

COVID-19

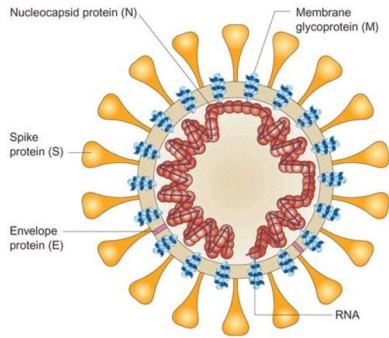
Labo Microbiologie

01 december 2020

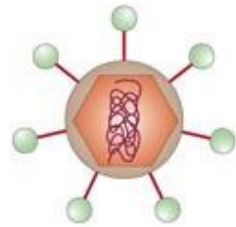


DETECTIE VAN EEN NIEUWE PATHOGEEN...

Diagnostiek van virale infecties



Direct methods



Virus isolation

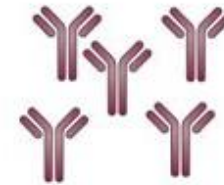


Genome detection

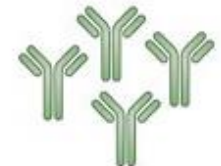


Antigen detection

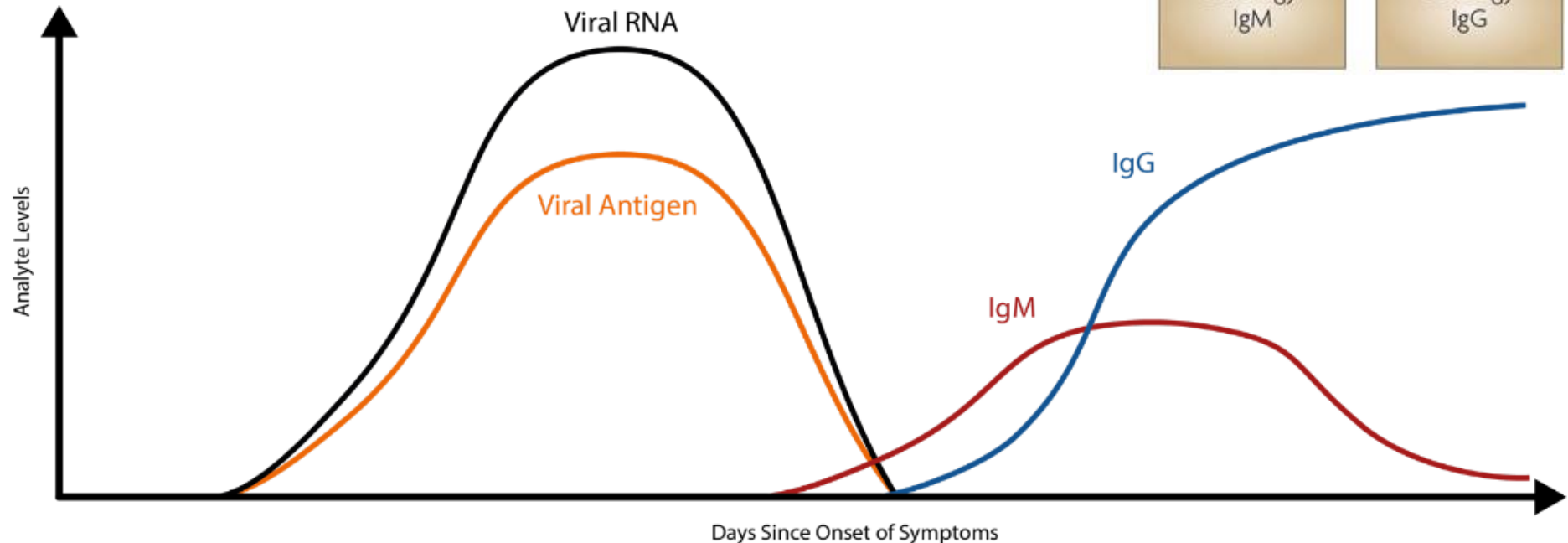
Indirect methods



Serology IgM

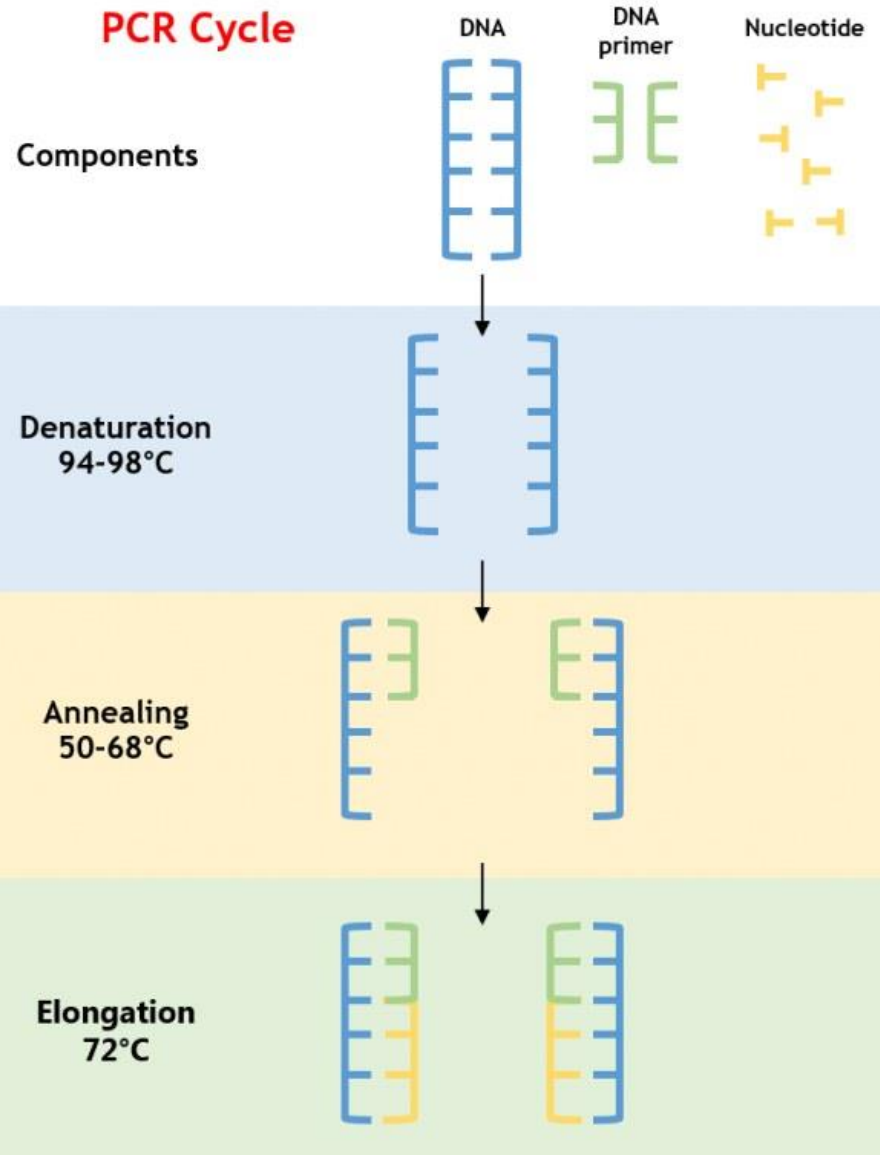
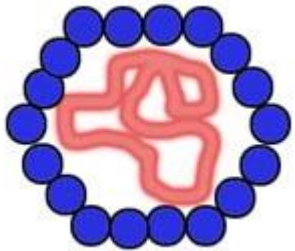


