

Rzeczywistość w laboratorium w dobie pandemii SARS-CoV-2 (COVID-19)

Jolanta Krzysztoń-Russjan

Dział Mikrobiologii
Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego
Uniwersyteckie Centrum Medyczne,
Szpital WUM w Warszawie

**Diagnostyka laboratoryjna SARS-CoV-2
– aktualizacja zaleceń z 07.04.2021
Agencja Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji**

**Komitety Sterujące: prof. R. Nizankowski, M. Myśliwiec, P. Szymanski i
Panel Ekspertów pod kier. Konsultanta krajowego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej,
prof. K. Dzierżanowskiej-Fangrat**

Badania materiału genetycznego SARS-CoV-2.

Badania antygenowe służące do wykrywania białek SARS-CoV-2.

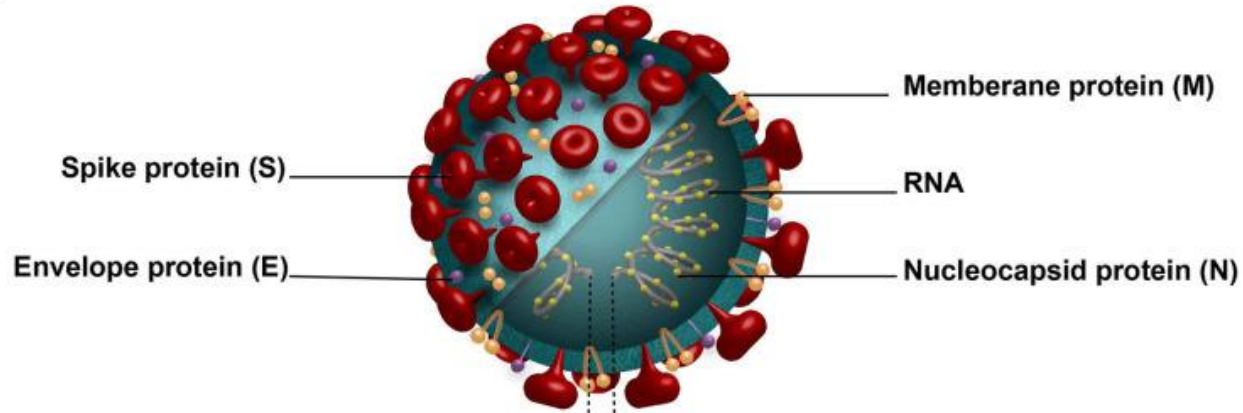
Badania serologiczne służące do wykrywania przeciwciał przeciw SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 (*ang.* severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)

(ostry ciężki zespół niewydolności oddechowej)

