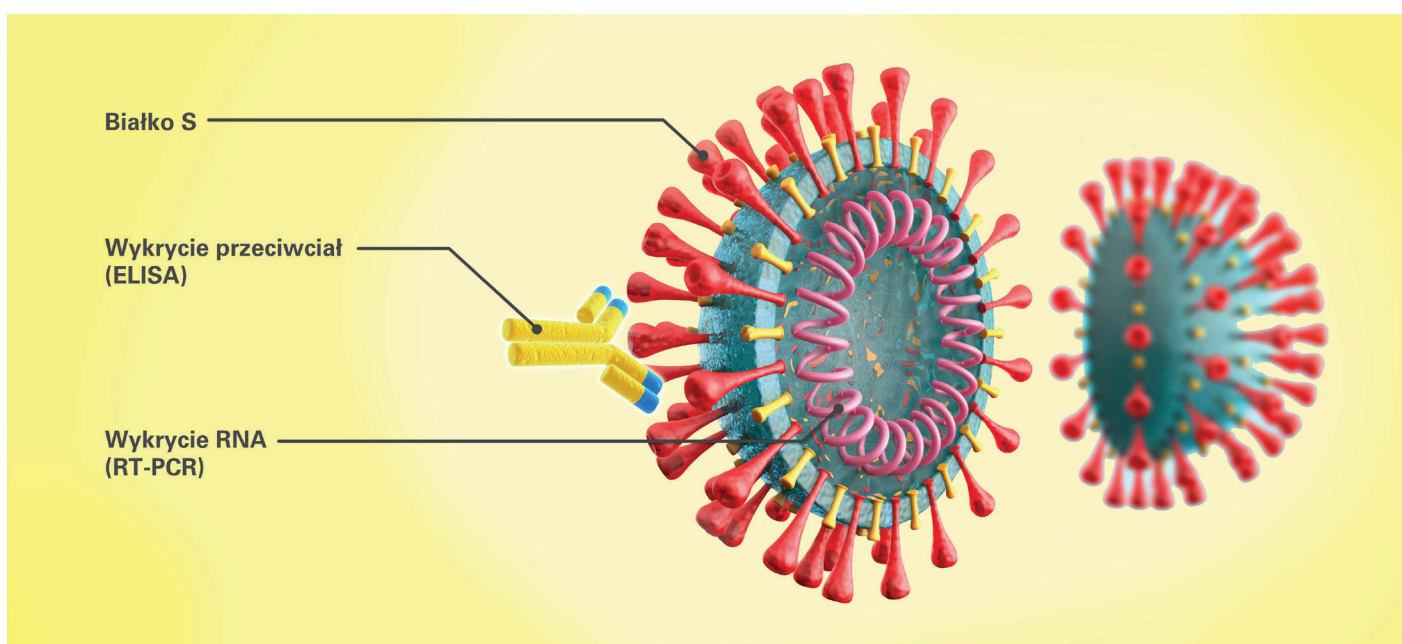


## Diagnostyka COVID-19: testy genetyczne czy serologiczne?

Pandemia wywołana przez koronawirusa SARS-CoV-2 jest obecnie jednym z największych problemów zdrowotnych na świecie. W związku z wysoką patogennością nowego koronawirusa niezwykle istotne jest prowadzenie odpowiedniej diagnostyki wśród osób potencjalnie zakażonych oraz ewidencja zachorowań.

### Jakie rodzaje testów są wykorzystywane w diagnostyce zakażeń SARS-CoV-2?

Istnieją dwa typy badań, które są wykorzystywane w diagnostyce laboratoryjnej COVID-19 (Coronavirus disease 2019): **genetyczne (diagnostyka bezpośrednia)**, np. test EUROIMMUN EURORealTime SARS-CoV-2, i **serologiczne (diagnostyka pośrednia)**, np. testy EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 ELISA (IgA, IgG). Testy bezpośrednie i pośrednie różnią się zastosowaniem i metodologią.



### Testy genetyczne do diagnostyki zakażeń koronawirusem SARS-CoV-2

Badaniami rekomendowanymi do wykrywania ostrej infekcji SARS-CoV-2 są testy genetyczne, w tym RT-PCR. Testy genetyczne pozwalają na wykrycie **materiału genetycznego wirusa SARS-CoV-2** w badanej próbce. Materiałem do badań jest zwykle wymaz z nosogardzieli lub próbki pobrane z dolnych dróg oddechowych (aspiraty tchawicze lub popłuczyny oskrzelikowo-pęcherzykowe).

