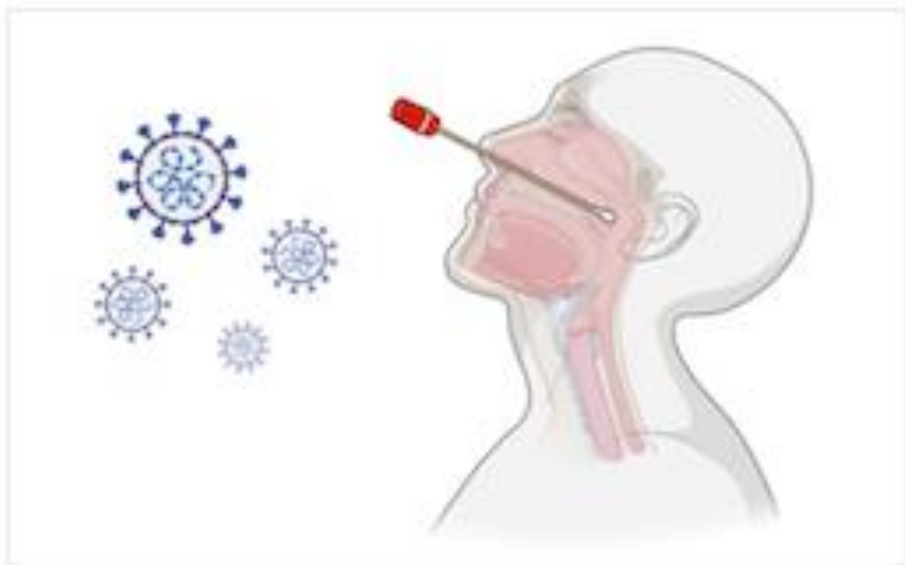


Testy na koronawirusa- w jaki sposób się je wykonuje



W Nowej Zelandii, aby potwierdzić zakażenie koronawirusem SARS-CoV-2, który powoduje chorobę Covid-19, wykorzystuje się testy PCR.

Testy PCR charakteryzują się bardzo dużą dokładnością i są w stanie rozróżnić siedem znanych rodzajów koronawirusa.

Rodzaje wirusa	choroba
SARS-CoV	SARS
SARS-CoV-2	Covid-19
MERS-CoV	MERS
HCoV-OC43	Przeziębienie
HCoV-HKU1	Przeziębienie
HCoV-229E	Przeziębienie
HCoV-NL63	Przeziębienie

Test PCR polega na poszukiwaniu materiału genetycznego wirusa w próbce wymazu pobranego od osoby podejrzanej zakażeniem. Próbkę wymazu pobierana jest z gardła lub nosa.

PCR jest jedną z najważniejszych technik używaną do badań na Wydziale Biochemii w Otago.

Poniżej opis w jaki sposób działa technika PCR

1) Pobieranie wymazu

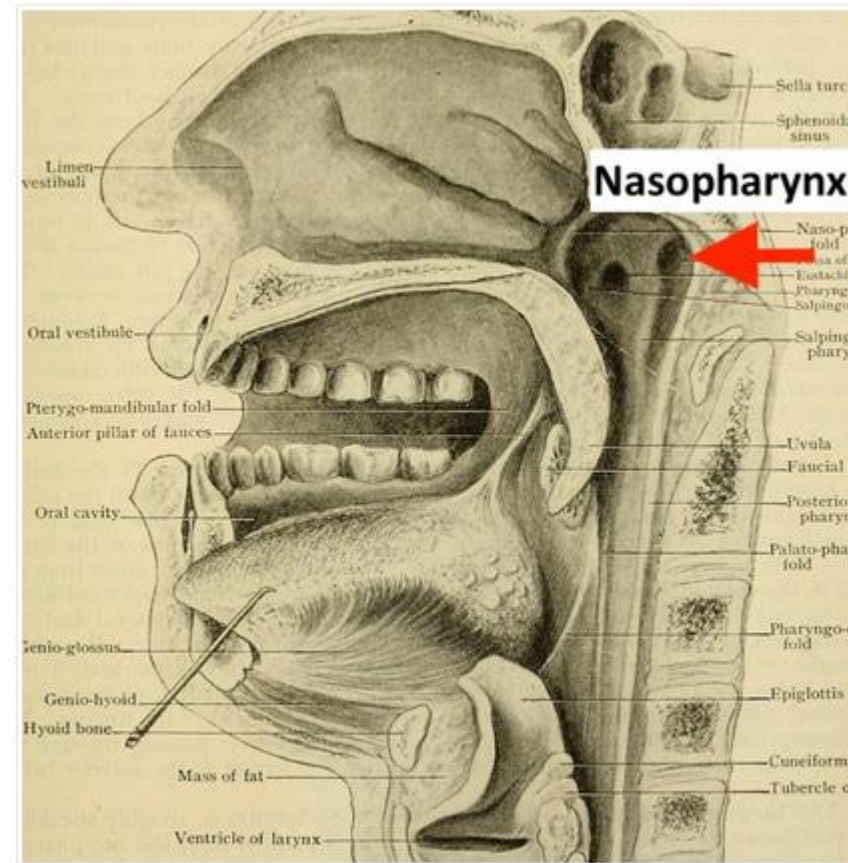
Wymaz pobierany jest za pomocą wacika na długim trzonku



Pracownik służby zdrowia z przygotowanym wacikiem na trzonku do pobrania wymazu

Pracownik służby zdrowia używa wacika z długim trzonkiem do pobrania wymazu. Wymaz pobierany jest z górnej części gardła tuż za nosem.

Na rysunku zaznaczone miejsce z którego pobierany jest wymaz.



Po pobraniu wymazu na waciku znajduje się część komórek, śluz oraz bakterie i wirusy.

Następnie wymaz jest umieszczany w probówce zawierającej mieszaninę białek i antybiotyków, które zabezpieczają pobrany materiał. Probówka jest szczelnie zamykana i wysyłana do laboratorium.

Sposób pobierania wymazu jest widoczny na filmie:

https://www.youtube.com/watch?v=syXd7kgLSN8&feature=emb_logo

Problemy z pobieraniem wymazu

Zazwyczaj jeżeli osoba jest zakażona wirusem i wykazuje objawy pobrany wymaz jest na tyle czuły, aby „wychwycić” cząsteczki wirusa pobrane z górnej części gardła tuż za nosem.

