

Možnosti laboratórnej diagnostiky ochorenia Covid-19.
Senzitivita, špecificita, pozitívna a negatívna prediktívna hodnota diagnostických testov - vo vzťahu k testovaniu na Covid-19.

(Infoletter č. 5)

Ing. Jela Petrisková, PhD.¹
doc. MUDr. Martin Hrubisko, PhD., mim. prof.²
prof. MUDr. Miloš Jeseňák, PhD., MBA, FAAAAI^{1,3,4}

¹ Oddelenie klinickej imunológie a alergológie UN Martin

² Oddelenie klinickej imunológie a alergológie, Onkologický ústav sv. Alžbety

³ Klinika detí a dorastu JLF UK a UN Martin

⁴ Klinika pneumológie a fýzeológie JLF UK a UN Martin

Výber diagnostických laboratórnych testov závisí **od štádia ochorenia**, v ktorom sa infikovaná osoba nachádza, teda od štádia sérokonverzie protilátok. Možno povedať, že rozlišujeme dva druhy testov v závislosti od stanovovaného analytu (t.z. predmetu laboratórneho vyšetrenia). V **počiatočných štádiách ochorenia** stanovujeme *prítomnosť vírusu na slizniciach* horných dýchacích ciest. V **neskorších štádiách**, v ktorých predpokladáme tvorbu protilátok, vyšetrujeme *koncentráciu špecifických imunoglobulínov v krvi* (sére, plazme) infikovaného jedinca. Spomínané dva typy laboratórnych vyšetrení sa potom ďalej rozdeľujú podľa použitej laboratórnej metódy.

- Pri výbere vhodných laboratórnych testov sa riadime najmä dvomi (často spomínanými) štatistickými veličinami, ktoré je výrobca diagnostík povinný uvádzať a to **senzitivitou** a **špecificitou** testov. Obidve veličiny sa vyjadrujú spravidla v percentách. **Senzitivita (citlivosť)** testu vyjadruje úspešnosť, s ktorou test zachytí prítomnosť stanovovaného analytu, čiže podiel pozitívne testovaných pacientov zo všetkých, ktorí sú skutočne pozitívni. *Príklad:* Testujeme 10 skutočne pozitívnych pacientov, u 9 pacientov test vyjde ako pozitívny, jeden pacient vyjde ako falošne negatívny. Tento test má senzitivitu 90%. Čím vyššia je senzitivita testu, tým vyššia je pravdepodobnosť, že pacient označený týmto testom ako negatívny je skutočne negatívny. **Špecificita** testu vyjadruje úspešnosť, s ktorou test zachytí neprítomnosť stanovovaného analytu, čiže podiel negatívne testovaných pacientov zo všetkých, ktorí sú skutočne negatívni. *Príklad:* Testujeme 10 skutočne negatívnych pacientov, u 9 vyjde test ako negatívny, u jedného pacienta falošne pozitívny. Špecificita testu je 90%. Čím vyššia je špecificita testu, tým vyššia je pravdepodobnosť, že pacient označený týmto testom ako pozitívny je pozitívny skutočne. Citlivosť a špecificita vypovedá o **kvalite diagnostického testu**.
- **Pozitívna prediktívna hodnota** je pomer skutočne pozitívnych pacientov ku všetkým (skutočne aj falošne) pozitívnym, t.z. pravdepodobnosť, že pacient s pozitívnym testom má ochorenie. **Negatívna prediktívna hodnota** je pomer skutočne negatívnych jedincov ku všetkým (skutočne aj falošne) negatívnym, t.z. pravdepodobnosť, že pacient s negatívnym výsledkom testu nemá ochorenie. Prediktívna hodnota sa viaže k **prevalencii ochorenia** vo vyšetrovanej skupine pacientov, jej hodnotu do veľkej

miery ovplyvňuje indikujúci lekár. **Pozitívna prediktívna hodnota sa znižuje, ak vyšetrenie nie je indikované cielene, ale používa sa ako skriningové.** So znižovaním pozitívnej prediktívnej hodnoty vyšetrenia úzko súvisí nárast zbytočne vynaložených finančných prostriedkov na laboratórne vyšetrenia.

