

PCR a antigenní testy, virus v životním prostředí

Omar Šerý

Laboratoř neurobiologie a patologické fyziologie, Ústav
živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i., Rumburská 89,
Liběchov

Elisabeth Pharmacon, spol. s r. o., Rokycanova 4437/5, Brno

Laboratoř DNA diagnostiky, Ústav biochemie,
Přírodovědecká fakulta MU, Kamenice 5, Brno

Přednáška: část technická a výzkumná

Technická část – odběr vzorků, transport, izolace RNA, RealTime PCR, vyhodnocení výsledků, antigenní testy

Výzkumná část – detekce koronaviru v tkáních osob, které zemřely na COVID-19
- detekce koronaviru v prostředí



Odběr vzorků na SARS-CoV-2

Nasopharyngeální, oropharyngeální stěr, jazyk, sliny?

Studie pro MZ ČR z 8.4.2020 na 19 pacientech

Sliny z kořene jazyku dostatečné pro DNA diagnostiku

Oropharyngeální stěr je dostatečně citlivý

Používání vatových tamponů nevhodné (inhibice PCR)

**Dekontaminace odběrových center a laboratoří od
nukleových kyselin!!!**

Transport vzorků na SARS-CoV-2

Média pro transport virů s odebraným materiálem nutno chladit. Dochází k ředění virů.

Lyzační média zabezpečí uchování virové RNA při pokojové teplotě a minimálně 15x zvyšují citlivost detekce.

Izolace RNA viru SARS-CoV-2

Metody využívající silica kolonky nebo paramagnetické částice

Bez izolace – ředění vzorků – inhibice, nebezpečí falešně negativního výsledku.

PCR detekce viru SARS-CoV-2

Více cílů ve virové RNA – stačí dva cíle, jeden cíl je málo.

Chyby v používání interní kontroly – nesmí se detekovat lidská RNA jako interní kontrola – nelze kontrolovat její množství a případnou inhibici.

Většina byť akreditovaných laboratoří nehlídá interní kontrolu a reportuje výsledky s inhibicemi jako negativní. Sputum inhibuje a je častější ve vzorcích pozitivních osob, jak ukázala praxe.

Antigenní testy pro detekci viru SARS-CoV-2

Základní otázka – co chceme diagnostikovat?

Referenční laboratoře rozesílají pro evaluaci klinických laboratoří homeopatická množství viru v kontrolních vzorcích. Ty které je nezachytí mají horší hodnocení.

Potřebujeme zachytit nízkou pozitivitu na začátku onemocnění a zamezit dalšímu šíření viru?

Potřebujeme diagnostikovat probíhající respirační onemocnění?

Potřebujeme ověřit vylučování viru na konci onemocnění?

