

Imunoanalytické metody v diagnostice infekce SARS-Cov-2

Ivo Lochman¹, Josef Kratochvíla²

¹Spadia Lab a KBO LF OU, Ostrava, ²SEKK, Pardubice

Aplikace imunoanalytických metod v diagnostice infekce SARS-CoV-2

Imunoanalytické metody se používají k:

- 1. Průkazu/stanovení vybraných antigenů a segmentů RNA viru na sliznicích, v tělních tekutinách a tkáních**
- 2. Průkazu/stanovení protilátek proti vybraným antigenům viru v krvi nebo v séru**
- 3. Jsou součástí testů buněčné imunity prokazujících reaktivitu imunokompetentních buněk periferní krve proti antigenům viru (IGRA)**
- 4. Stanovení analytů provázejících infekci SARS-CoV-2, a to především k prognózování průběhu infekce (CRP, IL-6, dimery, počty lymfocytů atd.)**

Metody jsou dostupné většinou jako ve formě EIA

- 1. Manuálních testů (především ELISA)**
- 2. Testů prováděných na analyzátoch**
- 3. POCT (laterální imunochromatografie)**
- 4. Multiplexových testů (imunoblot, ALBIA)**

Předpoklady pro kvalitní laboratorní diagnostiku

- Klinické laboratoře provádějící diagnostiku by měly být **akreditovány** nebo **autorizovány**
- **Akreditace** znamená formální potvrzení odborné způsobilosti provádět specifické úlohy činnosti nebo ověření a uznání takového oprávnění. Při jejím udělování se postupuje podle norem a uděluje ji úředně pověřený akreditační orgán (či instituce). **Akreditace se provádí na základě auditu.** V ČR je jedinou takovouto akreditační autoritou (národním akreditačním orgánem) **ČIA.**
- **Autorizace** je proces získávání souhlasu s provedením nějaké operace/činnosti. Autorizační institucí pro klinické laboratoře je v ČR např. **NASKL.**
- Akreditované a autorizované laboratoře by měly pracovat s **validovanými a verifikovanými metodami.** Týká se to i metod a systémů **POCT!** Metodou se rozumí generický popis logického organizování činnosti použité při měření.

Přehled doporučení/požadavků pro validaci/verifikaci

Analytická validace je ověření, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití.

Verifikace je potvrzení, že jsou požadované funkční vlastnosti dosaženy

1. Každá laboratoř by měla srovnáním s jinými metodami a jejich výkonnostními charakteristikami a analytickými znaky doložit, že jejich metoda dává relevantní výsledky.
2. Každá laboratoř by si měla ověřit přesnost a pravdivost a klinickou použitelnost použité metody. Přístup bude záviset na tom, jak se s daty nakládá (**kvalitativní a kvantitativní metody**)

Klinická validace/verifikace

3. Podle ISO 15189, směrnic CAP a nového nařízení IVDR z roku 2017 je výrobce odpovědný za klinické ověření testu označeného CE/FDA. Národní legislativa však může formulovat další požadavky.
4. Validace nové metody se přednostně provádí ve velkých multicentrických studiích zahrnujících diagnostické vzorky klinicky charakterizovaných pacientů a kontrol. Takové studie by měly umožnit odhadnout míru pravděpodobnosti (LR) specifickou pro výsledky daného testu.

Kvalitativní a kvantitativní metody

Kvalitativní metody jsou metody, jejichž hodnocení provádíme našimi čidly. Výsledky jsou udávány adjektivy (negativní, pozitivní, hraniční, neprůkazné atd.).

Kvantitativní metody jsou metody, jejichž výstupem je číslo. Často jsou ale jejich výsledky uváděny v kategoriích, a pak mohou být řazeny mezi metody kvalitativní.

V akreditované laboratoři by měly být metody prováděné laboratoří verifikovány hlavně u **diagnostik (testovacích souprav)** se značkou **CE IVD**, popř. **FDA**. Jejich verifikace je pak jednodušší než u metod, které tuto značku nemají, a proto by mělo být jejich používání preferováno.

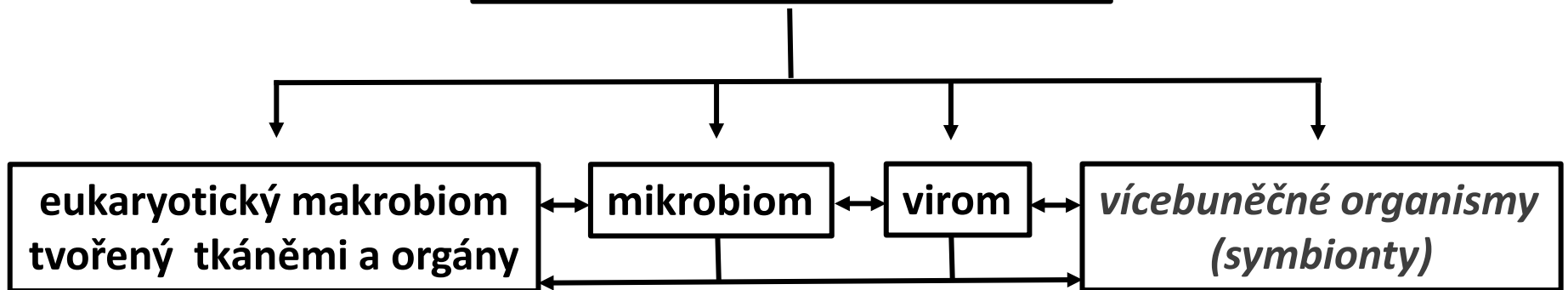
Certifikace

- **Certifikace shody** výrobku/metody je postup, který osvědčuje shodu jeho vlastností s technickou specifikací, to znamená, že osvědčuje jeho kvalitu minimálně na tzv. obvyklé úrovni.
- Certifikace laboratoře je certifikací shody laboratoře s požadavky specifikované normy, např. ISO 15189.
- Certifikát je potvrzení vydané třetí stranou vztahující se k produktům, systémům nebo osobám. dokládá splnění požadavků na užitné vlastnosti a na bezpečnost výrobku, které jsou požadované danou technickou specifikací. **(výrobce/laboratoř).**
- Certifikační orgány musí být akreditovány. Akreditaci provádí **ČIA.**

