

A SARS-CoV-2-járvány kihívásai és tapasztalatai a molekuláris diagnosztikában

Zóka András dr. ■ Tresó Bálint dr. ■ Bekő Gabriella dr.

Dél-pesti Centrumkórház, Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet, Központi Laboratórium, Mikrobiológiai Profil, Budapest

Bár a SARS-CoV-2-pandémia próbára tette a diagnosztikus kapacitásokat, számos hasznos tapasztalattal is szolgált, melyek alacsonyabb mintaszám mellett nem lettek volna levonhatók. Míg korábban a PCR-vizsgálatok jellemzően diagnosztikus, illetve kvantitatív követési célokat szolgáltattak, a járvány során többségbe kerültek a szűrő- és (kezdetben) a felszabadító vizsgálatok. Jól követhető volt, hogy a tesztek piacra juttatásának erőltetett üteme sokszor nem tette lehetővé a teljesen kiforrott koncepciók létrehozását. Tekintettel arra, hogy a molekuláris diagnosztika során nem teljes vírusgenomokat, hanem célszakaszokat mutatunk ki, amelyek aránya a fertőzés egyes szakaszaiban nem feltétlenül állandó, egyre valószínűbb, hogy nem azonos célgenek a legmegfelelőbbek diagnosztikus, szűrő- és felszabadító vizsgálatokhoz. A nagy mennyiségű, aspecifikusan végzett vizsgálat még kiváló fajlagosság mellett is a pozitív prediktív érték csökkenéséhez vezethet, amennyiben a fertőzés tényleges prevalenciája a vizsgálati csoportban alacsony. Munkánkban megkíséreljük irodalmi és saját adatok felhasználásával összefoglalni az elmúlt két év fontosabb diagnosztikus tapasztalatait a teljesség igénye nélkül.

Orv Hetil. 2021; 162(52): 2071–2078.

Kulcsszavak: pandémia, SARS-CoV-2, PCR

Challenges and experiences of the SARS-CoV-2 pandemic in molecular diagnostics

Although the SARS-CoV-2 pandemic has been a great challenge for the diagnostic capacities, it also proved to be a unique source of experience. While previously PCR tests had overwhelmingly been used for targeted diagnostic and quantitative follow-up testing, screening and (initially) release tests became far more prevalent during the pandemic. It was well to be seen that the forced pace of bringing tests to market often gave way to not fully mature concepts. The PCR method is based on the detection of sequences, the proportions of which are likely to alter throughout the course of the disease. It is becoming increasingly clear that different target genes might be the best suitable for diagnostic, screening and release testing. Even with specific assays, an unprecedentedly high number of tests might result in the inflation of the positive predictive value, when the true prevalence of the infection remains very low among the tested individuals. Here we try to summarize some of the potentially most relevant diagnostic conclusions of the pandemic so far according to our own data and the literature.

Keywords: pandemic, SARS-CoV-2, PCR

Zóka A, Tresó B, Bekő G. [Challenges and experiences of the SARS-CoV-2 pandemic in molecular diagnostics]. Orv Hetil. 2021; 162(52): 2071–2078.

(Beérkezett: 2021. október 9.; elfogadva: 2021. október 21.)

Rövidítések

COVID-19 = (coronavirus disease 2019) koronavírus-betegség 2019; Ct = (cycle threshold) detektálási ciklus-küszöbérték; EDTA = (ethylenediaminetetraacetic acid) etilén-diamin-tetraecetsav; mRNS = (messenger ribonucleic acid [mRNA]) hírvivő ribonukleinsav; ORF = (open reading frame) nyitott

leolvasási keret; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz-lánreakció; PK = proteínáz K; RdRp = RNS-dependens RNS-polimeráz; RNS = ribonukleinsav; SARS-CoV-2 = (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) súlyos akut légzőszervi tünetegyüttest okozó koronavírus-2; TRS = transzkripció-szabályozó szekvencia

A mikrobiológiai molekuláris diagnosztika eddigi évi-évtizedei során a nagy tömeget érintő szezonális fertőzések diagnosztikája többnyire epidemiológiai megközelítéssel folyt. Terápiás döntést befolyásoló PCR- (polimeráz-láncreakció – polymerase chain reaction) vizsgálat főként csak súlyos, életet veszélyeztető kórképek, illetve perzisztens fertőzések követése során történt. A SARS-CoV-2-járvány során ugyanakkor egy hatékonyan terjedő, potenciálisan súlyos kórképet okozó fertőző ágenssel szembesültünk, amely kimutatásának minden esetben azonnali következményei (járványügyi intézkedés és/vagy terápiás döntés) lehettek. A szerológiai diagnosztika elégtelen érzékenysége, illetve az antivirális ellenanyagok megjelenéséhez szükséges idő a direkt víruskimutatáson alapuló molekuláris diagnosztika kizárólagosságához és felértékelődéséhez vezetett a pandémia során. A PCR módszertani ismertetése a jelen munkának nem célja, és meghaladná annak kereteit, így erre vonatkozóan utalunk a szakirodalomra [1]. A járvány dinamikája nem tette lehetővé a PCR-tesztek hosszadalmas fejlesztését és kipróbálását. Számtalan, alapvető jellemzőikben is igen heterogén gyári kit került kereskedelmi forgalomba. A szűrővizsgálatok magas száma hamar megmutatta a rohamtempóban kifejlesztett kitek különbözőségeit. Munkánk célja azon szempontok összefoglalása irodalmi és saját adatok felhasználásával, amelyekben a SARS-CoV-2-járvány a mikrobiológiai molekuláris diagnosztika számára az eddigiekben kihívásokkal, de tapasztalatokkal is szolgált.