- Na **stanovenie prítomnosti vírusu** sa v súčasnosti používajú dva druhy laboratórných testov a to testovanie metódou **RT-PCR** (polymerázová reťazová reakcia v reálnom čase) a tzv. **antigénové testy** (membránové imunochromatické testy s rôznym spôsobom vizualizácie). Obidva laboratórne testy **vyžadujú profesionálnu zručnosť v predanalytickej fáze pri stere z nosa a nosohltana.** V súčasnosti je už možný odber vzorky kloktaním, testy zo slín príp. hlienu nie sú zatiaľ rozšírené. Stanovenie SARS-CoV-2 z bronchoalveolárnej laváže, ktoré má svoje opodstatnenie najmä v neskoršom štádiu ochorenia, tiež nie je v súčasnosti hromadne využívané.

Porovnanie RT-PCR a antigénových testov

- **PCR testy** (v určitom časovom intervale) dávajú odpoveď na otázku, či bola osoba nakazená novým koronavírusom. RT-PCR testy pokrývajú dlhší časový interval, ktorého najmä hornú časovú hranicu nie je možné presne časovo ohraničiť. PCR testy aj po dlhšom čase prostredníctvom viacnásobnej amplifikácie vírusovej RNA dokážu zachytiť aj jej veľmi malé množstvá, pričom živý vírus je na slizniciach horných dýchacích ciest prakticky neprítomný po 10 – 14 dňoch. Preto bol aj u nás prijatý konsenzus, podľa ktorého je pacient po uplynutí tejto doby považovaný za neinfekčného.
- **Antigénové testy** nám dajú odpoveď na otázku, či je osoba infekčná práve teraz, v tomto momente. Antigénový test na rozdiel od RT-PCR nezachytáva pozitivitu v prvých dňoch od infekcie. Najvhodnejšie použitie antigénových testov je 6 – 10 dní od infekcie, najväčšiu záchytnosť majú u symptomatických pacientov, naopak pomerne nízku záchytnosť (a tým pádom aj výpovednú hodnotu) majú u asymptomatických jedincov.
- Veľkým prínosom pre porovnateľnosť RT-PCR s antigénovými testami a pre koreláciu testu s klinickým stavom a infekčným potenciálom pacienta je zavedenie klasifikácie vírusovej nálože, kedy sa udáva počet cyklov (CT – *threshold cycle*) resp. počet kópií na ml. Aj u nás už laboratória zaviedli klasifikáciu podľa CT a to nasledovne: CT vyššie ako 35 znamenajú nízku vírusovú nálož, CT od 25 do 35 značia strednú vírusovú nálož a CT pod 25 znamenajú vysokú vírusovú nálož.
- **Špecifita a senzitivita:** Pri PCR testoch systematické preskúmanie štúdií prinieslo senzitivitu 71 – 98 % a špecifitu 95 % s veľkými rozdielmi medzi jednotlivými krajinami. Pri antigénových testoch štúdie uvádzajú u symptomatických jedincov senzitivitu 90 %, u asymptomatických jedincov 50 %. V čase najvyššej vírusovej nálože je zhoda antigénových testov s RT-PCR až 100%, so znižujúcou sa vírusovou záťažou klesá na cca 30 %.
- **Vzhľadom na vysokú špecifitu antigénových testov možno povedať, že v prípade pozitívneho výsledku je pacient s vysokou pravdepodobnosťou skutočne pozitívny.**

Citlivosť (senzitivita) antigénových testov sa významne znižuje v závislosti od vírusovej záťaže a klesá v pomerne krátkom časovom rozmedzí od nákazy. Negatívny antigénový test ani na druhý deň od jeho realizácie nie je skutočnou „pripustkou na slobodu“.

- Pokiaľ pretestovanie antigénovými testami neprebíha v dostatočne krátkych časových intervaloch (1 – 2-krát za týždeň), infikovaný jedinec v prvých dňoch môže byť významným zdrojom nákazy pre svoje okolie. Tiež najmä bezpríznakový jedinec s nízkou vírusovou náložou a teda negatívnym antigénovým testom môže ohrozovať osoby vystavené blízkemu a dlhotrvajúcemu kontaktu.
- Výhodou antigénového testu je krátka čakacia doba na výsledok, čo môže v prípade pozitívneho výsledku a pri dodržaní karanténnych opatrení obmedziť čas stretávania sa s inými osobami a minimalizovať možnosť prenosu ochorenia.
- Pri výbere testov na priame stanovenie antigénu je potrebné zvážiť ich benefity aj nevýhody. Usmernenia, ktoré by vám mohli pomôcť, nájdete na stránkach MZ SR a ŠÚKL: https://standardnepostupy.sk/files/200000766-4be964be9a/Metodika_VUC_AZS_AG_10122020.pdf a https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/media/tlacove-spravy/typy-testov-pouzivanych-pri-diagnostike-ochorenia-covid-19?page_id=5351

