

LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA COVID-19: OD DOKAZOVANJA OKUŽBE DO MERJENJA IMUNSKEGA ODZIVA

LABORATORY DIAGNOSIS OF COVID-19: FROM VIRUS DETECTION TO IMMUNE RESPONSE MEASUREMENT

AVTOR / AUTHOR:

Asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.¹

Doc. dr. Alenka Šmid, mag. farm.¹

Asist. Taja Zore, mag. lab. biomed.¹

Lara Slavec, mag. lab. biomed.^{1,2}

Asist. Damjan Avsec, mag. farm.¹

Asist. dr. Irena Prodan Žitnik, mag. farm.¹

Prof. dr. Joško Osredkar, mag. farm., spec. med. biokem., EuSpLM^{1,3}

Prof. dr. Borut Božič, mag. farm., spec. med. biokem., EuSpLM¹

Prof. dr. Janja Marc, mag. farm., spec. med. biokem., EuSpLM¹

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za klinično biokemijo, Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

² Ginekološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Šlajmerjeva 3, 1000 Ljubljana

³ Klinični inštitut za klinično kemijo in biokemijo, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Njegoševa 4, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: jasna.omersel@ffa.uni-lj.si

POVZETEK

V spopadanju s pandemijo bolezni covid-19 so bile neprimerljivo uspešnejše države z obsežnim laboratorijskim testiranjem, doslednim spremljanjem in izolacijo okuženih oseb. K hitrejši in učinkoviti zdravniški obravnavi pomembno doprinese laboratorijska diagnostika. Njena vloga je, da izbira najboljše metode, ki so v danem trenutku na razpolago in zagotavljajo kakovostne, zanesljive rezultate v najkrajšem možnem času. V članku predstavljamo spoznanja o imunskem odzivu po okužbi s SARS-CoV-2, pristope v diagnostiki virusnih okužb in značilnosti dobre diagnostične metode. Predstavljena je diagnostika covid-19 z vidika prepoznavanja aktivne (virusna RNA) in prebolele okužbe (protitelesa proti virusnim antigenom) kot tudi spremembe v biokemijskih parametrih in uporabnost diagnostičnih rezultatov za uspešno obvladovanje pandemije SARS-CoV-2.

KLJUČNE BESEDE:

diagnostika SARS-CoV-2, imunski odziv, molekularne metode, serološki testi, zakonodaja

ABSTRACT

In the fight against covid -19, countries where extensive laboratory testing, consistent monitoring and isolation of infected individuals were implemented have been incomparably more successful. Laboratory diagnostics contributes to faster and more efficient medical decisions. Its role is to select the best methods available at a given time, and to provide high quality and reliable results in the shortest possible time. Herein, we present the latest findings on the immune response to a SARS-CoV-2 infection, approaches in the diagnosis of viral infections and the characteristics of a good diagnostic method. We present the diagnostics of covid-19 from recognising active (viral RNA) and past infection (antibodies against viral antigens) to changes in biochemical parameters and the applicability of diagnostic results for successful management of the SARS-CoV-2 pandemic.

KEY WORDS:

SARS-CoV-2 diagnostics, immune response, molecular methods, serological tests, legislation

1 UVOD

Za obvladovanje pandemije in boj proti eventualnemu novemu izbruhu okužbe covid-19 je bistvenega pomena testiranje na prisotnost okužbe ali na preteklo izpostavljenost virusu SARS-CoV-2. Za obvladovanje različnih stopenj pandemije je pomembno razumeti namen posameznega testiranja ter diagnostično uporabno vrednost (1). Vloga medicinskih laboratorijev je, da izbirajo najboljše metode, ki so na razpolago, in tako zagotavljajo kakovostne, zanesljive rezultate ter hitrejšo in učinkovito zdravniško obravnavo bolnika.

Simptomi covid-19 so raznoliki, predvsem pa nespecifični in sorodni številnim respiratornim okužbam. Zato je laboratorijska diagnostika nujna, saj lahko odkrije in potrdi povzročitelja okužbe, virus SARS-CoV-2. Klinična in znanstvena spoznanja, ki jih je stroka dobila ob epidemiji SARS leta 2002, so pomembno vodila in pospešila razvoj diagnostičnih metod ob pandemiji covid-19. Leta 2002 so potrebovali kar pet mesecev za odkritje nukleotidnega zaporedja virusnega genoma SARS-CoV, kar je končno vodilo do razvoja metode verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR) ter dokazovanja povzročitelja okužb. V primeru SARS-CoV-2 je Center za kontrolo in preprečevanje bolezni (CDC) 13. januarja 2020 objavil, da je genom virusa SARS-CoV-2 dostopen v podatkovni bazi GenBank, prvo metodo za dokazovanje prisotnosti virusa pa so objavili tri dni kasneje (1, 2).

V prispevku predstavljamo in podajamo pomen ključnih laboratorijskih metod dokazovanja virusa SARS-CoV-2 in imunskega odziva nanj ter povzetek ostalih laboratorijskih parametrov, ki glede na trenutno poznavanje dopolnjujejo diagnostiko covid-19.