A koronavírus-replikáció biológiai sajátosságai

A SARS-CoV-2 a *Coronaviridae* család *Betacoronavirus* nemzetségéhez tartozik. Az egyszálú RNS-genom polaritása az mRNS-ekkel megegyezik (pozitív szenz). A PCR képes detektálni a natív vírusgenom mellett a transzlációra váró mRNS-szakaszokat is, ebből adódóan a vírusreplikáció képes befolyásolni a kimutathatóságot, illetve a célként választott szakaszok különböző érzékenységet biztosíthatnak a kórkép fázisától függően. A vírus célsejtbe jutását követően először a teljes vírusgenomról készülnek negatív szenz kópiák, majd ezekről történik a teljes genom sokszorozódása. A róluk átíródó pozitív szenz teljesgenom-másolatok részben mRNS-ként szolgálnak az *ORF1ab*-szakasz transzlációjához és a replikációs komplexek összeállításához, részben pedig az összeépülő virionok genomjai lesznek [2]. A *Nidovirales* rend legtöbb tagjának sajátossága, hogy a pozitív polaritású genomról a negatív templátszálak szegmentáltan is átíródhatnak. Erre vezethető vissza, hogy a koronavírusok más, nem szegmentált genommal rendelkező vírusoktól eltérően képesek a genetikai rekombinációra [3]. Az átíródó szegmenteik határait a transzkripció szabályozó szekvenciák (TRS) jelölik, jellemzően minden leolvasási keret után [2]. Ezen szekvenciák bármelyike után az RNS-dependens RNS-polimeráznak (RdRp, amelyet az

ORF1b-szakasz kódol) lehetősége van a templátszál 3' végén elhelyezkedő 'leader' TRS-re ugrani és ezzel befejezni az mRNS-szálat. Így különböző hosszúságú mRNS-ek keletkeznek. A templátszál 5' végéhez legközelebb a nukleokapszid (*N*)-gén helyezkedik el, így ez mindenképpen átíródik [2]. Az ezen negatív szákról elkészülő pozitív szenz kópiák látszólag policisztronsak, ugyanakkor valószínűleg ténylegesen csak az 5' véghez legközelebbi gén transzlációja történik meg, azaz funkcionálisan monocisztrons mRNS-ként viselkednek. A fentiekből adódik, hogy a vírusreplikáció mellett a transzkripció is képes befolyásolni a detektálhatóságot, illetve a kimutatásra választott szakaszok is valószínűleg különböző érzékenységet biztosítanak a kórkép fázisától függően.

A PCR-kitek jellemzői, a célgének megválasztása

A járvány kezdete óta összesen nyolcféle PCR-kitet volt lehetőségünk számottevő mintamennyiségen kipróbálni és általuk a molekuláris SARS-CoV-2-diagnosztika evolúcióját is követni. Ezek főbb jellemzőit az 1. táblázatban foglaltuk össze; a felhasználás időszakát a járvány szakaszai szerint, illetve a gyártókat az 1. ábra mutatja. Két teszt kit tett lehetővé egyedi mintafeldolgozást (Cepheid GeneXpert, Sunnyvale, CA, USA; Roche Liat, Bazel, Svájc), ezeket a sürgősségi diagnosztika során (elsősorban sürgős műtetre váró betegek nasopharyngealis mintáinak vizsgálatához) használtuk. A járvány első hulláma alatt az első PCR-kit (genesig Coronavirus [COVID-19], Primerdesign Ltd., London, Egyesült Királyság), amelyet a rutindiagnosztikában alkalmaztunk, kizárólag az *ORF1ab*-régión detektálta. Ahogy palletánk a későbbiekben kiegészült a HybriBio HBRT-COVID-19 (Hongkong, Kína) (*RdRp* és *N* gének), illetve az Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene Inc., Szöul, Koreai Köztársaság; *N*, *E* és *RdRp*, illetve a későbbi változatban *N*, *E* és *RdRp* + *S* célgének) PCR-kitekkel, megfigyeltük, hogy viszonylag gyakori az *RdRp/ORF1ab* nélkül mutatkozó *N*-gén-pozitivitás, amely a vírusreplikáció ismert folyamatába illeszkedve a zajló fertőzés későbbi szakaszának felelhet meg [4]. Azonos betegről származó ismételt mintavétel esetén megfigyeltük, hogy az *N*-gén kimutathatósága, így feltételezhetően transzkripciója a fertőzés során stabil marad, míg az *ORF1ab/RdRp* jellegzetesen csökken a fertőzés későbbi szakaszában [4]. Bár átfogó, nagy esetszámú összehasonlítást nem végeztünk, egyedi esetekben sor került egyes minták ismételt mérésére más PCR-kittel: öt, Allplex kittel kizárólag *N*-gén-pozitív minta (Ct [cycle threshold] mindegyik esetben >35) közül a genesig *ORF1ab* PCR-kit csak kettő esetében adott pozitív eredményt (nem publikált adat). A Genesig kínálatában a monogénes tesztet a későbbiekben felváltották a kettő (*ORF1ab*, *S*), majd a három (*ORF1ab*, *S*, *M*) gén detektálására alkalmas kitek. Míg az *ORF1ab/RdRp* diag-

