

COVID-19 VIZSGÁLATI LEHETŐSÉGEK

BEVEZETÉS

A SARS-CoV-2 a koronavírusok családjába tartozó vírus, mely súlyos, akut légzőszervi szindróma képében jelentkező betegséget okoz. Az új koronavírus Kínából származik, a Hubei tartományban található Wuhan városából terjedt el, fertőzési hullámot indítva először az országon belül, majd pandémiát okozva az egész világon. A SARS-CoV-2 elsősorban cseppfertőzéssel terjed, köhögés vagy tüsszentés útján, a fertőzött betegekkel kontaktusba kerülés esetén. A fertőzés inkubációs ideje átlagosan három-hét nap (maximum 14 nap), tünetei elsősorban: láz, köhögés, légzési nehezítettség és fáradtság. A legtöbb betegben a fertőzés enyhe lázas betegség képében nyilvánul meg. Néhány betegnél, különösen idős vagy krónikus betegségben szenvedőknél azonban súlyos, akut légzési distressz szindróma (ARDS) alakul ki. A betegség az esetek egy részében halállal végződik, korcsoportos bontás alapján a mortalitási valószínűség 0,2-14,8% között alakul a 10-80+ éves korosztályban. A férfiak halálozási kockázata majdnem kétszerese a nőkének. 2020 februárjában a SARS-CoV-2 által okozott betegséget a WHO COVID-19-nek nevezte el.

A SARS-CoV-2 fertőzések diagnosztikájában többféle laboratóriumi módszer is alkalmazható:

- a **vírus RNS** közvetlen kimutatása polimeráz láncreakcióval (PCR) légúti mintából,
- a **vírus antigén** kimutatása rapid fluoreszcens immunoassay-vel légúti mintából,
- és a SARS-CoV-2 elleni **antitestek** kimutatása vérből.

Az egyes vizsgálati módszerek használhatósága és az általuk szolgáltatott eredmények információtartalma más és más, így szerepük eltérő a diagnosztikai láncban.

RT-QPCR (REVERZ TRANSZKRIPTÁZ KVANTITATÍV POLIMERÁZ LÁNCREAKCIÓ)

A legspecifikusabb és legérzékenyebb vizsgálati módszer a vírus jelenlétének igazolására, mivel annak örökítőanyagát (RNS) mutatja ki a vizsgált mintából. Kritikus jelentőségű a COVID-19 kezdeti megelőzésében a pandémiás terjedés szempontjából. A koreai COVID-19 esetekből származó tanulmányok szerint az RdRP gén kimutatása alacsonyabb érzékenységgel, mint az N gén vizsgálata, ezért ajánlott az N géneket detektáló, nagyon érzékeny RT-PCR módszerek használata. **A SYNLAB által jelenleg alkalmazott teszt a vírus genetikai állományának 3 szakaszát vizsgálja: kimutatásra kerül az E gén, RdRP gén és az N gén is, így az általunk használt PCR reakció igen nagy érzékenységgel tekinthető.**

A vizsgálatmal kapcsolatos legfontosabb információk:

Felső légúti minta (orrból és garatból történő mintavétellel) küldhető vizsgálatra. A leletátfordulási idő 24-48 óra.

A vizsgálat előnyei:

A vírus légúti jelenlétének igazolására a legjobb, gold standardnak tekinthető módszer. Kiváló érzékenység és magas specificitás jellemzi. A fertőzőképesség legjobb vizsgálati módszere.

A vizsgálat korlátai:

A mintavétel speciális mintavételi eszközt és szaktudást igényel, kellően képzett és gyakorlott személy végezheti azt védőfelszerelésben. A nem megfelelő mintavétel álnegatív eredményhez vezethet. A vizsgálat kivitelezése és értékelése magas szaktudást igényel, csak speciális felszereltségű molekuláris diagnosztikai laboratóriumban végezhető el. Mivel a folyamat számos, egymásra épülő lépésből áll, melyek mindegyike több órát is igénybe vehet, ez hosszabb leletátfordulási időt tesz csak lehetővé.

