

dr n. med. Agata Lebedowska

Katedra i Zakład Podstawowych Nauk Biomedycznych,
Wydział Nauk Farmaceutycznych w Sosnowcu, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach
Kierownik Katedry: dr hab. n. farm. Sławomir Wilczyński, prof. SUM

Diagnostyka molekularna i serologiczna COVID-19

COVID-19, choroba wywołana przez koronawirusa ciężkiego ostrego zespołu oddechowego 2 (SARS-CoV-2), pojawiła się pod koniec grudnia 2019 r. w Wuhan w Chinach, szybko rozprzestrzeniając się na inne kraje w Azji, Europie i Ameryce Północnej. 11 marca 2020 r. World Health Organization (WHO) ogłosiła globalną pandemię. Obecnie potwierdzono przypadki COVID-19 w prawie każdym kraju na świecie. WHO wezwała kraje dotknięte chorobą do spowolnienia rozprzestrzeniania się wirusa poprzez nałożenie środków ograniczających, takich jak ścisła kontrola podróży, spotkań towarzyskich i handlu^[1].

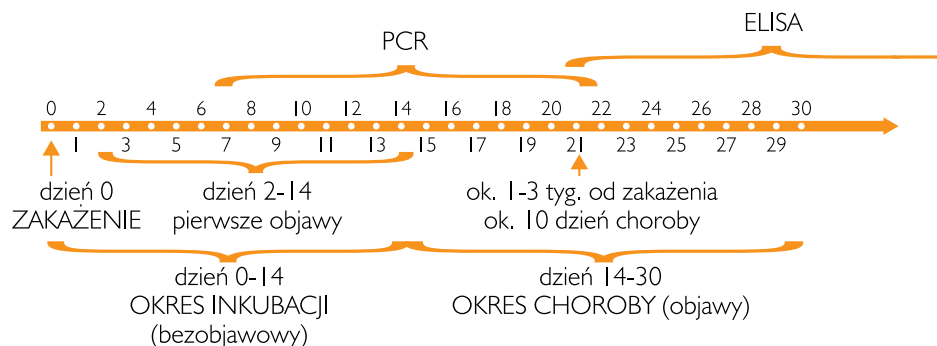
Nowy koronawirus jest przedstawicielem wirusów RNA i wykazuje podobieństwo genetyczne (75-80%) do wirusów występujących u nietoperzy – *Sarbecovirus*. Należy do grupy wirusów SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus*). Systematyka SARS-CoV-2: Klasa: *Coronaviruses*; Królestwo: *Riboviria*; Rząd: *Nidovirales*; Podrząd: *Comidovirineae*; Rodzina: *Coronaviridae*; Podrodzina: *Orthocoronavirinae*; Rodzaj: *Betacoronavirus*; Podrodzaj: *Sarbecovirus*; Gatunek: SARS^{2,3}.

Na etapie przedanalizy prawidłowo pobranie materiału z dróg oddechowych w odpowiednim czasie jest niezbędne do szybkiej i dokładnej diagnostyki molekularnej COVID-19. Wymagane są odpowiednie środki w celu zapewnienia bezpieczeństwa personelowi laboratorium przy jednoczesnym uzyskaniu wiarygodnych wyników badań. Na etapie analitycznym testy PCR

w czasie rzeczywistym *real-time* RT-PCR pozostają testem molekularnym z wyboru, podczas gdy techniki oparte na przeciwciałach są wprowadzane jako narzędzia uzupełniające^[4].