2 IMUNSKI ODZIV NA VIRUSNO OKUŽBO NA PRIMERU SARS-COV-2

Vstop virusa SARS-CoV-2 v celico poteče z receptorsko olajšano endocitozo virusnega delca, ki ji sledi zlitje virusne ovojnice z membrano endosoma. Posledica vstopa, dozorevanja virusa in sproščanja virusnih delcev je piroptoza, posebna oblika programirane celične smrti. Ta sproži aktivacijo okoliških celic epitelijske, endotelne in alveolarne ma-

krofagov, da izločajo kemokine in vnetne citokine, kar vodi v privabljanje monocitov, makrofagov in limfocitov na mesto vnetja v pljučih (3). Prvi odziv je torej aktivacija prirojenega imunskega odziva. Temu sledi aktivacija pridobljenega imunskega sistema, ki se pri bolnikih s covid-19 pokaže po enem tednu od nastopa simptomov (3). Aktivacija citotoksičnih limfocitov T vodi neposredno do smrti okužene celice, aktivirane dendritične celice in celice T pomagalka pa še dodatno aktivirajo tako citotoksične limfocite T kot tudi limfocite B. Sočasno izločajo vnetne citokine, potrebne za nadaljnjo rekrutacijo in aktivacijo imunskih celic, kar vodi do vzpostavitve povratne vnetne zanke. Aktivirani limfociti B posredujejo humoralno imunost v obliki specifičnih protiteles (4). Razvoj protiteles proti SARS-CoV-2 je načeloma hiter in v skladu z dinamiko virusnega bremena (3). Pri bolnikih s covid-19 so detektirali serokonverzijo (protitelesni imunski odziv) v prvem tednu po nastopu simptomov okužbe, najprej v obliki nizkoafinitetnih protiteles IgM, v drugem tednu so prevladala IgG, katerih titer je vrh dosegel do konca tretjega tedna (3, 5). V raziskavi na 285 bolnikih je Long s sodelavci pri vseh bolnikih dokazal specifična protitelesa v tretjem tednu od pojava simptomov covid-19 in potek serokonverzije na tri načine: IgM pred IgG, IgG sočasno z IgM in IgM za IgG. Koncentracija IgM oz. IgG je plato dosegla šest dni po serokonverziji, razlike med bolniki z najvišjo in najnižjo koncentracijo pa so bile kar do dvajsetkratne, ob čemer pa koncentracija ni nujno korelirala s kliničnimi znaki (6). Za dolgotrajno imunost proti SARS-CoV-2 so potrebna nevtralizacijska protitelesa, usmerjena proti površinskemu antigenom. V primeru SARS-CoV-2 je ključen antigen protein S, ki je odgovoren za vstop virusa v celice. Raziskave okužb s SARS-CoV v letih 2002 do 2003 so pokazale, da je za uspešno premagovanje virusa potreben preklon iz prirojene v pridobljeno imunost. Pri SARS-CoV so spominske limfocite T odkrili tudi še po dveh letih od prebolele okužbe, kar nakazuje, da je za nadzor in razrešitev okužbe s SARS-CoV potrebna celična imunost (3). V primeru SARS-CoV je visoka koncentracija protiteles pomenila ugodnejši potek bolezni in manj zapletov (4). Nasprotno so raziskave covid-19 pokazale, da visoke koncentracije protiteles v akutni fazi okužbe (prva dva tedna) lahko poslabšajo vnetje in vodijo v prizadetost organov preko s protitelesi posredovanega ojačanja imunskega odziva, kar naj bi po nekaterih raziskavah pomenilo težji klinični potek bolezni (3, 7). Poleg tega nevtralizacijska protitelesa pozitivno korelirajo z označevalcem vnetja CRP in negativno s številčno koncentracijo limfocitov ob sprejemu, starejši bolniki pa imajo višje titre nevtralizacijskih protiteles v primerjavi z mlajšimi, ki imajo tudi sicer ugod-



nejšo napoved (8). Trenutno še ni znano, ali preboleli ostanejo dolgotrajno odporni proti SARS-CoV-2 (3, 8).

3 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA VIRUSNIH OKUŽB

Diagnostika virusnih okužb poteka na dveh ravneh: neposredno z dokazovanjem prisotnosti virusa in posredno z merjenjem odziva imunskega sistema okužene osebe na virus. Prisotnost virusa v splošnem ugotavljamo z dokazovanjem virusnih nukleinskih kislin (RNA ali DNA), običajno z metodo verižne reakcije s polimerazo (PCR) ali PCR v realnem času. Osamitev virusov v celični kulturi je pred razvojem molekularnih preiskav predstavljala zlati standard v diagnostiki virusnih okužb, danes pa je predvsem zaradi zamudnosti in nižje analizne občutljivosti ter tudi večje ogroženosti laboratorijskega osebja nekoliko izgubila na pomenu. Virusne antigene določamo neposredno v kužnini ali po osamitvi v celični kulturi, običajno z metodo direktne imunofluorescence (DIF) ali z encimskoimunskimi metodami. V zadnjih letih so na voljo tudi testi za diagnostiko ob bolniku (POCT), ki delujejo na principu lateralne imunodifuzije, a izkazujejo bistveno nižjo analizno občutljivost (9, 10).

Serološke preiskave omogočajo oceno odziva okužene osebe na okužbo oziroma njenega imunskega statusa. Hemogram, rezultati biokemijskih preiskav in vnetni označevalci nam dajo vpogled v stanje organizma in omogočajo tudi napoved poteka bolezni. Z dokazovanjem prisotnosti specifičnih protiteles pa odkrijemo osebe, ki so okužbo prebolele in so pred ponovno okužbo morda tudi dolgotrajno zaščitene. Z dokazovanjem prisotnosti IgM ali IgG običajno razlikujemo med aktivno in prebolelo okužbo, vendar se prav pri SARS-CoV-2 to kaže za nezanesljivo. Dinamika nastajanja in persistence protiteles IgA v krvi je manj predvidljiva, zato jih v diagnostiki redkeje uporabljamo. Za določanje specifičnih protiteles v serumu najpogosteje uporabljamo imunske metode na trdnem nosilcu (npr. ELISA), aglutinacijske teste in metodo imunskega odtisa (11).

