

«SARS-CoV-2 от лабораторных исследований до клинического использования»



КОРОНАВИРУС

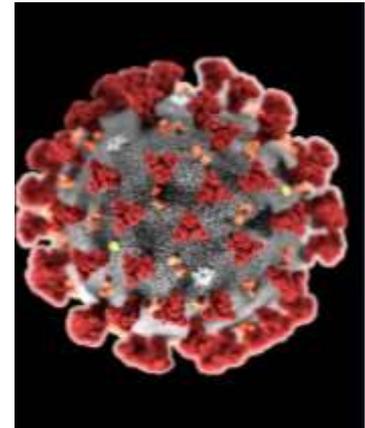
➤ Морфология: «**короноподобный**» внешний вид → длинный выступающий поверхностный белок (колос) длиной 20нм



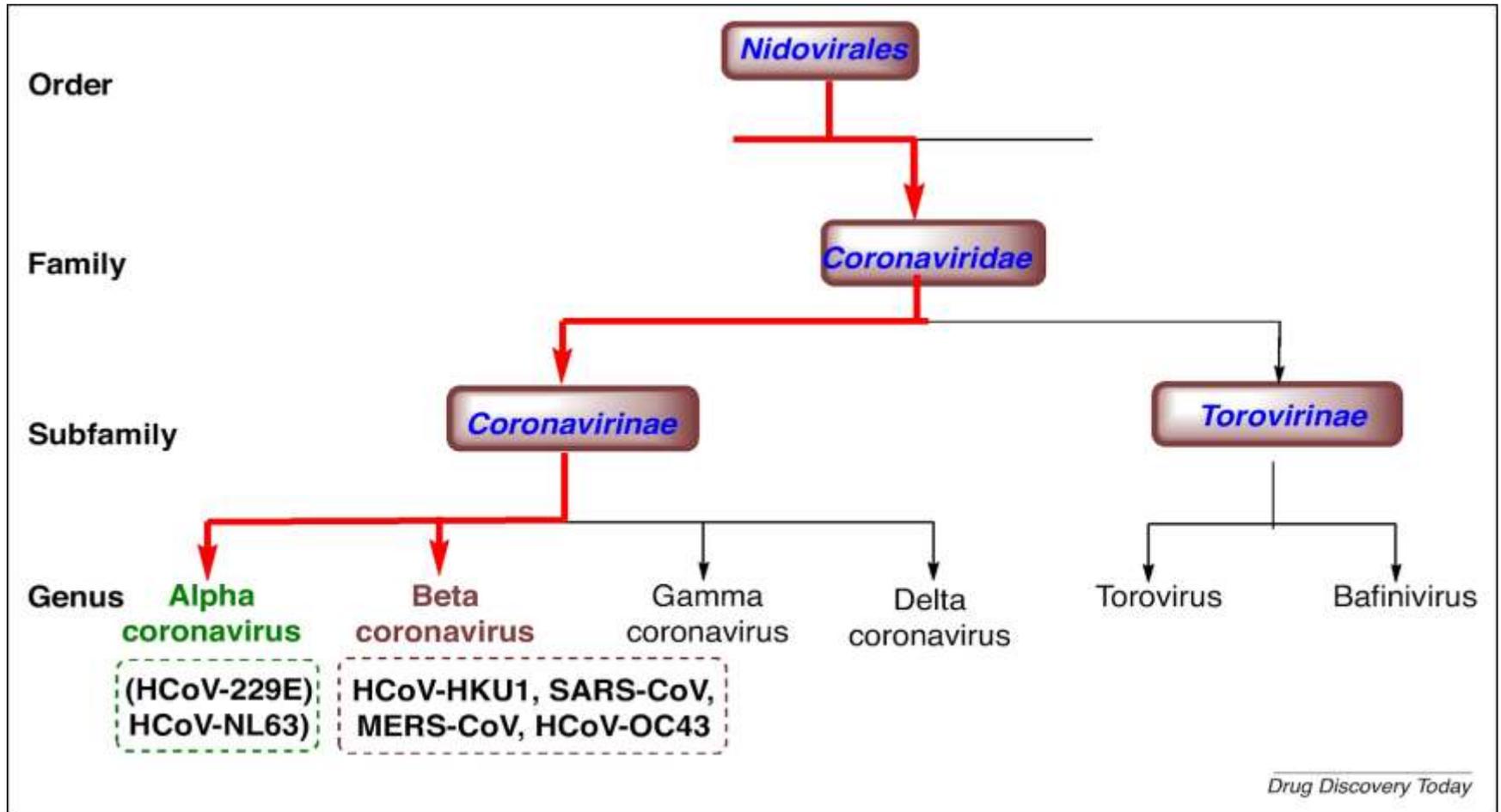
➤ вирионы: Плеоморфный (неправильной формы), Ø 80-160нм

➤ геном: Несегментированный (+) ssRNA, 27-32 kb
содержит 6 ORF

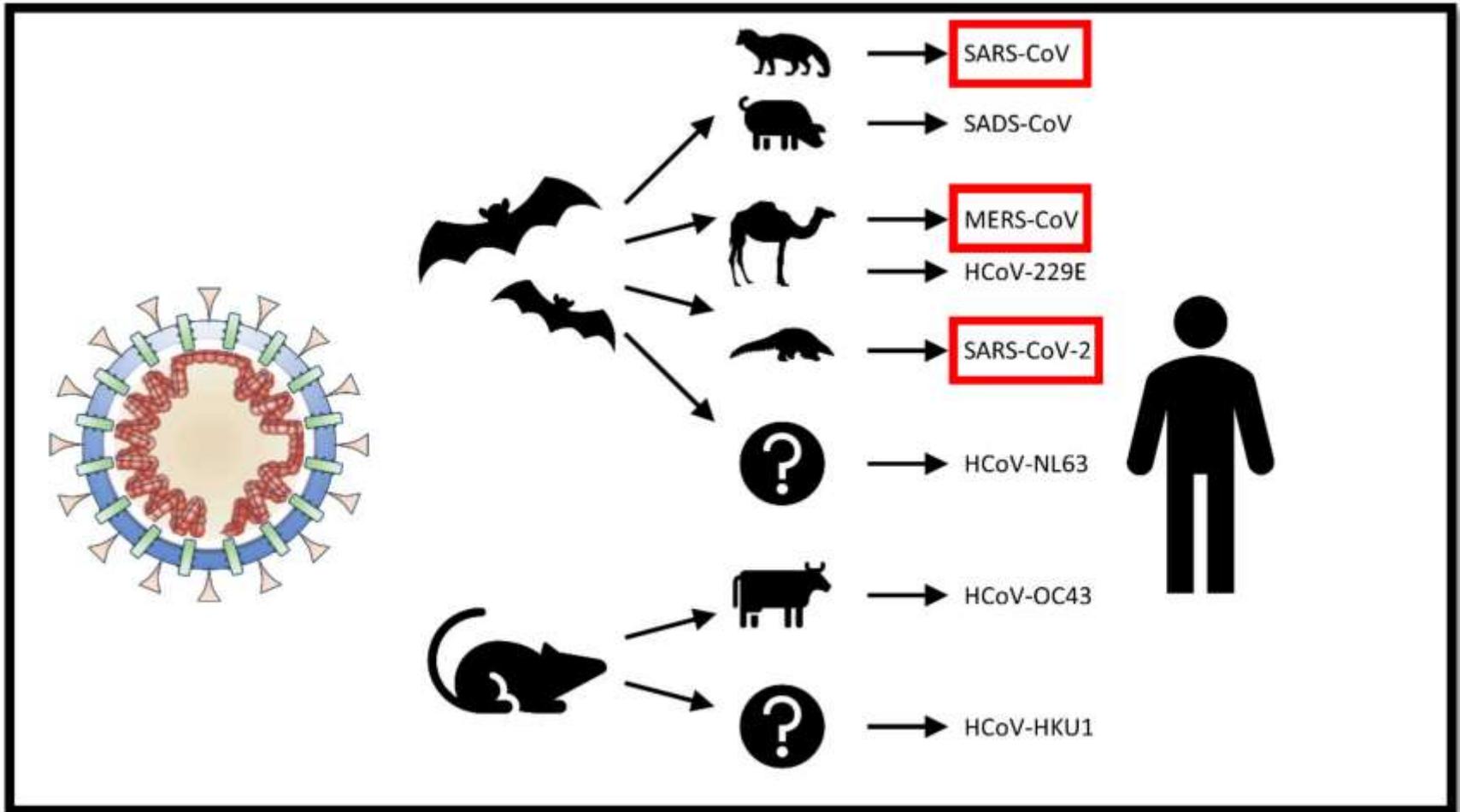
- M Мембранный белок, взаимодействующий с нуклеокапсидом
- S Спайковый белок, взаимодействует с клеточным рецептором и опосредует слияние с плазматической мембраной клетки-мишени
- E Белок оболочки, связанный с вирусной оболочкой
- HE Гемоагглютининовая активность (только II группа)



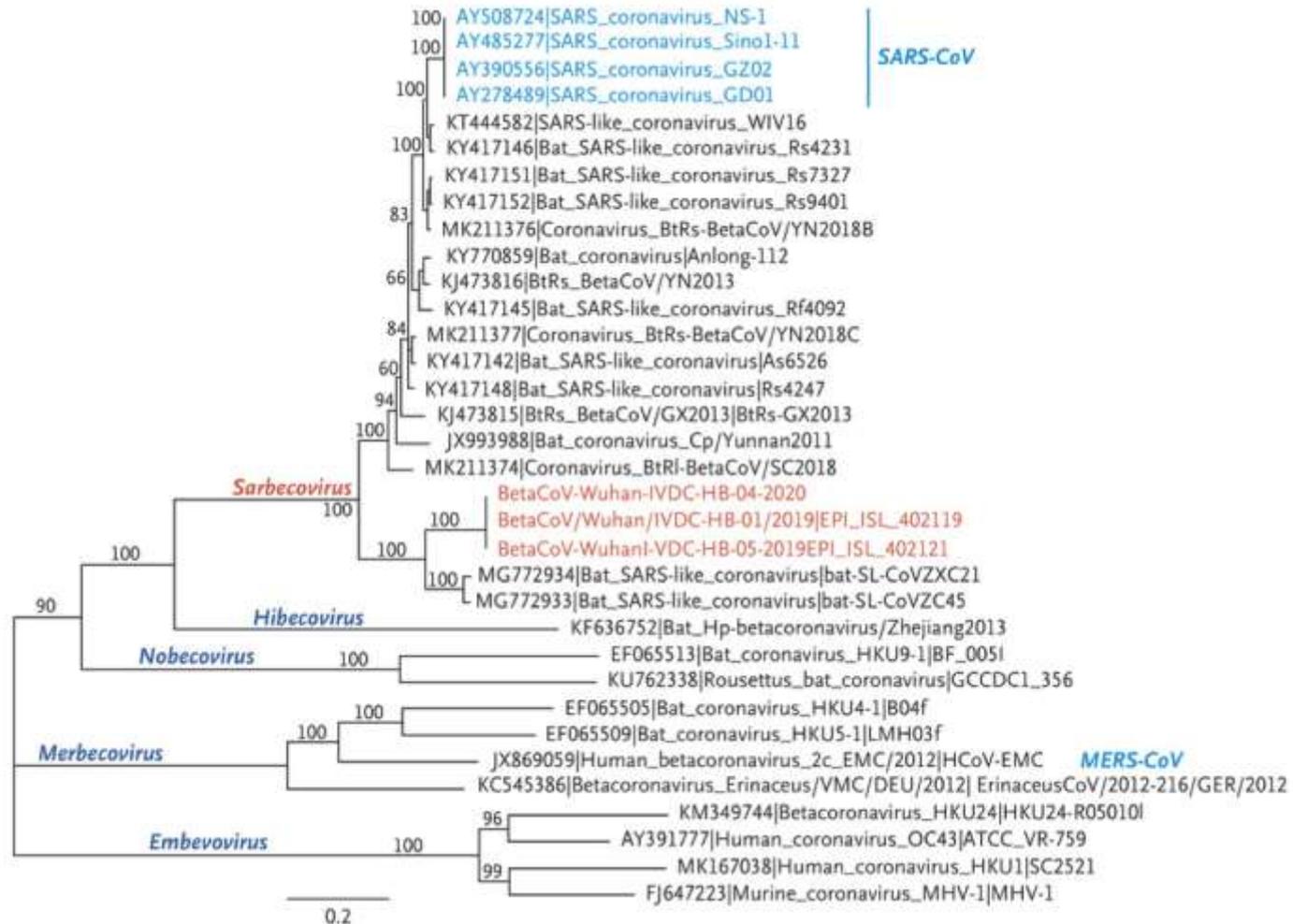
Коронавирус



Коронавирус



Генетический анализ: родство с другими вирусами



Динамика передачи

Передача SARS-CoV-2 происходит главным образом через дыхательные капельки.

Респираторные капли могут быть выделены путем чихания (40000 капель), кашля (3000 капель) или разговора (около 600 капель в минуту). Они также могут быть выделены в ходе медицинских процедур, таких как интубация и бронхоскопия, или процедур с использованием кислородных масок и небулайзеров.

Более крупные капли (> 60 микрон) имеют тенденцию распространяться примерно на 1 метр (3 фута) и требуют мер предосторожности, в то время как более мелкие капли распространяются дальше и требуют более строгих мер предосторожности.



Стойкость на поверхностях

При аэролизации SARS-CoV-2 остается жизнеспособным до 3 часов, что является критическим фактором для контроля внутрибольничной инфекции, особенно при проведении процедур аэролизации. Жизнеспособный SARS-CoV-2 измеряли на поверхностях до 4 часов на меди, 24 часа на картоне и 72 часа на пластике и нержавеющей стали.