Testy molekularne

Niezwykle istotne dla zahamowania rozprzestrzeniania się SARS-CoV-2 jest wykrycie infekcji w fazie początkowej. Według zaleceń WHO w diagnostyce zakażeń SARS-CoV-2 należy stosować metody molekularne (NAAT, *nucleic acid amplification tests*), w tym *real-time* RT-PCR wykrywające materiał genetyczny wirusa, o najwyższej czułości między 7-14 dniem od infekcji^[5]. Materiałem klinicznym do badań molekularnych u pacjentów są próbki z górnych dróg oddechowych: wymazy z gardła lub nosogardła, płuczyny lub aspiraty z nosogardła, które na-



Ryc. 1. Schemat diagnostyki COVID-19 w przebiegu zakażenia SARS-CoV-2^[5].

leży zebrać od razu i w miarę możliwości pobierać powtórnie w celu monitorowania eradycji wirusa. Dla celów epidemiologicznych do badań genetycznych można również wykorzystać próbki kału, moczu lub próbki post mortem z autopsji^[6,7].

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym SARS-CoV-2 oparta jest na reakcji odwrotnej transkrypcji, czyli procesie przepisywania jednoniciowego RNA wirusa na dwuniciowy DNA. DNA jest w dalszej kolejności powielane w reakcji PCR i wykrywane w czasie rzeczywistym przy użyciu fluorescencyjnych znaczników dla zdefiniowanych obszarów genu wirusa SARS-CoV-2^[5]. Zastosowanie metody RT-PCR w celu identyfikacji nowego koronawirusa stało się możliwe dzięki udostępnieniu wzoru jego genu w bazie GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data*). Wysokie podobieństwo genetyczne w obrębie rodzaju *Coronavirus* stanowiło dużą trudność w wyszukaniu specyficznych sekwencji oraz odróżnieniu SARS-CoV-2 od innych wirusów wywołujących infekcję dróg oddechowych i jelit u ludzi, jak choćby wirusa SARS-CoV. Koronawirusy mają wiele sekwencji molekularnych w obrębie swojego genu jednoniciowego RNA, które można zastosować w testach PCR. Należą do nich geny kodujące białka strukturalne, w tym geny glikoprotein otoczki (E),

helikazy (HE) czy nukleokapsydu (N). Oprócz genów kodujących białka strukturalne istnieją specyficzne dla gatunku geny pomocnicze wymagane do replikacji wirusa. Należą do nich polimerazy RNA zależne od RNA (RdRp), esterazy hemaglutyniny (HE) oraz geny otwartej ramki odczytu ORF1a i ORF1b. Aby uniknąć potencjalnej reakcji krzyżowej z innymi endemicznymi koronawirusami, a także potencjalnego dryfu genetycznego SARS-CoV-2, w teście należy uwzględnić co najmniej dwa cele molekularne. W Stanach Zjednoczonych do identyfikacji molekularnej wirusa SARS-CoV-2 CDC (Centrum Kontroli i Prewencji Chorób) zaleca dwa docelowe białka nukleokapsydowe (N1 i N2), podczas gdy WHO zaleca badanie pierwszego rzutu za pomocą testu genu E, a następnie testu potwierdzającego z użyciem genu RdRp. Wszystkie badania z wynikami wątpliwymi powinny być wykonane z próbek pobranych powtórnie. Ponadto wyniki negatywne u pacjentów z symptomami choroby lub z bliskiego kontaktu z chorymi powinny być powtórzone. W przypadku drugiego ujemnego wyniku u pacjentów z objawami rekomenduje się następnie pobranie próbek z dolnych dróg oddechowych^[3]. Obecnie laboratoria diagnostyki molekularnej opierają się na gotowych zestawach do RT-PCR, gdzie proces

przygotowywania próbek jest uproszczony i polega na zastosowaniu mieszanin reakcyjnych w postaci liofilizowanej. Na rynku dostępne są testy komercyjne posiadające certyfikaty: SARS-CoV-2 *Real-Time PCR Detection Kit* (CerTest Biotec, Hiszpania), *Genesig Real-Time PCR COVID-19* (Primerdesign Ltd., Wielka Brytania), *Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit* (Anatolia Geneworks, Turcja) czy *Vitassay qPCR SARS-CoV-2* (Vittassay, Hiszpania). W celu szybkiej diagnostyki zakażeń wirusem SARS-CoV-2 można również wykorzystać komercyjnie dostępny aparat *FilmArray* (BioFire). Zestaw ten został zaaprobowany przez FDA i opracowany wspólnie z Departamentem Obrony USA (*Department of Defence United States of America*)^[3,7].