Az RT-PCR a legdrágább teszt a COVID-19 diagnosztikai lehetőségek között. Nagyobb közösség vizsgálatának feltétele a mintavételezési folyamat alapos előkészítése és megszervezése. Nagy tömegű tesztelési igény esetén alternatíva lehet a minták poolozása, ez az esetleges vizsgálati költségeket ugyan csökkentheti, de a vizsgálat érzékenysége is romlik ezzel együtt.

RAPID ANTIGÉN TESZT

Magas specificitású, a PCR-hez képest kisebb érzékenységű, de annál olcsóbb vizsgálati módszer. A teszt a SARS-CoV-2 vírus S-proteinjét mutatja ki, a vírust közepes vagy magas mennyiségben ürítő páciensek légúti mintáinak elemzésére használható. Alacsonyabb érzékenysége miatt a negatív eredmény nem zárja ki az éppen aktuális fertőzés fennállását, így ezt meg kell erősíteni az RT-PCR vizsgálattal.

A vizsgálattal kapcsolatos legfontosabb információk:

Felső légúti minta (orrból és/vagy garatból történő mintavétellel) küldhető a vizsgálatra. A vizsgálat kivitelezési ideje akár 15 perc/minta is lehet.

A vizsgálat előnyei:

A vírus légúti jelenlétének igazolására szolgáló, kiváló specificitású, fluoreszcens detektálási módszeren alapuló, gyors metodika. Támogatja a gyors döntéshozatalt olyan helyzetekben, ahol a fertőzöttek mielőbbi elkülönítése szükséges. A gyors teszt leolvasását speciális leolvasó eszköz (fluoreszcens reader) segíti, így azt nem kell szemmel értékelni. Jóllehet a teszt elvégzéséhez és értékeléséhez professzionális laboratóriumi személyzetre és háttérre szükség van, de nem szükséges azt speciális molekuláris diagnosztikai laboratóriumban kivitelezni.

A vizsgálat korlátai:

A mintavétel speciális mintavételi eszközt és szaktudást igényel, kellően képzett és gyakorlott személy végezheti azt védőfelszerelésben. A nem megfelelő mintavétel álnegatív eredményhez vezethet. Mivel érzékenysége alacsonyabb a PCR-nél, elsődlegesen olyan környezetben használható, ahol magas a betegség előfordulási gyakorisága, tehát a pozitív eredmények száma várhatóan magas lesz. Az RNS-hez képest a vírus fehérjék később expresszálódnak, ezért negatív eredményhez vezethet az is, ha túl korán, a betegség kezdeti fázisában történik a mintavétel, illetve ha a vírusrészecskék már csökken a légutakban a gyógyulás során. Kizárólag kvalitatív tesztelésre alkalmas, mennyiségeket nem detektál, az eredmény így csak pozitív vagy negatív minősítésű lehet.

SZEROLÓGIAI VIZSGÁLATOK (COVID-19 SPECIFIKUS ANTITESTEK KIMUTATÁSA)

A szerológiai tesztek a SARS-CoV-2 vírus ellen termelődött ellenanyagokat mutatják ki vérmintából. Az antitest kimutatási metodikák a szervezet válaszreakciójáról adnak képet, így a vizsgálatok információtartalma különbözik a direkt víruskimutatási eljárásokétól. Míg a PCR és az antigén teszt a vírus jelenlétét igazolhatja, addig a szerológiai tesztek azt vizsgálják, hogy korábban talákoztunk-e a vírussal, elkezdődött-e már egy arra specifikus válaszreakció. Akut fertőzés kimutatására a szerológiai gyors tesztek önmagukban nem alkalmasak. Ezek a tesztek segítséget nyújtanak a betegség teljes diagnosztikájában, információtartalmukkal kiegészíthetik a közvetlen kórokozó kimutatási módszereket, komplexebbé téve azok eredményének értékelését. Segíthetnek a tünetmentes fertőzöttek, illetve a fertőzésen már átesett, immunitást szerzett személyek felderítésében.