Czasami jednak wirus może namnażać się w miejscu oddalonym od pobranego wymazu lub ilość wirusa jest za mała, aby pobrać go za pomocą wacika.

Tak więc, negatywny wynik może oznaczać, że nie jest się osobą zakażoną lub po prostu, że wymaz został pobrany z miejsca, gdzie wirus się jeszcze nie namnożył.

2) Wysyłanie pobranego wymazu do laboratorium

Należy wysłać wymaz jak najszybciej

3) Izolowanie materiału genetycznego i oczyszczanie

Koronawirus składa się dwóch głównych części, są to: z zewnątrz błona tłuszczowa otoczona białkami, a w środku materiał genetyczny RNA owinięty białkami

Poniżej rysunek schematyczny cząsteczki koronawirusa



Illustration by David S. Goodsell, [RCSB Protein Data Bank](https://www.rcsb.org/).

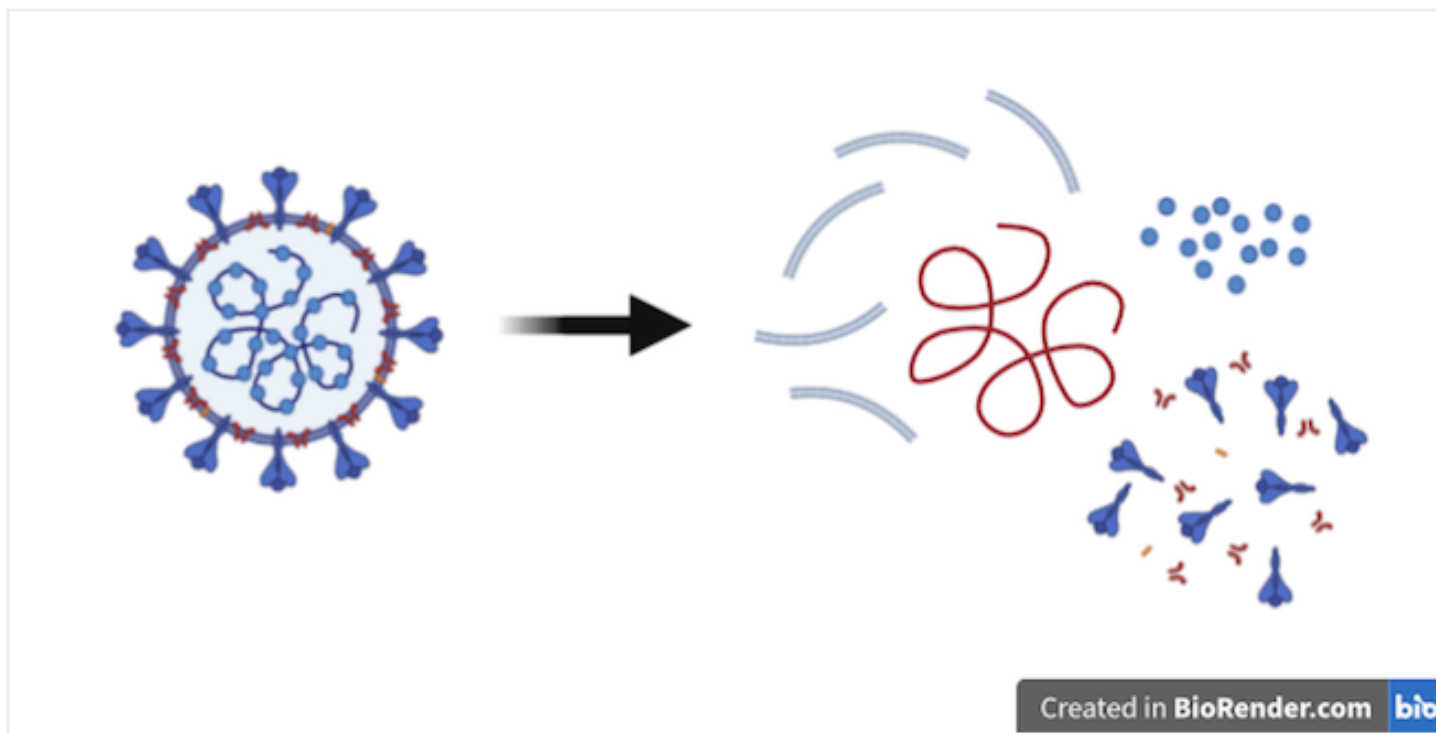
Aby wykonać test sprawdzający obecność koronawirusa należy rozbić cząsteczki koronawirusa i wydobyć z nich materiał genetyczny. Należy również pozbyć się wszystkich innych składników obecnych w pobranym wymazie.

Pobrana próbka wymazu zawiera wiele innych substancji np. : śluz, inne białka

Należy więc pozbyć się wszystkich innych substancji obecnych w pobranym wymazie oraz pozostałych części cząsteczki koronawirusa (białka, błona tłuszczowa)

Należy rozbić cząsteczki

Cząsteczki wirusa rozbijamy za pomocą chemikaliów, detergentów oraz soli chaotropowej