Problémy při aplikaci imunoanalytických metod v diagnostice infekce SARS-CoV-2

- Jsou používány nedostatečně validované a verifikované metody, které nejsou mezi sebou harmonizovány.
Harmonizace je proces, který snižuje rozptyl výsledků laboratorních měření ve zdravotnických laboratořích na úroveň pod klinicky významnými limity.
- Imunitní systém je chápán jen jako imunitní systém eukaryotické části člověka realizovaný buňkami vzniklými v průběhu hematopoézy. Nedocněna je funkce fylogeneticky mnohem starších mechanismů, se kterými IS při udržování homeostázy spolupracuje, včetně jeho mikrobiomu a viromu.
- Je kladen důraz především na analytickou specifičnost a klinickou citlivost používaných laboratorních metod a tápe se u jejich klinické výpovědní hodnoty.
- Je opomíjen fakt, že funkce imunitního systému, ani jeho nástrojů, mezi něž patří i protilátky není založena na přísné specifičnosti.
- Proto je častá nevhodná indikace testů a následně špatná interpretace jejich výsledků.
- Často jsou pak činěna při boji s infekcí SARS-CoV-2 a následným onemocněním COVID-19 nevhodná opatření (snahy o nemožné).

Člověk je holobiont (superorganismus)



Systémy makrobiomu

respirační	krycí	oběhový
kosterní	svalový	reprodukční
trávicí	močový	endokrinní
imunitní	nervový	

Život a homeostáza holobiontu je závislá na správné funkci buněk, z něhož je složen

Funkce buněk závisí na adekvátní výživě

Buňky produkují do svého okolí látky, které ukazují na stav jejich metabolismu a funkcí