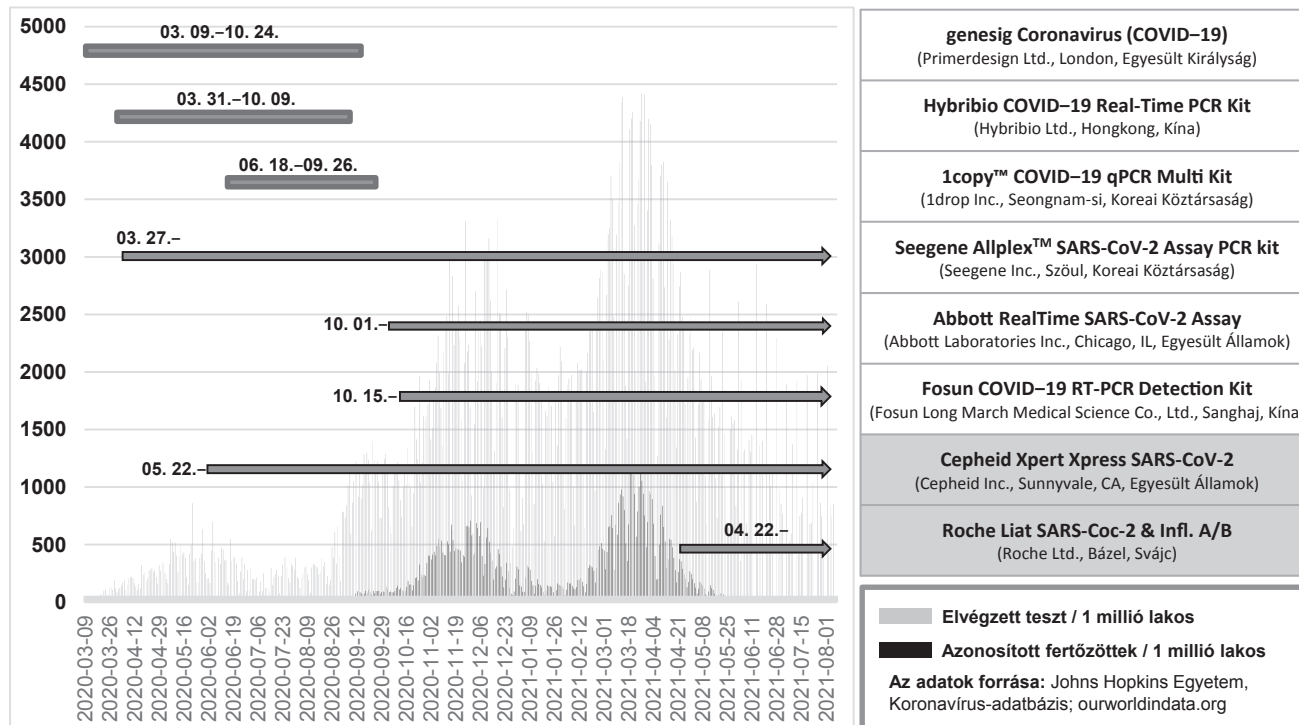
1. táblázat | A felhasznált tesztek főbb jellemzői

Teszt	RNS-izolálás	Valós idejű PCR	PCR-célpont			
			<i>Orflab/RdRp</i>	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>E</i>
Genesis Coronavirus (COVID-19)	Seegene Nimbus vagy Starlet, illetve QIAgene QIASymphony berendezések	BioRad C1000, CFX96 Real-Time rendszerrel (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)	✓	X	X	X
HybriBio COVID-19 Real-Time PCR Kit			✓	✓	X	X
1copy™ COVID-19 qPCR Multi Kit			X	✓	X	✓
Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay			✓	✓	✓	✓
Fosun COVID-19 RT-PCR Detection Kit			✓	✓	X	✓
Abbott RealTime SARS-CoV-2 Assay	Abbott m2000sp	Abbott m2000rt	✓	✓	X	X
Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2	Az izolálás és az amplifikáció összes lépése egy kazettában zajlik		X	✓	X	✓
Roche Liat SARS-CoV-2 & Infl. A/B			✓	✓	X	X

COVID-19 = koronavírus-betegség 2019; ORF = nyitott leolvasási keret; PCR = polimeráz-láncreakció; qPCR = kvantitatív PCR; RdRp = RNS-dependens RNS-polimeráz; RNS = ribonukleinsav; RT-PCR = valós idejű PCR; SARS-CoV-2 = súlyos akut légzőszervi tünetegyüttest okozó koronavírus-2

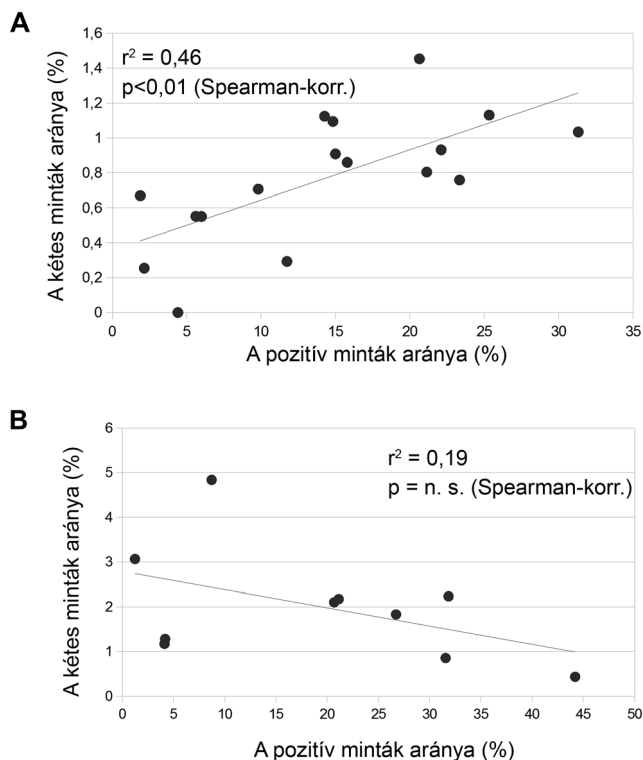
nosztikus szenzitivitását elsősorban a vírusreplikáció dinamikája befolyásolja, a számos PCR-tesztben alkalmazott, 'envelope' (E) fehérjét kódoló gén esetén ettől eltérő problémák merülhetnek fel. A szóba jövő célgének közül a SARS-CoV-2 E-génje tekinthető a legkevésbé specifikusnak, más alfa- és béta-koronavírusokkal 50–90% szekvenciahomológiát mutat [5] (emellett számos

olyan változatát leírták, amely a kimutathatóságát képes befolyásolni [6–8]). Az E-gén egyedüli kimutatását az általunk használt tesztek közül önmagában egyik sem fogadja el a SARS-CoV-2-fertőzöttség egyértelmű bizonyítékának (a használati útmutatók a „véltetően pozitív”, illetve „kétes” értékelést javasolják). Korábbi vizsgálatunk során az Allplex PCR-kittel kizárólag E-gén-



