

Infekce SARS-CoV-2

diagnostika

Prof. MUDr. Pavel Dřevínek, PhD



Ústav lékařské mikrobiologie
2. lékařské fakulty UK a
Fakultní nemocnice v Motole



19. března 2021

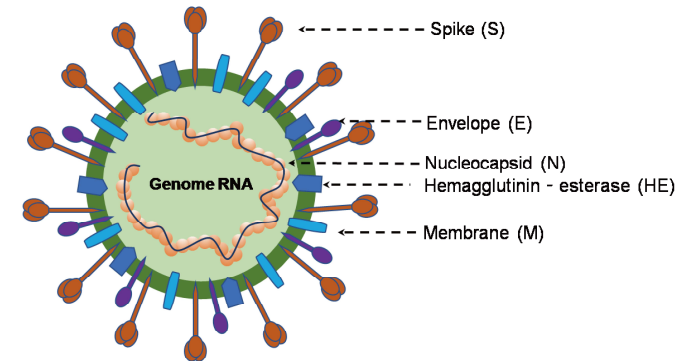
Jakou cestou laboratorně confirmovat akutní COVID-19

- **Přímý průkaz**

detekce nukleové kyseliny

detekce antigenu

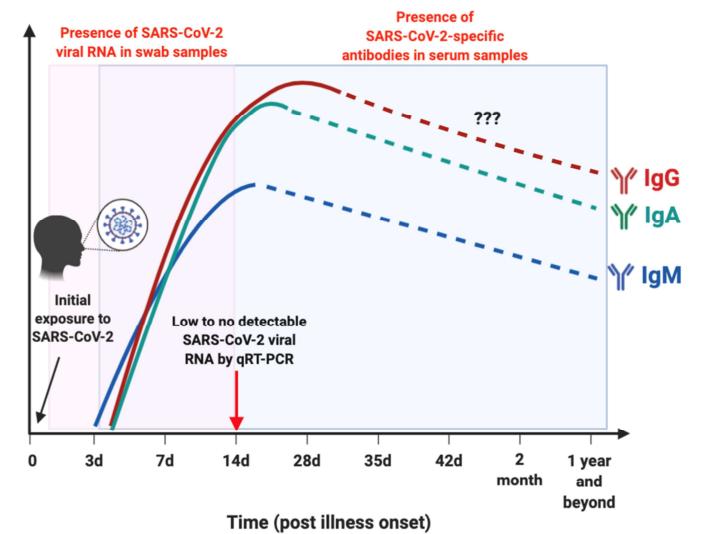
detekce virionů (kultivace)



- **Nepřímý průkaz**

detekce protilátek IgM, IgA, IgG

- diagnostika postcovidových komplikací
- stanovení prožité infekce při nálezu slabé positivity PCR
- stanovení protilátek po onemocnění, po očkování
- výběr dárců konvalescentní plazmy



Lee et al. Front Immunol. 2020.

Antigen a PCR: praktické aspekty

Antigen

v režimu POC (point-of-care)



15 min

PCR

1. Extrakce virové RNA



0,5 hod

2. RT-PCR



1,5 hod

v režimu POC



60 min

Antigen a PCR: aspekt citlivosti testů

Historická zkušenost s detekcí antigenu u chřipky:

*Table 2. Overall and Subgroup Analyses of Pooled Rapid Test Accuracy Estimates for Influenza A and B, by Index Test Type**

Index Test Type	Influenza A		Influenza B	
	Pooled Sensitivity (95% CrI), %	Pooled Specificity (95% CrI), %	Pooled Sensitivity (95% CrI), %	Pooled Specificity (95% CrI), %
Overall				
Traditional RIDTs (94 influenza A studies; 30 influenza B studies)	54.4 (48.9 to 59.8)	99.4 (99.1 to 99.7)	53.2 (41.7 to 64.4)	99.8 (99.7 to 99.9)
DIAs (18 influenza A studies; 17 influenza B studies)	80.0 (73.4 to 85.6)	98.3 (97.4 to 98.9)	76.8 (65.4 to 85.4)	98.7 (97.5 to 99.4)
Rapid NAATs (12 influenza A studies; 12 influenza B studies)	91.6 (84.9 to 95.9)	99.2 (98.6 to 99.7)	95.4 (87.3 to 98.7)	99.4 (98.9 to 99.8)

*RIDT ... rapid influenza diagnostic test
DIA digital immunoassay
NAAT ... nucleic acid amplification test*

Merckx et al. Annals of Int Medicine. 2017.