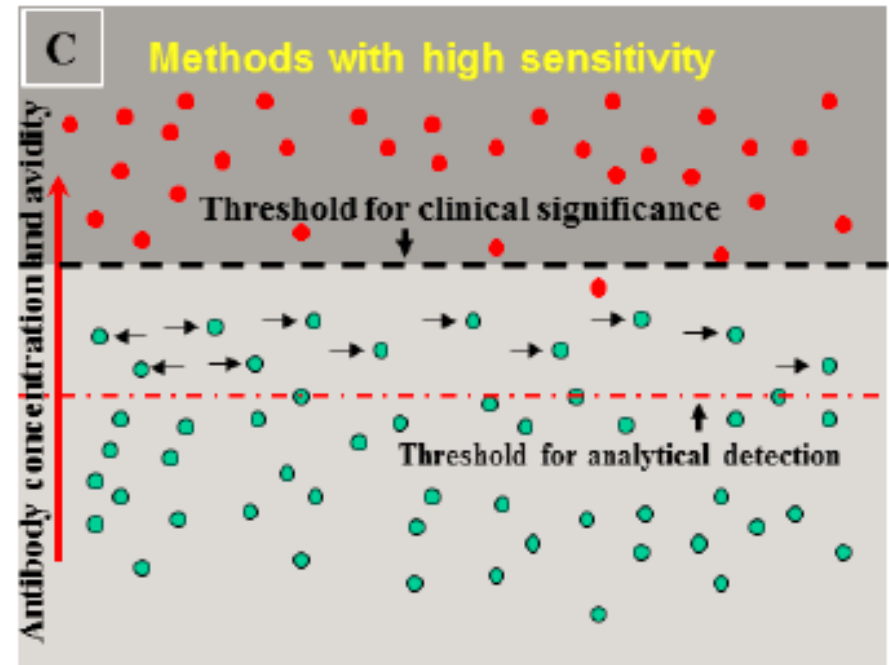
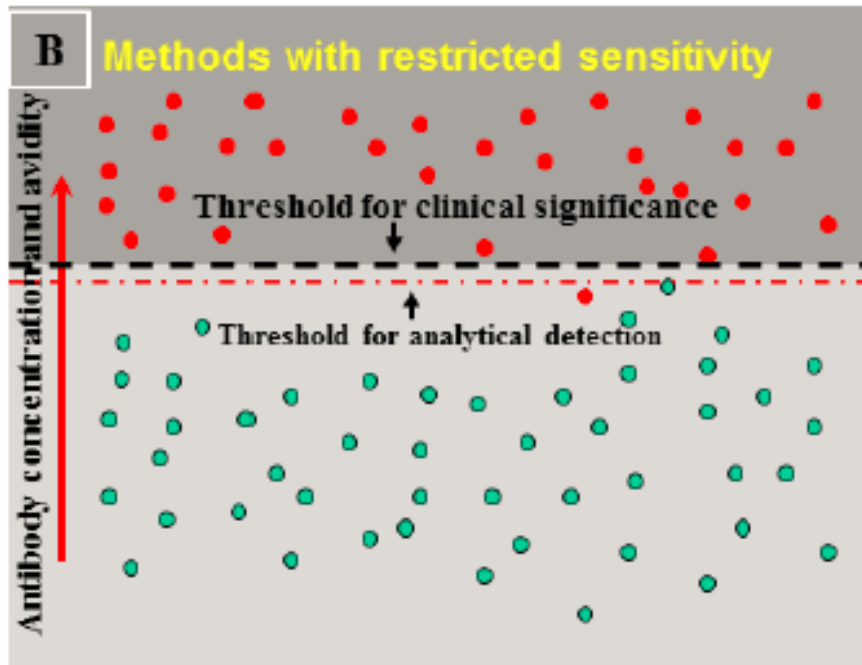
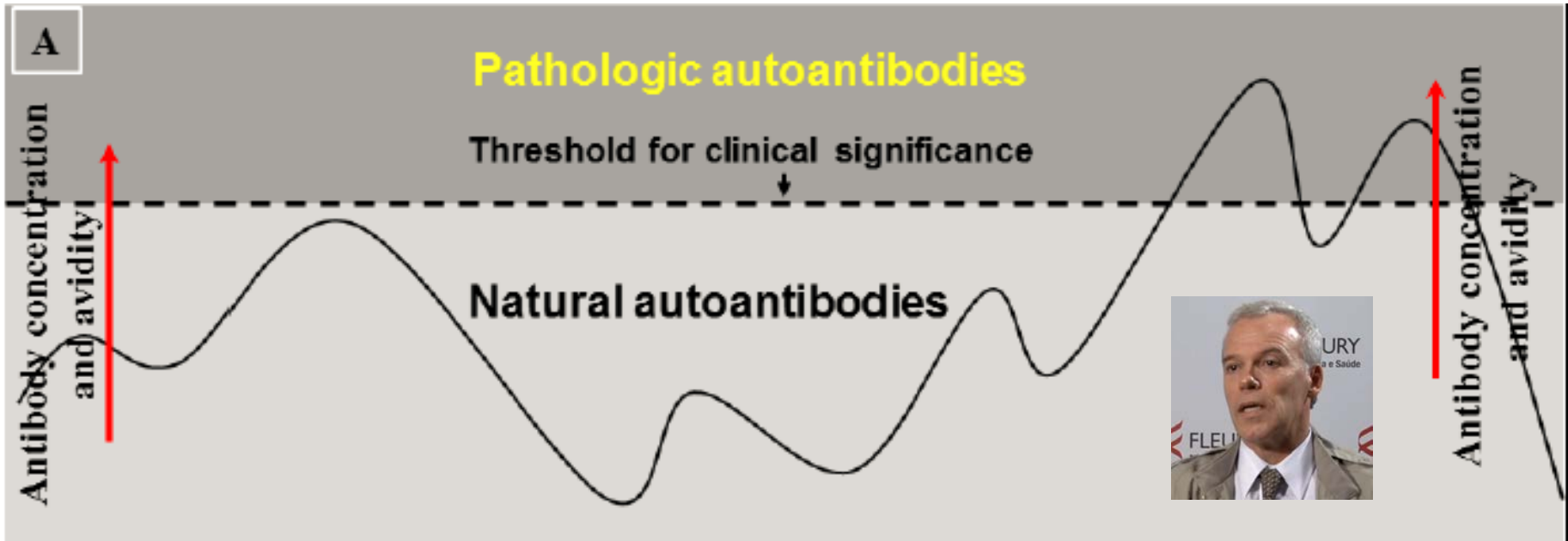
Metabolity s m.h. <1500 kDa se nazývají **metabolom** daného prostoru (biologického vzorku tkáně, séra, dechu apod.)

Analýza metabolomu se stává důležitým diagnostickým pomocníkem u řady nemocí

Složky holobiontu i systémy makrobiomu spolu vzájemně komunikují a ovlivňují se. Žijí v symbióze. Cílem je udržovat **homeostázu** celého superorganismu.

Problémy při aplikaci imunoanalytických metod v diagnostice infekce SARS-CoV-2

- Jsou používány nedostatečně validované a verifikované metody, které nejsou mezi sebou harmonizovány.
Harmonizace je proces, který snižuje rozptyl výsledků laboratorních měření ve zdravotnických laboratořích na úroveň pod klinicky významnými limity.
- Imunitní systém je chápán jen jako imunitní systém eukaryotické části člověka realizovaný buňkami vzniklými v průběhu hematopoézy. Nedocněna je funkce fylogeneticky mnohem starších mechanismů, se kterými IS při udržování homeostázy spolupracuje, včetně jeho mikrobiomu a viromu.
- Je kladen důraz především na analytickou specifičnost a klinickou citlivost používaných laboratorních metod a tápe se u jejich klinické výpovědní hodnoty.
- Je opomíjen fakt, že funkce imunitního systému, ani jeho nástrojů, mezi něž patří i protilátky není založena na přísné specifičnosti.
- Proto je častá nevhodná indikace testů a následně špatná interpretace jejich výsledků.
- Často jsou pak činěna při boji s infekcí SARS-CoV-2 a následným onemocněním COVID-19 nevhodná opatření (snahy o nemožné).



převzato z Andrade L.E.C.: Autoantibody testing and methodological platforms: a story with several versions
 Presentation on on 12th Dresden Symposium on Autoantibodies, 2015