1. ábra | A laborunkban a SARS-CoV-2-járvány kezdete óta használt PCR-teszt-kitek. A háttérben a felismert esetek (sötét oszlopok) és az elvégzett tesztek (világos oszlopok) száma látható 1 millió lakosra vetítve. Minden oszloppár egy napra vonatkozik. Mindegyik teszt „CE IVD” minősítéssel rendelkezik. Az epidemiológiai adatok forrása: Johns Hopkins University CSSE COVID-19 Data; ourworldindata.org

CE IVD = „európai szabványoknak megfelelő” minősítésű *in vitro* diagnosztikai tanúsítvány (orvostechinikai eszközökre); COVID-19 = koronavírus-betegség 2019; PCR = polimeráz-láncreakció; SARS-CoV-2 = súlyos akut légzőszervi tünetegyüttest okozó koronavírus-2



2. ábra | A kétes és a pozitív eredmények aránya az összes Allplex SARS-CoV-2 Assay-vel vizsgált minta között szignifikáns összefüggést mutat (A). Bár az adatpontok száma jóval alacsonyabb, a Fosun COVID-19 RT-PCR Kit esetében hasonló összefüggés tendencia szintjén sem mutatkozik (B). Egy adatpont egy hónapnak felel meg ($\Sigma n_A = 98\ 460$ fő, $\Sigma n_B = 5043$ fő)

COVID-19 = koronavírus-betegség 2019; n.s. = nem szignifikáns; RT-PCR = valós idejű polimeráz-láncreakció; SARS-CoV-2 = súlyos akut légzőszervi tünetegyüttest okozó koronavírus-2

pozitív minták közel 40%-át korábbi pozitivitást követően, mintegy maradványként detektáltuk, hasonló arányban pedig olyan tünetmentes egyénekben, akik további mintákban egyáltalán nem mutattak reaktivitást [5]. A kétes és pozitív minták aránya az összes minta kö-

zött 0,46-os r^2 -tel mutatott összefüggést (2. ábra), így a kétes eredményekért körülbelül 40%-ban lehet felelős a tényleges fertőződés, ami egybevág korábbi eredményeinkkel. A tünetmentes, pozitivitást semmilyen egyéb mintában nem mutató további közel 40%-ra azonban valószínűleg más magyarázatot kell keresnünk. Ezen túlmenően figyelmet érdemel, hogy más tesztkitekre más adatok lehetnek jellemzőek: az általunk használt Fosun assay (Sanghaj, Kína) esetében a kétes eredmények aránya jóval magasabb volt az Allplexnél tapasztaltaknál, és nem csökkent a prevalencia csökkenésével (2. táblázat). Az Abbott teszt kit (Chicago, IL, USA) esetében csak az igen magas ciklusszám mellett (≥ 33 Ct) detektált reaktivitást interpretáltuk kétesként szűrővizsgálatok esetén, az *E*-gén-t nem detektálja. Az Abbott kit célgénválasztása (*RdRp* és *N*) feltehetően a leginkább informatív, hátránya ugyanakkor, hogy a két gént nem egymástól függetlenül detektálja, így a pozitív-negatív dimenzió túl nem nyerhető belőle információ, továbbá a nukleinsav-izolálás és a PCR-vizsgálat időigénye mind közül a leghosszabb.

A tesztelési stratégia buktatói

Különösen a pandémia első hullámának idején jelent meg a minél szélesebb körű tesztelés mint igény és potenciális lehetőség a járványügyi kontrollra. Annak ellenére, hogy a korai felismerés és karantén elrendelése ebben az időszakban az egyetlen beavatkozási lehetőség volt, a negatív teszteredmény az egyén vírushordozásáról természetesen csak pillanatképet adhat. Emellett több teszt esetében a termékek saját leírásai, illetve az eddig rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján nem zárható ki fals reaktivitás előfordulása akár 1–2%-ban [9]. Tovább árnyalja a képet, ha belegondolunk, hogy voltak olyan laboratóriumok, amelyekben kizárólag a világjárvány miatt került bevezetésre molekuláris biológiai vizsgálat. Számos esetben felmerülhetett a helyhiány és a

2. táblázat | A pozitív, negatív és kétes eredmények aránya a harmadik hullám csúcán és 2021 nyarán a három, egy időben használt teszttel

	Harmadik hullám (2021. 02. 01.–2021. 05. 31.)			Alacsony incidencia (2021. 06. 01.–2021. 08. 31.)		
	Allplex	Abbott	Fosun	Allplex	Abbott	Fosun
	$\Sigma n = 22\ 419$	$\Sigma n = 704$	$\Sigma n = 2866$	$\Sigma n = 3545$	$\Sigma n = 1772$	$\Sigma n = 978$
Kétes	187* (0,83%)	5** (0,71%)	54* (1,88%)	10* (0,31%)	4** (0,23%)	19* (1,94%)
Pozitív	3548 (15,83%)	132 (18,75%)	709 (24,74%)	82 (2,53%)	32 (1,81%)	31 (3,17%)
Negatív	18684 (83,34%)	567 (80,54%)	2103 (73,38%)	3153 (97,16%)	1736 (97,97%)	928 (94,89%)
p (χ^2)	<0,001			<0,001		

