

LIETUVOS RESPUBLIKOS PREZIDENTO INICIJUOTOS SVEIKATOS EKSPERTŲ TARYBOS

Rekomendacijos dėl COVID-19 testavimo ir identifikavimo priemonių tobulinimo

2020 m. lapkričio 16 d., Vilnius

Testavimas

Nuo COVID-19 pandemijos pradžios diagnostikos laboratorijos daugiausia taiko nukleorūgščių amplifikacija paremtus didelio specifiškumo ir jautrumo testus (pvz., AT-PGR) viruso genetinei medžiagai nustatyti. Šie testai Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO), JAV ligų kontrolės ir prevencijos centro (CDC), Europos ligų kontrolės ir prevencijos centro (ECDC) yra pripažinti kaip tinkamiausi SARS-CoV-2 infekcijai nustatyti (1, 2). Lapkričio 6 d. duomenimis, Lietuvoje atlikta daugiau nei 400 000 AT-PGR testų 1 mln. gyventojų (3). Pagal šį rodiklį Lietuva priskiriama prie pirmaujančių ES šalių.

AT-PGR testai yra tikslūs ir jautrūs, tačiau testo atlikimo procedūra yra gana sudėtinga, reikalaujanti aukštos kvalifikacijos ir sudėtingos įrangos. Šie testai taip pat yra brangūs – vieno testo savikaina siekia apie 30 eurų. Daugėjant užsikrėtimo atvejų ir didėjant testavimo apimtims, ilgėja laboratorinio ištyrimo ir atvejų identifikavimas, nes susiduriama su kvalifikuoto personalo, įrangos našumo, tolygaus laboratorinio testavimo apimčių paskirstymo trūkumu. Šiuo metu ištiriama po 12–14 tūkst. mėginių per parą, todėl laboratorijų pajėgumai yra išnaudoti ir jau nebėra galimybių reikšmingai padidinti testavimo apimčių ar pagreitinti testavimo procedūros. Aktyvios infekcijos atvejų nustatymo greitis yra kritinis kontroliuojant infekcijos židinius.

Greitieji antigeno testai

Europos Komisija 2020 10 28 paskelbė rekomendacijas dėl testavimo apimčių didinimo ir greitųjų antigeno testų naudojimo (4). Šalys, prasidėjus antrajai pandemijos bangai, pradeda taikyti greituosius antigeno testus, tačiau bendros strategijos nėra. Pvz., Slovakijoje greitieji antigenų testai buvo panaudoti masiniam populiacijos testavimui – per 2 dienas buvo ištirta 3,5 mln. gyventojų, tarp jų rasta apie 38 tūkst. infekuotų asmenų, jiems rekomenduota izoliuotis (5). Slovakijoje įsigytų testų (13 mln.) kaštai sudaro >50 mln. Eur.

Greitųjų antigeno testų jautrumas siekia apie 20 000 viruso kopijų, t. y. jis yra apie 1000 kartų mažesnis nei molekulinį (RT-PGR) testų. Greitųjų antigenų testai pasižymi dideliu jautrumu nustatant aktyvią infekciją, esant nedideliems viruso kiekiams galimi klaidingai neigiami testo rezultatai. Testų privalumas yra maža kaina (~5–6 Eur), paprastumas ir greitis (15 min.). Jų rezultatas matomas plika akimi, nereikia jokios specialios įrangos.

Taikant tinkamus greitųjų antigeno testų panaudojimo algoritmus, klaidingai neigiamų rezultatų rizika gali būti sumažinama iki minimumo. Kartu būtų taupomos valstybės lėšos, sutrumpinama naujų infekcijos atvejų nustatymo trukmė, greičiau izoliuojami lengvai sergantys ar besimptomiai asmenys, o sunkiau sergantieji laiku nukreipiami gydymui. Todėl greitųjų antigeno testų naudojimas būtų tikslingas valdant pandemiją.

PSO rekomenduoja naudoti greituosius antigeno testus, kurių jautrumas bent > 80 %, o specifiškumas – > 97 %. Šiuo metu kaupiami validavimo duomenys apie greituosius antigeno testus rodo, kad kai kurių gamintojų testų jautrumas ir specifiškumas viršija 90 ir 99 %, atitinkamai (6, 7).

Rekomendacijos dėl greitujų antígeno testų naudojimo

Testavimui rekomenduojama įsigyti validuotus greituosius antígeno testus, kurie, užsienio šalyse atliktos nepriklausomos validacijos duomenimis, pasižymi geriausiomis jautrumo ir specifiškumo charakteristikomis.

