

COVID-19 laboratorinė diagnostika

Aurelija Žvirblienė, VU Gyvybės mokslų centras

COVID-19 laboratorinei diagnostikai gali būti naudojami molekuliniai arba serologiniai metodai.

Šiais metodais nustatomi skirtingi koronaviruso SARS-CoV-2 infekcijos rodikliai. Molekuliniai testai nustato viruso genetinę medžiagą (viruso RNR), o šiuo metu rinkoje esantys greitieji serologiniai testai nustato antikūnus, susidariusius infekuoto asmens organizme, vystantis imuniniam atsakui į koronaviruso infekciją (1).

Atliekant molekulinis testus, tyrimui imami nosiaryklės mėginiai, nes virusas patenka į žmogaus organizmą oro lašiniu būdu, t.y. per kvėpavimo takus. Kvėpavimo takų ląstelėse virusas dauginasi (replikuojasi), todėl mėginyje galima aptikti viruso RNR. Molekulinio testo procedūra gana sudėtinga, nes turi būti atliekama tikro laiko atvirkštinės transkripcijos reakcija, kuri susideda iš keleto etapų. Pirmiausia viruso RNR paverčiama į komplementarią DNR, naudojant atvirkštinės transkripcijos reakciją. Tada pasirinktas DNR fragmentas yra amplifikuojamas (padauginamas milijonus kartų), naudojant specialius pradmenis ir atliekant polimerazės grandininę reakciją (PGR). Atliekant PGR, į reakcijos mišinį pridedama specialios fluorescencinės žymės, kuri prisijungia prie naujai sintetinės DNR ir pagal kurios švytėjimo intensyvumą vertinamas testo rezultatas. Fluorescencinio signalo registracijai reikalinga speciali įranga. Todėl molekuliniai testai gali būti atliekami tik specializuotose laboratorijose. Šie testai yra kiekybiniai – jis parodo ne tik viruso RNR buvimą, bet ir jos kiekį. Molekuliniai testai parodo, kad asmuo testo atlikimo metu yra užsikrėtęs virusu ir gali jį platinti (2).

Skirtingų gamintojų molekuliniai testai nustato skirtingas koronaviruso SARS-CoV-2 geno sekas (ORF1, N, RdRP, E, S genų fragmentus), nuo to testų specifiškumas ir patikimumas nenukenčia. Pradmenys PGR reakcijai parenkami taip, kad jie būtų specifiški tik SARS-CoV-2 geno sekoms ir nerodytų kryžminių reakcijų su kitais koronavirusais. Molekuliniai testai yra itin jautrūs – jais galima nustatyti 4-5 viruso RNR kopijas mėginyje (3).

Greitieji serologiniai testai nustato koronavirusui SARS-CoV-2 specifiškus IgM ir IgG klasės antikūnus, susidariusius infekcijos metu. Testui atlikti paimami ir tiriami kraujo mėginiai, nes ten cirkuliuoja susidarę antikūnai. IgM klasės antikūnai susidaro per keletą dienų (3-7 dienas) nuo infekcijos pradžios, jų buvimas parodo ankstyvą infekcijos stadiją. IgG klasės antikūnai susidaro vėliau (per 2-3 savaites) ir jie gali išlikti ilgesnį laiką. Virusui specifiškų IgG buvimas kraujyje gali parodyti, kad asmuo buvo užsikrėtęs virusu, bet nebūtinai šiuo metu serga, nešioja ar platina virusą. Greitieji serologiniai testai yra pagrįsti imunochromatografiniu horizontalios tėkmės metodu (angl. *Lateral flow assay*). Testas atliekamas ant porėto substrato - celiuliozės ar polimero strypelių. Užnešus mėginį, jame esantys virusui specifiniai antikūnai (IgM ir IgG) difunduoja veikiami kapiliarinių jėgų ir prisijungia prie strypelyje imobilizuotų aukso ar latekso nanodalelių, prie kurių yra prijungtas antigenas (SARS-CoV-2). Susidariusiam imuniniam kompleksui judant strypeliu toliau, šis kompleksas jungiasi prie imobilizuotų nanodalelių žymėtų antrinių antikūnų prieš žmogaus IgG arba prieš žmogaus IgM. Jeigu mėginyje yra virusui specifiškų IgG arba IgM, išryškėja spalvotos juostelės tose strypelio vietose, kur imobilizuoti atitinkami antriniai antikūnai. Šiam testui atlikti nereikia specialios įrangos ir jo rezultatas matomas plika akimi (4).

Greitųjų serologinių testų gamintojai testų aprašymuose nurodo, kad šie testai rodo tik virusui specifinių IgG ir IgM antikūnų buvimą kraujo mėginyje ir jie negali būti naudojami kaip vienintelis kriterijus koronaviruso SARS-CoV-2 infekcijai diagnozuoti. Serologinių testų rezultatas gali būti klaidingai neigiamas, jei tyrimo metu dar nespėjo susidaryti SARS-CoV-2 specifiniai antikūnai, arba klaidingai teigiamas kai kurių pataloginių metu, esant mėginyje dideliame kiekiui kito specifinio antikūnų.

