

## Rekomendacje NIZP-PZH w zakresie diagnostyki molekularnej SARS-CoV-2

Warszawa 24.04.2020r

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny pełniąc funkcję krajowego laboratorium centralnego COVID-19 prowadzącego weryfikację wyników badań laboratoryjnych w kierunku SARS-CoV-2 przedstawia rekomendacje dla laboratoriów prowadzących molekularną diagnostykę COVID-19. Przedstawione rekomendacje obejmują spostrzeżenia i wnioski z dotychczas przeprowadzonych weryfikacji wyników badań laboratoryjnych na obecność materiału genetycznego SARS-CoV-2 oraz zalecenia organizacji międzynarodowych (WHO, ECDC) i rekomendacji innych krajowych laboratoriów ds. diagnostyki COVID-19.

Mając na uwadze fakt, że laboratoria prowadzące diagnostykę molekularną SARS-CoV-2 pracują z użyciem zestawów diagnostycznych (testy molekularne i zestawy do izolacji RNA) różnych producentów i stosują różne aparaty do reakcji real-time PCR **NIZP-PZH nie ma możliwości sprawdzenia i oceny wszystkich stosowanych rozwiązań w diagnostyce COVID-19**. Z tego względu **każde laboratorium we własnym zakresie musi przeprowadzić sprawdzenie stosowanego układu diagnostycznego**, zgodnie z zaleceniami producenta lub producentów wszystkich modułów układu diagnostycznego. **NIZP-PZH dokonuje jedynie weryfikacji wyniku badania laboratoryjnego próbek które wcześniej zostały zbadane w laboratoriach**, a wyniki wydane zleceniodawcom. Badaniu podlega oryginalna próbka materiału klinicznego od pacjenta. Na podstawie stwierdzonych rozbieżności NIZP-PZH wskazuje możliwe przyczyny rozbieżności i formułuje zalecenia i rekomendacje dla ocenianego laboratorium. Poniżej przedstawiono najczęściej zalecane rekomendacje.

### Rekomendacje

#### 1. Interpretacja wyniku dodatniego na granicy czułości analitycznej

Ze względu na wysoką czułość analityczną metody real-time PCR szczególny problem stanowią próbki z wynikiem na granicy czułości analitycznej, tj. gdy powyżej 35 cyklu (CT) uzyskano krzywą sygnału reakcji rtPCR o kształcie „S”. Zgodnie z ogólną zasadą należy wynik badania interpretować zgodnie z zaleceniami producenta zestawu diagnostycznego (dla zestawów ze znakiem IVD). Jednakże w procesie walidacji całego układu diagnostycznego może się okazać, że wskazane przez producenta zestawu kryteria interpretacji wyniku trzeba poddać korekcie w celu uniknięcia wyniku fałszywie dodatniego. Pomocne w tym procesie jest stosowanie kontroli (dodatniej i ujemnej) dostarczonych przez producentów zestawów diagnostycznych i zestawów do izolacji RNA. Zalecany jest także udział w programach zewnętrznej kontroli jakości (EQAs) w przypadku gdy będą dostępne.

#### 2. Wynik nierozstrzygający

Ze względu na różny poziom wirēmii (liczba kopii SARS-coV-2 w badanej próbce) w okresie rozwoju zakażenia u różnych osób i w różnym czasie od początku zakażenia, w badaniach laboratoryjnych w kierunku SARS-CoV-2 należy spodziewać się wyników dodatnich na granicy czułości analitycznej. W przypadku, gdy wynik dodatni budzi wątpliwości (wynik słabo dodatni), zgodnie z wytycznymi WHO diagnosta ma prawo wystawić **wynik nierozstrzygający i zlecić pobranie do badania kolejnej próbki od pacjenta po 24-48h** od momentu pobrania próbki, której wynik dodatni budził wątpliwość. Z reguły po upływie 24-48h poziom wirēmii w próbce od pacjenta ulega zmianie – wzrasta lub obniża się tak, iż

mieści się w obszarze wyniku pewnego analitycznie tj. pozwala jednoznacznie stwierdzić obecność lub brak obecności materiału genetycznego SARS-CoV-2 w badanej próbce. **Wystawienie wyniku nierozstrzygującego nie świadczy i nie może być interpretowane jako błąd lub brak należytego działania laboratorium, a wszelkie działania i naciski na przyspieszenie wydania wyniku ostatecznego są niedopuszczalne i naruszają ustawowe prawa diagnostyki laboratoryjnego.**

### 3. Wynik negatywny – brak wykrycia obecności SARS-CoV-2

W przypadku uzyskania wyniku „ujemnego” tj. przy braku wykrycia obecności poszukiwanych markerów genetycznych SARS-CoV-2 należy mieć świadomość, że **wynik „ujemny” nie wyklucza zakażenia**. Z tego względu, w przypadku gdy pacjent wykazuje objawy typowe dla COVID-19 lub miał udokumentowany bliski kontakt z potwierdzonym przypadkiem COVID-19 wskazane jest wykonanie ponownego badania kolejnej próbki od pacjenta. Alternatywnie można przeprowadzić badanie tej samej próbki innym testem molekularnym jeśli jest dostępny.