#### Jaka jest zasada działania testu genetycznego na obecność koronawirusa?

Test RT-PCR wykrywający materiał genetyczny SARS-CoV-2 w próbce pobranej od pacjenta jest oparty o reakcję odwrotnej transkrypcji, czyli **proces przepisywania jednoniciowego RNA (ssRNA)** wirusa SARS-CoV-2 przez enzym odwrotną transkryptazę **na dwuniciowy DNA (cDNA)**. Uzyskane w wyniku reakcji cDNA jest następnie powielane w reakcji PCR i wykrywane w czasie rzeczywistym przy użyciu fluorescencyjnych znaczników dla zdefiniowanych obszarów genomu koronawirusa SARS-CoV-2.

W testach genetycznych istotny jest **właściwy dobór starterów**, które umożliwiają powielanie odpowiednich wyskospecyficznych regionów SARS-CoV-2 podlegających analizie.

## Kiedy wykonać test genetyczny?

Wykonywanie testów genetycznych zalecane jest przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) podczas **podejrzenia ostrej (wczesnej) infekcji u pacjenta**. Badaniu wykrywającemu materiał genetyczny wirusa powinny zostać poddane osoby spełniające kryteria przypadku podejrzanego COVID-19, które są szczegółowo opisane w zaleceniach (1).

Testy RT-PCR wykazują **najwyższą czułość między 7. a 14. dniem od kontaktu** z koronawirusem SARS-CoV-2 (jest to zwykle czas występowania u pacjenta pierwszych objawów zakażenia) (2). Po upływie około tygodnia od wystąpienia pierwszych objawów klinicznych czułość diagnostyki molekularnej (RT-PCR) w zakażeniach SARS-CoV-2 stopniowo maleje z powodu spadku liczby cząstek wirusa w nabłonku dróg oddechowych. Wówczas rośnie ryzyko wyników fałszywie ujemnych, pomimo toczącej się infekcji (3).

## Wynik badania

Dodatni wynik testu molekularnego świadczy o obecności materiału genetycznego wirusa w próbce i **jest dowodem na toczące się zakażenie**. Wykrycie infekcji w jej początkowej fazie ma w obecnej sytuacji epidemiologicznej największe znaczenie dla zahamowania dalszego szerzenia się infekcji spowodowanej przez SARS-CoV-2 (4).

## Zalety i wady testów typu RT-PCR w diagnostyce COVID-19

Testy genetyczne są obecnie **jedynym zalecanym narzędziem diagnostycznym**, które umożliwia ostateczne potwierdzenie ostrej infekcji SARS-CoV-2. RT-PCR umożliwia wykrycie zakażenia **jeszcze przed wystąpieniem pierwszych objawów klinicznych**, jak również u pacjentów bezobjawowych (2). Przy zastosowaniu odpowiednio dobranych starterów do reakcji PCR **reakcje krzyżowe z innymi koronawirusami można niemal zupełnie wykluczyć**. Przykładowym testem jest zestaw EUROIMMUN EURORealTime SARS-CoV-2. Test ten opiera się na strategii podwójnego celu, w której w jednej reakcji amplifikowane są 2 wysokospecyficzne regiony genów: ORF1ab i N-Gen, co zapewnia wysoką czułość (LOD = 1 cp/μl) i swoistość oznaczenia.

Testy molekularne stosowane w diagnostyce COVID-19 mają jednak pewne ograniczenia. Na wynik testu RT-PCR może wpłynąć wiele czynników, m.in.:

- **czas pobrania próbki do badania** (testy genetyczne wykazują najwyższą czułość między 7. a 14. dniem od kontaktu z patogenem; pobranie w późniejszej fazie infekcji może doprowadzić do otrzymania fałszywie negatywnego wyniku) (2),
- **sposób pobrania materiału do badania** (nieprawidłowe pobranie wpływa na niską jakość uzyskanego materiału),
- **transport materiału biologicznego** do laboratorium (zbyt długi czas lub nieprawidłowe warunki przechowywania mogą skutkować fałszywie negatywnym wynikiem),
- **poprawność wykonania analizy laboratoryjnej**.

