

# Diagnostyka molekularna SARS-CoV-2

Piotr Grabarczyk<sup>id</sup>, Ewa Sulkowska, Aneta Kopacz<sup>id</sup>, Aleksandra Kalińska<sup>id</sup>,  
Magdalena Łętowska<sup>id</sup>

Zakład Wirusologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie  
Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

## Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Grabarczyk P, Sulkowska E, Kopacz A et al. SARS-CoV-2 molecular diagnostics. J Transf Med 2021; 14 (1): 10–18. DOI: 10.5603/JTM.2021.0001.

Należy cytować wersję pierwotną.

## Streszczenie

Zakażenia nowym koronawirusem — SARS-CoV-2 — stały się w ostatnich miesiącach głównym problemem epidemiologicznym oraz klinicznym na świecie, w tym Polsce w zakresie chorób zakaźnych. Niniejszy artykuł powstał na podstawie wystąpienia zaprezentowanego w trakcie webinaru zatytułowanego „Hematologia i transfuzjologia a COVID-19”, który odbył się w maju 2020 roku. Praca ma na celu przybliżenie procedury diagnostyki zakażenia nowym koronawirusem. Zwrócono w niej uwagę na krytyczne dla jakości wykonywanych badań aspekty fazy przedanalizycznej oraz analitycznej, na które ma wpływ zarówno osoba zlecająca, jak i personel wykonujący badanie. Na podstawie aktualnego piśmiennictwa przedstawiono także dalsze kierunki doskonalenia diagnostyki molekularnej SARS-CoV-2.

**Słowa kluczowe:** SARS-CoV-2, RT-PCR, diagnostyka

*J. Transf. Med. 2021; 14: 1–9*

## Wstęp

Niniejszy artykuł powstał na podstawie wystąpienia zaprezentowanego w trakcie webinaru zatytułowanego „Hematologia i transfuzjologia a COVID-19”, który miał miejsce w dniu 28 maja 2020 roku. Tekst wzbogacono o szereg bardziej szczegółowych informacji dotyczących testów do detekcji RNA SARS-CoV-2. Praca ma na celu przybliżenie procedury diagnostyki zakażenia nowym koronawirusem, jednak nie są w niej szczegółowo przedstawiane zasady optymalnego wykonywania wszystkich etapów badania — temu są poświęcone rekomendacje krajowe i zagraniczne [1–3]. Autorzy pragną zwrócić uwagę na krytyczne dla jakości wykonywanych badań momenty, na które ma wpływ zarówno osoba zlecająca, jak i personel wykonujący badanie. Na podstawie aktualnego piśmiennictwa przedstawiono także dalsze kierunki doskonalenia diagnostyki molekularnej SARS-CoV-2.

Dlaczego wiedza dotycząca diagnostyki nowego koronawirusa jest ważna w przypadku hematologii? Warto zwrócić uwagę, że kliniki i przychodnie hematologiczne przyjmują pacjentów z grup wysokiego ryzyka ciężkiego przebiegu covid-19 — osoby z obniżoną odpornością w trakcie leczenia przeciwnowotworowego, po przeszczepieniach komórek krwiotwórczych, z niedoborami odporności o różnym podłożu, w tym leczone immunosupresyjnie [4].

## Rola i przebieg diagnostyki molekularnej w diagnostyce COVID-19

Wyniki diagnostyki molekularnej są podstawą rozpoznania przypadku potwierdzonego zakażenia SARS-CoV-2. W zaleceniach krajowych i międzynarodowych oraz w piśmiennictwie naukowym podkreśla się, że wiarygodność uzyskiwanych

**Adres do korespondencji:** dr hab. n med. Piotr Grabarczyk, Zakład Wirusologii Instytutu Hematologii i Transfuzjologii, ul. Chocimska 5, 00-957 Warszawa, e-mail: [pgrabarczyk@ihit.waw.pl](mailto:pgrabarczyk@ihit.waw.pl)

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Common Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

wyników zależy od rodzaju materiału biologicznego oraz sposobu jego pobrania [1–3].

