

Výhled v laboratorní diagnostice COVID-19 – úvaha

Lochman I., Kratochvíla J.

Veřejně dostupná data týkající se onemocnění COVID-19 způsobeného virem SARS-CoV-2 ukazují, že tento virus je dnes již celosvětově natolik rozšířen, a že, ať chceme nebo nechceme, ve velké části světa probíhá jeho komutativní přenos bez ohledu na to, jaká preventivní opatření prováděly nebo provádějí jednotlivé státy. Ta jen zpomalovala a zpomalují jeho šíření a budování tzv. stádní imunity. Preventivní opatření mají svůj význam. Naštěstí těžší průběhy tohoto onemocnění nejsou časté a většinou má tato infekce a jí vyvolané onemocnění (zejména u mladších věkových skupin) jen lehký nebo bezpříznakový průběh. V takových případech nebývá však zapojena ani specifická adaptivní imunita, jejíž součástí jsou protilátky. Proto jejich stanovování u jedinců, kteří infekci SARS-CoV-2 prodělali nebo prodělávají bezpříznakově nebo jen s lehkými příznaky, má zřejmě zatím jen velmi omezený význam a v současnosti se o jejich významu široce diskutuje. Vše je totiž v těchto případech řešeno na úrovni přirozené, více méně nespecifické, imunity, a to již na úrovni sliznic. Ty představují hlavní vstupní cesty do superorganismu člověka. Za této situace je namístě úvaha, zda by nebylo vhodné změnit i přístup k laboratorní diagnostice infekce SARS-CoV-2 tak, jak je uvedeno v následujícím textu.

1. Testování na přítomnost viru SARS-CoV-2 a zjištění potenciální infekčnosti nositele

Jelikož jde primárně o respirační virus, je zjišťována jeho přítomnost v nosohltanu jako předpokládané primární vstupní cestě do organismu člověka. Otázkou je, zda je optimální provádět detekci/průkaz (lépe ale stanovení) vybraných segmentů RNA viru z výtěru v nose nebo v ústní dutině anebo jinde. Při vyšetření by v každém případě měla být zjišťována i velikost virové nálože, a mělo by se provést **stanovení** viru v daném prostoru dýchacího, popř. zažívacího traktu, nejen jeho kvalitativní **detekce/průkaz**. Výsledek stanovení (průkazu) vybraných segmentů RNA viru SARS-CoV-2 metodou RT-PCR by měl být uváděn nejen jako kvalitativní popis, ale i kvantitativně alespoň v jednotkách ct (cycle of threshold), tj. udáním cyklu, při kterém je zaznamenán signál silnější než nastavená hodnota cut off pro daný test. Aby však mohly být srovnávány hodnoty ct dosažené v různých laboratořích

testovacími soupravami různých výrobců, musí být tyto soupravy verifikovány a bylo by zřejmě i nutné udávat výsledky v TCID₅₀ (tissue culture infective dose), tj. v množství viru způsobujícího cytopatický efekt u 50 % inokulované buněčné kultury, resp. v pfu (plaque forming unit), obě na mL vyšetřovaného roztoku. Přibližně lze říci, že 0,69 pfu = 1 TCID₅₀. K tomu by však jednotlivé srovnávané metody používané pro stanovení musely být harmonizovány. Kalibraci (doprovázenou i odhadem nejistoty pracovních kalibrátorů) by měl zajistit a v průvodní dokumentaci udávat výrobce testovacích souprav (v souladu se směrnicí IVD MD). Je třeba si uvědomit, že pomocí RT-PCR se stanovuje/detekuje jen aktuální přítomnost vybraných segmentů RNA viru v odebraném materiálu, nikoliv, zda se jedná o intaktní viriony schopné infikovat při uvolnění do daného prostředí další jedince (hostitele viru). To může být důležité při interpretaci výsledků vyšetření např. u možných chronických nosičů viru.

Při stanovování přítomnosti antigenů SARS-CoV-2 v daném prostoru organismu imunochromatografickými rychlotesty nebo nějakou formou klasických laboratorních EIA testů je nutno počítat s menší citlivostí těchto testů oproti RT-PCR, a to až o několik řádů. Při volbě těchto testů by mělo být podmínkou, že mají uvedenu klinickou citlivost ve srovnání s metodou RT-PCR a měli bychom preferovat takové testy, které dovolují vyhodnocení pomocí vhodného přístroje. U kazetových rychlotestů jsou to většinou POCT-skenery. Výstupem je pak zpravidla opět číslo, které by mělo být udáváno současně s kvalitativním popisem. Kazetové rychlotesty jsou však dnes, bohužel, vyhodnocovány většinou jen vizuálně a je udáván jen kvalitativní výsledek, nejčastěji pozitivní/negativní. Izolační roztoky pro PCR stanovení RNA, které jsou dnes většinou zároveň roztoky inaktivačními a lyzačními, nejsou použitelné pro průkaz antigenů, neboť rozrušují bílkoviny, které jsou cílovými strukturami detekovanými/stanovovanými v antigenních testech. Izolační roztoky pro antigenní testy lze naopak použít také pro RT-PCR testy s tím, že do izolačního postupu pro RT-PCR přidávají další krok – inkubace izolačního roztoku antigenního testu s inaktivačním a izolačním roztokem pro RT-PCR test.