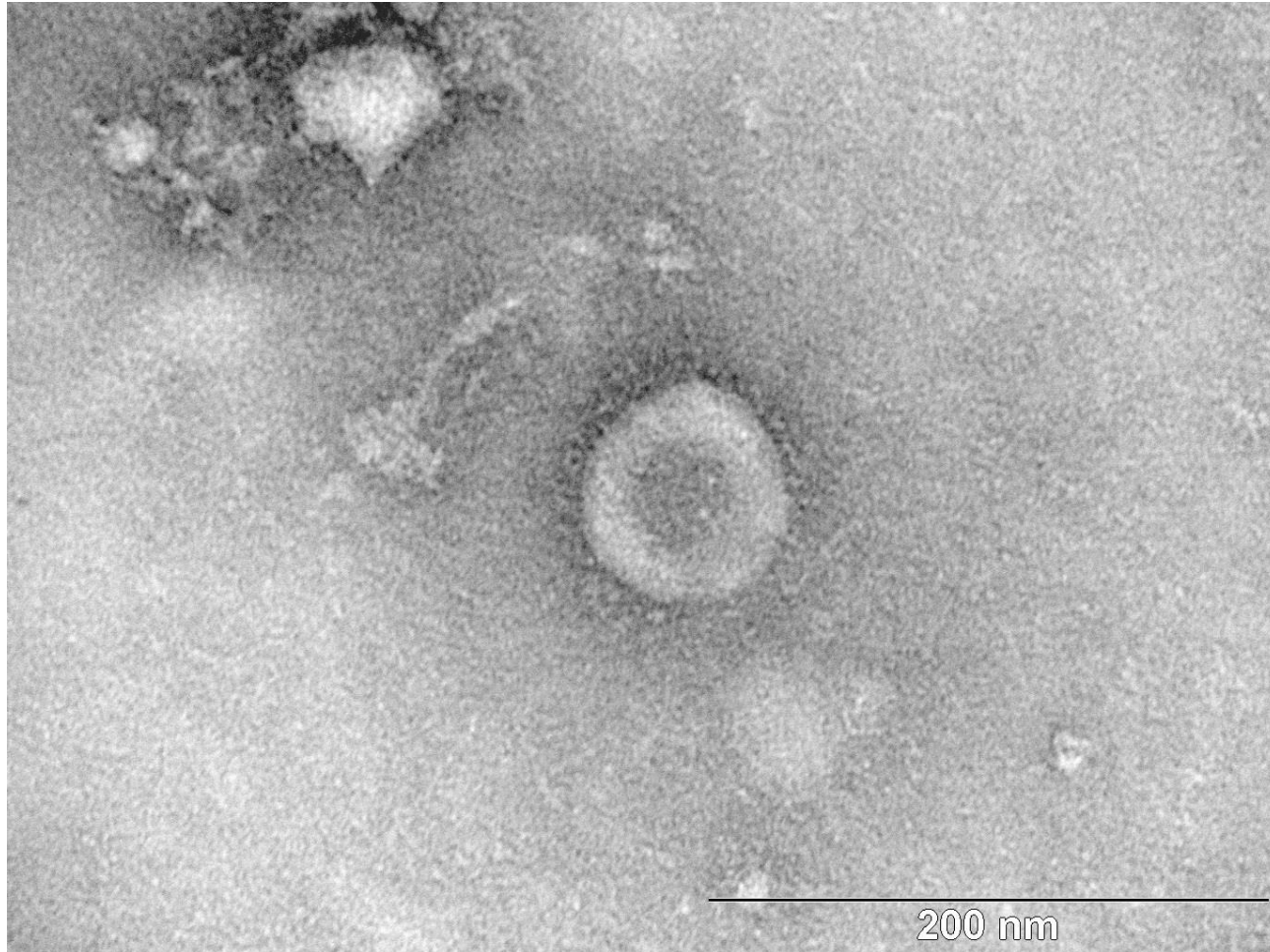
Antigenní testy pro detekci viru SARS-CoV-2

Antigenní testy – záchyty řádově do 28 cyklu RealTime PCR

- více než 1000x méně citlivé než PCR testy**
- falešná negativita i pozitivita**
- nejsou určeny pro testování bezpříznakových osob**
- falešný pocit bezpečí při negativním výsledku**
- mnohem více záleží na správném způsobu odběru vzorku než u PCR metody**

Koronavirus SARS-CoV-2

Vlastní výsledky výzkumu



Koronavirus SARS-CoV-2

Co se děje s koronavirem v lidském těle?

Rozšíření viru v těle

Primární nákaza dýchací cesty

Plíce

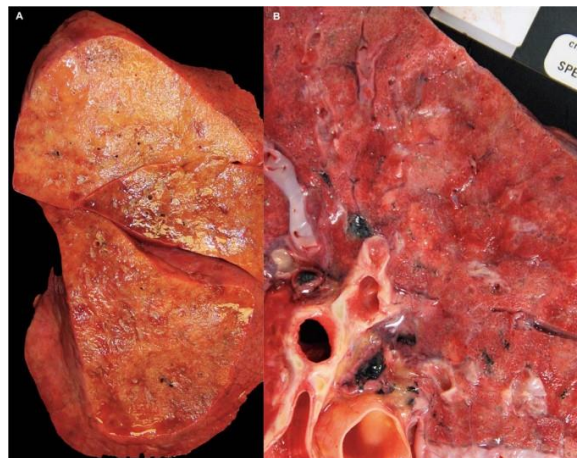
Krev

Další orgány – srdce, vaječníky, varlata, slinivka,
mozek, štítná žláza, nadledviny, ledviny, slezina,
prostata, moč, oko