RNA wirusa pojawia się w materiale biologicznym pobranym z dróg oddechowych jeszcze przed objawami klinicznymi. Szacuje się, że wyniku pozytywnego można się spodziewać już po około tygodniu od zakażenia. Jednak wynik badania zależy od tego, jaki materiał zostanie poddany analizie: najwcześniej RNA wirusa pojawia się i jednocześnie relatywnie długo, bo do 5–6 tygodni, utrzymuje się w nosogardzieli. W drogach oddechowych RNA wirusa pojawia się w podobnym czasie, ale już po 2–3 tygodniach zanika. RNA w płwocinie oraz popłuczynach płucno-oskrzelowych (BAL, *bronchoalveolar lavage*) pojawia się nieznacznie później, w czasie, kiedy są obserwowane pierwsze objawy kliniczne lub nieco wcześniej i utrzymuje się dłużej niż w materiale biologicznym z innych obszarów dróg oddechowych. RNA wirusa jest wykrywalne także między innymi w stolcu, gdzie może się utrzymywać bardzo długo czy w spermie od zakażonych mężczyzn, jak również sporadycznie we krwi [1, 2, 5]. Jednak z punktu widzenia diagnostycznego materiał biologiczny spoza dróg oddechowych nie ma większego znaczenia.

Zalecaną przez polskie i międzynarodowe rekomendacje metodą detekcji RNA SARS-CoV-2 jest reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym poprzedzona odwrotną transkrypcją. Należy jednak pamiętać, że na rynku dostępne są także testy oparte na innych technologiach namnażania materiału genetycznego, oparte na przykład na amplifikacji przez odwrotną transkrypcję. Testy te nie ustępują pod względem czułości oraz wydajności (liczba wykonanych testów np. w ciągu 8 godzin) testom opartym na metodzie reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, *polimerase chain reaction*) [6–8].

Cykl badania RNA obejmujący izolację kwasów nukleinowych i amplifikację fragmentów genomu wirusa oraz kontroli wewnętrznej w przypadku większości testów obecnie używanych zajmuje 3–4 godziny [1, 3, 5, 8]. Bez wątplenia, marzeniem każdej kliniki zlecającej badanie diagnostyczne w kierunku covid-19 są szybkie testy molekularne. Na rynku pojawiają się testy dające możliwość uzyskania wyniku już w niespełna 1,5 godziny. Należy jednak pamiętać, że wciąż relatywnie niewiele wiadomo o ich czułości i swoistości [9, 10].

Sekwencjonowanie, w tym NGS, ze względu na koszty, zastosowanie specjalistycznej aparatury oraz konieczność dysponowania wysoce wykwalifikowanym personelem obecnie ma zastosowanie przede wszystkim poznawcze [10, 11].

W przypadku podejrzenia zakażenia SARS-CoV-2 kluczową kwestią jest podjęcie decyzji, gdzie zlecić badanie molekularne wirusa. Wykaz laboratoriów uprawnionych do wykonywania diagnostyki molekularnej nowego koronawirusa można znaleźć na stronie internetowej prowadzonej przez Ministerstwo Zdrowia [12]. Według danych z grudnia 2020 roku istnieje 269 pracowni diagnostycznych wpisanych na listę *Laboratoriów COVID*. Wymienione tam laboratoria muszą spełniać odpowiednie kryteria w zakresie środków bezpieczeństwa, to jest pracują w rygorze laboratorium BSL2, pracownicy są zobowiązani do rygorystycznego stosowania środków ochrony osobistej, badania podlegają kontroli jakości, w tym wstępnej ocenie prawidłowości wyników dodatnich i ujemnych. Najwyższe standardy bezpieczeństwa oraz jakości spełniają laboratoria, które prowadzą izolację kwasów nukleinowych metodami w pełni automatycznymi.