Inne ograniczenia testów genetycznych to: stosunkowo wysoki koszt pojedynczego badania, dość długi czas oznaczenia oraz niewielka liczba przystosowanych do ich wykonywania laboratoriów, które muszą być wyposażone w specjalistyczny sprzęt.

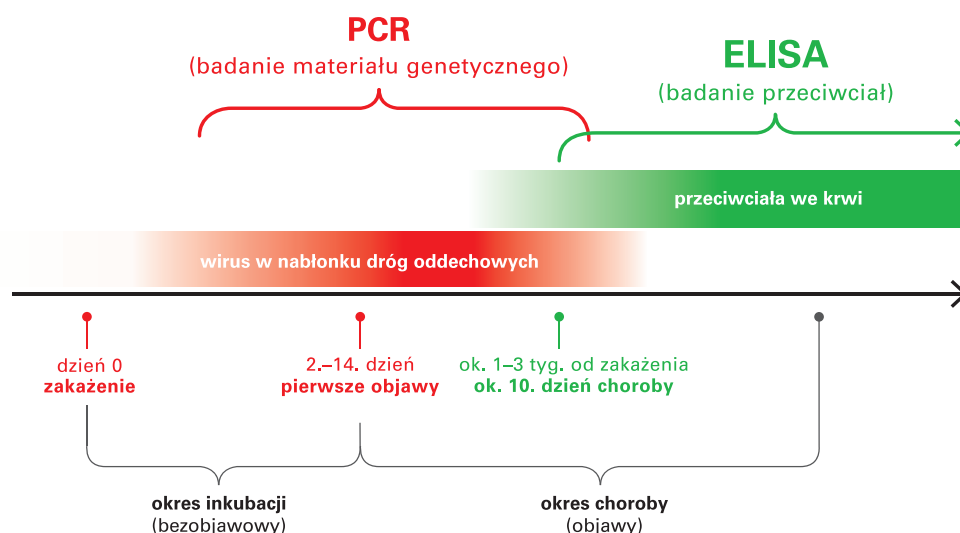
Pracownie genetyczne muszą spełniać restrykcyjne warunki prawne, a personel powinien być przeszkolony w zakresie wykonywania badań molekularnych.



## Testy serologiczne do diagnostyki zakażeń koronawirusem SARS-CoV-2

Serologiczne testy do diagnostyki COVID-19 wykrywają w badanej próbce **specyficzne przeciwciała skierowane przeciwko nowemu koronawirusowi**. Testy te nie służą zatem do bezpośredniego wykrywania wirusa, ale do potwierdzenia kontaktu z nim, czyli wykrycia specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2 w badanej próbce. **Pozytywny wynik dowodzi kontaktu pacjenta z wirusem**. Próbkę do badania stanowi surowica lub osocze.

Testy serologiczne odgrywają kluczową rolę **w późniejszej fazie COVID-19**. Badania oparte o metodę ELISA mogą stanowić uzupełnienie bezpośredniej metody wykrywania koronawirusa (RT-PCR), wydłużając czas, w którym możliwe jest przeprowadzenie wiarygodnej diagnostyki (4).



### Kiedy wykonać test serologiczny?

Przeciwciała specyficzne dla koronawirusa SARS-CoV-2 w klasie **IgG** są wykrywalne we krwi pacjenta **około 10. dnia od czasu wystąpienia pierwszych objawów** klinicznych, natomiast detekcja przeciwciał w klasie **IgA** jest możliwa zwykle **nawet kilka dni wcześniej** (5).

W badaniach serologicznych należy uwzględnić występowanie tzw. okna serologicznego. Jest to czas w pierwszej fazie infekcji, podczas którego układ immunologiczny nie zdążył jeszcze wyprodukować wysokiego poziomu specyficznych dla patogenu przeciwciał. Wraz z czasem trwania infekcji i wzrostem poziomu przeciwciał dochodzi do **serokonwersji, czyli zmiany ujemnego odczynu serologicznego na dodatni**. W przypadku badania dwóch próbek pobranych od pacjenta w odstępie czasu można wykryć serokonwersję, która **świadczy o świeżej infekcji** (2).

Wykrycie przeciwciał klasy IgG potwierdza kontakt pacjenta z wirusem, co może mieć istotne znaczenie w takich sytuacjach, jak:

#### • **Badania epidemiologiczne:**

- ustalenie rozpowszechnienia zakażenia w populacji, zakaźności, zapadalności i wirulencji nowego czynnika zakaźnego,
  - ustalenie dokładnego wskaźnika infekcji na dotkniętym epidemią obszarze – określenie wskaźnika śmiertelności choroby
- (5) (6).