Problémy při aplikaci imunoanalytických metod v diagnostice infekce SARS-CoV-2

- Jsou používány nedostatečně validované a verifikované metody, které nejsou mezi sebou harmonizovány.
Harmonizace je proces, který snižuje rozptyl výsledků laboratorních měření ve zdravotnických laboratořích na úroveň pod klinicky významnými limity.
- Imunitní systém je chápán jen jako imunitní systém eukaryotické části člověka realizovaný buňkami vzniklými v průběhu hematopoézy. Nedocněna je funkce fylogeneticky mnohem starších mechanismů, se kterými IS při udržování homeostázy spolupracuje, včetně jeho mikrobiomu a viromu.
- Je kladen důraz především na analytickou specifičnost a klinickou citlivost používaných laboratorních metod a tápe se u jejich klinické výpovědní hodnoty.
- Je opomíjen fakt, že funkce imunitního systému, ani jeho nástrojů, mezi něž patří i protilátky není založena na přísné specifičnosti.
- Proto je častá nevhodná indikace testů a následně špatná interpretace jejich výsledků.
- Často jsou pak činěna při boji s infekcí SARS-CoV-2 a následným onemocněním COVID-19 nevhodná opatření (snahy o nemožné).

Imunitní systém a jeho funkce

IS je homeostatický systém, který s *ostatními homeostatickými systémy* zajišťuje vnitřní integritu a vnější individualitu organismu

analytická

- prostřednictvím svého aparátu **přijímá signály** z vnějšího i vnitřního prostředí organismu, jehož homeostázu zajišťuje, **které musí vyhodnocovat**
- chová se při tom jako **systém informační**, tzn., že má určitý rozsah, ve kterém dokáže reagovat
- rozhoduje nejen **kvalita**, ale i **kvantita** signálů, **prostor** a **čas** ve kterém a po který působí

• vzhledem k tomu, že se IS rozhoduje na základě vyhodnocení několika signálů v daném prostoru a čase, není jeho logika kategoriální ale je **pravděpodobnostní** (Leng Q, Bentwich Z. 2002)

• **funkce IS není založena na přísné specifičnosti** (Zinkernagel RM, 2002)

výkonná

směřuje k zachování a obnovení narušené homeostázy.



Děje se tak:

- **reparací** poškozených buněk
- odstraněním poškozených buněk nebo cizorodého materiálu v procesu **fagocytózy**, který je provázen vždy **zánětem**
- **izolací** cizorodého materiálu (např. vznik cyst)
- **adaptací** na nové prostředí (symbióza).

Problémy při aplikaci imunoanalytických metod v diagnostice infekce SARS-CoV-2

- Jsou používány nedostatečně validované a verifikované metody, které nejsou mezi sebou harmonizovány.
Harmonizace je proces, který snižuje rozptyl výsledků laboratorních měření ve zdravotnických laboratořích na úroveň pod klinicky významnými limity.
- Imunitní systém je chápán jen jako imunitní systém eukaryotické části člověka realizovaný buňkami vzniklými v průběhu hematopoézy. Nedocněna je funkce fylogeneticky mnohem starších mechanismů, se kterými IS při udržování homeostázy spolupracuje, včetně jeho mikrobiomu a viromu.
- Je kladen důraz především na analytickou specifičnost a klinickou citlivost používaných laboratorních metod a tápe se u jejich klinické výpovědní hodnoty.
- Je opomíjen fakt, že funkce imunitního systému, ani jeho nástrojů, mezi něž patří i protilátky není založena na přísné specifičnosti.
- Proto je častá nevhodná indikace testů a následně špatná interpretace jejich výsledků.
- Často jsou pak činěna při boji s infekcí SARS-CoV-2 a následným onemocněním COVID-19 nevhodná opatření (snahy o nemožné).

Nejčastější chyby při aplikaci imunoanalytických metod v diagnostice SARS-CoV-2 infekce

- Výsledky stanovování protilátek ani testy buněčné imunity nelze často správně interpretovat bez znalosti anamnézy
- Testy prováděné z krve (séra, plasmy) nemusí vždy korelovat se stavem analyzovaných entit na sliznicích – hlavní vstupní cestě SARS-CoV-2.
- Ag a PCR testy na průkaz/stanovení virus specifických Ag nebo segmentů RNA viru vypovídají o něčem jiném než testy stanovující protilátky proti komponentám viru nebo funkční reaktivitu proti těmto komponentám buněčnými testy (IGRA). Jiná je proto i interpretace jejich výsledků.
- Nelze stanovit dostatečnou obecně platnou koncentraci sérových protilátek proti komponentám SARS-CoV-2 ani reaktivitu v buněčných testech, která by zaručovala, že jedinec bude bezpečně chráněn při opakovaném styku s tímto virem a infekce proběhne zcela bezpříznakově nebo jen s mírnými příznaky.
- Protilátkové a buněčné testy prováděné z krve jsou často jedinou možností, jak lze pomoci potvrdit zpětně na základě anamnézy, zda se vyšetřovaný jedinec se SARS-CoV-2 setkal a ten mohl způsobit pozorované potíže.