Testování na přítomnost viru by zřejmě nemělo být prováděno plošně s cílem „protestovat“ celou populaci, a to zřejmě několikrát, poněvadž je to nejen ekonomicky neúnosné, ale i vědecky neopodstatněné. Testování by měli být zejména jedinci, kteří na sobě pozorují příznaky COVID-19, a to co nejdříve po jejich objevení! *Po provedených odběrech by se jedinec, pokud nebude ve stavu, vyžadujícím hospitalizaci, mohl sám snažit ihned po provedení stěrů na RT-PCR průkaz viru nebo antigenní test předpokládanou nebo vyšetřením potvrzenou virovou nálož v nosohltanu snižovat nebo eliminovat,*

např. inhalací horkých par alespoň 3x denně po dobu 2 dní, prolévání nosu vhodným médiem, a častým mytím rukou mýdlem nejen po použití WC, ale i při každém návratu domů z venkovních prostorů. Doporučuje se také užívat alespoň několik dní po objevení se příznaků onemocnění vysoké dávky vitamínu C (1000 mg/den), vitamínu D, popř. i některých stopových prvků, např. Zn a Se (7 až 11).

Při tomto postupu by se mohl výrazně snížit a dále postupně klesat počet vzorků, který bude nutno otestovat denně metodou RT-PCR event. antigenními testy tak, jak bude populace přirozeným promořováním nebo vakcinací postupně získávat imunitu proti SARS-CoV-2.

Není ani reálné předpokládat, že trvale budou existovat speciální odběrová místa pro Covid 19. Odběry budou muset být realizovány v běžných odběrových místech pro laboratorní vyšetření s tím, že odebírající personál bude muset mít při odběru respirátor, štít a rukavice. Pokud nebude provedena POCT detekce/stanovení antigenů viru ihned přímo v místě odběru vzorku, bude největším problémem zřejmě zajištění rychlého transportu odebraného vzorku do laboratoře, kde bude provedeno jeho statimové zpracování.

Je nutno mít na paměti, že Ag testy, ale i soupravy RT-PCR různých výrobců mohou poskytovat u některých jedinců rozdílné výsledky způsobené mj. také rozdílností použitých cílových SARS-CoV-2 antigenů a segmentů virové RNA.

2. Zjišťování promořenosti populace

Pro tyto účely je už nyní výhodné použít stanovení protilátek, které je běžně dostupné. Při přirozeném infikování virem SARS-CoV-2 by to měly být IgA a IgG protilátky, po parenterálním podání vakcíny pak IgM a IgG protilátky v období 1 až 3 měsíce po prodělané infekci. Stanovení, nikoliv jen detekce/průkaz, by mělo být použito i u rychlostestů, ať již by bylo testování prováděno z kapky krve, ze séra nebo z plasmy. Lze předpokládat, že u jedinců, kteří prodělají Covid-19 bezpříznakově nebo jen s lehkými příznaky, se budou nacházet asi jen IgA protilátky, a to již několik dní po prodělení infekce, resp. nástupu příznaků a budou přetrvávat krátce v řádu dní nebo týdnů. IgG protilátky, pokud se u těchto jedinců objeví, se budou objevovat později, ale měly by přetrvávat déle. Lze předpokládat, že jejich množství je přímo úměrné virové náloži. U jedinců, u nichž infekce překoná epiteliální bariéry a dostane se až k vnitřním orgánům těla, nejčastěji do plic, se pak budou tvořit v časných fázích infekce samozřejmě také ve větším množství IgM protilátky. U těchto jedinců pak budou v séru i zvýšené markery zánětu, jako je CRP, IL-6, IL-10 a další, bude u nich zaznamenán i pokles počtu lymfocytů v periferní krvi atd. Na druhé straně, zvláště tehdy, když u nich nebude onemocnění

provázáno kašlem a rýmou, nebude u nich s velkou pravděpodobností prokazatelná přítomnost virové RNA ve stěrech ze sliznice nosu. Při dostatečné citlivosti použité metody je pak stanovení protilátek proti SARS-CoV-2 vhodným nepřímým testem potvrzujícím prodělanou nebo prodělanou infekci SARS-CoV-2. **O tom, zda se již daný jedinec zbavil viru uvnitř těla, by ale vypovídalo nejlépe stanovení virové RNA ve stolicích nebo ve stěrech provedených z rektu (1, 2).**

Aby je bylo možno využít, je nutné, aby byly pro všechna tato vyšetření stanoveny podmínky indikace. Tento přístup k zjišťování promořenosti populace by ukazoval na dynamiku promořování populace a byl by ekonomicky i provozně výhodnější než dosud realizovaný plošný screening.