- **Dochodzenia epidemiologiczne** – diagnostyka osób niezakwalifikowanych do badania PCR:
  - badania przesiewowe osób, które miały kontakt z chorymi na COVID-19,
  - badanie osób z powikłaniami po niedawnym przebyciu infekcji grypopodobnej.
- **Terapie eksperymentalne, rozwój szczepionek:**
  - wykrywanie ozdowieńców z wysokim poziomem IgG – możliwość pobrania od nich plazmy do stosowania w terapii najcięższych przypadków COVID-19 (immunizacja bierna – transfuzja swoistych przeciwciał) (7),
  - opracowywanie nowych szczepionek – możliwość sprawdzenia ich skuteczności w indukowaniu odpowiedzi humoralnej (8).
- **Badania masowe szczególnie narażonych osób:**
  - identyfikacja osób zakażonych, przechodzących infekcję bezobjawowo lub skąpo objawowo – wykrycie tzw. „cichych” nosicieli, którzy mogą być źródłem zakażenia innych ludzi,
  - badanie osób szczególnie narażonych na zakażenie SARS-CoV-2 – tych, które z uwagi na wykonywaną pracę mogą być źródłem infekcji dla ludzi starszych i schorowanych, oraz osób mających kontakt w wieloma ludźmi (np. personel medyczny, policja, personel sklepów, aptek),
  - badanie osób bezobjawowych lub skąpo objawowych w odstępach czasu – wychwycenie ewentualnej serokonwersji.
- **Identyfikacja osób odpornych na powtórne zakażenie:**
  - podejmowanie decyzji o przerwaniu lub kontynuacji kwarantanny,
  - wykrywanie osób, które wytworzyły przeciwciała i prawdopodobnie są odporne – ogromne znaczenie dla odbudowy gospodarki (8) (7).

### Zalety i wady testów serologicznych

Testy serologiczne są wsparciem diagnostyki COVID-19 metodą RT-PCR, pozwalają na wydłużenie czasu, w którym można przeprowadzić rzetelną i wiarygodną diagnostykę. Stosowanie testów wykrywających przeciwciała daje możliwość **przebadania dużej liczby próbek w trakcie jednej serii. Dzięki temu jest to idealne narzędzie do badań epidemiologicznych.**

Przeciwciała anti-SARS-CoV-2 mogą być wykrywane także u osób, które przeszły infekcję bezobjawowo lub skąpo objawowo.

Ponadto sprzęt, który jest niezbędny do przeprowadzenia testu ELISA, znajduje się w większości medycznych laboratoriów diagnostycznych. **Procedura inkubacji jest prosta i intuicyjna**, a badanie jest łatwe do wdrożenia w laboratorium. Warto dodać, że **możliwość pełnej automatyzacji** badania może znacznie zwiększyć liczbę wykonywanych testów w laboratorium.

Niewątpliwą zaletą badań serologicznych, w porównaniu do testów molekularnych, jest stosunkowo **niski koszt** wykonania pojedynczego badania oraz krótszy czas przeprowadzenia oznaczenia.

Nie należy jednak zapominać, że przeciwciała anti-SARS-CoV-2 pojawiają się w organizmie chorego stosunkowo późno, dlatego **testy serologiczne nie powinny zastępować diagnostyki bezpośredniej** (RT-PCR) w diagnostyce świeżych zakażeń SARS-CoV-2 (5).

Podczas interpretacji wyniku testu serologicznego należy mieć na uwadze możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych z przeciwciałami przeciwko innym patogennym dla człowieka koronawirusom. Wyniki fałszywie pozytywne mogą być też związane ze szczepieniem na grypę lub z towarzyszącymi chorobami autoimmunizacyjnymi. Dlatego przy wyborze testu serologicznego do



diagnostyki zakażeń wirusem SARS-CoV-2 należy zwrócić uwagę na antygen zastosowany w teście, który ma istotne znaczenie dla czułości i specyficzności badania. W testach EUROIMMUN Anty-SARS-CoV-2 (IgA, IgG) ELISA zastosowano **wysokospecyficzny, rekombinowany antygen S1 SARS-CoV-2**. Wybór tego antygenu do testu jest podyktowany m.in. niską homologią tej podjednostki białka S SARS-CoV-2 z analogicznymi regionami innych patogennych dla człowieka koronawirusów (9).