4 ZNAČILNOSTI DOBRE LABORATORIJSKE DIAGNOSTIČNE METODE

V vseh fazah razvoja, izdelave in uvajanja laboratorijske preiskave je vrednotenje pomembna osnova zagotavljanja

kakovostnih rezultatov. Vrednotimo lahko metodo, analizni komplet, rezultate ali celotno preiskavo, ki obsega metodo, reagentne in pripomočke, rezultate in učinkovitost postopka. Za vrednotenje metode so najpomembnejše meja detekcije (najmanjša zaznavna količina merjenja), analizna občutljivost (najmanjša zaznana sprememba množine merjenja) in analizna specifičnost (sposobnost določitve samo želenega merjenja v mešanici različnih snovi) (12).

Pri vrednotenju rezultatov je pomembna klinična učinkovitost: ali lahko z njimi ločujemo med skupinami zdravih in bolnih ter med skupinami bolnih s podobnimi boleznimi. Specifičnost rezultata ali diagnostično oz. klinično specifičnost izračunamo kot delež zdravih, pri katerih je rezultat testa normalen. Diagnostična oz. klinična občutljivost pa predstavlja delež bolnikov s patološkim rezultatom.

Vrednotenje analiznega kompleta je enako za uporabo v ročni ali avtomatizirani izvedbi. Imamo pa dodatne zahteve za uporabo v diagnostiki v primerjavi z uporabo za raziškovalne namene.

Vrednotenje preiskave sloni na pristopih vrednotenja zdravstvenih tehnologij, ki vključujejo tudi ekonomske in druge vidike (13), pri čemer je pomembno spremljanje vigilance medicinskih pripomočkov.

Pri metodah, ki temeljijo na imunokemijskih reakcijah, lahko analizna specifičnost predstavlja težavo zaradi heterogenosti pacientovih protiteles. Slednje vpliva tudi na vrednotenje rezultatov: imunski odziv sestavlja množica protiteles proti različnim mikrobnim antigenom in njihovim epitopom, na katere se vežejo z različnimi afinitetami. Tako z različnimi izvedbami metod zajamemo praviloma samo del protiteles in se zato lahko rezultati med seboj razlikujejo (14).

Diagnostična metoda je dobra, če z njo zaznamo klinično pomembna protitelesa (nanašajoč se na vrednotenje rezultatov) in lahko spremljamo že majhne spremembe v koncentracijah (nanašajoč se na vrednotenje metode).

5 LABORATORIJSKA DIAGNOSTIKA COVID-19

5.1 BIOKEMIJSKI LABORATORIJSKI PARAMETRI OB OKUŽBI S SARS-COV-2

Klinične značilnosti covid-19 so široko opredeljene (15), medtem ko reprezentativni nabor laboratorijskih parametrov še vedno postavljajo. Laboratorijska medicina igra bistveno

vlogo pri zgodnjem odkrivanju in diagnozi covid-19, več parametrov pa kaže tudi napovedno vrednost.

Dosedanje metaanalize kažejo, da z laboratorijskimi analizami dobro opredelimo potek bolezni pri bolnikih, ki potrebujejo obravnavo v intenzivni negovalni enoti, slabše pa pri tistih, ki imajo blažji potek bolezni. Zhang in sod. v svoji raziskavi na 140 bolnikih s covid-19 (58 s hudim potekom) ugotavljajo bistveno višje vrednosti D-dimera (razgradnega produkta fibrina), CRP in prokalcitonina pri bolnikih s hudo boleznijo v primerjavi s tistimi z blažjo obliko (16). V raziskavi z 41 bolniki s covid-19 (13 s hudo boleznijo) so bili pomembni napovedni dejavniki sprejema na oddelek: levkocitoza, nevtrofilija, limfopenija, protrombinski čas, D-dimer, albumin, ALT, celotni bilirubin, LDH in prokalcitonin, katerega vrednosti so bile povišane pri 25 % bolnikov, sprejetih na intenzivno enoto, medtem ko pri bolnikih z blagim potekom ni bil povišan (17).

Povzamemo lahko, da so najpogostejše spremembe prisotne pri naslednjih parametrih: limfopenija (35–75 % primerov), povišane vrednosti CRP (75–93 % primerov), LDH (27–92 % primerov), sedimentacija eritrocitov (do 85 % primerov) in D-dimer (36–43 % primerov), nizke koncentracije albumina v serumu (50–98 % primerov) in hemoglobina (41–50 %) ter vnetni citokini, ki lahko privedejo do citokinske nevihte (18, 19). V preglednici 1 je povzetek kandidatnih parametrov, ki bi lahko služili kot klinični napovedni dejavniki za resnost bolezni ali smrtni izid covid-19 in bi jih uporabljali v stratifikacijskih modelih. V prihodnosti bo potrebno analizirati bazo bolnikov z različnim potekom in izidom bolezni in na ta način ugotoviti pomen posameznega parametra. Zelo pomembne bi bile tudi vrednosti omenjenih parametrov v skupini umrlih. Večino dosedanjih raziskav so naredili na populaciji vzhodne Azije,

predvsem Kitajske, v prihodnosti pa pričakujemo tudi rezultate iz evropskih in ameriških raziskav. Šele medsebojna primerjava rezultatov bo presegla morebitni odklon zaradi razlik v rasi in pomenila nepristransko oceno pomena nekoga parametra.