BIOUHAN™

HIT-180 Analysis System

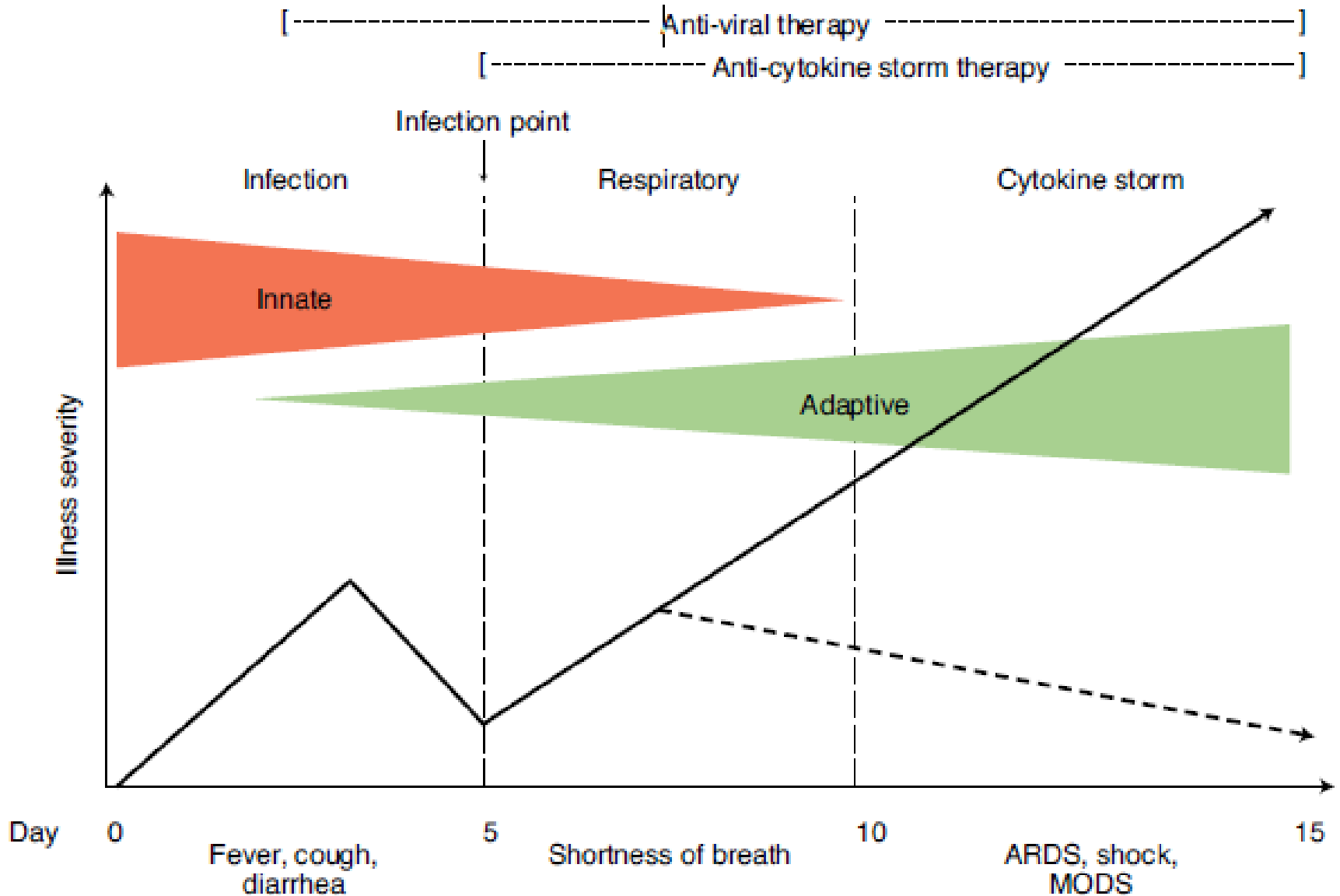


SARS-CoV-2 N antigen POCT

- rychlý a vysoce citlivý a levný POCT test na bázi fluorescence
- balení diagnostik po 25 vzorcích
- kvantitativní výsledek v pg/ml za 15 minut
- 3 druhy vzorků: sérum/plasma, výtěr z nosu a kapilární krev z prstu
- odečítání výsledku pomocí levného analyzátoru
- export výsledku do počítače a LIS nebo do mobilu
- detekční limit rekombinantního N proteinu je 4 pg/ml
- limit detekce SARS-CoV-2 viru ve výtěrech je 20 CTID₅₀/ml
- ve srovnání s PCR je jeho citlivost 37 ct
- senzitivita testu je 91,12%
- specificita testu je: 99,71%
- dostupná je dnes i souprava pro stanovení anti-spike protilátek



The COVID-19 inflection point of illness.

