



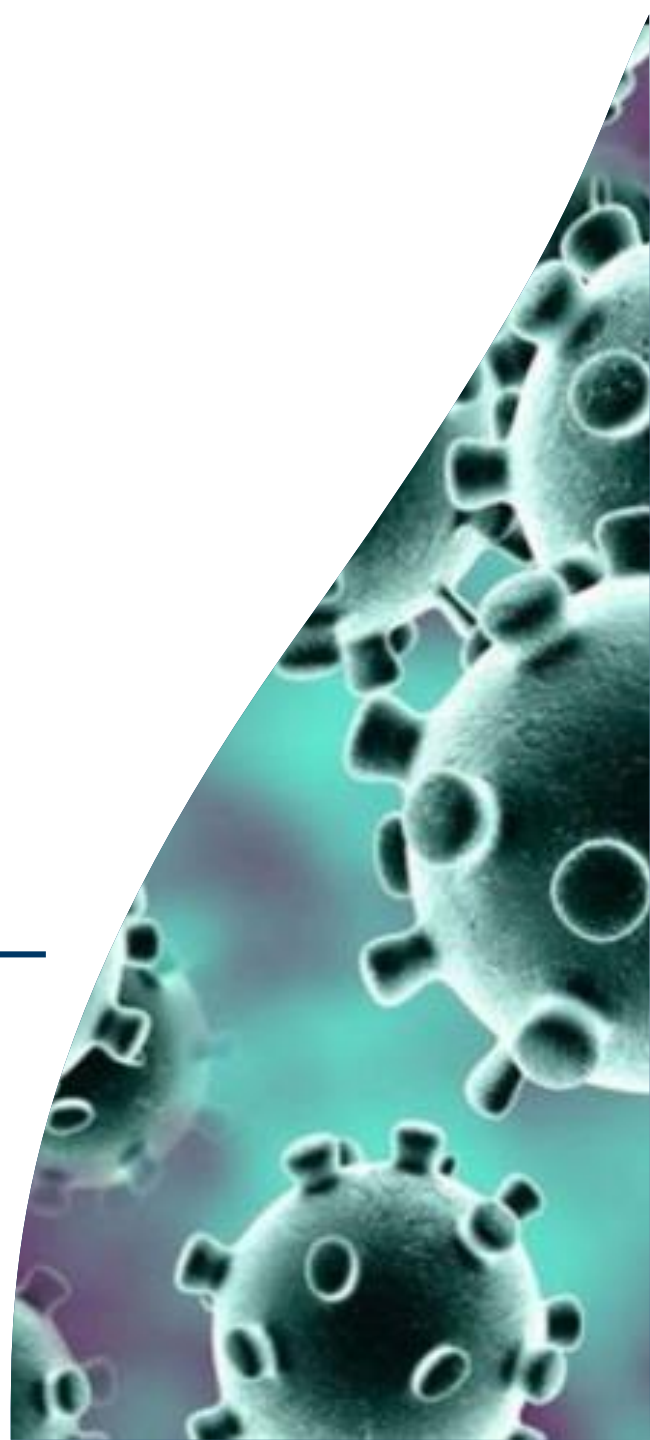
SARS-COV-2 LABORATOORNE DIAGNOSTIKA

03.02.2021

Paul Naaber, MD PhD

SYNLAB Eesti Infektsioonhaiguste valdkonna juht

Tartu Ülikooli bio-ja siirdemeditsiini instituudi kaasprofessor



SARS-CoV-2 sissejuhatus

- Viirus: SARS-CoV-2
- Haigus: COVID-19
 - Levik: peamiselt piisknakkusena, võimalik ka esemete kaudu
 - Inkubatsioon mediaan 6 p (enamik vahemikus 2-12 p, max 14 p)
 - Nakkusohtlik: kerged juhud kuni 10 p peale sümptome; enamik nakatumisi vahemikus u 2 päeva enne kuni 2 peale algust
 - U 1/3 nakatunutest asümptomaatilised

SARS-CoV-2 laboratoorne tuvastamine

- Viiruse **RNA** määramine **PCR** meetodil patsiendi hingamisteedest
 - Sobib haiguse esmaseks diagnostikaks
- Viirusvastaste **antikehade** määramine verest
 - Määrab organismi vasturektsiooni – sõltub immuunsüsteemist
 - Diagnoos hilises haigusstaadiumis (PCR juba negatiivne) 2.-3 haigusnädal
 - Seroepidemioloogilised uuringud
- **Antigeeni** testid – SYNLABis ei tehta
 - Analüütiline tundlikkus madalam kui PCR – sobib kui viiruse hulk on kõrge
 - Diagnostiline aken piiratud – Ag testiga määratav viiruse hulk vaid haiguse alguses

Testi tundlikkus ja spetsiifilisus

- **Tundlikkus**

- kui palju test suudab määrata positiivseid juhtumeid
- mida tundlikum test, seda vähem valenegatiivseid juhtumeid

- **Spetsiifilisus**

- kui palju määratud positiivsetest juhtudest on tegelikult õiged positiivsed
- mida spetsiifilisem test, seda vähem valepositiivseid juhtumeid

