

Opravdu je smysluplné plošné antigenní testování? Domýšlíme vše opravdu do důsledků?

Arnošt Komárek¹, Zuzana Krátká², Hana Zelená^{3,4}

¹*Katedra pravděpodobnosti a matematické statistiky, Matematicko-fyzikální fakulta Univerzity Karlovy*

²*Imunologická laboratoř GENNET, s.r.o., Praha,*

³*Centrum klinických laboratoří, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě,*

⁴*Lékařská fakulta, Ostravská univerzita*

Úvod do problematiky

Plánované využití antigenních testů při velkoplošném testování vesměs bezpříznakových jedinců s sebou nese mnohá úskalí, na která se ať již úmyslně nebo neúmyslně zapomíná. Základním kvalitativním kritériem každého testu je jeho spolehlivost, která je však vyjádřena nejenom senzitivitou (která určuje “jak dobře zachycujeme pozitivní jedince”), ale také specificitou (která určuje, jak často dojde k “falešnému poplachu”). Potřeba vysoce senzitivních (citlivých) testů je neoddiskutovatelná a obvykle není opomíjena ani při plánování plošného testování. Na význam dobré specificity testu se však v honbě za pozitivními výsledky často zapomíná. Přitom zejména při celoplošném testování může absolutní počet falešně pozitivních výsledků velice rychle dosáhnout až neúnosných mezí i při relativně vysoké specificitě použitého testu, jak si na několika jednoduchých příkladech ukážeme dále.

Problém první – určení hranice positivity

Zastavme se ale nejprve na chvíli u **senzitivity** typického antigenního testu (Ag) a připomeňme, že senzitivita Ag testu je výrobcí obvykle zjišťována pomocí testování skupiny jedinců, jimž vyšel pozitivně PCR (polymerase chain reaction) test. Tedy Ag test je od výrobce kalibrován vůči PCR testu. A už zde narážíme na první problém a to, že musíme správně definovat **hranici positivity**. PCR test poskytuje informaci o množství kopií virové RNA přítomných ve vzorku, nepřesně označované jako tzv. „virová nálož“, a to prostřednictvím čísla udávajícího počet PCR cyklů potřebných k detekci virové RNA. Čím nižší počet cyklů je, tím více molekul RNA bylo na začátku přítomno ve zkoumaném vzorku. Pro mnohé bude asi překvapením, že v infikovaných buňkách se produkuje významně více

virové RNA, než kolik se jí využije pro tvorbu nových virových částic. Na 1 000 až 10 000 molekul RNA připadá pouze jedna „životaschopná“ virová částice, kterou můžeme detekovat kultivací (1, 2). Takže ve vzorcích se slabou pozitivitou PCR převažuje „smetí“ volné RNA a velmi pravděpodobně tam nejsou žádné infekční viry schopné někoho nakazit nebo vyvolat onemocnění. Z pohledu epidemiologického je tedy důležité vědět nejen **jestli** je vzorek pozitivní, ale i **kolik** je v něm kopií RNA resp virových částic.

V České republice je v současnosti nastavena hranice 40 cyklů PCR reakce jako maximum, do kdy je třeba zachytit přítomnost virové RNA. Ale zatímco jedinci, kteří mají pozitivní PCR zachycené do 30 cyklů jsou většinou infekční, tak lidé, u kterých je reakce pozitivní až po 30. cyklu, už mají tak malou nálož RNA/virů, že infekční spíše nejsou (3-6). Proto např. v Rakousku tuto hranici positivity posunuli na 30 cyklů (7). Ale vraťme se k antigennímu testování.

Problém druhý – stanovení senzitivity

Vzhledem k tomu, že primárním účelem Ag testu bylo potvrdit infekci u jedince s příznaky onemocnění (a tedy typicky vyšší virovou náloží), byla senzitivita Ag testu udávaná výrobcem obvykle odvozena pomocí studie provedené na jedincích s klinickými příznaky onemocnění COVID-19. Jenže ve chvíli, kdy test použijeme na plošné testování jedinců, kteří nemají klinické příznaky (např. na skupinu školáků), se situace zásadně změní. Senzitivita Ag testu bude výrazně nižší, protože u zdravých (bezpříznakových) lidí, byť pozitivních dle PCR testu, bude významně méně osob s vysokou virovou náloží. Pokud u této skupiny měříme senzitivitu a jako „pozitivní PCR“ použijeme standardní limit do 40 cyklů, pak zjistíme senzitivitu velmi nízkou. Pokud použijeme limit do 30 cyklů (a chceme tedy zachytit lidi opravdu infekční), pak se senzitivita testů zvýší. Rozdílné hodnoty senzitivity Ag testů konec konců prezentují i srovnávací studie několika antigenních testů provedené v nedávné době v ZÚ Ostrava a FN Motol (8,9).