1. pro jaký účel jsou testy používány
2. jaký klinický materiál a jak odebrán (preanalytická část)
3. jaký konkrétní test kterého výrobce (analytická část)

1. Pro jaký účel jsou testy používány

Testování:	diagnostické	epidemiologické	preventivní
kdy provést	v době příznaků	v inkubační době	většinou opakovaně v definovaných intervalech, ale i jednorázově
u koho	příznaky onemocnění COVID-19	<ul style="list-style-type: none"> kontakty s nemocným COVID-19 návrat z epidemiologicky rizikové oblasti 	<ul style="list-style-type: none"> jedinec přijímán k hospitalizaci zaměstnanec v zařízeních sociálních služeb, LDN apod., klient zaměstnanec v kritické infrastruktuře státu ...
PCR	ano	ano	ano (každých 7 až 14 dní)
antigen	ano	ne	ne ? ano ? (každé 2 dny, 3 dny, každých 5 dní ?)

důvod diagnostický

Počet jedinců	591
- symptomatických	290
- asymptomatických	301
Odebíraný materiál	výtěr z nosohltanu

		PCR		
		pozitivní	negativní	
Antigen	pozitivní	124	0	124
	negativní	44	122	166
		168	122	290
Senzitivita		73,8 % (95% CI 66,7 - 79,9 %)		

důvod preventivní (a epidemiologický)

Počet jedinců	496
- symptomatických	0
- asymptomatických	496
Odebíraný materiál	výtěr z nosohltanu (PCR) a výtěr z nosu (antigen)

		PCR		
		pozitivní	negativní	
Antigen	pozitivní	41	0	41
	negativní	52	403	455
		93	403	496
Senzitivita		44,1 % (95% CI 33,8 - 54,8 %)		

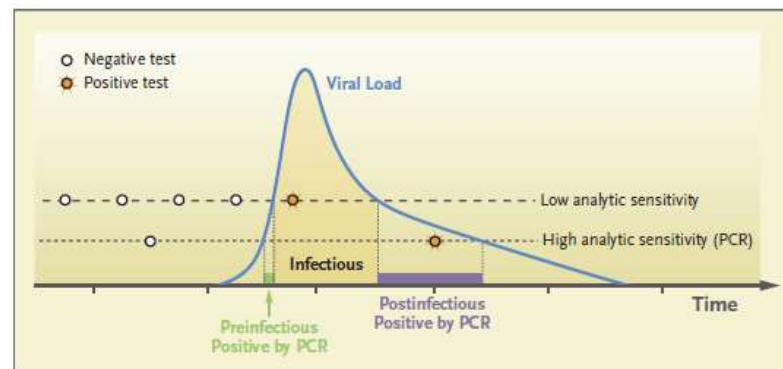
Den 0
Den 2



		antigen				
PCR pozitivní	Den 0	+	+	-	-	Senzitivita
	Den 2	+	-	+	-	
72		26	6	11	29	59,7 %

--> opakováním antigenního testu se zvyšuje jeho citlivost

Vlastní data. FN Motol 2021.



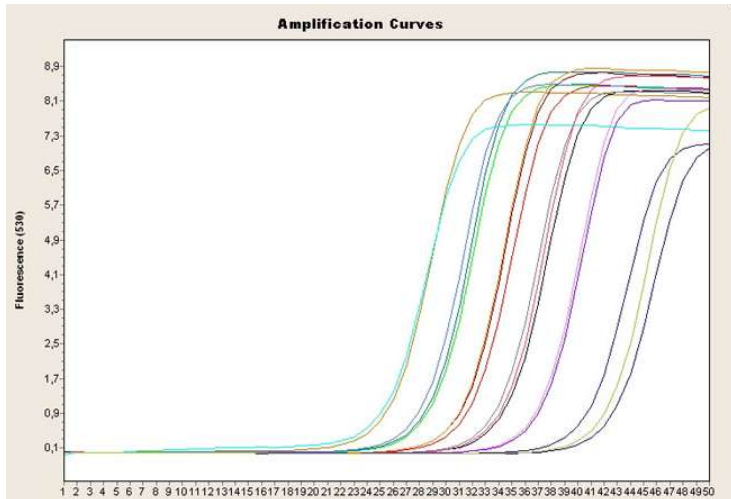
Mina et al. NEJM. 2020.