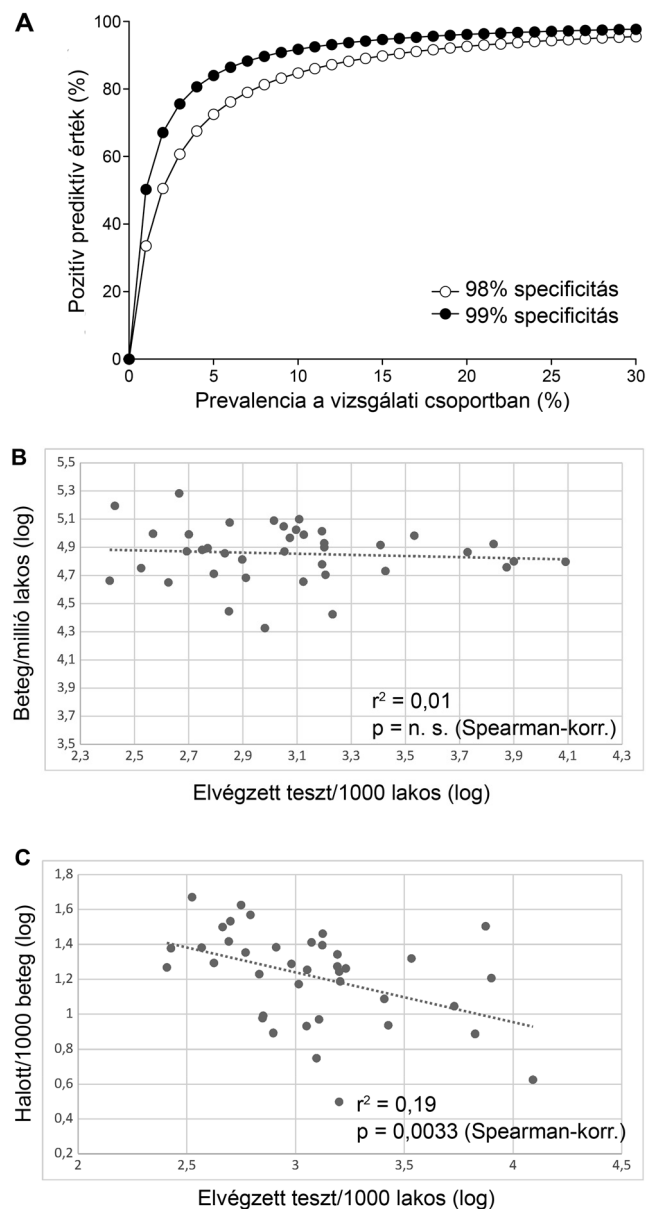
Jelmagyarázat:

*Kizárólag *E*-gén-pozitivitást mutató, illetve egyetlen génre Ct>40 reaktív minták

**Ct>33 reaktív minták

Ct = detektálási ciklus-küszöbérték

szakképzett munkaerő hiánya. Számos olyan asszisztens és mikrobiológus kényszerülhetett molekuláris biológiai vizsgálatok végzésére és értékelésére, akinek csak elméleti ismeretei lehettek a témában. Emiatt a megfelelő külső minőség-ellenőrzési programokban való részvétel jelentősége mindenképpen hangsúlyos. A nukleinsav-amplifikáción alapuló módszerek esetében kiemelkedő a precizitásnak, a munkafolyamatok elkülönítésének a jelentősége.



3. ábra

A pozitív prediktív értéket (a valós pozitívítás aránya a pozitív teszteredmények között) még igen specifikus tesztek esetében is számottevően ronthatja a körkép nagyon alacsony prevalenciája a vizsgálati csoportban (A). Akár ez is állhat annak hátterében, hogy az európai országokban a tesztelés fokozásával a felismert esetek számát nem lehetett (tovább) növelni (B), miközben a felismert esetek halálózása látszólag csökkent (C). A B és C ábrán egy adatpont egy ország kumulatív adatait jelöli az utolsó augusztusi adatközlésig bezárólag. Az adatok forrása: Johns Hopkins University CSSE COVID-9 Data; ourworldindata.org

COVID-19 = koronavírus-betegség 2019; n.s. = nem szignifikáns

Komoly problémát jelenthet az amplikonkontaminációból adódó álpozitivitás. Ilyen, szuboptimális viszonyok mellett erősen javasolt és nagy segítséget jelenthet az uracil-N-glikoziláz-dezoxiuracil-trifoszfát rendszer használata a PCR-alapú víruskimutatásban. Bár a tesztek közvetlen összehasonlítására nagy mennyiségű mintán nem adódott lehetőségünk, az saját eredményeinkből is megállapítható, hogy a járvány azonos időszakában különböző tesztekkel kapott eredmények között a pozitív és kétes minták aránya szignifikánsan eltér (2. táblázat).

A korábbi gyakorlatban, amikor a molekuláris vizsgálatokat jellemzően az egyedi diagnosztikában hasznosítottuk, illetve a járvány csúcán, amikor a vizsgált minták 15–25%-a bizonyult pozitívnek, a 98–99%-os specificitás kielégítő pontosságú eredményeket adhatott, nagy mennyiségű minta és alacsony prevalencia mellett azonban ez már nem feltétlenül igaz. A 3/A ábra szemlélteti a pozitív prediktív érték változását a tényleges prevalencia függvényében 1 és 2%-os (hipotetikus) fals pozitívítási ráta mellett. A felismert esetek esetleges „hígulása” a fals pozitív esetekkel egy lehetséges magyarázat arra a bizarr trendre, amelyet az európai országok járványügyi adatait összesítve megfigyelhetünk (nyers adatfájlok forrása: Johns Hopkins University CSSE COVID-19 Data; ourworldindata.org): az elvégzett tesztek számának további növelésével már nem lehetett az 1 millió lakosra vetített felismert esetek számát növelni (3/B ábra), ugyanakkor a fertőzöttek mortalitását – látszólag – csökkenteni lehetett (3/C ábra). A statisztikai számításokat KyPlot 6.0 szoftverrel végeztük (KyensLab Inc., Tokió, Japán).

Az esetleges fals pozitívításokon túlmenően természetesen a bizonytalan jelentőségű kétes eredmények jelentkezésével is számolnunk kell, amelyek a két, E-gént is tartalmazó, általunk használt teszttel (Allplex, Fosun) 0,83% és 1,94% között változtak a járvány stádiumától is függően (2. táblázat). Korábbi eredményeink [5] (több irodalmi adattal összhangban, ld. fentebb) is arra utalnak, hogy az önmagában, magas Ct-értékkel mutató E-gén-pozitivitás jelentős arányban nem vezethető vissza igazolható fertőzésre, és a fennmaradó találatok klinikai relevanciája is kétségbe vonható. Ezek alapján az E-gén detektálásának diagnosztikus haszna alacsony átfertőzöttség mellett kérdéses.

