

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

aktualizacja na dzień 31.05.2021r.

Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny z dniem 10.06.2021r. kończy prowadzenie weryfikacji wyników badań laboratoryjnych w kierunku SARS-CoV-2 (wydane zostaną ostatecznie poświadczenia poddania się procesowi weryfikacji w NIZP-PZH). Instytut przedstawia rekomendacje dla laboratoriów prowadzących molekularną diagnostykę COVID-19 obejmujące spostrzeżenia i wnioski z dotychczas przeprowadzonych weryfikacji wyników badań laboratoryjnych na obecność materiału genetycznego SARS-CoV-2 (z oceny 289 laboratoriów i 5561 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 genetyczne i zestawy do izolacji RNA) różnych producentów i stosują szeroki zakres aparatury, **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. Ponadto, zgodnie z zaleceniami Zespołu ds. koordynacji laboratoriów COVID<sup>1</sup> do dnia 30.06.2021r. laboratoria te zobowiązane są do uzyskania certyfikatu potwierdzającego jakość badań laboratoryjnych w kierunku SARS-CoV-2 w materiale klinicznym od ludzi uzyskany w ramach udziału w zewnętrznych, ogólnodostępnych programach kontroli jakości badań (EQA) lub w programach organizowanych przez WHO lub ECDC.

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 pacjenta<sup>2</sup>.

---

<sup>1</sup> Ustalenia w zakresie kontroli jakości badań w laboratoriach COVID  
<https://www.gov.pl/web/zdrowie/wniosek-o-wlaczanie-medycznego-laboratorium-diagnostycznego-do-wykazu-laboratoriow-covid>

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

## 2. Wynik nierozstrzygający

Ze względu na różny poziom ładunku wirusa (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 24-48 h** od momentu pobrania próbki, której wynik dodatni budził wątpliwość. Z reguły po upływie 24-48 h ładunek wirusa 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)<sup>3</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>4</sup> W krajach i na obszarach, w których epidemia jest pod kontrolą

<sup>3</sup> <https://www.gov.pl/web/gis/definicja-przypadku-covid19-na-potrzeby-nadzoru-epidemiologicznego-nad-zakazeniami-wirusem-sars-cov-2-definicja-z-dnia-31102020->

<sup>4</sup> <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1272454/retrieve>

**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 co oznacza, że wykrycie tylko jednego swoistego fragmentu genomu SARS-CoV-2 jest wystarczające do laboratoryjnego potwierdzenia przypadku COVID-19. **Mając jednak na uwadze ryzyko wystąpienia mutacji w genie SARS-CoV-2 w skutek selekcji nowych wariantów genetycznych wirusa, WHO<sup>5</sup> i eksperci AOTMiT<sup>6</sup> rekomendują stosowanie testów genetycznych wykrywających 2, a optymalnie 3 różne obszary genomu SARS-CoV-2.** Zwiększenie liczby wykrywanych obszarów genomu wirusa zmniejsza podatność testu na wystąpienie wyniku fałszywie ujemnego wskutek mutacji.

NIZP-PZH 31.05.2021r.

---

<sup>5</sup> Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health ISBN 978-92-4-001844-0 (electronic version) <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1326052/retrieve>

<sup>6</sup> AOTMiT, Diagnostyka laboratoryjna SARS-CoV-2 Aktualizacja Zaleceń, wersja 2.1 z 27.04.2021r. <https://www.aotm.gov.pl/media/2021/05/Diagnostyka-COVID-19-%E2%80%93-Aktualizacja-Zalecen-wersja-2.1-27-maja-2021-r..pdf>