		antigen				
Den 0	PCR <u>silně</u> pozitivní	+	+	-	-	Senzitivita
Den 2		+	-	+	-	
	40	26	6	6	2	95 %
	PCR <u>slabě</u> pozitivní					
	32	0	0	5	27	15,6 %

--> vzorky PCR "silně pozitivní" jsou z 95 % pozitivní i antigenním testem do dvou dní od provedení PCR

--> slabou pozitivitu PCR nelze automaticky považovat za přehnanou citlivost metody a za klinicky bezvýznamný nález

Silná či slabá pozitivita PCR (hodnota Ct) a infekčnost



Hodnota Ct = cyklus PCR, kdy začíná narůstat PCR signál
čím je Ct hodnota nižší, tím více je detekovaného agens
ve vzorku

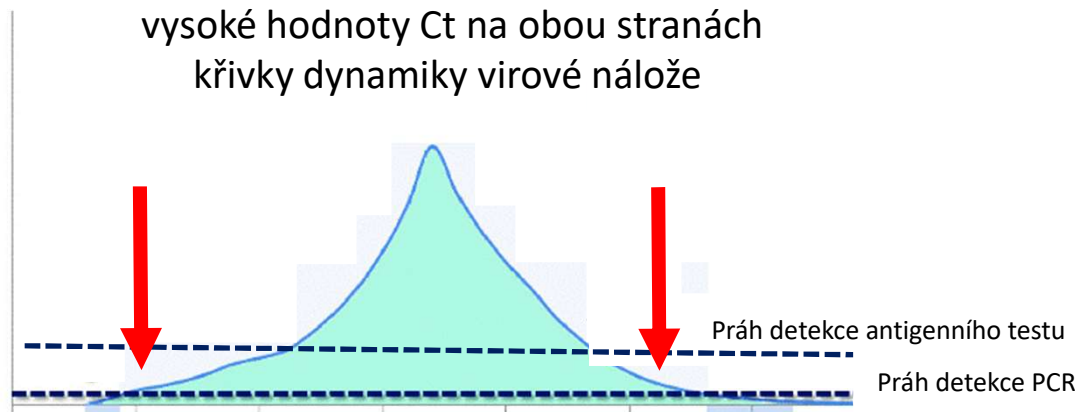
Ct	virová nálož (kopie/mL)	antigenní test	infekčnost pacienta
37	10^3	negativní	nepravděpodobná
33	10^4	negativní	méně pravděpodobná
30	10^5	negativní (většinou)	pravděpodobná
26	10^6	negativní / pozitivní	ano
22	10^7	pozitivní	ano
18	10^8	pozitivní	ano

G. Greub, Lausanne. Webinář ESCMID 2021

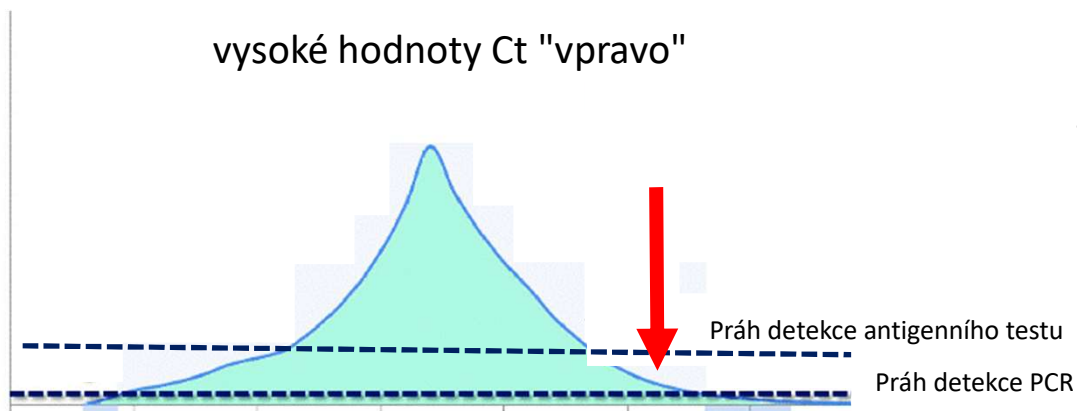
--> mezi hodnotami Ct 30 až 35 leží hranice infekčnosti jedince
(infekčnost určena k momentu provedení vyšetření)

--> pozitivita antigenního testu značí velkou virovou nálož
a infekčnost pacienta, ale jeho negativita ji úplně nevylučuje