geny/obszary genomu poszukiwane w trakcie diagnostyki

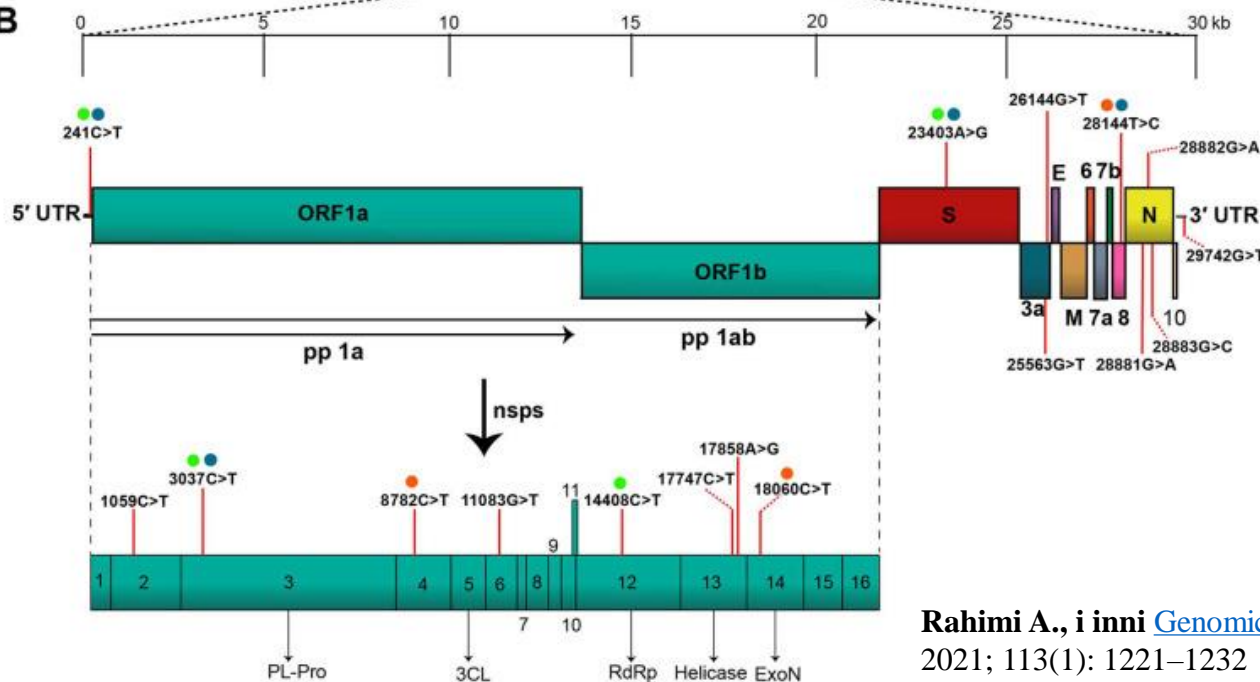
A



Rodzina: *Coronaviridae*
Podrodzina: *Orthocoronavirinae*
Rodzaj: *β-coronavirus*,
Gatunek: **SARS-CoV-2**

Pleomorfizm, wielkość 60–200 nm średnio ok 125 nm
Genom o wielkości 29.8 kb to 29.9 kb; (ssRNA)
N-nukleokapsyd o spiralnej symetrii (silnie ufosforylowane białko)

B



Rahimi A., i inni [Genomics](#). 2021; 113(1): 1221–1232

Geny kodujące białka niestrukturalne:

ORF1ab, RdRp

Geny kodujące białka strukturalne:

S – gen kodujący białko kolca,

E – gen kodujący białko otoczki,

M – gen kodujący białko błonowe lub membranowe

N – gen kodujący białko nukleokapsydu

W obszarze ORF1a i ORF1b **16 białek niestrukturalnych** w tym RdRp,
4 białka strukturalne: S, E, M, N;
9 „accessory factors”

Czułość badań molekularnych w zależności od rodzaju badanego materiału biologicznego

Diagnostyka laboratoryjna SARS-CoV-2 – aktualizacja zaleceń z 07.04.2021 Agencja Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji
Komitet Sterujący: prof. R. Nizankowski, M. Myśliwiec, P. Szymanski i
Panel Ekspertów pod kier. Konsultanta krajowego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej, prof. K. Dzierżanowską-Fangrat

Rodzaj materiału	Czułość (%)
• Wymaz z gardła i nosa pobierany równocześnie	97
• Wymaz z nosogardła	92,2
• Ślina pobrana z gardła / ślina z tylnej części jamy ustno-gardłowej	90,1
• Plwocina	87,5
• Wymaz z gardła	84
• Ślina	83,9
• Wymaz z nosa	82
• Kał	46
• Łzy / wymaz ze spojówki	17,4
• Krew	7,3
• Mocz	0