Serology IgG

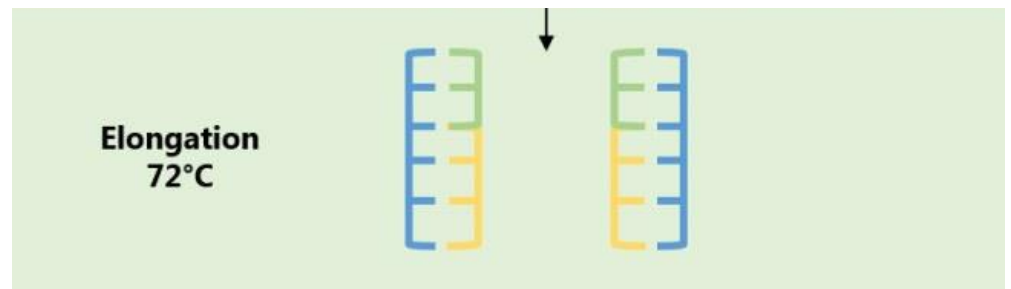
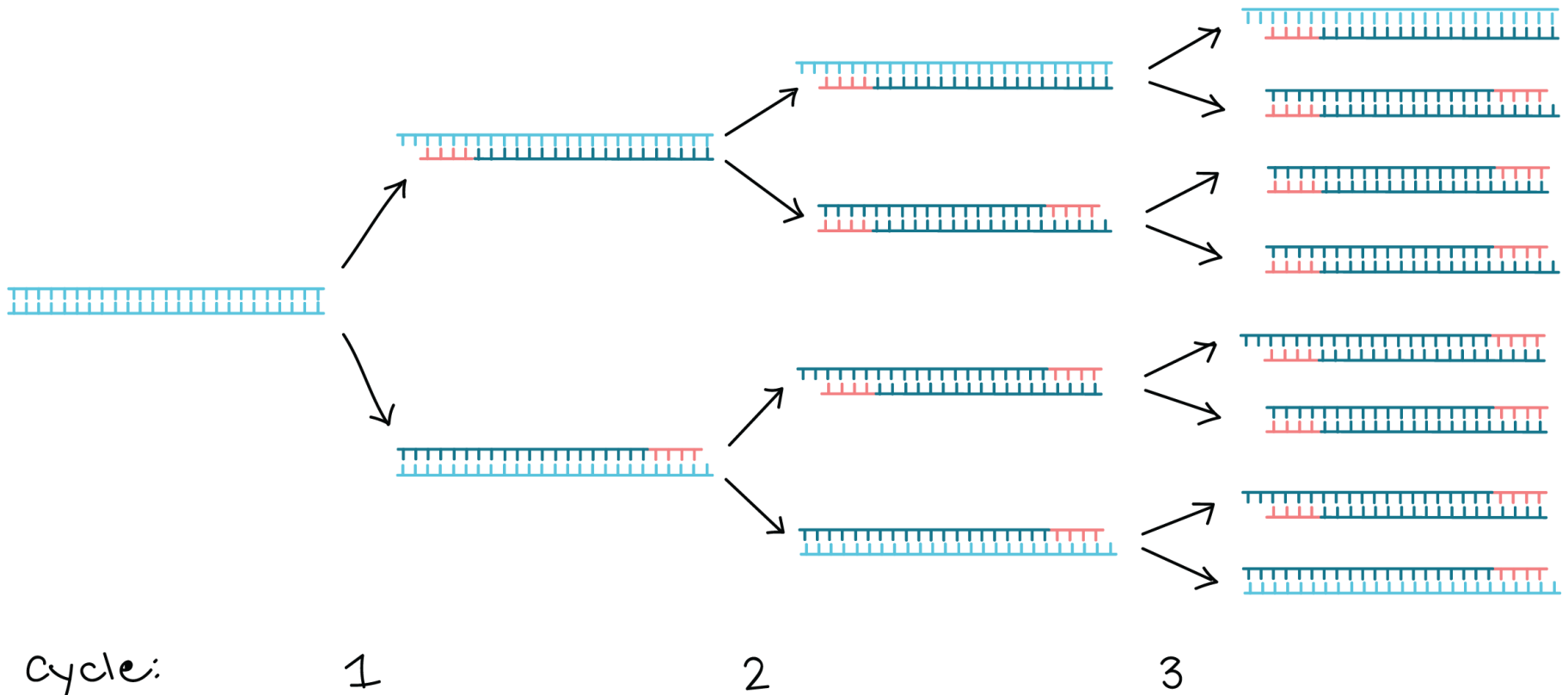