A szenzitivitás mint lehetséges hátrány

Amikor egy vizsgálat célja etiológiai diagnózis tünetes személyen, az eredmény relevanciája egyértelmű, a SARS-CoV-2-járvány esetében azonban túlnyomó többségben voltak a szűrő és felszabadító céllal végzett PCR-vizsgálatok. Az utóbbiak alkalmazása jelentősen visszaszorult, és már csak fokozott rizikó (elsősorban egészségügyi dolgozók) esetén javasolt, ami mindenképp indokoltnak látszik a fertőzés lefolyásának jellegzetességei alapján. Ismert, hogy a vírus a szervezetben a

klinikai gyógyulást követően még hetekig jelen lehet, és kimutathatósága az alkalmazott módszer érzékenysége-nek függvénye [10]. Ha figyelembe vesszük, hogy a vírus egészen biztosan nem azonos időben tűnik el a diagnosztikus horizontunkról és a szervezetből, megalapozottan merülhet fel, hogy a szűrő- és felszabadító vizsgálatokhoz milyen tesztek és milyen értékelési paramétereket lenne célszerű alkalmaznunk. Sajnos a jelenleg rendelkezésre álló adatok alapján egyértelmű választ adni nem tudunk, de néhány adat irányadó lehet. Korábbi vizsgálatunkban a kizárólag *E*-gén-pozitív („kéttes”) eredményt adó minták körülbelül 15%-ban fordultak elő pozitív minták között [5]. Bár a vírusszám ingadozása is lehet ennek magyarázata, a preanalitikai szakasz eseményei (mintavétel, tárolás, szállítás) is okozhatják az egyébként alacsony vírusszám látszólagos ingadozását a kimutathatósági határ körül. Ez egyben arra is felhívja a figyelmet, hogy miért veszélyes a Ct-értékből egyetlen mérés alapján következtetést levonni. Reálisan felmerül azonban, hogy az ennyire alacsony vírusszám egyáltalán bír-e relevanciával. *La Scola és mtsai* vizsgálatában az *E*-génre 34 'real-time' (valós idejű) PCR-ciklus felett (Ct) reaktív minták egyike sem volt képes sejt kultúrán vírusfertőzést létrehozni [11]. Hasonló eredményre jutottak *Singanayagam és mtsai* is, bár az ő vizsgálatukban a 60 darab, Ct>35 *RdRp*-gén-pozitív minta közül 5-ből tenyészthető volt a SARS-CoV-2 *in vitro* sejt kultúrán [12]. Az utóbbi vizsgálat alapján az *RdRp* célgénként választása, ahogy az a replikáció ismert jellegzetességeiből is következik, alkalmasabbnak tűnik a fennálló aktív fertőzés leképezésére. Természetesen a fertőző és fogékony közegek mintavétel-leoltás szintű kontinuitása csak a személyes kontaktusok töredékében vethető össze a laboratóriumi minta-sejt kultúra kapcsolat szorosságával. Ezt látszik alátámasztani az a vuhani, közel tízmillió fős epidemiológiai vizsgálat is, amelyben egyetlen esetben sem tudtak mindvégig tünetmentes vagy negatív eredménnyel felszabadított, ismételt pozitív eredményt adó személyt [13] fertőző forrásként azonosítani.

PCR-inhibitorok biológiai mintákban

Számos ágens számos módon képes akadályozni a nukleinsav-amplifikáció megtörténtét, a vélhetően legfontosabbakat a 3. táblázatban foglaltuk össze [14–17]. A minta inhibitor tartalmának felismerését szolgálja a belső kontroll, amely információt nyújt a PCR kivitelezhetőségéről, így az eredmény értékelhetőségéről. A belső kontroll lehet egy, az előkészítés során a mintához adott egyezményes nukleinsavszakasz, amely minden minta esetében kimutatásra kerül, vagy a humán sejtek valamely nem variabilis, átíródo háztartási (housekeeping) génje. Ez utóbbi előnye, hogy egyben a mintavétel megfelelőségéről is információt ad. Sejt kontroll és utólag hozzáadott belső kontroll egyidejű használatával elméletileg lehetséges lenne a mintavételi hiba és az inhibitor jelenlétének elkülönítése, de erre a rutindiagnosztikában

3. táblázat | Néhány gyakori PCR-inhibitor hatása és kiküszöbölésük elsődleges módszerei [16, 17]

Anyag	Hatás	A kivédés elsődleges módja
Urea	Polimeráz degradációja	Ismételt mosási lépés beiktatása, ioncserélők használata
Heparin	Polimeráz gátlása	
EDTA	Mg ²⁺ -ionok megkötése	
Polifenolok	Mg ²⁺ -ionok megkötése	
Ca ²⁺ , Fe ³⁺ , Na ⁺ , K ⁺	Polimeráz gátlása, primer specificitása ↓	
Hemin	Quencher, polimeráz gátlása, olvadása	A fehérjék bontása, elsősorban proteináz K segítségével
IgG	ssDNS kötése, Ct emelése	
Kollagén	Mg ²⁺ -ionok megkötése, polimeráz gátlása	
Csersav	Polimeráz enzim gátlása	Faeszakozók mellőzése
Polifenolok	Mg ²⁺ -ionok megkötése	
Epesók	Nem egyértelmű	BSA, p32, aktív szén használata
Alkoholok	Polimeráz degradációja	Felületfertőtlenítők körültekintő használata

BSA = szarvasmarha-szérumalbumin; Ct = detektálási ciklus-küszöbérték; ssDNS = egyszálú dezoxiribonukleinsav; EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav; IgG = immunglobulin-G; PCR = polimeráz-láncreakció