Analüütiline tundlikkus/spetsiifilisus

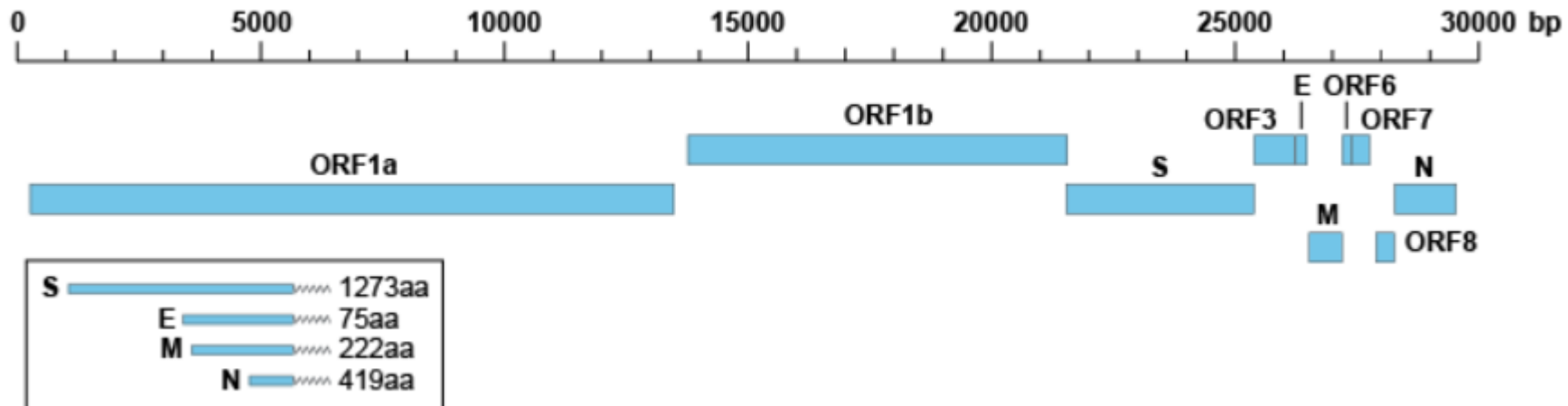
- kui täpselt test määrab proovis ainet vms (näit SARS-CoV-2 RNA) milleks test on ette nähtud

Kliiniline tundlikkus/spetsiifilisus

- kui täpselt me testiga diagnoosime haigust

SARS-CoV-2 RNA PCR

Testid määravad SARS-CoV-2 viirusele spetsiifilisi RNA lõike viiruse S, E, M, N, ORF geenides, tavaliselt 1-3 markerit testis



SYNLABis ThermoFisher test

- Määrab kolme geneetilist markerit: ORF1ab, N ja S geenides
- Positiivne tulemus kui vähemalt 2 markerit on Ct <37

SARS- CoV-2 PCR analüütiline tundlikkus

- Sõltub veidi testist/markergeenist
- Viiruse mutatsioon võib mõjutada

ThermoFisher test

- Tundlikkus Ca 300 viiruskoopiat/ml
- Kliinilise proovi 10 000 x lahjendusel ikka pos tulemus, 100 000 x piiripealne tulemus
- Ühe geeni (S-geen) mutatsiooni korral toimib ikka:
 - N ja ORF1ab signaal olemas

Dilution	ThermoFisher		
	S gene Ct	N gene Ct	ORF1ab Ct
E10-1	19,5	19	19,5
E10-2	21,5	23	23
E10-3	25	25,5	25,5
E10-4	30	30	30
E10-5	Inconc	Inconc	Inconc
E10-6	NEG	NEG	NEG
E10-7	NEG	NEG	NEG

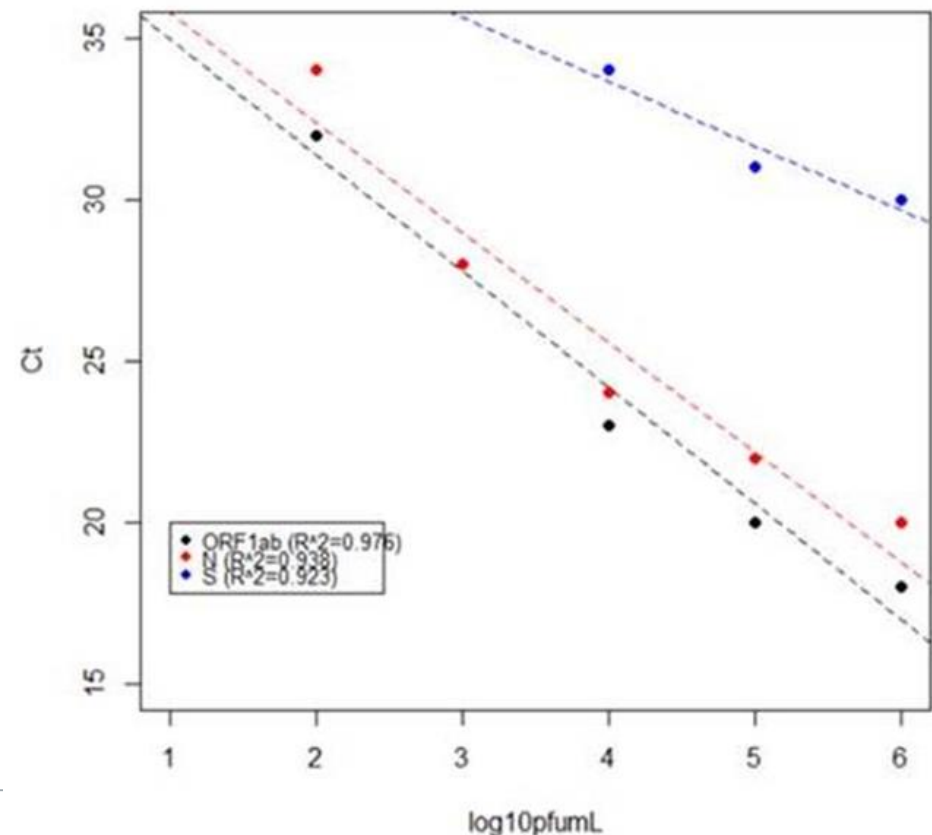
Mida tähendab Ct väärtus?

Lävisükkel (*threshold cycle* ehk Ct) – Ct on tsüklite arv, millal reaktsiooni signaal ületab läviväärtuse. Ct oleneb ka DNA/RNA kogusest: mida madalam Ct (vähem tsükleid) seda rohkem RNA-d/DNA-d proovis

**Madalam CT \approx suurem viiruse hulk
 \approx nakkusohtlikum patsient**

Aga

- Ct sõltub testist ja markerist
- Ct ja viiruse hulga/nakkusohtlikuse seos tuleks valideerida iga testi/metoodika jaoks
- Millisest viiruse hulgast on inimene nakkusohtlik?