V případě antigenního testu by se mohlo zdát, že specifita musí být prakticky rovna 100 % a výše uvedené srovnávací studie toto do jisté míry potvrzují. Kromě jednoho z testů validovaných v Ostravě se odhadnuté specifity pohybovaly vesměs od 95 % výše (8,9). Velice cenný náhled do problematiky specifity testu nasazeného do plošného testování v nelaboratorních podmínkách však poskytlo pilotní testování žáků sedlčanské základní školy provedené v půlce února 2021 (publikováno dne 19.2.2021 na zivotvcesku.cz). Výrobcem deklarovaná specifita 100 % se zde ukázala být spíše rovna hodnotě okolo 90 % a je jasné, že k chybovosti přispělo značnou měrou též amatérské provedení odběru a nezkušenost při vyhodnocení testu, kterému se ale při plošném nasazení jakéhokoliv testu nevyhneme a

měli bychom s tím počítat. Pokud odběr rutinně provádí kvalifikovaná a dobře proškolená osoba, pak se senzitivita i specificita testování zvyšuje, jak jsme si už vyzkoušeli v laboratořích.

Pro úvahy o plošném nasazení Ag (či jakýchkoliv jiných, PCR nevyjímaje!) testů tedy platí základní poučka (na kterou např. jaksi zapomněli i strůjci jarní “Studie kolektivní imunity SARS-CoV-2” organizované MZ ČR) (10). **Senzitivitu (i specificitu) použitého testu je třeba nezávisle určit v cílové populaci (např. školáků) a to v podmínkách plánovaného použití (např. pomocí samoodběrů ve třídách) ještě před nasazením testu do praxe (do studie).** V opačném případě se nelze divit, že testování (nebo studie) nepřinese očekávané výsledky.

Problém třetí – kouzlo pre-testové pravděpodobnosti

Hlavním zádrhelem při plošném nasazení jakéhokoliv testu je fakt, že pro správnou interpretaci výsledku testu u konkrétního jedince je zapotřebí znát nejenom senzitivitu a specificitu testu, ale také tzv. *pre-testovou pravděpodobnost positivity*. V populačním kontextu se jedná o *prevalenci*, nicméně pro hodnocení jednoho individuálního testu je zapotřebí pracovat s pravděpodobnostním vyjádřením pre-testové domněnky o pozitivitě právě testovaného jedince. Pokud provádíme diagnostický test indikovaný lékařem u pacienta na základě jeho klinických příznaků (např. v ordinaci praktického lékaře u pacienta s respiračním onemocněním), je tato pre-testová pravděpodobnost positivity poměrně vysoká, mnohdy blízká 100 %. Pokud však provádíme test v široké a vesměs bezpříznakové populaci (např. testování koronavirové infekce u zdravých školáků), je pre-testová pravděpodobnost positivity rovna **aktuální** prevalenci (výskytu) nákazy v **testované populaci**. V případě koronavirové infekce v populaci zdravých školáků lze předpokládat, že tato hodnota bude v každém okamžiku nejvýše v jednotkách procent (zejména na 1. stupni však spíše ještě řádově méně, vezmeme-li v potaz aktuální odbornou literaturu týkající se infekčnosti dětí, viz 12). Pozitivní výsledek testu by následně měl být interpretován v kontextu tzv. *pozitivní prediktivní hodnoty* (PPV), která udává, s jakou pravděpodobností je pozitivně otestovaný jedinec skutečně pozitivní (má infekci). Obdobně negativní výsledek testu by měl být interpretován v kontextu tzv. *negativní prediktivní hodnoty* (NPV), jež udává, s jakou pravděpodobností je negativně otestovaný jedinec skutečně negativní (nemá infekci). K určení PPV a NPV je zapotřebí znát (skutečnou nikoliv deklarovanou výrobcem) senzitivitu a specificitu testu a kromě nich navíc též pre-testovou pravděpodobnost positivity.

