

Laboratóriumi vizsgálat (PCR) részletes leírása

A koronavírus-fertőzés diagnózisának felállításához laboratóriumi vizsgálatra van szükség. A molekuláris biológia számos célra alkalmazza az úgynevezett polimeráz-láncreakciót (PCR), beleértve különböző patogének, köztük a koronavírusok azonosítását is. Az eljárás célja, hogy felszaporítsa az adott mintában található örökítőanyagot, avagy DNS-t, amely így könnyebben vizsgálható. Ez azonban már a folyamat második lépése, a koronavírus ugyanis az RNS-vírusok közé tartozik. Éppen ezért először reverz transzkriptáz (RT) enzim segítségével DNS-t kell készíteni belőle, amit aztán a PCR folyamán fel lehet szaporítani.

A COVID-19 kórokozója a SARS-CoV2 egy 90 nanométer átmérőjű vírus, genetikai információját egy egyszálú RNS molekula hordozza, amelyet egy 4 különböző fehérjéből álló burok vesz körül. Amikor a sejtek receptoraihoz kötődött vírus bejut a sejtbe, fehérjeburka lebomlik és a replikációs enzim segítségével sokszorosan, 100-1000 példányban újratermeli magát. Eközben előfordul, hogy nem minden -az emberi sejt által termeltetett- vírus RNS-t vesz körül a -szintén a gazdasejt által termeltetett -fehérjeburok, így szabad vírus RNS-ek kerülnek a véráramba, a garat és az orrnyalkahártya váladékába, ebből a váladékból polimeráz láncreakcióval (PCR) mutatható ki a koronavírus.

Jelenlegi tudásunk szerint a SARS-CoV2 vírus RNS 5-6 nappal a fertőzés után (és a tapasztalatok szerint már 1-2 nappal a klinikai tünetek megjelenése előtt) mutatható ki a garat és az orrnyalkahártya váladékában.

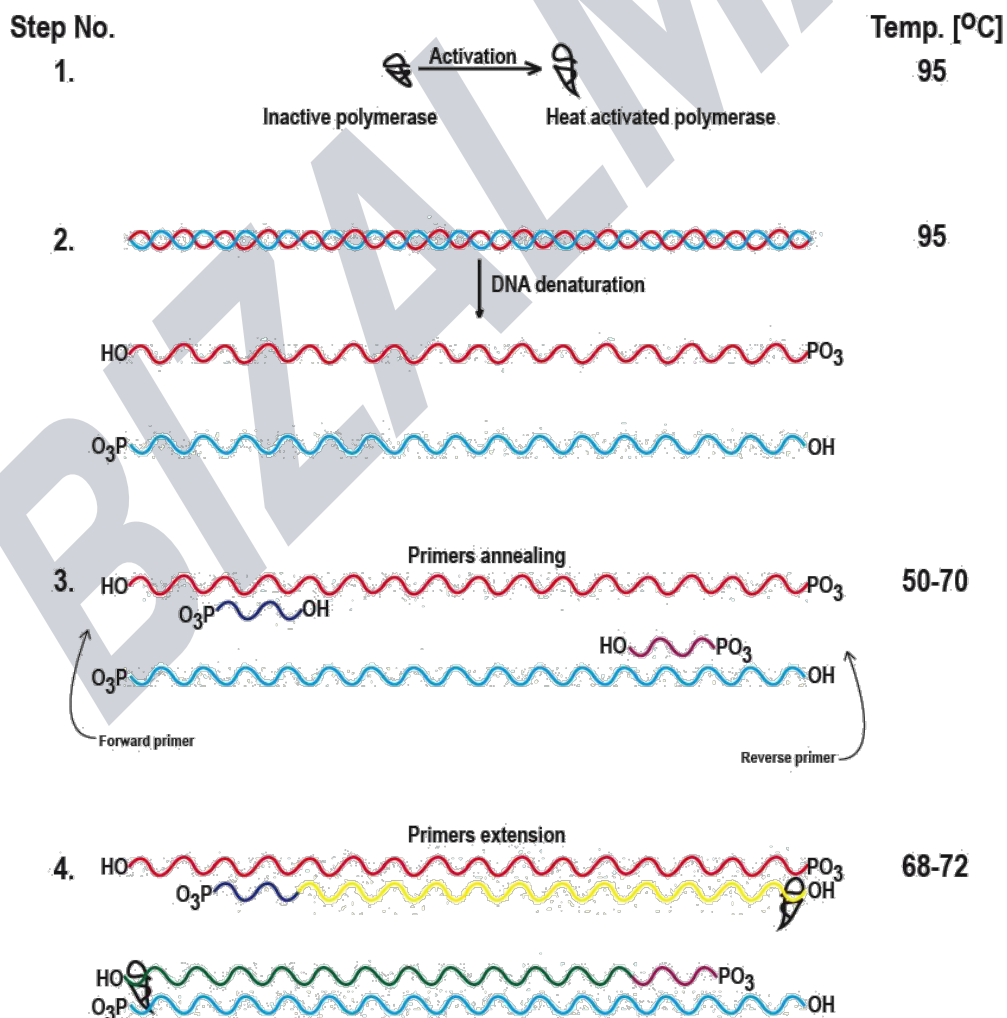
A PCR elve nagyon egyszerű: a kétszálú DNS-szakaszt (hődenaturációval) egyszálúsítjuk, majd megszintetizáljuk mindkét szál komplementer párját. Ezt ciklikusan ismételve exponenciális módon felszaporítható a kiválasztott DNS-szakasz. A reakciót katalizáló polimeráz enzim tulajdonsága, hogy működéséhez kell egy dupla szálú DNS-rész is, ahonnan a polimerizáció el tud indulni. Ezt a tényt kihasználhatjuk arra, hogy kizárólag csak az a DNS-szakasz sokszorozódjon fel, amelyiket mi szeretnénk.

