



## **Νέος Κορωνοϊός SARS-CoV-2 (COVID-19): Μέθοδοι διάγνωσης και ανάπτυξη ανοσίας**

Η εργαστηριακή επιβεβαίωση με αξιόπιστες και επικυρωμένες μεθόδους ανάλυσης αποτελεί το “gold standard” για τη διάγνωση των περισσότερων ασθενειών. Εντούτοις, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που έχουμε να κάνουμε με την αναγνώριση μιας νέας μεταδοτικής νόσου (όπως στην περίπτωση της COVID-19), μπορεί να μην υπάρχουν μέθοδοι με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα που να μπορούν με ακρίβεια και επαναληψιμότητα να διαχωρίζουν τα μολυσμένα άτομα από τα υγιή. Είναι σημαντικό να σημειώσουμε ότι η κλινική κρίση, η οποία συνήθως συμπεριλαμβάνει την πιθανότητα μόλυνσης με βάση τον κίνδυνο έκθεσης και με ανασκόπηση των κλινικών σημείων και συμπτωμάτων, είναι κρίσιμης σημασίας για την κατανόηση μιας μολυσματικής νόσου, όπως η COVID-19 και την αναγνώριση των πασχόντων από αυτή.

Υπάρχουν δύο γενικοί τύποι αναλύσεων για μολυσματικές νόσους – εκείνοι που ανιχνεύουν τον ίδιο το μολυσματικό παράγοντα (π.χ. τεχνικές PCR για ιικό RNA) κι εκείνοι που ανιχνεύουν την αντίδραση του ξενιστή (του ατόμου) στο μολυσματικό παράγοντα (π.χ. ορολογικές τεχνικές ανίχνευσης ειδικών αντισωμάτων). Σήμερα υπάρχουν σε προσφορά και οι δύο τύποι αναλύσεων για τη νόσο COVID-19.

### **Ανίχνευση του ιικού RNA**

Τα πλέον κλινικά επικυρωμένα και δοκιμασμένα τεστ (*CE-IVD*) για τη νόσο COVID-19 σήμερα είναι εκείνα που ανιχνεύουν άμεσα και ποσοτικοποιούν το ιικό RNA. Η ανίχνευση ιικού RNA αποτελεί ένδειξη για τρέχουσα λοίμωξη και υποδηλώνει μολυσματικότητα και κίνδυνο μετάδοσης σε άλλους. Εντούτοις, η παρουσία ιικού RNA σε ένα άτομο, ιδιαίτερα σε προχωρημένο στάδιο της νόσου, μπορεί να αντιπροσωπεύει υπολείμματα ιικού RNA σε ένα άτομο και όχι βιώσιμα ιικά σωματίδια, ικανά να μεταδώσουν τη νόσο. Χρειάζονται μελέτες παρακολούθησης της δυναμικής του ιικού RNA σε μολυσμένα άτομα, σε διάφορα βιολογικά υγρά και ανατομικές περιοχές και σύγκριση αυτών με τον κίνδυνο μετάδοσης της νόσου προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

Η μέθοδος ανίχνευσης του ιικού RNA βασίζεται στην αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (rRT-PCR) συγκεκριμένων γονιδιακών στόχων του ιού (τουλάχιστον δύο) κι εφαρμόζεται σε δείγματα του κατώτερου ή ανώτερου αναπνευστικού συστήματος. Αναδρομικές (ήδη) μελέτες δείχνουν ότι η τεχνική αυτή μπορεί να μην είναι τόσο ευαίσθητη στα πρώιμα στάδια της νόσου, όσο τουλάχιστον φαίνεται να είναι η αξονική τομογραφία του πνεύμονα και άλλα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα. Η αιτία για τη χαμηλή ευαισθησία της στα πρώτα (και πιθανά ασυμπτωματικά) στάδια της νόσου δεν φαίνεται να οφείλεται σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα



αλλά σε αιτίες όπως το ιικό φορτίο στις διάφορες ανατομικές περιοχές και οι ανεπαρκείς μέθοδοι συλλογής του προς εξέταση υλικού.