Protilátkové testy v diagnostike Covid-19

- **Protilátkové testy** sú určené na stanovenie koncentrácie **špecifických protilátok v triedach IgM, IgA a IgG** proti proteínom vírusu SARS-CoV-2.
- Okrem metódy stanovenia je dôležitá **povaha antigénu**. Ako antigény vírusu SARS-CoV-2 sú v dostupných sérologických testoch najčastejšie používané proteíny: nukleokapsidový proteín (NP), transmembránový spike proteín (SP) a spike proteínové podjednotky S1 a S2. Protilátky namierené proti **spike proteínu (SP)** alebo jeho **podjednotkám (S1, S2)** majú pravdepodobne vyššiu neutralizačnú aktivitu a lepšie vystihuje stav imunizácie.
- Vo väčšine testov sa ako antigénny substrát používa práve nukleokapsidový proteín. **Z toho dôvodu nie je väčšina dostupných testov (či už rýchlotestov alebo rôznych laboratórnych testov) vhodná a určená pre hodnotenie postvákcináčnej protilátkovej odpovede, ktorá pozostáva z protilátok proti Spike proteínu.**
- Súčasná literatúra opisuje viac ako 200 imunotestov na vyšetrenie koncentrácie protilátok v krvi (sére, plazme) dostupných po celom svete a poukazuje na veľkú variabilitu v citlivosti a špecificite testov v závislosti od metodiky alebo povahy antigénov. **Metódy**, ktoré sa najčastejšie používajú, sú:
 - Enzýmové imunosorbentné testy (ELISA),
 - Chemiluminiscenčné imunotesty (CLIA),
 - Fluorescenčné testy point-of-care (POCT – protilátkové rýchlotesty) a
 - Imunochromatické testy s laterálnym prietokom (LFIA - protilátkové rýchlotesty).

- Variabilita medzi výsledkami rôznych diagnostických súprav je veľmi vysoká a vyžaduje si **medzinárodnú štandardizáciu** a porovnávacie štúdie.
- Na základe veľkého množstva údajov od výrobcov nie je možné vo všeobecnosti určiť skutočnú senzitivitu a špecificitu používaných metód. Podľa doterajších skúseností možno posúdiť výhody a nevýhody jednotlivých spôsobov stanovenia koncentrácie protilátok:
 - **ELISA: výhoda** - vysoká citlivosť, kvantitatívne stanovenie; **nevýhoda** - vyššia cena, dlhší čas vyšetrenia (dlhšie samotné trvanie ako aj potreba nazbierať väčší počet vzoriek - nevýhoda pre „malé laboratória“), nutnosť drahého prístrojového vybavenia a personálu na vysokej odbornej úrovni.
 - **LFIA: výhoda** - rýchlosť vyšetrenia (15 – 30 minút), vyšetrenie z kapilárnej krvi, nie je potrebné špeciálne prístrojové vybavenie a postačuje rýchle zaškolenie personálu, nízka cena; **nevýhoda** - kvalitatívne stanovenie, nižšia citlivosť.
 - **POCT: výhoda** - rýchlosť vyšetrenia, postačuje rýchle zaškolenie personálu, nízka cena, minimálne náklady na prístrojové vybavenie; **nevýhoda** - kvalitatívne stanovenie, nižšia citlivosť.
 - **CLIA: výhoda** - kvantitatívne stanovenie, rýchlosť vyšetrenia a nižšia cena (v porovnaní s ELISA); **nevýhoda** - potreba drahého prístrojového vybavenia a personálu na vysokej odbornej úrovni.
- Z hľadiska potreby sledovania dynamiky tvorby protilátok sú najmenej vhodné metódy, ktoré umožňujú stanovenie „celkovej“ koncentrácie špecifických protilátok bez možnosti rozlíšenia jednotlivých tried, hoci tento test do istej miery znižuje náklady a skracaje čas analýzy.
- Predpokladá sa, že detekcia protilátok anti-SARS-CoV-2 bude hrať kľúčovú úlohu pri určovaní vhodných stratégií pri vývoji vakcín a terapeutických zásahov v ochorení Covid-19 hlavne z hľadiska sledovania ich účinnosti a tiež pri zvládnutí a kontrole ďalších ohnisk choroby. Stále však existujú medzery v našich znalostiach o rôznych spôsoboch testovania, ktoré je potrebné doplniť, aby bolo možné dať zmysluplné odporúčania na ich použitie v rôznych podmienkach.
- Komerčne dostupné protilátkové testy **nie sú určené na sledovanie a hodnotenie postvakcinačnej protilátkovej odpovede.**