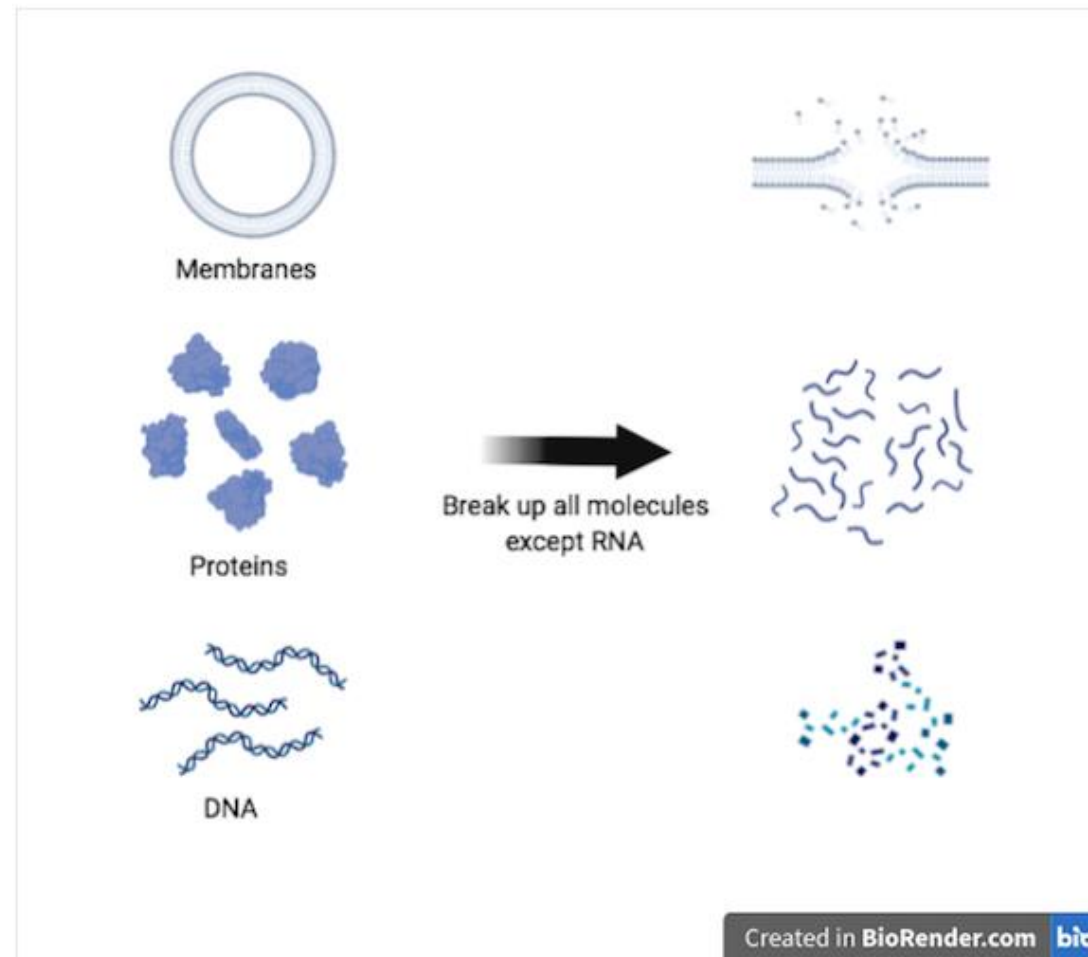


Proces rozbicia cząsteczki wirusa uwalnia jego elementy. (RNA oznaczone jest kolorem czerwonym).

Zastosowanie detergentu pozwala na rozbięcie błon komórkowych wirusów, które zbudowane są z oleistych cząsteczek

Zastosowana sól chaotropowa uczestniczy w procesie denaturacji białek zatrzymując ich działanie oraz pomaga oddzielić RNA od białek.

Białka są „cięte” na kawałki przy pomocy enzymu proteazy. Natomiast DNA jest rozrywane za pomocą enzymu DNazy.



W kolejnym kroku należy pozbyć się wszystkiego z próbki oprócz RNA.

Obecnie próbka składa się wielu typów rozbitych cząsteczek, które są zmieszane z RNA. Należy zostawić tylko RNA.

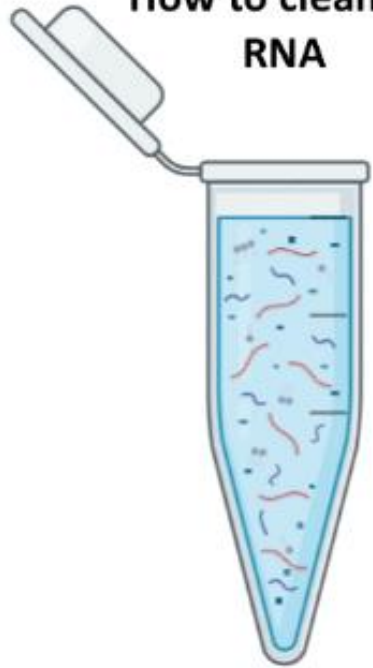
Aby mieć pewność, że RNA nie zostanie przypadkowo wymyte do próbki należy dodać małe krzemionkowe kulki magnetyczne. RNA wówczas przykleja się do kulek. Następnie na zewnętrznej stronie próbki należy umieścić magnes. Kulki a wraz z nimi RNA przyklejają się do wewnętrznej ścianki probówki za pomocą wytworzonego przez magnes przyciągania.

Dzięki zastosowaniu magnezu i kulek można w łatwy sposób wymyć wszystkie pozostałe składniki próbki oprócz RNA. Do mycia stosuje się płyn z bardziej chaotropową solą.

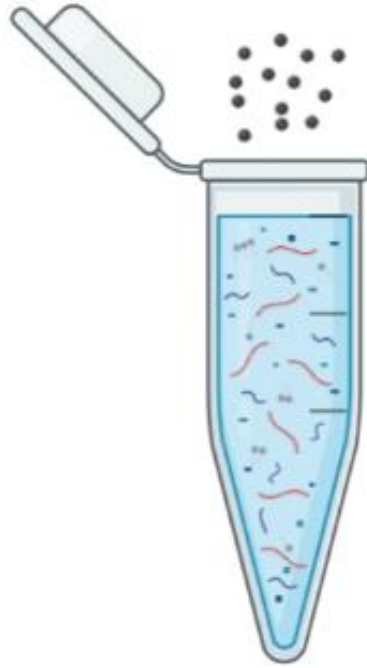
Gdy w próbce jest już obecny tylko materiał genetyczny można go odkleić od kulek magnetycznych. RNA należy przemyć wodą, a kulek pozbyć się za pomocą magnezu.