Co lze očekávat od nasazení Ag testu

Jako příklad si ukažme, co lze očekávat od nasazení Ag testu, jehož parametry přibližně odpovídají testům použitým ve studii, která proběhla v ZÚ Ostrava, pokud se senzitivita určuje z celé skupiny PCR pozitivních (tedy u skupiny osob jak s vysokou, tak nižší virovou náloží). Uvažme pro náš test senzitivitu 60 %, a specifitu 99 %. Poznamenejme, že v případě plošného nasazení takového testu mezi školáky lze s ohledem na praktické problémy při provádění odběrů a s tím spojenou vyšší chybovostí očekávat snížení obou těchto parametrů.

Příklad první – vyšetření nemocného pacienta u lékaře

Nejprve se podívejme, jak by se interpretoval pozitivní, resp. negativní výsledek takového testu v případě, že test bude proveden u indikovaného jedince, u kterého lékař na základě klinického vyšetření očekává pozitivní výsledek a svoje očekávání vyjádří hodnotou pre-testové pravděpodobnosti positivity ve výši 80 %. PPV zde vychází 99,6 %, tj. jedinec, jemuž test vyšel pozitivně, má s pravděpodobností téměř 100 % opravdu infekci koronavirem. Zde si můžeme též povšimnout, že pozitivní výsledek testu dává takřka jistotu skutečné positivity a to i při relativně nízké senzitivě testu. Důvodem je právě vysoká pre-testová pravděpodobnost, zde zdůvodněná příslušným klinickým vyšetřením. Oproti tomu, NPV zde vyjde pouze 38,2 %. Tedy jedinec, jemuž test vyšel negativně, má ve skutečnosti stále vysokou pravděpodobnost $100 - 38,2 = 61,8$ %, že má ve skutečnosti koronavirovou infekci. Důvodem je opět vysoká pre-testová pravděpodobnost positivity a současně poměrně nízká senzitivita. Tj. ani negativní test nedokáže zcela “přebít” před-testové vyhodnocení positivity na základě klinického vyšetření.

Příklad druhý – testování školáků

Nyní vše zopakujme v situaci, kdy je pre-testová pravděpodobnost positivity (prevalence) rovna 1 %, tedy každý stý žák ve škole je nakažený. Kromě PPV a NPV se také podívejme, jakým způsobem se toto odrazí v absolutních hodnotách správně i falešně pozitivně či negativně otestovaných, jestliže se zabýváme populací o velikosti jednoho milionu jedinců, což je zhruba počet žáků základních škol a nižších gymnázií v České republice (11). Při prevalenci 1 % tedy máme v této populaci 10 tisíc skutečně pozitivních (a potenciálně infekčních) jedinců. PPV a NPV nyní vycházejí téměř opačně oproti předcházející situaci. PPV je nyní 37,8 %, tedy pozitivně otestovaný jedinec má koronavirovou infekci pouze se zhruba třetinovou pravděpodobností, NPV je 99,6 %, tedy negativně otestovaný jedinec má téměř jistotu, že je skutečně negativní. Podívejme se ale nyní na absolutní čísla, která odhalí jedno z nebezpečí neuváženého plošného testování. Senzitivita ve výši 60 % nám mezi 10 000

pozitivními nalezneme 6 000 pozitivních, zbytek 4 000 pozitivních je testem označen za falešně negativní a tito žáci sítím testování propadnou. Oproti tomu i vysoká specifická (99 %) nalézají mezi masou 990 000 neinfikovaných žáků svoje jedno procento, tj. 9 900 žáků, jež jsou (falešně) označeni za pozitivní. Výsledkem celého testovacího manévru je sice 6 000 pozitivních žáků, ale také 4 000 neodhalených infikovaných školáků a téměř 10 000 falešně pozitivních (ale zdravých) žáků, tedy těch, na něž budou zbytečně navázány další náklady spojené s konfirmací pomocí PCR testů, karanténami a trasováním. Pokud by specifická byla pouze 90 %, jako tomu bylo u testu použitým v sedlčanské základní škole, dostaneme v každém kole testování téměř 100 000 (necelých 10 %) falešně pozitivních jedinců.

Na druhou stranu nelze opomenout ani fakt, že poměrně nízká senzitivita (zde uvažujeme 60 %), která ale bude jenom stěží významně vyšší u některého ze snadno použitelných antigenních testů (navzdory údajům výrobce o často skvělé senzitivitě), nám ve velké populaci i nadále zanechává poměrně vysoký počet neodhalených nakažených. O ne zrovna vysoké smysluplnosti plošného testování antigenními testy se opakovaně přesvědčují na Slovensku (zatím se však nezdá, že by si marnost takového svého počínání chtěli připustit) (viz např. články na novinky.cz z 2.11.2020 a idnes.cz z 26.1.2021). Pokud bychom s testem, jehož senzitivita je pouze 60 % otestovali náraz celou populaci (jak se opakovaně snaží Slováci), při prevalenci 1 % nám v České republice unikne přibližně 40 000 infikovaných osob (40 % z 1 % populace).