PS: A nezabúdajte! Štatistiky sú ako bikiny – naznačia mnohé, ale neukážu všetko!

Literatúra:

- Arons MM, Hatfield KM, Reddy SC, et al.: Presymptomatic SARS-CoV-2 infections and transmission in a skilled nursing facility. *N Engl J Med* 2020; 382(22): 2081-2090. DOI:10.1056/NEJMoa2008457
- Bullard J, Durst K, Funk D, et al.: Predicting Infectious SARS-CoV-2 From Diagnostic Samples. *Clin Infect Dis* 2020 May 22. doi: 10.1093/cid/ciaa638.
- Fejt V, Krátká Z, Zelená H, Fürst T. Stáří není nemoc: Vývoj hladiny ochranných protilátek proti koronaviru SARS-CoV-2 u seniorů z Domova Břevnice. *Čas. Lék. Čes.* 2020; 159: 303–311.
- Harris M, Taylor G: *Medical statistics made easy*. Third edition. Scion Publishing Ltd., 2014: 62 – 63. ISBN 978 1 907904 03 5.

- Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, et al. Comparison of automated SARS-CoV-2 antigen test for COVID-19 infection with quantitative RT-PCR using 313 nasopharyngeal swabs, including from seven serially followed patients. *Int J Infect Dis.* 2020;99:397-402. doi:10.1016/j.ijid.2020.08.029.
- <https://www.alphamedical.sk/aktuality/novinka-v-ramci-pcr-testov-0>: Novinka v rámci PCR testov.
- Ministerstvo zdravotníctva SR: Metodika k testovaniu na prítomnosť koronavírusu SARS-CoV-2 spôsobujúceho ochorenie COVID-19 pre ambulantných poskytovateľov zdravotnej starostlivosti rýchlym antigénovým testom. https://standardnepostupy.sk/_files/200000766-4be964be9a/Metodika_VUC_AZS_AG_10122020.pdf
- Nuccetelli M, Pieri M, Gisone F, Bernardini S.: Combined anti-SARS-CoV-2 IgA, IgG, and IgM Detection as a Better Strategy to Prevent Second Infection Spreading Waves [published online ahead of print, 2020 Sep 18]. *Immunol Invest.* 2020;1-13. doi:10.1080/08820139.2020.1823407.
- Nuccetelli, M., Pieri, M., Grelli, S. et al.: SARS-CoV-2 infection serology: a useful tool to overcome lockdown?. *Cell Death Discov.* 6, 38 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41420-020-0275-2>
- Okba NMA, Müller MA, Li W, et al.: Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2-Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients. *Emerg Infect Dis.* 2020; 26(7): 1478-1488. doi: 10.3201/eid2607.200841. Epub 2020 Jun 21. PMID: 32267220; PMCID: PMC7323511.
- Turcato G, Zaboli A, Pfeifer N, et al.: Clinical application of a rapid antigen test for the detection of SARS-CoV-2 infection in symptomatic and asymptomatic patients evaluated in the emergency department: A preliminary report [published online ahead of print, 2020 Dec 19]. *J Infect.* 2020; S0163-4453(20)30773-8. doi:10.1016/j.jinf.2020.12.012.
- Typy testov používaných pri diagnostike ochorenia COVID-19. 2020. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/media/tlacove-spravy/typy-testov-pouzivanych-pri-diagnostike-ochorenia-covid-19?page_id=5351
- Watson J, Whiting PF, Brush JE.: Interpreting a covid-19 test result. *BMJ.* 2020; 369: 1808. doi: 10.1136/bmj.m1808.