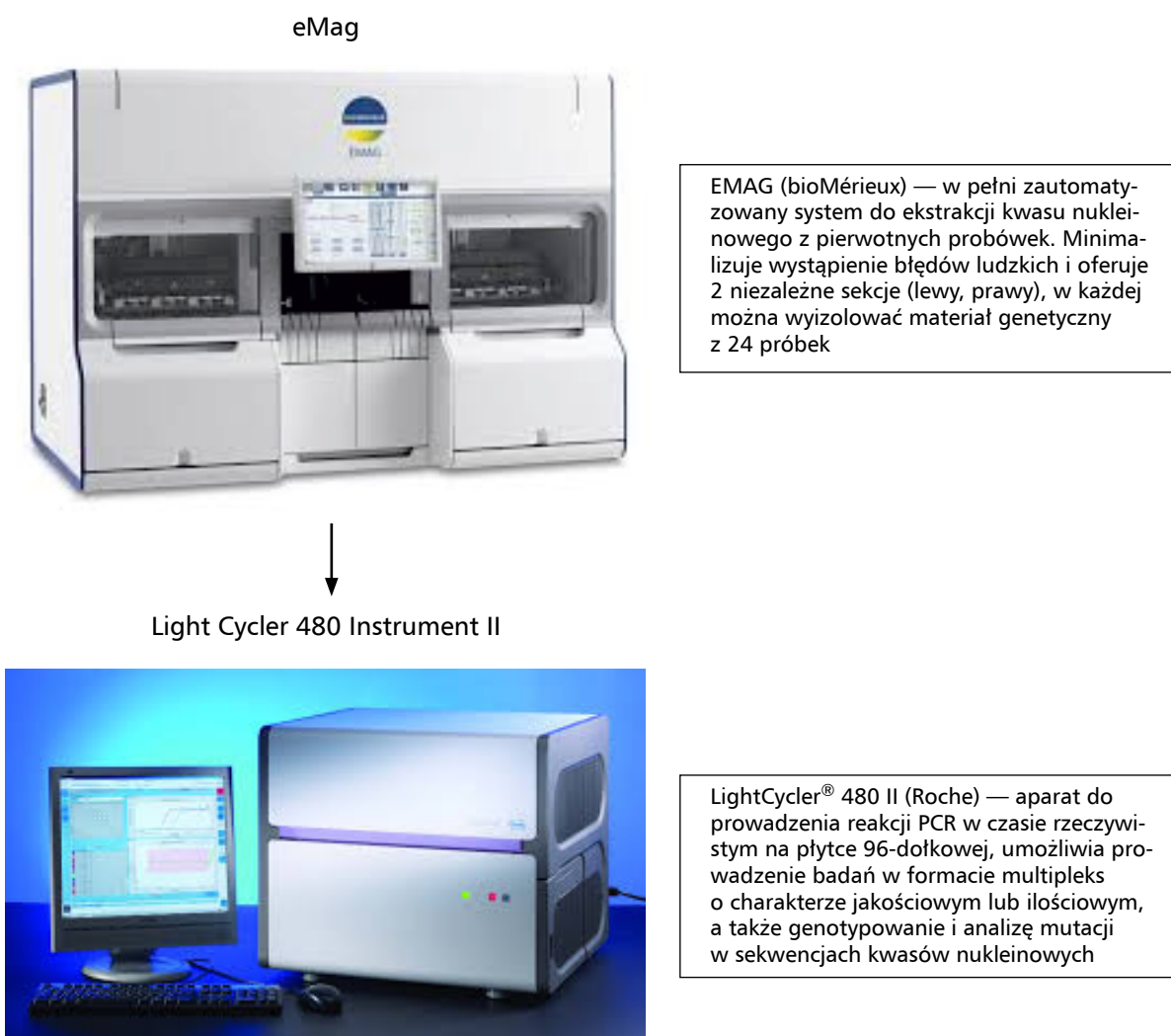
Zgodnie z rozporządzeniem Rady Ministrów z 16 maja 2020 roku laboratoria, które podpisały umowy z NFZ na wykonywanie badań RNA SARS-CoV-2, mają obowiązek przyjmowania zleceń przez system teleinformatyczny EWP [13] i w takim przypadku nie ma obowiązku wystawiania zleceń papierowych. Wydaje się jednak, że to rozwiązanie może stwarzać ryzyko występowania błędów przedanalizacyjnych związanych z brakiem (czytelnych) danych na próbówce z materiałem analitycznym. W celu ograniczenia ryzyka warto stosować uproszczoną formę zestawienia próbek wysyłanych na badanie.

