I. Etiologia i zasady postępowania z materiałem biologicznym

1 Wykrywanie kwasów nukleinowych SARS-CoV-2

1.1 Pobieranie próbki

Właściwa próbka oraz odpowiedni sposób i czas jej pobrania są kluczowe, aby zwiększyć czułość wykrywania wirusa. Pacjent powinien zgłosić się do punktu pobrań przed spożyciem posiłku, bez higieny jamy ustnej. Do badania możemy oddać: wydzielinę górnych dróg oddechowych (wymaz z nosogardła, wymaz z nosa, wydzielinę z nosogardła), wydzielinę dolnych dróg oddechowych (plwocinę, wydzielinę z dróg oddechowych, popłuczyny oskrzelowo – pęcherzykowe), krew, kał, mocz i wydzielinę ze spojówki oka. Plwocina i inne próbki pobierane z dolnych dróg oddechowych charakteryzują się dużą zawartością kwasów nukleinowych i są preferowane. SARS-CoV2 preferencyjnie namnaża się w pneumocytach typu II, a największa obecność wirusa pojawia się od 3 do 5 dni od początku choroby. Z tego względu, jeżeli test na obecność kwasów nukleinowych jest ujemny na początku choroby, próbka do badania powinna być pobrana ponownie w następnych dniach.

1.2. Wykrywanie kwasów nukleinowych

Wykrywanie kwasów nukleinowych jest metodą preferowaną w diagnostyce infekcji koronawirusowej. Według instrukcji z zestawu, proces wykrywania wirusa wygląda następująco: W pierwszej kolejności następuje poddanie pobranej próbki wstępnej obróbce, dzięki której wirus ulega lizie do kwasów nukleinowych. Następnie, trzy wyizolowane geny SARS-CoV-2, nazwane ORF1a/b, N (białko nukleokapsydu) oraz E (białko kapsydu) są poddawane amplifikacji metodą ilościową real-time PCR. Amplifikowane geny są wykrywane nasileniu fluorescencji. Kryteriami dodatniego testu jest obecność genu ORF1ab i/lub genów N i E.

2. Izolacja i posiew wirusa

Posiew wirusa musi być przeprowadzony w laboratorium 3 klasy bezpieczeństwa biologicznego (BSL-3). Poniżej w skrócie przedstawiony jest opis tego procesu: najpierw pozyskuje się świeże próbki od pacjenta: plwociny, wydzieliny itp. i zaszczepiane do komórek Vero-E6 celem utworzenia hodowli wirusa. Efekt cytopatyczny jest widoczny po kilku, kilkunastu godzinach. Wykrycie wirusowego kwasu nukleinowego w hodowli komórkowej oznacza pomyślnie wykonany posiew. Pomiar miana wirusa: po rozcieńczeniu stężenia wirusa przez krotność 10-ciu, metodą mikro-cytopatyczną określany jest RCID50. Innym sposobem na opisanie żywotności wirusa jest określenie ilości jednostek tworzących łysinkę (PFU, *plaque forming unit*).

3. Wykrywanie przeciwciał w osoczu

Po zainfekowaniu organizmu przez SARS-CoV-2 rozpoczyna się produkcja specyficznych przeciwciał. Do metod identyfikacji przeciwciał w osoczu należą np. immunochromatografia z wykorzystaniem koloidalnego złota, metoda ELISA, immunologiczna chemiluminescencja. Dodatnie specyficzne przeciwciała IgM lub miano przeciwciał IgG przynajmniej 4x wyższe w fazie zdrowienia niż w fazie ostrej choroby, mogą być używane jako kryterium diagnostyczne u pacjentów u których podejrzewamy chorobę koronawirusową, a u których w badaniu próbek nie wykryliśmy kwasu nukleinowego wirusa. Przeciwciała IgM są wykrywalne 10 dni od momentu rozpoczęcia choroby, natomiast dla przeciwciał IgG jest to 12 dni od momentu wystąpienia objawów. Wiremia stopniowo zmniejsza się wraz ze wzrostem miana przeciwciał w osoczu.