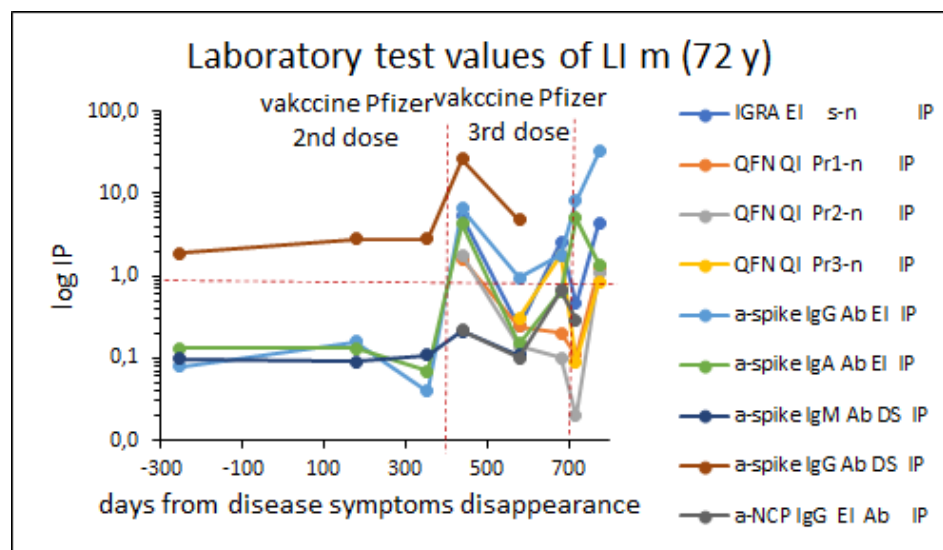
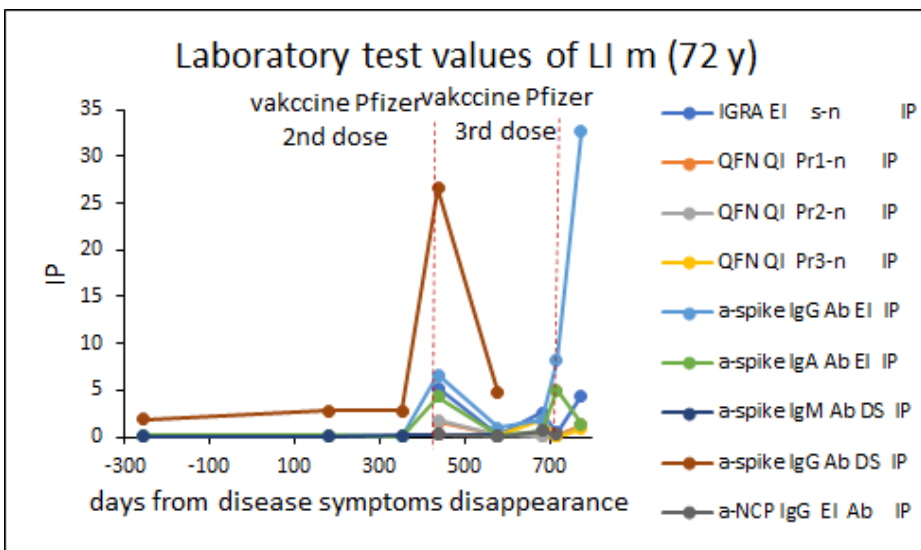


Literatura -Naše příspěvky k dané problematice

- Lochman I, Kratochvíla J, Friedecký B.: Laboratorní diagnostika COVID-19. Klin Biochem Metab 2020; 28/49(3): 103-111.
- Friedecký B, Kratochvíla J: Laboratorní aspekty COVID-19. Diagnostika, epidemiologie, prognóza pacientů. Klin. Biochem. Metab., 28 (49), 2020, No. 3, p. 97–105.
- Lochman I: Příspěvek k laboratorní diagnostice COVID-19. Alergie 2021; 23(1): 58-59.
- Lochman I, Kratochvíla J: Výhled v laboratorní diagnostice COVID-19. Úvaha. FONS 2021; 31(1): 12-14.
- Friedecký B, Kratochvíla J: Harmonizace v klinických laboratořích. Pojmy a problémy. Metrologická návaznost, standardizace, harmonizace. Klin. Biochem. Metab., 27 (48), 2019, No. 3, p. 116–123.
- Plzák Z, Kratochvíla J, Friedecký B, Šprongl L.: Doporučení pro validace a verifikace postupů laboratorních vyšetření ve zdravotnických laboratořích. Klin. Biochem. Metab., 29 (50), 2021, No. 2, p. 78-83.
- Friedecký B, Kratochvíla J: Informace o spolehlivosti detekce SARS-CoV-2. A kde je získat?, FONS 2022; 32(1): 21-23.

**ID: 7 LI, age: 72 years, gender: M, day of symptoms manifestation: 20.12.2019
vaccine: Pfizer, date of 2nd dose: 8.2.2021, date of 3rd dose 12.11.2022**

date of blood withdrawal	days from 2nd vaccine dose	days from 3rd vaccine dose	days from sympt. disapp.	IGRA EI s-n IP	QFN QI Pr1-n IP	QFN QI Pr2-n IP	QFN QI Pr3-n IP	a-spike IgG Ab EI IP	a-spike IgA Ab EI IP	a-spike IgM Ab DS IP	a-spike IgG Ab DS IP	a-NCP IgG EI Ab IP	Neutra LISA %IH	a-spike IgG Ab EI QVAC IP
10.4.2019	-670	-947	-254					0,08	0,13	0,10	1,9			
16.6.2020	-237	-514	179					0,16	0,13	0,09	2,8			
7.12.2020	-63	-340	353					0,04	0,07	0,11	2,79			
3.3.2021	23	-254	439	5,27	1,60	1,80		7,26	2,64	0,213	26,58	0,22	93,4	33,23
21.7.2021	163	-114	579	0,24	0,24	0,14	0,31	1,17	0,15	0,11	4,75	0,1	42,7	1,20
2.11.2021	267	-10	683	2,62	0,20	0,10	1,80	0,58	0,16			0,67	27,0	0,55
6.12.2021	301	24	717	0,46	0,11	0,02	0,09	8,6	4,87			0,29	99,2	158,36
2.2.2022	359	82	775	4,40	1,25	1,10	0,85	7,77	1,33			0,16	98,5	33,96



