17.03.2022

Opracowała i wykonała Zofia Sułkowska

Notatka wyłącznie do użytku własnego

TESTY DIAGNOSTYCZNE NA COVID I NIE TYLKO

1. Jak można wykryć wirusa?

Obecność wirusa w organizmie można wykryć na dwa sposoby:

* przez obserwację jego genomu
* przez obserwację jego białek

1. Budowa wirusa SARS-CoV-2



S - SPIKE - białko kolca odpowiedzialne za

interakcję z receptorem na powierzchni komórki

E - ENVELOPE - białko otoczki odpowiedzialne za

interakcję z receptorem na powierzchni komórki

M - MEMBRANE - białko błonowe - głównie białko

macierzy wirusa

N - NUCLEOCAPSID - białko nukleokapsydu

(pojedyncza nić RNA) - materiał genetyczny

wirusa

Genom wirusa SARS-CoV-2 występuje w postaci mRNA

1. PCR

PCR - Polymerase Chain Reaction - czyli łańcuchowa reakcja polimerazy. Wynaleziona została w latach osiemdziesiątych XX w. w celu badania genomu człowieka.

Na czym polega działanie PCR?

Działanie PCR polega na amplifikacji (powielaniu) łańcuchów DNA z pomocą termo

polimerazy DNA w wyniku wielokrotnego podgrzewania i oziębiania próbki w

warunkach laboratoryjnych

Etapy reakcji PCR:

Etap I: Rozdzielenie poprzez rozplecenie interesującego nas fragmentu DNA na

dwie nici (lub RNA). W wysokiej temperaturze (ok. 95°C) pękają wiązania

wodorowe, czego skutkiem jest rozdzielenie się podwójnej alfa helisy na

dwa łańcuchy.

Etap II: Przyłączenie się starterów. Jest to proces tworzenia odcinków

dwuniciowych składających się ze starterów (cząstek DNA

komplementarnych do sekwencji DNA, którą chcemy powielić) oraz z

matrycowej cząstki DNA. Etap ten przebiega w temperaturze 45°-60°C.

Etap III: Elongacja, czyli wydłużanie łańcucha. Jest to właściwa synteza DNA

i amplifikacja pożądanego genu. Polimeraza znajduje wtedy starter

i dobudowuje dalej komplementarne nukleotydy. Ten etap przebiega w

temperaturze 72°C i trwa 30 sekund.

Gdyby wydajność tej reakcji wynosiła 100%, po n\* cyklach z jednej cząsteczki DNA można by uzyskać 2n cząsteczek.

\* liczba cykli

Jeśli chcemy wykryć konkretne DNA używamy znaczników, które umożliwiają monitorowanie reakcji PCR. Takim znacznikiem może być np. sonda fluorescencyjna lub interkalatory - inne znaczniki. Im więcej cząsteczek DNA na początku cyklu, tym szybciej ich ilość przebija próg i dochodzi do fluorescencji. Im niższy numer cyklu tym więcej DNA było na jego początku.

Dużo DNA na start → Szybsza fluorescencja i mniejsza ilość cykli

Mało DNA na start → Wolniejsza fluorescencja i większa ilość cykli

Brak DNA → Brak fluorescencji

* Im mniejszy jest fragment powielanego DNA tym szybciej zachodzi reakcja
* Do reakcji typu PCR wykorzystuje się 100-330 nukleotydów

1. RT-PCR

RT-PCR - Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction - czyli łańcuchowa reakcja polimerazy z odwrotną transkrypcją. Przy RT-PCR najpierw następuje odwrotna transkrypcja, czyli proces “przepisania” jednoniciowego RNA na dwuniciowy DNA za pomocą enzymu odwrotnej transkryptazy, a następnie uruchamiany jest program 35-40 cykli reakcji PCR.

RT-PCR a wykrywanie wirusa SARS-CoV-2:

Stosując tą metodę do wykrywania wirusa SARS-CoV-2 pobiera się wolno mutujące

fragmenty wirusa. Jest ich zwykle dwie do trzech sekwencji.

