

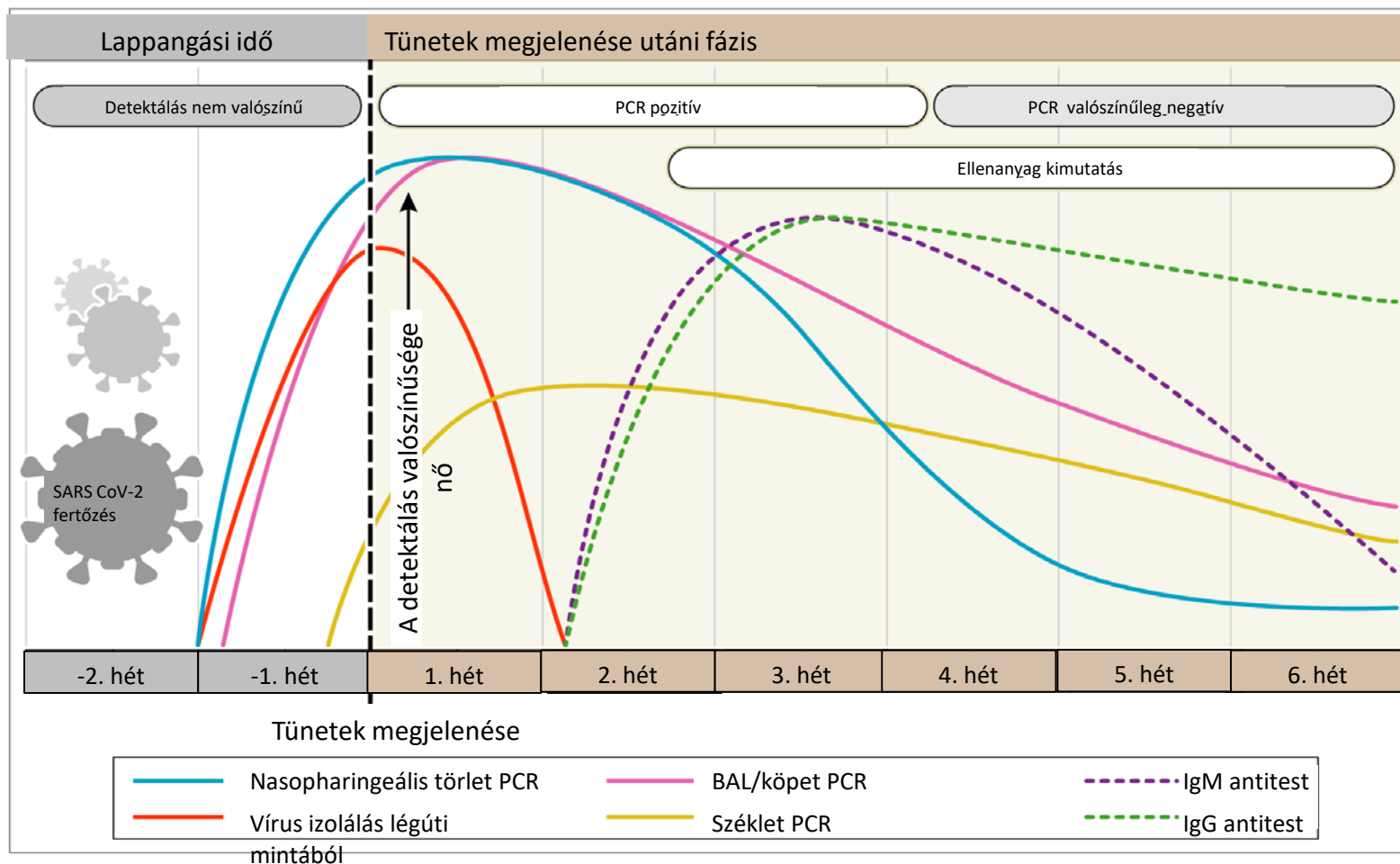
A COVID járvány kapcsán végzett diagnosztikai vizsgálatok tapasztalatai



Barcsay Erzsébet
Nemzeti Népegészségügyi Központ

Foglalkozás-egészségügyi Fórum
Budapest, 2021. szeptember 15.