Ještě poznámka ke slabé pozitivitě PCR



Ještě poznámka ke slabé pozitivitě PCR



--> pacient neinfekční, tj. je možné být bez obav, pokud lze vyloučit, že se pacient nenachází v úvodní fázi infekce a že se nejedná o pacienta v imunosupresi

CORRESPONDENCE

Duration of Culturable SARS-CoV-2
in Hospitalized Patients with Covid-19

Kim et al. 2021



21 pacientů
medián časového intervalu od začátku příznaků:
do negativy kultivace 7 dní
do negativy PCR 34 dní

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

CORRESPONDENCE



Shedding of Viable SARS-CoV-2 after Immunosuppressive
Therapy for Cancer

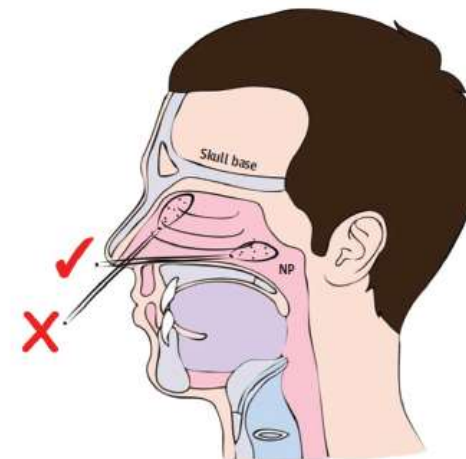
Aydillo et al. 2020



20 pacientů
časový interval od začátku příznaků:
do negativy kultivace až 61 dní
do negativy PCR až 78 dní

2. Jaký klinický materiál a jak odebrán

- **Horní cesty dýchací**
 - **Výtěr z nosohltanu**
 - **Výtěr z orofaryngu**
- **Dutina ústní**
 - Výtěr z nosu
 - orofaryngeální výplach (kloktání)
 - Sliny (plivání, slintání, houbičky)



The NP is back, not up.

Higgins. JAMA Otolaryngology. 2020.



Příklad srovnávací studie: antigen z nosu



Early View

Research letter

Head-to-head comparison of SARS-CoV-2
antigen-detecting rapid test with self-collected
anterior nasal swab *versus* professional-collected
nasopharyngeal swab

287 pacientů (s trváním příznaků v průměru 4,4 dní) = diagnostické testování

- a) výtěr z nosu - samoodběr
- b) výtěr z nosohltanu zdravotnickým personálem

39 pozitivních metodou PCR

- a) 29 antigen pozitivních výtěrem z nosu (citlivost 74 %)
- b) 31 antigen pozitivních výtěrem z nosohltanu (citlivost 80 %)

Příklad srovnávací studie: antigen ze slin



Letter to the Editor

Evaluation of the rapid antigen test Panbio COVID-19 in saliva and nasal swabs in a population-based point-of-care study

659 pacientů

- 265 asymptomatických
- 394 s příznaky (medián 3 dny)

- a) antigen z nosohltanu
- b) antigen z nosu
- c) antigen ze slin
- d) PCR z nosohltanu