I při odborně provedeném odběru materiálu (odběr z nosohltanu provedený kvalifikovaným zdravotnickým personálem) je reálná senzitivita různých Ag testů rozdílná a významně se liší od hodnot deklarovaných výrobcem. Považujeme-li za komparátor pouze metodu PCR, je senzitivita bližší k hodnotám okolo 50 %, zatímco zohledníme-li ve srovnání i výsledek testu viability, detekující ve vzorku infekční viry, ukazuje se senzitivita spíše okolo 90 % a více, o čemž nás přesvědčují ostravská a motolská srovnávací studie (8,9). Konečně o tom, že zejména v době vrcholící epidemie je při nízké senzitivitě absolutní počet falešně negativních (a falešně uklidněných) jedinců dostatečný na další akceleraci epidemie nás opakovaně přesvědčuje situace na Slovensku.

Na tomto místě poznamenejme, že s ohledem na velikost populace (jeden milion školáků) a fakt, že v případě epidemie SARS-CoV-2 nebude aktuální prevalence nakažených nikdy v desítkách procent, bude mít zhoršování či zlepšování stavu epidemie významný vliv na počet falešně negativních, nicméně zcela zanedbatelný vliv na počet falešně pozitivních. Při zlepšení stavu epidemie vyjádřeném prevalencí 0,5 % dostaneme při testování jednoho milionu školáků poloviční počet falešně negativních, tj. 2 000, k nim však prakticky stejný (ale vyšší) počet 9 950 falešně pozitivních. Při zhoršení stavu epidemie a nárůstu prevalence na 2 % obdržíme sice dvojnásobek falešně negativních (oproti prevalenci 1 %), tj. 8 000, počet falešně pozitivních o něco klesne, ale zanedbatelně na hodnotu 9 800.

Lze konstatovat, že při plošném testování v populaci s nízkou aktuální prevalencí sledovaného znaku (nákaza virem SARS-CoV-2) je proporce falešně pozitivních vždy přibližně rovna doplňku specificity do 100 %. V případě, že se jedná o velkou populaci, měl by každý, kdo plánuje plošné testování, mít velice dobře rozmyšleno, jakým způsobem přistupovat k pozitivně otestovaným, neboť jich bude v absolutním měřítku hodně a významná část z nich ve skutečnosti nebude nakažena.

Příklad třetí- má vůbec smysl používat antigenní nebo PCR testy ke skríníngu infekcí?

Rozumně využití testy mohou v mnohém pomoci. Zůstaňme v situaci, kdy máme stále k dispozici test o (poměrně nízké) senzitivitě 60 %, specificitě 99 % a na základě nezávislého šetření (vytrasování apod.) jsme se dozvěděli, že Pažout ze 3.B byl pozitivně laboratorně testován na přítomnost viru SARS-CoV-2. V tuto chvíli máme *důvodné* podezření, že se v jeho školní třídě nacházejí další nakažení. Řekněme, že se předběžně domníváme, že kromě Pažouta je nyní ve třídě dalších 6 ze 30 dětí nakaženo. Tímto předpokladem se však významně mění pre-testová pravděpodobnost positivity pro „populaci“ této třídy z 1 % na 20 % (6 ze 30). Hodnoty PPV a NPV jsou pak rovny postupně 93,8 % a 90,8 %. Tedy jak v případě pozitivního, tak v případě negativního výsledku odborně provedeného testu máme v obou případech více jak 90% jistotu, že otestovaný žák je skutečně pozitivní, resp. negativní.

Diskuze

Nutným předpokladem úspěšného testování je mít vhodný test a dobře proškolený tým provádějící testování! Povinností odborníků nastavujících proces testování (nikoliv ředitelů škol, ale poradců ministerských úředníků) je **verifikovat kvalitu testů** a doporučit vhodné PCR nebo antigenní testy s dostatečnou senzitivitou. Takový seznam souprav distribuovaných v ČR dosud není k dispozici.