Дезинфекция поверхности, такая как **62-71% этанола** или **0,5% перекиси водорода**, может инактивировать коронавирусы, которые сохраняются на поверхностях



Вертикальная передача

Вертикальная передача инфекций SARS или MERS не была задокументирована ранее.

Вопрос о том, может ли SARS-CoV-2 передаваться путем вертикальной передачи, от матери плоду или новорожденному во время беременности или в перинатальный период, не совсем ясен.



	SARS	MERS	COVID-19
Выкидыш	Зарегистрирован	Не зарегистрирован	?
Дистресс плода	Не зарегистрирован	Зарегистрирован	Зарегистрирован
Мертворождение	Зарегистрирован	Зарегистрирован	Зарегистрирован
Преждевременные роды	Зарегистрирован	Зарегистрирован	Зарегистрирован
Ограничение роста плода	Зарегистрирован	Не зарегистрирован	Зарегистрирован
Вертикальная передача	Не зарегистрирован	Не зарегистрирован	Не исключено
Дефекты рождения	Не зарегистрирован	Не зарегистрирован	?
Развитие нервной системы	Не зарегистрирован	Не зарегистрирован	?



SARS-CoV-2 геном

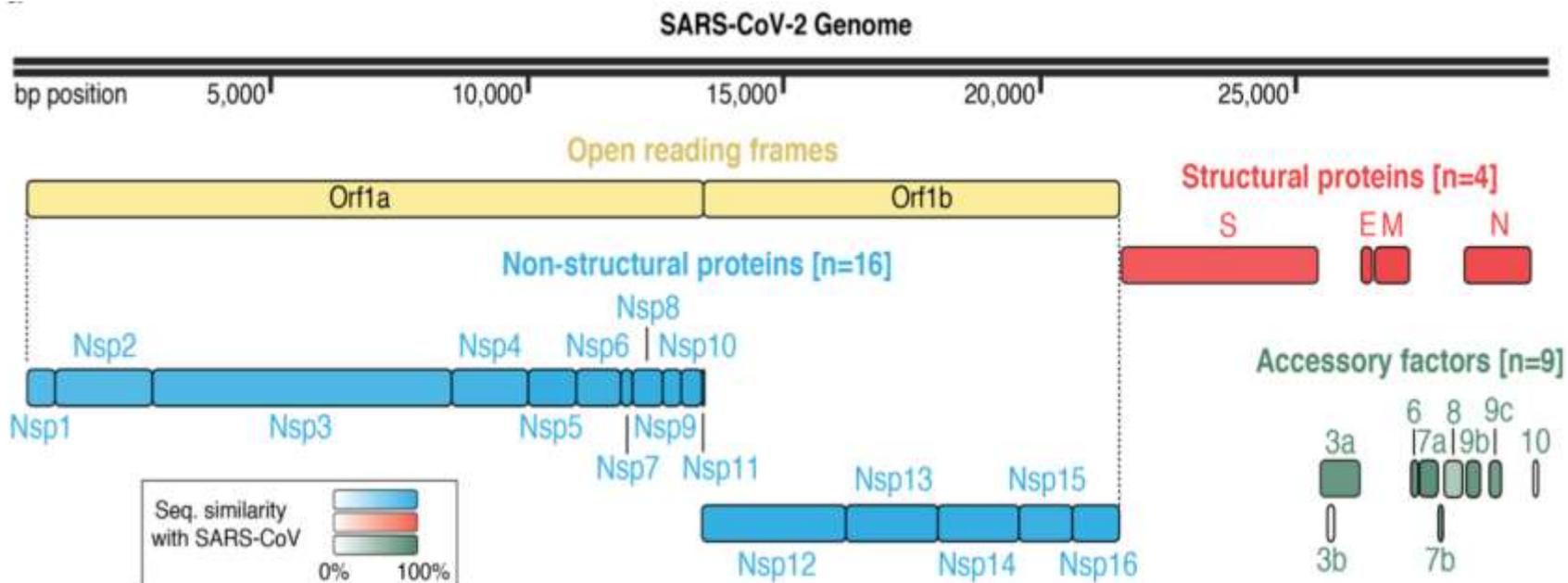
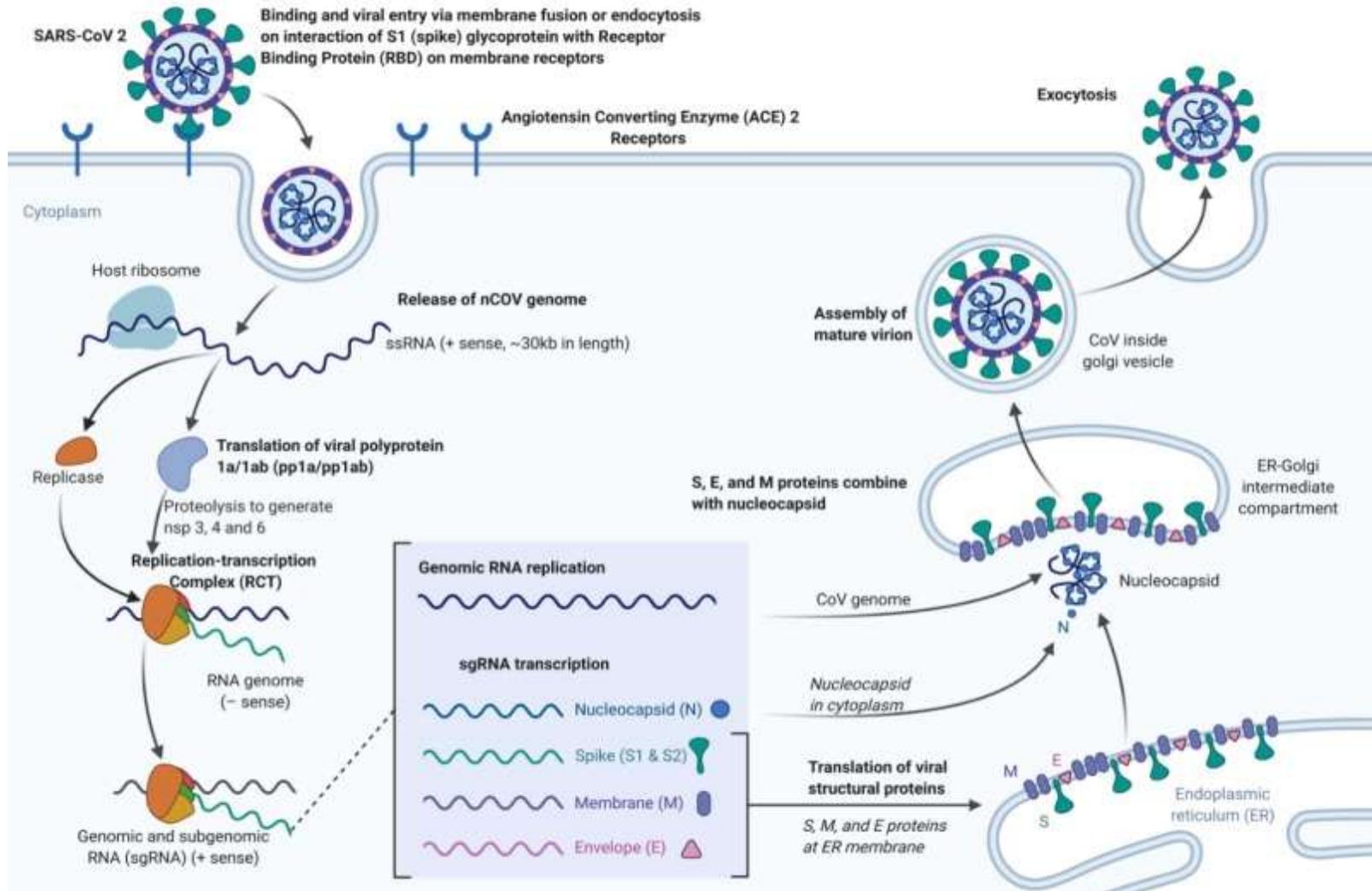


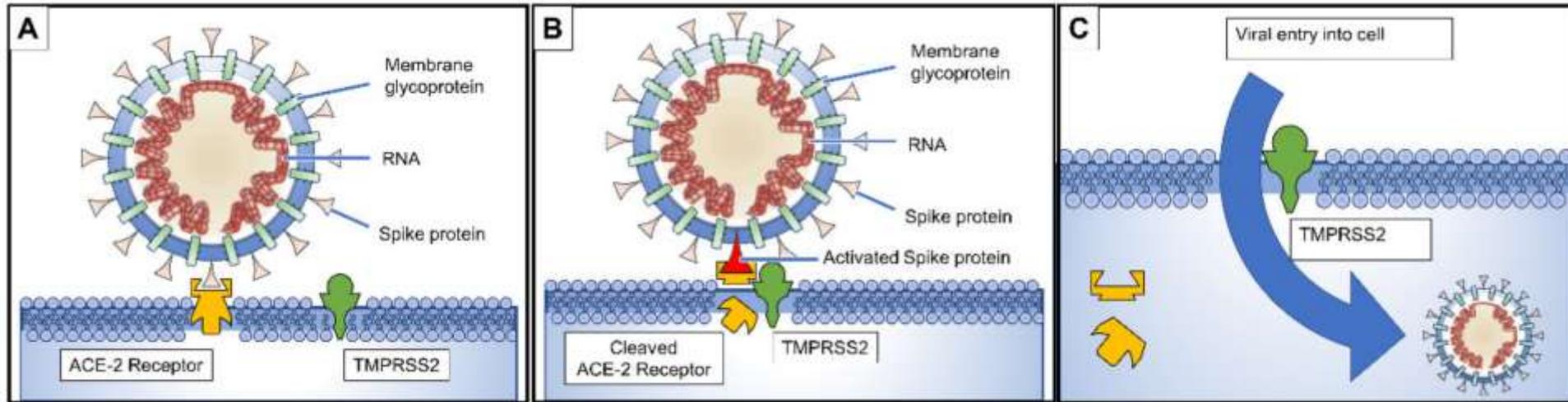
Рисунок заимствован из Collier, Oxford, Kellam, Human Virology 5e 2016.



