

Diagnostika COVID-19 – súčasnosť a možný vývoj

Ing. Jarmila Lakomá, Ph.D., MPM

Medical Science Liaison pre Českú republiku

Scientific Engagement & Communication Lead CE cluster

Pandémia menom COVID-19 sa rozšírila svetom v priebehu dvoch krátkych mesiacov. Jej stopa však ostane v ľudskej spoločnosti už navždy. Otázkou ostáva, čo ostane, ako „bolo predtým“ a čo sa nenávratne zmení? A čo ak príde ďalšie podobné epidémie alebo pandémie? Rýchla identifikácia a izolácia infikovaných jedincov je označená ako kľúčový mechanizmus kontroly šírenia vírusu SARS-CoV-2.

Svetová zdravotnícka organizácia (WHO) hodnotí dve základné metódy diagnostiky vírusu SARS-CoV-2:

1. laboratórne testovanie založené na molekulárno-biologickej metóde rRT-PCR,
2. laboratórne testovanie pomocou tzv. „rýchlotestov“.

Identifikácia symptómov ako horúčka, kašeľ, slabosť, ťažkosti s dýchaním (a ev. ďalšie menej typické príznaky) a röntgenové vyšetrenie pľúc sú nešpecifickým indikátorom infekčnosti SARS-CoV-2, ktorá si vyžaduje ďalšie epidemiologické dáta.

Aké sú súčasné možnosti testovania? Aký je ich princíp, cena a čas, za aký je výsledok? O čom presne hovoria pojmy senzitivita a špecifickosť („špecifická“)?



Zlatým štandardom pre diagnostiku COVID-19 ochorenia je rRT-PCR (*real time* reverzná transkripčná polymerázová reťazová reakcia), ktorá využíva vzorky z horných dýchacích ciest, slín, krvného séra alebo stolice. Tento typ *priamej diagnostiky* sa opiera o preukázanie prítomnosti vírusového infekčného agensa použitím nukleovej kyseliny (SARS-CoV-2 je RNA vírus, teda kyseliny ribonukleovej (RNA)).

Metóda PCR je charakteristická **vysokou špecifickosťou** (schopnosť presne identifikovať jedincov bez ochorenia, t. j. stanovenie negatívneho prípadu) a **senzitivitou** (schopnosť presne identifikovať ochorenie, t. j. stanovenie pozitívneho prípadu). Má však tiež svoje obmedzenia, ktoré spočívajú v možnosti **falošnej**

negativity (prípady, keď síce výsledok testu hodnotí pacienta ako bez ochorenia, avšak v skutočnosti tento pacient chorý je). K tomuto môže dôjsť napr. v prípade asymptomatickej vírusovej infekcie. Preto je veľmi dôležité správne načasovanie odberu vzoriek (nosohltanových sterov). Množstvo vírusu sa v priebehu infekcie u jedinca mení.

Citlivosť PCR testu je najvyššia na počiatku prejavu symptómov. Naopak, pacienti, ktorí sú síce infikovaní, ale sú asymptomatickí, môžu mať falošne negatívne výsledky testu. Rovnako je to u pacientov, ktorým symptómy ustupujú. Výsledok priamej detekčnej metódy je dostupný v časovom horizonte 1 až 4 dni (v závislosti od laboratória).

Použitie tzv. „rýchlotestov“, alebo „*rapid diagnostic tests* – (RDT)“ sa považuje za *nepriamu diagnostickú metódu*. RDT testy sú vyvinuté na rýchle testovanie pacienta.

WHO neodporúča tento typ testovania na preukázanie klinickej diagnózy COVID-19. Naopak, WHO odporúča použitie RDT v laboratórnych podmienkach pre ďalší vývoj a testovanie spektra ich použiteľnosti.¹

Aktuálne sú na trhu dva typy RDT testov – **rýchle testy detekcie antigénu** (existuje asi 10 typov testov, v EÚ sú zatiaľ dostupné len tri) a **rýchle protilátkové testy** (vyše 60 certifikovaných testov na trhu).