Etapy badania molekularnego - wiarygodny sposób wykrywania – SARS-CoV-2

- izolacja RNA (termo-niestabilny kwas nukleinowy; rozmrażanie, zamrażanie działa bardzo niekorzystnie na eluaty RNA)
 - unikanie kontaminacji podczas przenoszenia materiału biologicznego z próbek – przenoszenie tego materiału przy użyciu jednorazowych sterylnych plastików, np. pipeta z długą końcówką z filtrem, którą oczywiście każdorazowo należy wymienić lub jednorazowe pipetki z podziałką,
 - materiał do archiwizacji (dłuższy okres przechowywania, to przechowywanie prób biologicznych w podłożach transportowych, bardziej stabilne RNA niż próbka RNA po izolacji),
 - wskazane w temp. -80 °C,
- różne metody izolacji
 - metody automatyczne/półautomatyczne (najbardziej bezpieczne minimalizują ryzyko kontaminacji podczas przenoszenia materiału biologicznego do
 - zestawy kolumnkowe, ze złożami krzemionkowymi (punkty krytyczne: dokładnie wypłukanie i osuszenie kolumnki przed elucją RNA)),
 - zestawy z kulkami magnetycznymi (punkty krytyczne: dokładnie osuszenie osadu kulek z RNA z pozostałości r-ru alkoholu)
 - szybkie protokoły, należy zwrócić uwagę na punkty protokołów, takie jak wortexowanie, jeśli wortexowanie to należy bezwzględnie sprawdzić szczelność zamknięcia, następnie zwirować,
 - obecność składników hamujących w eluacie RNA wpływa niekorzystnie na proces odwrotnej transkrypcji, amplifikacji fragmentów cDNA (PCR, sekwencjonowanie)
- czynniki wpływające na wydajność izolacji (związane także z bezpieczeństwem epidemiologicznym)
 - rodzaj podłoża transportowego (wskazane z dodatkiem substancji inaktywującej wirusa i stabilizującej materiał genetyczny),
 - sposób pobrania i rodzaj materiału biologicznego (zalecenia WHO, zalecenia Krajowego Konsultanta ds.
 - sposób przechowywania i transportu: dobrze oznakowana próbka, szczelnie zamknięta, umieszczona w podwójnym opakowaniu foliowym umieszczona,
 - transport w zamkniętym pojemniku z wkładem chłodzącym, lub pojemniku zapewniającym temp. -2-8°C ,
- identyfikacja: wykazanie obecności, co najmniej dwóch obszarów genomu w tym przynajmniej jeden swoisty dla SARS-CoV-2
 - zastosowanie zwalidowane zestawy z danymi umożliwiającymi określenie kategorii dla wyniku: ujemnego, dodatniego, nierozstrzygającego i nie diagnostycznego,
 - zastosowanie odpowiednich kontroli, tj.: kontroli izolacji RNA, kontroli dodatniej, ujemnej, dla RT-PCR,
 - odpowiednie zalecenia producenta stosowanego testu, zalecenia wartości *cut-off*

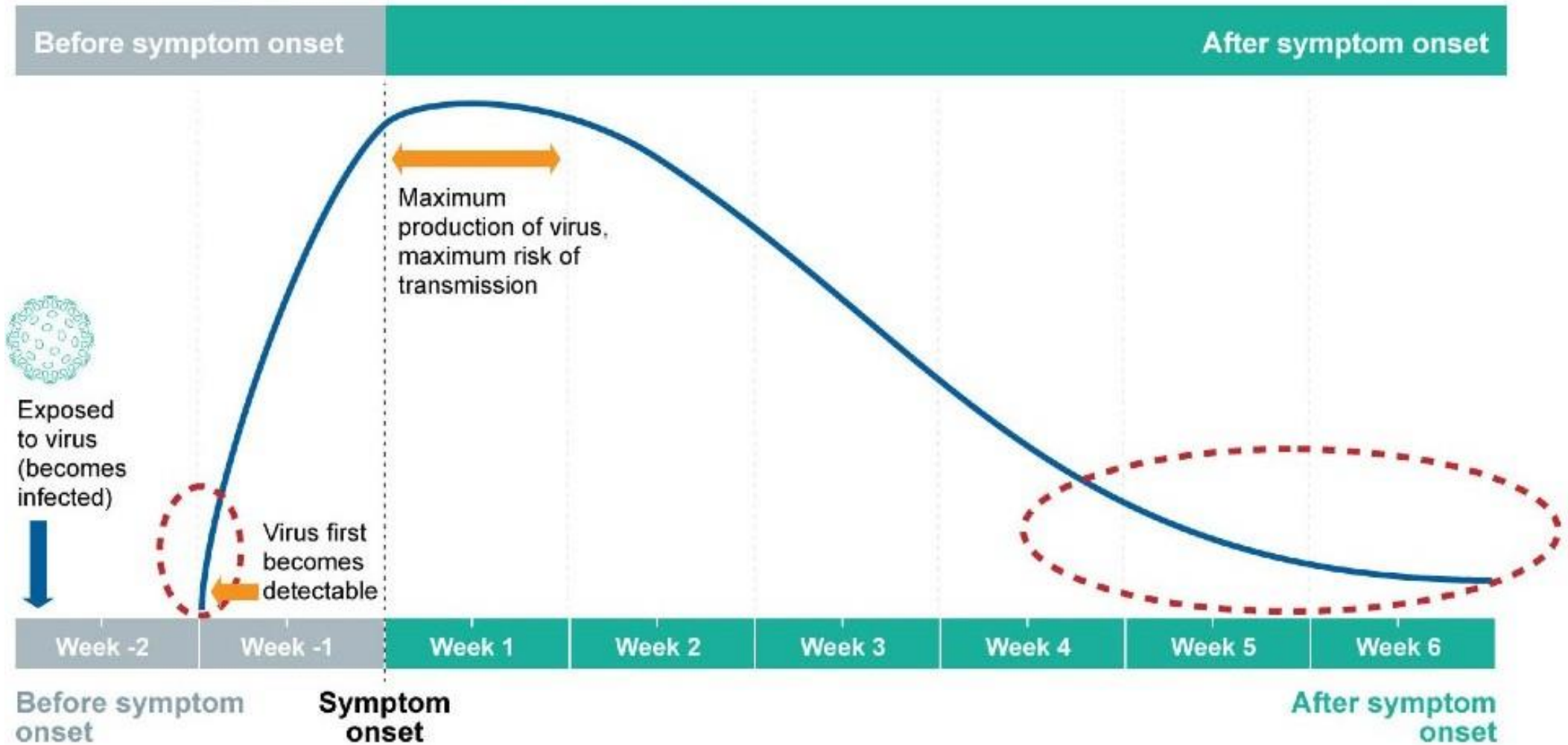
Systemy automatyczne umożliwiają kompleksowe badanie uwzględniające, izolację RNA, odwrotną transkrypcję i RT-PCR z jakościową identyfikacją fragmentów genomu SARS-CoV-2, wynik dodani zazwyczaj w odniesieniu do określonej wartości punktów odcięcia „*cut-off*”.

