Mohou sérologické metody pomoci při diagnostice COVID-19 v případě opakované falešné negativity výsledku PCR testu?

MUDr. Miroslav Kubiska, doc. MUDr. Dalibor Sedláček, CSc., MUDr. Ing. Robin Šín, MBA

Klinika infekčních nemocí a cestovní medicíny, Lékařská fakulta v Plzni, Univerzita Karlova, Fakultní nemocnice Plzeň

Prezentujeme kazuistiku pacienta s klasickými příznaky respiračního onemocnění, u kterého byl opakovaně negativní výsledek RT-PCR na průkaz RNA viru SARS-CoV-2, ale imunochromatografickým rychlým testem byla detekována přítomnost protilátek třídy IgM, později také IgG. Typický pro virovou pneumonii při onemocnění COVID-19 byl také nález při CT vyšetření plic. I v současné době plně dostupných laboratorních a mikrobiologických vyšetření neklesá význam kvalitně odebrané anamnézy, klinického vyšetření a posouzení průběhu nemoci.

Klíčová slova: COVID-19, SARS-CoV-2, horečka, kašel, RT-PCR, imunochromatografický rychlý test.

Can serological methods be helpful in the diagnosis of COVID-19 in cases of repeated false negative results of PCR tests?

We present the case report of a patient with classical symptoms of respiratory disease, who has had repeat negative RT-PCR results of the SARS-CoV-2 virus RNA, but a rapid immunochromatographic test detected the presence of IgM class antibodies, later also IgG. A typical picture of viral pneumonia in COVID-19 was also found during a CT scan of the lungs. Even currently, in the era of fully available laboratory and microbiological examinations, a well-collected medical history, clinical examination and assessment of the course of the disease remain imperative.

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, fever, cough, RT-PCR, rapid immunochromatographic test.

Úvod

Na konci roku 2019 se v čínském Wu-chanu začalo ve větším počtu případů vyskytovat závažné respirační onemocnění postihující především dolní dýchací cesty a plíce. Epidemiologickým šetřením byla u prvních případů zjištěna spojitost s velkoobchodním tržištěm Chua-nan (1). Již v lednu se onemocnění rozšířilo mimo asijský kontinent a postupně nabylo charakteru celosvětové pandemie. Jako původce onemocnění byl identifikován nový β-koronavirus pojmenovaný SARS-CoV-2. Většina koronaviřů způsobuje u lidí běžná nezávažná respirační onemocnění (2), ale již delší dobu jsou známy i vysoce patogenní viry způsobující onemocnění SARS a MERS. U onemocnění SARS je popisována smrtost

nakažených kolem 10 %, u MERS je to potom až 35 % (3, 4).

Hlavním zdrojem viru SARS-CoV-2 je infikovaný člověk. Nejvíce viru je vylučováno v iniciální fázi onemocnění při kašlání a kýchání. Kapénky se pak běžně šíří do vzdálenosti až 2 metrů. K nákaze pak dochází nejčastěji vdechnutím nebo zasažením sliznic kapénkami při blízkém styku osob nebo nepřímo kontaktem s kontaminovanými předměty a povrchy. Průměrná inkubační doba se pohybuje kolem 5,2 dne a s ohledem na její distribuci na časové ose byla stanovena maximální inkubační doba na 14 dní (5). Onemocnění se nejčastěji projevuje respiračními příznaky. Jedná se především o horečku, kašel, dušnost, myalgie a artralgie, dále celkovou slabost a zvýšenou únavu (6). Při laboratorním

vyšetření se u pacientů se středně těžkým a těžkým průběhem pozoruje elevace C-reaktivního proteinu, interleukinu-6, laktátdehydrogenázy, kreatinkinázy, feritinu. Počet leukocytů bývá většinou normální nebo snížený. V diferenciálním rozpočtu lze častěji pozorovat lymfocytopenii (7). V oblasti zobrazovacích metod je vhodné provedení CT plic, které odhaluje typický obraz virové pneumonie. Standardem pro diagnostiku onemocnění COVID-19 je detekce virové RNA pomocí RT-PCR ve výtěru z nosohltanu nebo v aspirátu z dýchacích cest.

