

Ельчанинова Т.И., Войчишина С.Е, Тавокина Т.В.
Лабораторная диагностика коронавирусной болезни

Коронавирусы являются представителями семейства Coronaviridae из отряда Nidovirales, подсемейства Coronavirineae и способны вызывать респираторные заболевания. Первый коронавирус был открыт в 1931 году (вирус инфекционного бронхита, IBV – Infectious bronchitis virus) или коронавирус птиц, а в 1965 году открыты коронавирусы человека (HCoV – Human Coronaviruses).

До настоящего времени были идентифицированы шесть коронавирусов человека (HCoV), а именно HCoV-229E, HCoV-NKU1, HCoV-OC43, HCoV-NL63, а также вирусы, которые относятся к особо опасным SARS-CoV (коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома) и MERS-CoV (коронавирус ближневосточного респираторного синдрома).

Лабораторная диагностика коронавирусной болезни включает специфические, гематологические, коагулологические, общеклинические, биохимические и иммунологические тесты.

Подтверждение заболевания COVID-19 основывается на выявлении: вирусной нуклеиновой кислоты (РНК) и антител против вируса, возникающих в организме и вирусного антигена.

Специфическое тестирование на заболевание (коронавирусная болезнь 2019 -COVID-19) и связанный с ней вирус SARS-CoV-2 возможно двумя основными методами: молекулярное распознавание и серологическое тестирование.

Молекулярные методы используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) наряду с тестами на нуклеиновые кислоты и другими передовыми аналитическими методами для обнаружения генома вируса. Один из ранних тестов ПЦР был разработан в Берлине в январе 2020 года с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

в реальном времени (ОТ-ПЦР, RT-PCR) и лег в основу 250 000 наборов для распространения Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ).

ОТ-ПЦР (обратная транскриптаза - полимеразная цепная реакция).

Для диагностики использовали RdRP и E ген, где E выступал в качестве инструмента первой линии, а анализ гена RdRp - в качестве подтверждающего. Все анализы были высокочувствительными и специфичными, не реагировали перекрестно с другими коронавирусами, а также с клиническими образцами человека, которые содержали респираторные вирусы. Выявление РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией включает в себя три этапа: экстракцию РНК из образцов исследуемого материала, реакцию обратной транскрипции и амплификацию участка кДНК данного коронавируса с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, которая производится непосредственно в ходе ПЦР.

Несмотря на высокую чувствительность и специфичность этого метода, он имеет некоторые ограничения. Так, несколько последовательных отрицательных результатов тестирования совсем не исключают возможности наличия инфекции. К появлению ложноотрицательных результатов может привести ряд факторов: низкое качество образцов; образец был взят слишком рано или слишком поздно в течение заболевания; не были соблюдены необходимые требования при обращении с образцом или в ходе его транспортировки и технические факторы, связанные с выполнением теста.

Метод обнаружения коронавируса на основе микрочипов, является быстрым анализом, с высокой пропускной способностью. Принцип метода состоит в том, что с помощью обратной транскриптазы РНК коронавируса продуцирует кДНК, меченную специфическими зондами. Затем эти меченные кДНК помещаются в лунки и гибридизуются с твердофазными олигонуклеотидами, закрепленными на микрочипе с последующей промывкой для удаления свободных ДНК. В результате РНК коронавируса может быть выявлена путем исследования специфических зондов

Уникальная технологическая платформа компании Randox позволяет, используя технологию Biochip проводить экспресс-анализ SARS-CoV-2, обрабатывая одновременно 54 образца пациентов, представляя результаты 540 анализов в течение 5 часов на анализаторе Evidence Investigator.

Выявление вирусной РНК является единственной методикой, которую на данный момент акцептирует как Всемирная организация здравоохранения (WHO), так и Европейский центр профилактики и контроля заболеваний (ECDC).

Биологическим материалом для исследования являются: материал, полученный при взятии мазка из носоглотки и ротоглотки, промывные воды бронхов, полученные при фибробронхоскопии (бронхоальвеолярный лаваж), (эндо)трахеальный, назофарингеальный аспират, мокрота, цельная кровь, кал (при кишечной дисфункции), биопсийный или аутопсийный материал легких.

Серологическое тестирование использует ELISA антитела тесты — наборы для обнаружения присутствия антител иммунной системы против вируса. Иммуноанализ с использованием тест-полосок может обеспечить быстрое качественное обнаружение антител для скрининга с последующим проведением подтверждающих тестов. Время проведения с использованием этих тест-полосок от 15 до 20 минут, что значительно меньше по сравнению с использованием ОТ-ПЦР.

Тест на антитела определяет реакцию организма на вирус, для развития которой необходимо определенное время. Согласно данным последних исследований, антитела к коронавирусу появляются через 10 дней после появления симптомов заболевания. Поскольку в течение всего этого времени пациент инфекционно опасен, ясно, что тест на антитела не подходит для ранней диагностики заболевания и принятия решения относительно необходимости карантина. Тем не менее, как ВОЗ, так и ECDC признали, что выявление антител может потребоваться для проведения дальнейших эпидемиологических исследований.