O tom, jak bude vyšetřovaný jedinec reagovat, když se s infekcí SARS-CoV-2 setká, by měly vypovídat IGRA testy (Interferon-Gamma-Release-assays), které jsou v současné době vyvíjeny a ověřovány (3 až 6). Tyto testy jsou již dnes široce využívány v diagnostice latentní TBC u pacientů postižených řadou různých onemocnění před nasazením biologické léčby a u jedinců s prodělanou a sérologicky potvrzenou CMV infekcí před plánovanou transplantací orgánů kvatiferonovými testy (QFN testy).

Prognosticky i diagnosticky významné se ukazují a mohou být i nové testy, které stanovují množství vybraných antigenů SARS-CoV-2 v séru nebo plasmě pacientů (12 až 16).

3. Problémy v laboratorní diagnostice COVID-19

Zásadním problémem všech testů aplikovaných dnes v diagnostice COVID-19 je nedostatek jejich harmonizace/standardizace a často, z toho plynoucí špatná interpretace jejich výsledků. Je to dáno nejen nedostupností nebo jen velmi omezenou dostupností mezinárodně uznávaných standardů a kalibrátorů, ale i obecnými vlastnostmi těchto testů, ať se již jedná o testy imunoanalytické (průkaz a stanovení protilátek a antigenů) nebo testy PCR (průkaz a stanovení definovaných úseků virové RNA). U kvalitativních testů, což jsou většinou testy, které odečítáme pouze vizuálně (kazetové rychlostesty na antigeny a protilátky bez vyhodnocení skenery) nemáme pro jejich hodnocení a srovnávání jinou možnost, než korelovat své subjektivně získané výsledky s parametry jako senzitivita a specifita deklarovanými výrobci. Všechny testy, které jsou odečítány pomocí různých analytických přístrojových platform, a jejichž výsledkem je nějaké číslo, by měly být v podstatě testy kvantitativními, i když často jejich výsledky prezentujeme jen v kategoriích jako testy kvalitativní. *Naměřené číslo odpovídá určitým jednotkám a těm je pak přiřazována určitá kategorie a její interpretace, která je prezentována jako výsledek testu. Test je pak*

označován jako test kvalitativní. Použijeme-li při hodnocení testu jednotky měřené přístrojem, pak, i když se tyto jednotky u testů různých výrobců mohou nazývat stejně, nemusí mít stejnou hodnotu, která by odpovídala referenční hodnotě nějakého mezinárodně uznávaného kalibrátoru, poněvadž zatím nejsou deklarovány a dostupné. Každý z testů vyhodnocovaných měřidlem by měl mít v návodu výrobcem uvedeno, jak interpretovat naměřené výsledky v interpretačních kvalitativních kategoriích. Tyto kategorie by měly být vždy alespoň tři: pozitivní, hraniční (metrologicky správně neprůkazný) a negativní. Výrobce by měl také deklarovat klinickou senzitivitu a specifčnost testu, popř. další parametry jako jsou pozitivní a negativní prediktivní hodnota testu. Ty jsou závislé na prevalenci onemocnění a na jasné definici jedinců s daným onemocněním (pro senzitivitu) a zdravých (pro specifčnost). To většinou chybí nebo je nedostatečné. Otázkou je, co od testu očekáváme. Zda nám má test rozlišit jedince nemocné od zdravých nebo nemocné od jedinců s jinými onemocněními, kteří ale mají stejné příznaky jako jedinci s námi definovaným a sledovaným onemocněním. V druhém případě je nám klasicky pojmána a udávána specifčnost testu k ničemu. U kvantitativních testů je pak výhodné udávat konečné výsledky jako **indexy pozitivity (IP)**, tj. poměr mezi naměřenou hodnotou vzorku a hodnotou meze pozitivity (cut off). To výrazně zjednodušuje a zpřehledňuje porovnávání jednotlivých testů, aniž by porušilo metodiku udávanou výrobcem, poněvadž na hodnoty udávané výrobcem lze velmi jednoduše IP zpět převést. V každém případě by však neměly být používány a povoleny v diagnostice testy, jejichž parametry udávané výrobcem nebudou ověřeny v nezávislé, referenční laboratoři, a pokud ta není dostupná, tak v laboratoři, která test hodlá používat, v ideálním případě nebudou-li vlastnit certifikát FDA či EU. *Certifikáty EUA (Emergency Used Authorization), vydávané od 4. 2. 2020 americkým orgánem FDA (Food and Drug Administration) by měly být podmínkou používání metod v klinické laboratoři, a to jak testovacích souprav, tak „in-house“ (v laboratoři vyvinutých) metod. Podmínky udělení certifikátu EUA pro metodu zahrnují i základní požadavky na analytické a preanalytické parametry metod, obdobně je to i u certifikátu CE-IVD (In Vitro Diagnostic Medical Device – Directive 2017/746 EC).* Diagnosticky výhodné jsou samozřejmě testy, které mají co nejužší rozmezí neprůkazných (hraničních) hodnot, a to jak z klinického, tak analytického hlediska.