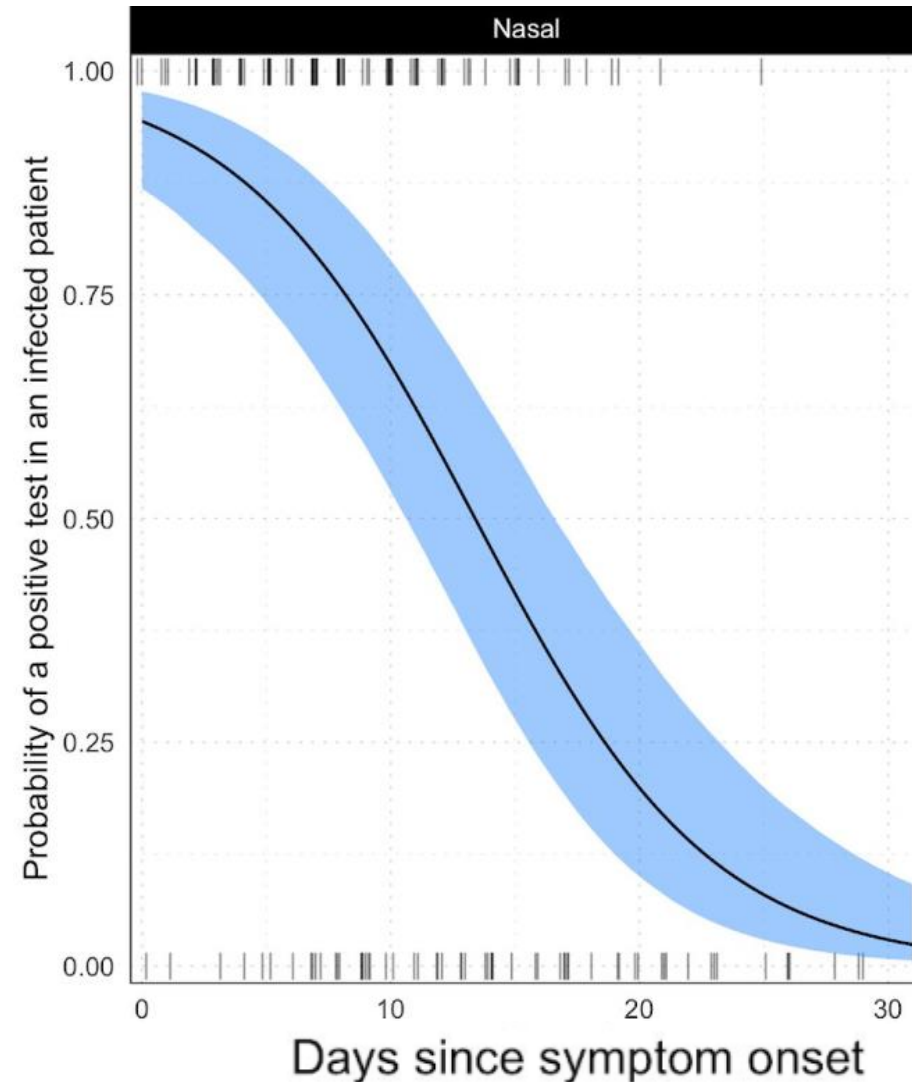


Kliiniline tundlikkus – kas diagnoosime haigust?

Positiivne tulemus sõltub

- **Proovivõtu aeg** – oluliseim põhjus miks nakatumise korral saame neg tulemuse on liiga hiline proovivõtt. Viiruse hulk suurim vahetult enne ja peale sümptomite teket
- Materjal/lokalisatsioon (ninaneel, kurk bronhiloputus)
- Proovivõtu tehnika jne

Test võib olla analüütiliselt ülimalt tundlik, kuid vastus neg, sest viirust proovis pole



Kui kaua püsib PCR positiivne?

Sõltub haiguse raskusest (enamikes uuringutes).

Näit. (mediaanid):