**Kluczowym etapem procesu diagnostycznego jest właściwe pobranie materiału analitycznego.** Właściwy sposób realizacji tego etapu został szczegółowo przedstawiony w krajowych rekomendacjach opracowanych przez Konsultanta Krajowego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej — prof. Katarzynę Dzierżanowska-Fangrat oraz konsultantów wojewódzkich w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej, które są dostępne w Internecie [2]. Należy zwrócić uwagę, że rodzaj pobieranego materiału z dróg oddechowych zależy od wielu czynników (objawów i stanu klinicznego, dostępności materiału analitycznego). Preferowanym materiałem do badań jest wymaz z gardła i błon śluzowych nosa pobierany jednocześnie. Bardzo ważne jest również stosowanie właściwych wymazówek. Optymalnie jest stosować wymazówki z podłożem wirusologicznym, aczkolwiek dopuszczalne jest także pobieranie na sól fizjologiczną buforowaną fosforanem (PBS, *phosphate-buffered saline*). Najlepiej, aby wacik wymazówki był wykonany z dakronu, wiskozy lub jedwabiu. Nie należy stosować wacików

z alginianu wapnia. Mając na względzie bezpieczeństwo pracowników laboratorium, którzy otwierają próbki z wymazówką, po pobraniu materiału od pacjenta należy wymazówkę ułamać tak, aby zajmowała nie więcej niż 2/3 wysokości próbki, a następnie umieścić wymazówkę w próbce i szczelnie zamknąć. Jeśli wymazówka jest ułamana zbyt wysoko i dotyka do korka, w czasie otwierania próbki może się gwałtownie wyprostować i spowodować wychłapanie materiału biologicznego z próbki na zewnątrz, stwarzając ekspozycję na materiał zakaźny dla pracownika laboratorium.

Zgodnie z kryteriami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) na obszarze, gdzie wirus krąży w populacji, do potwierdzenia zakażenia wystarczające jest wykrycie fragmentu jednego genu wirusa [3]. Polskie kryteria są znacznie bardziej rygorystyczne, ponieważ nakładają obowiązek detekcji przynajmniej

fragmentów dwóch różnych genów SARS-CoV-2 [2]. W Zakładzie Wirusologii IHiT diagnostykę covid prowadzi się w termocyklerze LightCycler 480 Instrument II (Roche Diagnostics), gdzie są analizowane kwasy nukleinowe izolowane w automatycznym aparacie EMAG<sup>®</sup> (ryc. 1). Amplifikacja z zastosowaniem testu SARS-CoV-2 R-GENE<sup>®</sup> pozwala na jednoczesne sprawdzenie obecności fragmentów dwóch genów wirusa — genu kodującego białko nukleokapsydu (N) oraz genu kodującego białko RNA-zależnej polimerazy RNA (RdRp). Aby wynik był ważny, konieczne jest uzyskanie wyniku pozytywnej kontroli wewnętrznej, która jest dodawana do materiału analitycznego podczas izolacji kwasów nukleinowych. Dołączenie kontroli wewnętrznej pozwala upewnić się, że ekstrakcja zaszła prawidłowo i w próbce nie było inhibitorów reakcji enzymatycznej. W przypadku braku amplifikacji obu regionów wirusa — N i RdRp — uzyskuje