Moleculaire detectie

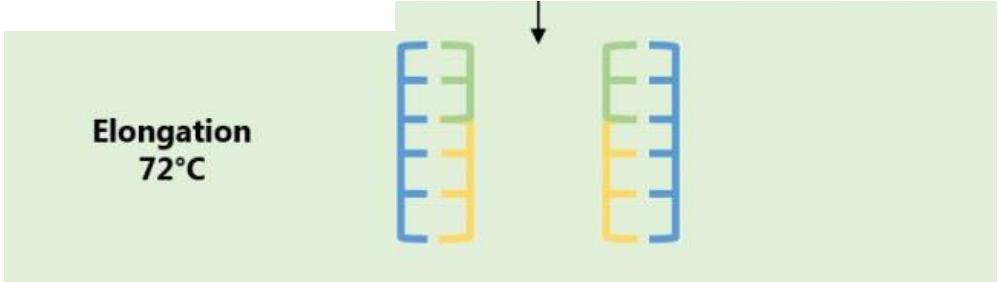
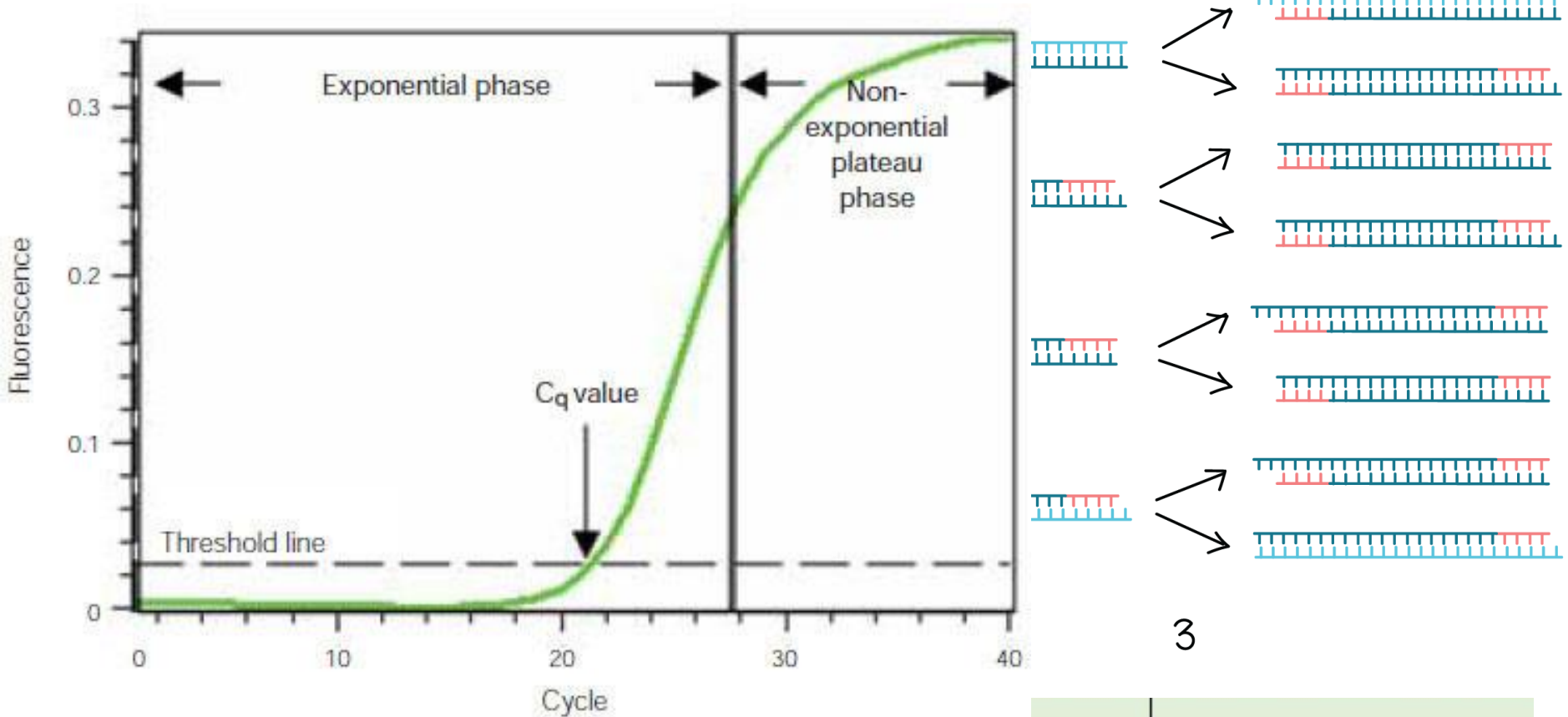
Staal → DNA/RNA isolatie
(→ cDNA synthese)