asümptomaatilised: 6 päeva

kerge haigus: 10 p

mõõdukas haigus: 12 p

raske haigus: 14 p

kriitilises seisus haiged: 32 p

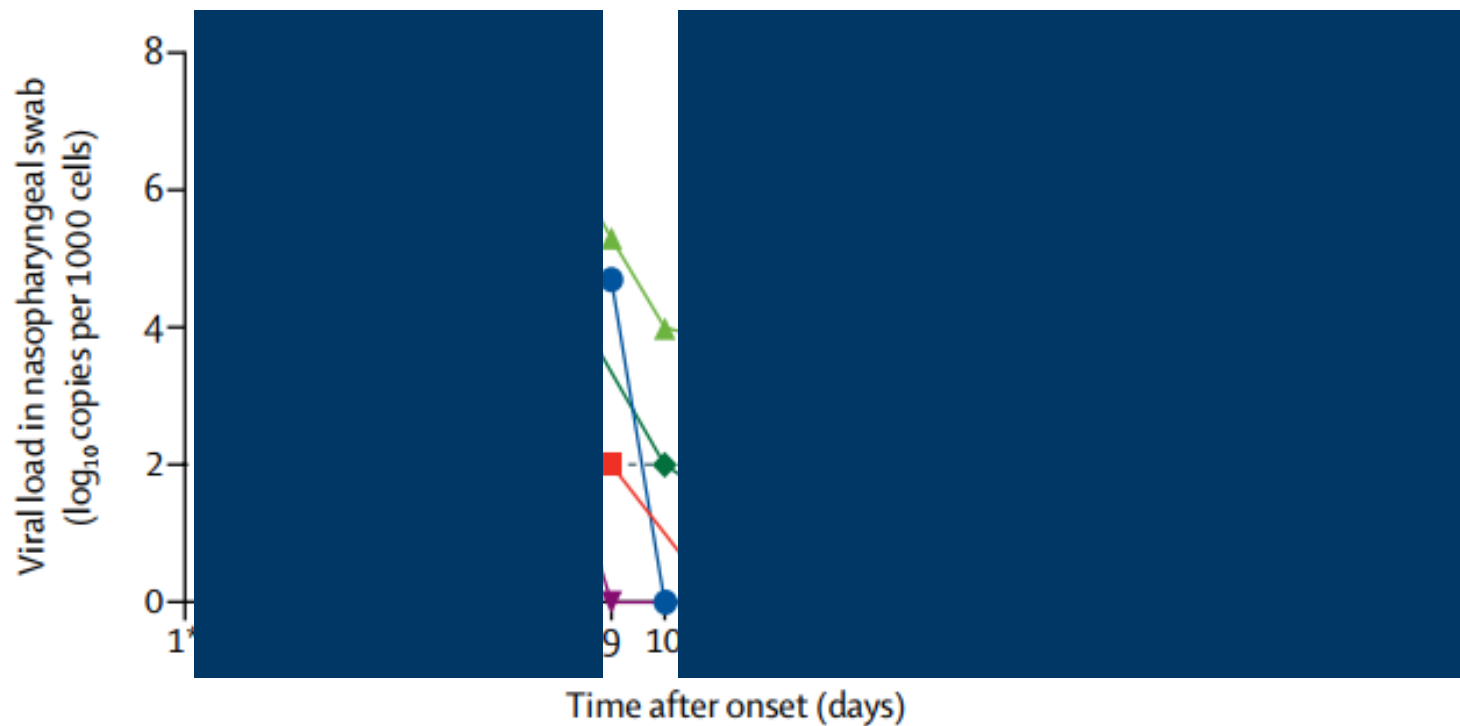
>60 aastastel kauem

PCR positiivsus: individuaalne varieeruvus

- PCR positiivsus 2 kuni 83 päeva
- Asümptomaatiliste positiivsus: 2-12 päeva
- Viiruse ebaühtlane eritumine ninaneelus (madalate viirusehulkade korral): üks päev piiripealne, teine p positiivne, kolmas p negatiivne
- Viiruse hulga dünaamika varieeruvus

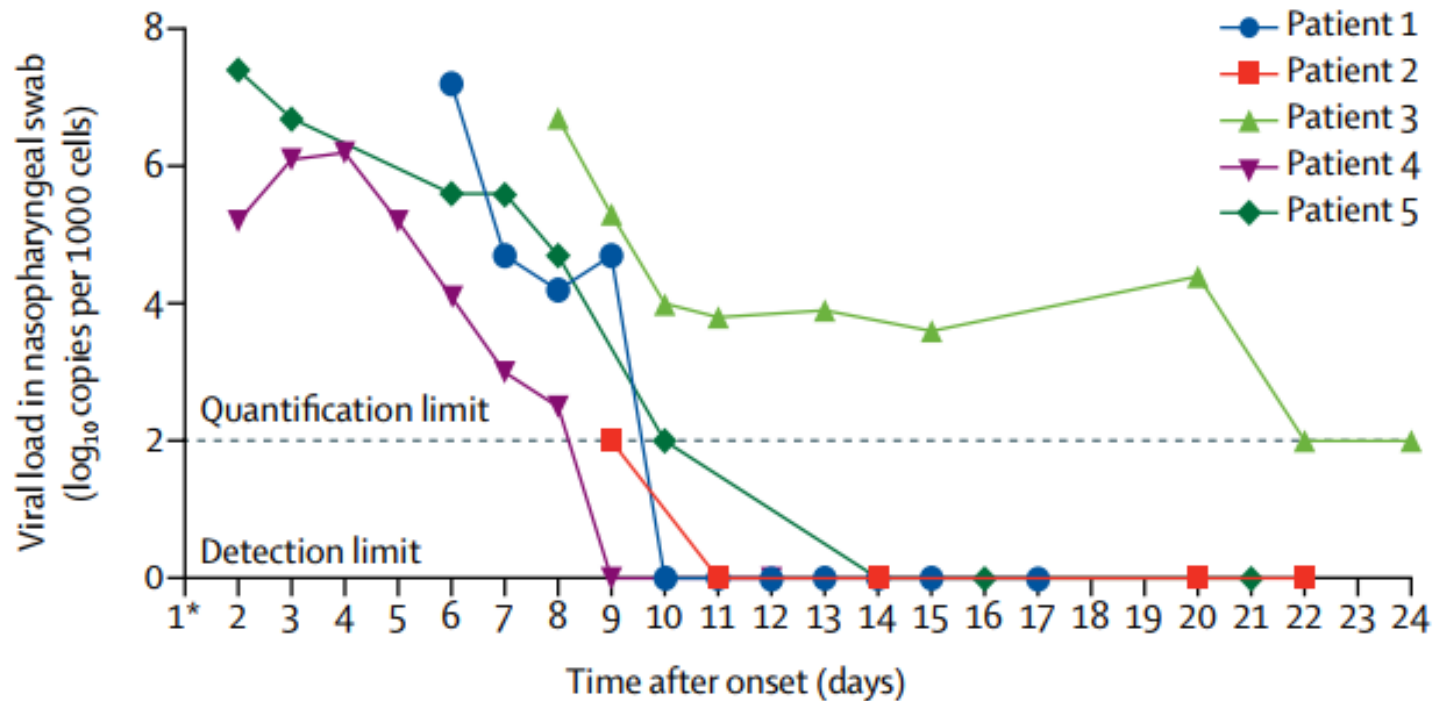
PCR positiivsus: individuaalne varieeruvus