5.2 DOKAZOVANJE PRISOTNOSTI OKUŽBE: VIRUSNA RNA IN VIRUSNI ANTIGENI

Za zgodnje in neposredno prepoznavanje okužbe z virusom SARS-CoV-2 uporabljamo metode, ki jih uvrstimo v dve kategoriji. V prvi so metode, ki zaznajo virusno RNA, v drugi pa tiste, ki zaznajo virusne antigene. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) in Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (ECDC) trenutno priporočata predvsem uporabo metod iz prve kategorije, ki temeljijo na uporabi verižne reakcije s polimerazo v realnem času s predhodno reverzno transkripcijo (RT-qPCR), s katero pomnožimo in kvantificiramo odseke virusnega genetskega materiala v vzorcu preiskovanca (slika 1). Kot pozitivni kontrolni vzorec uporabljamo standardizirano koncentracijo specifičnega zaporedja RNA SARS-CoV-2, za negativno kontrolo pa vodo brez RNaz in DNaz in negativni vzorec izolacije RNA, ki ga pripravimo iz neuporabljene palčke za odvzem brisa. S testi določimo enega ali več tarčnih genov v genomu SARS-CoV-2, kot so geni E, N, S (kodirajo različne proteine, ki se nahajajo na površinski ovojnici) in RdRp (kodira virusno od RNA odvisno RNA-polimerazo). Za metode določanja SARS-CoV-2, ki temeljijo na RT-qPCR, sta značilni visoki analiza specifičnost (97–100 %) in analiza občutljivost, saj z njima zaznamo zelo nizko

Preglednica 1: Povzetek sprememb laboratorijskih parametrov pri bolnikih s težjo oz. usodno obliko covid-19 (16–19).

Table 1: Summary of changes in laboratory parameters in patients with severe covid-19 illness (16–19).

Hemogram	Biokemija	Vnetni označevalci
↑ število levkocitov ↑ število nevtrofilcev ↓ število limfocitov ↓ število trombocitov ↓ število eozinofilcev ↓ hemoglobin	↓ albumin ↑ alanin aminotransferaza ↑ aspartat aminotransferaza ↑ bilirubin, celotni ↑ sečnina ↑ kreatinin ↑ kreatin kinaza ↑ laktat dehidrogenaza ↑ mioglobin ↑ kreatin kinaza-MB ↑ srčni troponin I	↑ hitrost sedimentacije eritrocitov ↑ CRP ↑ serumski feritin ↑ prokalcitonin ↑ IL-2R ↑ IL-6 ↑ IL-8 ↑ IL-10
Koagulacija		
↑ protrombinski čas ↑ D-dimer		

koncentracijo virusne RNA (meja detekcije nekaterih testov je 1 do 10 kopij virusne RNA/reakcijo) (20). Nekoliko bolj problematična je klinična občutljivost, saj s testom zaradi variabilnih količin virusa (t. i. virusnega bremena) v zgornjih dihalih v posameznih stopnjah okužbe ali neustrezno odvzetega vzorca nekaterih okuženih posameznikov ne znamo. Prisotnost virusa najpogosteje ugotavljamo v vzorcih zgornjih dihal, kot sta bris ali izpirek nosno-žrelnega predela ali žrela, saj je odvzem teh najenostavnejši. Vendar pa v raziskavah ugotavljajo, da je virusno breme v prvih dveh tednih po okužbi največje v spodnjih dihalih, zato so analize na vzorcih spodnjih dihal, kot sta sputum in bronhoalveolarni izpirek, bolj zanesljive. Zbiranje teh je težavnejše, obstaja opa tudi večja možnost nastanka aerosola in posledično prenosa okužbe (21, 22). Kljub prisotni okužbi je tako test lahko negativen, če je v času vzorčenja virusno breme nizko. V primeru, da pri pacientu obstaja utemeljen sum na okužbo, je priporočljivo ponovno testiranje, ki ga, če je to le možno, izvedemo na vzorcu iz spodnjih dihal (22). Celoten analizi postopek skupaj z izolacijo virusne RNA iz vzorca traja od 3 do 5 ur, za izvedbo je potrebna posebna laboratorijska oprema. Pospešeno razvijajo metode, ki bi omogočile hitrejšo in enostavnejšo izvedbo analize. Zanimive so metode za detekcijo virusne RNA, ki temeljijo na mehanizmu z zanko posredovanega izotermnega pomnoževanja z reverzno transkripcijo (RT-LAMP), in metode, ki temeljijo na uporabi tehnologije CRISPR/Cas. Pri slednji encim Cas12 ali Cas13 hkrati cepi virusno RNA in fluorescentno označene sonde. To vodi v porast fluorescence vzorca, ki jo zaznamo. Kot RT-qPCR so v večini primerov tudi te metode sposobne zaznati zelo nizke koncentracije virusne RNA – meja detekcije ene izmed metod CRISPR/Cas SARS-CoV-2 je denimo 6,75 kopij RNA/mL transportnega medija (23). Analize potekajo pri nespremenjeni temperaturi, zato za izvedbo ne potrebujemo drage opreme. Nekatere metode omogočajo zaznavo rezultata s prostim očesom. Običajno so hitrejše, saj omogočajo

pridobitev rezultata v manj kot eni uri. Zato so te metode primerne tudi za razvoj hitrih testov (21).