Kazuistika

Muž, 61 let, dosud vážněji nestonající a bez chronické medikace byl přivezen zdravotnickou záchrannou službou dne 24. března 2020 na

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA: MUDr. Miroslav Kubiska, kubiskam@fnplzen.cz
Klinika infekčních nemocí a cestovní medicíny, Fakultní nemocnice Plzeň
Edvarda Beneše 1128/13, 305 99 Plzeň

Cit. zkr: Med. praxi 2020; 17(3): 194–196
Článek přijat redakcí: 4. 5. 2020
Článek přijat k publikaci: 18. 5. 2020

Tab. 1. Laboratorní hodnoty pacienta

	19. 3. 2020 ambulance	24. 3. 2020 hospitalizace
Krevní obraz		
Leukocyty ($\times 10^9/l$; normální hodnota 4,0–10,0)	4,2	5,5
Lymfocyty (podíl; normální hodnota 0,2–0,45)	0,36	0,1
Trombocyty ($\times 10^9/l$; normální hodnota 150,0–400,0)	133	137
Erytrocyty ($\times 10^{12}/l$; normální hodnota 3,8–5,2)	5,85	5,03
Hemoglobin (g/l; normální hodnota 120,0–160,0)	159	138
Biochemie		
Bilirubin celkový ($\mu\text{mol/l}$; normální hodnota 0–25,0)	13	9
ALT ($\mu\text{kat/l}$; normální hodnota 0–1,0)	0,66	0,41
AST ($\mu\text{kat/l}$; normální hodnota 0–0,8)	0,51	0,54
GGT ($\mu\text{kat/l}$; normální hodnota 0–1,9)	1,88	2,02
Močovina (mmol/l; normální hodnota 3,0–8,0)	7	5,8
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$; normální hodnota 62,0–106,0)	111	75
Sodík (mmol/l; normální hodnota 137–145)	141	138
Draslík (mmol/l; normální hodnota 3,6–4,8)	4,4	4,1
Chloridy (mmol/l; normální hodnota 98–109)	105	105
Vápník (mmol/l; normální hodnota 2,1–2,6)	2,08	2,16
Hořčík (mmol/l; normální hodnota 0,8–1,1)	0,93	0,91
CK ($\mu\text{kat/l}$; normální hodnota 0,1–3,2)	2,61	1,16
LDH ($\mu\text{kat/l}$; normální hodnota 0–4,2)	6,53	5,77
Myoglobin ($\mu\text{g/l}$; normální hodnota 28,0–72,0)	49,2	29,3
TroponinT hs (ng/l; normální hodnota < 14)	–	11
NTproBNP (ng/l; < 125)	–	313
Glukóza (mmol/l; normální hodnota 3,6–5,6)	6,5	7,9
Hemokoagulace		
APTT (s; normální hodnota 25,9–40,0)	–	46
Protrombinový test (s; normální hodnota 12,0–15,0)	–	14,2
Markery zánětu		
CRP (mg/l; normální hodnota 0–5,0)	19	121
Prokalcitonin ($\mu\text{g/l}$; normální hodnota 0–0,1)	0,1	0,1
Interleukin-6 (ng/l; normální hodnota 0–7,0)	6	102,7
Feritin ($\mu\text{g/l}$; normální hodnota 30,0–284,0)	–	2 004

ambulanci Kliniky infekčních nemocí a cestovní medicíny pro 8 dnů trvající kašel, horečku až 39,6 °C, profúzní pocení, celkovou slabost a únavu. Užíval střídavě paracetamol a ibuprofen v běžném dávkování s dobrým efektem. Anamnesticky byl asi před týdnem v kontaktu s kolegou v práci, který se vrátil z dovolené ve Francii.

Ambulantně byl ošetřen již 19. března 2020, kdy byl afebrilní (krátce po užití antipyretika), kardiopulmonálně kompenzovaný, eupnoický, normosaturovaný na vzduchu. Fyzikální nález byl v normě, a to včetně poslechu plic. Laboratorní nález byl až na elevaci laktátdehydrogenázy bez pozoruhodností. Z parametrů zánětu byla přítomna jen mírná elevace C-reaktivního proteinu, negativní prokalcitonin a interleukin-6 (tabulka 1). Provedený imunochromatografický rychlý test (Innovita, Tangshan, Biological Technology, Co. Ltd.) na průkaz protilátek proti koronaviru SARS-CoV-2 byl ve třídách IgM i IgG

negativní. Vzhledem k celkovému klinickému stavu nebyla hospitalizace indikována a stav byl uzavřen jako virový infekční horních cest dýchacích.