1. Metoda PCR w diagnostyce

Choroby zakaźne:

* Wirusowe: HIV-1, zapalenie wątroby typu B i C, mononukleoza, zakażenia

wirusem brodawczaka ludzkiego

* Bakteryjne: gruźlica, rzeżączka, borelioza, chlamydia
* Grzybicze: drożdżyce
* Wywołane przez pierwotniaki: toksoplazmoza, czerwonka

Choroby uwarunkowane genetycznie:

* Badania przesiewowe noworodków: choroby metaboliczne, mukowiscydoza, niedobory immunologiczne, hemofilia
* Badania dzieci i dorosłych pod kątem występowania mutacji w genach, które decydują o wystąpieniu choroby lub predysponują do jej rozwoju: choroba Huntingtona, wielotorbielowatość nerek, mutacje w onkogenach i supresorach nowotworzenia

1. Kasetkowe testy antygenowe

→ wykrywają białka wirusowe

Przeciwciała:

→ są produkowane przez limfocyty B

Aktywacja limfocytów B powoduje namnażanie się kolejnych limfocytów B oraz

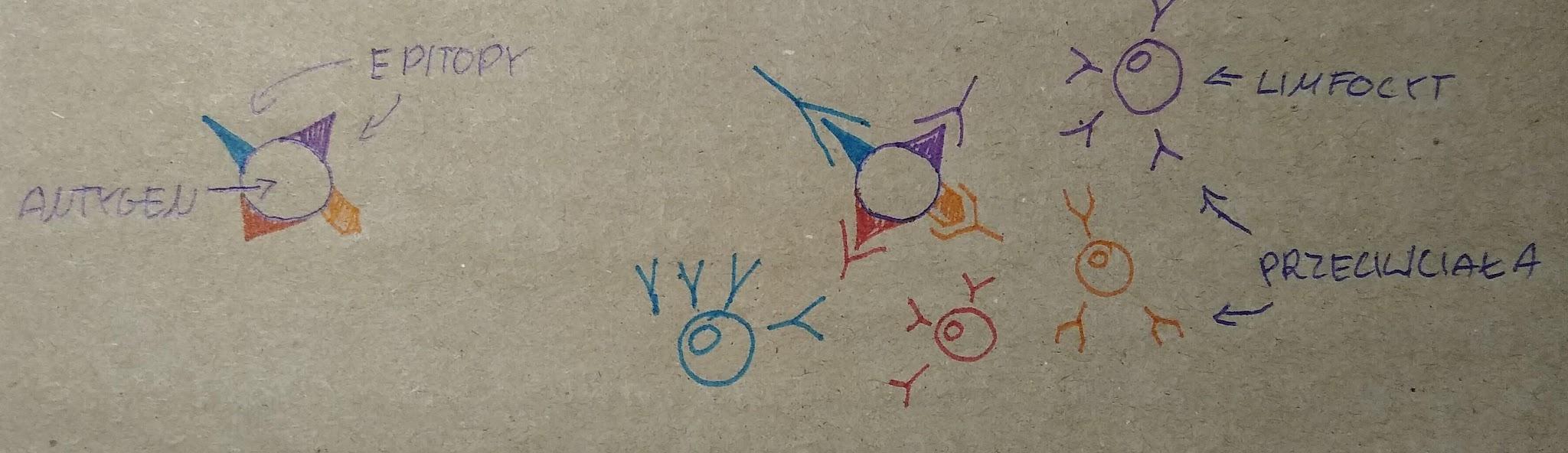
wzmożoną produkcję przeciwciał. Jedna komórka limfocytu B produkuje tylko jeden

rodzaj przeciwciał. Więc jeśli antygen ma cztery epitopy (białka, do których

przyłączają się przeciwciała), potrzeba czterech komórek limfocytów B do

wyprodukowania czterech różnych rodzajów przeciwciał odpowiadających

poszczególnym czterem epitopom.