A SARS-CoV-2 fertőzés kimutathatósága



Sethuraman *et al.* JAMA. 2020;323(22):2249-2251. alapján



Mintavétel 1.

- A megbízható eredmény alapja a megfelelő mintavétel:
 - felsőlégúti minta: orr- és garattörlet
nasopharingeális minta
 - alsólégúti minta: BAL
trachea leszívás
 - előtte 2-3 órával nem eszik-iszik, nem mos fogat, nem rágózik



<https://www.nnk.gov.hu/index.php/koronavirus-tajekoztato/673-orr-garat-mintavetel-folyamata>

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>

<https://www.gov.uk/government/publications/wuhan-novel-coronavirus-guidance-for-clinical-diagnostic-laboratories/laboratory-investigations-and-sample-requirements-for-diagnosing-and-monitoring-wn-cov-infection>

Mintavétel 2.

- Egyéb: nyál minta → RT-PCR
Ag gyorseszteszt
↓
 - kevésbé kellemetlen mintavétel
 - nem szükséges képzett személyzet
 - EU-ban vita a nyál alapú Ag tesztekéről



Mintavétel 3.

- VTM – **V**írus **T**ranszport **M**édium

Vírus inaktiválót tartalmaz – nem fertőző anyag

- lamináris boksztól mentes mintafeldolgozás

- vírus tenyésztésre nem alkalmas

Inaktiválót nem tartalmaz – magasabb biztonsági szint

- vírus izolálás → referencia laboratóriumi tevékenység, kutatás



Mintavétel 4.

- Probléma:
 - Nem kötelező, hogy fájjon!
 - Elégtelen mintavétel → kevés sejt → álnegatív eredmény

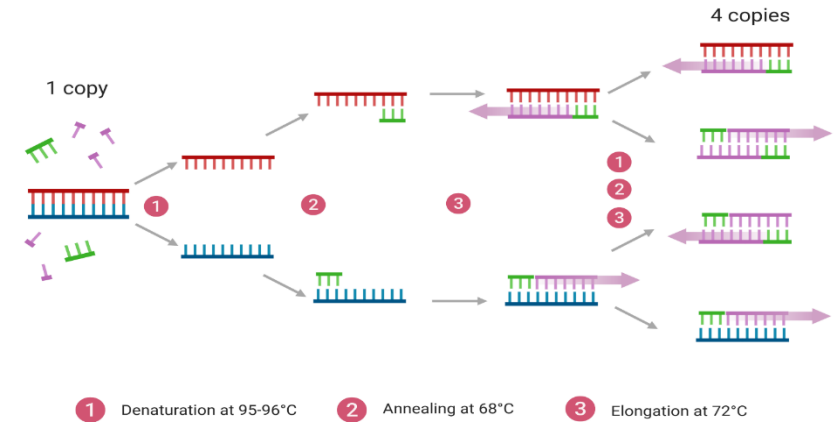


Leletre: *„A beküldött mintában kevés sejtes elem volt található, ami befolyásolhatja az eredményt.”*

- PCR belső kontroll

I. RT-PCR - A „gold standard” módszer

- Real time RT-PCR = reverz-transzkripciós polimeráz láncreakció (szemikvantitatív)
- Ciklus szám a kit leírás szerint (nem lesz minden pozitív)
- A PCR előtt **nukleinsav tisztítási** lépés (hosszabb laborfolyamat, megfelelő eszköz és szakember szükséges, költséges)





Nukleinsav tisztítási módszerek 1.