Koronavirus SARS-CoV-2

Co se děje s koronavirem v lidském těle?

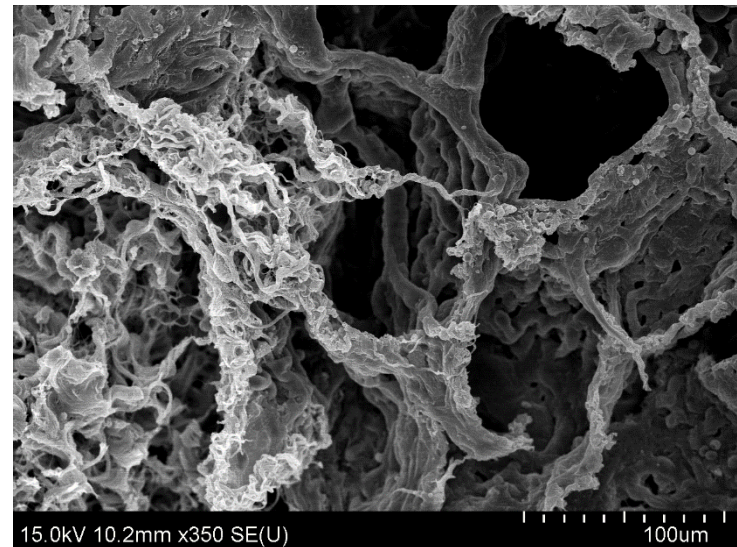
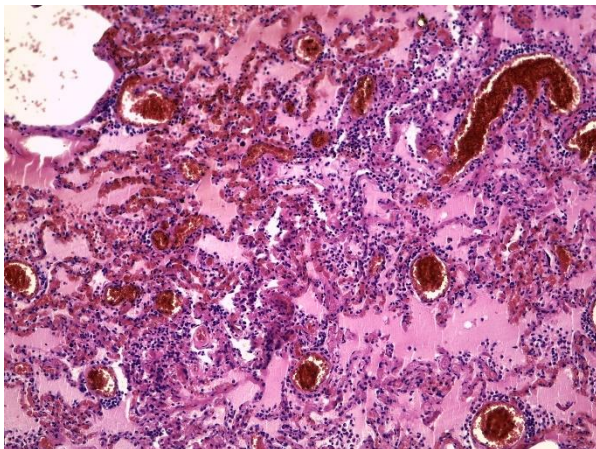
Plíce napadené koronavirem: jsou mnohem těžší, nasáklé tekutinou, průdušnice a průdušky plné hlenu, plíce mají spíše fialovou barvu, ztrácejí svou funkci a jejich zánět je hlavní příčinou úmrtí



Koronavirus SARS-CoV-2

Co se děje s koronavirem v lidském těle?