### 4. Wynik niediagnostyczny

Jeśli w trakcie badania stwierdzono, że w badanej próbce nie nastąpiła amplifikacja kontroli wewnętrznej i uzyskano wynik „ujemny” tj. brak wykrycia obecności poszukiwanych markerów genetycznych SARS-CoV-2, nie należy wydawać wyniku badania wskazującego na brak obecności SARS-CoV-2. Taki wynik należy uznać za niediagnostyczny. Wskazana jest ponowna izolacja kwasów nukleinowych z badanej próbki i ponowne przeprowadzenie testu. Jeśli po raz kolejny nie nastąpiła amplifikacja kontroli wewnętrznej, może to wskazywać na obecność inhibitorów reakcji rtPCR. Taką próbkę należy uznać za niezdadną do badań i jak najszybciej poinformować zleceniodawcę o konieczności dostarczenia kolejnej próbki do badania.

### 5. Dobór testu diagnostycznego do wymogów definicji przypadku COVID-19

Ze względów na wymogi europejskiego i krajowego nadzoru epidemiologicznego nad COVID-19, laboratoria, które chcą prowadzić kompletną diagnostykę COVID-19 (tj. pozwalającą na laboratoryjne potwierdzenie przypadku COVID-19) muszą stosować metodykę badania spełniającą wymogi aktualnej krajowej definicji przypadku potwierdzonego COVID-19. Definicja ta jest dostępna na stronie internetowej Głównego Inspektora Sanitarnego (GIS)<sup>1</sup>

W zależności od etapu rozwoju epidemii COVID-19 w krajach będących członkami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) dopuszczalne są różne rozwiązania diagnostyczne w celu laboratoryjnego potwierdzenia przypadku COVID-19.<sup>2</sup> W krajach i na obszarach w których epidemia jest pod kontrolą **WHO zaleca stosowanie molekularnych testów diagnostycznych wykrywających co najmniej 2 różne obszary genomu SARS-CoV-2, w tym przynajmniej jeden swoisty dla tego wirusa.**

W krajach i na terenach gdzie występuje stała cyrkulacja SARS-CoV-2 w populacji WHO dopuszcza stosowanie testów wykrywających tylko jeden obszar genomu SARS-CoV-2 do laboratoryjnego potwierdzenia przypadku COVID-19. Jednak o tym czy w danym kraju / obszarze występuje stała

<sup>1</sup> <https://gis.gov.pl/aktualnosci/definicja-przypadku-na-potrzeby-nadzoru-nad-zakazeniami-ludzi-nowym-koronawirusem-sars-cov-2/>

<sup>2</sup> <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1272454/retrieve>

cyrkulacja SARS-CoV-2 nie decyduje indywidualnie diagnosta laboratoryjny tylko krajowa definicja przypadku potwierzonego COVID-19 (w Polsce ogłaszana przez GIS).

Większość zestawów do molekularnej diagnostyki SARS-CoV-2 dostępnych obecnie na rynku krajowym może wykryć dwa lub więcej obszarów genu (genów) SARS-CoV-2. Zgodnie z kryteriami interpretacyjnymi niektórych producentów wykrycie tylko jednego z poszukiwanych genów interpretowane jest jako wynik pozytywny dla COVID-19. Jednak w oparciu o doświadczenia własne NIZP-PZH zaleca wystawienie wyniku pozytywnego po wykryciu minimum dwóch genów. W przypadku wykrycia tylko jednego genu zaleca się ponowne badanie innym testem molekularnym lub konsultację z laboratorium centralnym. Przykładowa interpretacja wyników testów 2-genowych z uwzględnieniem markerów (genów) przesiewowych albo swoistych została podana poniżej.

1) **Gen przesiewowy (+) i gen potwierdzający (+):**

Wynik pozytywny dla COVID-19 (**wykryto SARS-CoV-2**)

Niektóre zestawy z trzema genami docelowymi wykorzystują jeden gen docelowy do testu przesiewowego, a pozostałe dwa geny docelowe do testu potwierdzającego. W przypadku tych zestawów wynik testu potwierdzającego uznaje się za pozytywny w przypadku wykrycia jednego z genów potwierdzających. Jeśli żaden gen potwierdzający nie zostanie wykryty, wyniku nie można interpretować jako pozytywny.

2) **Gen przesiewowy (+) i gen potwierdzający (-):**

Wynik negatywny dla COVID-19 (**nie wykazano obecności SARS-CoV-2**)

W przypadku zestawów wykorzystujących startery dla betakoronawirusów do testu przesiewowego istnieje możliwość wykrycia różnych betakoronawirusów, nie tylko SARS-CoV-2.

3) **Gen przesiewowy (-) i gen potwierdzający (-):**

Wynik negatywny dla COVID-19 (**nie wykryto SARS-CoV-2**)

Jeśli kontrola wewnętrzna jest również ujemna, wynik jest niediagnostyczny i konieczne jest powtórzenie badania tej samej próbki.

4) **Gen przesiewowy (-) i gen potwierdzający (+):**

Powtórzyć badanie. Jeśli wynik nie ulegnie zmianie należy skontaktować się z laboratorium centralnym w celu przeprowadzenia dodatkowych badań.

Obecnie wiedza na temat czasu wykrycia wirusa w przypadkach COVID-19 jest bardzo ograniczona. Dlatego **trudno jest wykluczyć COVID-19 wyłącznie na podstawie jednego negatywnego wyniku**, szczególnie w przypadku stosowania próbki z górnych dróg oddechowych. W przypadku, gdy u pacjenta występuje wysokie prawdopodobieństwo wystąpienia COVID-19 (na podstawie wywiadu epidemiologicznego) powinny zostać pobrane i zbadane inne próbki z górnych dróg oddechowych. Jednocześnie można pobrać do badania także próbki z dolnych dróg oddechowych zwłaszcza przy pogarszającym się stanie pacjenta.