Princíp testovania protilátkových rýchlotestov je založený na detekcii špecifických protilátok vznikajúcich imunitnou odpoveďou organizmu na infekciu v krvi pacienta. Mechanizmus testovania je založený na tzv. „*lateral flow*“ imunochromatografickom princípe. Ide o dnes už bežný typ imunodiagnostickej metódy, ktorý sa vyznačuje rýchlosťou

a relatívne vysokou spoľahlivosťou (niektoré testy uvádzajú spoľahlivosť až 97,5 %). Tento typ testovania má svoje opodstatnenie, ak napr. infekt ustúpil z dýchacích ciest, alebo v prípade asymptomatického klinického prejavu pacienta.

Všeobecne organizmus napadnutý vírusovou infekciou odpovedá najprv nešpecifickou a následne špecifickou imunitnou reakciou. Prvé sa v rámci imunitnej odpovede organizmu tvoria IgM (imunoglobulín M) protilátky (skrining akútnej infekcie). Ich detekcia v organizme je krátkodobá (7 až 10 dní od počiatku infekcie) v porovnaní s neskôr nastupujúcimi IgG (imunoglobulín G) protilátkami (testovanie protektívnej imunity). IgG protilátky sa objavujú okolo 14. dňa od počiatku infekcie a vrchol koncentrácie dosahujú medzi 4. až 6. týždňom. Perzistencia IgM v organizme je kratšia (3 – 6 mesiacov) v porovnaní s IgG, ktoré pretrvávajú v organizme niekedy aj celý život (**graf 1**).

Možnosť molekulárno-biologického laboratórneho vyšetrenia na vírus SARS-CoV-2 je pre lekárom indikovaných pacientov v Českej republike, ako aj na Slovensku hrazená zdravotným poistením. Pre počiatočný nedostatok testovacích kitov (súprav) bolo obmedzenie použitia testov len pre tento typ pacientov. V súčasnosti je možné zažiadať o test aj ako samoplatca. Aj súkromné laboratória v oboch krajinách zo začiatku čelili obrovskému náporu žiadostí. Ceny sa na Slovensku pohybujú v rozmedzí 30 – 70 Eur plus manipulačný poplatok. V Českej republike je poplatok za vyšetrenie pre samoplatcov orientačne okolo 3-tisíc CZK. Tieto ceny závisia od odberového miesta a laboratória.

Na stránkach ministerstiev zdravotníctva ČR a SR sú odkazy na zoznamy odberových centier s možnosťou testovania.^{3,4} Okrem centrálnych odberových centier zoznamy obsahujú aj centrá pre samoplatcov a tzv. „*drive-in*“, alebo „*drive-thru*“ odberové miesta, kde odbery realizujú pacienti priamo z auta. Rovnako siete súkromných laboratórií na svojich webových stránkach disponujú konkrétnym zoznamom odberových miest a informáciami pre odber vzoriek.

Cenové relácie laboratórnych testov na protilátky (samostatne IgG alebo IgM a IgG v kombinácii) pre samoplatcov sa na Slovensku pohybujú v rozmedzí od 40 – 70 Eur/test v závislosti od vybraného pracoviska (nákup RDT testov sa pohybuje orientačne medzi 140 až 400 Eur/balenie, ktoré obsahuje 10 alebo 25 testov). Konkrétny typ testu (teda či sa jedná o RDT testovanie, alebo použitím laboratórnych prístrojov) je na rozhodnutí daného pracoviska. Výsledky testovania pomocou laboratórnych prístrojov však

trvajú dlhšie (cca 2-4 dni) v porovnaní s RDT testami. V Českej republike sú ceny testovania pre samoplatcov v závislosti na konkrétnej metóde testu. V prípade laboratórneho testovania sa ceny pohybujú v rozmedzí 600 – 1 500 CZK/test. V prípade RDT testov na IgG a IgM v kombinácii stojí vyšetrenie približne 500 CZK/test a pre samotné IgG približne 600 CZK/test.