Testus reikėtų naudoti 5–7 dieną nuo simptomų pradžios arba po buvusio kontakto, kai tikėtinas didžiausias viruso kiekis nosiaryklės mėginiuose.

Testus tikslinga naudoti decentralizuotam testavimui infekcijos židiniuose, rizikos įstaigose (pvz., globos namuose), simptominiams arba kontaktą turėjusiems asmenims testuoti, odontologijos klinikų pacientams testuoti, pritaikant diferencijuotus testavimo algoritmus, kurie turėtų būti parengti remiantis PSO rekomendacijomis, moksliniais duomenimis ir kitų šalių patirtimi.

Testavimas greitaisiais antígeno testais gali būti atliekamas mobiliuosiuose punktuose, karščiavimo klinikose.

Priėmimo skyriuose ar ligoninėse greitieji testai galėtų būti naudojami nesant galimybės atlikti molekulinio tyrimo: teigiamas testo rezultatas patvirtintų infekciją, o gavus neigiamą rezultatą būtina atlikti PGR tyrimą (RT-PGR arba greitąjį PGR).

LRV sudaryta medikų darbo grupė yra parengusi rekomendacijas dėl greitujų antígeno testų naudojimo ir pateikusi jas Sveikatos apsaugos ministerijai. Tikslinga jomis remtis, kuriant testavimo algoritmus.

Pacientų, turinčių gretutinių ligų, greitesniam hospitalizavimui ir specializuotam gydymui, Lietuvos didžiosiose ligoninėse turi būti toliau užtikrinti resursai ir įranga atlikti greituosius PGR testus.

Plečiant SARS-CoV-2 testavimo apimtį tiek valstybinėse, tiek privačiose laboratorijose, tikslinga tobulinti laboratorinės diagnostikos reglamentavimą ir diagnostikos kokybę priežiūrai, užtikrinti tinkamas diagnostinių metodų standartizavimo ir validavimo procedūras.

Serologiniai tyrimai

Serologiniai testai parodo virusui specifiskus antikūnus, kurie yra humoralinio imuninio atsako į infekciją rodiklis. SARS-CoV-2 infekcijos metu IgM ir IgG klasės antikūnai susidaro gana vėlai – praėjus 10–14 dienų po teigiamo PGR testo arba simptomų pasireiškimo. Todėl serologiniai testai netinka ūmios SARS-CoV-2 infekcijos diagnostikai, bet tinka persirgusiems asmenims identifikuoti. Susidarę antikūnai kraujyje išlieka daug ilgiau (kelis mėnesius) nei virusas nosiaryklėje (kelias dienas).

Lietuvoje atlikti SARS-CoV-2 židinio serologiniai tyrimai, paėjus 2 ir 6 mėnesiams po užregistruoto protrūkio, parodė, kad daugiau nei 95 proc. persirgusių asmenų, net ir tų, kurie persirgo besimptomė infekcija, turi virusui specifiskų antikūnų, kurie išlieka 6 mėnesius po persirgimo. Panašius duomenis apie antikūnų išsilaikymą pateikia kitose šalyse atlikti serologiniai tyrimai (8).

Daugelyje šalių, taip pat ir Lietuvoje, atlikti plataus masto seroepidemiologiniai tyrimai (9, 10). Keičiantis epidemiologinei situacijai, tokius tyrimus tikslinga kartoti.

Platesnis serologinių tyrimų taikymas bei tiksliniai infekcijos židinių tyrimai leistų įvertinti tikrąjį viruso paplitimo mastą, neaplenkiant ir besimptomųjų nešiotojų, kurie nebuvo tirti molekuliniais metodais. Serologinių tyrimų taikymas kartu su PGR (arba greitaisiais antígeno testais) protrūkio pradžioje arba aktyviame židinyje gali suteikti vertingos informacijos apie protrūkio šaltinį, nes anksčiau užsikrėtę asmenys jau gali turėti antikūnų. Tai leistų tiksliau

prognozuoti infekcijos plitimą, įvertinti užsikrėtimo rizikas. Vėlesni infekcijos židinių serologiniai tyrimai parodytų infekcijos išplitimo mastą. Serologinių tyrimų duomenys būtų naudingi prognozuojant pandemijos eigą bei padėtų priimti sprendimus dėl ekonomiką ribojančių priemonių įvedimo arba atšaukimo.