**Rycina 1.** Przykładowa organizacja badania diagnostycznego covid-19 (ZW IHiT)

**Tabela 1.** Interpretacja wyników badania *real-time* PCR typu multipleks, postępowanie w przypadku uzyskania wyników rozbieżnych w badaniu przesiewowym

Wartość docelowa Ct lub $\Delta$ Ct (IC1sample — IC1W0)				
Gen N (530 nm)	+	+	–	–
IC1sample — IC1W0 (560 nm)	$\leq 3$ Ct lub $> 3$ Ct		$\leq 3$ Ct	$> 3$ Ct
Gen RdRp (670 nm)	+	–	+	–
INTERPRETACJA				
	Wykryto obecność wirusa SARS-CoV-2	Wynik niejednoznaczny (należy wykonać badanie z użyciem odczynnika PCR2 i/lub należy ponownie wykonać badanie z użyciem odczynnika PCR1)	Nie wykryto obecności wirusa SARS-CoV-2 (lub $< \text{LoD}$ )	Wynik nieważny (inhibicja/słaba ekstrakcja)
↓ ↓				
PCR2 (Sarbecowirus)				
Wartość docelowa Ct lub $\Delta$ Ct [IC1sample — IC1W0]				
Gen E (530 nm)	+	–	–	–
IC1sample — IC1W0 (560 nm)	$\leq 3$ Ct lub $> 3$ Ct	$\leq 3$ Ct		$> 3$ Ct
Kontrola komórkowa (670 nm)	+ lub –	$< 35$ Ct	$\geq 35$ Ct lub –	+ lub –
INTERPRETACJA				
	Wykryto obecność sarbecowirusa	Nie wykryto obecności sarbecowirusa (lub $< \text{LoD}$ )	Nie wykryto obecności komórek (badanie nowej próbki)	Wynik nieważny (inhibicja/słaba ekstrakcja)

się wynik negatywny, natomiast amplifikacja obu regionów wskazuje na zakażenie — w obu sytuacjach procedura diagnostyczna jest zakończona. W sytuacji gdy jest obserwowana amplifikacja tylko jednego z dwóch wyżej wymienionych regionów genomu wirusa, konieczne jest przeprowadzenie kolejnej genomu PCR, w której są amplifikowane dwa geny — fragment regionu kodującego białko otoczki (gen E) oraz gen HPRT1 dla kontroli komórkowej badanego materiału. Wynik pozytywny genu E potwierdza zakażenie Sarbecovirusem, negatywny przemawia za brakiem zakażenia lub obecnością wirusa w bardzo niskim stężeniu poniżej limitu detekcji testu (tab. 1) [14].

### Interpretacja wyników badania RNA SARS-CoV-2

W świetle danych naukowych pojedynczy wynik badania RNA SARS-CoV-2 nie musi przesądzać o statusie osoby badanej. Pojedynczy wynik ujemny nie wyklucza zakażenia i nie powinien być traktowany jako jedyne kryterium diagnostyczne,

szczególnie w przypadkach, gdy obraz kliniczny sugeruje zakażenie SARS-CoV-2 lub pacjent miał bliski kontakt, bez zabezpieczenia, z osobą z potwierdzonym przypadkiem COVID-19, niezależnie od rodzaju i natężenia występujących objawów klinicznych. Rekomendacje krajowe jednoznacznie określają, że w przypadku pacjenta hospitalizowanego, u którego w pierwszym badaniu molekularnym uzyskano wynik ujemny, badanie należy powtórzyć: a) gdy istnieje duże prawdopodobieństwo zakażenia ocenione na podstawie wywiadu epidemiologicznego, obrazu klinicznego i wyniku badania obrazowego klatki piersiowej — kolejne badanie należy zlecić w ciągu 24–48 godzin od pobrania pierwszej próbki, b) gdy stwierdzone jest nasilenie objawów ze strony układu oddechowego — kolejne badanie należy zlecić w ciągu 24–48 godzin od pobrania pierwszej próbki oraz c) gdy pacjent wymaga intubacji i jest możliwość pobrania materiału z dolnych dróg oddechowych.