Je však potrebné upozorniť, že tieto RDT testy nie sú určené pre samotestovanie laickej verejnosti. Na stránkach ŠÚKL je uvedené: „Na trhu v Európskej únii momentálne nie sú registrované žiadne testy na COVID-19 určené na samotestovanie laickej verejnosti. Rýchlotesty, ktoré sú v EÚ registrované, sú určené na profesionálne použitie. V prípade ich použitia laickou verejnosťou hrozí riziko nesprávneho použitia testu a tiež nesprávnej interpretácie výsledku“.⁵

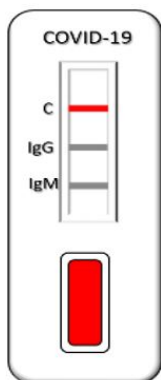
Dôkaz negatívneho testu na ochorenie COVID-19 - v súčasnosti priepustka cez hranice, v blízkej budúcnosti možno podmienka vstupu do reštaurácie či do kina?

V závislosti od typu RDT diagnostického testu (napr. tehotenský test, test na *Helicobacter pylori* a iné) je čas čakania na výsledok zvyčajne otázkou minút.

Časová dostupnosť výsledkov rýchlotestov na COVID-19 je okolo 10 – 20 minút. V prípade COVID-19 sa rýchlotesty líšia svojou špecifickosťou a senzitivitou. Hlavným otáznikom pri tejto nepriamej diagnostickej metóde je kontrola nízkeho počtu falošne pozitívnych a falošne negatívnych výsledkov.

Zo správnej interpretácie rýchlotestov vyplýva, že populácia pozitívna na IgG protilátky (IgG+) v prípade odznenia symptómov a negatívneho výsledku PCR je tá časť populácie, ktorá bola infikovaná SARS-CoV-2 vírusom a túto infekciu prekonala a získala protilátky pre prípad opakovanej infekcie (**obr. 1**).

Obr. 1: Interpretácia diagnostického rýchlotestu na SARS-CoV-2

Interpretácia testu SARS-CoV-2 závisí od prítomnosti oboch typov protilátok (IgG a IgM)	
	
IgM+/IgG+	Nedávna (recentná) infekcia SARS-CoV-2, tzn. POKROČILÉ ŠTÁDIUM INFEKcie
IgM+/IgG-	Nedávna (recentná) infekcia SARS-CoV-2, tzn. VČASNÉ ŠTÁDIUM INFEKcie
IgM-/IgG+	Predchádzajúca infekcia SARS-CoV-2, tzn. PREKONANÁ INFEKcia
IgM-/IgG-	Žiadna infekcia alebo veľmi počiatočné nezistiteľné štádium infekcie

Adaptované z <https://www.clinisciences.com/a>

<https://olup-prednahora.sk/aktuality/blog/laboratorne-testovanie-covid-19-co-nam-prezradia-testy/>^{6,7}

Naopak, veľmi rizikový pri stretnutí s prenášačom sú pacienti, ktorí v týchto testoch preukázali neprítomnosť oboch typov protilátok (IgM-/IgG-). V tomto prípade treba vziať do úvahy vek a celkový zdravotný stav tohto rizikového jedinca.

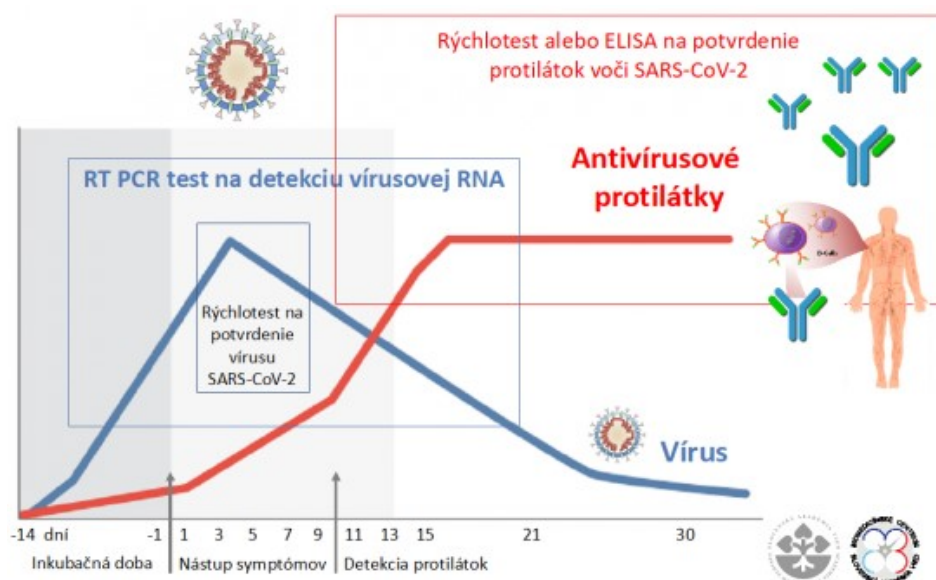
Tab. 1: Klinický význam výsledkov kombinácie testov rRT-PCR a sérologických testov na protilátky IgM a IgG