### **Ανίχνευση της ανοσιακής αντίδρασης του ξενιστή**

Οι τεχνικές του άλλου τύπου, δηλαδή αυτές που ανιχνεύουν την αντίδραση του ξενιστή στο μολυσματικό παράγοντα, συνήθως μετρούν ειδικά αντισώματα και υπάρχουν ήδη στην κυκλοφορία αρκετά από αυτά τα τεστ για τη νόσο COVID-19. Τα τεστ αυτά προσφέρουν, επίσης, χρήσιμες πληροφορίες, αλλά η χρησιμότητα και η σημασία της ορολογικής πληροφορίας είναι πολύ διαφορετική από εκείνη των διαγνωστικών αναλύσεων του ιικού RNA. Τα ορολογικά τεστ δείχνουν κατά πόσο ένα άτομο έχει προηγουμένως έρθει σε επαφή με το μολυσματικό παράγοντα κι έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται ως συμπληρωματική εξέταση στο αποτέλεσμα της rRT-PCR, ιδιαίτερα σε προχωρημένα στάδια της εξέλιξης της νόσου. Γενικά, τα αντισώματα τύπου IgM συνήθως εμφανίζονται μερικές ημέρες έως μια εβδομάδα από την έναρξη των συμπτωμάτων και παραμένουν για μερικές εβδομάδες ή ένα-δύο μήνες. Εμφανίζονται πριν από τα IgG αλλά είναι λιγότερο ειδικά για το συγκεκριμένο τύπο του ιού. Τα αντισώματα IgG συνήθως εμφανίζονται αρχικά στην κυκλοφορία του αίματος δύο εβδομάδες μετά τη μόλυνση και διαρκούν για μήνες κι σε κάποιες περιπτώσεις ακόμα και για χρόνια. Αντισώματα έναντι του SARS-CoV-2 διαφόρων τύπων έχουν ανιχνευτεί σε ασθενείς με COVID-19 κατά μέσο όρο 5-14 ημέρες από την έναρξη των συμπτωμάτων. Μερικές εβδομάδες από τη μόλυνση, μπορεί κανείς να ανιχνεύει ιικό RNA αλλά και αντισώματα στο ίδιο άτομο, αν και γενικά τα ορολογικά τεστ είναι λιγότερο ειδικά από τα μοριακά τεστ. Όλα τα ορολογικά τεστ θα πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή έως ότου ολοκληρωθούν οι απαραίτητοι εκτεταμένοι έλεγχοι και περιγραφούν τα χαρακτηριστικά της λειτουργίας τους, καθώς οι διάφορες τεχνικές ανίχνευσης αντισωμάτων διαφέρουν πολύ μεταξύ τους, ενώ οι περισσότερες μέχρι τώρα δεν έχουν καλά χαρακτηρισμένους και τυποποιημένους μάρτυρες ελέγχου. Δείγματα από ασθενείς με εποχικά κρουολογήματα από άλλους κορωνοϊούς (non-SARS-CoV-2) είναι πολύ σημαντικά ως αρνητικοί μάρτυρες!

Η παρουσία αντισωμάτων έναντι ενός μολυσματικού παράγοντα αποτελεί πολύτιμη ένδειξη μιας παρελθούσας λοίμωξης σε επιδημιολογικές πληθυσμιακές μελέτες κι επιτρέπουν αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων πολιτικών παρεμβάσεων πρόληψης της εξάπλωσης τους νόσου. Τα αντισώματα επίσης δείχνουν τα επίπεδα ανοσίας έναντι του μολυσματικού παράγοντα, όμως, στην περίπτωση του SARS-CoV-2 δεν είναι ακόμα γνωστό κατά πόσο η παρουσία αντισωμάτων αποτελεί ένδειξη προστασίας από τη νόσο.

Είναι πολύ σημαντικό να σημειώσουμε εδώ την υπάρχουσα απάντηση του ανοσιακού συστήματος του ανθρώπου στους τέσσερις εποχιακούς κορωνοϊούς (hCoV-OC43, hCoV-229E, hCoV-HKU1 και hCoV-NL63) έναντι των οποίων, σχεδόν όλοι μας μέχρι να ενηλικιωθούμε, διαθέτουμε αντισώματα. Παρά το γεγονός ότι έχουμε αντισώματα όμως, πολλοί από εμάς "κρουολογούμε" και εκδηλώνουμε συμπτώματα κάθε χειμώνα από τους ιούς αυτούς. Το πώς και γιατί συμβαίνει αυτό είναι άγνωστο,



όπως άγνωστο είναι τι ακριβώς αναγνωρίζουν τα αντισώματα αυτά στους κορωνοϊούς, γιατί δεν μας προστατεύουν τα φυσικά αυτά αντισώματα, με ποιο τρόπο αλλάζουν (μεταλλάσσονται) κάθε χρόνο οι κορωνοϊοί και για πιο λόγο τους συναντάμε το χειμώνα και όχι το καλοκαίρι.