Célja: a klinikai mintában (sejtes VTM) jelenlévő vírus eredetű RNS izolálása

→ RT-PCR

- **Kézi tisztítás**

- Kb. 20 minta/óra, hosszú folyamat
- Szakképzett laboratóriumi dolgozót igényel

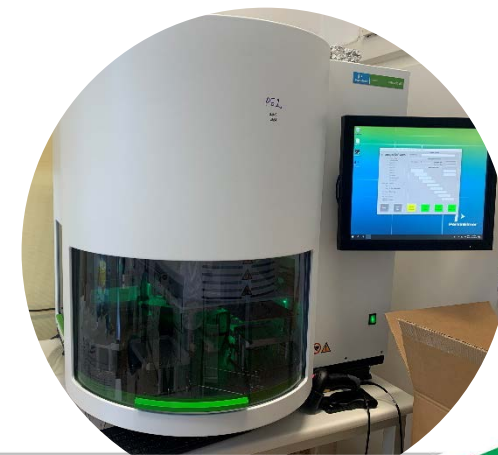




Nukleinsav tisztítási módszerek 2.

■ Nukleinsav tisztító automatával

- NNK-ban alkalmazott automaták:
 - QiaSymphony (Qiagen) – 96 minta egyidejűleg (6 óra)
 - Chemagic (Perkin Elmer) – 96 minta egyidejűleg (1 óra)
 - MagnaPure (Roche) – 24/32/96 minta egyidejűleg (1 óra)
- Reagens és eszköz igény
- Költséges
- Nagy mintaszámok feldolgozásánál szükséges

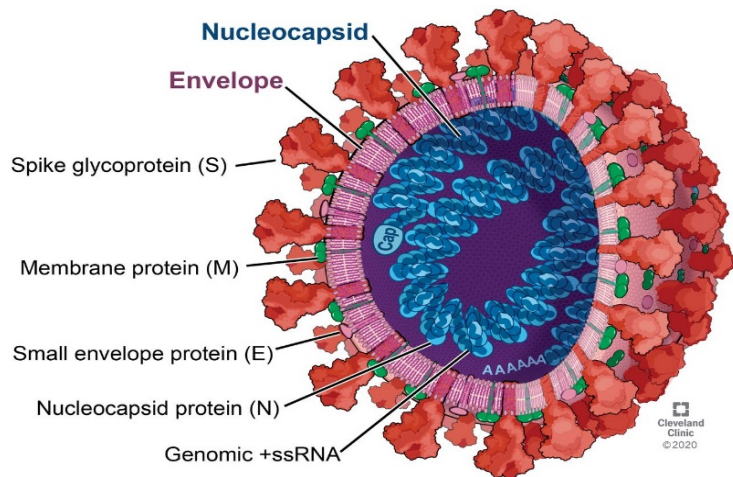




SARS-CoV-2 genetikai állománya és génjei



S	1273aa
E	75aa
M	222aa
N	419aa



Leggyakrabban keresett gének:

N (vírus nukleoprotein)

E (burokfehérje)

RdRp (ORF1ab-n kódolt; RNS-függő RNS polimeráz enzim – a vírus szaporodásáért felel)

S (felszíni tüske „spike” protein) – változékony!



I. RT-PCR - A „gold standard” módszer

- Kitekben általában 2 gén párhuzamos kimutatása
- Konzervatív régiók! - mutációk főleg az S proteinen
- Belső kontroll: **humán RnaseP** (ún. house-keeping gén)
Célja: a minta tartalmaz-e elegendő humán sejtet a víruskimutatáshoz, megfelelően történt-e a mintavétel?