Rapid antitest tesztek

Ezek a tesztek a vizsgált személy vérében található COVID-19 specifikus ellenanyagok (IgM és IgG) gyors, „ágy mellett” kimutatására szolgálnak. *Számos ilyen teszt került forgalomba hazánkban is, azonban nem mindegy, hogy az adott tesztről milyen gyártói bevizsgálási adatok állnak rendelkezésre, milyen a tesztek teljesítőképesség (érzékenysége, specificitása, reprodukálhatósága) és azokat mennyire tudja igazolni professzionális laboratórium a gyakorlatban. A SYNLAB által használt teszt teljeskörű dokumentációval rendelkezik a gyártó részéről.*

A vizsgálattal kapcsolatos legfontosabb információk:

A vizsgálatot natív vérminta savójából javasoljuk elvégezni. A vizsgálat kivitelezési ideje akár 15 perc/minta is lehet.

A vizsgálat előnyei:

Gyorsan elvégezhető, akár ágy mellett is. A COVID-19 diagnosztikai láncban a legkedvezőbb árú teszteknek számítanak. Az eredmények leolvasásához nem szükséges külön eszköz, mivel a tesztkazetta szemmel is értékelhető.

A vizsgálat korlátai:

Pontatlanabb az automatizált antitest meghatározásokhoz képest (ELISA, kemilumineszcens assay-k stb.), hiszen a gyors tesztekre jellemző módon, a fals eredmények nagyobb számban fordulhatnak elő. A leolvasási idő be nem tartása hibás eredményhez vezethet. Lokális felhasználás és kapilláris mintavétel esetén nem végezhető nagy tömegben a teszt. **A vizsgálat érzékenysége és volumene növelhető, ha nem ujjbegyből történik a mintavétel, hanem vénás vér kerül levételre és feldolgozásra professzionális laboratóriumi környezetben.** Csak kvalitatív eredményt ad, így az ellenanyagválasz időbeli változásának megítélésre kevésbé alkalmas. **A vizsgált ellenanyag típusától és a mintavétel időpontjától függ a diagnosztikai szenzitivitás:** az eredmény álnegatív lehet, ha a betegség korai fázisában történik a mintavétel. A specificitást befolyásolja, hogy a **vírus melyik antigénje ellen termelődött antitestet vizsgálja a teszt és az mennyire specifikus a SARS-CoV-2 vírusra:** más vírusok hasonló fehérjéi ellen termelődött antitestek keresztreakciót okozhatnak, mely álpozitív eredményhez vezethet! **Több, piacon elérhető teszt csak kutatási célra használható és nem is rendelkezik diagnosztikai minősítéssel!** Sok forgalmazó esetén nem ismert, hogy **milyen a lot-lot stabilitás** (azaz lehet, hogy az egyik sorozatú teszt még működik, míg egy másik lot már nem), nincs adat arra vonatkozólag, hogy mely kórokozókka vizsgálják be a **keresztreaktivitás** lehetőségét, nem áll rendelkezésre adat arra sem, hogy a betegség melyik fázisában, hány páciensen vizsgálták be a **teszt teljesítőképességét**, továbbá nem tudni, hogy a **vizsgált IgG antitest milyen típusú**, azaz tartós védelmet nyújt-e a páciens számára a további SARS-CoV-2 fertőzésekkel szemben, vagy nem. Az eredmények értékelését megnehezíti, hogy az akut immunválaszra jellemző IgM akár tartósan is jelen lehet a vérben (perzisztálhat), annak ellenére, hogy a vírus esetleg már nem kimutatható a légutakban. Más kórokozókhoz hasonlóan, gyakori lehet az IgM álpozitivitás megjelenése is.

Fentiek miatt mindenképpen javasolt, hogy az ilyen tesztek professzionális laboratóriumi szolgáltatótól igényeljék, ahol a szaktudás rendelkezésre áll az eredmények értelmezéséhez.