5.3 POTRJEVANJE IMUNSKEGA ODZIVA NA OKUŽBO: MERJENJE PROTITELES

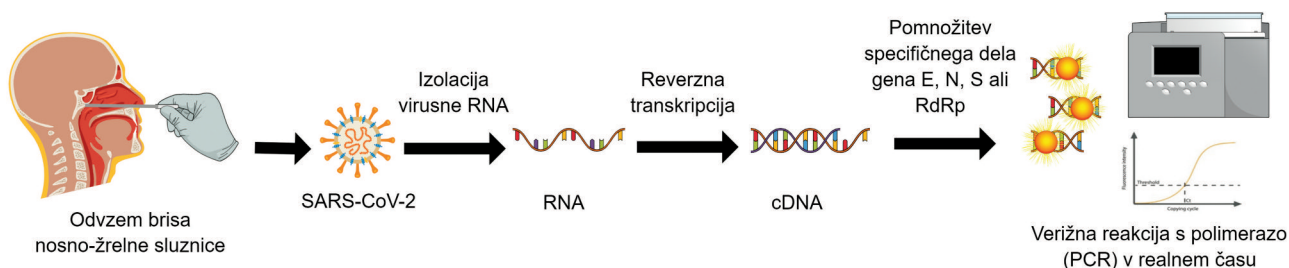
Glede na naše trenutno znanje o virusu SARS-CoV-2 in odzivu imunskega sistema nanj je serološko testiranje na protitelesa proti SARS-CoV-2 uporabno:

1. za posredni dokaz akutne okužbe in ugotavljanje prebolele okužbe,
2. za določitev prevalence virusa v določeni populaciji,
3. za identifikacijo posameznikov, ki so razvili močan protitelesni imunski odziv na okužbo in bi lahko bili darovalci rekonvalescentnega seruma za terapijo,
4. za bazične raziskave imunskega odziva ob okužbi s SARS-CoV-2 in razvoj cepiv ter
5. za določitev posameznikove odpornosti (imunosti) na SARS-CoV-2.

Za dokazovanje prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 so danes na trgu številni analizi kompleti, ki temeljijo na encimskoimunski tehniki na trdnem nosilcu ali imunokromatografiji.

5.3.1 Encimskoimunske metode na trdnem nosilcu (ELISA)

ELISA je biokemijska metoda, ki jo v imunologiji uporabljamo za detekcijo protiteles ali antigenov v vzorcu. Temelji na specifični interakciji med antigenom (npr. protein virusne ovojnice) in protitelesom v serumu preiskovanca (slika 2). V primeru okužbe s SARS-CoV-2 metodo ELISA uporabljamo predvsem za določanje prisotnosti protiteles IgG in IgM pri bolniku, lahko pa tudi za določanje protiteles IgA in celokupnih protiteles (3,4). Kot antigene v imunoloških me-



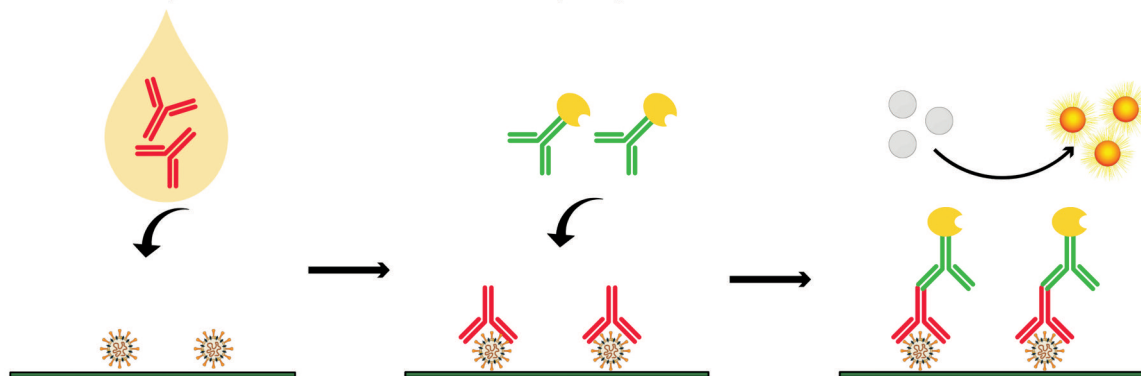
Slika 1: Metoda RT-qPCR za določanje prisotnosti virusne RNA v vzorcu nosno-žrelnega brisa preiskovanca.

Figure 1: RT-qPCR method for detection of viral RNA in a sample of nasopharyngeal swab.

Nanos seruma preiskovanca

Nanos detekcijskih protiteles

Nanos substrata



Legenda



Virusni antigen



Protitelesa proti SARS-CoV-2 v serumu



Sekundarna, z encimom označena protitelesa



Substrat



Obarvan produkt

Slika 2: Princip metode ELISA za določanje prisotnosti protiteles IgG in IgM v serumu preiskovanca s prisotno okužbo s SARS-CoV-2.
Figure 2: Principle of ELISA method for detection of IgG and IgM antibodies against SARS-CoV-2 in a serum sample.