Kolejne kroki jaki należy wykonać, aby uzyskać czyste RNA

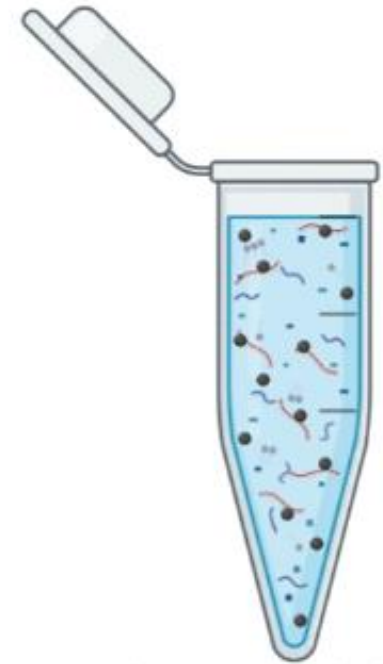
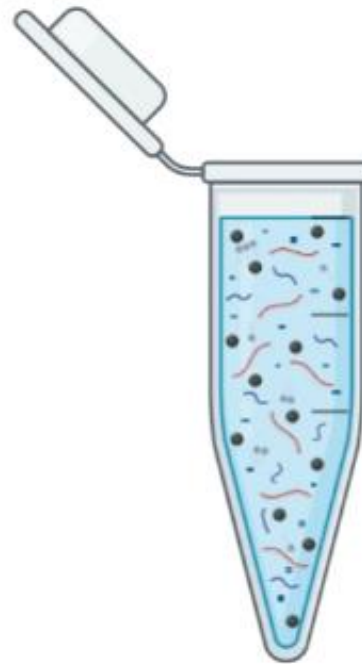
How to clean up RNA



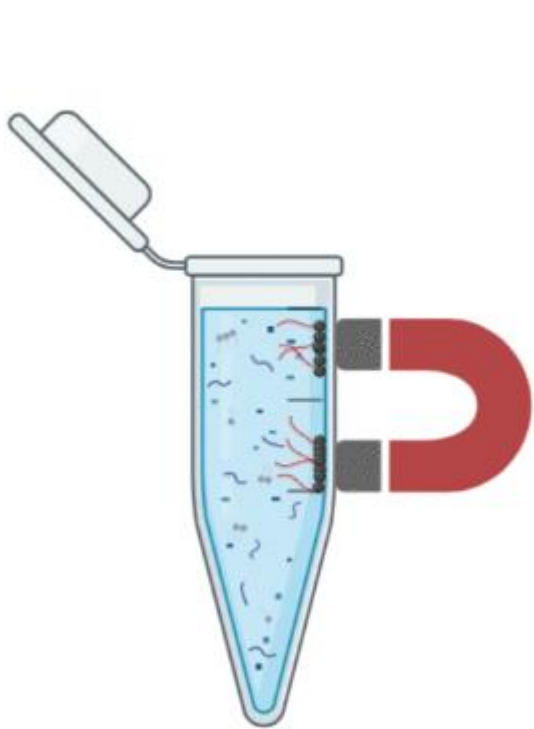
RNA mixed with other molecules.



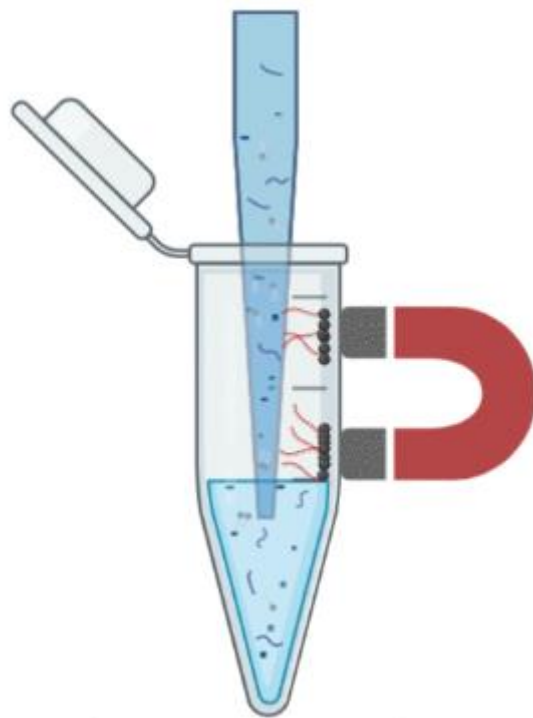
Add magnetic beads.



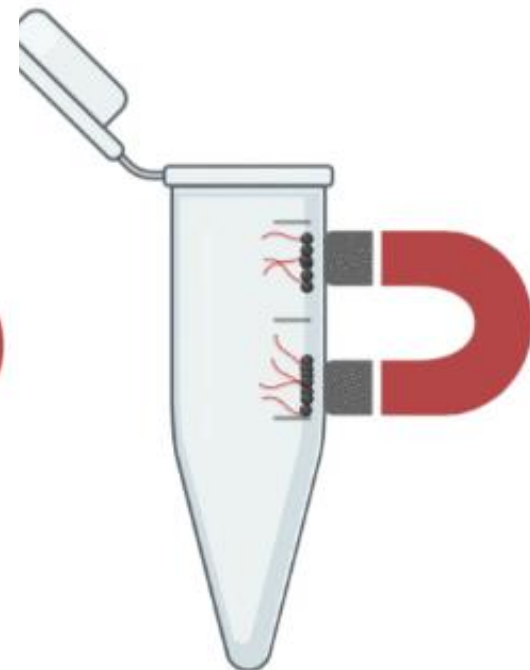
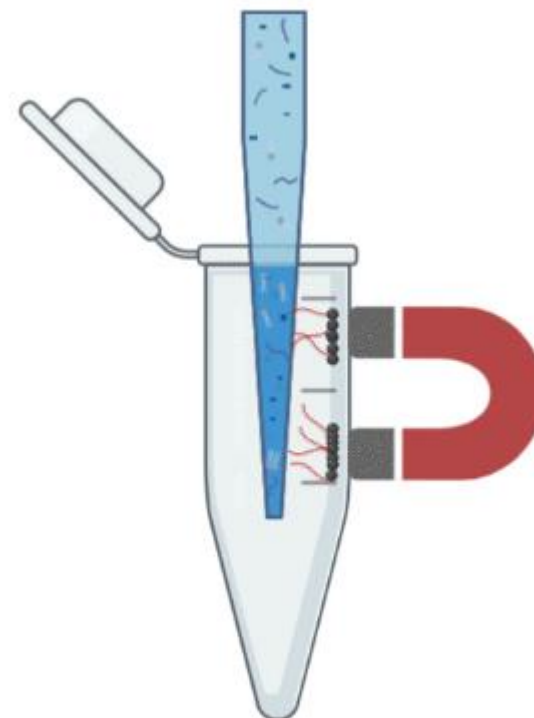
The RNA sticks to the beads.