Pagal Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) rekomendacijas, molekuliniai testai laikomi „aukso standartu“ COVID-19 laboratorinei diagnostikai. PSO nerekomenduoja greitųjų serologinių testų naudoti SARS-CoV-2 infekcijai diagnozuoti, nes šiuo metu dar nėra pakankamai duomenų apie jų patikimumą. Jie gali būti naudojami moksliniams tyrimams arba SARS-CoV-2 infekcijos epidemiologiniams tyrimams (5).

Neseniai Europos ligų prevencijos centras (ECDC) paskelbė informaciją apie naujus diagnostinius metodus, skirtus greitam SARS-CoV-2 nustatymui. Skirtingai nuo šiuo metu naudojamų molekulinų metodų, kurie užtrunka kelias valandas ir reikalauja sudėtingų viruso RNR išskyrimo ir padauginimo procedūrų, šių testų rezultatas gaunamas per 10-30 minučių.

Šie greitieji testai SARS-CoV-2 antigenų nustatymui gali būti pagrįsti imunochromatografiniu metodu, arba kitomis technologijomis.

Šių naujų metodų patikimumas dabar intensyviai tiriamas, lyginant juos su „aukso standartu“ – molekulinio RT-PGR metodu. Išvados ir rekomendacijos dėl šių testų tinkamumo COVID-19 laboratorinei diagnostikai bus pateiktos, surinkus visą reikalingą informaciją.

Šie naujieji greitieji testai skiriasi nuo serologinių greitųjų testų, kurie nustato virusui specifiskus antikūnus – IgM arba IgG.

ECDC nepakeitė savo nuomonės dėl greitųjų serologinių testų – jie nepakankamai patikimi ir nerekomenduojami COVID-19 diagnostikai, nes antikūnų aptikimas kraujyje neįrodo viruso buvimo,

Citata iš ECDC dokumento: „*It should be underlined that SARS-CoV-2 antibody detection tests have limited usefulness for early COVID-19 diagnosis as it can take 10 days or more after onset of symptoms*“.

Nevyriausybė organizacija [FIND](#) (*Foundation for Innovative New Diagnostics*) bendradarbiaujanti su PSO, šiuo metu vertina naujai sukurtų greitųjų diagnostinių testų patikimumą. Šiuo metu organizacijos FIND sąrašė yra 10 greitųjų testų, skirtų SARS-CoV-2 antigenų nustatymui. Šie testai turi CE sertifikatą, t.y., jie atitinka ES direktyvą 98/79/EC, reglamentuojančią *in vitro* diagnostikos (IVD) produktus.

Lentelė. Molekulinių, greituju serologinių ir greituju antigeno nustatymo metodų palyginimas

<i>Testas</i>	<i>Technologija, jos principas</i>	<i>Privalumai</i>	<i>Trūkumai</i>
Molekulinis testas	RT-PGR. Nustatoma viruso RNR, ji paverčiama DNR ir amplifikuojama. Imamas nosiaryklės mėginys.	Tikslus ir jautrus metodas, parodo viruso buvimą. Viruso RNR aptinkama bet kuriuo infekcijos metu, kai tik virusas yra nosiaryklėje.	Sudėtinga ir brangi technologija, užtrunka kelias valandas, reikalinga speciali įranga
Greitasis serologinis testas	Imunochromatografija, Nustatomi virusui specifiški IgM ir/arba IgG klasės antikūnai. Imamas kraujo mėginys.	Paprasta procedūra, užtrunka kelias minutes, rezultatas matomas plika akimi.	Nepakankamas tikslumas, nes antikūnų buvimas nerodo viruso buvimo. IgM atsiranda po savaitės, o IgG – po 2-3 savaičių nuo infekcijos pradžios. Infekcijos pradžioje gali būti gautas klaidingai neigiamas rezultatas.
Greitasis viruso nustatymas	Įvairios technologijos. Nustatomi viruso antigenai arba viruso RNR. Imamas nosiaryklės mėginys.	Rezultatas gaunamas per 10-30 minučių, testo procedūra paprasta, rezultatas gali būti matomas plika akimi, arba naudojama nebrangi, nesudėtinga įranga	Kol kas trūksta duomenų apie šių metodų patikimumą.

Apibendrinimas:

- Molekuliniu metodu - tikro laiko atvirkštinės transkripcijos PGR – nustatoma SARS-CoV-2 RNR
- Serologiniu imunochromatografiniu metodu nustatomi SARS-CoV-2 specifiški IgM arba IgG klasės antikūnai
- PSO rekomenduoja naudoti molekulinį metodą COVID-19 laboratorinei diagnostikai
- Kuriami greitieji testai SARS-CoV-2 antigenų nustatymui, tačiau rekomendacijos dėl jų tinkamumo COVID-19 laboratorinei diagnostikai bus pateiktos tik ištyrus jų patikimumą.