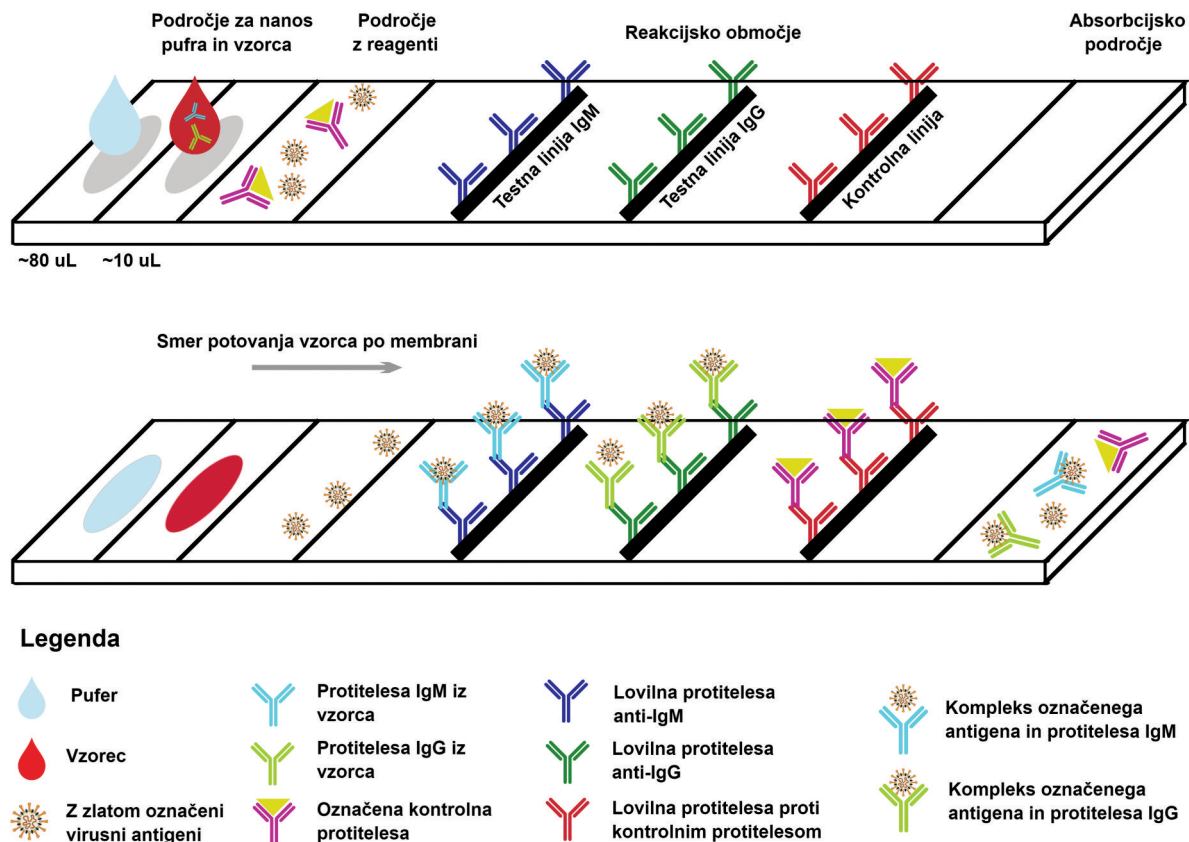
today we use different surface proteins SARS-CoV-2. Most often it is a recombinant protein of the nucleocapsid (N) or «spike» protein (its surface domain S1 or domain for receptor binding (RBD)), above all the RBD domain would be significant for SARS-CoV-2, as it is important for distinguishing the new coronavirus strain from previous ones (24, 25). When using these proteins as antigens, it is necessary to be aware of potential cross-reactivity of the tested antibodies against common circulating alpha- (NL63 and 229E) and betacoronavirus (OC43 and HKU1), which are present in our space. Even around potential cross-reactivity, it is currently the most common concern regarding the specificity of serological testing for antibodies against SARS-CoV-2 (24, 26).

In individual cases with asymptomatic COVID-19 infection, antibodies against SARS-CoV-2 are not always detectable in the first seven days after the appearance of symptoms. In most hospitalized patients, we detect IgG antibodies 14 days, certainly up to 28 days after the appearance of symptoms (25). Due to this, the effectiveness of serological methods for appropriate COVID-19 diagnosis is very limited. When can we detect the presence of antibodies against SARS-CoV-2, it depends on the individual's immune response and on the analytical sensitivity of the used method. Antibody response is not suitable for evaluation, but the tested person is either positive or negative at the given moment. In reliable, appropriately validated serological methods, a negative result indicates the absence of previous exposure

to the virus or to the absence of an immune response: the person could have been exposed to the virus, but seroconversion has not yet occurred or it has occurred in a smaller amount, so antibodies in the blood (yet) cannot be detected. Conversely, a positive test result for antibodies against SARS-CoV-2 means either acute or past infection (24). The effectiveness of the ELISA method, which is used by some Slovenian laboratories, shows 99,81% clinical specificity (95% confidence interval) and 88,1% or 100% clinical sensitivity (95% confidence interval), if the samples were tested seven or fourteen days after confirmed infection with PCR (26).

5.3.2 Imunokromatografske metode

Immunochromatographic methods (*lateral flow immunoassays*) are usually qualitative (they give the result as presence or absence of infection), in some cases they can also be semi-quantitative (they give the result in concentration ranges). The advantages of the methodology enable the preparation of a complete analysis kit, which is portable, easy to use, and simple to use, so it can be used for testing of patients (POCT) or for self-testing (i.e. rapid tests). For analysis, a small amount of sample (usually a drop of capillary blood) is needed, and the result can be obtained within 10 to 30 minutes (26). They are relatively accessible, so the use of these tests is increasing. Among rapid tests for the detection of SARS-CoV-2, the most developed immunochromatographic tests



Slika 3: Princip imunokromatografske metode (hitri test) za določanje protiteles IgG in IgM v krvi, serumu ali plazmi preiskovanca, okuženega s SARS-CoV-2.

Figure 3: Principle of immunochromatographic method (rapid test) for detection of IgG and IgM antibodies against SARS-CoV-2 in a blood, serum or plasma sample.

za določanje protivirusnih protiteles (IgM in IgG) v polni kapilarni krvi, serumu ali plazmi (slika 3) (29).

Na podoben način delujejo tudi hitri imunokromatografski testi za določanje virusnih antigenov v nosno-žrelnem brisu v stanju aktivne okužbe. Edina razlika je, da se po nanosu vzorca na testni listič virusni antigen iz vzorca veže na označena monoklonska protitelesa proti SARS-CoV-2 na ploščici.

