

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

Warszawa 02.11.2020r.

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 (z oceny 144 laboratoriów i 2497 próbek) 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). WHO zwraca szczególną uwagę na konieczność bardzo ostrożnej interpretacji wyników „słabo dodatnich” tj. przy wysokich wartościach Ct i zaleca w razie wątpliwości zbadanie kolejnej próbki od pacjenta¹.

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**

¹ Diagnostic testing for SARS-CoV-2. WHO Interim guidance, 11 September 2020
<https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1302661/retrieve>

od pacjenta po 24-48 h od momentu pobrania próbki, której wynik dodatni budził wątpliwość. Z reguły po upływie 24-48 h poziom wirerii 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 nierozstrzygającego nie świadczy i nie może być interpretowane jako błąd lub brak należytego działania laboratorium.**

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

W przypadku uzyskania wyniku negatywnego („ujemnego”) tj. przy braku wykrycia obecności poszukiwanych markerów genetycznych SARS-CoV-2 należy mieć świadomość, że **wynik negatywny 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 negatywny 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 rt-PCR. Taką próbkę należy uznać za niezdatną 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 przypadku COVID-19 z 31.10.2020 r. jest dostępna na stronie internetowej Głównego Inspektora Sanitarnego (GIS)²

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-19.³ 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 cyrkulacja SARS-CoV-2 nie decyduje indywidualnie diagnosta laboratoryjny tylko krajowa definicja przypadku potwierdzonego COVID-19. **Krajowa definicja przypadku COVID-19 z 31.10.2020 r. nie precyzuje liczby fragmentów genomu, które muszą być wykryte by wynik można uznać za pozytywny**

² <https://www.gov.pl/web/gis/definicja-przypadku-covid19-na-potrzeby-nadzoru-epidemiologicznego-nad-zakazeniami-wirusem-sars-cov-2-definicja-z-dnia-31102020->

³ <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1272454/retrieve>

co oznacza, że wykrycie tylko jednego swoistego fragmentu genomu SARS-CoV-2 jest wystarczające do laboratoryjnego potwierdzenia przypadku COVID-19. Z tego względu z niniejszych rekomendacji NIZP-PZH usunęliśmy poradę w zakresie interpretacji poszczególnych fragmentów /genów/ SARS-CoV-2 w odniesieniu do ostatecznego wyniku badania.

NIZP-PZH 02.11.2020r.