- Viiruse hulga dünaamika varieeruvus



PCR positiivsus: individuaalne varieeruvus

- Viiruse hulga dünaamika varieeruvus



PCR Testi spetsiifilisus

Analüütiline

- **Määrab kolme SARS-CoV-2 viirusele spetsiifilist RNA lõiku**
 - Ükski ei anna ristreaktsiooni muude koroonaviirustega
 - Kõigi kolme mittespetsiifiline signaal äärmiselt ebatõenäone
 - Nõrgad signaalid v ainult üks signaal: piiripealne tulemus

Kliiniline

- NB! test määrab RNA-d mitte eluvõimelist viirust; RNA-d/ mittefunktsioneerivat viirust võib leida hingamisteedes ka peale kliinilist paranemist ning nakatamisriski kadumist
- Valepositiivse võimalused: kontaminatsioon (proovivõtt, reagensid, materjal); proovide segimine

„Piiripealne“ tulemus

Põhjus:

- madal viiruse/RNA hulk proovis – kas paranemisstaadium või haiguse algus?
- Kas patsiendid jõuavad hilja (päevi peale haiguse algust) testimata?
- Ei saa välistada mittespetsiifilist reaktsiooni
- Soovitame kordusproovi

Dilution	ThermoFisher		
	S gene Ct	N gene Ct	ORF1ab Ct
E10-1	19,5	19	19,5
E10-2	21,5	23	23
E10-3	25	25,5	25,5
E10-4	30	30	30
E10-5	Inconc	Inconc	Inconc
E10-6	NEG	NEG	NEG
E10-7	NEG	NEG	NEG

Uued muteerunud tüved

VOC 202012/01 (UK); 501Y.V2 (Lõuna Aafrika); P.1 (Brasiilia) jt.

- Tegelik kliiniline tähendus ebaselge
- Mõned suurema levikupotentsiaaliga
- Kuidas mõjutab meie diagnostikat (ThermoFisher PCR)
 - Mõne mutatsiooni korral (69-70 deletsioon) S signaal puudub, teised säilivad – st testi tundlik ka uute mutantide suhtes
 - Saame skriinida 69-70 deletsiooni suhtes
- Määramiseks vaja sekveneerimine (hetkel koostöös TA ja TÜga)

Antikehatestid

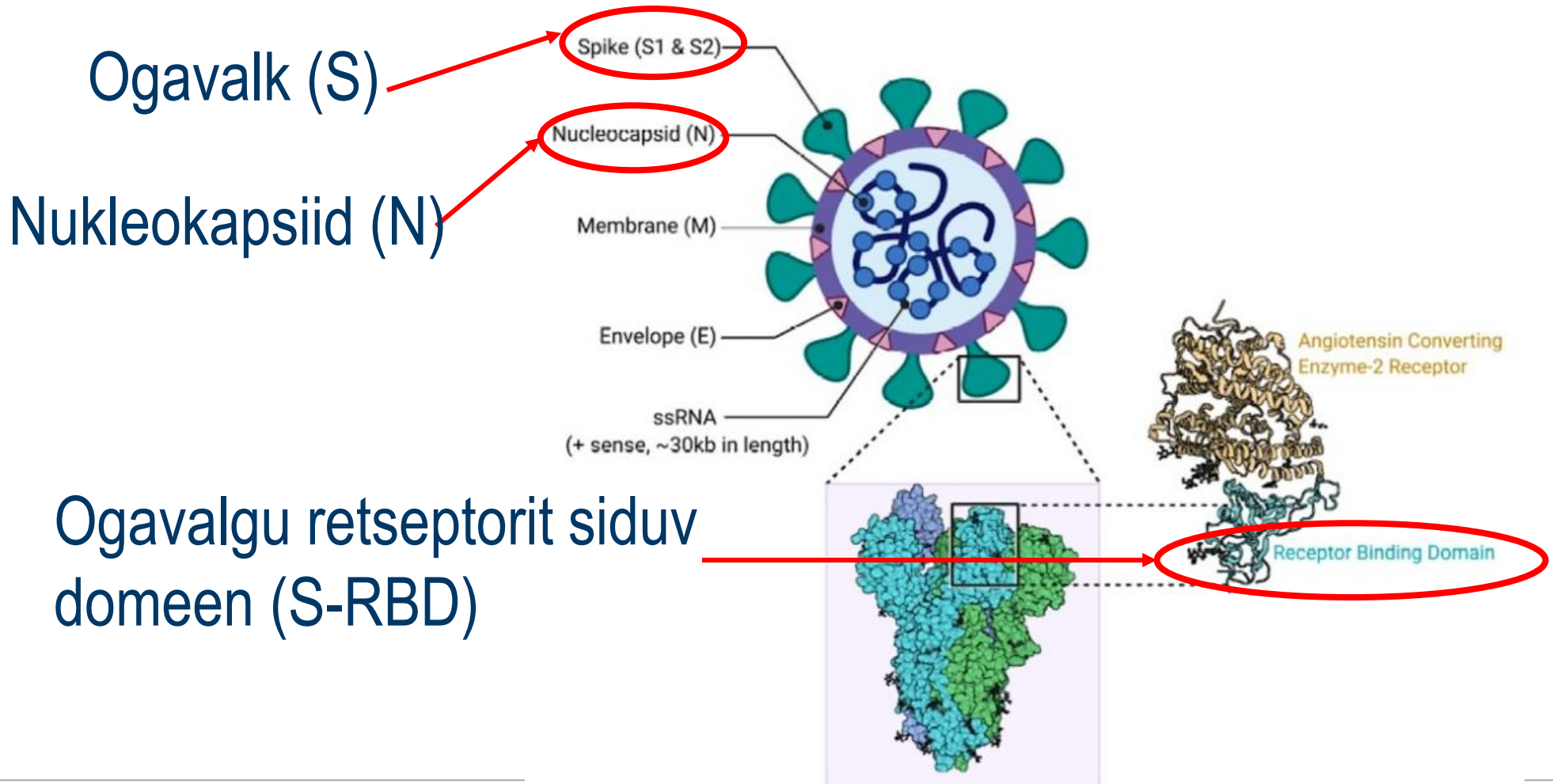
Antikehad tekivad inimorganismi vastureaktsioonil infektsioonile st kaudne haigustekitaja testimine