Hitri testi za dokazovanje prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 so v nekaj mesecih od pojava covid-19 dobesedno preplavili vse svetovne trge. Stroka na (samo)testiranje s trenutno dostopnimi hitrimi testi gleda kritično, saj ti testi v mnogih primerih niso mednarodno preizkušeni. Obstaja namreč velika verjetnost za lažno negativne rezultate, ko je količina prisotnih protiteles oz. antigena pod pragom detekcije, ali lažno pozitivne rezultate v primeru pretekle okužbe z drugo vrsto koronavirusa (SARS-CoV, MERS-CoV).

6 OD RAZVOJA DIAGNOSTIČNE METODE DO TRGA IN POSAMEZNIKA

Laboratorijske metode, reagenti in pripomočki morajo biti skladni z evropsko zakonodajo na tem področju (oznaka CE) in validirani kot diagnostični medicinski pripomoček *in vitro* (oznaka IVD). Vrednotenje za diagnostiko je predpisano z Direktivo 93/42/EGS o medicinskih pripomočkih (MDD), Uredbo EU 2017/746, z zakonom (ZMedPri, 2009) in Pravilnikom o medicinskih pripomočkih (UL 37/10 in 66/12). Število molekularnih testov, ki prihajajo na tržišče, iz dneva v dan narašča. Do 20. maja 2020 je bilo na seznamu fundacije FIND (neprofitna organizacija, ki spodbuja inovacije in razvoj diagnostike) kar 269 metod RT-qPCR.

V Sloveniji so ob izbruhu pandemije molekularne diagnostične metode za prisotnost virusa SARS-CoV-2 v vzorcih

zgornjih dihal izvajali Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani (IMI) in Klinika Golnik.

Z začetkom nacionalne raziskave covid-19 so na IMI začeli tudi z uporabo metode ELISA za določanja protiteles IgG in IgA, ki so jo izbrali na konsenzu evropskih strokovnjakov glede na najboljše izkazane parametre občutljivosti in specifičnosti med takrat dostopnimi metodami. Imunokromatografski hitri testi za določanje prisotnosti protiteles proti SARS-CoV-2 so v Sloveniji zaenkrat namenjeni samo strokovni uporabi. Nekateri že izpolnjujejo zahteve standarda ISO 13485, s katerim proizvajalci medicinskih pripomočkov dokazujejo usklajenost sistema kakovosti in izpolnjevanje dela zahtev MDD. 20. maja 2020 je bilo v bazi FIND 122 na trgu dostopnih imunokromatografskih analiznih kompletov za detekcijo protiteles proti SARS-CoV-2 z oznako CE-IVD (20). Pričakovati je, da bodo za samotestiranje dostopni tudi v Sloveniji. Dokler ni poznana narava imunskega odziva in ni potrjena trajna imunost, je pomen rezultatov prisotnih IgG in IgM omejen. Hkrati velja opozoriti, da je na trgu tudi veliko hitrih testov nepreverjenih proizvajalcev, ki so neakovostni in vodijo do lažno negativnih ali lažno pozitivnih rezultatov. Dokler hitri imunokromatografski testi ne bodo ustrezno ovrednoteni, WHO odsvetuje njihovo uporabo v klinični praksi, spodbuja pa njihov razvoj, izboljševanje in preverjanje kakovosti (30).

7 IMUNSKI POTNI LIST

Pristop (samo)izolacije v obdobju pandemije covid-19 se je izkazal kot učinkovita strategija, ki omogoča relativno dobro preživetje v splošni populaciji, vendar ne brez posledic. V želji po čimprejšnjem zagonu gospodarstva in drugih aktivnostih se je pojavila ideja o imunskem potnem listu (*Immunity Passport*), izdanem na osnovi rezultatov testiranja. Potni list bi dovoljeval prosto gibanje in vrnitev na delovno mesto, saj bi zagotavljal, da lastnik ni več kužen, je pa odporen proti ponovni okužbi z virusom SARS-CoV-2. Zaradi številnih predanaliznih in analiznih dejavnikov, ki vplivajo na zanesljivost rezultatov trenutno dostopnih testov in relativno slabega poznavanja koncentracijske dinamike protiteles so se pojavile kritike takšnega pristopa. Izdaja imunskega potnega lista osebi s spregledano kužnostjo bi pomenila novo grožnjo za zdravje ljudi, iz etičnega vidika pa je na mestu tudi pomislek o privilegiranosti oseb z imun-

skim potnim listom (31). Čeprav je nekaj držav predlagalo uvedbo imunskega potnega lista (Čile, Nemčija, Italija, VB, ZDA itd.), v digitalni ali fizični obliki, pa WHO temu nasprotuje (32). Stališče WHO je, da trenutna testiranja ne morejo zagotavljati točnih rezultatov za izdajo imunskega potnega lista, vendar se lahko razmere z dvigom kakovosti testov in novih spoznanj o trajanju imunosti spremenijo.

8 SKLEP

Razvoj in uporaba sodobnih molekularnih tehnik danes omogočata hiter odziv na pojav nove okužbe v družbi in pravilno identifikacijo praktično katere koli vrste virusa ali bakterije. Večji izziv ostajajo serološke metode dokazovanja protiteles, tako z vidika validacije metode kot uporabne vrednosti rezultatov. V nekaj mesecih bo razvoj kakovostnih hitrih testov nedvomno doprinesel k učinkovitejši obravnavi bolnikov s covid-19 v morebitnem drugem valu epidemije, ki ga epidemiologi napovedujejo jeseni oziroma pozimi 2020. Ne glede na kakovost metod oz. zanesljivost rezultatov bosta ključnega pomena učinkovito sodelovanje med zdravniško stroko in zdravstvenimi delavci v laboratoriju ter ustrezna interpretacija rezultatov diagnostičnih metod skupaj s klinično sliko bolnika in lastnostmi analiziranega vzorca (bris ali kri, čas po nastopu simptomov). Resnost bolezni namreč ni odvisna samo od vrste virusa in virusnega bremena, temveč tudi od individualnih lastnosti imunskega odziva posameznika.