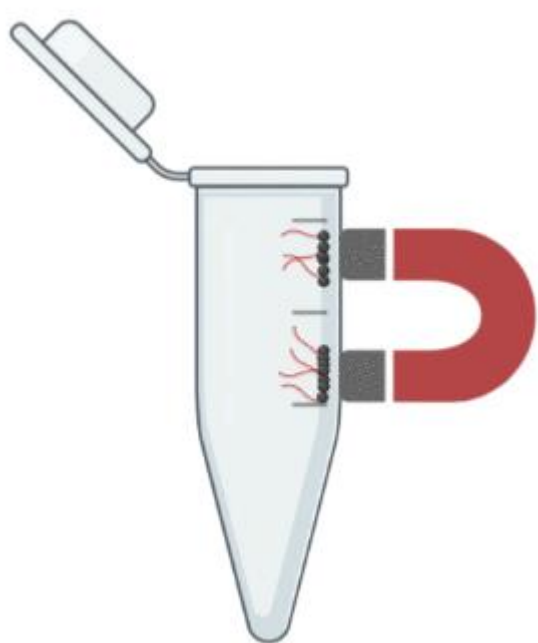


Put a magnet next to the tube. The beads (with RNA) stick to the magnet.

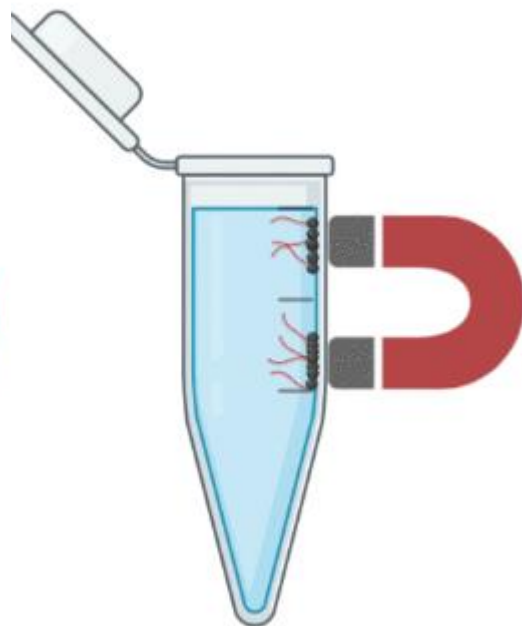


Wash away everything except the RNA.

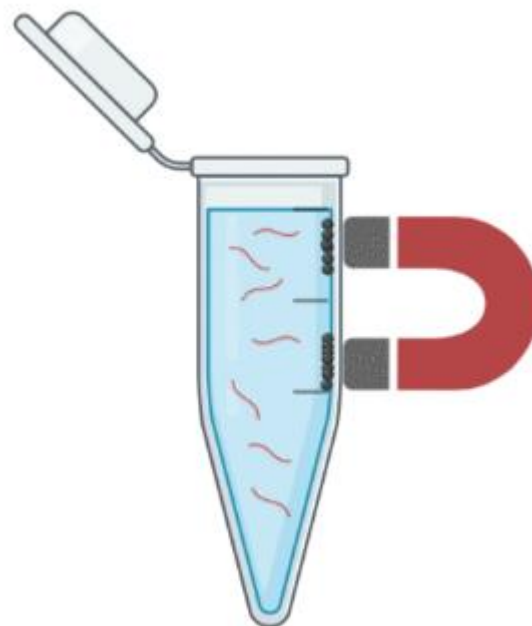




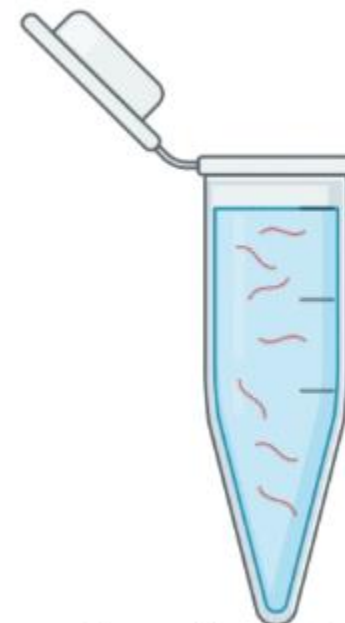
Add water.



The RNA comes off the beads.



Take away the magnet and beads,
and you have clean RNA.