## Genetyka czy serologia – jak diagnozować zakażenia SARS-CoV-2?

Zarówno testy genetyczne, jak i serologiczne służą do diagnostyki zakażeń koronawirusem SARS-CoV-2. Testy RT-PCR znajdują zastosowanie szczególnie we wczesnej fazie infekcji, a więc w fazie replikacji wirusa, w której wykazują najwyższą czułość. Są to jedyne testy, które umożliwiają potwierdzenie ostrej infekcji. Testy serologiczne służące do badania obecności specyficznych przeciwciał w surowicy lub osoczu mają zastosowanie w okresie późniejszym, czyli już po wystąpieniu objawów COVID-19 (2) (10).

### Porównanie testów genetycznych i serologicznych do diagnostyki zakażeń koronawirusem SARS-CoV-2

| Cecha                             | Testy genetyczne   | Testy serologiczne  |
|-----------------------------------|--|---|
| <b>Co jest wykrywane</b>          | Materiał genetyczny wirusa (diagnostyka bezpośrednia)  | Specyficzne przeciwciała anty-SARS-CoV-2 (diagnostyka pośrednia)  |
| <b>Jaką informację uzyskujemy</b> | Wynik dodatni potwierdza obecność materiału genetycznego SARS-CoV-2 w badanej próbce, <b>potwierdza występowanie ostrej infekcji</b>   | Wynik dodatni potwierdza obecność przeciwciał anty-SARS-CoV-2 w badanej próbce, <b>potwierdza kontakt pacjenta z SARS-CoV-2</b>   |
| <b>Zastosowanie</b>               | <ul style="list-style-type: none"> <li>Identyfikacja osób zakażonych, przechodzących infekcję bezobjawowo lub skąpo objawowo, które mogą być źródłem zakażenia innych ludzi (tzw. „cisi” nosiciele)</li> <li>Badania osób szczególnie narażonych na zakażenie SARS-CoV-2 (np. personel medyczny), które z uwagi na wykonywaną pracę mogą być źródłem infekcji dla ludzi starszych i schorowanych, oraz osób mających kontakt z wieloma ludźmi (np. policja, personel sklepów, aptek)</li> <li>Podejmowanie decyzji o przerwaniu lub kontynuacji kwarantanny</li> </ul> |   |
|                                   | <b>Potwierdzenie aktywnej infekcji</b>   | <b>Diagnostyka i uzupełnienie diagnostyki:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>W przypadku badań w odstępach czasu: stwierdzenie serokonwersji jest dowodem zakażenia</li> <li>U osób, u których objawy wskazywały na COVID-19, a uzyskano negatywne wyniki badań PCR (podejrzenie fałszywie negatywnych wyników badania molekularnego)</li> </ul> |



|                                     |   |  |
|-------------------------------------|---|--|
|                                     |   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• U osób, u których nie wykonano badania PCR w ciągu pierwszych 7–10 dni choroby (w późniejszych fazach choroby czułość ELISA jest wyższa niż PCR)</li> <li>• U pacjentów, którzy cierpią na powikłania po niedawnym przebyciu infekcji grypopodobnej, a nie mieli diagnostyki w kierunku zakażenia koronawirusem</li> <li>• Wydłużenie czasu rzetelnej i wiarygodnej diagnostyki zakażeń nowym koronawirusem</li> </ul> <p><b>Badania epidemiologiczne:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ustalenie rozpowszechnienia zakażenia w populacji, zaraźliwości, zapadalności i wirulencji nowego czynnika zakaźnego</li> <li>• Możliwość ustalenia dokładnego wskaźnika infekcji na dotkniętym epidemią obszarze i określenie wskaźnika śmiertelności choroby</li> <li>• W wielu krajach badania serologiczne wdrażane są w celu identyfikacji osób <b>odpornych na zakażenie</b></li> </ul> <p><b>Terapia eksperymentalna, rozwój szczepionek:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wykrywanie ozdowieńców z wysokim poziomem przeciwciał klasy IgG w celu pobrania od nich osocza do stosowania w terapii najcięższych przypadków COVID-19 (immunizacja bierna – transfuzja swoistych przeciwciał)</li> <li>• Opracowywanie nowych szczepionek – możliwość sprawdzenia ich skuteczności w indukowaniu odpowiedzi humoralnej</li> </ul> |
| <b>Cena pojedynczego oznaczenia</b> | Stosunkowo wysoka   | Stosunkowo niska   |
| <b>Wady</b>                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Dostępny w niewielkiej liczbie placówek medycznych</li> <li>• Na wynik badania ma wpływ jakość pobranego materiału i warunki przechowywania próbki</li> <li>• Stosunkowo wysoki koszt badania</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Nie służy do wykrywania świeżych infekcji</li> <li>• U niewielkiej liczby osób zdrowych wynik może być pozytywny, pomimo braku kontaktu z SARS-CoV-2 (reaktywność krzyżowa)</li> <li>• Przeciwciała pojawiają się w organizmie chorego stosunkowo późno (po kilku dniach od wystąpienia objawów klinicznych)</li> </ul>   |