Czułość testów PCR około tygodnia od wystąpienia symptomów klinicznych maleje i wirus może zostać niewykryty, pomimo toczącego się zakażenia. W takim przypadku możemy otrzymać wynik fałszywie ujemny. Wówczas ważną rolę w diagnostyce odgrywają testy serologiczne.

Testy serologiczne

Na skutek kontaktu z patogenem w organizmie dochodzi do reakcji immunologicznej i wytwarzane są przeciwciała wykrywalne testami serologicznymi opartymi o metodę ELISA. Test ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), czyli test immunoenzymatyczny, służy do ilościowego lub półilościowego oznaczenia *in vitro* specyficznych przeciwciał wybranej klasy (IgG, IgM, IgA) przeciwko wybranemu antygenowi. Metody serologiczne odgrywają rolę w późniejszej fazie infekcji i stanowią idealne dopełnienie metod molekularnych w celu wydłużenia diagnostyki. Materiałem klinicznym do badań serologicznych jest surowica, gdzie konieczne są sparowane próbki: pierwsze w pierwszym tygodniu oraz następne po 2-4 tygodniach^[3].

Okres inkubacji (okres bezobjawowy) i okienko serologiczne, w którym dopiero tworzone są przeciwciała, a testy immunologiczne dają wynik negatywny pomimo zakażenia, w przypadku koronawirusa jest dość długi. Przeciwciała anty-SARS-CoV-2 pojawiają się w surowicy późno, najczęściej na kilka dni od wystąpienia objawów klinicznych^[5].

Najbardziej wiarygodne wyniki otrzymuje się, badając jednocześnie przeciwciała dwóch klas IgA i IgG. Swoiste przeciwciała anty-SARS-CoV-2 klasy IgG są wykrywalne około 10 dni od momentu wystąpienia objawów. Potwierdzają, że wystąpił kontakt z patogenem. W surowicy przeciwciała IgG stanowią 75% wszystkich przeciwciał. Wysokie miano IgG informuje o zwiększonej odporności na dany patogen. Pełnią funkcję ochronną przy ponownym narażeniu. Z kolei przeciwciała klasy IgA stanowią pierwszą linię obrony przed patogenami. To główna klasa immunoglobulin występująca w wydzielinach śluzowo-surowicznych odpowiedzialna za neutralizację wirusów. W surowicy występują w mniejszej ilości i neutralizują patogeny, które przekroczyły barierę śluzówkową. Badania wykazały, że w przypadku SARS-CoV-2 przeciwciała IgA są wykrywalne wcześniej niż na 10 dni od objawów klinicznych COVID-19. Stanowią zatem dodatkowe narzędzie diagnostyczne wczesnej fazy infekcji. Zbadano również przydatność wykrywania przeciwciał IgM w przypadku nowego koronawirusa. Jednak te immunoglobuliny skierowane są przeciw białku N, które wykazuje wysokie podobieństwo pomiędzy różnymi koronawirusami, mogą wystąpić reakcje krzyżowe, więc specyficzność testu jest niska^[5].