Výsledok testu			Klinický význam výsledkov testov
rRT-PCR	IgM	IgG	
+	-	-	Pacient môže byť v počiatočnom štádiu infekcie (v závislosti od prítomnosti symptómov)
+	+	-	Pacient (pravdepodobne symptomatický) môže byť v počiatočnom štádiu infekcie
+	+	+	Pacient je v progresívnej fáze infekcie
+	-	+	Pacient môže byť v neskoršej fáze infekcie alebo je opakovane infikovaný
-	+	-	Pacient môže byť vo veľmi počiatočnej fáze infekcie. Falošná negativita rRT-PCR
-	-	+	Pacient prešiel infekciou a zotavil sa
-	+	+	Pacient môže byť vo fáze zotavovania sa z infekcie, alebo falošná negativita rRT-PCR

Preložené a dostupné na internete <http://www.diazyme.com/covid-19-antibody-tests>²

Odborníci odporúčajú kombinovať priamu a nepriamu metódu detekcie vždy s ohľadom na konkrétneho pacienta (**tab. 1**), (**obr. 2**).

Obr. 2: Schéma kombinovaného použitia jednotlivých testov vo vzťahu k množstvu vírusu v organizme



Samotestovanie v pohodlí domova alebo realita zo StarTrekku?

Telemedicína sa stáva štandardnou metódou pre niektoré špecializácie ako dermatológia, psychiatria a psychológia, praktické lekárstvo. Ešte prednedávnom neznámy pojem elektronické recepty je dnes bežne znejúcou esemeskou v našich telefónoch. Možno je len otázkou času, kedy si zvykneme napríklad na „inteligentnú toaletu“ (**obr. 3**), tak ako sme si zvykli na inteligentný telefón.

Obr. 3: Inteligentná toaleta : Inteligentná toaleta automaticky odosiela údaje extrahované z ľubovoľnej vzorky biolo-gického materiálu.

Je vybavená technológiou, ktorá dokáže diagnostikovať celý rad onkomarkerov v stolici a moči (napr. kolorektálny karcinóm).

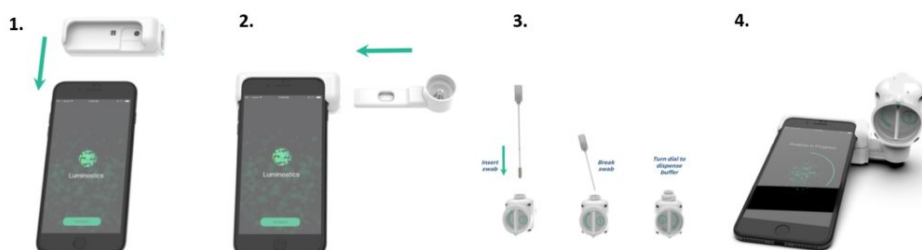


Dostupné na internete

<https://med.stanford.edu/news/all-news/2020/04/smart-toilet-monitors-for-signs-of-disease.html>⁹