Předpokládáme, že Ústavem pro zdravotnické informace (ÚZIS) jsou shromažďována data o výskytu COVID-19 u dětí školního věku a krajské hygienické stanice mají data o klastrech infekčních dětí ve třídách. Pokud by byly tyto informace k dispozici statistikům, měli bychom nejen přesnější představu o pre-testové pravděpodobnosti nákazy ve školních třídách, ale navíc analýzou těchto informací bychom mohli navrhnout změny, které by vedly ke zlepšení systému testování a trasování a mohli bychom otevřít školy ve větším rozsahu, než jaký je plánován v současné době. Přineslo by to více užitku než navrhované antigenní testování.

Závěr

Z předchozího textu by se mohlo zdát, že je jeho cílem odradit od využití snadno dostupného testování ať už ve školách či jinde. Opak je pravdou. Cílem textu je se zamyslet, jaká úskalí využití takových testů v plošném měřítku může přinést a **dopředu** se na tato úskalí připravit. Plošnému testování by neměla být přisuzována příliš vysoká očekávání a např. v kontextu přípravy na otevření škol by zahájení plošného testování nemělo v žádném případě být považováno za nutnou podmínku, bez které školy nelze otevřít. Výskyt 200 pozitivně testovaných mezi půl milionem rakouských dětí (publikováno 16.2.2021 na novinky.cz) nebo jednoho pozitivního studenta při testování 600 studentů kloktacími testy v Olomouci (publikováno na echo24.cz dne 21.2.2021), mluví za vše. O smysluplném využití (jakýchkoliv) testů by se mělo uvažovat v intencích předposledního odstavce, tj. k rychlému a snadnému odlišení nakažených a nenakažených v kolektivu, ve kterém je *důvodné* podezření na výskyt rozsáhlé nákazy.

Seznam literatury

1. Munster VJ, Feldmann F, Williamson BN, et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. Nature 2020; 585:268-72.
2. Sender R, Bar-On YM, Flamholz A, et al. The total number and mass of SARS-CoV-2 virions in an infected person. medRxiv 2020:2020.11.16.20232009.
3. Centers for Disease Control and Prevention: symptom-based strategy to discontinue isolation for persons with COVID-19 (Updated July 22, 2020). Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/community/strategy-discontinue-isolation.html>. Accessed 14 August 2020
4. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2020; 39:1059–61
5. Young B, Ong SW, Ng LF, et al. Immunological and viral correlates of COVID-19 disease severity: a prospective cohort study of the first 100 patients in Singapore. Lancet 2020
6. Bullard J, Dust K, Funk D, et al. Predicting infectious SARS-CoV-2 from diagnostic samples. Clin Infect Dis. 2020 May 22;ciaa638. doi: 10.1093/cid/ciaa638.
7. Rakouská společnost pro laboratorní medicínu a klinickou chemii: Laboratorní diagnostika pro koronavirus SARS-CoV-2 Dostupné na: <https://www.oeglmkc.at/corona.html>

8. FN Motol - Dřevínek P: Výsledky srovnávací studie antigenních a PCR testů. Dostupné na:
https://www.fnmotol.cz/_sys_/FileStorage/download/3/2854/priloha_vysledky-srovnavaci-studie-antigen-vs-pcr.pdf

9. ZU v Ostravě – Zelená H: Výsledky studie antigenních testů. Dostupné na:
<https://zuova.cz/Content/files/novinky/20201201-vysledky-studie-antigennich-testu.pdf>

10. Ministerstvo zdravotnictví ČR. Strategie testování onemocnění COVID-19 pro sezónu respiračních onemocnění 2020/2021. Příloha 3 – Průřezové studie protilátkové imunity. MZ ČR, 29. 9. 2020.
 Dostupné na: https://koronavirus.mzcr.cz/wp-content/uploads/2020/10/Strategie-testování-COVID-19_def_200929.pdf

11. Český statistický úřad – Školy a školská zařízení – školní rok 2019/2020. Dostupné na:
<https://www.czso.cz/csu/czso/skoly-a-skolska-zarizeni-skolni-rok-20192020>

12. Viner RM, Mytton OT, Bonell, C., Melendez-Torres, GJ, Ward J., Hudson, L., Waddington, C., Thomas J, Russell, S, van der Klis F, Koirala A., Ladhani S, Panovska-Griffiths J, Davies NG, Booy R, Eggo RM.
 Susceptibility to SARS-CoV-2 Infection Among Children and Adolescents Compared With Adults. A Systematic Review and Meta-analysis. JAMA Pediatrics 2021; 175: 143-156. doi: 10.1001/jamapediatrics.2020.4573.