Απαραίτητη, λοιπόν, είναι κατ' αρχάς η καθιέρωση προτύπων μεθόδων με υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα που θα γίνουν αποδεκτές και θα εφαρμοστούν σε όλα τα εργαστήρια, ώστε να μπορέσουμε να παρακολουθήσουμε την πραγματική έκθεση στον SARS-CoV-2 και δυνητικά την ανοσία σε αυτόν, ενώ προς επίλυση και κατανόηση είναι το γεγονός της ταυτόχρονης παρουσίας RNA και αντισωμάτων σε ασθενείς με MERS ή SARS-CoV-2 και η σημασία αυτού για την εξέλιξη της νόσου.

### **Αναπάντητα ερωτήματα**

Υπάρχουν αρκετά σημαντικά αναπάντητα ερωτήματα, κάποια από τα οποία διερευνώνται από την επιστημονική κοινότητα:

- Θα ήταν πολύ χρήσιμο να έχουμε ένα τεστ, το οποίο αναγνωρίζει μολυσμένα άτομα προτού παρουσιάσουν συμπτώματα και προτού αρχίζουν να σκορπούν και να μεταδίδουν τον ιό σε άλλους. Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση είναι η αναγνώριση γονιδίων του ανθρώπου-ξενιστή τα οποία εκφράζονται πολύ νωρίς στη διαδικασία της μόλυνσης με ειδικότητα για το συγκεκριμένο τύπο ιού.
- Μια αναλυτική χαρτογράφηση της ειδικότητας των αντισωμάτων κατά τη διάρκεια της μόλυνσης από τον SARS-CoV-2, δηλαδή ένας έλεγχος της αντιδραστικότητας και λειτουργίας των αντισωμάτων, θα βοηθούσε πολύ να καταλάβουμε την ποικιλομορφία στην έκβαση της λοίμωξης μεταξύ των ανθρώπων, να γίνει καλύτερη διαστρωμάτωση του κινδύνου, να προβλέψουμε τη σχέση μεταξύ της ύπαρξης αντισωμάτων και της έκβασης της νόσου και να αναγνωρίσουμε τα ιδανικά αντιγόνα για την παρασκευή εμβολίου.
- Πολύ σημαντικό είναι να γίνουν ολοκληρωμένες μελέτες μεγάλης διάρκειας ώστε να διαπιστωθεί η σχέση μεταξύ των διαφορετικών τύπων ειδικών αντισωμάτων στον SARS-CoV-2 και της πιθανότητας ένα άτομο να νοσήσει ξανά. Ο κύριος στόχος είναι η αναγνώριση αντισωμάτων τα οποία εξουδετερώνουν και αναστέλλουν την ιική λοίμωξη, καθώς και η διαπίστωση της συγκέντρωσης του αντισώματος (τίτλου) που χρειάζεται για προστασία.

### **ΕΠΙΛΕΓΜΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Xu, H., L. Yan, C. Qiu, B. Jiao, Y. Chen, X. Tan, Z Chen, et al. 2020. Analysis and prediction of false negative results for SARS-CoV-2 detection with pharyngeal swab specimen in COVID-19 patients: A retrospective study. <https://doi.org/10.1101/2020.03.26.20043042> (accessed April 4, 2020).