Репликация коронавируса



Вхождение вируса: рецепторы

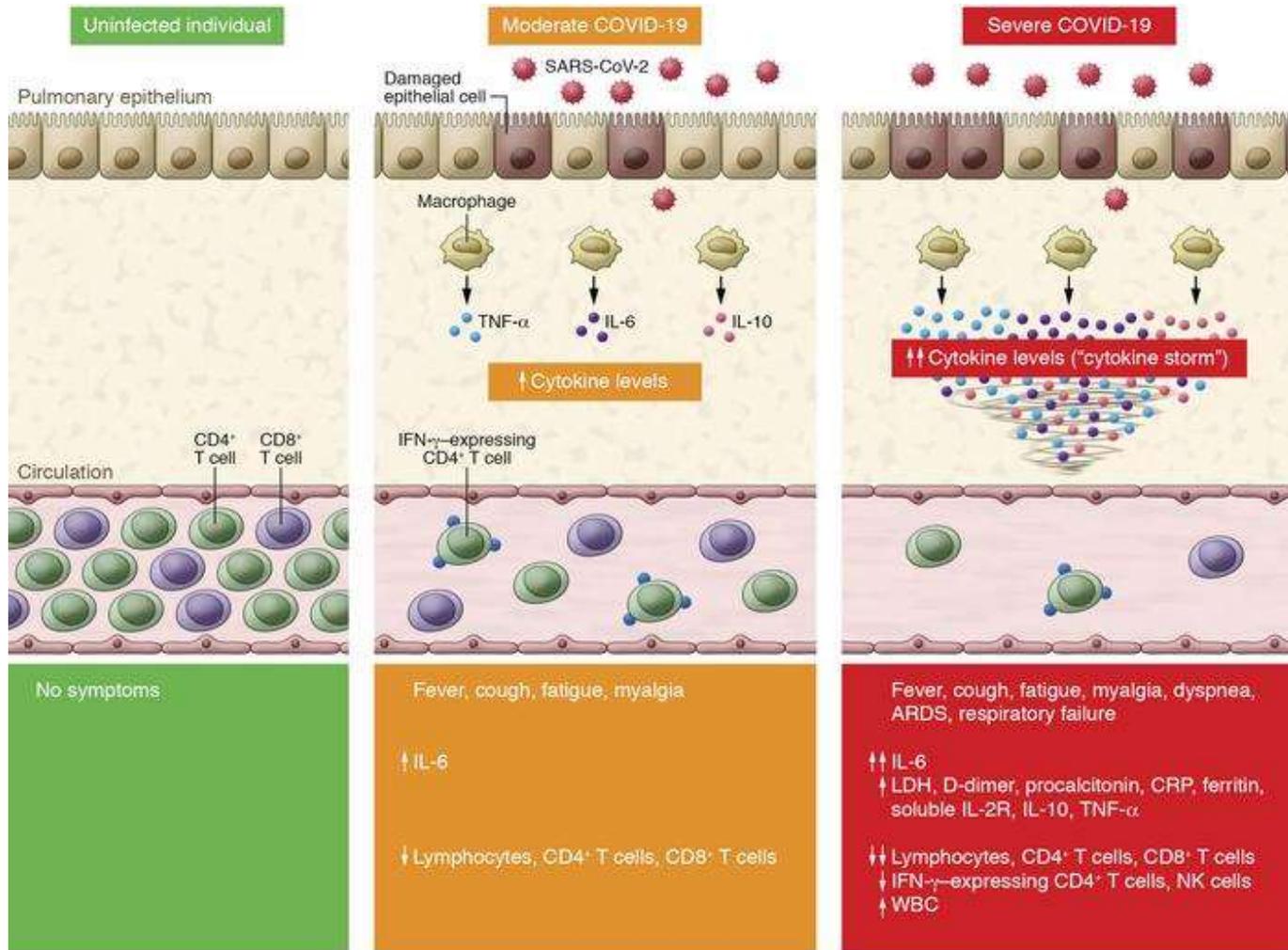


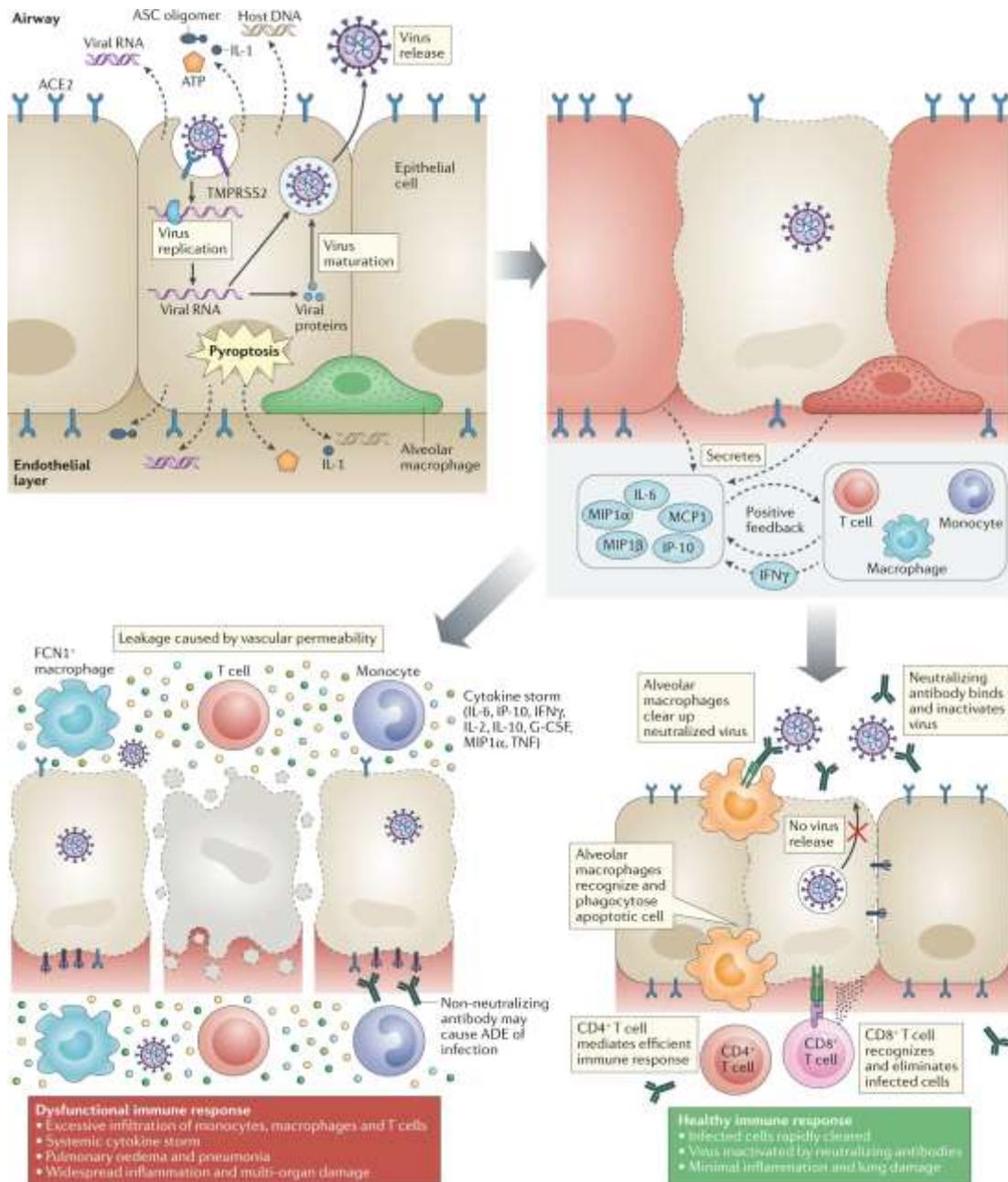
SARS-CoV-2 проникает в клетки-хозяева через взаимодействие с ACE2, трансмембранным белком в пневмоцитах типа 2 в альвеолах и кишечных эпителиальных клетках.

Связывание белка SARS-CoV-2 S с ACE2 вызывает конформационное изменение белка S, что позволяет протеолитическому расщеплению протеазами клеток-хозяев. TMPRSS2 представляет собой сериновую протеазу на мембране клетки-хозяина, которая расщепляет вирусный S-белок, расщепляя его, что обеспечивает слияние мембран вируса и клетки-хозяина.



SARS-CoV-2 (2019): патогенез

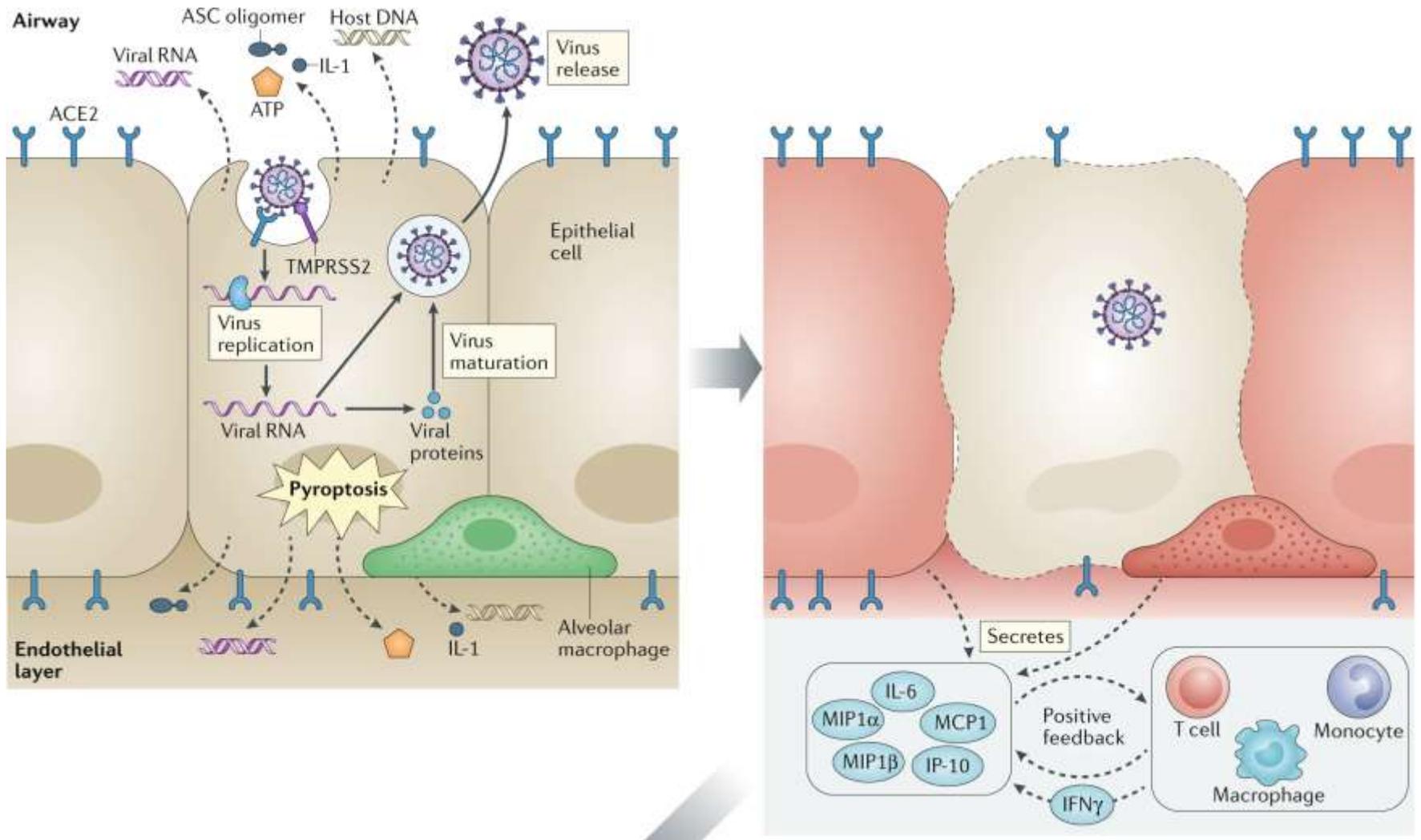




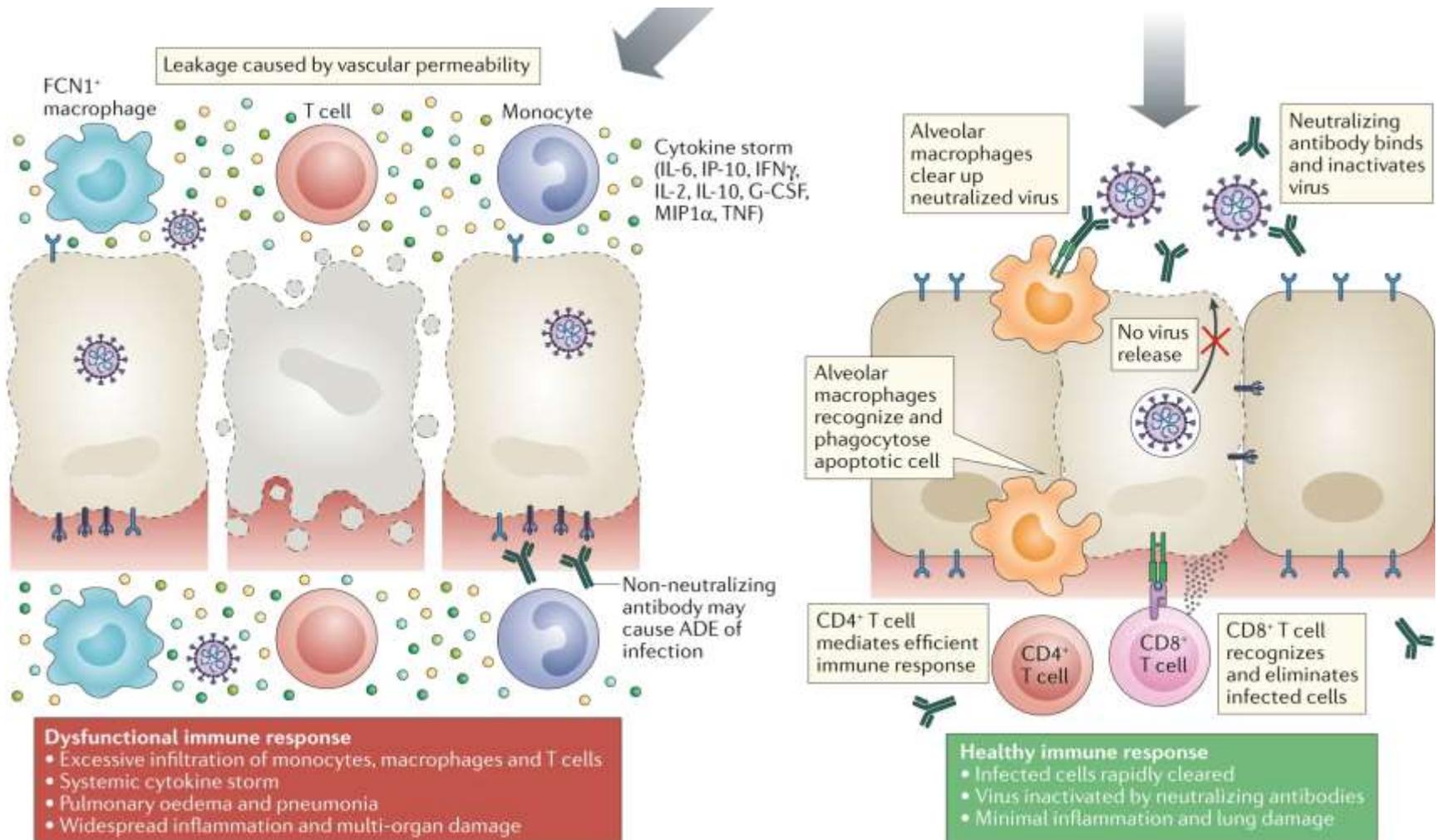
Хронология событий при заражении SARS-CoV-2.