I. RT-PCR - A „gold standard” módszer

- A PCR eredményének értékelése és interpretálása szakértelmet igényel
- SARS-CoV-2 vírusvariánsok vizsgálata - változékony régióra tervezett primerek

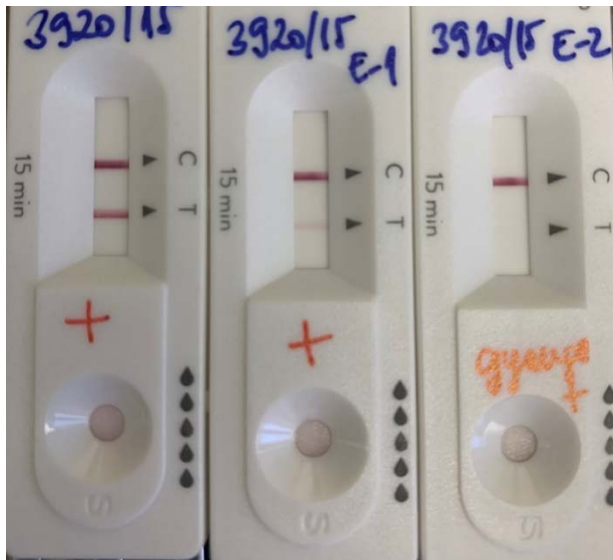
II. Point-of-care (POC) RT-PCR tesztek

- Előny:
 - egyedi minták gyors (60-120 min) molekuláris vizsgálata
 - egymástól független indítás
 - a „hagyományos” RT-PCR rendszerekkel megegyező érzékenység
 - nem igényel speciális szaktudást
- Hátrány : kis kapacitás – egyszerre 1-4 minta futtatható

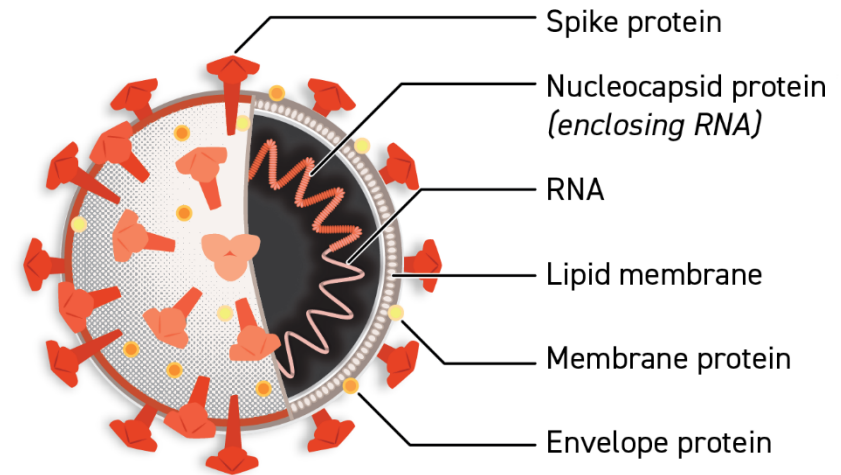


III. Antigén gyors tesztek 1.

- Leggyakrabban kimutatott antigén az N protein
- Néhány gyors teszt esetében nem ismert



SARS-CoV-2





Antigén gyors tesztek 2.

WHO guideline: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/point-of-care-testing.html>

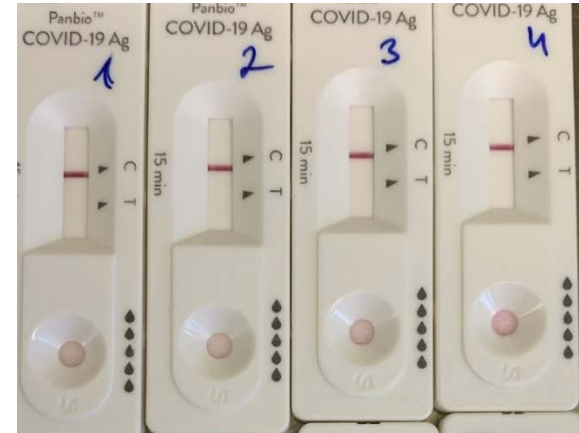
Az NNK-ban számos különböző antigén gyors teszt került összehasonlításra egyidejű mintavétel gyors teszt és PCR céljából (NNK által kiadott eljárásrend szerint) – gyors teszt a terepen leolvasva, PCR elvégzése az NNK-ban.