2. Fang, Y., H. Zhang, J. Xie, M. Lin, L. Ying, P. Pang, and W. Ji. 2020. Sensitivity of chest CT for COVID-19: Comparison to RT-PCR. *Radiology*, <https://doi.org/10.1148/radiol.202000432> (accessed April 4, 2020).
3. Thai H., M. Le, C. Vuong, M. Parida, H. Minekawa, T. Notomi, F. Hasebe, and K. Morita. 2004. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol*; 42(5):1956-1961.
4. Lamb, L., S. Bartolone, E. Ward, and M. Chancellor. 2020. Rapid detection of novel coronavirus (COVID-19) by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. <https://doi.org/10.1101/2020.02.19.20025155> (accessed April 4, 2020).
5. Kellner M.J., J.G. Koob, J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh, and F. Zhang. 2019. SHERLOCK: Nucleic acid detection with CRISPR nucleases. *Nat Protoc* 14:2986-3012.
6. Lucia C., P. B. Federico, and G. C. Alejandra. An ultrasensitive, rapid, and portable coronavirus SARS-CoV-2 sequence detection method based on CRISPR-Cas12. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.02.29.971127> (accessed 2 April 2020).
7. Metsky H., C.A. Freije, F. Tinna-Solveig, Kosoko-Thoroddsen, P.C. Sabeti, and M. Cameron. 2020. CRISPR-based surveillance for COVID-19 using genomically-comprehensive machine learning design. <https://doi.org/10.1101/2020.02.26.967026> (accessed April 2, 2020).
8. Bruce E., T. Scott, J. Hoffman, P. Laaguiby, D. Gerrard, S. Diehl, D.G.B. Leonard, et al. 2020. <https://biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.20.001008v1> (accessed April 2, 2020).
9. Yelin, I., N. Aharony, E.S. Tamar, A. Argoetti, E. Messer, D. Berenbaum, E. Shafran, et al. 2020. Evaluation of COVID-19 RT-zPCR test in multi-sample pools. <https://doi.org/10.1101/2020.03.26.20039438> (accessed April 5, 2020).
10. Alshukairi A., J. Zheng, J. Zhao, A. Nehdi, S. Baharoon, L. Layqah, A. Bokhari, et al. 2018. High prevalence of MERS-CoV infection in camel workers in Saudi Arabia. *mBio* 9. pii: e01985-18.
11. Corman V.M., A.M. Albarak, A.S. Omrani, M.M. Albarak, M.E. Farah, M. Almasri, D. Muth, et al. 2016. Viral shedding and antibody response in 37 patients with Middle East Respiratory Syndrome coronavirus infection. *Clin Infect Dis* 62(4):477-483.
12. Zhao, J., A.N. Alshukairi, S.A. Baharoon, W.A. Ahmed, A.A. Bokhari, A.M. Nehdi, L.A. Layqah, et al. 2017. Recovery from the Middle East respiratory syndrome is associated with antibody and T cell responses. *Sci Immuno* 2:eaan5393.
13. Wölfel, R., V. Corman, W. Guggemos, M. Seilmaier, S. Zange, M. Müller, D. Niemeyer, et al. 2020. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x> (accessed April 4, 2020).
14. Mayhew M.B., L. Buturovic, R. Luethy, U. Midi, A.R. Moore, J.A. Roque, B.D. Shaller, et al. 2020. A generalizable 29-mRNA neural-network classifier for acute bacterial and viral infections. *Nat Commun* 11:1177. <https://www.nature.com/articles/s41467-020-14975-w> (accessed April 4, 2020).
15. Warsinske H., R. Vashisht and P. Khatri. 2019. Host-response-based gene signatures for tuberculosis diagnosis: A systematic comparison of 16 signatures. 2019. *PLoS Med* 16(4):e1002786.
16. Blanco-Melo D., B.E. Nilsson-Payant, W. Liu, R. Møller, M. Panis, D. Sachs, R.A. Albrecht, and B.R. tenOever. 2020. SARS-CoV-2 launches a unique transcriptional signature from in vitro, ex vivo, and in vivo systems. <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.004655> (accessed April 2, 2020).
17. Khan S., R. Nakajima, A. Jain, R. Ramiro de Assis, A. Jasinskas, J.M. Obiero, O. Adeniyai, et al. 2020. Analysis of serological cross-reactivity between common human coronaviruses and SARS-CoV-2 using coronavirus antigen microarray. <https://doi.org/10.1101/2020.03.24.006544> (accessed April 2, 2020).
18. Xu G. J., T. Kula, Q. Xu, M. Z. Li, S. D. Vernon, T. Ndung'u, K. Ruxrungtham, et al. 2015. Comprehensive serological profiling of human populations using a synthetic human virome. *Science* 348(6239):aaa0698.

Αθήνα, 14 Απριλίου 2020

Γεωργία Χριστοπούλου, MSc, PhD  
Μοριακός Βιολόγος – Γενετιστής  
Διευθύντρια Εργαστηρίου  
Genotypos Science Labs IAE

Παντελής Κωνσταντουλάκης, PhD  
Μοριακός Βιολόγος – Γενετιστής  
Επιστημονικός Διευθυντής  
Genotypos Science Labs IAE