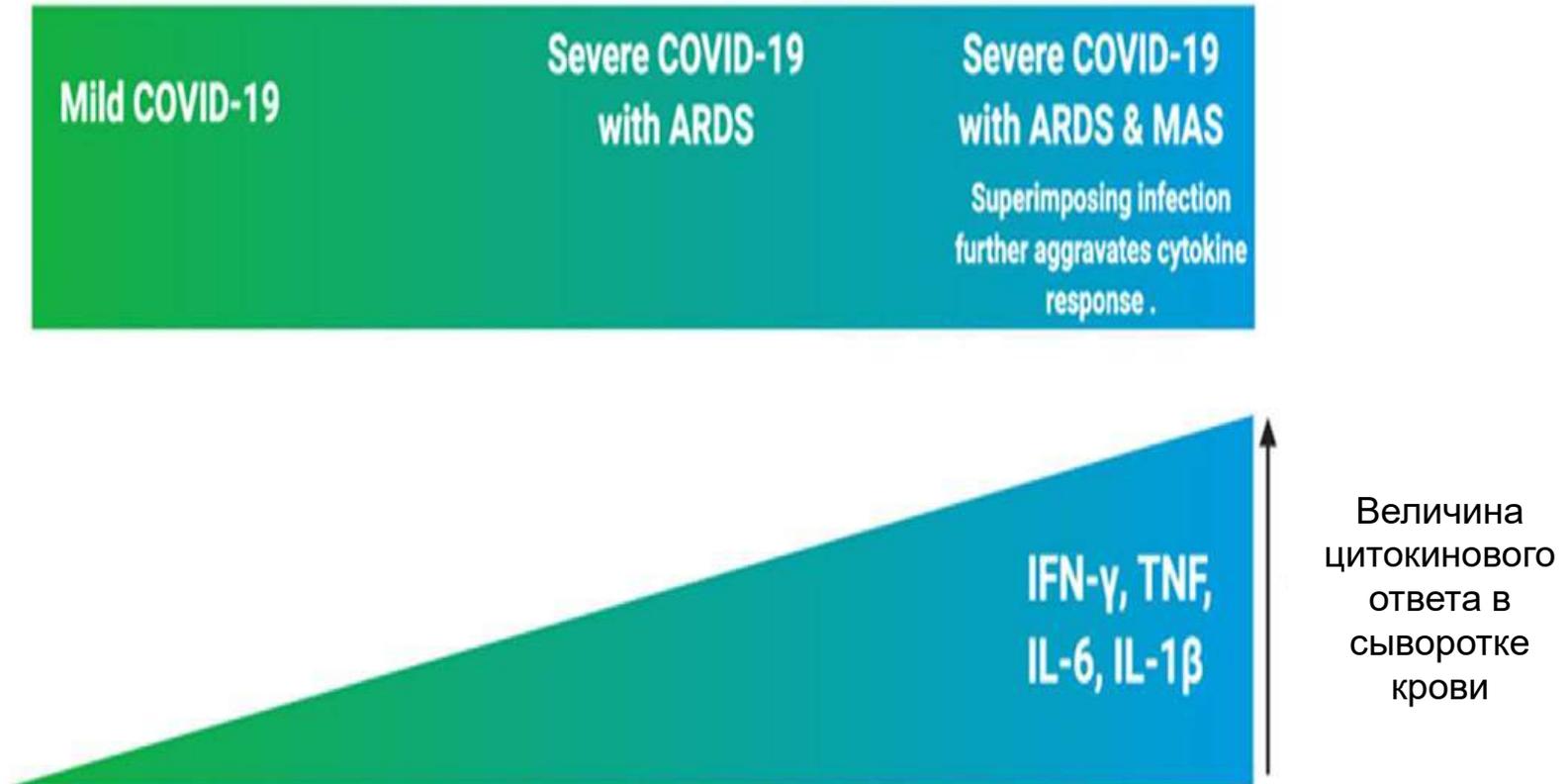
Хронология событий при заражении SARS-CoV-2



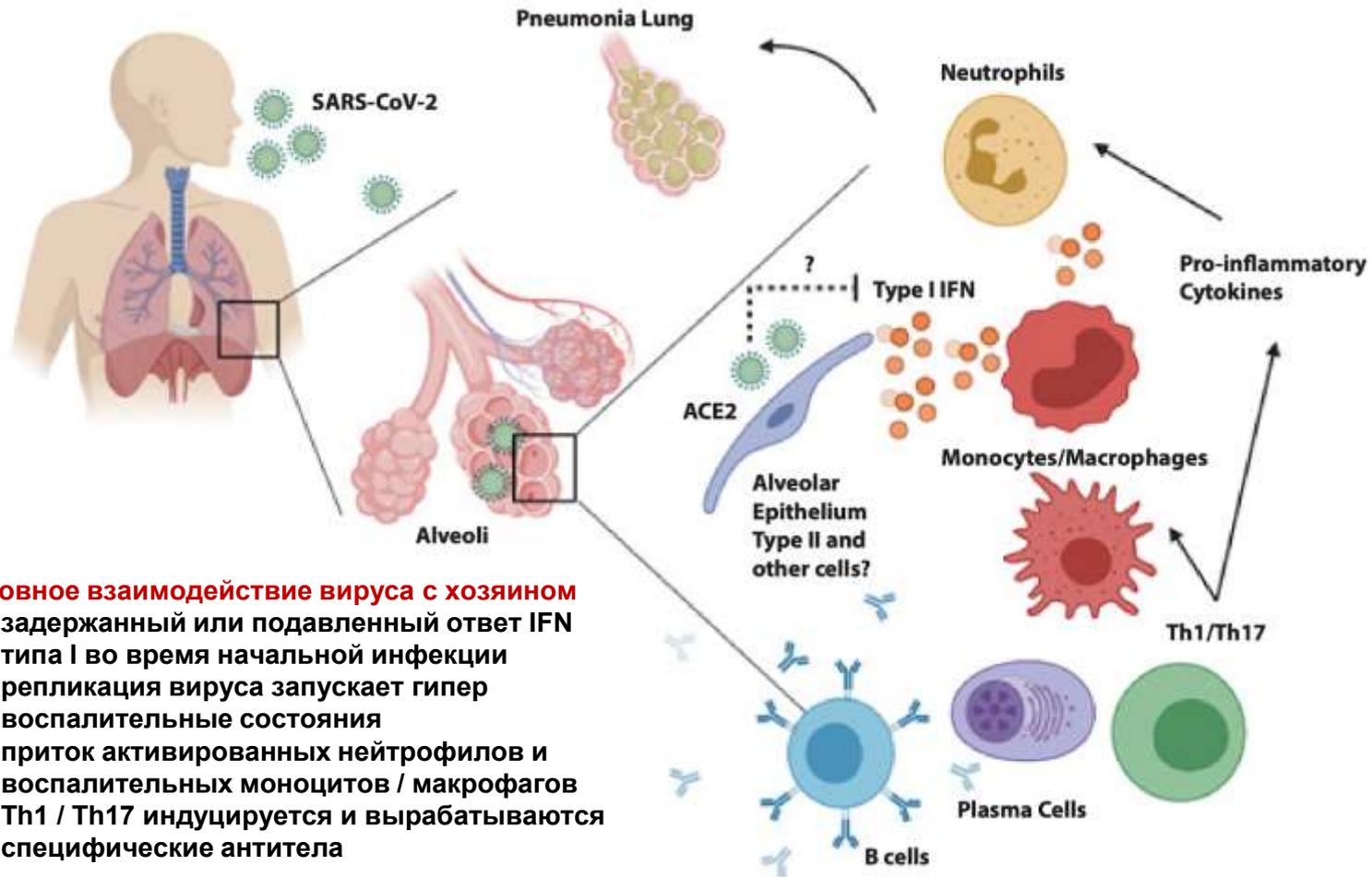
Хронология событий при заражении SARS-CoV-2



Иммунный ответ при COVID-19



Врожденный иммунный ответ



Основное взаимодействие вируса с хозяином

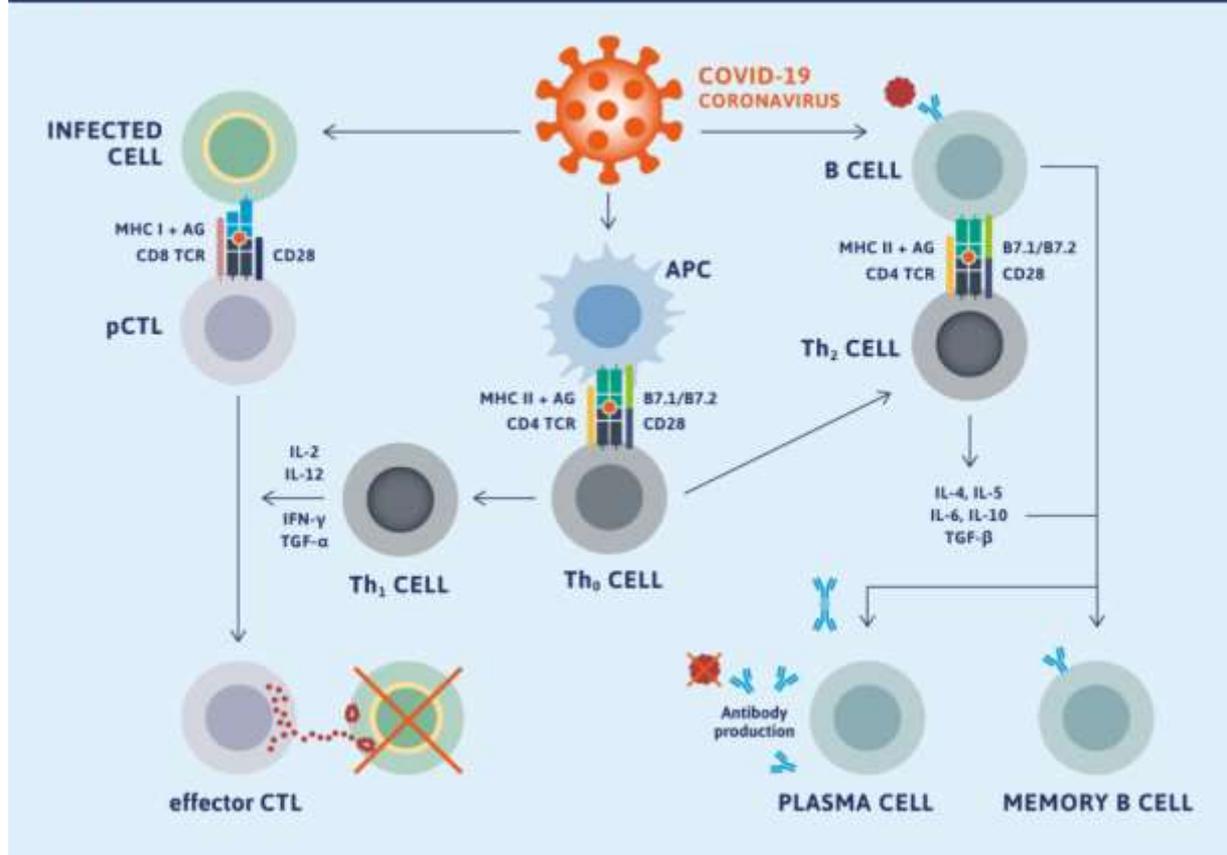
- задержанный или подавленный ответ IFN типа I во время начальной инфекции
- репликация вируса запускает гипервоспалительные состояния
- приток активированных нейтрофилов и воспалительных моноцитов / макрофагов
- Th1 / Th17 индуцируется и вырабатываются специфические антитела



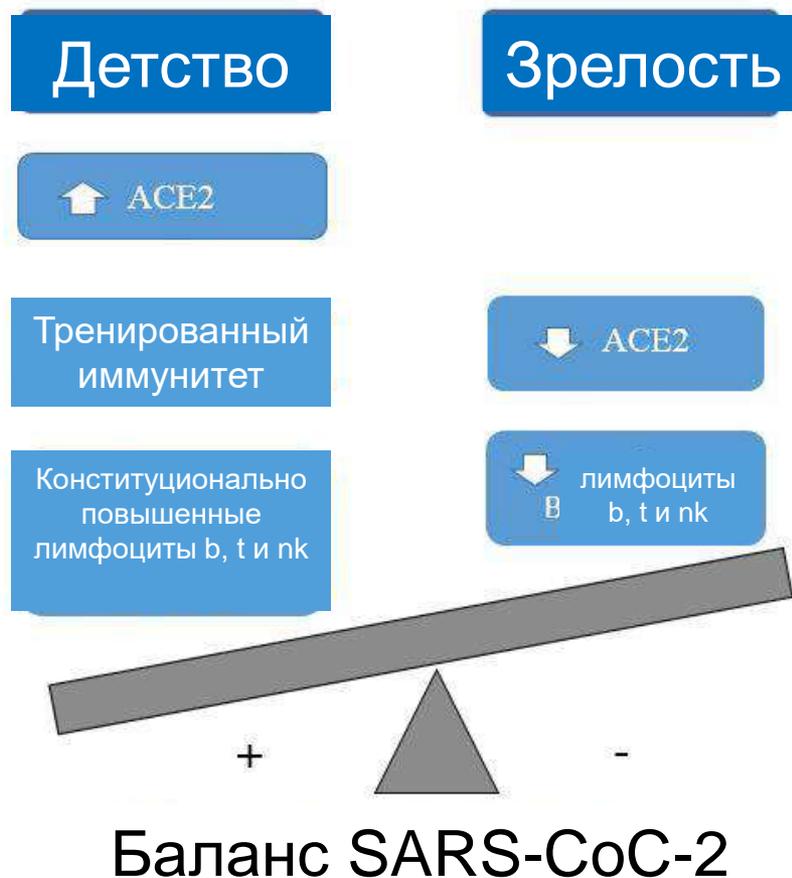
Адаптивный иммунный ответ

Fig. 1

Адаптивный иммунный ответ против коронавируса требует стимуляции В-клеточных и Т-клеточных эпитопов



SARS-CoV-2 (2019): дети



Увеличение концентрации ACE2-рецепторов в легочных пневмоцитах у детей может оказывать защитное действие при тяжелых клинических проявлениях вследствие инфекции SARS-CoV-2

Как частые вирусные инфекции, так и прививки у детей могут вызывать усиление врожденной иммунной системы, что приведет к более эффективной защите от различных патогенов.



Диагностика SARS-CoV-2

Основные характеристики биобезопасности лаборатории COVID-19

- Все процедуры должны выполняться на основе оценки риска и только персоналом с продемонстрированной способностью при строгом соблюдении любых соответствующих протоколов в любое время.
- Первоначальная обработка (до инактивации) образцов должна проводиться в шкафу биологической безопасности (BSC) или в первичном защитном устройстве.
- Непроизводительные диагностические лабораторные работы (например, секвенирование, тест амплификации нуклеиновых кислот [NAAT]) должны проводиться на объекте с использованием процедур, эквивалентных уровню биобезопасности 2 (BSL-2).
- Анализы в точках медицинской помощи или исследования, близкие к таковым, могут проводиться на стенде без использования BSC, когда того требует местная оценка риска и принимаются надлежащие меры предосторожности.
- Распространительную работу (например, анализ на вирусную культуру или анализы нейтрализации) следует проводить в лаборатории локализации с направленным внутрь потоком воздуха (BSL-3).
- Следует использовать соответствующие дезинфицирующие средства с доказанной активностью против вирусов с оболочкой (например, гипохлорит [отбеливатель], спирт, перекись водорода, четвертичные аммониевые соединения и фенольные соединения). Образцы пациентов из подозреваемых или подтвержденных случаев следует перевозить как UN3373, «Категория биологического вещества В». Вирусные культуры или изоляты следует перевозить как категория А, UN2814, «инфекционное вещество, поражающее человека».