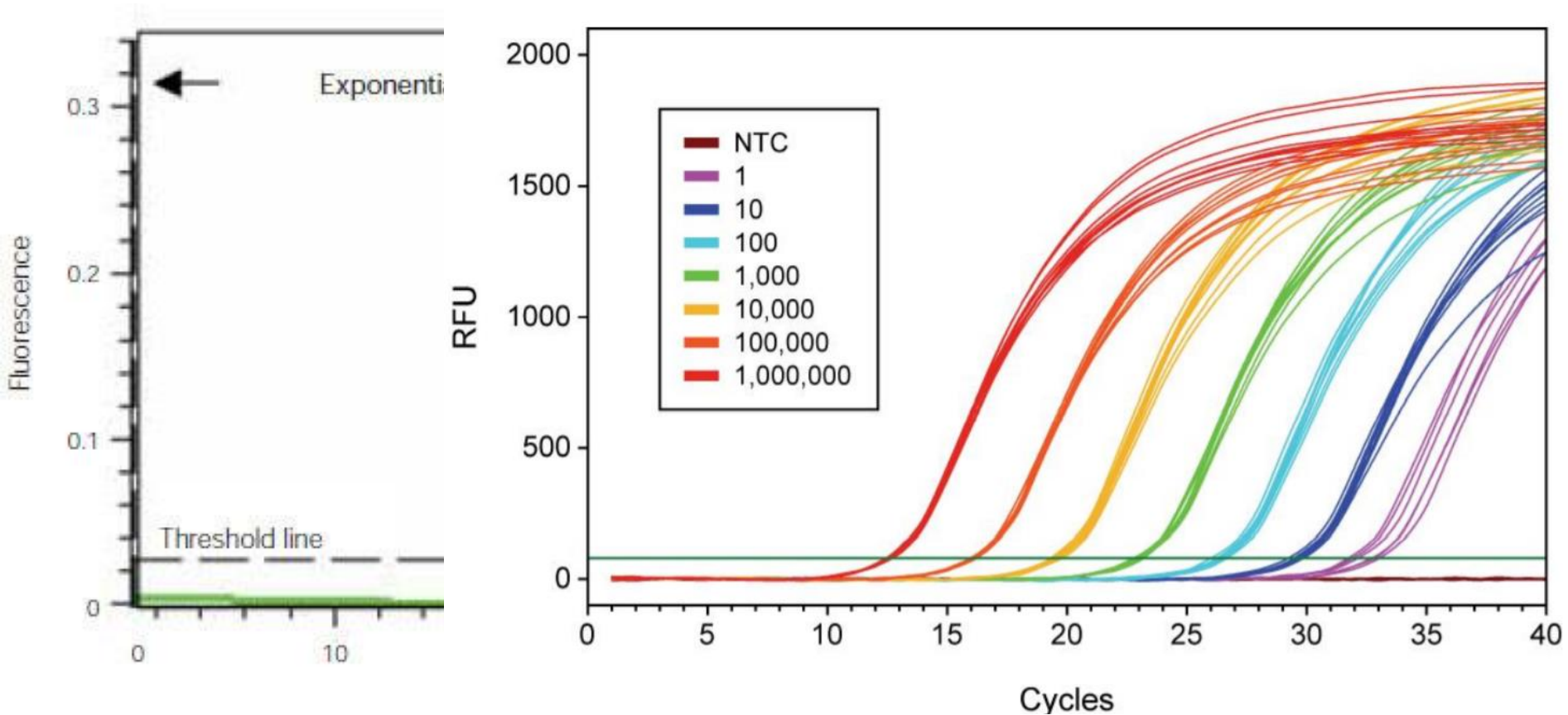
Moleculaire detectie



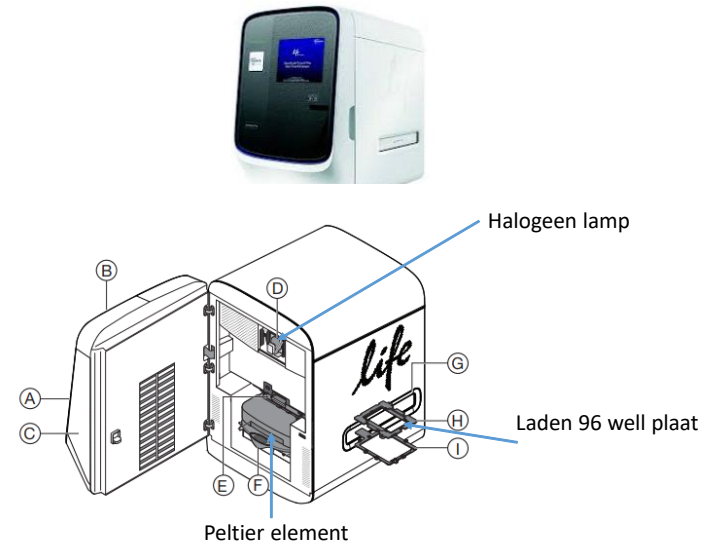
Moleculaire detectie



Moleculaire detectie

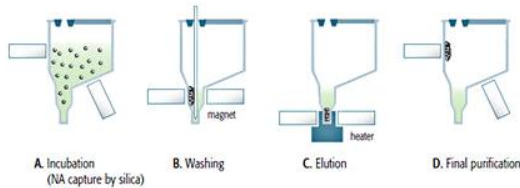


CT waarde omgekeerd evenredig met hoeveelheid virus aanwezig in staal



Extraction Principle

- A. During incubation of the lysed samples, all the target nucleic acid is captured by magnetic silica particles.
- B. The NucleoSens[®] easyMAC[™] magnetic device attracts all the magnetic silica, enabling the system to purify the nucleic acids through several washing steps.
- C. The heating step releases the nucleic acids from the silica.
- D. At the final step, the magnetic silica particles are separated from the eluate by the magnetic device.

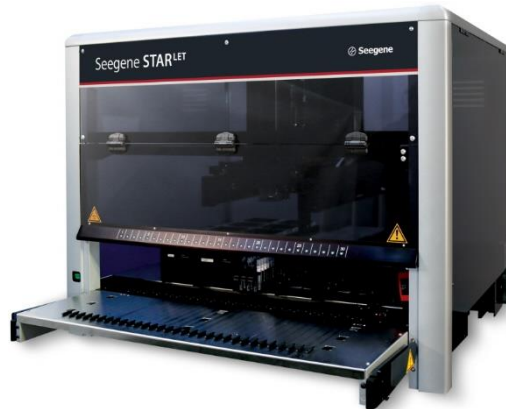


1/ extractie DNA/RNA

2/ PCR set-up

3/ amplificatie dmv PCR
& detectie dmv 100%
specifieke Fluor-labeled probes

Midden 2019



Respiratoire virussen (en atypische bacteriën)

Historiek OLVZ

Eigen in-house assay real-time PCR assay

2002 : AdenoV / *M. pneumoniae* / *C. pneumoniae* / *L. pneumophila*

2004 : RSV A/B / hMPV

2006 : Influenza A / B

2009 : Bocavirus / PIV 1/2/3/4

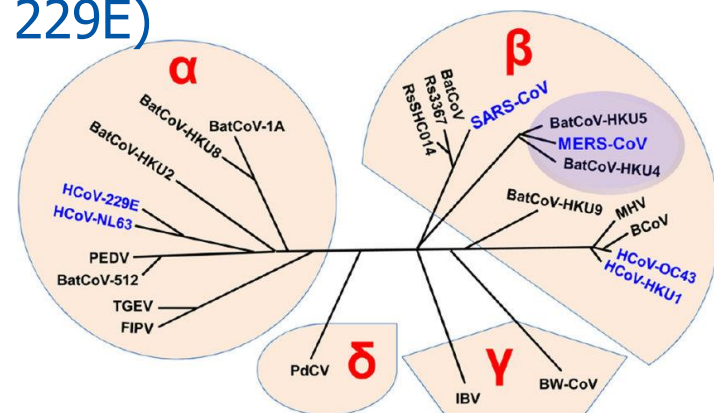
2012 : *B. pertussis* / *parapertussis* / *holmesii*

2013 : Enterovirus

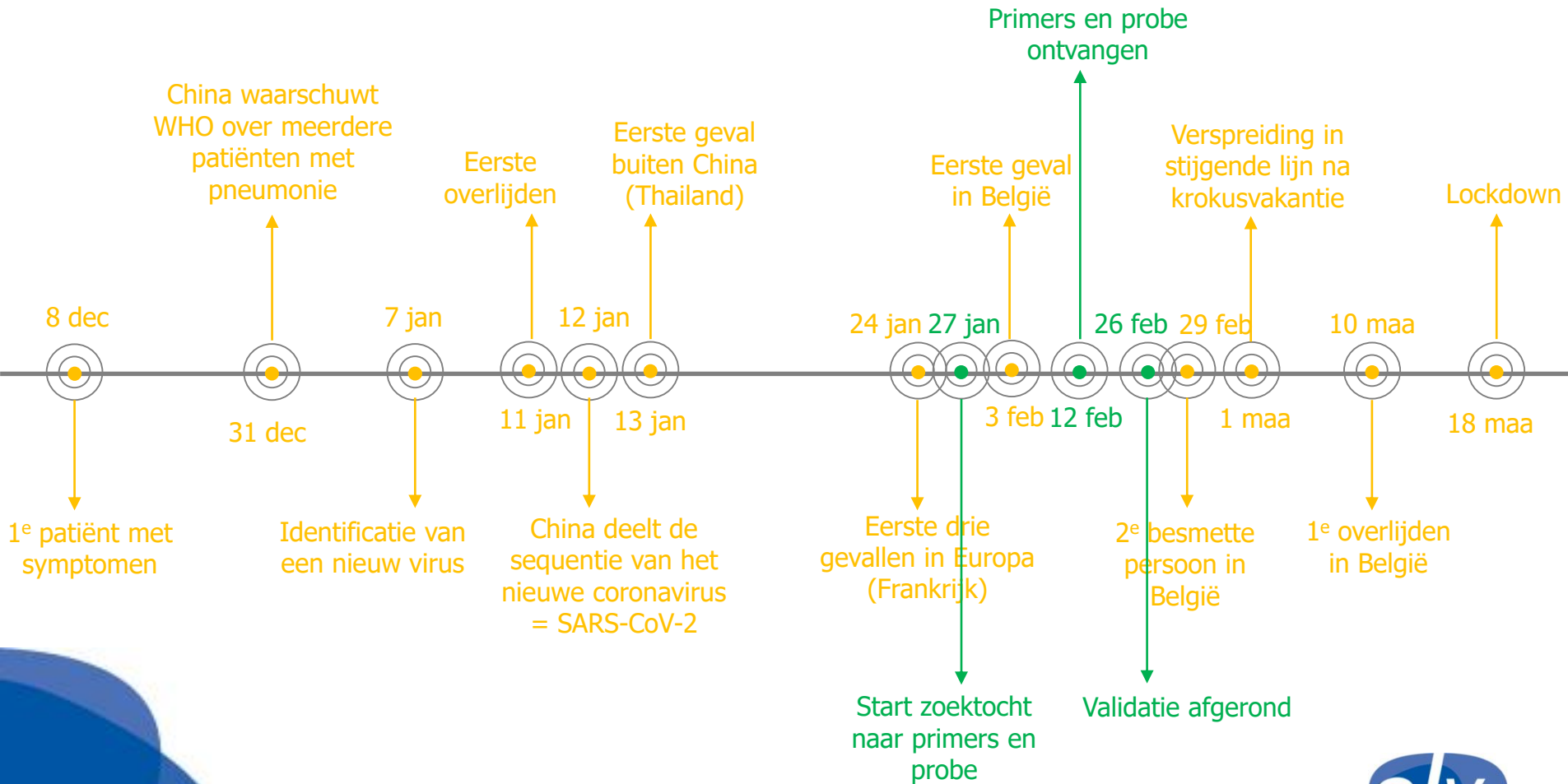
2014 : Rhinovirus

2016 : Coronavirus (OC43, NL63, HKU1 en 229E)