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
Darabszám	101	18	103	99	87	97	124	98	201	566	41	121
Szenzitivitás	46%	33,3%	57,8%	52,5%	57,6%	55,6%	47,2%	54,3%	63,5%	49,2%	36,8%	72%
Specifitás	98%	100%	89,7%	98,3%	100%	78,7%	100%	100%	100%	99,7%	95,5%	100%
Pontosság	72,3%	77,8%	75,7%	79,8%	83,9%	70,1%	84,7%	78,6%	86,6%	83,2%	68,3%	89%
Pozitív prediktív érték	95,8%	100%	81,3%	95,5%	100%	60,6%	100%	100%	100%	98,9%	87,5%	100%
Negatív prediktív érték	64,9%	75%	73,2%	75,3%	79,4%	75%	82,2%	71,2%	82,5%	80,2%	63,6%	85%
Fals negatív aránya	54%	67%	42%	48%	42%	44%	52,8%	45,6%	36,5%	50,8%	63,2%	28%
Fals pozitív aránya	2%	0%	10%	2%	0%	21%	0%	0%	0%	0,3%	4,5%	0%

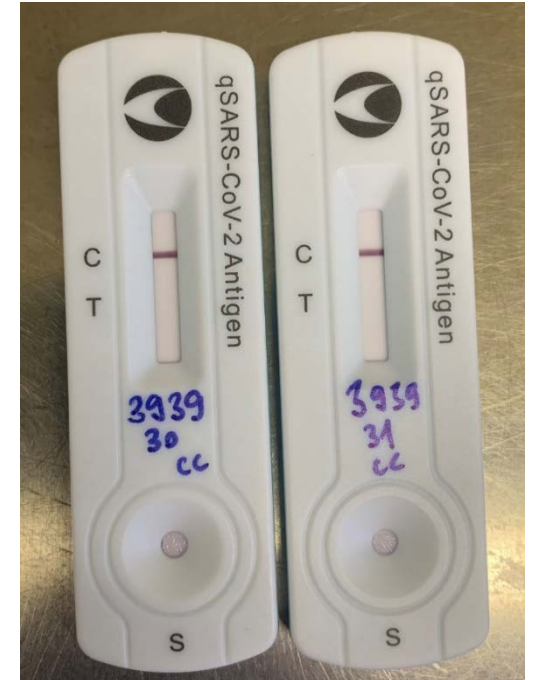
Antigén gyors tesztek 4.

- 15 perces leolvasási időkeret – OMSz
- Hosszabb idő után leolvasva fals eredmény!
- Mintavételi nehézségek – nasopharyngeális minta
→ gyakorlat!
- Gyenge pozitív mintákat nehéz „tapasztalatlan szemmel” leolvasni



Antigén gyorsesztek 5.

- **Előny:** rövid időn belül (15 perc), helyszínen eredmény
- **Hátrány:** alacsony kópiaszám mellett fals negatív eredményt adhat





Antigén gyors tesztek 6.

Eljárásrend 2020.11.07.

- Ag gyors teszt pozitív → SARS-CoV-2 fertőzés igazolt
- Ag gyors teszt negatív → újabb minta VTM-be → RT-PCR teszt

- Magas prevalencia mellett negatív Ag teszt → RT-PCR
- Alacsony prevalencia mellett pozitív Ag teszt → RT-PCR