Spoločnosť SANOFI v spolupráci so *start-up* spoločnosťou z Kalifornie Luminostics¹⁰ prichádza s absolútne originálnym nápadom pre samotestovanie ochorenia COVID-19 v pohodlí domova. Sanofi poskytne dlhoročnú skúsenosť v oblasti klinických štúdií a Luminostics svoju patentovanú technológiu „*glow-in-the-dark*“ nanočastíc (žiara v tme) vyvinutých pre spotrebiteľskú diagnostiku. Princíp stanovenia by sa dal v počiatočnom kroku prirovnať k už spomínaným RDT testom. Avšak v tomto prípade ide o kombináciu unikátneho vysoko citlivého typu nanočastíc a patentovaného hardvéru a softvéru spoločnosti Luminostics. Tieto nanočastice sú spolu s ďalšími reagenciami súčasťou nosnej platničky jednorazovej náplne (**obr. 4**).

Obr. 4: Samotestovacie zariadenie Luminostics¹⁰



1. Opakovateľne použiteľný adaptér na mobilný telefón. Tento adaptér je kompatibilný s väčšinou telefónnych zariadení
2. Jednorazová náplň do adaptéra. Táto náplň je hlavnou časťou, kde prebieha chemiluminiscenčná reakcia s biologickou vzorkou
3. Odberový tampón
4. Mobilná aplikácia, ktorá vyhodnocuje vzorku

Integrovaná kamera s bleskom v smartfóne dokáže veľmi šetrne rozpoznať tieto nanočastice (nie je ešte úplne jasné, aký typ vzorky sa bude používať – pravdepodobne vzorka slín, pretože nosohltanový ster je

veľmi zložitý úkon vyžadujúci zdravotníckeho špecialistu). Tento originálny imunotest sa vyznačuje veľmi vysokou senzitivitou a špecifitou. S použitím špeciálnych nanomateriálov mechanizmom „*lateral flow*“ dosahuje 100 – 1000-násobne nižšie limity detekcie, ako je to u tradičných rýchlotestov. Spoločnosť Luminostics garantuje, že táto inovatívna metóda je schopná detegovať baktérie s koncentráciou 100 až 1000 buniek na mililiter a stanovovať agensy v biologických vzorkách vo femtomolárnych (10^{-15}) množstvách.¹⁰

Cieľom tejto originálnej spolupráce je vývoj nepriamej diagnostickej metódy pre testovanie SARS-CoV-2 s použitím mobilného telefónu. Šlo by vôbec o prvý spotrebiteľský test vo voľnom predaji. Očakáva sa, že výsledok testu by mohol byť dostupný cca o 30 minút.

Sanofi a Luminostics plánujú možnosť diagnostiky SARS-CoV-2 pre všetkých užívateľov mobilných telefónov. Aplikácia bude kompatibilná s iOS a Android operačnými systémami. Rýchlo fungujúci domáci test ponúka niekoľko výhod, medzi ktoré môžeme zaradiť ľahkú dostupnosť, vylúčenie osobného kontaktu a zníženie prenosu infekcie pre pacientov a zdravotnícky personál, rýchlosť analýzy a tiež finančnú dostupnosť. Ak vývoj a regulačné povolenia prebehnú úspešne, prvotné odhady zavedenia na trh sú do konca roka 2020.

Literatúra

1. <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>
2. <http://www.diazyme.com/covid-19-antibody-tests>
3. <https://www.korona.gov.sk/poziadat-o-vysetrenie-na-covid-19/>
4. <https://koronavirus.mzcr.cz/seznam-odberovych-center/>
5. https://www.sukl.sk/hlavna-stranka/slovenska-verzia/media/tlacove-spravy/aktualizovane-odporuceni-e-statneho-ustavu-pre-kontrolu-lieciiv-ksamotestom-na-covid-19?page_id=5338
6. <https://www.clinisciences.com/>
7. Kvetková, Janka., <https://olup-prednahora.sk/aktuality/blog/laboratorne-testovanie-covid-19-co-nam-prezradia-testy/>
8. https://www.sav.sk/index.php?lang=sk&doc=services-news&source_no=20&news_no=8771
9. <https://med.stanford.edu/news/all-news/2020/04/smart-toilet-monitors-for-signs-of-disease.html>
10. www.luminostics.com