Automatizált antitest tesztek (ELISA és egyéb immunoassay alapú)

Ezek a tesztek a SARS-CoV-2 elleni IgG vagy IgA/IgM immunoglobulin osztályú humán antitestek szemikvantitatív in vitro meghatározását biztosítják a SARS-CoV-2 fertőzés diagnosztizálásának alátámasztására, és kiegészítik a közvetlen kórokozó kimutatási módszereket. Ezenkívül a szerológia felhasználható az epidemiológiai adatok gyűjtésére is. Az antitest kimutatási eredmények helyes értékelése érdekében (hasonlóan más fertőzőes betegségekhez) két betegmintát szükséges megvizsgálni ahhoz, hogy a szerológiai státusz megítélhető legyen, egyet az akut fázisból (a betegség 1. hete), a másikat pedig 2–4 héttel később.

A vizsgálattal kapcsolatos legfontosabb információk:

A vizsgálat natív vérminta savójából végezhető. A vizsgálat kivitelezési ideje néhány óra.

A vizsgálat előnyei:

Automatizálható, így nagy tömegű szűrésre is alkalmas. Érzékenysége és specificitása sokkal jobb, mint a rapid antitest teszteké, kevesebb az álpozitív vagy álnegatív eredmények aránya. Ellenőrzött minőségű, bevizsgált, megbízható tesztek. A jobb minőségű tesztek a vírus S1 proteinje ellen termelődött antitestet mutatják ki, mely magasabb specificitást tesz lehetővé.

A koronavírus-járvány kitörését követően a diagnosztikai piac számos neves szereplője kezdett el automatizált SARS-CoV-2 szerológiai tesztet fejleszteni, ezek bevezetése a közeljövőben várható a SYNLAB diagnosztikai portfóliójába is.

A vizsgálat korlátai:

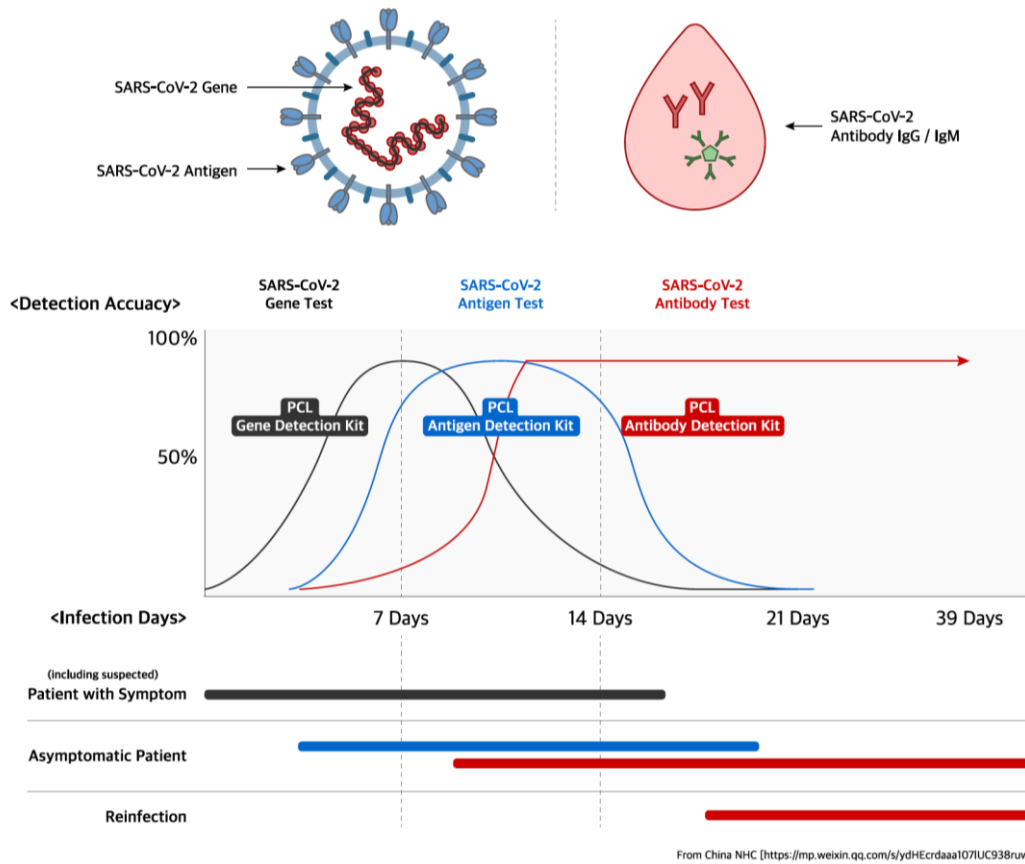
Egyes tesztek csak kvalitatív eredményt adnak, így az ellenanyag válasz időbeli változásának megítélésre kevésbé alkalmasak.