Šiuo metu rinkoje yra daug serologinių testų – tiek greitųjų kokybinių (kurie parodo tik antikūnų buvimą ar nebuvimą), tiek kiekybinių (kurie nustato antikūnų lygį). Pastarieji testai gali būti naudingi sekant imuninio atsako dinamiką – antikūnų lygio kitimą. Serologinių testų yra įsigijusios tiek privačios, tiek valstybinės gydymo įstaigos. Tačiau dauguma rinkoje esančių greitųjų serologinių testų, nors ir turi CE IVD žymėjimą, nėra perėję tinkamų validacijos procedūrų, todėl, prieš juos taikant serologiniams tyrimams, būtina įvertinti jų patikimumą (jautrumą, specifiškumą), lyginant su validuotais diagnostiniais testais.

Lietuva yra įsigijusį 500 000 greitųjų serologinių testų. LR SAM ir Akreditacijos tarnybos pavedimu atliktas šių testų patikimumo įvertinimas. Nustatyta, kad šių testų specifiškumas yra 99,6 %, jautrumas – 92 % (11). Šie greitieji testai naudojami ne tik Lietuvoje, bet ir kitose šalyse (12).

Rekomendacijos dėl serologinių tyrimų naudojimo

Daugėjant infekcijos atvejų Lietuvoje, tikslinga plačiau taikyti serologinius tyrimus, didinti jų prieinamumą, o testavimo duomenis kaupti bendroje duomenų bazėje (E-sveikata), siekiant įvertinti visuomenės persirgimo mastą.

Serologiniams tyrimams rekomenduojama naudoti validuotus serologinius testus, kurių specifiškumas yra ne mažesnis nei 99,5 %, jautrumas – ne mažesnis nei 90 %.

Šiuos testus rekomenduojama naudoti praėjus ne mažiau nei 14 dienų po simptomų pradžios arba teigiamo PGR testo, nes jie netinka ūmios infekcijos diagnostikai, o IgM antikūnų nustatymas neparodo ūmios infekcijos,

Remiantis CDC rekomendacijomis, serologinius testus tikslinga naudoti pažengusios COVID-19 ligos diagnozei patvirtinti, esant būdingiems simptomams, bet neigiamam PGR testui (13).

Siekiant padidinti serologinių tyrimų prieinamumą, tikslinga šiuos tyrimus atlikti ne tik asmens sveikatos priežiūros įstaigose, bet ir mobiliuosiuose punktuose, naudojant valstybės įsigytus ir validuotus greituosius serologinius testus. Didėjant užsikrėtimų skaičiui ir nepajėgiant molekuliniais testais laiku iširti visų simptomus jautusių ar kontaktą turėjusių asmenų, turi būti suteikta galimybė visiems norintiems atlikti serologinį testą ir nustatyti persirgtą infekciją.

Serologinius tyrimus tikslinga atlikti infekcijos židiniuose, siekiant įvertinti infekcijos išplitimo mastą bei identifikuoti persirgusius asmenis, kuriems nebuvo atliktas PGR testas. Tikslinga atlikti serologinį testą 2 kartus – protrūkio pradžioje kartu su PGR testu (siekiant nustatyti infekcijos šaltinį), ir praėjus 1–2 mėnesiams po protrūkio suvaldymo (siekiant įvertinti infekcijos išplitimo mastą).

Serologinius testus rekomenduojama naudoti kuo platesniam medicinos darbuotojų testavimui, naudojant panašų algoritmą kaip infekcijos židinių tyrimams.

Remiantis mokslinių tyrimų duomenimis, PSO, CDC rekomendacijomis ir kitų šalių patirtimi, būtina parengti aiškias rekomendacijas dėl persirgusių asmenų, turinčių teigiamą serologinio testo rezultatą, saviizoliacijos ir kitų apribojimų tikslingumo. Šiuo metu CDC nėra pateikusi tokių rekomendacijų, bet joms atsiradus visuomenė turi būti nedelsiant informuota.

COVID-19 (SARS-Cov-2) viruso pilno genomo analizė

Daugelyje šalių atliekama cirkuliuojančių SARS-CoV-2 izoliatų pilno genomo sekoskaita, siekiant įvertinti viruso mutacijų riziką ir jų dažnį, taip pat prognozuoti būsimųjų vakcinų bei kuriamų biofarmacinių antikūnų efektyvumą. Šie duomenys kaupiami GISAID duomenų bazėje (14). Šiuo metu bazėje jau paskelbta daugiau nei 190 000 SARS-CoV-2 genomo sekų iš viso pasaulio, duomenys nuolat papildomi. GISAID duomenų bazėje paskelbta keliasdešimt Lietuvoje cirkuliuojančio viruso izoliatų genomų sekų. Virusų genomo tyrimai atlikti mokslininkų iniciatyva.