– sajnos – nem kerül sor. Emellett a kizárólag hozzáadott belső kontrollt használó vizsgálatok esetén az elégtelen mintavételből adódó álnegativitás gyakorlatilag felismerhetetlen. Bár a SARS-CoV-2 az enterocytákat is fertőzi, és kimutatható székletből, ennek felhasználását a rutindiagnosztikában nehezíti, hogy igen nagy mennyiségben tartalmaz PCR-inhibitorokat (a 3. táblázatban felsoroltak közül az EDTA és a heparin kivételével potenciálisan az összeset). Az eltérő mintafeldolgozás különböző tesztek esetében eltérő érzékenységet eredményezhet az esetleg jelen lévő PCR-inhibitorokkal szemben. A mágnesesgyöngy-alapú nukleinsav-izolálás általában igen hatékony az inhibitorok eltávolításában, de azok továbbvitele („carryover”) előfordulhat termékenként eltérő mértékben [18]. Légúti mintákban elsősorban fehérjetermészetű inhibitorokra kell számítanunk, eliminálásuk kézenfekvő módja a proteináz K (PK) alkalmazása. Egy közelmúltban publikált vizsgálat eredményei alapján az általunk is alkalmazott Seegene Allplex™ SARS-CoV-2 Assay oronasopharyngealis mintákból nukleinsav-izolálás nélkül, kizárólag PK-előkészítést alkalmazva *RdRp*, *N* és *E* virális génekre pozitív mintákban (Ct = 15–40) 98,9%, kizárólag *N*-gén-pozitív (Ct>30) mintákban 76,7% érzékenységet mutatott a mágnesesgyöngy-alapú izolálással összehasonlítva [19]. A felsoroltak közül eddigi gyakorlatunk során felmerült még a fában jelen lévő inhibitorok esetleges hatása (csersav, polifenolok) is. Bár az egyedi visszakövethetlenség miatt nem volt kétséget kizáróan bizonyítható a szerepe, a fanyelű vattapálcával

történt mintavétel felmerült lehetséges magyarázatként az egy időben megszorított invalid eredmények hátterében.

Következtetések

A tesztelési gyakorlat csak akkor felelhet meg a klinikai és járványügyi céloknak, ha megfelelő időben, kellőképpen pontos és egyben releváns eredményt képes adni. A SARS-CoV-2-járvány, bár próbára tette az ellátórendszer kapacitását, egyben lehetőséget is jelentett arra, hogy a PCR-diagnosztika igen nagy volumenű alkalmazásának kihívásait a gyakorlatban megismerjük, és a megfelelő munkafolyamatokat kialakítsuk. Mivel a PCR mint módszer a kórokozó egyedi örökítőanyagának direkt felismerésén alapul, fajlagossága jól megtervezett rendszer esetén kiváló. Ennek ugyanakkor feltétele a technikai részletek (primerek tervezése, megfelelő ciklusparaméterek) mellett a megfelelően egyedi célgén megválasztása is. Mivel a vírus eltűnése a szervezetből a legtöbbször valószínűleg nem esik egybe a kimutathatóság végével, ugyanakkor az érzékenység növelése (ahogy minden diagnosztikus módszer esetén) egy pont után már csak a fajlagosság kárára lehetséges, maximális helyett célszerűbb lehet optimális érzékenységre törekednünk. A vírusreplikáció sajátosságainak figyelembevétele nem kerülhető meg, hiszen nem víruspartikulák és teljes genomok adott számát mutatjuk ki, hanem az egy időben jelen lévő szekvenciák összességét. Az optimális célsekvenciák eltérőek lehetnek különböző helyzetekben: egy tünetes személynél megfelelő differenciáldiagnózis mellett elsődleges szempont a legjobb érzékenység elérése, így a célgén minél szélesebb palettájának használata indokolt; egy prevalenciát vizsgáló epidemiológiai felmérés számára a stabilan expresszálódó *N*-gén látszik a legalkalmasabbnak. A kontaktok szűrése és a felszabadító vizsgálatok kényes területet jelentenek: bár a detektálható vírusgén és a Ct-értékek minden bizonnyal összefüggnek a fertőzőképességgel, a preanalitikai szakasz eseményei és a mérés technikai jellemzői (beleértve a kitek eltéréseit) olyan fokú bizonytalansági tényezőt jelentenek, hogy egy nem negatív eredmény esetében a fertőzőképességet kizáró paramétereket megjelölni nem látszik célszerűnek, emiatt a hangsúly inkább a vizsgálat szabályozott indikációján van. Saját korábbi eredményeink szerint is akár az esetek 15%-ában felmerül az elégtelen mintavétel lehetősége [5], ennek felismerésében segítséget a tesztekbe épített sejtkontroll jelenthetne (más légúti mintából végzett vizsgálatok esetében is). Ugyanakkor amennyiben mind egyéni (például súlyos alapterbetegség), mind epidemiológiai (például egészségügyi dolgozó) rizikótól mentes tünetmentes személy szűrővizsgálatára kerül sor, az *E*-gén vizsgálatának mellőzése látszik célszerűnek, amennyiben rendelkezésre áll olyan PCR-teszt, amely legalább további kettő vírusgént detektál. A fentiek alól kivételt jelenthet a sürgősségi, elsősorban preoperatív diagnosztikában a Cepheid Xpert

PCR-teszt (*N* + *E* gének), amely esetében a kétes eredmények aránya az eddigiekben nem volt számottevő (1539 vizsgálatból 0,13%).

Fontos figyelembe vennünk, hogy a pozitivitás várható aránya a tesztelték között alapvetően befolyásolja az eredmény relevanciáját: amennyiben vizsgálati csoportban a tényleges prevalencia 1–2% csupán, az eredmény információértelmezése bizonytalanná válik. Emellett említést érdemel, hogy a tesztelési stratégiától függően a nasopharyngealis mintából végzett PCR a preszimptomatikus esetek mintegy felét lehet képes azonosítani még többszöri mintavétel mellett is [20]. A pozitív prediktív érték maximalizálásának egyetlen kínálkozó eszköze a szűrővizsgálatok lehetőség szerinti leginkább célzott és standardizált végzése tüneti és epidemiológiai kritériumok alapján. A kampányszerű, tömeges „lakossági szűrés” járványügyi hasznossága jelentős költségek mellett is kérdéses, és akár kedvezőtlen hatású is lehet, amennyiben jelentős számban idéz elő fals eredményeket, illetve hamisan kelt biztonságérzetet.