- sõltub organismi immuunsüsteemi reageerimisest
- antikehade tekkeks kulub teatav aeg

Tavaliselt määratakse IgM, IgA ja IgG tüüpi antikehi, kusjuures tüüpiliselt ilmub IgM varem ja IgG hiljem – COVID-19 puhul aga sageli suht üheaegselt

Antikehatestid:

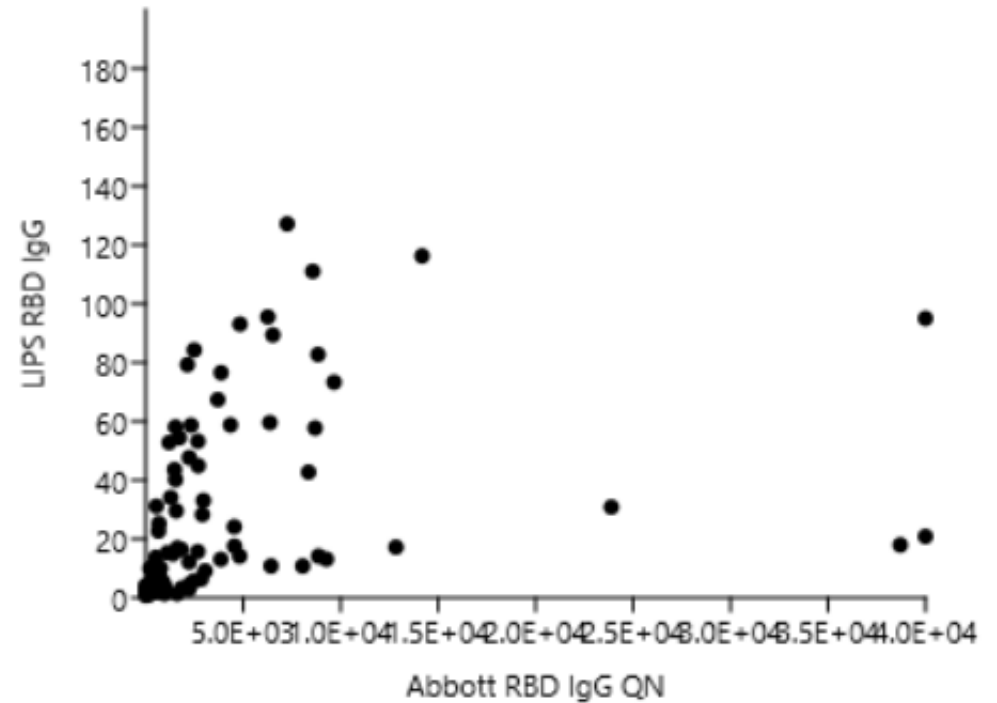
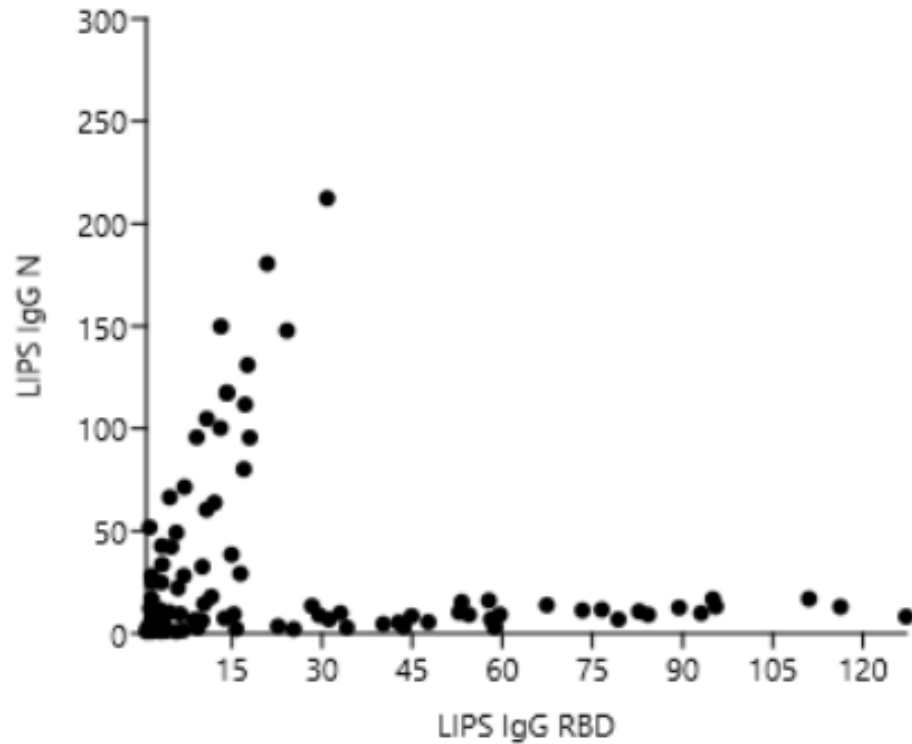
erinevad testid võivad määrata erinevate viirusevalkude vastaseid antikehi



Antikehatestide tundlikkus

Test, tootja	valk	Tundlikkus
MAGLUMI 2019-nCoV IgG, SNIBE	?	70.1
SARS-CoV-2 ELISA IgG, EUROIMMUN AG	S1	82.5
SARS-CoV-2 IgG, Abbott	N	84.5
Elecsys® Anti-SARS-CoV-2, Roche	N	83.5
EDI™ Novel Coronavirus COVID-19 IgG, Epitope	N ja S	85.6
LIAISON® SARS-CoV-2 S1/S2 IgG, DiaSorin	S1 ja S2	81.4
STANDARDTM Q COVID-19 IgG, SD Biosensor	N	64.9
LIPS S-RBD IgG, in-house	S-RBD	84.5
LIPS N IgG, in-house	N	91.8
SARS-CoV-2 IgG, Abbott	N	84.5
SARS-CoV-2 IgM Abbott IgM	S	82.5
Paneel IgM + IgG, Abbott	S + N	89.7
Abbott IgG II Quant	?+ S-RBD	93.8

Erinevad testid – erinevad tulemused?