4) Upewnienie się, że test wykryje tylko nowego koronawirusa

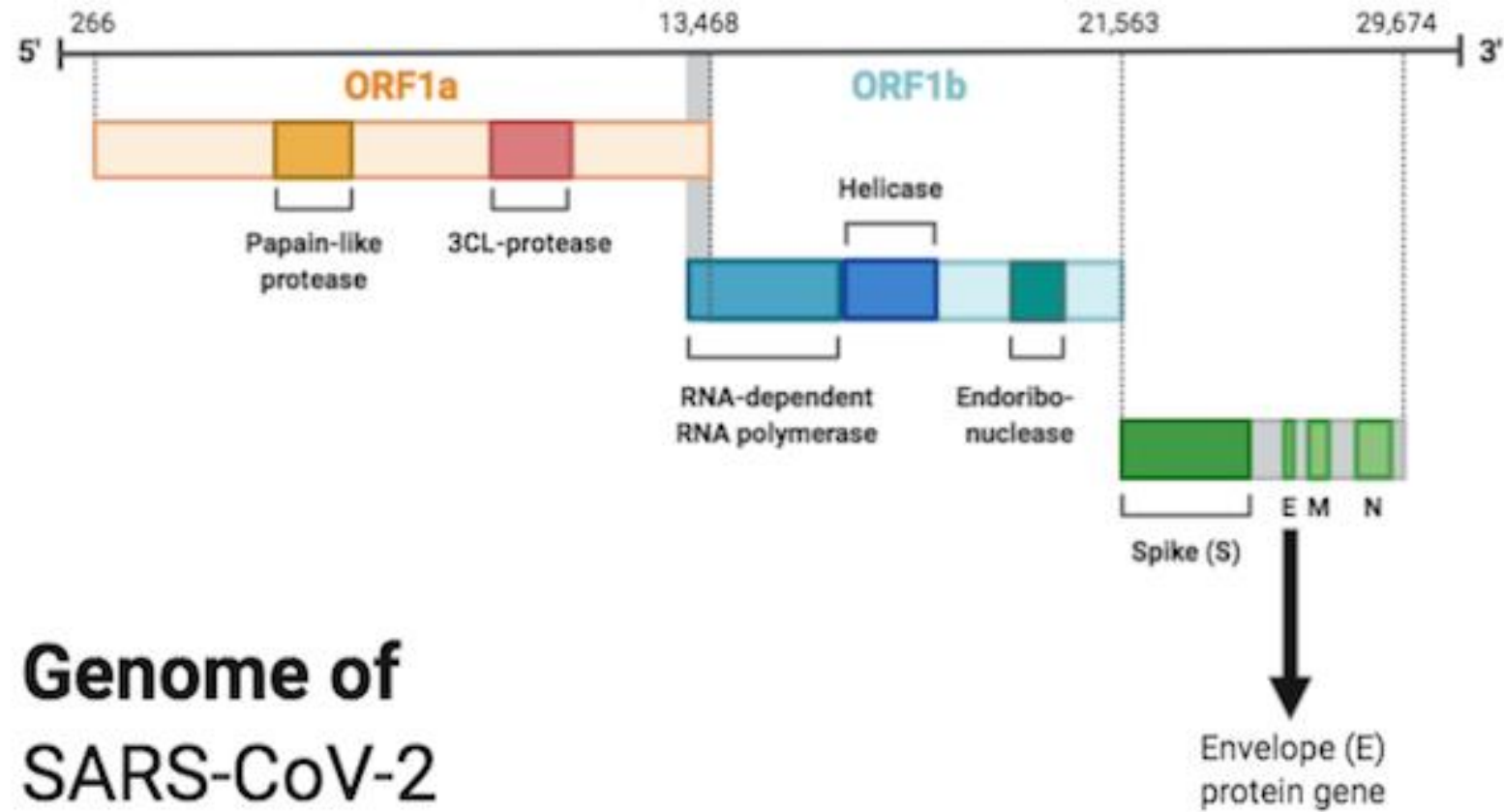
RNA obecne w próbce jest mieszaniną RNA ludzkiego oraz RNA bakterii i wirusów.

Aby być pewnym, że w próbce będzie tylko RNA należące do wirusa należy znaleźć sekwencję RNA, która jest unikalna tylko dla tego wirusa.

RNA nowego koronawirusa zostało poznane przez naukowców już na początku epidemii.

W genomie koronawirusa znajduje się prawie 3000 zasad zawierających informację o 29 różnych białkach.

Schemat genomu:



Należy wykorzystać dwa krótkie fragmenty DNA (tzw. startery), które przyłączą się do sekwencji genomu.

Do testu PCR naukowcy wybrali dwa krótkie fragmenty sekwencji genu E o długości 22 i 26 zasad. Białko E (otoczek) kodowane przez ten gen pomaga w tworzeniu tłustej błony wirusa.

Naukowcy stworzyli startery DNA, które przyłączają się tylko do tych fragmentów genu E.

Poniżej sekwencja RNA genu E (RNA składa się z zasad G, C, A i **U**):

```
AUGUACUCAUUCGUUUCGGAAGAGACAGGUACGUUAAUAGUAAUAGCGUACUUCUUUUUCUUGCUUUCGUGGUAUUCUU
GCUAGUUACACUAGCCAUCCUACUGCGCUUCGAUUGUGUGCGUACUGCUGCAAUAUUGUUAACGUGAGUCUUGUAAAAC
CUUCUUUUUACGUUUACUCUCGUGUUAAAAAUCUGAAUUCUUCUAGAGUCCUGAUCUUCUGGUCUAAACGAACUAAAUA
UUAUAUUAGUUUUUCUGUUUGGAACUUUAAUUUUUAGCC
```

Poniżej sekwencje dwóch starterów DNA używanych w teście (DNA składa się z zasad G,C, A i T)

Starter przedni: ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT

Starter wsteczny: ATATTGCAGCAGTACGCACACA

Startery przyłączają się do genu E tylko w częściach podkreślonych:

AUGUACUCAUUCGUUUCGGAAGAG**ACAGGUACGUUAAUAGUUAUAGCGU**ACUUCUUUUUCUUGCUUUCGUGGUAAUUCUU
GCUAGUUACACUAGCCAUCCUUACUGCGCUUCGAU**UGUGUGCGUACUGCUGCAAUAU**UGUUAACGUGAGUCUUGUAAAAC
CUUCUUUUUUACGUUUACUCUCGUGUUAAAAAUCUGAAUUCUUCUAGAGUUCCUGAUCUUCUGGUCUAAACGAACUAAUA
UUAUAUUAGUUUUUCUGUUUGGAACUUUAAUUUUUAGCC

W ten sposób test wykrywa tylko RNA koronawirusa

5) Jeżeli wirus jest obecny

Działanie RT-PCR (od ang. reverse transcription polymerase chain reaction)

Aby wykryć obecność RNA koronawirusa, należy wykonać wiele jego kopii, jednak nie jest to proste

Najpierw należy wykonać proces odwrotnej transkrypcji (RT) (synteza nici DNA na matrycy RNA), wykonuje się to za pomocą enzymu odwrotnej transkryptazy.

Po otrzymaniu kopii DNA należy wykonać wiele kopii DNA przy użyciu łańcucha polimerazy reakcji (PCR) oraz enzymu – polimerazy DNA.

Do kopiowania RNA wirusa używa się tylko starterów genu E.

Film poniżej przedstawia działanie RT-PCR

https://www.youtube.com/watch?v=4RJhx8hjFAs&feature=emb_logo

W jaki sposób dowiedzieć się, czy RNA wirusa zostało pomyślnie skopiowane?