A polimerizációs reakció folyamata a következőképp néz ki: ha egy egyszálú DNS-szakasz ismert részével komplementer szakaszt (ún. primert) készítünk, akkor az megfelelő körülmények között az adott komplementer szekvenciához be fog kötődni (a hibridizáció mindig a bázispárosodás szabályainak megfelelően zajlik, adeninnel szemben timin, citozinnal szemben guanin található). Ha DNS-dependens DNS-polimeráz dezoxi-nukleotid-trifoszfátokat (dNTP) adunk a fenti reakcióelegybe, akkor a feltapadt primer 3' végétől elkezdődik a komplementer láncreakciója. A polimerizációs reakciót egy idő után leállítjuk, a két szál (új és régi) szétválasztjuk (például hődenaturációval). A képződött új szálhoz tervezett komplementer primert (melynek szekvenciája megegyezik a régi szál egy rövid szakaszának a szekvenciájával) is hozzáadjuk a rendszerhez, a második polimerizációs reakcióban az eredeti szállal (vagy egy részével) azonos szekvenciájú termék polimerizálódik.

Beláthatjuk, hogy ezt elvben folytathatjuk a végtelenségig; ha minden polimerizációs/hődenaturációs ciklus után újra hozzáadjuk a kétféle primert és az enzimet (a hődenaturáció tönkreteszi az enzimek többségét), és újrafuttatjuk a reakciót, minden lépésben duplázódni fog a templátként szolgáló szakasz komplementere. Mivel az állandóan ismétlődő bemérés igen körülményes és munkaigényes lenne, ezért a reakció kezdetekor nagyon sok, mindkét szállal komplementer primert és hőstabil polimeráz tesztünk a reakcióelegybe, minek következtében a két komplementer szál egyszerre szintetizálódik. Nem kell semmi mást csinálni, csak a hőmérsékletet

ciklikusan változtatni, hogy minden ciklusban duplázódjon az adott DNS-szakasz. Nézzük részletesen a körülményeket:

1. Ha dupla szálú templátunk van, akkor 94-95 °C-ra fel kell fűtenünk a reakciócsöveket, hogy a DNS széttekeredjen (denaturáció).
2. A mintákat lehűtjük arra a hőmérsékletre (45–65 °C), ahol a specifikus primerek megtalálják a komplementer szekvenciájukat, de még nem képesek arra, hogy aspecifikus helyre kötődjenek. (Alacsonyabb hőmérsékleten egymással nem komplementer DNS-szakaszok is képesek aspecifikusan kapcsolódni.) Elvben itt az eredeti DNS két szála is visszakapcsolódhatna, mégsem ez történik, két ok miatt: egyrészt a templát DNS hosszú, sokáig tart, amíg a pontos párosodást megtalálja, másrészt primerből sokkal több van, hamarabb találja meg valamelyikük a komplementer szekvenciát. Ezt a kapcsolódási hőmérsékletet angolul „annealing temperature”-nek hívjuk, a reakció specifitását elsősorban ez határozza meg.
3. A primerek bekapcsolódása után szinte azonnal elkezdődik a polimerizáció. Hogy a polimerizáció megfelelően gyorsan haladjon, a reakció hőmérsékletét fel szokták vinni az enzim működési optimumára (72-74 °C). A felsokszorozni kívánt szakasz hosszának függvényében a reakciót melegítéssel leállítjuk (visszatérés az 1. pontra), ilyenkor szétválik a DNS két lánc, hogy aztán az annealing temperature-ra lehűtve ismét primerek tapadhassanak hozzájuk és újratekzdődhessen a polimerizáció (ábra).



Jelenlegi tudásunk szerint a SARS-CoV2 vírus RNS 5-6 nappal a fertőzés után (és a tapasztalatok szerint már 1-2 nappal a klinikai tünetek megjelenése előtt) mutatható ki a garat és az orrnyálkahártya váladékában.

A teszthez szükséges minta vétele egyszerű: a nyál és orr-váladékból vattapálcával vesznek (sodornak le) sejteket, ami szintén szakértelmet igényel, fontos, hogy a mintavételt végző a garatban és az orrüregben kellő magasságig tolja fel a mintavevő eszközöket és megfelelő technikával minél több sejtet gyűjtsön össze, ugyanis az összegyűjtött sejtek mennyisége befolyásolja a vizsgálati eredményt. Levett sejteket a mintát vevő egy megfelelő folyadékba mossa be, majd az anyagot a laboratóriumba juttatja. A teszt eredménye 24 óra múltán tudható.

A mintavétel előtt 8 órával nem szabad sem enni, sem folyadékot fogyasztani, sőt fogat mosni, vagy szájöblítést végezni sem.

A teszt eredménye lehet:

pozitív: a minta elégségesnek bizonyult, és benne jelen van a vírus

negatív: a minta elégségesnek bizonyult, és nincs jelen benne a vírus

és az is előfordulhat, hogy nem sikerült elegendő sejtet tartalmazó mintát venni (sejtszegény minta), ilyenkor a mintavétel és a vizsgálat ismétlése javasolt.

A betegség gyógyulása után a vírus eltűnik a nyálkahártyáról. Korábban igazolt koronavírus fertőzés esetén 2 egymást követő, 2 nap különbséggel vett mintán elvégzett PCR teszt negatív eredménye esetén tekinthető a páciens gyógyultnak.

Felhasznált források:

- who.int
- hbr.org
- thermofisher.com
- enzolifesciences.com
- sciencedaily.com
- https://regi.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop412A/2011_0079_wunderlich_molbio/ch07.html