Z kolei wynik nierozstrzygnięty nie pozwala jednoznacznie ocenić, czy mamy do czynienia z zakażeniem i konieczne jest powtórzenie badania po 1–2 dobach [1, 2, 15].

## Testy do prowadzenia badania RNA SARS-CoV-2

Obecnie mamy do czynienia z niespotykaną, spektakularną intensyfikacją produkcji różnego rodzaju testów — według ewidencji z dnia 21 stycznia 2021 roku na świecie produkowanych jest przynajmniej blisko 300 różnych testów przeznaczonych do detekcji RNA SARS-Cov-2 metodami manualnymi oraz około 150 do diagnostyki wirusa z użyciem procedur zautomatyzowanych. Należy się spodziewać, że liczba ta będzie rosła [16]. Tempo, w jakim jest zalewany rynek nowymi produktami do wykrywania kwasów nukleinowych, powoduje, że cały czas bardzo mało wiemy na temat ich jakości. Piśmiennictwo naukowe, przedstawiające niezależne oceny testów, jest cały czas bardzo skromne [17–19], dlatego też laboratorium powinno w miarę możliwości prowadzić własną walidację używanego testu lub opierać się na niezależnych ocenach.

W naszym przekonaniu, wybierając test do detekcji RNA SARS-CoV-2, należy analizować wiele cech. Test do diagnostyki molekularnej COVID-19 musi być wyposażony w kontrolę wewnętrzną, która pozwoli ocenić prawidłowość procesu diagnostycznego obejmującego izolację kwasów nukleinowych oraz amplifikację fragmentów genomu wirusa. Wskazane jest także, aby istniała możliwość kontroli prawidłowości procesu pobrania. Proces uzyskania wyniku ostatecznego w przypadku wyniku pozytywnego istotnie przyspiesza jednoczesna amplifikacja przynajmniej dwóch regionów genomu wirusa, a w sytuacji wyników rozbieżnych dobrze mieć możliwość przeprowadzenia badania rozstrzygającego (drugi PCR). Wybór testu diagnostycznego powinien być poprzedzony analizą precyzji (powtarzalność i odtwarzalność) wyników testu (wartość Ct/Cp, *cycle threshold/crossing point*) oraz czułości analitycznej wyrażanej w cp/ml [copies/mL] z 95-procentowym przedziałem ufności. Testy stosowane na rynku polskim powinny posiadać oznakowanie CE IVD, aczkolwiek należy mieć świadomość, że ten rodzaj oznakowania nie jest stuprocentowym gwarantem jakości testu. Innym kluczowym aspektem testu rozważanego do diag-

nostyki COVID-19 jest swoistość. Nie wystarczy, w naszym przekonaniu, aby producent przedstawił procentową wartość tego parametru, ale ważne jest, aby przedstawił szczegółowe zestawienie patogenów oddechowych oraz substancji analizowanych pod kątem wystąpienia reakcji krzyżowych. Ten etap oceny testu ma kluczowe znaczenie, ponieważ trzeba pamiętać, że testy te są stosowane do amplifikacji fragmentów genomu wirusa z wymazów pobieranych z dróg oddechowych osób z chorobami układu oddechowego — takie postępowanie jest używane do różnicowania zakażeń SARS-CoV-2 z zakażeniami innymi patogenami wirusami, bakteriami, grzybami. Osoby badane przyjmują często leki, które potencjalnie mogą interferować z amplifikacją kwasów nukleinowych.