Руководство по биобезопасности лаборатории, связанной с коронавирусной инфекцией COVID-19

Interim guidance
13 May 2020

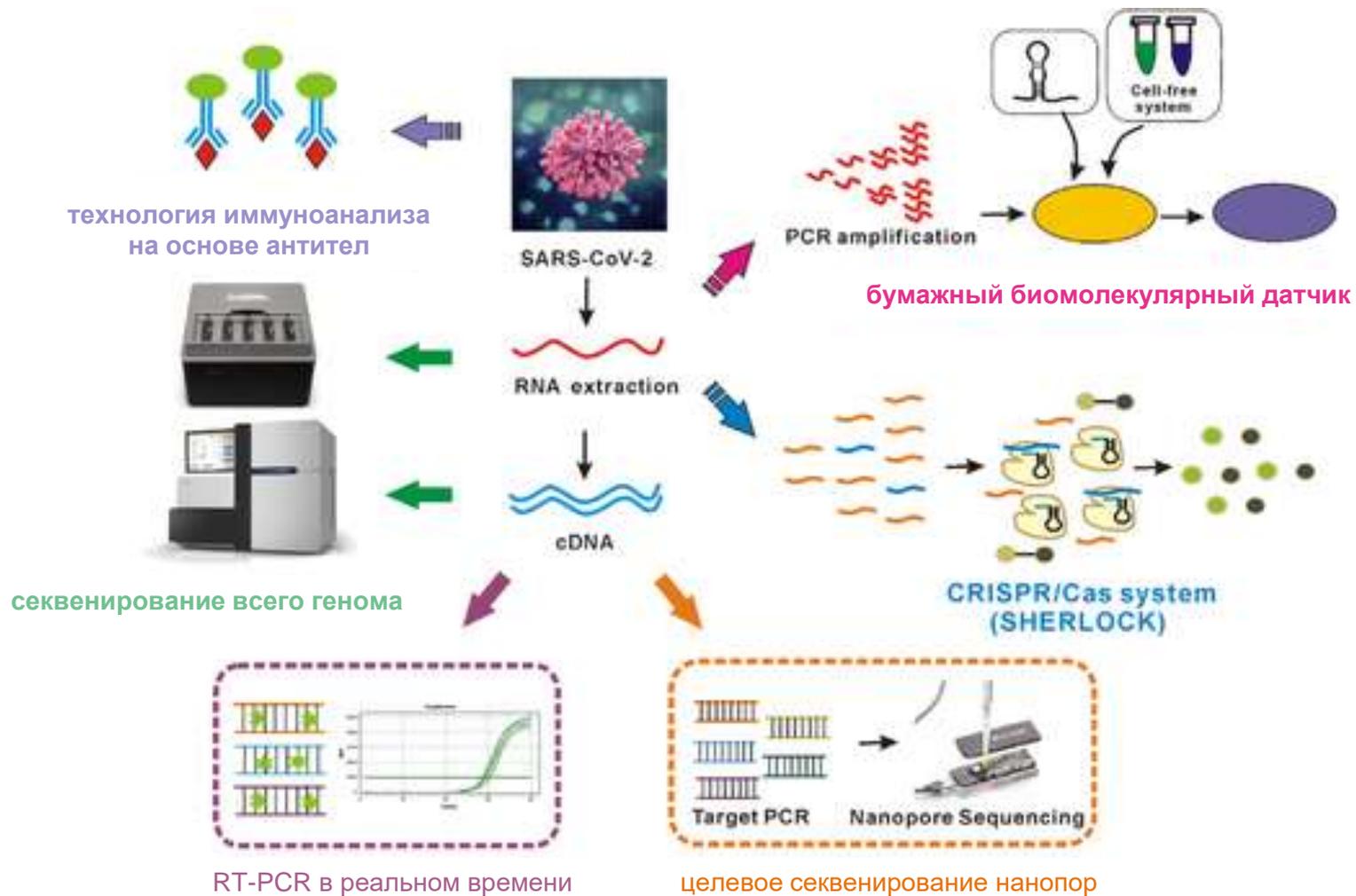


Диагностика SARS-CoV-2

Таблица 1 Типы диагностических подходов в COVID-19, все еще в экспериментальной фазе, теперь доступна для исследований; РОС - пункт оказания медицинской помощи.

Тест	Механизм обнаружения	Тестируемый материал	Наличие тестов РОС	Положительный результат теста	Использование тестов
Тесты амплификации нуклеиновых кислот (НААТ)	RT-PCR и обнаружение NGS подтверждает наличие генетических последовательностей консервативных областей для областей вируса, например N, E, S и RDRP гены. Необходимо определить две независимые последовательности амплификационных тестов	Амбулаторное: носоглоточный мазок, мокрота В стационаре: мокрота, эндотрахеальный аспират, кровь из БАЛ, фекалии	Нет. Должны быть выполнены в лаборатории	Подтверждает текущую инфекцию SARS-CoV2	Индивидуальное тестирование
Иммуноанализ на основе антител	иммуоферментный анализ с выявлением антител IgM или IgG против SARS-CoV-2	Сыворотка	Да (в зависимости от дизайна теста)	IgM +: 3-5 дней после начала IgG: перенесенная инфекция	общий уровень инфекции / иммунитета в сообществе
Иммуноанализ на основе антигенов	иммуоферментный анализ с обнаружением вирусных белков, например S (спайковый белок) или N белок (нуклеокапсид)	мазки из носоглотки, мокрота и другие выделения из нижних дыхательных путей, BAL, кровь, кал	Да (в зависимости от дизайна теста)	Подтверждает текущую инфекцию SARS-CoV2	Индивидуальное тестирование
Клинические тесты	Клинические симптомы (лихорадка / кашель). Эпидемиологический анамнез визуализация (КТ)	КТ - бнаружение рентгенологических признаков	Да	Возможна инфекция	Определить кандидатов для дальнейшего тестирования

Диагностика SARS-CoV-2



Диагностика SARS-CoV-2

Руководство по биобезопасности лаборатории, связанной с коронавирусной инфекцией COVID-19

Interim guidance
13 May 2020



Образцы, подлежащие взятию

Как минимум, должны быть собраны респираторные материалы:

- образцы верхних дыхательных путей: мазок из носоглотки и ротоглотки или промывка у амбулаторных пациентов
- и / или образцы нижних дыхательных путей: мокрота (если она была произведена), и / или эндотрахеальный аспират или бронхоальвеолярный лаваж у пациентов с более тяжелыми респираторными заболеваниями. (Обратите внимание на высокий риск аэролизации; строго придерживайтесь процедур профилактики и контроля инфекций).



Диагностика SARS-CoV-2

Table 2. Specimen collection and storage (adapted from^{4, 27, 28})

Specimen type	Collection materials	Storage temperature until testing in-country laboratory	Recommended temperature for shipment according to expected shipment time
Nasopharyngeal and oropharyngeal swab	Dacron or polyester flocked swabs*	2-8 °C	2-8 °C if ≤5 days -70 °C (dry ice) if >5 days
Bronchoalveolar lavage	Sterile container *	2-8 °C	2-8 °C if ≤2 days -70 °C (dry ice) if >2 days
(Endo)tracheal aspirate, nasopharyngeal or nasal wash/aspirate	Sterile container *	2-8 °C	2-8 °C if ≤2 days -70 °C (dry ice) if >2 days
Sputum	Sterile container	2-8 °C	2-8 °C if ≤2 days -70 °C (dry ice) if >2 days
Tissue from biopsy or autopsy including from lung.	Sterile container with saline or VTM.	2-8 °C	2-8 °C if ≤24 hours -70 °C (dry ice) if >24 hours
Serum	Serum separator tubes (adults: collect 3-5 ml whole blood).	2-8 °C	2-8 °C if ≤5 days -70 °C (dry ice) if >5 days
Whole blood	Collection tube	2-8 °C	2-8 °C if ≤5 days -70 °C (dry ice) if >5 days
Stool	Stool container	2-8 °C	2-8 °C if ≤5 days -70 °C (dry ice) if >5 days
Urine	Urine collection container	2-8 °C	2-8 °C if ≤5 days -70 °C (dry ice) if >5 days

Образцы для обнаружения вируса должны поступить в лабораторию как можно скорее после сбора. Правильная обработка образцов во время транспортировки имеет важное значение.

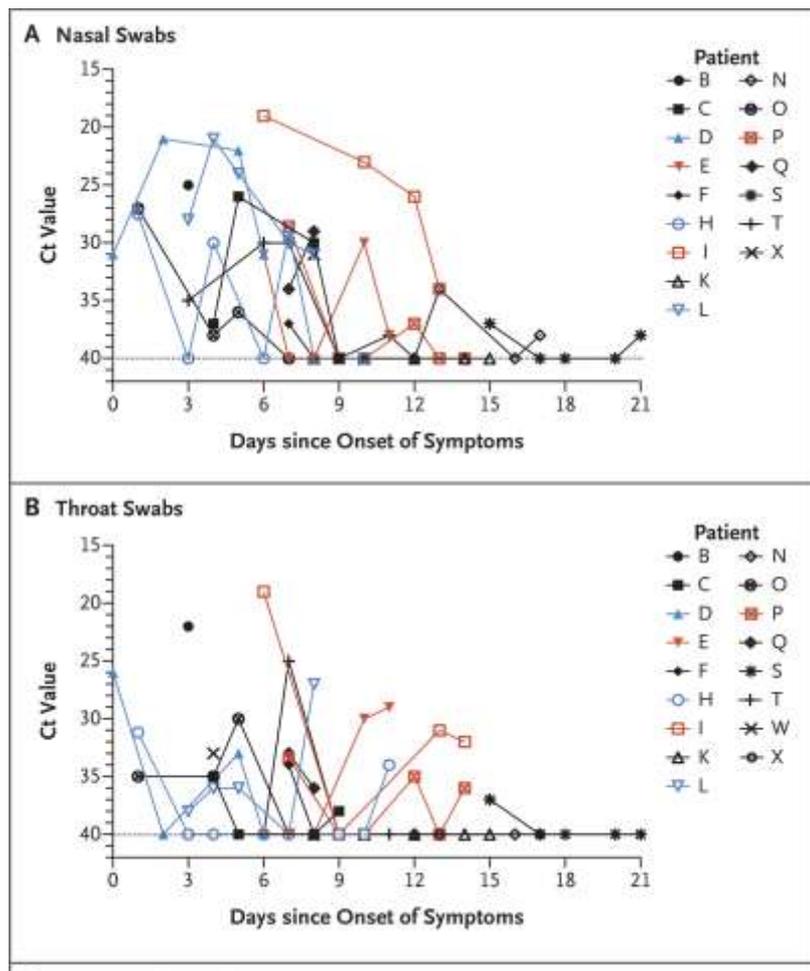


NAAT при SARS-CoV-2

Институт	Генные мишени
Китайский центр по контролю и профилактике заболеваний	ORF1ab и N
Институт Пастера, Париж, Франция	Две мишени в RdRP
Центры по контролю и профилактике заболеваний США	Три мишени в гене N
Национальный институт инфекционных заболеваний, Япония	Панкорона и множественные мишени
Шарите, Германия	RdRP, E, N
Университет Гонконга	ORF1b-nsp14, N
Тайский национальный институт здоровья	N



Вирусная нагрузка SARS-CoV-2 в образцах верхних дыхательных путей

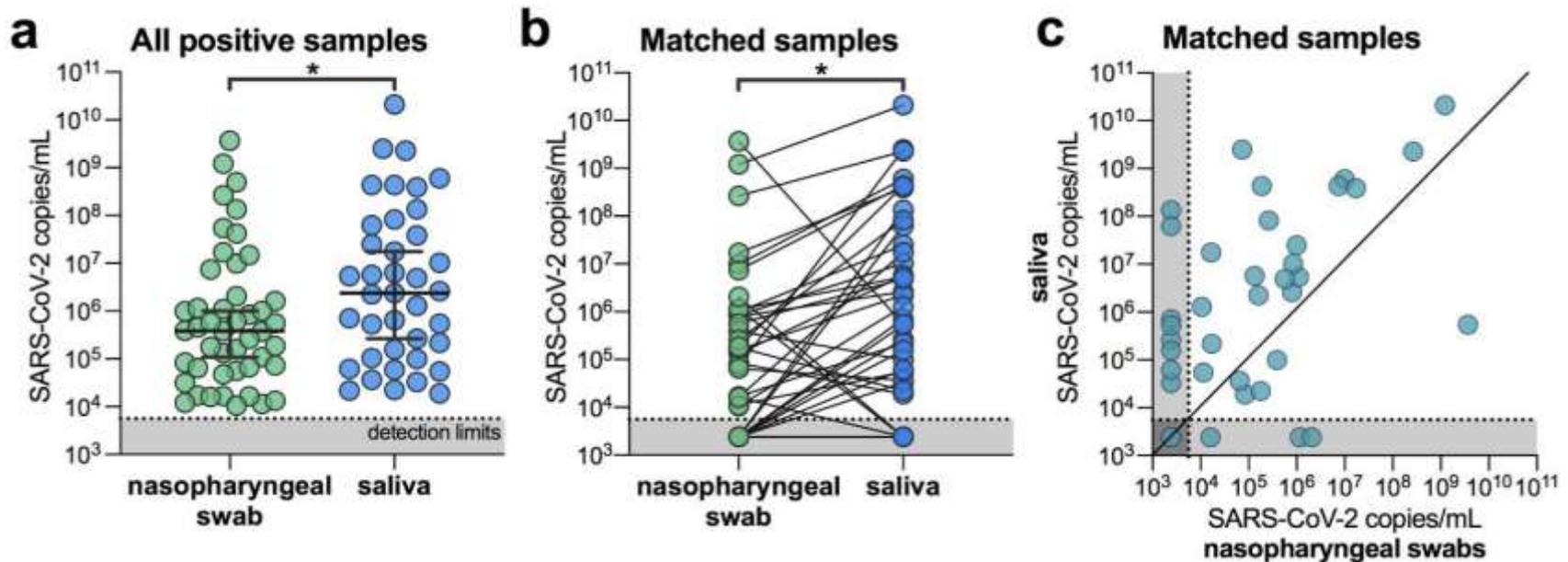


Более высокие вирусные нагрузки были обнаружены вскоре после появления симптомов, причем более высокие вирусные нагрузки чаще обнаруживались в носу, чем в горле.