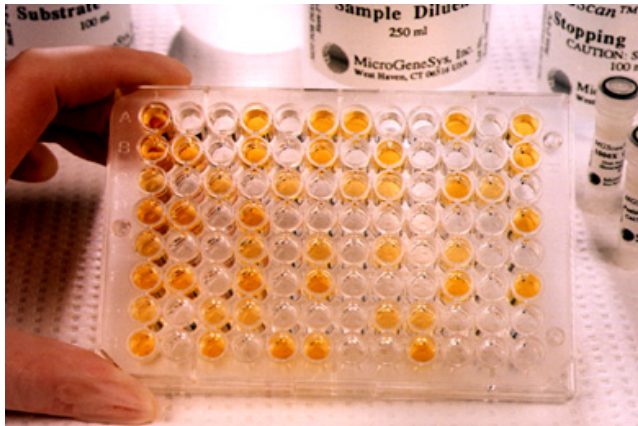


IV. Ellenanyag tesztek

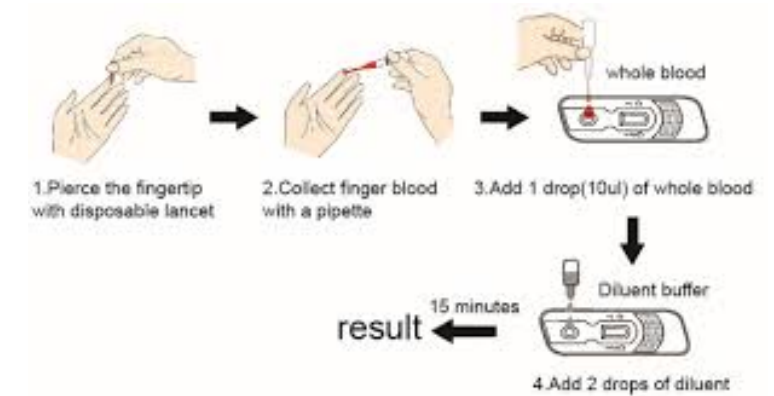
- Laboratóriumi tesztek (ELISA, CLIA, stb) ↔ gyors tesztek



megbízhatóbbak
kvantitatív

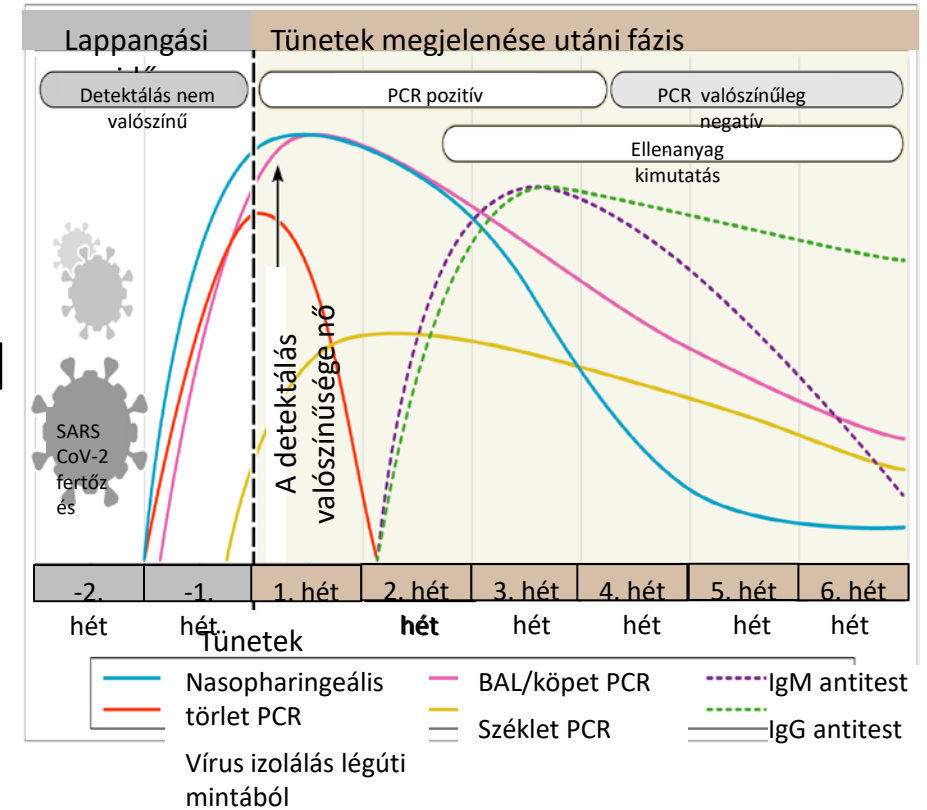


kevésbé érzékenyek
kvalitatív



Ellenanyag tesztek 2.