ID: 4 DZ, age 76 years, gender M

symptoms beginning: 15.12.2019

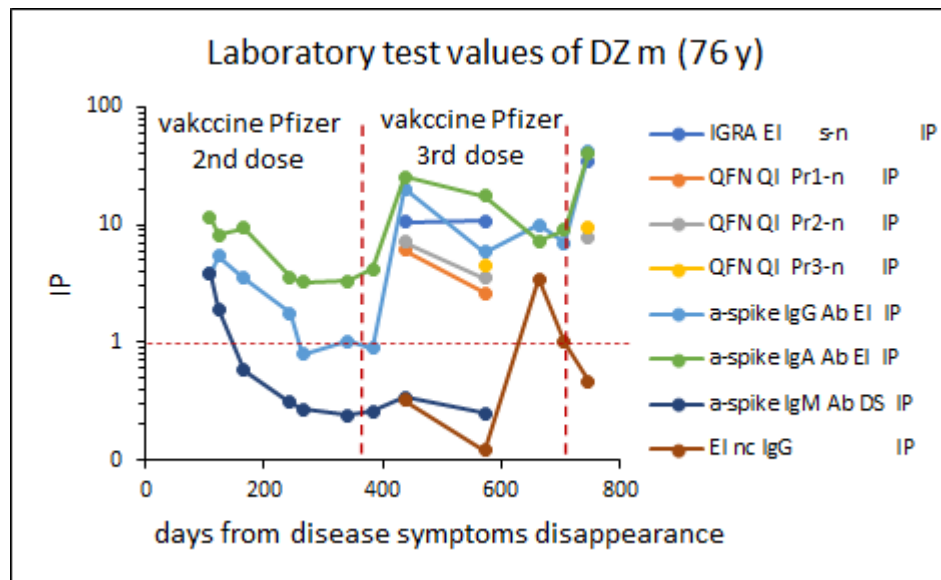
symptoms disappear.: 20.12.2019

disease course: moderate

vaccine: Pfizer

vaccine 2nd dose: 8.2.2021

vaccine 3rd dose: 7.12.2021



date of blood withdrawal	days from 2nd vaccine dose	days from 3rd vaccine dose	days from sympt. disapp.	IGRA EI s-n IP	QFN QI Pr1-n IP	QFN QI Pr2-n IP	QFN QI Pr3-n IP	a-spike IgG Ab EI IP OD	a-spike IgA Ab EI IP	a-spike IgM Ab DS IP	EI ncp IgG IP	EI NeutralI SA %IH	a-spike IgG Ab EI IP QVAC
7.4.2020	-307	-609	109					3,81	11,54	3,88			
22.4.2020	-292	-594	124					5,40	8,15	1,93			
3.6.2020	-250	-552	166					3,53	9,47	0,58			
19.8.2020	-173	-475	243					1,76	3,62	0,31			
10.9.2020	-151	-453	265					0,79	3,26	0,27			
25.11.2020	-75	-377	341					1,02	3,29	0,24			
6.1.2021	-33	-335	383					0,9	4,20	0,26			
2.3.2021	22	-280	438	10,64	6,15	7,10		8,60	7,53	0,34	0,32	99,50	244,50
14.7.2021	156	-146	572	10,81	2,60	3,55	4,50	7,94	7,35	0,25	0,12	99,50	53,74
14.10.2021	248	-54	664					8,60	7,29		3,48		>12
25.11.2021	290	-12	706					8,60	7,53		1,00	98,30	26,62
4.1.2022	330	28	746	34,63		7,65	9,30	8,60	7,53		0,47	99,30	55,83
6.4.2022	422	120	838					7,55	7,56				10,48

Děkuji za pozornost

Návrh postupu v diagnostice a terapie časných stadií SARS-CoV-2 infekce a COVID-19

Jedinec u sebe pozoruje příznaky infekce SARS-CoV-2.

1. Informuje neprodleně svého lékaře. Potvrdí-li lékař jeho podezření, odešle ho neprodleně na provedení PCR nebo verifikovaného antigenního testu, prodělal-li jedinec již v minulosti COVID-19, pak také na vyšetření IgG protilátek proti spikovým, popř. i nucleocapsidovým antigenům SARS-CoV-2. Výsledky PCR by měly být udávány alespoň v ct a výsledky Ag testů a protilátek v indexech positivity, aby mohla být posuzována velikost případné virové nálože, resp. hladina protilátek. Výsledek PCR a antigenních testů musí být znám ještě týž den, kdy byly vzorky odebrány.
2. Po návratu domů zahájí jedinec ihned sanitaci nosohltanu, aby se odstraňoval případný virus ze sliznice. Tato sanitace by měla probíhat alespoň 3x denně (ráno, v poledne a večer) a pokud se přítomnost viru prokáže, tak alespoň po 2-3 dny. Zároveň by měla začít podpůrná léčba vitamíny C, D a ionty Zn a Se. Postižený jedinec by měl také vypít několikrát denně malé, cca 200 ml, množství tekutin (voda, čaj). Desinfekci ústní dutiny lze provádět např. Joxem.
3. Potvrdí-li PCR nebo Ag testy přítomnost viru, pak lékař předepíše antivirotikum, které prokazatelně inhibuje replikaci viru (např. ivermectin, montelukast), které začne jedinec ihned užívat. V této situaci není pravděpodobně již vhodné anebo je nutné pečlivě zvážit, zda aplikovat preparáty, které mají své antivirové působení založené především na stimulaci imunitního systému (např. isoprinosin). Pomoci ale mohou přípravky tlumící zánětlivou imunitní odpověď na sliznicích, které užívají běžně např. astmatici (montelukast, seretide aj.).