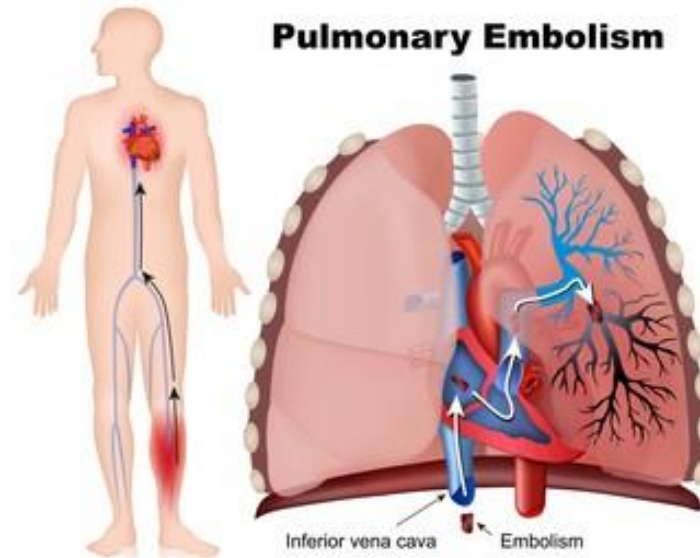
Mikroskopické snímky plic ukazují na tzv. intersticiální pneumonii s poškozením plicních sklípků, které obsahují četné neutrofilů a další bílé krvinky. V průběhu dní a týdnů dochází pak k fibrotizaci plicní tkáně.



Koronavirus SARS-CoV-2

Co se děje s koronavirem v lidském těle?

U některých osob zemřelých na koronavirus jsme pozorovali tvorbu trombů především v plicích, což bylo příčinou úmrtí.



PCR detekce viru v těle zemřelých

Intermitentní vylučování viru?

V plicích často 100x více virů než v nosohltanu

Oropharyngeální stěry často lepší než nasopharyngeální

Virová RNA v mrtvém těle vydrží i 2 týdny

Koronavirus SARS-CoV-2

Viabilní virus může být vylučován u osob, které se nakazí podruhé (Letizia et al., 2021, *The Lancet*). Všichni co vylučovali virus neměli virusneutralizační protilátky.

Correspondence 

Viable virus shedding during SARS-CoV-2 reinfection

The reinfection risk in individuals previously infected with SARS-CoV-2 is about a fifth of those never infected.^{1,2} Whether reinfected individuals shed viable virus has been identified as an important question relevant to pandemic control.³

In a prospective cohort study in *The Lancet Respiratory Medicine*,² we identified 19 cases of reinfection in people who at study entry were seropositive for both SARS-CoV-2 receptor binding domain and full-length spike protein, tested negative on three nasal swab PCR tests over a 2-week quarantine period, and subsequently developed a positive PCR test at least 2 weeks after leaving quarantine.² We have now investigated whether these SARS-CoV-2-reinfected individuals shed viable virus.

Viral transport media was available from the first and some subsequent

Vero E6/TMPRSS2 cells to quantify the level of detectable infectious virus.

Viable virus was detected in only four (25%) of 16 participants, and only once in each, with titres ranging from 1.7 to 5.5 log₁₀ plaque-forming units per mL. Serology and PCR cycle threshold (Ct) values using the US Food and Drug Administration-authorized Thermo Fisher TaqPath COVID-19 Combo Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were compared in those with viable virus detected (shedders) and those without viable virus detected (non-shedders; table; appendix p 2). At the time of positive viral culture, samples from shedders had lower Ct values. Although all participants had detectable SARS-CoV-2 spike IgG at study enrolment, none of the four shedders and only four (33%) of the 12 non-shedders had detectable serum neutralisation activity (limit of detection was 50% inhibitory dilution of 20) in serum at the time of enrolment into the study (methods

all four culture-positive individuals (methods previously described²). Although the strains isolated all had the Asp614Gly spike protein mutation and two of the isolates had the Leu18Phe spike protein mutation, they did not have mutations associated with the B.1.1.7, P.1, B.1.351, or other variants of concern as currently defined by the US Centers for Disease Control and Prevention (appendix p 3).

Limitations of our study are the use of virus culture as a proxy for capacity for transmission without direct study of transmission, the small sample size, the absence of specimens available for culturing from all reinfected participants, and the inability to compare potential for transmissibility between those who are infected for the first time and those who are reinfected.