Антитела Ig-M- указывают на то, что человек в данный момент является носителем коронавирусной инфекции. Чувствительность теста-96%, это значит, что в 4% случаев возможен ложно отрицательный результат. Специфичность 100% т.е. если нет коронавируса, то тест не покажет положительный результат. IgA- подтверждающий анализ контрольных образцов после заражения, подтвержденных методом ПЦР указывает на начало иммунной реакции; не рекомендуется для скрининга из-за ограниченной специфичности около 90% в контрольных группах. Антитела Ig-G- указывает на то, что человек уже переболел коронавирусной инфекцией. Чувствительность теста-96%, это значит, что в 4% случаев возможен ложно отрицательный результат. Специфичность 100% т.е. если нет коронавируса то тест не покажет положительный результат.

Выявление антител к SARS-CoV-2 имеет вспомогательное значение для диагностики текущей инфекции и основное для оценки иммунного ответа на текущую или перенесенную инфекцию. Антитела класса А (IgA) начинают формироваться и доступны для детекции примерно со 2 дня от начала заболевания, достигают пика через 2 недели и сохраняются длительное время. Антитела класса М (IgM) начинают выявляться примерно на 7-е сутки от начала заражения, достигают пика через неделю и могут сохраняться в течение 2-х месяцев и более. Примерно с 3-й недели или ранее определяются антитела класса G (IgG) к SARS-CoV-2. Особенностью иммунного антительного ответа на инфекцию SARS-CoV-2 является небольшой временной промежуток между появлением антител IgM и IgG, а иногда и одновременное их формирование. С целью диагностики COVID-19 рекомендуется проведение раздельного тестирования на антитела класса IgM/IgA и IgG, а также мониторинг появления антител в динамике (детекция сероконверсии) — повторное тестирование в неясных случаях через 5-7 дней

Предлагаемые экспресс-тесты для выявления антигена, как правило, имеют очень низкую чувствительность по сравнению с методом выявления вирусной РНК, что дает много ложноотрицательных результатов.

Их использование скорее принесет больше вреда, чем пользы – многие инфекционно опасные пациенты с COVID-19, чьи тесты дали ложноотрицательные результаты, могут прекратить карантин. Фактически это означает, что в дополнение к перепроверке немногочисленных позитивных результатов в фазе выздоровления, появится необходимость проверить повторно много ложноотрицательных результатов, чтобы получить адекватную картину. Культивирование вируса. ВОЗ не рекомендует культивирование вируса в качестве рутинной диагностической процедуры.

Общая лабораторная диагностика включает:

- обязательный общий анализ крови с определением числа тромбоцитов;
- биохимические исследования крови (мочевина, креатинин, электролиты, печеночные ферменты, билирубин, глюкоза, альбумин). Биохимический анализ крови не дает какой-либо специфической информации, но обнаруживаемые отклонения могут указывать на наличие органной дисфункции. Они имеют определенное прогностическое значение, оказывают влияние на выбор лекарственных средств и/или режим их дозирования.
- газы артериальной крови с определением PaO_2 , $PaCO_2$, pH, бикарбонатов, лактата;
- коагулограмму (ПВ, АЧТВ) для пациентов с признаками острой дыхательной недостаточности; D-димер (важно увеличение более 1000 нг/мл),
- С-реактивный белок (> 10 мг/мл)., прокальцитонин, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , TNF- γ .

Биологическим материалом для исследования являются: клетки, полученные при взятии мазка из носоглотки и ротоглотки, промывные воды бронхов, фибробронхоскопический материал, назофарингеальный аспират, мокрота, цельная кровь, кал (при кишечной дисфункции), биопсийный или аутопсийный материал легких.

Таким образом, комплексное лабораторное обследование, включающее специфические и неспецифические методы, позволяет своевременно

поставить диагноз и начать адекватную терапию. Важнейшим условием успешного выявления вирусов является правильный сбор клинического материала и его своевременная доставка в лабораторию.

Литература

- 1.P. Huang, H. Wang, Z. Cao, et al., A rapid and specific assay for the detection of MERS-CoV, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1101.
- 2.S.B. Jiang, S. Xia, T.L. Ying, et al., A novel coronavirus (2019-nCoV) causing pneumoniaassociated respiratory syndrome, *Cell. Mol. Immunol.* (2020), <https://doi.org/10.1038/s41423-41020-40372-41424>.
- 3.Xinhua (2020) Chinese researchers develop rapid antibody test kit for coronavirus. 21 Feb 2020. Available at: http://www.xinhuanet.com/english/2020-02/21/c_138805748.htm (accessed 09 Mar 2020).
- 4.Corman V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR //Eurosurveillance. – 2020. – Т. 25. – №. 3. – 25(3). doi: 10.2807/1560-7917.ES
- 5.Wu P. et al. Real-time tentative assessment of the epidemiological characteristics of novel coronavirus infections in Wuhan, China, as at 22 January 2020 //Eurosurveillance. 2020. Т. 25. №.3.