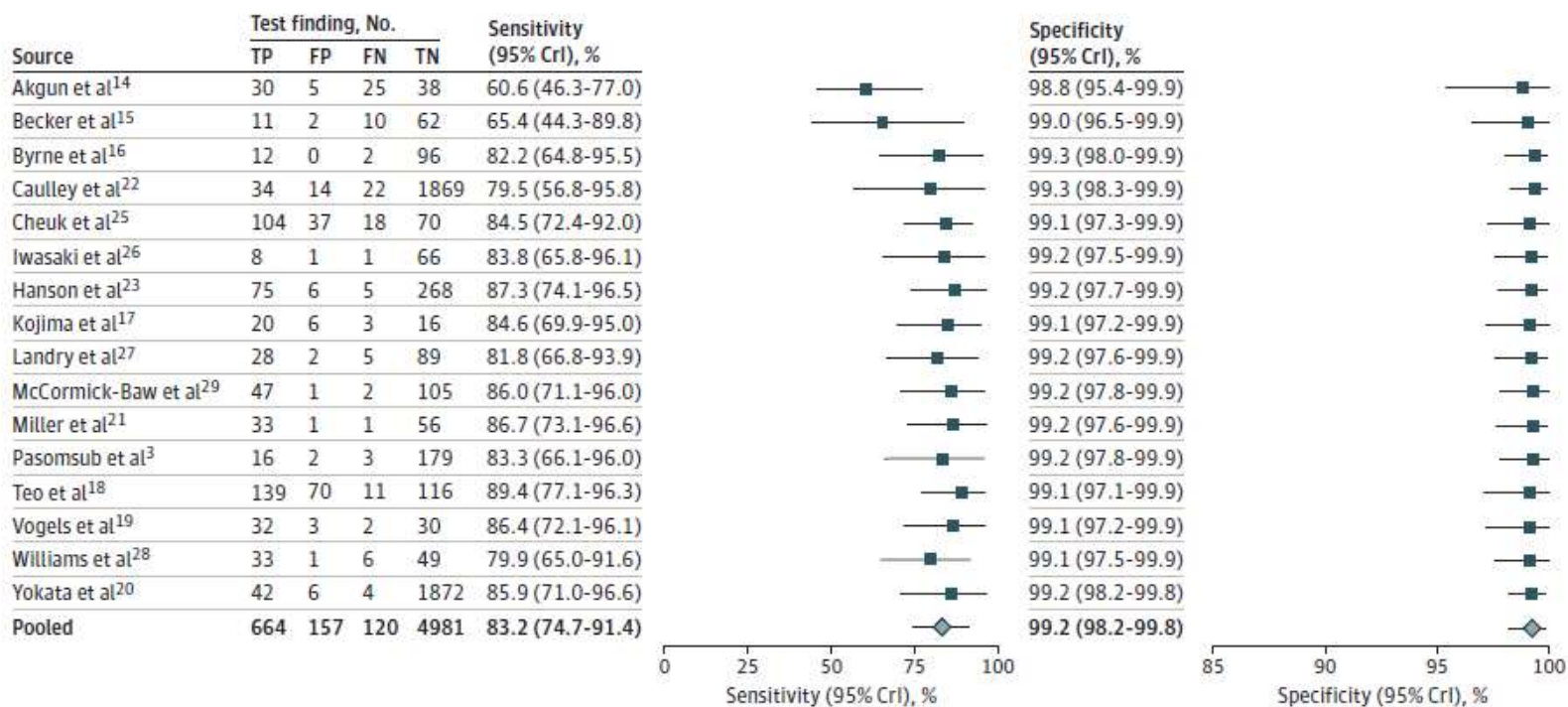
PCR pozitivita u 132 pacientů

Table 1
Performance of the Panbio COVID-19 antigen

Overall	TP
NP sample	76
Nasal sample	59
Saliva sample	28
Nasal+saliva	60
Nasal sample	
Symptomatic	51
Ct ≤ 25	43
Ct ≤ 30	48
Ct ≤ 35	51
Asymptomatic	8
Ct ≤ 25	8
Ct ≤ 30	8
Ct ≤ 35	8
Saliva sample	
Symptomatic	25
Ct ≤ 25	21
Ct ≤ 30	25
Ct ≤ 35	25
Asymptomatic	3
Ct ≤ 25	3
Ct ≤ 30	3
Ct ≤ 35	3

Metadata: PCR ze slin

Figure 3. Primary Meta-analysis Results for the Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Saliva Samples



--> PCR ze slin má přijatelnou citlivost; stává se alternativou k PCR z nosohltanu (u dětí)

3. Jaký konkrétní test kterého výrobce

Srovnání detekčního limitu POC antigenních testů

Test	Přístrojový limit detekce [ng]
Ecotest	0,125
SD Biosensor	1
Abbott	0,5
Lepu	0,25
Humasis	2,5
TestSeaLabs	2,5
Safecare	10

3. Jaký konkrétní test kterého výrobce

Srovnání detekčního limitu POC antigenních testů

Test	Přístrojový limit detekce [ng]
Ecotest	0,125
SD Biosensor	1
Abbott	0,5
Lepu	0,25
Humasis	2,5
TestSeaLabs	2,5
Safecare	10

Kalibrační řada přístrojově pozitivních testů



Závěrem

- Senzitivita metod přímé detekce v pořadí: PCR >>> antigenní test
- pozitivní antigenní test znamená infekčnost pacienta, ale negativita ji nevylučuje
- využití antigenního testu v situacích:
 - pacient s příznaky onemocnění, když PCR dg. není k dispozici (citlivost kolem 70 - 80 %)
 - kontrola infekčnosti jedince pro daný moment (citlivost kolem 75 %)
 - preventivní testování (citlivost jen kolem 40 - 45 %) --> vyžaduje frekventní opakování
- pečlivě zvažovat účel použití testu
- zásadní jsou věrohodné klinické validační studie, a to na konkrétní typ vyšetřovaného materiálu a konkrétní typ testu