A vizsgált ellenanyag típusától és a mintavétel időpontjától függ a diagnosztikai szenzitivitás: **az eredmény álnegatív lehet, ha a betegség korai fázisában történik a mintavétel, ugyanakkor a szenzitivitás növelhető, ha a betegség későbbi szakaszában történő mintavétel esetén többféle antitest (pl.: IgA/IgM és IgG) együttes vizsgálata történik meg.** A specificitást befolyásolja, hogy a vírus melyik antigénje ellen termelődött antitestet vizsgálja a teszt és az mennyire specifikus a SARS-CoV-2 vírusra (más vírusok, pl.: SARS-CoV-1 hasonló fehérjéi ellen termelődött antitestek keresztreakciót okozhatnak, mely álpozitív eredményhez vezethet).

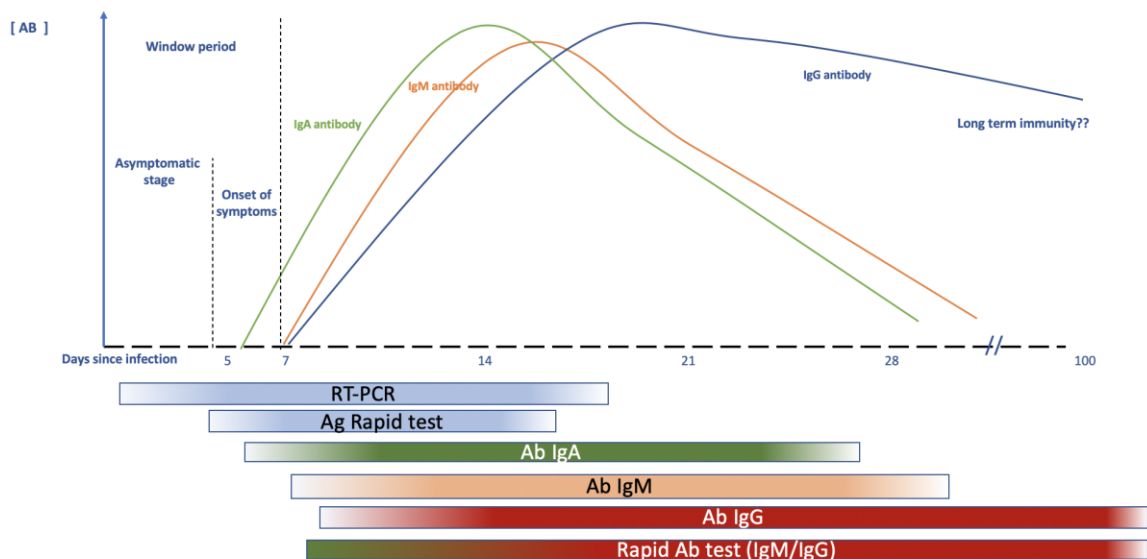
A szerológiai vizsgálatok egyike sem alkalmas önmagában az akut fertőzés bizonyítására. Egyetlen vérmintából egyik antitestvizsgálati módszer sem tudja bizonyítani vagy kizárni az esetleges fertőzést!

A savópár vizsgálat lehet alkalmas a szerológiai státusz tisztázására, de ez víruskimutatás nélkül nem zárhatja ki az éppen aktuális fertőzőképességet.