Anyagi támogatás: A jelen munka semmilyen forrásból nem részesült anyagi támogatásban.

Szerzői munkamegosztás: Az első szerző által írt kéziratot a társszerzők számos ponton kiegészítették. A végleges szövegváltozatot minden szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] Tresó B. Real-time PCR. In: Takács M. (ed.) Clinical and epidemiological virology. [Real-time PCR. In: Takács M. (szerk.) Klinikai és járványügyi virológia.] Vox Medica Kiadó, Budapest, 2010; pp. 115–126. [Hungarian]
- [2] V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol.* 2021; 19: 155–170.
- [3] Graham RL, Baric RS. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J Virol.* 2010; 84: 3134–3146.
- [4] Zóka A, Bekó G. Distinct changes in the real-time PCR detectability of certain SARS-CoV-2 target sequences. *Clin Chim Acta* 2020; 507: 248–249.
- [5] Zóka A, Bekó G. Does the E gene provide additional information in SARS-CoV-2 PCR? *J Infect Chemother.* 2021; 27: 1676–1677.
- [6] Rahman MS, Hoque MN, Islam MR, et al. Mutational insights into the envelope protein of SARS-CoV-2. *Gene Rep.* 2021; 22: 100997.
- [7] Tahan S, Parikh BA, Droit L, et al. SARS-CoV-2 E gene variant alters analytical sensitivity characteristics of viral detection using a commercial reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2021; 59: e0007521.
- [8] Artesi M, Bontems S, Göbbels P, et al. A recurrent mutation at position 26340 of SARS-CoV-2 is associated with failure of the E gene quantitative reverse transcription-PCR utilized in a commercial dual-target diagnostic assay. *J Clin Microbiol.* 2020; 58: e01598-20.

- [9] Freire-Paspuel B, Garcia-Bereguian MA. Analytical and clinical evaluation of “AccuPower SARS-CoV-2 multiplex RT-PCR kit (Bioneer, South Korea)” and “Allplex 2019-nCoV assay (Seegene, South Korea)” for SARS-CoV-2 RT-PCR diagnosis: Korean CDC EUA as a quality control proxy for developing countries. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11: 630552.
- [10] Huang J, Zheng L, Li Z, et al. Kinetics of SARS-CoV-2 positivity of infected and recovered patients from a single center. *Sci Rep.* 2020; 10: 18629.
- [11] La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020; 39: 1059–1061.
- [12] Singanayagam A, Patel M, Charlett A, et al. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25: 2001483.
- [13] Cao S, Gan Y, Wang C, et al. Post-lockdown SARS-CoV-2 nucleic acid screening in nearly ten million residents of Wuhan, China. *Nat Commun.* 2020; 11: 5917.
- [14] Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, et al. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 2012; 113: 1014–1026.
- [15] Sidstedt M, Hedman J, Romsos EL, et al. Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. *Anal Bioanal Chem.* 2018; 410: 2569–2583.
- [16] Jue E, Witters D, Ismagilov RF. Two-phase wash to solve the ubiquitous contaminant-carryover problem in commercial nucleic-acid extraction kits. *Sci Rep.* 2020; 10: 1940.
- [17] Kreader CA. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62: 1102–1106.
- [18] Bordelon H, Russ PK, Wright DW, et al. A magnetic bead-based method for concentrating DNA from human urine for downstream detection. *PLoS ONE* 2013; 8: e68369.
- [19] Freppel W, Merindol N, Rallu F, et al. Efficient SARS-CoV-2 detection in unextracted oro-nasopharyngeal specimens by rRT-PCR with the Seegene Allplex™ 2019-nCoV assay. *Virology.* 2020; 17: 196.
- [20] Hellewell J, Russell TW, the SAFER Investigators and Field Study team, et al. Estimating the effectiveness of routine asymptomatic PCR testing at different frequencies for the detection of SARS-CoV-2 infections. *BMC Med.* 2021; 19: 106.

(Zóka András dr.,
Budapest, Albert Flórián út 5–7., 1097
e-mail: zoka.andras@dpckorhaz.hu)

PÁLYÁZAT

A Prof. Dr. Romics László Akadémikus Emlékére Alapítvány pályázatot hirdet Magyarországon dolgozó, magyar állampolgárságú, 40 éven aluli orvosok és orvosbiológiai kutatással foglalkozó személyek számára. A nyertes pályázó(k) között 500 000 Ft alapítványi adomány, illetve különdíjak kerülnek kiosztásra.

A pályázat célja: a klinikai gyógyítás, vagy orvosi tudományos kutatás területén dolgozók kiemelkedő tudományos tevékenységének elismerése.

Előnyt élveznek azok a pályázók, akik az Alapítvány névadójának munkásságát folytatva cardiovascularis és anyagcsere-betegségek területéről nyújtanak be pályázatot.

A pályázat benyújtásának határideje: **2022. február 28.** (elbírálásának határideje: 2022. április 30.)

A pályázatot a palyazat@romicsalapitvany.hu e-mail címre elektronikus aláírással ellátva (ügyfélkapuval létrehozott AVDH aláírás is megfelelő), PDF formátumban kell benyújtani.

A pályázatot természetes személy, saját nevében, magyar nyelven nyújthatja be, a pályázati anyag ábrák nélkül maximum 15.000 leütés (karakter) terjedelmű lehet. A pdf fájl mérete nem haladhatja meg a 25 MB-ot. A pályázathoz a fentiekhez azonos módon, külön pdf formátumú fájlban mellékelni kell rövid szakmai életrajzot, a születési idő, lakcím és telefon elérhetőségek megjelölésével. A szakmai önéletrajz végén nyilatkozni kell, hogy a pályázó a közölt személyes adatoknak a Romics Alapítvány által történő kezeléséhez hozzájárul, tudomásul veszi, hogy a Kuratórium minden tagja megismerheti adatait és pályázatát. A pályázatot papíron kinyomtatott formában **nem kell** megküldeni.

Az Alapítvány adatairól, működéséről az alapítvány honlapján – www.romicsalapitvany.hu – található információ.