## Zalety

- Możliwość otrzymania **wyników dodatnich przed wystąpieniem pierwszych objawów** klinicznych
- Możliwość otrzymania wyników dodatnich również u pacjentów, u których zakażenie przebiega **bezobjawowo lub skąpo objawowo**
- **Niskie ryzyko wystąpienia reakcji krzyżowych** (przy odpowiednim doborze starterów)
- Obecnie jedyny rodzaj testu, który umożliwia **ostateczne wykluczenie bądź potwierdzenie występowania ostrej infekcji wirusem SARS-CoV-2**
- Możliwość przebadania **dużej liczby próbek** w trakcie jednej serii
- **Krótszy czas** przeprowadzenia testu w porównaniu do badań molekularnych
- **Dostępny sprzęt do automatyzacji** badania w większości laboratoriów diagnostycznych
- **Prosta procedura inkubacji**
- Łatwa do wdrożenia w laboratorium metodyka badania
- **Niski koszt** wykonania pojedynczego badania
- Odpowiednie do **masowych badań przesiewowych**
- Wydłużenie czasu rzetelnej i wiarygodnej diagnostyki zakażeń nowym koronawirusem

## Bibliografia

1. **Flisiak R. i wsp.** Zalecenia postępowania w zakażeniach SARS-CoV-2 Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych. [Online] 31 03 2020. [Zacytowano: 08 05 2020.] [http://www.pteilchz.org.pl/wp-content/uploads/2020/05/Prof.Flisiak\\_2020-PAIM-COVID-19-recommendation-PTEiLChZ-pl.pdf](http://www.pteilchz.org.pl/wp-content/uploads/2020/05/Prof.Flisiak_2020-PAIM-COVID-19-recommendation-PTEiLChZ-pl.pdf).
2. **Zhao J. i wsp.** Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *medRxiv (Preprint)*. [Online] 03 2020. [Zacytowano: 07 04 2020.] doi: 10.1101/2020.03.02.20030189.
3. **Guo L. i wsp.** Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America*. [Online] 21 03 2020. [Zacytowano: 07 04 2020.] doi: 10.1093/cid/ciaa310.
4. **Li R. i wsp.** Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV2). *Science*. [Online] 16 03 2020. [Zacytowano: 07 04 2020.] doi: 10.1126/science.abb3221.
5. **Liu L. i wsp.** A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients. *medRxiv (Preprint)*. [Online] 06 03 2020. [Zacytowano: 09 04 2020.] doi: 10.1101/2020.03.06.20031856.
6. **Okba N.M.A. i wsp.** SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *medRxiv (Preprint)*. [Online] 20 03 2020. [Zacytowano: 07 04 2020.] doi: 10.1101/2020.03.18.20038059.
7. **Amanat F. i wsp.** A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *medRxiv (Preprint)*. [Online] 17 03 2020. [Zacytowano: 08 04 2020.] doi: 10.1101/2020.03.17.20037713.
8. **Petherick A.** Developing antibody tests for SARS-CoV-2. *Lancet*. 2020, 395.
9. **Roujian L. i wsp.** Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel. *Lancet*. 2020, 395, strony 565–574.
10. **Rymer W.** Czy testy serologiczne mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce zakażenia SARS-CoV-2? *Medycyna Praktyczna*. [Online] 06 04 2020. [Zacytowano: 17 04 2020.] <https://www.mp.pl/covid19/covid19-kompendium/232509,testy-serologiczne-zastosowanie-w-diagnostyce-zakazenia-sars-cov-2>.