4. Wykrywanie wskaźników odpowiedzi zapalnej

Zalecane jest zbadanie poziomu CRP, prokalcytoniny, ferrytyny, D-dimerów, całkowitej ilości leukocytów oraz ich subpopulacji, IL-4, IL-g, IL-10, TNF-a, INF-y i innych wskaźników stanu zapalnego oraz odpowiedzi immunologicznej, co pozwoli na ocenę stanu klinicznego oraz ułatwi predykcję skłonności pacjenta do ciężkiego bądź krytycznego przebiegu choroby. Stanowi to podstawę do tworzenia strategii leczenia.

Większość pacjentów z COVID-19 ma prawidłowy poziom prokalcytoniny przy znacząco podniesionym poziomie CRP. Szybki i znaczący wzrost białka CRP wskazuje na możliwość wtórnej infekcji. D-dimery są znacząco podniesione w ciężkich przypadkach i potencjalnie mogą być stosowane jako czynnik predykcyjny złego rokowania. Pacjenci z niskim poziomem leukocytów na początku okresu rozwoju choroby generalnie mają złe rokowanie. U pacjentów w ciężkim stanie stopniowo zmniejsza się liczba leukocytów w krwi obwodowej. Poziomy IL-6 oraz IL-10 są bardzo wysokie u pacjentów w ciężkim stanie. Monitorowanie poziomów IL-6 oraz IL-10 jest przydatne w celu oceny ryzyka progresji choroby do stanu ciężkiego.

5. Bezpieczeństwo w laboratorium

Środki ostrożności biologicznej powinny być określone w oparciu o różny poziom ryzyka procesu badawczego. Środki ochrony osobistej powinny być używane zgodnie z wymaganiami ochrony dla laboratorium BSL-3 przy badaniu próbek pochodzących z układu oddechowego, wykrywaniu kwasów nukleinowych i hodowli kolonii wirusów. Stopień bezpieczeństwa biologicznego (ang. Biosafety Level, BSL) określa standard laboratoriów dostosowanych do pracy z patogenami różnych grup ryzyka. Czynniki biologiczne należące do grupy 3 to takie, które mogą wywoływać ciężkie choroby ludzi i zwierząt, lecz których leczenie jest możliwe. Stopnie bezpieczeństwa biologicznego BSL zawierają się w przedziale od 1 do 4 i określają stopień dostosowania laboratorium do pracy z czynnikami biologicznymi o wzrastającym stopniu ryzyka. Grupa 1 to czynniki, poprzez które wywołanie choroby u ludzi i zwierząt jest mało prawdopodobne i które wymagają najmniej restrykcyjnych zabezpieczeń. Grupa 2 to czynniki, które mogą wywoływać chorobę u ludzi i zwierząt oraz mogą być niebezpieczne dla pracowników, jednak ich rozprzestrzenienie jest mało prawdopodobne, a skuteczna profilaktyka lub leczenie są dostępne. Grupa 3 to czynniki groźniejsze, które mogą wywoływać ciężką chorobę u ludzi i zwierząt oraz mogą stanowić poważne niebezpieczeństwo dla pracowników. Istnieje ryzyko ich rozprzestrzenia, lecz zazwyczaj skuteczna profilaktyka lub leczenie są możliwe https://biotechnologia.pl/biotechnologia/laboratoria-klasy-bsl-3,15910. Środki ochrony osobistej zgodne ze standardem ochrony w laboratorium BSL-2 powinny być wdrożone przy przeprowadzaniu testów biochemicznych, immunologicznych oraz rutynowych badań laboratoryjnych. Próbki powinny być transportowane w specjalnych kontenerach i pudełkach transportowych które zgodne są z wymaganiami biobezpieczeństwa. Wszystkie sprzęty laboratoryjne wykorzystywane w diagnostyce powinny ściśle podlegać sterylizacji przy użyciu autoklawów. HMS Assistance S.A. wykonuje badania w autoryzowanych laboratoriach wskazanych na liście przez Ministerstwo Zdrowia.