Laboratoria badawcze wykonują 45 „cykli” PCR na próbce testowej Covid-19, co zajmuje nieco ponad pół godziny. Po tym czasie pojedyncza cząsteczka RNA SARS-CoV-2 stanie się 17 milionami identycznych cząsteczek DNA. Jednak nadal są tak małe, że nie widać ich oczami.

Aby zobaczyć, ile jest DNA i sprawdzić, czy wynik testu jest pozytywny, mieszanina reakcyjna PCR zawiera specjalny znacznik który świeci, gdy jest pocięta.

Znacznik przykleja się do tego samego fragmentu DNA, co jeden ze starterów.

Kiedy DNA zostaje skopiowane, znacznik zostaje zerwany z DNA i pocięty. Oderwana, posiekana etykieta następnie zaczyna fluoryzować (świecić)

Znaczniki te można „zobaczyć” i zmierzyć za pomocą maszyny wykrywającej światło. Im więcej fluorescencji wykryto w reakcji PCR, tym więcej kopii DNA zostało utworzonych.

Więc kiedy jest dużo świecących się miejsc, wiemy, że RNA koronawirusa było obecne w próbce wymazu i wiele kopii DNA zostało wykonanych, a zatem wynik testu jest pozytywny.

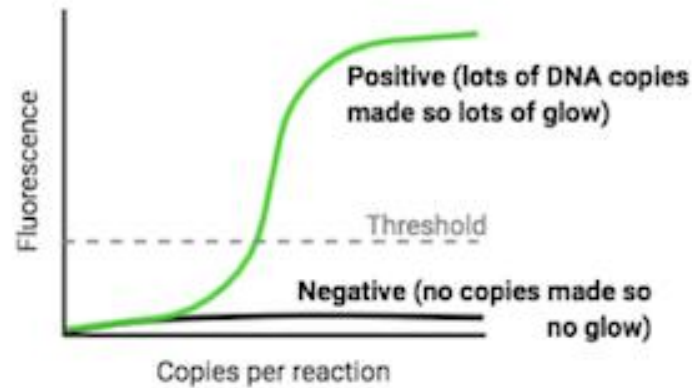
Jeśli nie ma poświaty, w próbce wymazu nie było żadnego koronawirusa, nie można było wykonać kopii DNA, a wynik testu jest negatywny.



Before DNA copying:
The intact tag binds to DNA
and does not glow.

During copying:
As the polymerase makes a new DNA
strand, the tag is displaced, chopped up,
and glows.

What the machine sees:

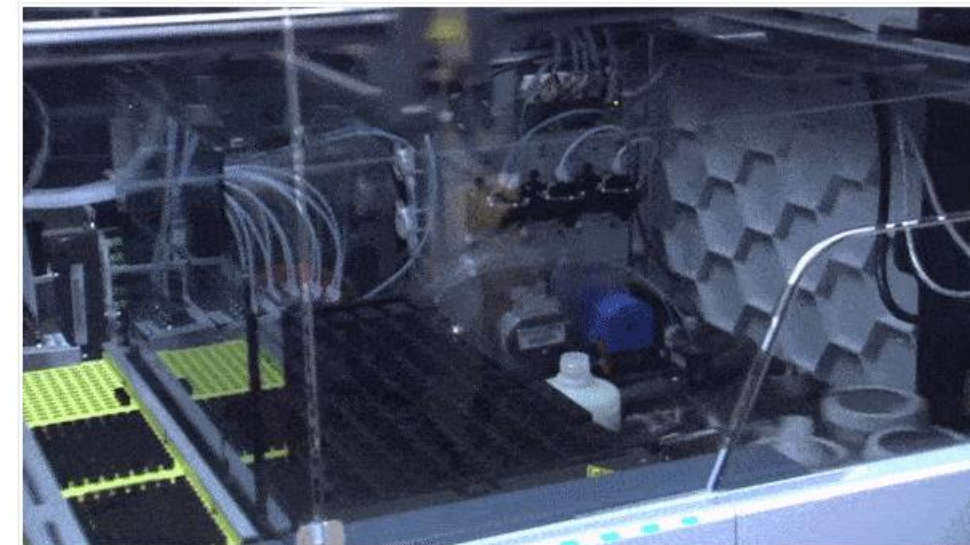
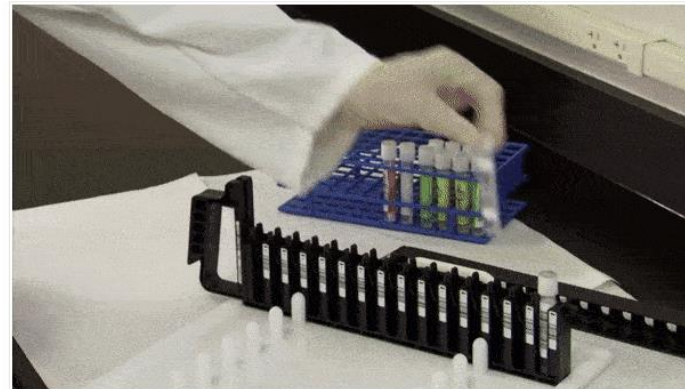
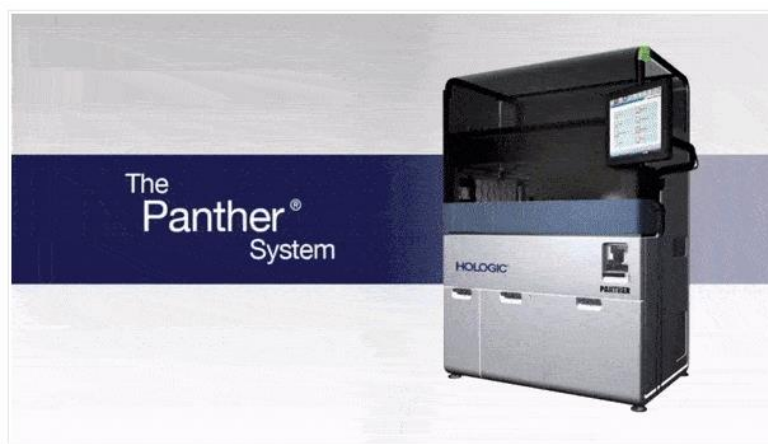


Aby wykonać wiele testów jednocześnie stosuje się „roboty”

Bardzo ważną rzeczą przy wykonywaniu testów na koronawirusa jest możliwość wykonania wielu testów w szybkim czasie

W laboratorium można to uzyskać dzięki zastosowaniu robotów, które przygotowują RNA oraz odwrotną transkrypcję PCR

Jedna osoba ręcznie może codziennie przeanalizować około 100 próbek, dzięki zastosowaniu zautomatyzowanej maszyny możliwe jest wykonanie nawet 1000 testów w ciągu 24 godzin i nie jest prawdopodobne, aby popełnione zostały błędy.