Seznam vybrané literatury

1. Fabian T, Nelson-Dooley C.: Coronavirus stool testing. SARS-CoV-2 qPCR stool test from diagnostic solutions laboratory. 2020. Dostupné na: <https://www.diagnosticsolutionslab.com/>

- blog/coronavirus-stool-testing.
2. Ge R a spol.: Positive stool test suggests that the discharge standard of COVID-19 needs to be improved. *Jpn J Infect Dis* 2020. Dostupné na: doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.265.
 3. Lineburg KE, Srihari S, Altaf M, Swaminathan S, Panikkar A. a spol.: Rapid detection of SARS-CoV-2-specific memory T-cell immunity in recovered COVID-19 cases. *Clin Transl Immunology*. 2020. Dostupné na: doi: 10.1002/cti.2.1219.
 4. Oxford/Immunatec T-SPOT Discovery SARS-CoV-2 assay. Dostupné na: <https://www.tspotdiscovery.com/>.
 5. Mabtech ELISpot and FluoroSpot kits. Dostupné na: <https://www.mabtech.com/>
 6. SARS-CoV-2 Interferon Gamma Release Assay (Research Use Only). Dostupné na: <https://www.euroimmun.de/en/>.
 7. Minkyung Bae, Hyeyong Kim.: The Role of Vitamin C, Vitamin D, and Selenium in immune system against COVID-19. *Molecules* 2020, 25, 5346; Dostupné na: doi:10.3390/molecules25225346.
 8. Abobaker A, Alzwi A, Alraied AHA.: Overview of the possible role of vitamin C in management of COVID-19. *Pharmacological Reports*. Dostupné na: <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00176-1>.
 9. Grant WB, Lahore H, McDonnell SL, Baggerly CA, French CB. A spol.: Evidence that Vitamin D supplementation could reduce risk of Influenza and COVID-19 infections and deaths. *Nutrients* 2020, 12, 988; Dostupné na: doi:10.3390/nu12040988.
 10. Holford, P, Carr, A, Jovic TH, Ali SR, Whittaker IS a spol.: Vitamin C—An adjunctive therapy for respiratory infection, sepsis and COVID-19. Dostupné na: doi: 10.20944/preprints202010.0407.v1). <https://www.preprints.org/manuscript/202010.0407/v1>.
 11. Vysoké dávky vitamínu C při léčbě onemocnění COVID-19. *MEDICINA PO PROMOCI* 2020; 21(3): 1-4.
 12. Li T, Wang L, Wang H, Li X, Zhang S a spol.: Serum SARS-COV-2 nucleocapsid protein: A sensitivity and specificity early diagnostic marker for SARS-COV-2 infection. *BMJ*. 2020 May 20. Dostupné na: doi: 10.1101/2020.05.24.20111849.
 13. Hingrat QLE, Visseaux B, Laouane C, Tubiab S, Bouadma L a spol.: SARS-CoV-2 N-antigenemia: A new alternative to nucleic acid ampli-

fication techniques. BMJ, 2020. Dostupné na: doi: 10.1101/2020.09.14.20191759.

14. Hingart QLE, Visseaux B, Laouean C, Tubiab S, Bouadma L a spol.: Detection of SARS-CoV-2 N-antigen in blood during acute COVID-19 provides a sensitive new marker and new testing alternatives. *Clinical Microbiology and Infection*, 2020. Dostupné na: <https://doi.org/10.1016/cmi.2020.11.025>.
15. Ogata AF, Maley AM, Wu C, Gilboa T, Nor-

man M a spol.: Ultra-sensitive Serial Profiling of SARS-CoV-2 Antigens and Antibodies in Plasma to Understand Disease Progression in COVID-19 Patients with Severe Disease. *Clin Chem*. 2020. Dostupné na: doi: 10.1093/clinchem/hvaa213.

16. Dostupné na: <https://www.biohit.cn/Antigen/index.aspx>.

Uváděny jsou jen vybrané citace.