Wirusy z rodziny koronawirusów mają dwa białka stanowiące ważne miejsca antygenowe dla testów serologicznych. Testy koncentrowały się na wykrywaniu przeciwciał surowicy przeciwko białkom powierzchniowym S. Białka S są funkcjonalnie podzielone na dwie podjednostki (S1 i S2): domena

S1 jest odpowiedzialna za wiązanie receptora, natomiast domena S2 jest odpowiedzialna za fuzję. SARS-CoV i SARS-CoV-2 wiążą się z ludzkim enzymem konwertującym angiotensynę 2, który znajduje się w ludzkich komórkach oddechowych, komórkach nerek i komórkach przewodu pokarmowego. Drugim białkiem, które wydaje się ważnym miejscem antygenowym dla rozwoju testów serologicznych do wykrywania COVID-19, jest białko N, które jest strukturalnym składnikiem helikalnego nukleokapsydu. Białko N odgrywa ważną rolę w patogenezie wirusa i replikacji RNA, jednak wykazuje wysoką homologię pomiędzy różnymi gatunkami koronawirusów, stąd testy bazujące na antygenach białka N wykazują niską specyficzność^[7].

Test ELISA firmy EUROIMMUN wykorzystuje antygen podjednostki S1 białka strukturalnego S (glikoproteina powierzchniowa), wykazuje wyższą specyficzność niż antygeny N i S oraz wyklucza reakcje krzyżowe z przeciwciałami dla innych wirusów rodziny koronawirusów^[5]. Obecnie na rynku dostępne są różne zestawy serologiczne oparte na metodzie ELISA oraz szybkie testy immunochromatograficzne: Virus COVID-19 IgG/IgM, Covid-19 Ag Respi-Strip (BioConnections), Coronavirus (COVID-19) IgM/IgG Rapid Test Kit (RayBiotech), Human SARS-CoV-2 IgG/IgM (2019-nCoV/Coronavirus), ELISA Kit (MyBioSource), Accu-Tell COVID-19 IgG/IgM Rapid Test Coronavirus (Gentaur), COVID-19 IgG/IgM Combo Rapid Test Device (Liming Bio), STANDARD Q COVID-19 IgM/IgG Duo (Biosensor), EDI™ Novel Coronavirus COVID-19 ELISA Kits (Epitope Diagnostics), COVID-19 IgM & IgG „Corona Virus” Rapid Test kit Box (Swiss Point of Care), ALLTEST 2019-nCoV IgM/IgG Rapid (BioMaxima i Novazym)^[3].

Metody serologiczne odgrywają ważną rolę w badaniach epidemiologicznych COVID-19 oraz w określaniu statusu immunologicznego bezobjawowych pacjentów, jednak

w badaniach przesiewowych lub diagnozowaniu wczesnych infekcji stanowiąc mogą jedynie uzupełnienie badań molekularnych^[7].

Testy łączone

Propozycję połączenia obu rodzajów testów jako pierwsi opisali Liu i wsp.^[6], wykonali badanie testem ELISA z użyciem rekombinowanego fragmentu białka N SARS-CoV-2 do wykrycia przeciwciał klasy IgM i IgG oraz RT-PCR u pacjentów z potwierdzeniem i podejrzeniem COVID-19. Próbkę zbadano dwukrotnie, w fazie początkowej oraz po 11 dniach od wystąpienia objawów. Wykazano przewagę techniki RT-PCR w początkowej fazie choroby i spadek jej wartości w fazie późniejszej od 5 do 11 dni, gdzie test ELISA okazał się skuteczny. Zatem połączenie obu technik może podnieść wykrywalność zakażeń na różnych etapach choroby^[3].

Diagnostyka molekularna i serologiczna infekcji skórnych

Łączenie metod molekularnych i serologicznych jest również przydatnym narzędziem diagnostycznym w infekcjach skóry. Ułatwia szybką identyfikację segmentów DNA specyficznych dla gatunku bezpośrednio z próbek klinicznych. Izolowany genomowy DNA ze skrawków skóry i/lub paznokci jest amplifikowany za pomocą startarów specyficznych dla gatunku, a produkty PCR są następnie wykrywane przy użyciu sond znakowanych biotyną. Beifuss i in.^[9] zastosowali metody PCR-ELISA do wykrywania pięciu popularnych dermatofitów: *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *T. violaceum*, *M. canis* i *E. floccosum*. Genomowy DNA wyizolowano ze skóry i paznokci pacjentów z podejrzeniem zakażenia i amplifikowano swoistymi dla gatunku primerami znakowanymi digoksygeniną ukierunkowanymi na gen topoisomerazy II. Wyniki badań sugerują, że bezpo-