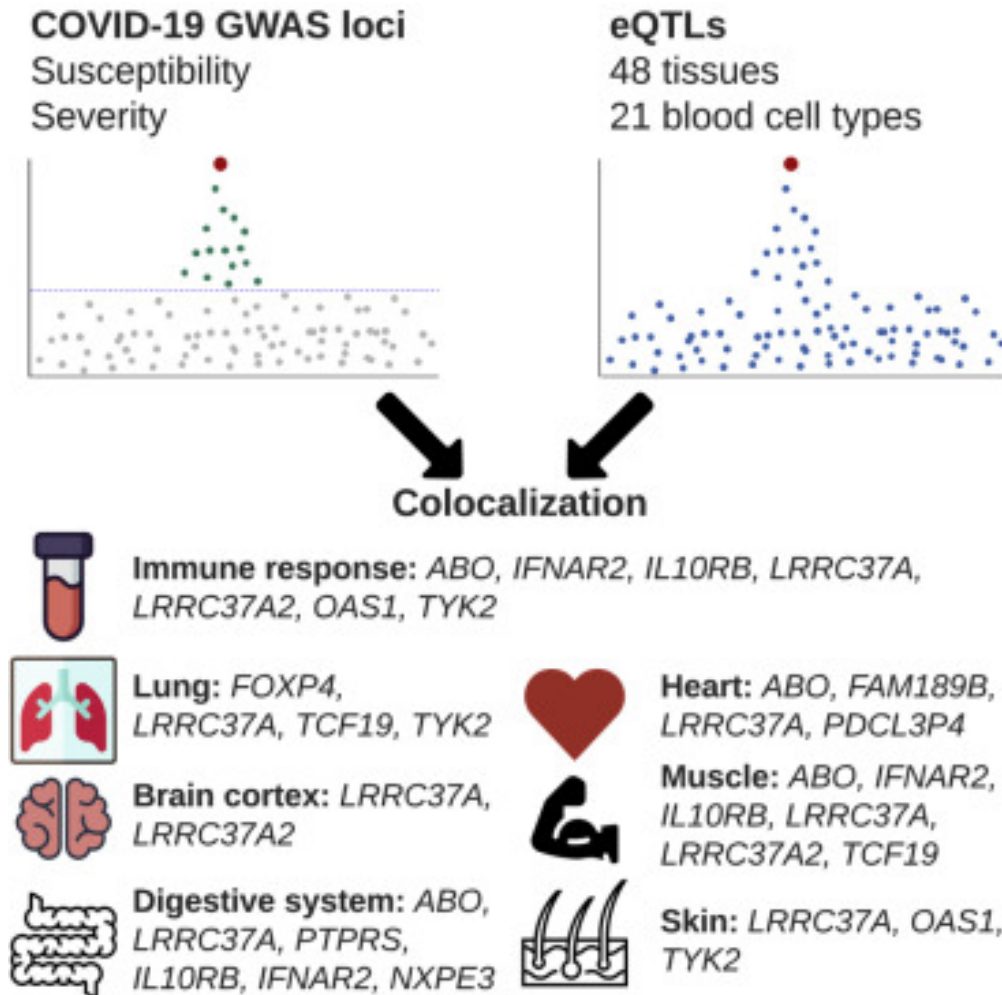
Příznaky COVID-19 by měly během 2 – 3 dní ustoupit, nemusí však zcela vymizet pozitivita viru ve stěrech z nosohltanu. Jedinec by se měl ale v každém případě dále řídit pokyny svého ošetřujícího lékaře.

EARLY OUTPATIENT PROTOCOL³

Ivermectin¹	0.2–0.4 mg/kg per dose (take with or after meals) — one dose daily, take for 5 days or until recovered* Use upper dose range if: 1) in regions with more aggressive variants; 2) treatment started on or after day 5 of symptoms or in pulmonary phase; or 3) multiple comorbidities/risk factors.
Fluvoxamine	50 mg twice daily for 10–14 days. Add to ivermectin if: 1) minimal response after 2 days of ivermectin; 2) in regions with more aggressive variants; 3) treatment started on or after day 5 of symptoms or in pulmonary phase; or 4) numerous comorbidities/risk factors. Avoid if patient is already on an SSRI.
Nasopharyngeal Sanitation	Steamed essential oil inhalation 3 times a day (i.e. vapo-rub) and/or chlorhexidine/benzydamine mouthwash gargles and Betadine nasal spray 2–3 times a day
Vitamin D3	4,000 IU/day
Vitamin C	500–1,000 mg twice a day
Quercetin	250 mg twice a day
Zinc	100 mg/day
Melatonin	10 mg before bedtime (causes drowsiness)
Aspirin	325 mg/day (unless contraindicated)
Pulse Oximeter	Monitoring of oxygen saturation is recommended (for instructions please see page 2 of this file)

Vnímatavost k SARS-CoV-2 a tíži onemocnění COVID-19 je asociovaná s genetickými variantami ovlivňujícími expresi genů v různých tkáních.

D'Antonio M. et al: Cell Reports 2021; 37(7): 110020, NOV 16



- Bylo identifikováno 23 genomových lokusů ukazujících na asociace s onemocněním COVID-19
- Kolokalizované signály GWAS a eQTL asociují s expresí 20 genů v 62 tkáních
- Celkem 45 % signálů GWAS se nekolokalizuje s eQTL v krvi nebo plicích
- Podrobné genetické mapování identifikuje předpokládané kauzální varianty v lokusech COVID-19 GWAS

GWAS - Genome-wide association study, eQTLs - expression quantitative trait locuses