2018 : *S. pneumoniae*

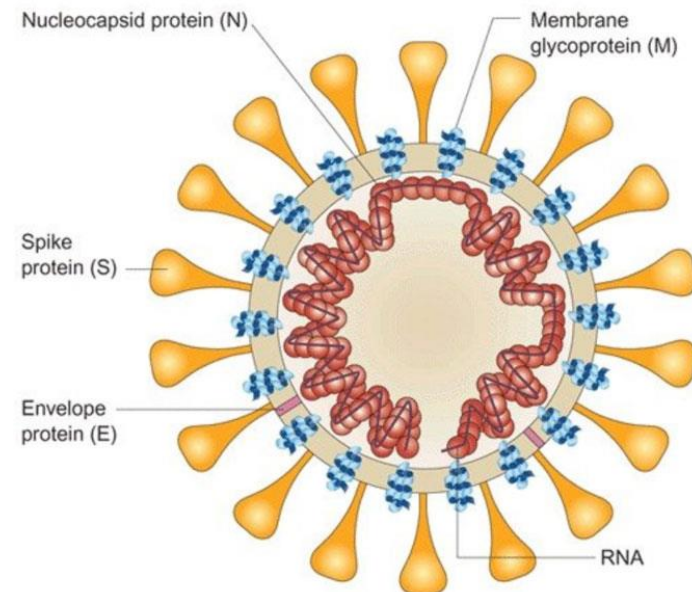


SARS-CoV-2



SARS-CoV-2 PCR

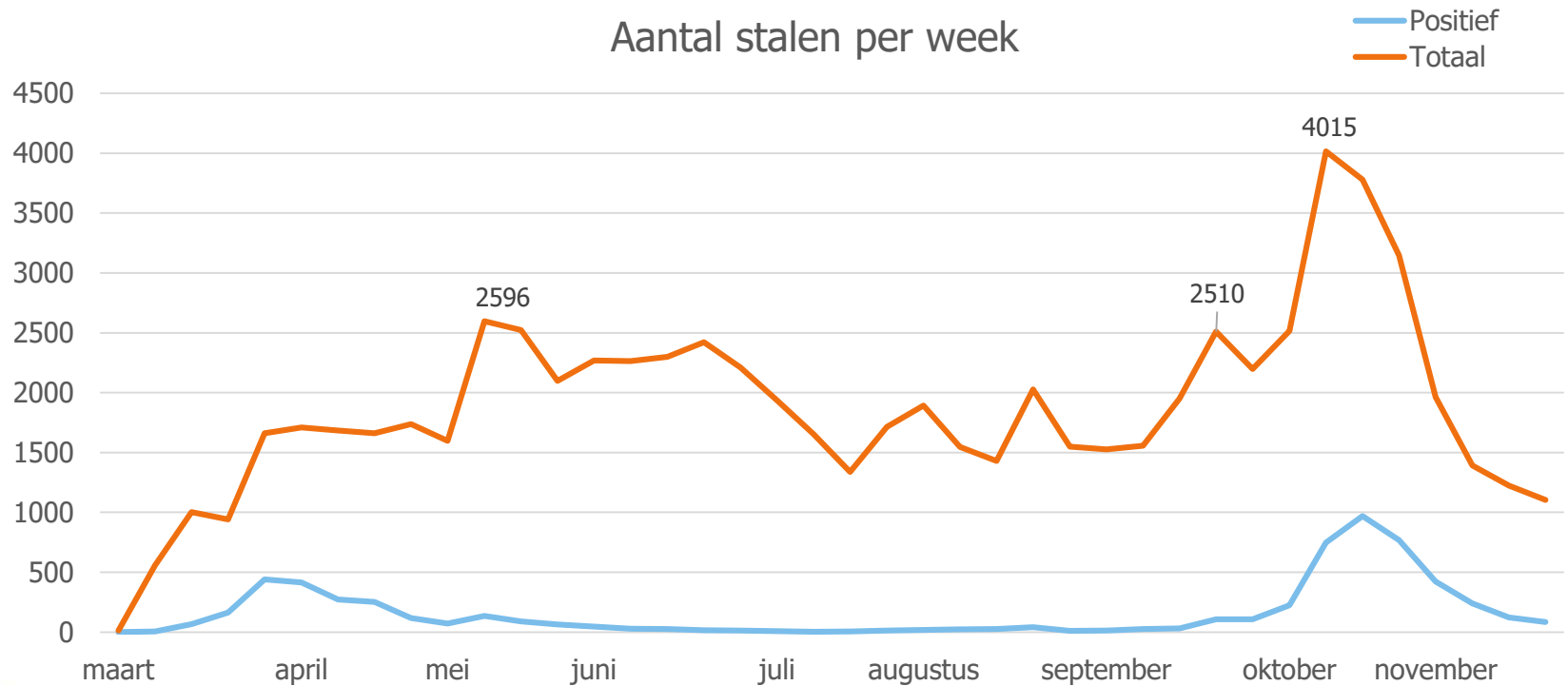
- Detectie van het SARS-CoV-2 viraal RNA dmv in labo zelf ontwikkelde RT-PCR gericht tegen N1
- Mogelijk op nasopharynx, diepere respiratoire stalen, bloed, faeces
- "Batch"-testen:
24 / 48 / 96 stalen per run
- Duur standaard moleculaire analyse:
4-5u