9 LITERATURA

1. Center for Disease Control and Prevention. Novel Coronavirus 2019 (nCoV-2019), Wuhan, China. [cited 2020 21.5.]; Available from: <https://web.archive.org/web/20200114084712/https://www.cdc.gov/coronavirus/novel-coronavirus-2019.html>
2. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020 Jan;25(3).
3. Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immun.* 2020 2020/04/28.
4. Nikolich-Zugich J, Knox KS, Rios CT, Natt B, Bhattacharya D, Fain MJ. SARS-CoV-2 and COVID-19 in older adults: what we



- may expect regarding pathogenesis, immune responses, and outcomes. *Geroscience*. 2020 0:1-10.
5. di Mauro G, Cristina S, Concetta R, Francesco R, Annalisa C. SARS-Cov-2 infection: Response of human immune system and possible implications for the rapid test and treatment. *Int Immunopharm*. 2020 Apr 16;84:106519.
 6. Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, Wu G-C, Deng K, Chen Y-K, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nat Med*. 2020 2020/04/29.
 7. Zhao J, Yuan Q, Wang H, Liu W, Liao X, Su Y, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *medRxiv*. 2020:2020.03.02.20030189.
 8. Wu F WA, Liu M. Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. *medRxiv*. [cited 2020 25.5.]; Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2020.03.30.20047365v2.full.pdf>
 9. Charlton CL, Babady E, Ginocchio CC, Hatchette TF, Jerris RC, Li Y, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Viruses Causing Acute Respiratory Tract Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jan;32(1).
 10. Petrovec M. Mikrobiološka diagnostika in epidemiologija virusnih okužb dihal. Infekcijske bolezni v pediatriji. Zbornik predavanj. 2011:31-42.
 11. Hodinka R. Serologic Tests in Clinical Virology. In: Jerome KR, editor. *Lenette's Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. Informa Healthcare. 2016:133-50.
 12. Bureau International des Poids et mesures. *International Vocabulary of Metrology – Basic and General Concepts and Associated Terms* 20.5.2020]. Available from: <https://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html>
 13. Evropska komisija. Ocena zdravstvenih tehnologij [cited 2020 20.5.]; Available from: https://ec.europa.eu/health/technology_assessment/overview_sl.
 14. Božič B, Marc J, Lukač-Bajalo J. Merjenje imunosti: od molekule do bolnika. Enodnevno podiplomsko izobraževanje iz laboratorijske biomedicine. UL-Fakulteta za farmacijo, Ljubljana; 2007.
 15. Mattiuzzi C, Lippi G. Which lessons shall we learn from the 2019 novel coronavirus outbreak? *Ann Trans Med*. 2020;8(3):48.
 16. Zhang J-j, Dong X, Cao Y-y, Yuan Y-d, Yang Y-b, Yan Y-q, et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*. 2020 2020/02/19;n/a(n/a).
 17. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet* (London, England). 2020.
 18. Liu Y, Yang Y, Zhang C, Huang F, Wang F, Yuan J, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Science China Life Sciences*. 2020 2020/03/01;63(3):364-74.
 19. Brandon Michael H, Maria Helena Santos de O, Stefanie B, Mario P, Giuseppe L. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med*. 2020(0):20200369.
 20. FIND. 2020 [cited 2020 20.5.]; Available from: <https://www.finddx.org/covid-19/sarscov2-eval-molecular/molecular-eval-results/>
 21. Udagama B, Kadhiresan P, Kozłowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano*. 2020 2020/04/28;14(4):3822-35.
 22. WHO. Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases 2020 [cited 2020 21.5.]; Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331329/WHO-COVID-19-laboratory-2020.4-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 23. Instructions for Use Sherlock CRISP/Cas SARS-CoV-2 Kit. Sherlock Bioscience. Available from: <https://www.fda.gov/media/137746/download>
 24. Theel ES, Slev P, Wheeler S, Couturier MR, Wong SJ, Kadkhoda K. The Role of Antibody Testing for SARS-CoV-2: Is There One? *J Clin Microbiol*. 2020:JCM.00797-20.
 25. Torres R, Rinder HM. Double-Edged Spike—Are SARS-CoV-2 Serologic Tests Safe Right Now? *Lab Med*. 2020;51(3):236-8.
 26. Elecsys Anti-SARS-CoV-2. Roche Diagnostics [cited: 2020 20.5]. Available from: <https://www.fda.gov/media/137605/download>
 27. Infantino M, Damiani A, Gobbi FL, Grossi V, Lari B, Macchia D, et al. Serological Assays for SARS-CoV-2 Infectious Disease: Benefits, Limitations and Perspectives. *IMAJ*. 2020;22(4):203-10.
 28. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. *Essays Biochem*. 2016 Jun 30;60(1):111-20.
 29. Carter LJ, Garner LV, Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci*. 2020 May 27;6(5):591-605.
 30. WHO. Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19. 2020 [cited 2020 22.5.]; Available from: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>.
 31. Phelan AL. COVID-19 immunity passports and vaccination certificates: scientific, equitable, and legal challenges. *Lancet*. 2020 May 4; 395(10237):1595-1598.
 32. WHO. Immunity passports in the context of COVID-19. [cited: 2020 20.5]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail/immunity-passports-in-the-context-of-covid-19>