- IgM – tünetek megjelenése után 5-6 nappal
– rövid ideig
- IgG – tünetek megjelenése után 8-14 nappal
– max 6 hónapig?

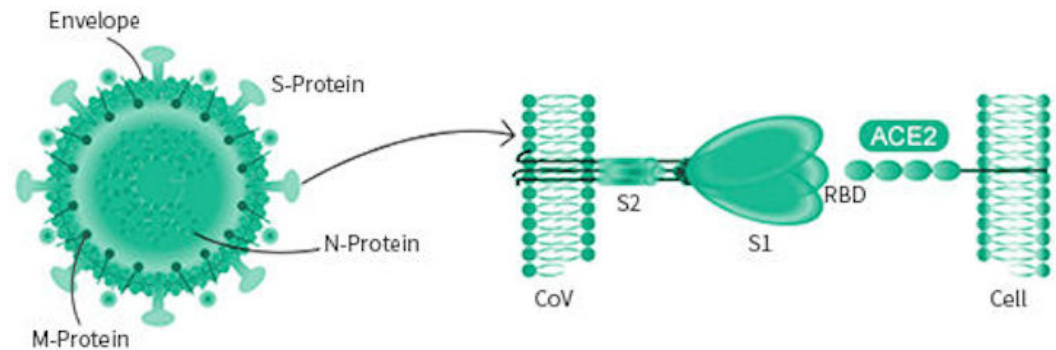


- Az ellenanyag vizsgálatok nem alkalmasak a fertőzés/fertőzőképesség korai diagnosztizálására!
- Szeroprevalencia vizsgálatok

Ellenanyag tesztek 3.

különböző típusú reagensek állnak rendelkezésre,
attól függően, hogy a koronavírus melyik fehérjéjével
(nukleokapszid, tüske fehérje, receptor-kötő domén/RBD)
szemben termelődött ellenanyag detektálására képes az adott teszt

ACE2 –angiotenzin-konvertáló enzim 2 receptor





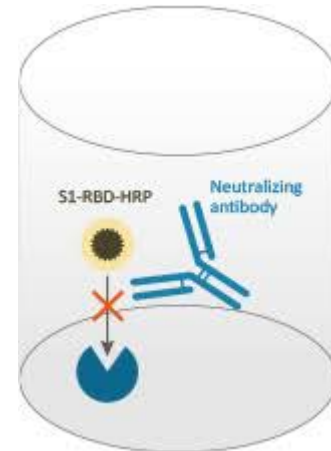
Ellenanyag tesztek 4.

- Oltás utáni ellenanyag válasz - nagyságrenddel magasabb
- IgG ellenanyagszint \neq védettség mértéke
- A különböző ellenanyag tesztek eredménye nem összehasonlíthat



Ellenanyag tesztek 5.

- Vírusneutralizáló ellenanyagok
nincs még deklarálnva, hogy milyen ellenanyag szint jelent védettséget
- Vírus neutralizációs tesztek (VNT)
 - élő SARS-CoV-2, BSL-3, 2-4 nap
 - helyettesítő/surrogate sVNT - tisztított RBD, ACE2 receptor
ELISA módszer, BSL-2, 1-2 óra



Köszönöm

az NNK COVID-19 laboratórium összes munkatársának a már több mint 1 év óta végzett emberfeletti, megfeszített munkát





**Köszönöm a megtisztelő
figyelmet!**

barcsay.erezsebet@nnk.gov.hu