V následujících třech dnech došlo k progresi obtíží s následnou 3denní hospitalizací na interním oddělení spádové okresní nemocnice. Zde byla na RTG snímku popsána počínající bronchopneumonie. V laboratoři byla nadále mírná elevace C-reaktivního proteinu s hodnotou 47 mg/l. Antigeny *Streptococcus pneumoniae* a *Legionella pneumophila* v moči byly negativní, chřipka A i B a RS viry metodou PCR také negativní. Nasazena byla intravenózní antibiotická terapie amoxicilinem/kyselinou klavulanovou v dávce 1,2 g každých 8 hodin a ciprofloxacinem v dávce 400 mg každých 12 hodin. Vzhledem k probíhající chřipkové epidemii byl až do vyloučení chřipky nasazen perorálně oseltamivir v dávce 75 mg každých 12 hodin. Stále ještě nebyl známý výsledek

ambulantně provedeného výtěru na RT-PCR SARS-CoV-2.

Vzhledem ke zhoršující se epidemiologické situaci a trvajícímu podezření na onemocnění COVID-19 byl pacient po domluvě přeložen na Klinikou infekčních nemocí a cestovní medicíny Fakultní nemocnice Plzeň, kde byl vstupně opakovaně nasofaryngeální výtěr na RT-PCR SARS-CoV-2, včetně multiplexu chřipky A i B a RSV. Výsledek 1. i 2. výtěru byl negativní, ale rychlým testem byly prokázány protilátky ve třídě IgM. Bylo provedeno CT plic, které prokázalo oboustranně rozsáhlé infiltráty, GGO i crazy paving (opacities charakteru mléčného skla se ztlustěním interlobulárních sept), tedy obraz typický pro virovou pneumonii při COVID-19 (obrázky 1–3). V laboratoři při příjmu již byla výrazná elevace C-reaktivního proteinu s hodnotou 121 mg/l, pozitivní byl také interleukin-6, prokalcitonin byl nadále hraniční. Nadále byla znatelná elevace laktátdehydrogenázy a v krevním obraze byla přítomna mírná lymfocytopenie a trombocytopenie.

Během hospitalizace na standardním izolačním lůžku se pokračovalo v zavedené antibiotické a symptomatické terapii potencionálním aminopenicilinem a makrolidem. Byla potřeba oxygenoterapie o nízkém průtoku kyslíku nosními hroty. Preventivně byl podáván LMWH v profylaktické dávce a expektorancia s dobrým efektem. Hospitalizace byla komplikována nově vzniklými tlakovými bolestmi v levé polovině hrudníku a retrosternálně, bez propagace, bez návaznosti na kašel či pohyb. Dechově nebyl zhoršen, bez jiné symptomatologie, normotenzní, mírně tachykardický, eupnoický, normosaturovaný při průtoku kyslíku 3 l/min. noztrilami. Na EKG byl zachycen nově vzniklý kompletní LBBB, ale kardiologická laboratoř byla opakovaně v normě. Postupně se EKG křivka normalizovala a nebyla nutná kardiologická intervence. Další průběh hospitalizace byl bez komplikací, bez stenokardií, EKG nález byl v normě.

Před propuštěním pacienta do domácího prostředí se opakoval nasofaryngeální výtěr na RT-PCR, již 3. v pořadí, opět s negativním výsledkem. Rychlý test byl pozitivní s průkazem protilátek ve třídě IgG. Vzhledem k epidemiologické anamnéze a pozitivitě rychlého testu (zpočátku IgM a při propuštění IgG) jsme případ uzavřeli jako virovou pneumonii při onemocnění COVID-19.

Obr. 1, 2, 3. Oboustranně rozsáhlé infiltráty široce nasedající na pleuru, GGO + crazy paving (zdroj: Klinika zobrazovacích metod, Fakultní nemocnice Plzeň)

Diskuze

Byl prezentován pacient se suspektní epidemiologickou anamnézou, typickým klinickým obrazem, plicním nálezem na CT a laboratorními hodnotami, které vedly kli-