Вирусная нагрузка, которая была обнаружена у бессимптомного пациента, была аналогична таковой у пациентов с симптомами, что указывает на потенциал передачи у бессимптомных или минимально симптоматических пациентов.



Титры SARS-CoV-2 выше в слюне, чем в мазках из носоглотки



Меньшая временная вариабельность SARS-CoV-2 при тестировании слюны у стационарных больных



Потенциальные преаналитические и аналитические уязвимости в лабораторной диагностике

Согласно последним данным, точность диагностики из многих доступных в настоящее время тестов RT-PCR для выявления SARS-CoV-2 может быть ниже оптимального (то есть $<100\%$).

Потенциальные уязвимости RT-PCR включают общие преаналитические проблемы:

- неадекватные процедуры сбора;
- обработка, транспортировка и хранение мазков;
- сбор неуместных или неадекватных материалов (для качества или объема);
- наличие мешающих веществ;
- ручные ошибки (такие как загрязнение образца)



Серологическое тестирование на SARS-CoV-2

Серологическое тестирование на COVID-19 может использоваться, чтобы определить, были ли люди ранее инфицированы SARS-CoV-2.



Важно определить, потому что полимеразная цепная реакция (ПЦР) и другие быстрые диагностические тесты, которые сейчас используются, выявляют наличие вирусного материала, который обнаруживается только у людей, которые в настоящее время инфицированы.



Первый и самый срочный - это проверка серологического теста.



Серологическое тестирование на SARS-CoV-2

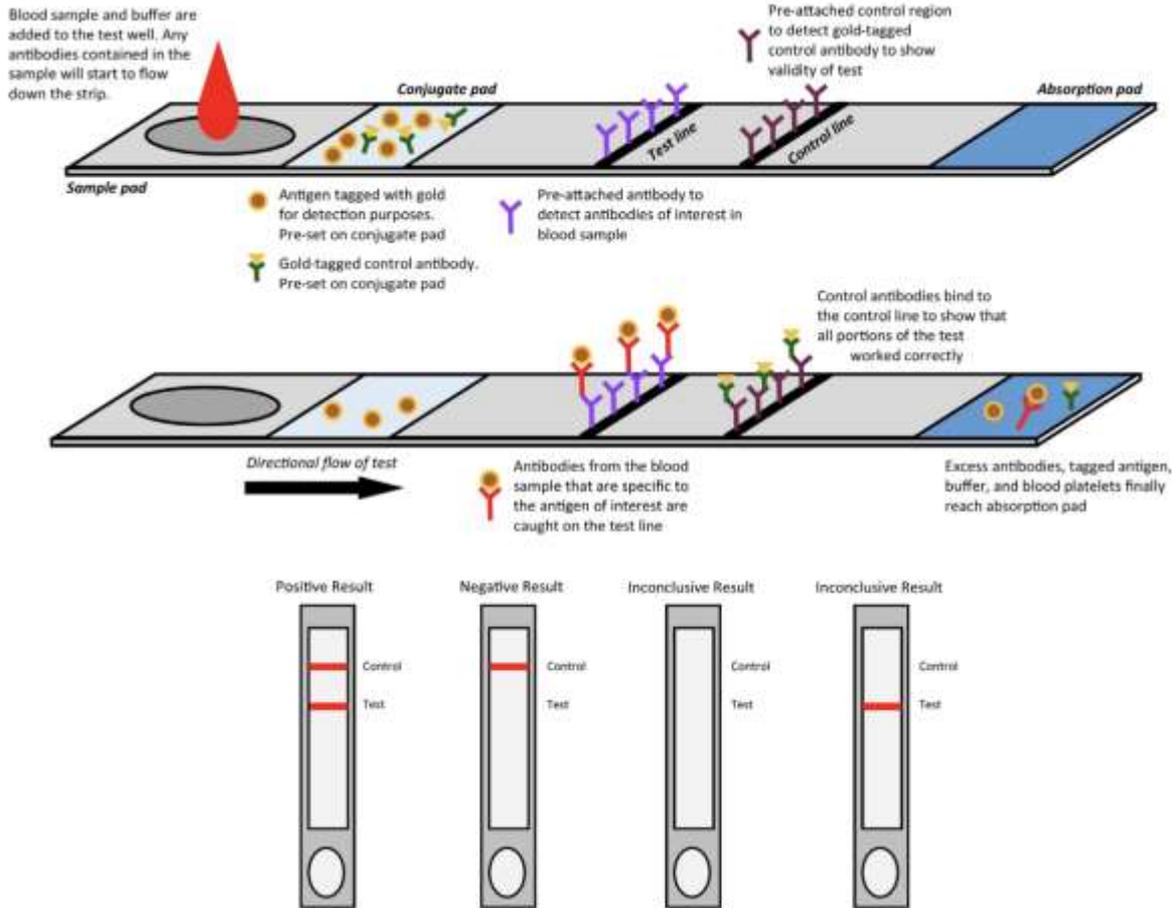
Существует три основных типа серологических тестов, разработанных для SARS-CoV-2:

- экспресс-тесты
- иммуноферментные анализы (ELISA)
- анализ нейтрализации

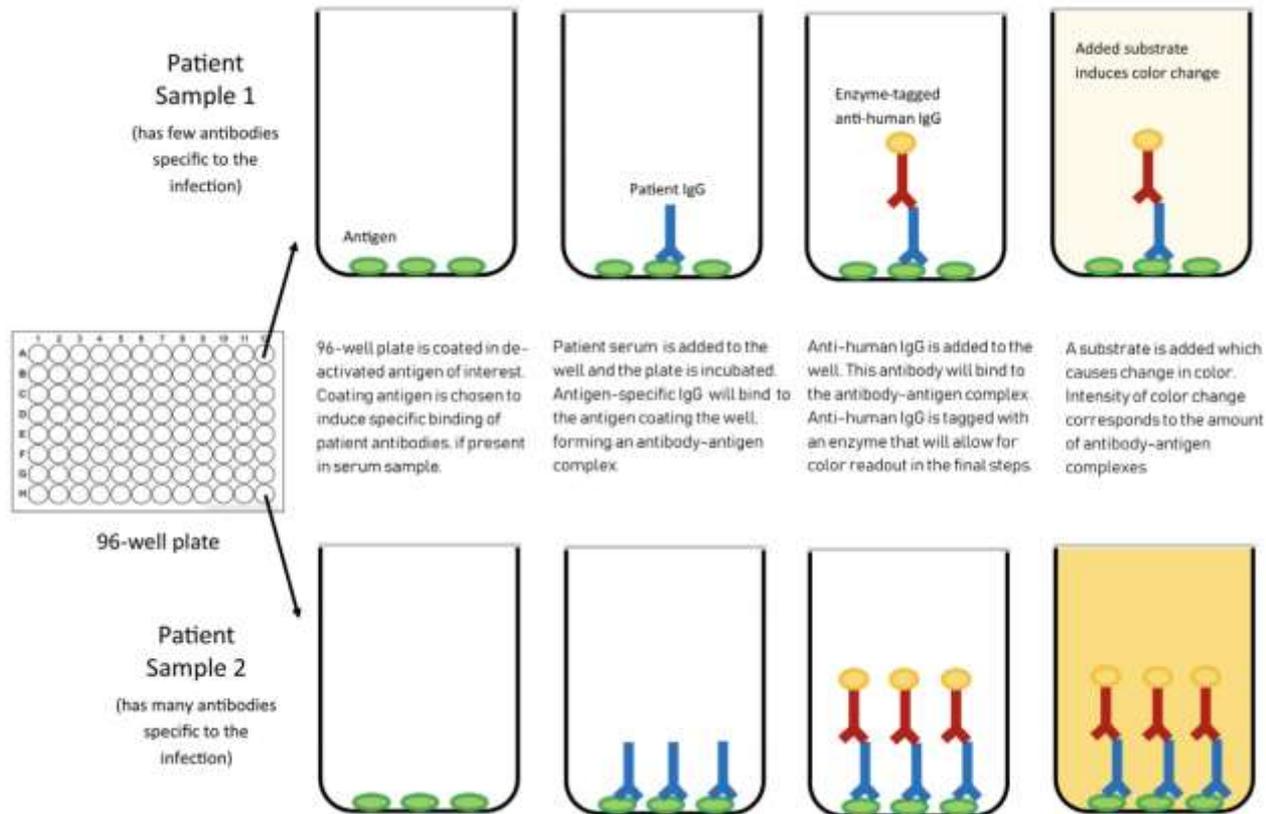
Тип теста	Время ожидания результата	Что показывает	Что не показывает	Требуемые экспертизы
экспресс-тесты	10-30 минут	Наличие или отсутствие (качественное) антител	Количество антител, или являются ли эти антитела нейтрализующими	Тестирование в месте оказания медицинской помощи, минимальное необходимое обучение
ELISA	2-5 часов	Наличие или отсутствие (количественное) антител	являются ли эти антитела нейтрализующими	Лабораторное пространство; требуется некоторая техническая подготовка
анализ нейтрализации	3-5 дней	Наличие нейтрализующих антител		Лабораторное пространство, по крайней мере, BSL-3, если используется живой SARS-CoV-2



Серологическое тестирование на SARS-CoV-2



Серологическое тестирование на SARS-CoV-2



The indirect ELISA method is shown above. Other methods include direct, competitive, and sandwich. While there can be variations in design, all methods utilize using color or fluorescence change to qualify or quantify the amount of antibodies in a serum sample that are specific to the antigen or compound of interest.



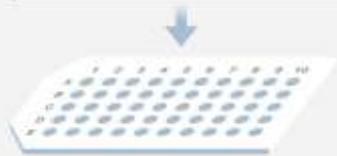
Серологическое тестирование на SARS-CoV-2

Как работает тест на нейтрализацию

1 Посадка клеток



Клетки Веро



Поместите клетки Веро в лунку

2 Инфекция



Коронавирус + антитела



Смешайте коронавирус с антителами и поместите на слой клеток Веро, чтобы вызвать инфекцию

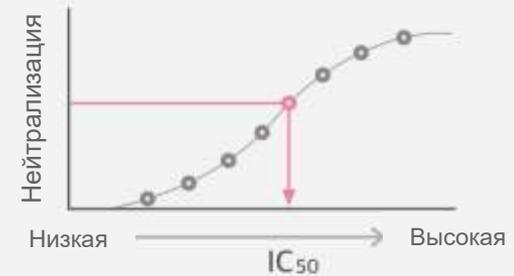
3 Получение данных и анализ



Окрашивание



Окрасьте живые клетки и постройте кривую для расчета IC₅₀, где концентрация антител показывает 50% нейтрализации