SARS-CoV-2 genomo tyrimai itin svarbūs ne tik Lietuvos, bet ir tarptautiniu mastu, stebint viruso plitimo kelius ir registruojant mutacijas, kurios gali sumažinti kuriamų vakcinų efektyvumą. Neseniai Danijoje, audinių fermose, aptikti SARS-CoV-2 variantai, kurie turi viruso S baltymo sekos mutaciją (14). Dėl šios mutacijos susilpnėja virusą neutralizuojančių antikūnų poveikis. Šie viruso variantai jau aptikti ir kitose šalyse – Nyderlanduose, Švedijoje. Jei tokie pakitę viruso variantai išplistų, tai galimai sumažintų dabar kuriamų vakcinų veiksmingumą.

Tai parodo būtinybę nuolat stebėti viruso genomo pokyčius, atliekant skirtinguose Lietuvos regionuose cirkuliuojančių viruso izoliatų pilno genomo sekoskaitą ir sekų bioinformatinę analizę.

Rekomendacijos dėl COVID-19 (SARS-Cov-2) viruso pilno genomo analizės vykdymo

Daugėjant informacijos apie viruso SARS-CoV-2 genomo mutacijas genuose, koduojančiuose viruso baltymus, svarbius virulentiškumui ir naudojamus kaip taikinius viruso detekcijai RT-PGR bei kaip antigenines determinantes vakcinų kūrimui, tikslinga inicijuoti Lietuvoje cirkuliuojančių SARS-CoV-2 viruso genomų sekoskaitos reguliarius ir plataus masto tyrimus, siekiant nustatyti mutacijų profilį ir galimą jo poveikį virulentiškumui, diagnostikos ir numatomų vakcinavimo priemonių efektyvumui.

Lietuvoje cirkuliuojančio viruso pilnos genomo sekos būtų teikiamos į GISAID duomenų bazę ir lyginamos su kitose šalyse cirkuliuojančių virusų sekų duomenimis.

Viruso genomo tyrimai turi būti atliekami nuolat, tam užtikrinant reikalingą finansavimą. Tikslinga atlikti 50–100 izoliatų genomų sekų analizę per mėnesį (600–1200 sekų per metus).

Šaltiniai:

1. Centers for Disease Control and Prevention. URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/virus-requests.html>
2. European Centre for Disease Prevention and Control. URL: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/TestingStrategy_Objective-Sept-2020.pdf
3. Our World in Data. URL: <https://ourworldindata.org/coronavirus-testing#world-map-total-tests-performed-relative-to-the-size-of-population>
4. European Commission Recommendation of 28.10.2020. URL: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/preparedness_response/docs/covid19_testingstrategies_recommendation_en.pdf

5. Spoločna zodpovednosť. URL: <https://www.somzodpovedny.sk/>
6. Van Beek J, Igloi Z, Boelsums T et al. From more testing to smart testing: data-guided SARS-CoV-2 testing choices, MedRxiv, October 14, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.10.13.20211524>
7. Validation Report. URL: https://www.hug.ch/sites/interhug/files/structures/laboratoire_de_virologie/documents/Centre_maladies_virales_infectieuses/ofsp_rdt_report_gcevd_27.10.2020.pdf
8. Ripperger TJ, Uhrlaub JL, Watanabe M et al. Orthogonal SARS-CoV-2 Serological Assays Enable Surveillance of Low-Prevalence Communities and Reveal Durable Humoral Immunity. *Immunity*, Volume 53, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.10.004>
9. Stringhini S, Wisniak A, Piumatti G, et al. Seroprevalence of anti-SARS-CoV-2 IgG antibodies in Geneva, Switzerland (SEROCoV-POP): a population-based study. *The Lancet*, Volume 396, Issue 10247, 313 – 319.
10. COVID-19 sero-epidemiologinis suaugusių Lietuvos gyventojų tyrimas. URL: <https://ismuni.lt/media/dynamic/files/20525/covid-19>
11. Naumovas D, Kučinskaitė-Kodžė I, Sližienė A, Paulauskas M, Jaraminė V, Petraitytė-Burneikienė R, Žvirblienė A. Greitųjų serologinių testų patikimumo tyrimas. Gegužės 20 d. 2020
12. Jerković I, Ljubić T, Bašić Ž, et al. SARS-CoV-2 Antibody Seroprevalence in Industry Workers in Split-Dalmatia and Šibenik-Knin County, Croatia, *Journal of Occupational and Environmental Medicine*: September 08, 2020.
13. Centers for Disease Control and Prevention. URL: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>
14. GISAID. URL: <https://www.gisaid.org/>