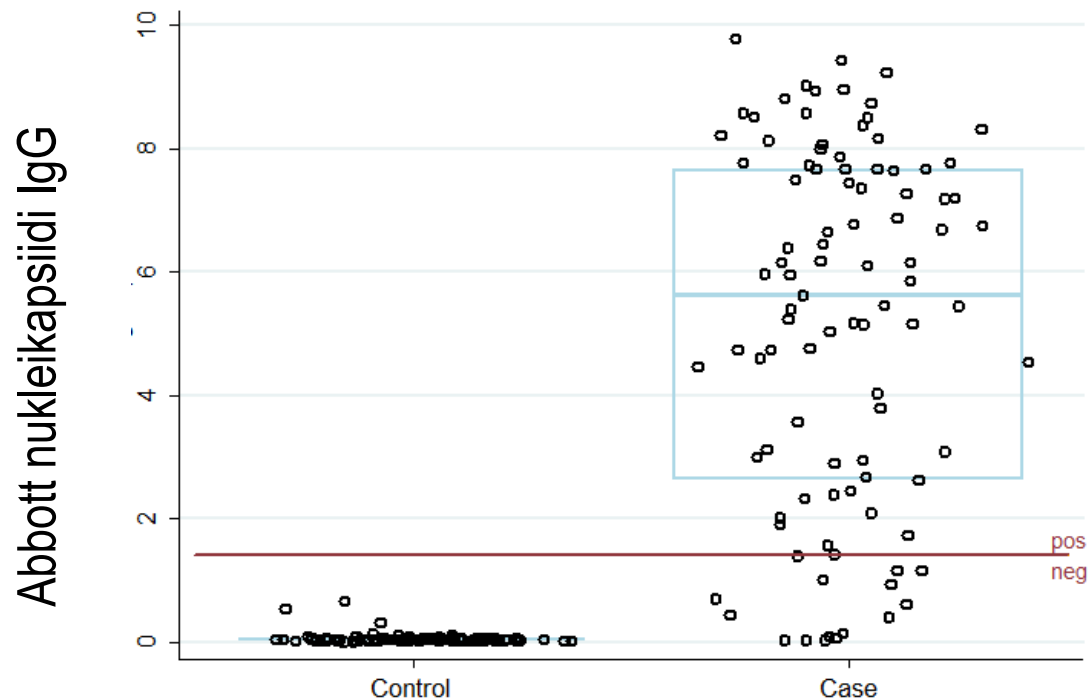
Antikehatestide tundlikkus

- Sõltub testi formaadist: analüsaatoril laboratoorne reeglina parema analüütilise tundlikkusega kui „kiirtest“
- Millise valguga vastast antikeha määrab
 - Erinevatel patsientidel erinevas haiguse staadiumis domineerivad erinevate valkude (N, S) vastased antikehad
- Antikehade hulk sõltub sümptomaatikast: asümptomaatiliste madalamas hulgas võrreldes raskemalt haigetega
- Hulk/positiivsus sõltub ajast: hakkavad tekkima 2-3 nädala jooksul, mõnel hiljem. Nukleokapsiidivastane IgG võib tõusta kiiremine kuid ka kaduda kiiremini kui ogavalguvastane
- **Individuaalne immuunvastus**

s.t antikehade hulk ja positiivsus sõltub konkreetsest patsiendist ning kõigil ei teki infektsiooni järgselt antikehi

Antikehatestide spetsiifilisus

- Eri testidel erinev
- IgA ja IgM puhul sagedamini ristreaktsioone kui IgG testil
- Abbott IgG testid (vana ja uus QN) kõrge spetsiifilisusega: >99%
- Tundlikkus/spetsiifilisus sõltub cut-off piiri seadmisest



Antikehatestid SYNLABis

Abbott-i testid, teostatakse ARCHITECT analüsaatoriga

(SARS-CoV-2 IgG, nukleokapsiidivastane IgG, teostati kuni 26.01)

SARS-CoV-2 IgG QN, S-RBD + muud? Alates 26.01.

SARS-CoV-2 IgM ogavalguvastane IgM – ainult piiratud näidustustel (vaja IgM sertifikaati, nabaväädiverest üsasisese nakatumise kinnitamiseks)

Uus SARS-CoV-2 IgG QN test

- Tundlikkus parem kui vana IgG + IgM kombineeritult
- Määrab ka S-RBD vastaseid antikehi, mille teket indutseerivad vaktsiinid
- Saame kvantitatiivse (arvulise) väärtuse – antikehade dünaamika hindamine

Tulemuse interpreteerimine:

- > 50 AU/ml positiivne
- Kvantitatiivse määramise vahemik: 21 – 40 000 AU/ml
- NB! Igal tootjal/testil on oma numbrilised väärtused – pole võrreldavad

POS: viitab varem või hiljuti põetud COVID-19 infektsioonile v vaktsineerimisele

NEG: puudub seroloogiline viide infektsioonile v vaktsineerimise järgsele antikehade tekkele

Antigeeni kiirtest

- Kvaliteet võib olla ebaühtlane, vajalik valideerimine
- Testid töötavad rahuldavalt kõrgete viirusehulkade korral