Mechanizm produkcji przeciwciał:

SARS-CoV-2 → organizm człowieka → namnażanie się limfocytów B → produkcja przeciwciał reagujących z częściami białka spike

Wyniki testów kasetkowych:

C T

I I - wynik dodatni, jest wirus

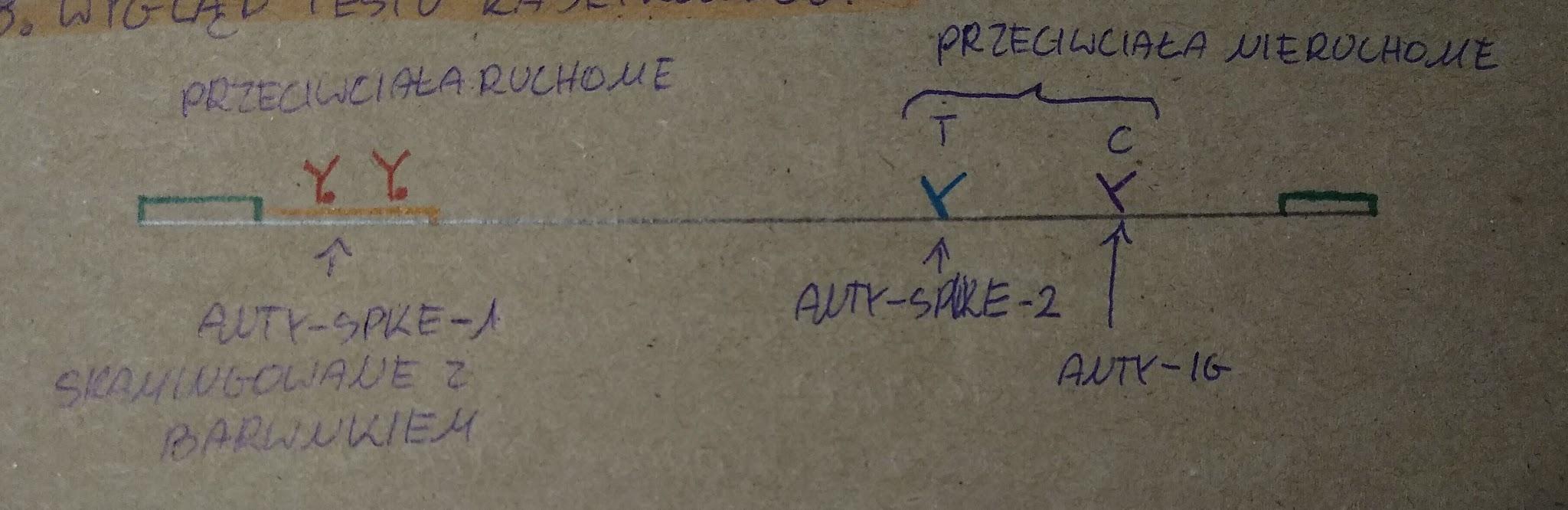
I - wynik ujemny, nie ma wirusa

- test nieważny

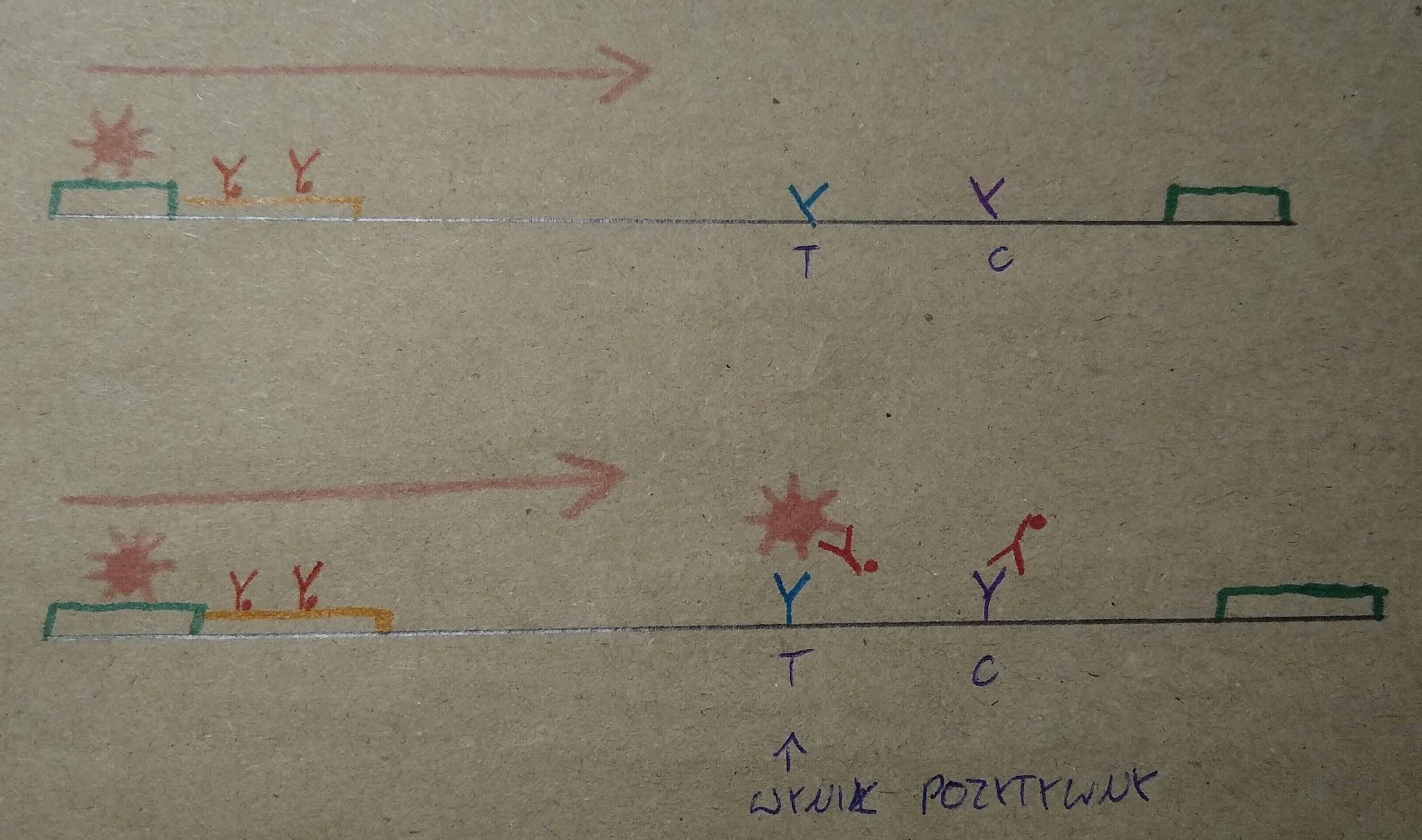
C - control

T - test

1. Wygląd kasetkowego testu antygenowego



Działanie:



1. Zastosowanie kasetkowych testów antygenowych

* antygeny drobnoustrojów i wirusów takich jak: helicobacter pylori, salmonella, plasmodium (malaria), wirus grypy, rotawirus, HIV-1, HCV
* antygeny nowotworowe (PSA, CEA)
* antygeny świadczące o zawale serca (troponina C)
* testy ciążowe - wykrywają gonadotropinę kosmówkową (HCG)
* zmodyfikowane testy kasetkowe wykorzystuje się do wykrywania fentanylu i innych narkotyków

1. Właściwości testów:

* CZUŁOŚĆ - SENSITIVITY

Jeśli test ma niską czułość: jesteś chory, a test tego nie wykrywa

* SWOISTOŚĆ - SPECITIVITY

Jeśli test ma niską swoistość: jesteś zdrowy, a test pokazuje, że jesteś chory

* DOKŁADNOŚĆ - ACCURACY

bierze pod uwagę oba typy błędów