A VIZSGÁLATOK EGYMÁSHOZ VALÓ VISZONYA, EGYÜTTES ALKALMAZHATÓSÁG



1. ábra: Azt mutatja, hogy egymáshoz képest időben a vírus RNS, a vírus antigén és a vírus ellen termelődött ellenanyagok mikor jelennek meg és mikor válnak kimutathatóvá. Látszik, hogy legkorábban a vírus RNS-e mutatható ki, az antigén néhány nappal később kezd el pozitívvá válni, az ellenanyagok szintje pedig kb. 7-10 nappal a fertőzés kezdetét követően kezd el emelkedni a vérben.



2. ábra (a SYNLAB előzetes kutatási adatai alapján): Azt szemlélteti, hogy a vírus RNS detektálhatóságához, valamint a tünetekhez képest a SARS-CoV-2 ellenes ellenanyagok időben hogyan jelennek meg.

Az RT-PCR vizsgálat és az antitest szűrés együttes alkalmazása nagyobb biztonságot ad a fertőzöttek felismerésében és elkülönítésében:

Az alábbi táblázatban látszik, hogy **önmagukban a szerológiai tesztek (így a rapid antitest vizsgálatok is) korlátozott információ tartalommal** rendelkeznek csak:

Szerológiai teszt eredmények információ tartalma PCR vagy Antigén teszt eredmény nélkül			Klinikai értelmezési lehetőségek
RT-PCR	IgM	IgG	
nem történt	-	-	A páciens nem rendelkezik védettséggel, a negatív szerológiai eredmény viszont nem zárja ki a fertőzést, mivel lehet, hogy a mintavétel az ablakperiódusba esett, így az ellenanyagok még nem jelentek meg a keringésben. A páciens – ha nem különítik el – fertőzésveszélyt jelent a környezetére nézve. Rapid teszteknel előfordulhat fals negatív eredmény is.
nem történt	+	-	A páciens talán a fertőzés korai szakaszában lehet. Lehet, hogy a teszt keresztreakciót ad más kórokozókval is, ez esetben az eredmény álpozitív. Ismételt vizsgálat javasolt a fertőzőképesség kizárására (PCR + szerológia)
nem történt	+	+	A páciens a fertőzés aktív szakaszában lehet, a specifikus ellenanyagok kezdenek megjelenni. Lehetséges átvészelttség perzisztáló IgM mellett. A páciens fertőzőképes is lehet, mindenképpen szükséges ennek kizárására PCR vizsgálatot végezni!
nem történt	-	+	A páciens a fertőzés késői szakaszában lehet, vagy már korábban átesett a fertőzésen. Mivel a fertőzőképesség ez alapján nem zárható ki, szükséges elvégezni a PCR vizsgálatot is ennek tisztázására.

PCR vizsgálattal kombinálva viszont lényegesen több információhoz juthatunk:

Teszt eredmények			Klinikai értelmezési lehetőségek
RT-PCR	IgM	IgG	
+	-	-	A páciens az ablakperiódusban lehet, de a fertőzőképesség igazolható.
+	+	-	A páciens a fertőzés korai szakaszában lehet, fertőzőképes.
+	+	+	A páciens a fertőzés aktív szakaszában van, a védő ellenanyagok kezdenek megjelenni. Fertőzőképes állapot!
+	-	+	A páciens a fertőzés késői szakaszában lehet, még biztosan fertőzőképes.
-	+	-	A páciens a fertőzés korai szakaszában lehet (ez esetben a PCR eredménye álnegatív), vagy az IgM eredménye álpozitív. Mindenképpen ismétlés szükséges: PCR + antitest kimutatás.
-	-	+	A páciens korábban már áteshetett a fertőzésen és rendelkezik immunitással.
-	+	+	A páciens korábban már áteshetett a fertőzésen, a gyógyulási szakaszban lehet. Előfordulhat perzisztáló IgM jelenléte is. A PCR vizsgálat megismétlése mérlegelendő.