niky k podezření na onemocnění COVID-19. Specifické testy správně odebraných nazofaryngeálních výtěrů, vyšetřených pomocí RT-PCR však byly opakovaně negativní. Takových případů je v současnosti popisováno různými autory více (8, 9). Důvodů pro falešnou negativitu při vyšetření pomocí PCR může být několik. Již v preanalytické fázi může být chyba v nesprávném způsobu odběru biologického materiálu při nazofaryngeálním výtěru. Ten musí být proveden dostatečně dlouhou speciální virologickou výtěrkou poněkud razantnějším způsobem z povrchu sliznice zadní stěny nosohltanu. Pro pacienty je tento odběr velmi nepříjemný. Zanoření a zalomení výtěrky do solubilního virologického média před vlastním transportem do laboratoře je zásadní podmínka. Pokud je materiál odebrán nesprávně, je znehodnocen, nebo je ho málo, nemusí být zachyceno dostatečné množství virů potřebné pro vyšetření RT-PCR. Největší množství SARS-CoV-2 je v nosohltanu symptomatických pacientů přítomno v prvních pěti dnech onemocnění, později je výhodnější vyšetření aspirátu z dolních dýchacích cest (u intubovaných pacientů). Oligo- či asymptomatických pacientů mohou vylučovat jen malé množství virů. Pokud je výtěr z nosohltanu prováděn v pozdní fázi onemocnění, šance na průkaz virové RNA významně klesá. Vlastní analytická fáze může rovněž přispět k falešné negativitě testu při nesprávném uložení a zpracování materiálu. Podle typu použitého PCR testu může být také různá senzitivita, která se obecně uvádí 70 %. Je třeba vědět, že pozitivní RT-PCR v materiálu odebraného v pozdní fázi onemocnění neznamená automaticky, že pacient je v té době ještě infekční. Bylo prokázáno, že životnost SARS-CoV-2 významně klesá po 8. dnu trvání onemocnění, ale RT-PCR, prokazující pouze RNA, může v té době být pozitivní. Pozitivita PCR byla prokazována často intermitentně i 2–4 týdny po vyléčení. Při negativitě RT-PCR se opakovaně

ukazuje jako důležitý nástroj pozitivní nález při provedeném CT plic (10, 11).

Vztah lékařské veřejnosti k tzv. rychlým imunochromatografickým testům, detekujícím specifické protilátky IgM a IgG, není v současné době příliš pozitivní. Jejich využití v klinické praxi je limitováno přímo biologickými procesy hostitele, jako je např. pozdní vzestup hladiny protilátek. Na základě praktických zkušeností infektologů v Česku se doporučuje námi využívané testy používat nejdříve 14 dnů od rizikového kontaktu či 7 dnů od začátku klinických příznaků (12). Nízkou senzitivitu rychlých testů by mohly v nejbližší době odstranit již existující citlivější enzymoimunoanalytické metody, např. ELISA. Podporu pro klinické rozhodování v naší klinice umožnil nepřímý průkaz patogena pomocí detekce specifických protilátek nejprve v izotypu IgM, později také IgG.

Závěr

Onemocnění COVID-19 může mít jednak celou řadu typických klinických příznaků, jednak může probíhat oligo- či dokonce asymptomaticky. Epidemiologická anamnéza v současné době již zpravidla při kvalifikovaném rozhodování mnoho nepomůže. Specifické RT-PCR testy prokazující RNA SARS-CoV-2 existují, ale jejich senzitivita není dostatečná a často se i při výsoce suspektním klinickém, CT, i laboratorním nálezu setkáváme s jejich negativitou. I přes uvedené je přímý průkaz infekce SARS-CoV-2 pomocí RT-PCR základní a v současnosti zcela nenahraditelnou metodou. Nepřímé průkazy původce pomocí detekce specifických IgM a IgG nemusí vždy pomoci a jedná se spíše o metodu doplňkovou. Současný diagnostický postup by proto měl vycházet především z klinického obrazu, CT vyšetření plic, pomocných hematologických a biochemických vyšetření s hlavním zaměřením na markery zánětu, a v neposlední řadě i z laboratorních vyšetření přímo či nepřímo prokazujících patogena.

LITERATURA

1. Bogoch II, Watts A, Thomas-Bachli A, Huber C, Kraemer MUG, Khan K. Pneumonia of unknown etiology in wuhan, China: potential for international spread via commercial air travel. *J. Trav Med* 2020; 27(2): taaa008. doi: 10.1093/jtm/taaa008.
2. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* 2019; 17(3): 181–192. doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
3. Song Z, Xu Y, Bao L, Zhang L, Yu P, Qu Y, et al. From SARS

- to MERS, thrusting coronaviruses into the spotlight. *Viruses* 2019; 11(1): 59. doi: 10.3390/v11010059.
4. Yin Y, Wunderink RG. MERS, SARS and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology* 2018; 23(2): 130–137. doi: 10.1111/resp.13196.
5. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. *N Engl J Med* 2020; 382(13): 1199–207.

doi: 10.1056/NEJMoa2001316.

6. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 2020; 395(10223): 497–506. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.

Další literatura u autora
a na www.medicinapropraxi.cz