Metody biologii molekularnej stosowane do wykrywania SARS-CoV-2 i jego zmienności genetycznej

Rahimi A., i inni [Genomics](#). 2021; 113(1): 1221–1232

- **Real-time RT-PCR** – monitorowanie (przyrostu liczby kopii produktu; sygnału) w czasie rzeczywistym
- **Loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)** – izotermiczna amplifikacja za pośrednictwem pętli, polimeraza *Bst* (z *Bacillus stearothermophilus*),
- **Recombinase polymerase Amplification (RPA)** – izotermiczna amplifikacja z zastosowaniem systemu rekombinazy-polimerazy (rekombinaza z bakteriofaga T4 i polimeraza *Bsu* (duży fragment Pol I z *Bacillus subtilis*),
- **CRISPR/Cas12, 13** (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats *systems*) – systemy *CRISPR/Cas* w połączeniu z RPA, LAMP w celu podniesienia czułości
- **Multiplex diagnostic approaches** – diagnostyka multipleksowa, zestawy umożliwiające wykrywanie wielu gatunków patogenów
- **Metagenomic next-generation sequencing** – sekwencjonowanie nowej generacji – umożliwia poznanie sekwencji wirusa i śledzenie zmian genetycznych, bez konieczności izolacji materiału genetycznego

COVID-19 symptom onset schematic diagram



„Assurance of SARS-CoV-2 RNA positive results during periods of low prevalence” z 16.10. 2020

Na co należy zwrócić uwagę przy wyborze zestawu lub sposobu wykrywania SARS-CoV-2 metodą molekularną?

1) czy zestaw został zwalidowany do badania (izolacji RNA) z określonego materiału biologicznego,

2) czy zestaw RT-PCR do detekcji SARS-CoV-2 został zwalidowany do procesu dla aparatu, w którym przeprowadzany jest ten etap badania (jeśli nie, konieczna jest walidacja),

- warunki przechowywania długoterminowego odczynników,
- stabilność odczynników, np. możliwość rozmrażania lub/i liczba rozmrożeń,
- warunki przechowywania odczynników po otwarciu, np. bezpieczny okres, optymalna temperatura,
- czułość zestawu: granica wykrywalności (Limit of detection; LOD): liczba kopii/ml
- obecność ISC (Internal System Control), np. obce RNA dodawane podczas izolacji,
- obecność (IC) staterów do wykrywania fragmentów genomu ludzkiego, to ułatwia weryfikację jakości pobranego materiału biologicznego,
- liczba genów/obszarów specyficznych dla SARS-CoV-2

Trudności diagnostyki molekularnej SARS-CoV-2

zmienność genetyczna (mutacje) → szczepy/warianty:

brytyjski: B.1.1.7

afrykański: 501Y.V2 (B.1.351)

brazylijski: P1 (a.k.a. 20J/501Y.V3), pochodzi od B.1.1.28

indyjski: B.1.617.1

europejski: B.1.525

niestabilność odczynników do detekcji SARS-CoV-2

wysokie koszty badań (zależne od stosowanej techniki)