SARS-CoV-2 testimiseks mõeldud antigeeni kiirtesti kasutamine

Lisa 1 Eestis verifitseeritud antigeeni kiirtestid jaanuar 2021 seisuga:

Testi nimetus ja tootja	Verifitseerimise kuupäev	Verifitseerinud labor	Tulemused
SD Biosensor Q COVID-19 Ag Test SD Biosensor/ F.Hoffmann-La Roche	4.11. - 19.11.2020	Põhja-Eesti Regionaalhaigla laboratoorium	Tundlikkus 87% Spetsiifilisus 100%
	30.11. – 10.01.2021	Tartu Ülikooli Kliinikumi Ühendlabor	Tundlikkus Ct <25 95% Tundlikkus Ct >25 37,5% Spetsiifilisus 99,5 %

Antigeeni kiirtesti ajastamine ja kinnitamise vajadus

	Sümptomaatiliste testimine		Asümptomaatiliste testimine	
Levimus testimispiirkonnas	Kõrge	Madal	Kõrge	Madal
Antigeeni testi sobivus	Jah	Jah	Jah	Jah
Testimise ajastus	Kuni 5 päeva sümptomite tekkimisest.		Kuni 7 päeva kokkupuutest, kui kokkupuude on teada	
Testi kinnitamise vajadus	Negatiivne tulemus tuleb kinnitada RT-PCR meetodil	Positiivne tulemus tuleb kinnitada RT-PCR meetodil. Kui aeg pole teada või ületab 5 päeva, siis tuleb negatiivne alati kinnitada RT-PCR-ga	Negatiivne tulemus tuleb kinnitada RT-PCR meetodil	Nii negatiivne kui positiivne tulemus kinnitada RT-PCR meetodil

Kasutatud allikas:

Options for the use of rapid antigen tests for COVID-19 in the EU/EEA and the UK. ECDC Technical Report, 19 November 2020 [Options for the use of rapid antigen tests for COVID-19 in the EU/EEA and the UK \(europa.eu\)](https://ecdc.europa.eu/en/our-work/reports-and-publications/rapid-antigen-tests)

Testide näidustused



TERVISEAMET

Laboratoorsed testid COVID-19 haiguse diagnoosimisel ja SARS-CoV2 tekitajaga kokkupuute hindamisel

Test ja uuringumaterjal	Milleks test sobib	Milleks ei sobi	Probleemid
RT-PCR tavameetodil Materjal: ninakaabe, kurgukaabe, kurguloputusvedelik (<i>Synlab</i>), bronhiloputusvedelik	Kuldne standard SARS-CoV2 infektsiooni diagnoosimiseks, ei vaja kinnitamist	Varasema põdemise hindamiseks	Aeganõudev
RT-PCR kiirtest Materjal: ninakaabe, kurgukaabe, bronhiloputusvedelik	Haiglas kiiret käsitlust nõudvate patsientide SARS-CoV-2 infektsiooni diagnoosimiseks, ei vaja kinnitamist	Varasema põdemise hindamiseks	Kallis hind ja tarded ebapiisavad

Test ja uuringumaterjal	Milleks test sobib	Milleks ei sobi	Probleemid
Antigeeni kiirtest Materjal: ninakaabe, kurgukaabe	Sümptomaatiliste patsientide esmaseks testimiseks eesmärgiga haiged kiiresti isoleerida (soovituslik kasutus kinnistes asutustes, kus on kindlaks tehtud infektsiooniga kokkupuude).	Riiki saabuvate reisijate testimine, karantiini lõpetamine	Testijate väljaõpe ja testimiskoha ohutus oluline tagada, kui testi kasutatakse väljaspool tavapäraseid testimispunkte ja tervishoiuasutust. Vajalikud kinnitavad uuringud RT-PCR meetodil, mis suurendab testimise maksumust. Madalama tundlikkusega kui RT-PCR, valenegatiivsete tulemuste võimalus enne sümptomite teket ning kui sümptomite algusest
			on moodas rohkem kui 5 päeva.

Test ja uuringumaterjal	Milleks test sobib	Milleks ei sobi	Probleemid
Antikehade test automaatanalüsaatoril Materjal: vereseerum	Varasema põdemise hindamiseks, tulemuse interpreteerimiseks vajalik arsti hinnang	Haiguse diagnoosimiseks	Erinevad testid S-valgu ja nukleokapsiidi vastase antikehade määramiseks. Võimalik tulemuste lahknemine erinevatel meetoditel.
Antikehade kiirtest Materjal: täisveri, kapillaarveri	Varasema põdemise hindamiseks, tulemuse interpreteerimiseks vajalik arsti hinnang	Haiguse diagnoosimiseks	Ebatäpsem kui automatiseeritud meetod, palju erinevaid teste erineva kvaliteediga. Oht valejäreluste tegemiseks.

KKK laborile

- Isolatsioon/karantiini nõuded ja lõpetamise tingimused on riiklikult määratud, laboril pole volitust isikuid nendest vabastada
- Labor väljastab ainult PCR ja antikehade analüüside tulemuste sertifikaate
- Labor ei anna tõendeid terveks/mittenakkusohtlikuks tunnistamise kohta
- Inimese enda vastutus on uurida, millist sertifikaati või tõendit mingi asutus või reisi sihtkohaks olev riik aktsepteerib. Nt vt välisministeeriumi koduleht, küsi saatkonnast jne
- Antikehatesti tulemusi ei arvestata nakkusohtlikkuse hindamisele ega isolatsiooni/karantiini lõpetamisel
- Kuidas vaktsiin (mRNA) mõjutab labori tulemust
 - Ogavalguvastane IgG (mõnel ka IgM) muutub positiivseks
 - Nukleokapsiidivastane IgG tulemust ei mõjuta
 - PCR ja antigeeni testi tulemust ei mõjuta

Täname tähelepanu eest.