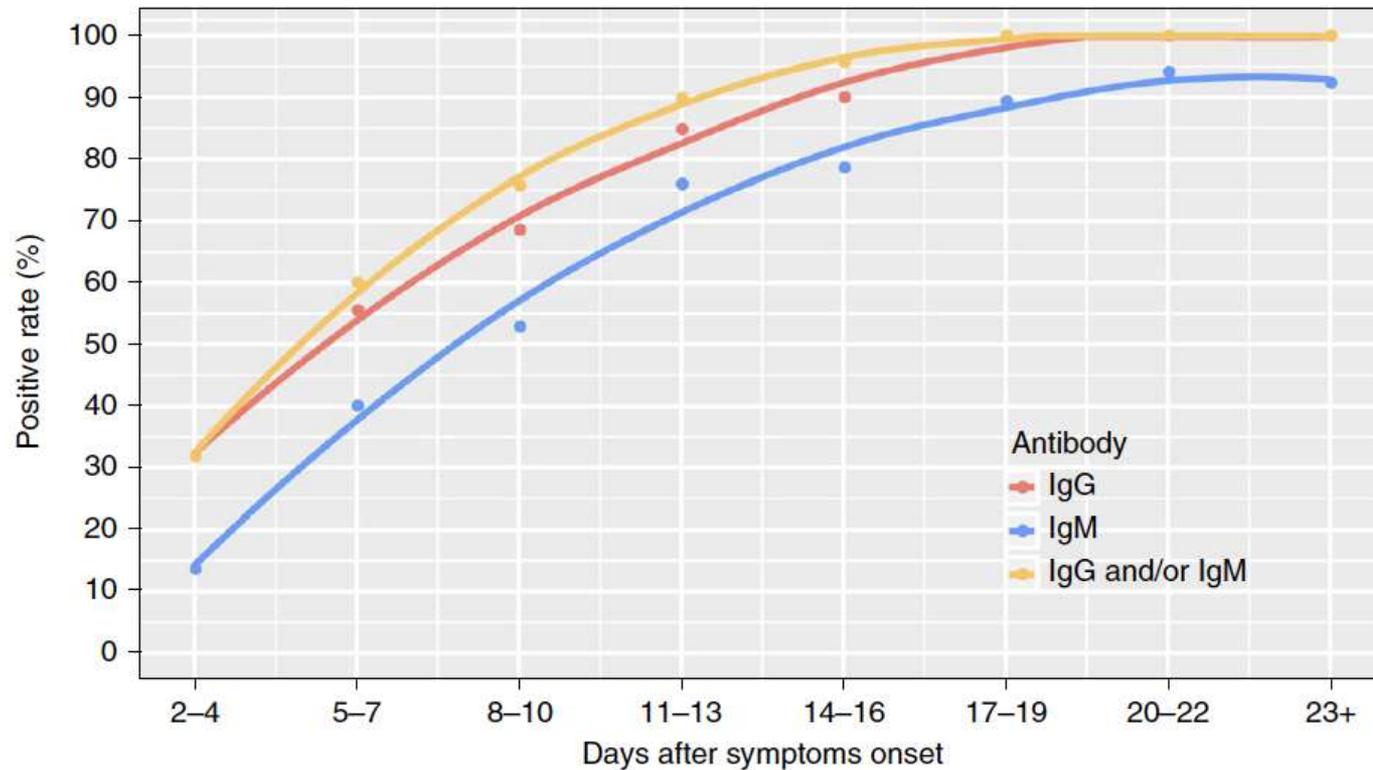


CELLTRION

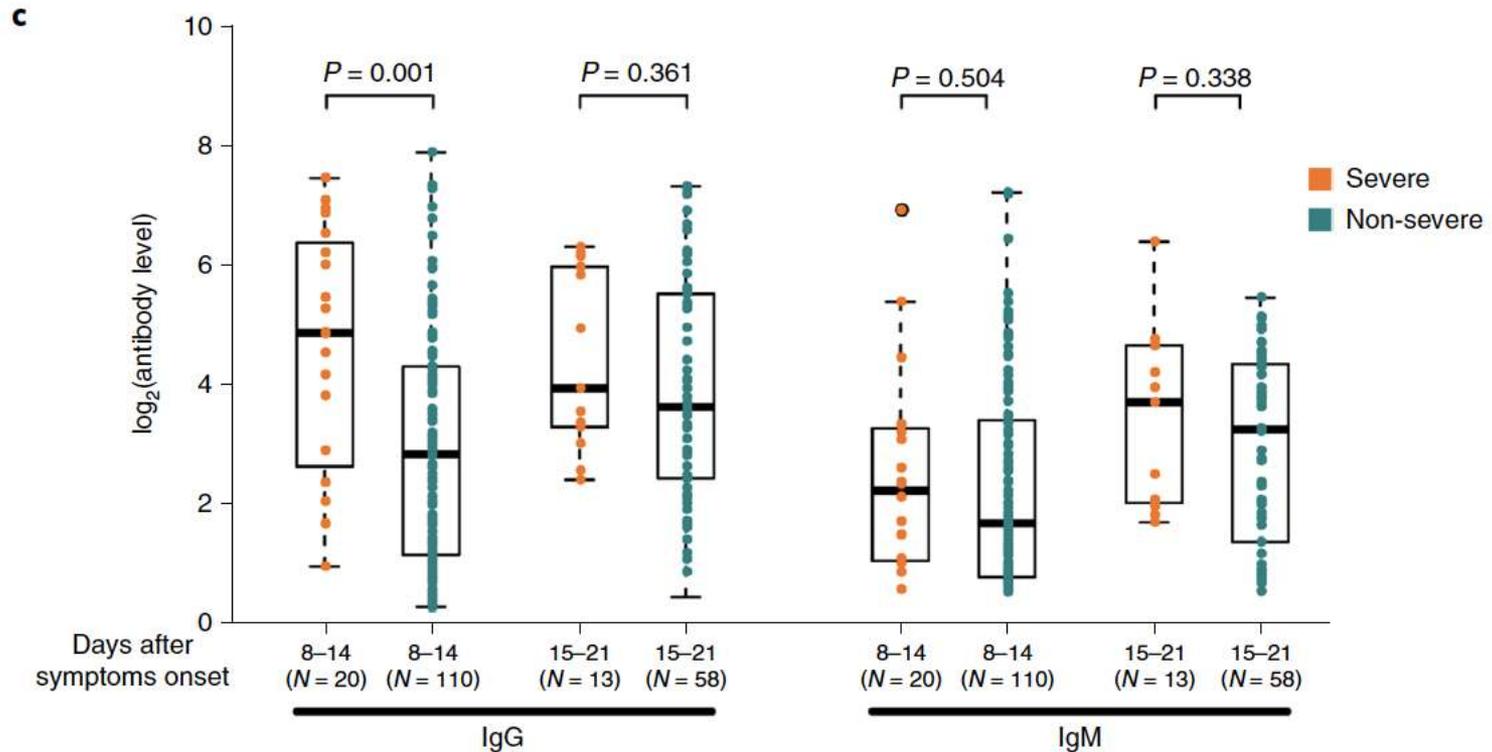


Ответы антител к SARS-COV-2

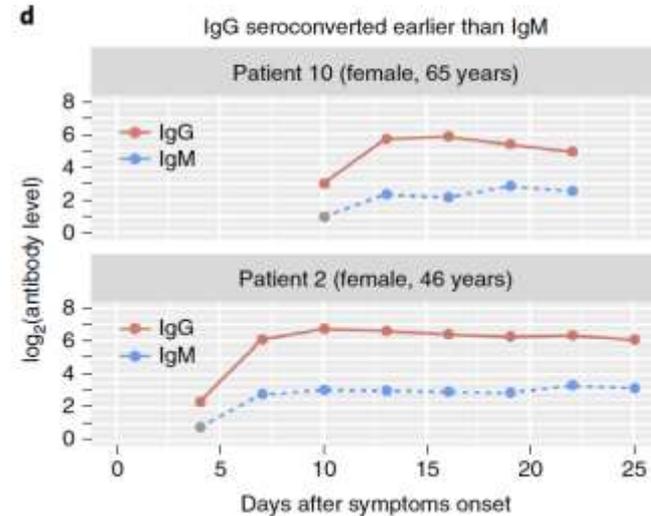
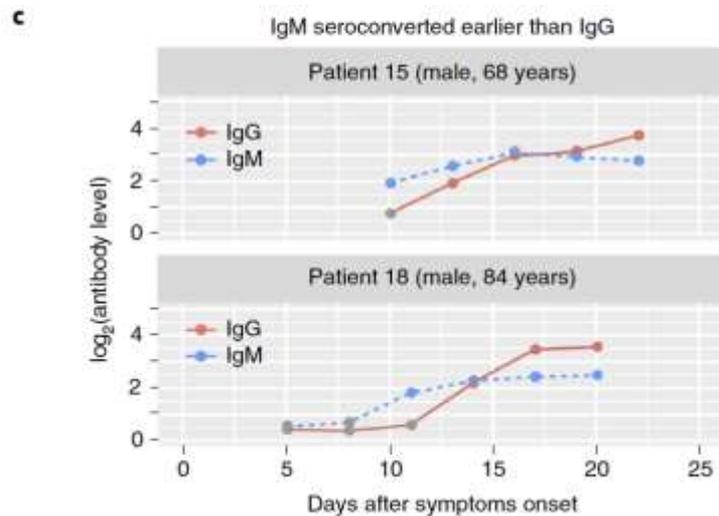
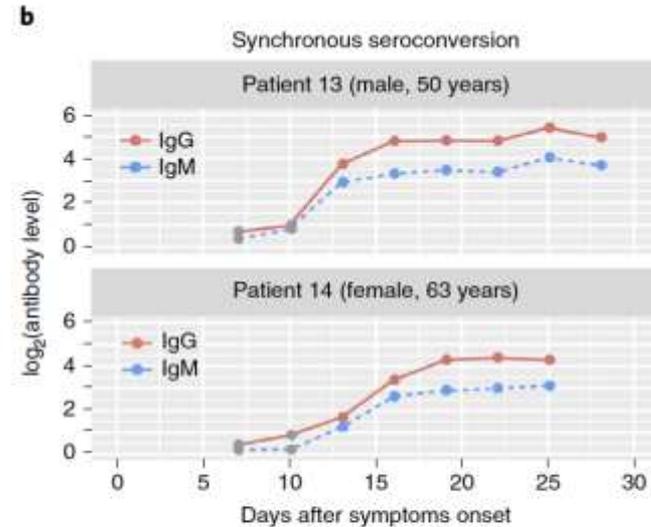
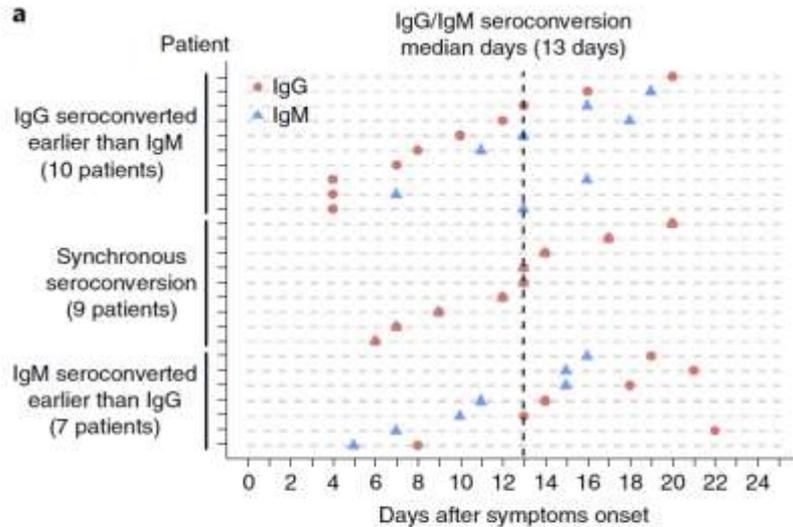
a