HUIDIGE STAND VAN ZAKEN

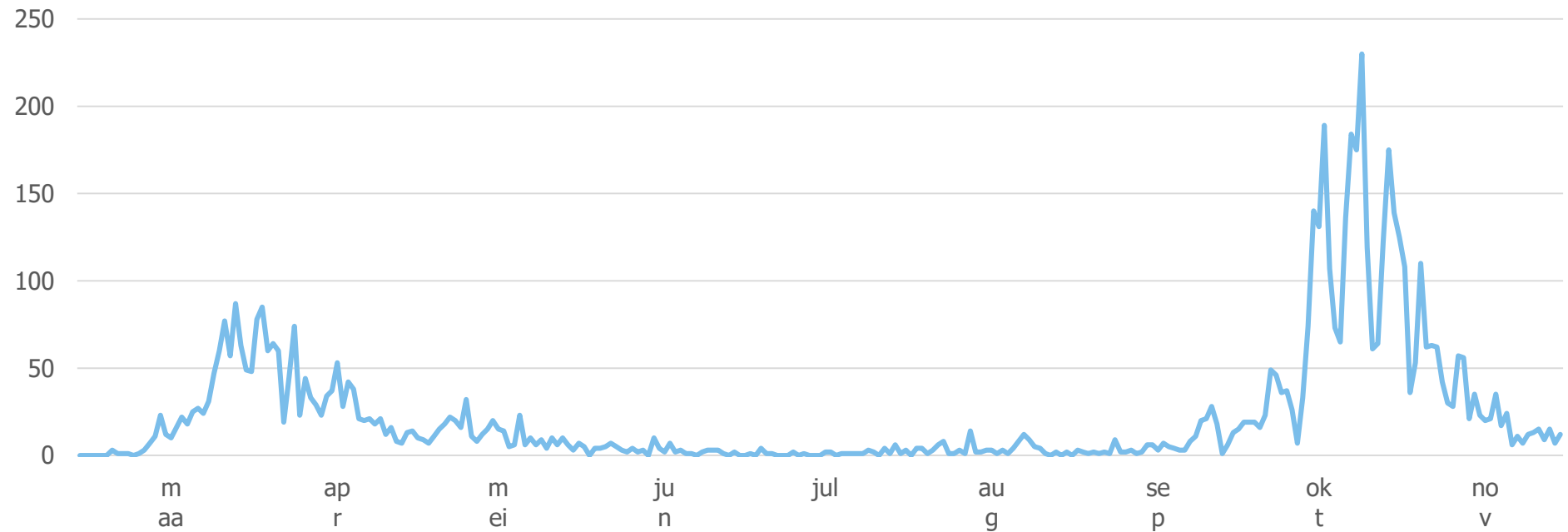


Moleculaire analyses tot nu



Moleculaire analyses tot nu

Aantal positieve stalen per dag



BESMET VERSUS BESMETTELIJK

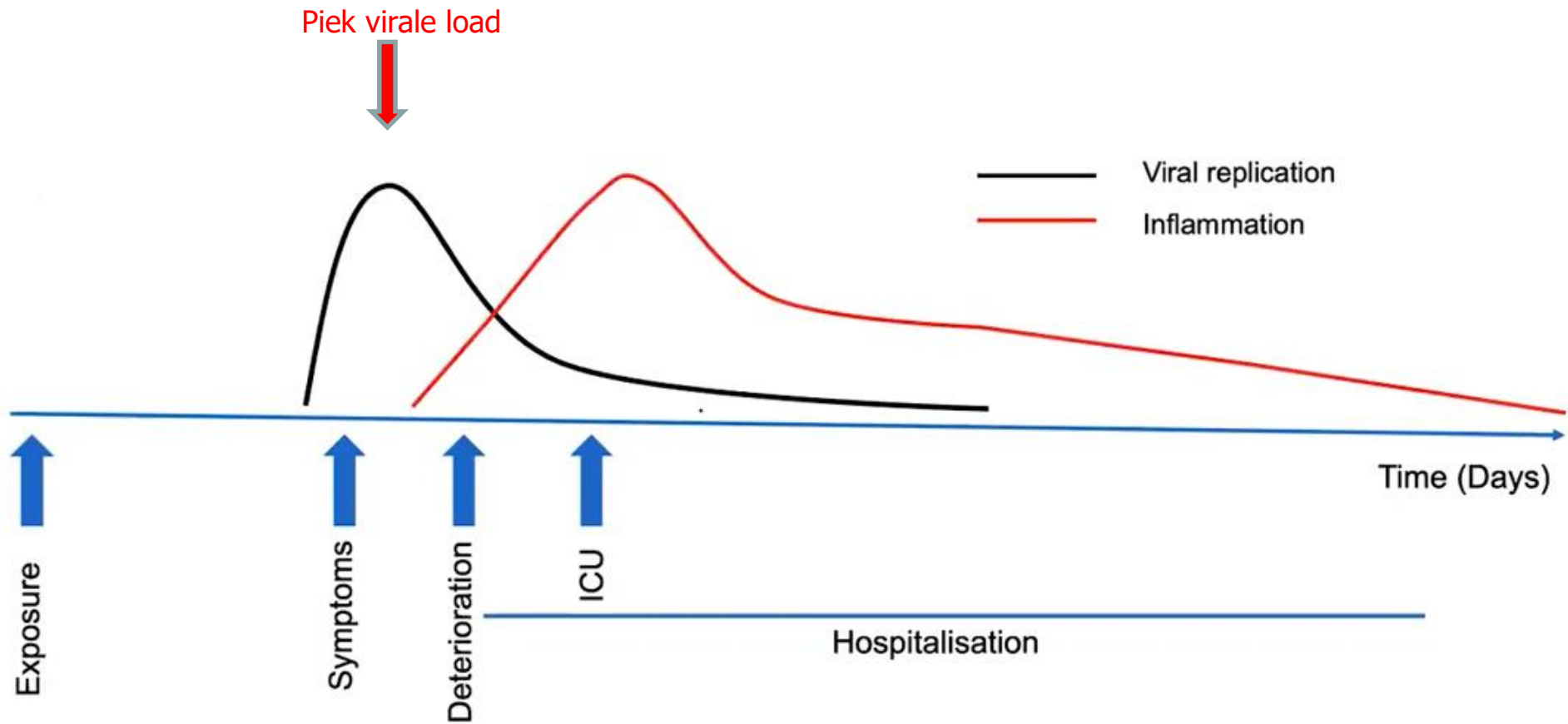


Etiologie klinisch probleem



Risico op overdracht

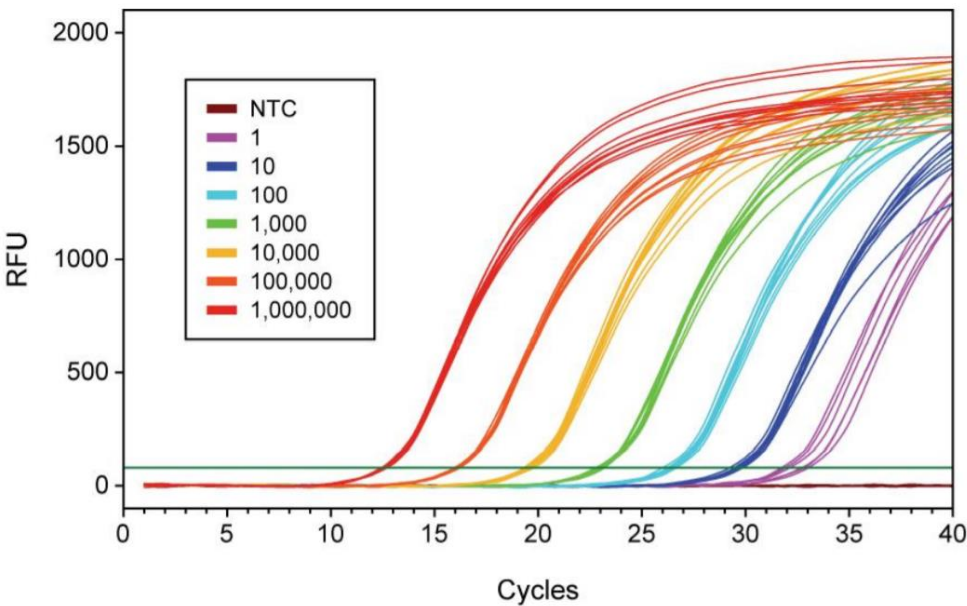
BESMET - COVID-19 verloop van de infectie



Sensitiviteit PCR

- ~ Moment van staalafname
- ~ Type & kwaliteit staalafname
- ~ Type assay: kwaliteit van extractie en PCR

BESMETTELIJK – PCR is zeer gevoelig!