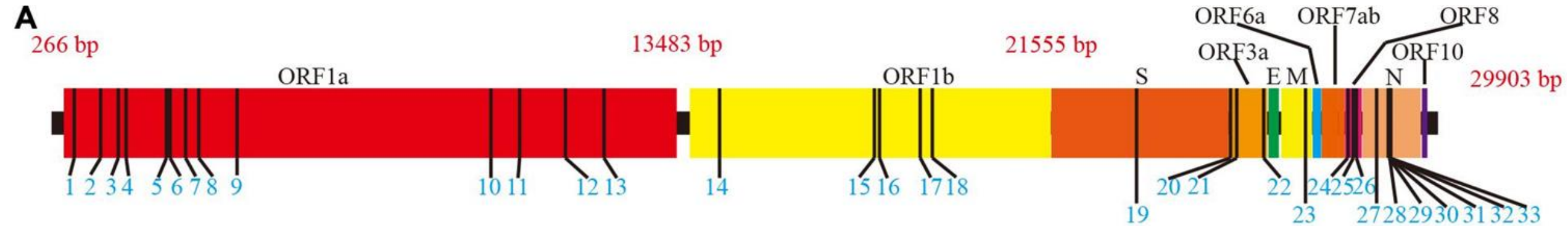
okresowy brak odczynników i/lub drobnego sprzętu laboratoryjnego

błędy wynikające z zanieczyszczeń w toku pracy przy stosowaniu bardzo czułych technik biologii molekularnej

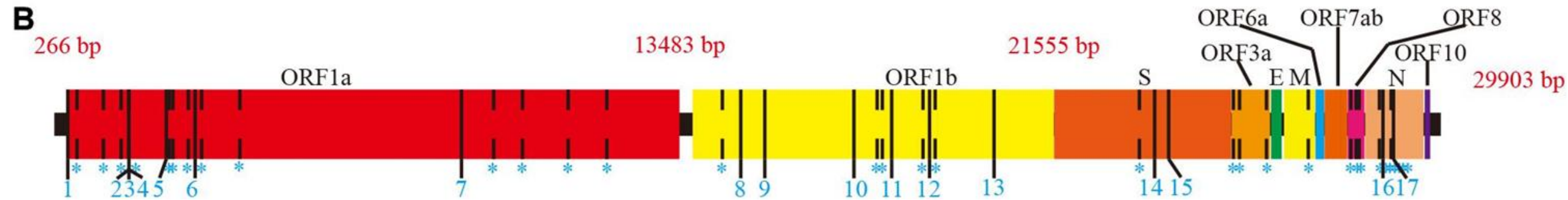
brak personelu

Struktura genomu SARS-CoV-2 – najczęściej występujące mutacje

NC_045512; 29903 bp; ss-RNA;
Lin Q i inni, 2021; 11: 591833.



Mutacje missensowna: zmiana punktowa sekwencji DNA tworząca nowy aminokwas



Mutacje nonsensowne: zmiana punktowa sekwencji DNA tworząca kodon stop

Jak uzyskać wiarygodny wynik badania molekularnego przy dużej liczbie badań i w krótkim czasie przeznaczonym na badanie?

1) analiza punktów krytycznych, których nie dopełnienie może skutkować błędami

- etap przedlaboratoryjny (prawidłowo wypełnione skierowanie z KRM (Krajowy Rejestr Medyczny) przez zlecającego badanie lekarza wraz z przesłaniem danych do EWP (system teleinformatyczny, do którego laboratoria raportują wyniki badań), skierowanie z lokalnego systemu umożliwiające, wypisanie wyniku,

Etapy badania :

- pobranie materiału do badań zgodnie z zaleceniami, właściwe oznakowanie próbek,
- przygotowanie próbek i przeprowadzenie badań w wydzielonej strefie z komorą BSL-2,
- wykonanie badania z zastosowaniem zwalidowanych zestawów umożliwiających wykrywanie, co najmniej dwóch obszarów genomu SARS-CoV-2, przez personel odpowiednio przeszkolony,
- wydanie wyniku zawierającego dane:
 - **nazwa instytucji i zakładu**, w którym wykonano badanie
 - **dane personalne** osoby badanej,
 - **status wyniku**: dodatni, ujemny, nie rozstrzygający lub nie diagnostyczny,
 - odpowiednie komentarze w przypadku statusu wyniku nierozstrzygający/niediagnostyczny
 - w przypadku wyniku dodatniego, podanie wartości Ct dla badanych obszarów genów, jeśli to możliwe,
 - nazwa metody/sprzętu, systemu,
 - **nazwiska osób wykonujących badanie, i osoby autoryzującej wynik**