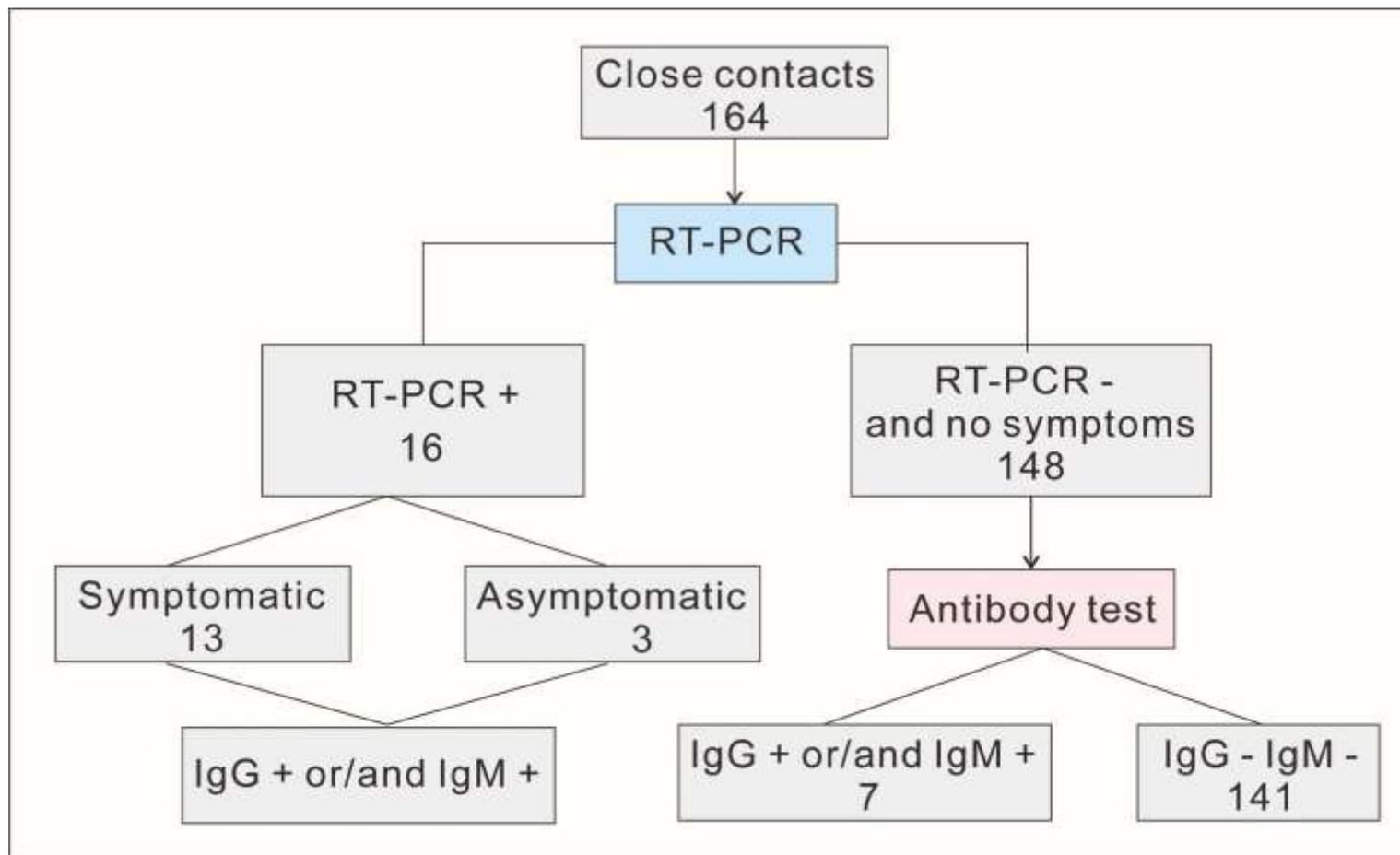
Ответы антител к SARS-COV-2



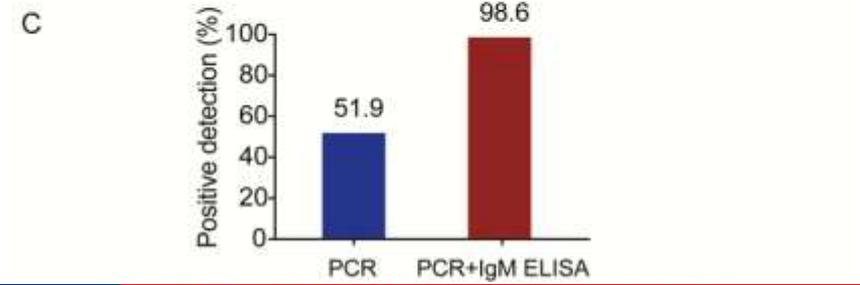
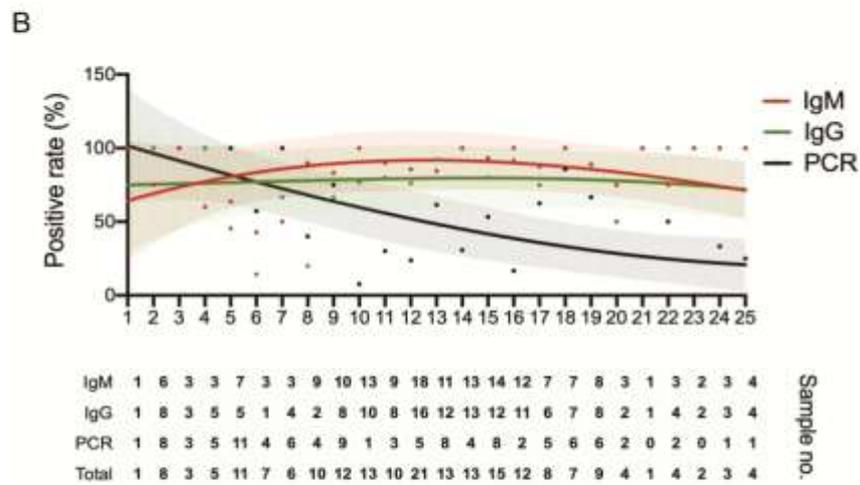
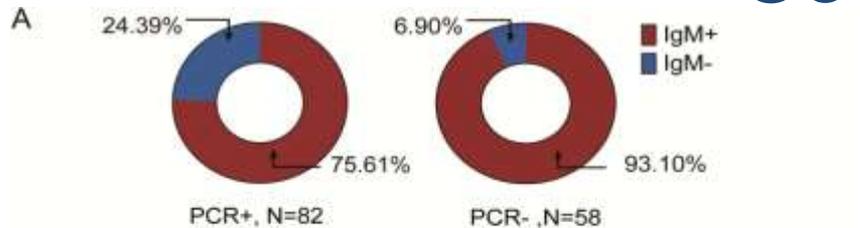
Ответы антител к SARS-COV-2



Серологическое исследование у близких контактов с пациентами с COVID-19



Серологическое тестирование на SARS-CoV-2

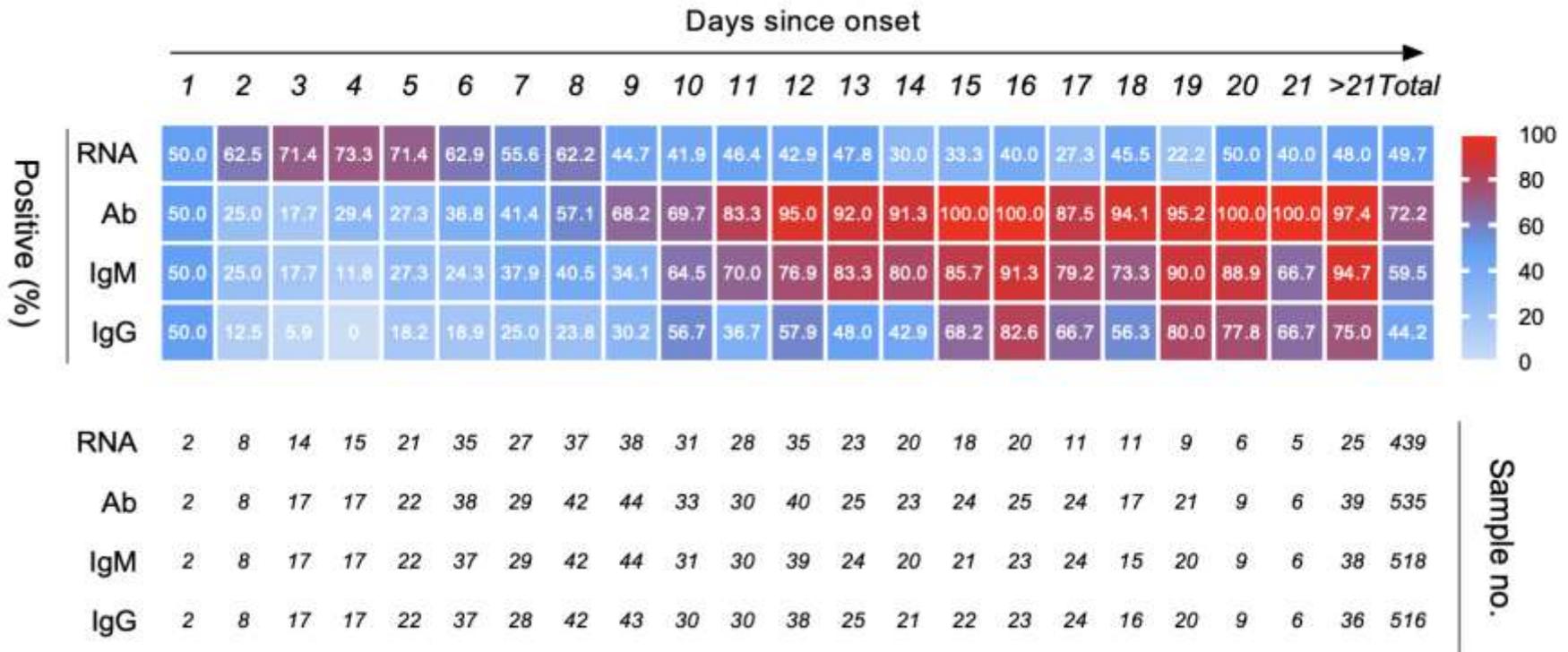


Ложноотрицательные результаты могут быть получены с помощью анализа NAAT.

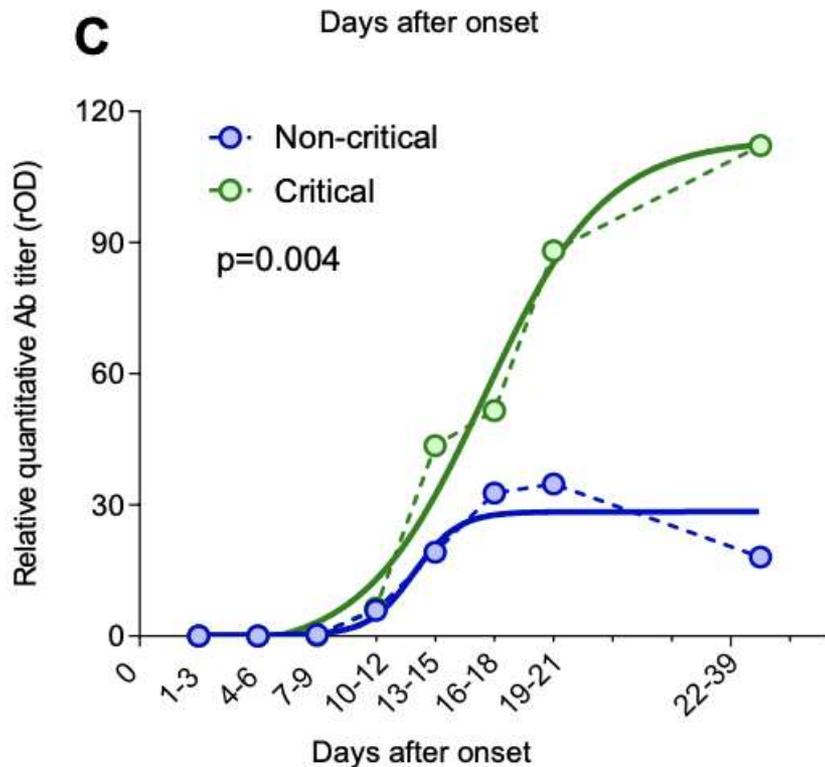
Го и его коллеги предложили проводить тестирование на антитела, когда тест КПЦР отрицательный, несмотря на другие признаки COVID-19, включая симптомы и эпидемиологию.



Профилирование характеристик чувствительности РНК, Ab, IgM и IgG во временных рядах с начала заболевания



Тест на антитела у критических и некритических пациентов



По-видимому, существует сильная положительная корреляция между клинической тяжестью и титром антител через 2 недели после начала заболевания, впервые у пациентов с COVID-19.



Серологическое тестирование на SARS-CoV-2

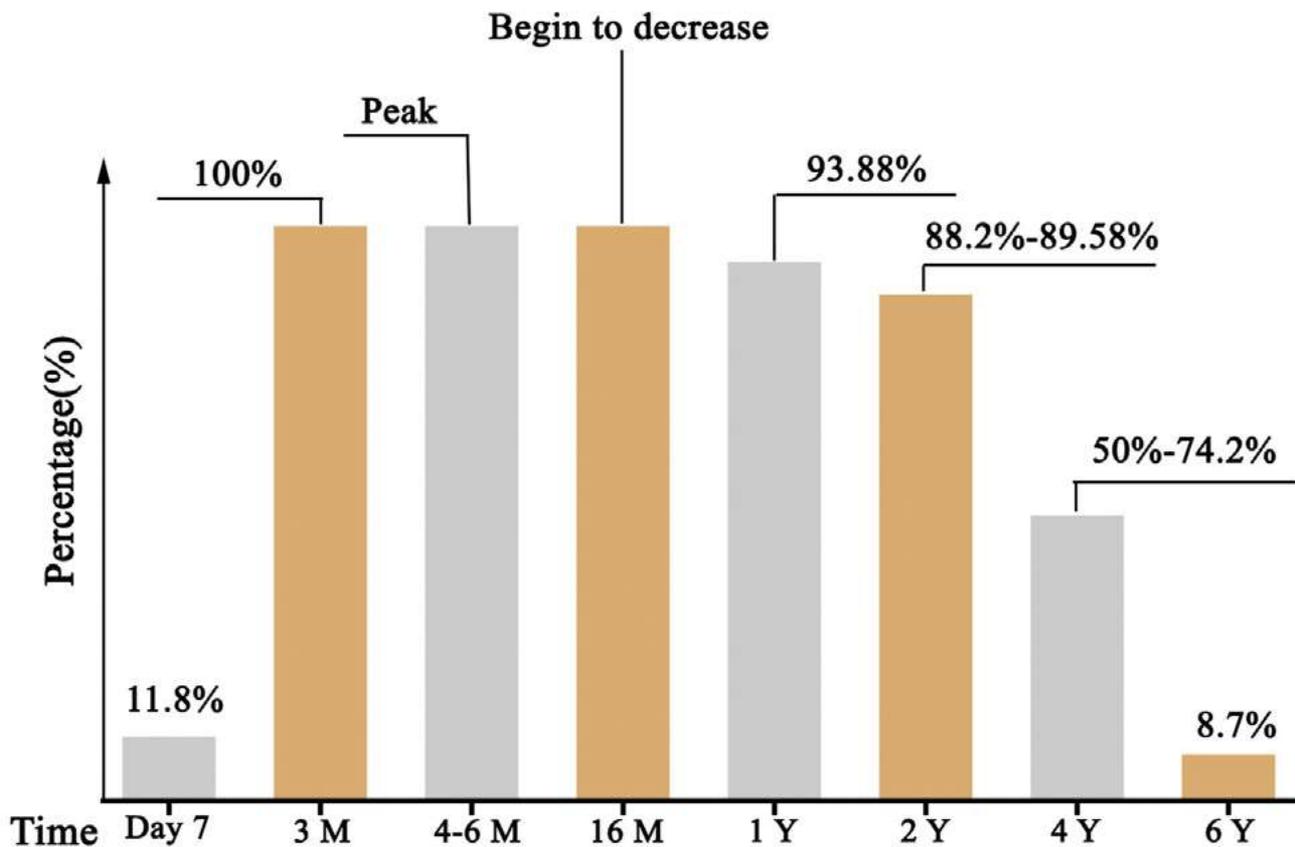
Общее антитело более чувствительно для выявления инфекции SARS-CoV-2, чем IgM и IgG.

Тестирование на антитела может играть жизненно важную роль в следующих условиях:

- для подозреваемых пациентов при первоначальном посещении или клинически диагностированных пациентов с неподтвержденным тестированием РНК;
- для здорового близкого контакта, находящегося в карантинном периоде;
- для пациентов с подтвержденным РНК серопозитивный указывает на то, что был индуцирован специфический иммунный ответ.



Продолжительность сывороточных нейтрализующих антител к SARS-CoV-2: урок инфекции SARS-CoV



Вопросы для размышления

Что делает коронавирус таким сильным в распространении?

Станет ли SARS-CoV-2 сезонным вирусом?

Почему некоторым пациентам с COVID-19 не хватает антител?

Будут ли реинфицированы пациенты, выздоровившие после COVID-19?

Как бороться с COVID-19 положительными случаями, которые остаются положительными (при ПЦР, очень близком к верхнему пределу) в течение длительного времени?