Przykład jednej z maszyn używanej do testowania w Nowej Zelandii:

Co się stanie, jeśli zabraknie nam zestawów testowych z zagranicy?

Pracownicy z Wydziału Mikrobiologii i Immunologii w Otago pomogli w uruchomieniu testu w Nowej Zelandii. Zaprojektowali go do pracy z enzymami i innymi odczynnikami, które można importować z zagranicy.

Ale co się stanie, jeśli brakuje niektórych z tych odczynników z zagranicy i nie będzie możliwości importu przez jakiś czas?

Pracownicy służby zdrowia, naukowcy i media podkreślają to jako problem, o którym należy pomyśleć.

(Przeczytaj artykuł na temat RNZ: Covid-19: Limited testing kits has scientists searching for generic alternative)

Jeśli zajdzie taka potrzeba, część testów można wykonać w Nowej Zelandii.

Pomocne mogą być umiejętności i sprzęt w instytucjach badawczych, takich jak Otago Biochemistry.

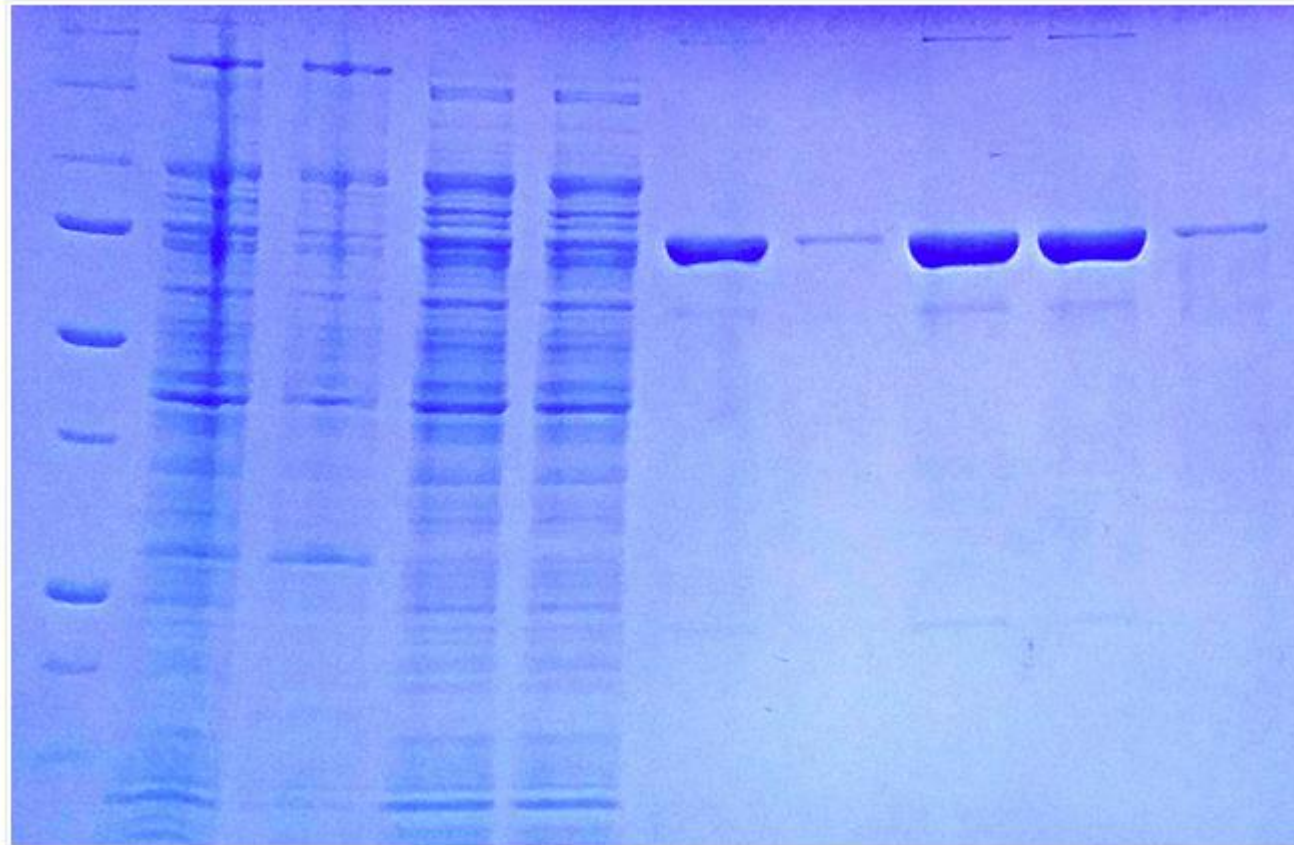


Sam Jamieson oczyszcza enzym odwrotnej transkryptazy w laboratorium Mace.

W Otago Biochemistry grupa badawcza profesora Petera Mace'a wykonała enzym odwrotnej transkryptazy.

Naukowcy „włożyli” gen kodujący enzym do niektórych bakterii, zmusili bakterie do wytworzenia enzymu, a następnie wyekstrahowali enzym z bakterii.

Naukowcy często wytwarzają białka w ten sposób, aby mogli je zbadać i dowiedzieć się, jak działają.



Zdjęcie żelu przedstawiające enzym na różnych etapach oczyszczania. Duże plamki po prawej stronie to próbki czystego enzymu odwrotnej transkryptazy.

Na całym świecie przeprowadza się bardzo dużą liczbę badań nad nowym koronawirusem.
Więcej informacji można uzyskać na stronie:

<https://www.otago.ac.nz/biochemistry/research/otago736948.html> .