- 3 CT's lager → 10x hogere viral load
- CT 38 = 10 virusdeeltjes/25 μ L
- CT 35 = 100
- CT 32 = 1000
- CT 29 = 10 000
- CT 26 = 100 000
- CT 23 = 1 000 000
- CT 20 = 10 000 000
- CT 17 = 100 000 000
- CT 14 = 1 000 000 000
- CT 11 = 10 000 000 000 virusdeeltjes/25 μ L

Kenmerken PCR

- ~ Zeer gevoelige techniek
- ~ Genoomdetectie – ook “dood” virus
 - geen PCR om genezing aan te tonen
- ~ Specificiteit is hoog, maar specificiteit voor replicerend virus is laag

Predicting Infectious Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 From Diagnostic Samples

Jared Bullard,^{1,2,3} Kerry Dust,¹ Duane Funk,^{4,5} James E. Strong,^{2,3,4} David Alexander,^{1,3} Lauren Garnett,^{3,4} Carl Boodman,³ Alexander Bello,^{3,4} Adam Hedley,¹ Zachary Schiffman,^{3,4} Kaylie Doan,⁴ Nathalie Bastien,^{3,4} Yan Li,^{3,4} Paul G. Van Caesele,^{1,2,3} and Guillaume Poliquin^{2,3,4}

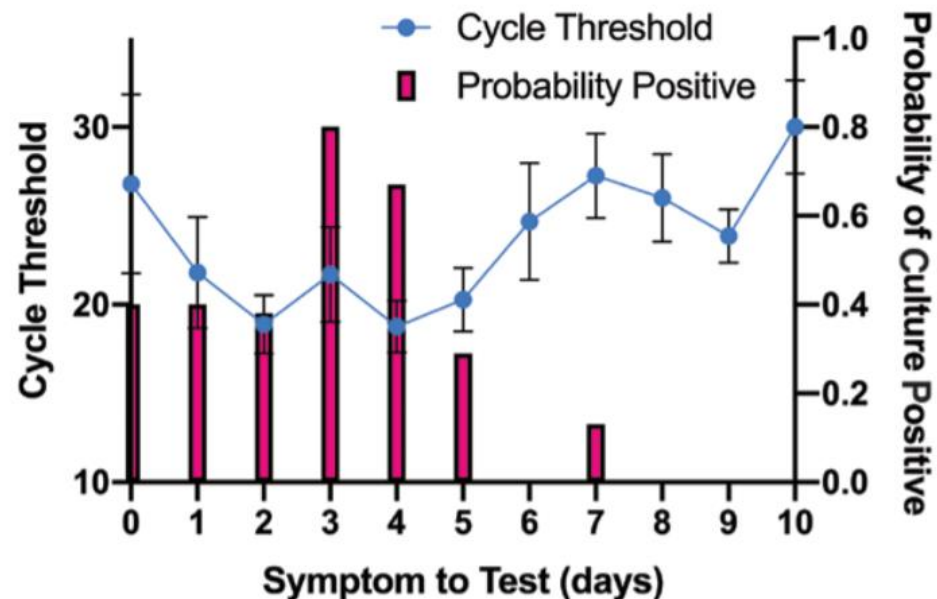


Figure 3. Comparison of symptom onset to test (days) to the probability of successful cultivation on Vero cells (Probability Positive) and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) E gene reverse-transcription polymerase chain reaction cycle threshold (Ct) value.

Belang van semi-kwantitatief rapporteren!

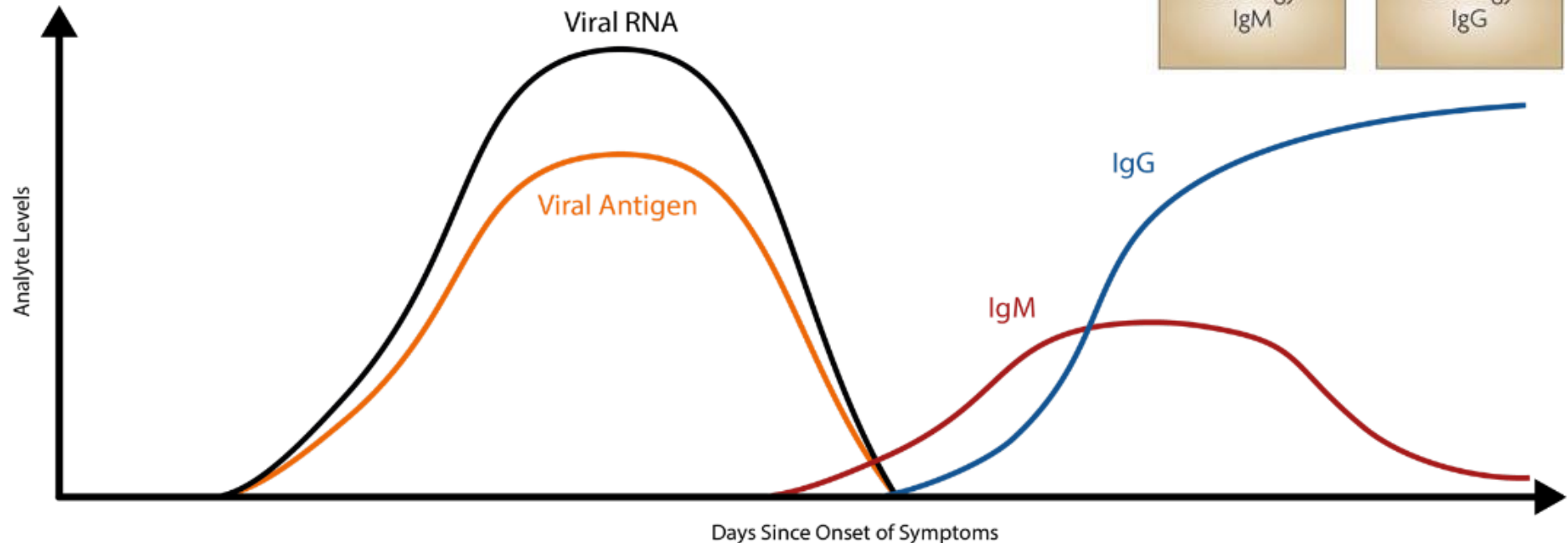
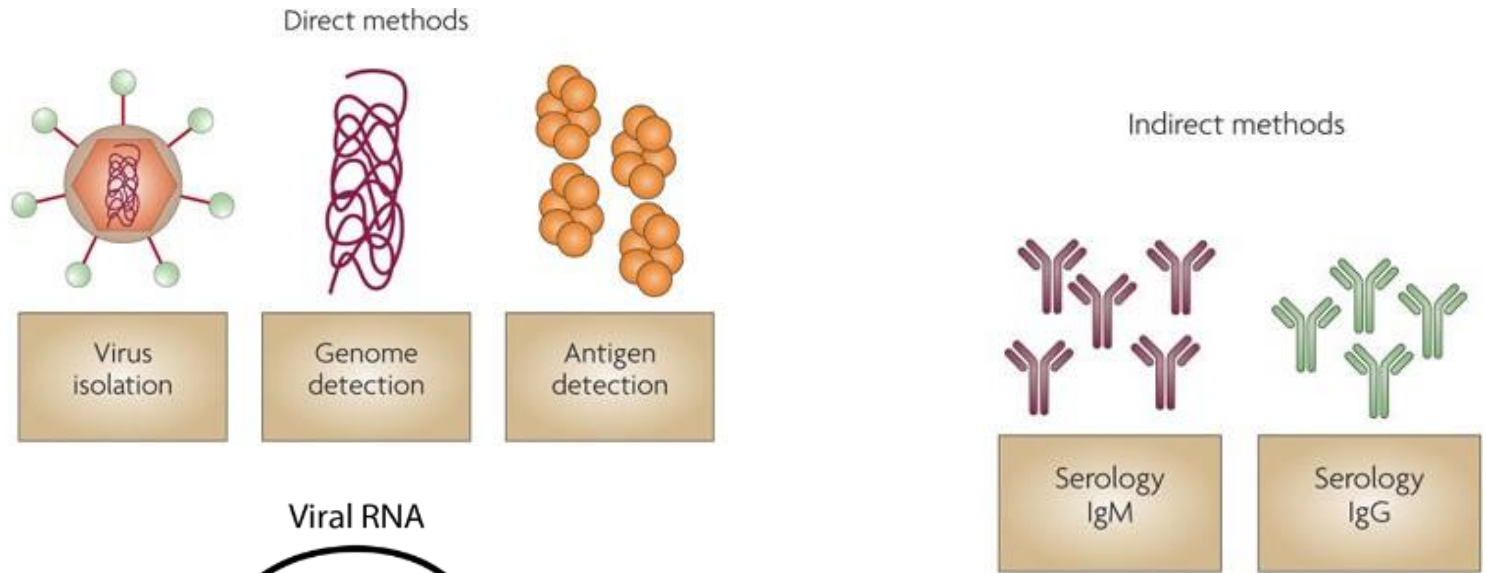
Interpretatie OLVZ:

< 20	Zeer hoge virale load
≥ 20 en < 26	Hoge virale load
≥ 26 en < 32	Matige virale load
≥ 32	Lage virale load

ANDERE TECHNIEKEN



Diagnostiek van virale infecties



Antigentest

- Gebaseerd op detectie van oppervlakte eiwitten van het SARS CoV 2
- Steeds meer assays op de markt
- Kenmerken:
 - Lateral flow immuno-assay (zoals zwangerschapstest)
 - Uit te voeren op nasopharyngeaal aspiraat (niet op sputum)
 - Eenvoudig - arbeidsintensief
 - Snel resultaat: TAT 15-30 min
 - Sensitiviteit veel lager dan PCR testen
- Positionering = eerder ikv besmettelijkheid dan besmet zijn (?)



Antigentest

- Validatie/vergelijking van 5 assays → in routine sinds 5 november 2020
 - Voor wie:
 - Iedere patiënt (ARI en niet-ARI) die ongepland opgenomen wordt
 - Personeel met milde ARI symptomen en noodzaak start werkshift
- snelle diagnose en isolatie meest besmettelijke patiënten/personeel
- (1) rechtstreekse opname van positieve ARI patiënten op de cohort afdeling
 - (2) vermijden van opname van sterk besmettelijke patiënten zonder ARI klachten op niet-COVID afdelingen
- wordt steeds gevolgd door moleculaire analyse

PCR sneltest

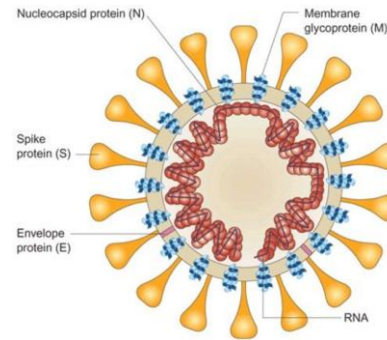
- “Sneltest” = snelle PCR
 - Test per test
 - Gevoeligheid vergelijkbaar met in-house test
 - Lage hands-on time (+-5 min)
 - TAT: $\pm 1u15$ (maar max 4 tegelijk)
 - Prijs per test: €€€
 - !!! Beperkte beschikbaarheid → restrictief gebruik



Overzicht gebruikte testen

	Klassieke PCR	PCR sneltest	Antigen (snel)test
Wat wordt opgespoord	Viraal RNA		Viraal antigen
Antwoordtijd vanaf staal in labo	5-24u	1u30 (niet tussen 21u en 7u)	30min
Performantie	Uitstekende sensitiviteit en specificiteit		Goede specificiteit, sensitiviteit beperkt
Beschikbaarheid		Zeer beperkt aantal testen beschikbaar	
Gebruik	Iedere patiënt waarbij men COVID-19 wil aantonen of uitsluiten	Klinische nood aan zeer snelle diagnostiek (iom COVID arts) Dringende, niet geplande heelkunde	Iedere patiënt (ARI en niet-ARI) die ongepland opgenomen wordt (niet rooming-in) Personeel met ARI symptomen en noodzaak start werkshift --> snelle diagnose en isolatie meest besmettelijke patiënten/personeel --> wordt steeds gevolgd door moleculaire analyse
Hoe aanvragen			Telefonisch
Resultaat	<p><i>SARS-CoV-2 RNA gedetecteerd</i> --> COVID-19 positief, besmettelijkheid ivf virale load, kliniek en evt voorgaande resultaten</p> <p><i>SARS-CoV-2 niet gedetecteerd</i> --> geen COVID-19</p>		<p><i>Positief</i> --> recente COVID-19 infectie, als besmettelijk te beschouwen</p> <p><i>Geen argumenten voor hoge besmettelijkheid</i> --> COVID-19 infectie niet uitgesloten, PCR volgt</p>

Serologie



- Spooft antistoffen (As) op
- Verschillende types testen:
 - Sneltesten (lateral flow), ELISA testen (batch-testen), CLIA testen (geautomatiseerd)
 - Gericht tegen spike proteïne (S) of nucleoproteïne (N)
 - Detectie van IgM, IgG, totaal aantal As, IgA
- Huidige situatie:
 - Serologische assay beschikbaar, geautomatiseerde assay die totaal aantal As opspooft
 - ??? Verband tussen aanwezigheid van As en bescherming tegen herinfectie (immuniteit)
 - ??? Duur aanwezigheid van As/immuniteit
- Belang:
 - Diagnostiek in tweede tijd bij negatieve PCR met sterke klinische/radiologische verdenking
 - Timing infectie
 - Epidemiologisch/vaccinatie (?)



PRAKTISCH



Staalafname & resultaten

- Labo afname:
 - Asymptotisch ikv hoogrisico contact/reis
 - Asymptotisch ikv geplande opname/ingreep (24u-72u vooraf)
 - Paucisymptomatisch
 - Opgenomen patiënten
 - Op afspraak:
 - Ma-vr: 8-19u (Aalst), 8-16u (Asse)
 - Za-zo: 8-16u (Aalst), 8-12u (Asse)
 - Aalst: 053 72 42 71; Asse: 02 300 62 42
- Spoed: symptomatisch
- Resultaten:
 - Labo microbiologie: 7u – 21u
 - TAT: 5-24u



Met dank aan

Het volledige klinisch laboratorium:

MLTs microbiologie, medewerkers labo afname Aalst/Asse, medewerkers dispatch, andere MLTs, moleculair biologen, ...