Overall, our findings suggest that about a quarter of young healthy individuals with subsequent SARS-CoV-2 reinfection shed viable virus. Some of these individuals were asymptomatic and could unknowingly



Lancet Respir Med 2021
Published Online
May 5, 2021
[https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00219-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00219-8)
†Contributed equally

For the study by Letizia AG and colleagues see *Online/Articles Lancet Respir Med* 2021; published online April 15; [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00158-2)
See *Online* for appendix

Koronavirus SARS-CoV-2

Co z uvedeného plyne?

K rozšíření infekce došlo také díky propuštění lidí z izolace po sedmi dnech od nákazy. Většina z nich byla totiž infekční pro své okolí. Chybou MZ ČR bylo zkrácení izolace na 7 dnů bez potřeby negativního PCR testu na konci a nyní je izolace jen 5 dnů.

Koronavirus SARS-CoV-2

Co z uvedeného plyne?

Očkovaní lidé se mohou nakazit a pokud se nakazí mohou být pro své okolí infekční. Zvýhodňování očkovaných proti neočkovaným tím, že mohou cestovat a nemusejí se testovat je nevědecké, neetické a nebezpečné.

Koronavirus SARS-CoV-2

Co z výzkumu vyplývá?

Výsledky zatím zpracováváme a je připravováno několik manuskriptů.

Lze konstatovat, že i týdny po nákaze lze pozorovat virus v plicích a jiných orgánech, když je již člověk PCR negativní z nasopharyngeálního stěru. Virus bývá ve stolici.



Occurrence of SARS-CoV-2 in Indoor Environments With Increased Circulation and Gathering of People

Radka Dzedzinska^{1,2}, Petr Kralik^{1,2} and Omar Šerý^{1,2,3*}

¹ Laboratory of Neurobiology and Pathological Physiology, Institute of Animal Physiology and Genetics, Czech Academy of Sciences, Liběchov, Czechia, ² Elisabeth Research Institute, Brno, Czechia, ³ Laboratory of DNA Diagnostics, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czechia

At the time of sampling (2020/2021), the number of new cases of SARS-CoV-2-positive individuals in the Czech Republic significantly exceeded the numbers in neighboring countries and in the EU. In terms of the number of deaths, the country ranked near the top of the list. Legislative orders required wearing masks indoors, disinfecting surfaces in public places, and limiting the number of people per sales area in commercial spaces. Due to an situation, most schools and shops were closed. The entire country anticipated

*CORRESPONDENCE: Omar Šerý, sery@iapg.cas.cz

Koronavirus SARS-CoV-2

Brněnská hlavní pošta 17.12.2020



Koronavirus SARS-CoV-2

Galerie Šantovka Olomouc 17.2.2021



Koronavirus SARS-CoV-2

Kovidová jednotka nemocnice 6.5.2021

Desítky virů: plastové kliky, podlahy a podrážky
sester

Jednotky virů: umyvadla, podlahy, mobilní telefony

Koronavirus SARS-CoV-2

Nesmyslné:

- dezinfikovat venkovní prostory
- dezinfikovat dopisy a balíky
- po návštěvě veřejných prostor si dezinfikovat ruce pokud mám k dispozici vodu a mýdlo
- obávat se, že se nakazím z povrchů
- nosit venku respirátor

Koronavirus SARS-CoV-2

Koronavirus SARS-CoV-2 se přenáší vzduchem

Respirátory podle koncentrace viru v prostředí jsou dostatečně účinné v případě správného nasazení

- FFP2 pro veřejné prostředí (obchody, dopravní prostředky)**
- FFP3 pro infekční provozy (odběrová centra, kovidové jednotky)**

Tisíce mrtvých, kteří zemřeli na COVID-19

Selhává primární péče - diagnostika po telefonu a mailem, terapie jako u chřipky paralenem

Chybí vyšetření lékařem, RTG vyšetření plic, sledování krevního obrazu, krevní srážlivosti a glykémie.

Chybí antivirová terapie od PCR pozitivního výsledku

Chybí antikoagulační léčba, kortikoidy pro zamezení fibrotizace plicní tkáně atd.