średnia izolacja DNA z próbek klinicznych w połączeniu z PCR-ELISA stanowi szybkie, powtarzalne i czułe narzędzie do wykrywania pięciu głównych dermatofitów niezależnie od ich cech morfologicznych i biochemicznych^[9]. Molekularne metody identyfikacji dermatofitów zyskały znaczną popularność i akceptację, ponieważ umożliwiają szybkie i dokładne wykrywanie grzybów. Jednak powszechne przyjęcie tych technik w laboratoriach klinicznych jest utrudnione. Metody molekularne wymagają specjalistycznego przeszkolenia personelu, drogiego sprzętu i odczynników, dlatego są przede wszystkim wykorzystywane w badaniach naukowych^[10].

Testy molekularne mogą być istotne dla monitorowania postępu choroby, oceny skuteczności i przewidywania wyników leczenia. Można zastosować techniki diagnostyki molekularnej, aby zdefiniować wzorce genotypowej i fenotypowej ekspresji w zmiennych warunkach klinicznych i morfologicznych, zidentyfikować cechy specyficzne dla drobnoustrojów, takie jak czynniki wirulencji i specyficzne geny związane z opornością na leki w zakażeniach błon śluzowych skóry. Możliwa jest także charakterystyka czynników zakaźnych, które odgrywają rolę w patogenezie niektórych nowotworów skóry. Wreszcie metody molekularne mogą być stosowane do identyfikacji nowych chorób zakaźnych w obrębie skóry i przydatków^[10].

Podsumowanie

Według wytycznych Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych podstawą rozpoznania aktywnego zakażenia SARS-CoV-2 jest technika RT-PCR. Jednakże łączne stosowanie testów immunologicznych zwiększa szansę wykrycia zakażenia zarówno w przypadkach klinicznie objawowych, jak i bezobjawowych, objętych nadzorem epidemiologicznym lub kwarantanną. Wyniki badań serologicznych nie mogą

być wykorzystywane jako podstawa do diagnozowania, wykluczania zakażenia ani do informowania o stanie zakażenia SARS-CoV-2.

Piśmiennictwo:

1. Guan D., Wang D., Hallegatte S., et al.: Global supply-chain effects of COVID-19 control measures. *Nature Human Behaviour* 2020, 1-11.
2. Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., et al.: The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020, 5, 536-544.
3. Michalski A., Bielawska-Drózd A., Cieślak P., Makowski P., Kocik J.: Metody diagnostyki laboratoryjnej COVID-19. *Wiedza Medyczna* 2020, 1-9.
4. Zhao J., Yuan Q., Wang H., et al.: Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease. *Clinical Infectious Diseases* 2019, medRxiv (Preprint) [online: 10.07.2020].
5. Polska EUROIMMUN. Diagnostyka serologiczna w COVID-19. *euroimmun.pl*. 2020 [online: 09.07.2020] <https://euroimmun.pl/blog/wp-content/uploads/2020/04/Diagnostyka-serologiczna-w-COVID-19.pdf>.
6. World Health Organization: Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019-2020: 2019 [online: 14.07.2020].
7. Tang Y-W., Schmitz J.E., Persing D.H., Stratton C.W.: Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. *J Clin Microbiol* 2020, 58, e00512-20.
8. Liu L., Liu W., Wang S., et al.: A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients. *Microbes and Infection* 2020, 22(4-5), 206-211.
9. Beifuss B., Bezold G., Gottlob P., et al.: Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer. *Mycoses* 2011, 54.2, 137-145.
10. Murphy M.J.: *Molecular diagnostics in dermatology and dermatopathology*. London: Springer Science & Business Media, 2011.