Obowiązkowym parametrem przedstawianym w ulotkach producentów testów jest czułość kliniczna. W tym przypadku producenci często podają wartości zbliżone do 100%, co bez sprecyzowania metody referencyjnej wydaje się mało wiarygodne, wiadomo bowiem, że stosowane metody nie pozwalają wykryć wszystkich zakażeń SARS-CoV-2, a czułość kliniczna zależy od tego, w jakiej fazie zakażenia znajduje się pacjent.

W tabeli 2 przedstawiono charakterystykę wybranych testów przeznaczonych do diagnostyki molekularnej SARS-CoV-2. Pierwsze trzy były wykorzystywane od początku pandemii do czerwca 2020 roku w Zakładzie Wirusologii IHiT. Zestaw genesig® do detekcji koronawirusa (COVID-19) w real-time PCR (Primerdesign Ltd); Bosphore® Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit v2 (Anatolia geneworks); dystrybuowane przez Centralną Bazę Rezerw do laboratoriów z Listy COVID-19 były stosowane szerzej.

Dodatkowo w tabeli 2 można znaleźć dane dotyczące testów polskiej produkcji do wykrywania RNA nowego koronawirusa oraz testu na aparaty CoBAS, wykorzystywanego w polskim krwiodawstwie do prowadzenia masowych badań.

Należy również zwrócić uwagę na toczące się badania nad zwiększeniem przepustowości stosowanych procedur diagnostycznych przez pulowanie próbek [20, 21] oraz upraszczanie części obejmującej izolację kwasów nukleinowych [22].

Tabela 2. Porównanie testów do prowadzenia badań RNA SARS-CoV-2

Nazwa testu	Zwalidowany system izolacji kwasów nukleinowych	Amplifikowane fragmenty genów	Kontrola wewnętrzna	Kontrola pobrania materiału	Czułość analityczna (95% LOD)	Czułość kliniczna	Swoistość	Zakres ocenianych reakcji krzyżowych	Liczba testów możliwych do wykonania w ciągu 8 godzin
Zestaw genesis <sup>®</sup> do detekcji koronawirusa (COVID-19) (CE IVD) Primerdesign Ltd.	Systemy ekstrakcji RNA (CE IVD)	SARS-CoV-2 (brak wyznaczonych genów)	Tak	Nie	0,58 kopii/ $\mu$ l	98%	100%	Influenza A: H1N1, H3N2; Influenza B: Victoria, Yamagata; RSV A, RSV B, Coronavirus: NL63, 229E, HKU, OC43	138 (EMAG <sup>®</sup> )
Bosphore <sup>®</sup> Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit v2 Anatolia geneworks	Magnesia <sup>®</sup> 16 Nucleic Acid Extraction System — Magnesia <sup>®</sup> Viral Extraction Kit (Anatolia Geneworks)/Magrev <sup>®</sup> 24 Stand-Magrev <sup>®</sup> Viral DNA/RNA Extraction Kit (Anatolia Geneworks)/Bosphore <sup>®</sup> Viral RNA Extraction Spin Kit (Anatolia Geneworks)	Orf1ab (PCR1), E (PCR2)	Tak	Nie	25 kopii/rxn	Brak danych	Brak danych	Enterowirus, Parainfluenza-1, Parainfluenza-2, Parainfluenza-4, RSV-A, Rhinowirus, Bocavirus, Parechovirus, Influenza A, Influenza B, Coronavirus 229E, Coronavirus OC43, Coronavirus HKU1, Coronavirus NL63 i SARS	138 (EMAG <sup>®</sup> )
ARGENE <sup>®</sup> SARS-CoV-2 R-GENE <sup>®</sup> BioMerieux	EMAG <sup>®</sup> , NUCLISENS <sup>®</sup> easyMAG <sup>®</sup> , MagNA Pure Compact, MagNA Pure 96, QIAasymphony SP	N, RdRp (PCR1), E (PCR2)	Tak	Tak (HPRT1)	380 kopii/ml	100% — SARS-CoV-2 (PCR1 i PCR2) — Sarbeco-virus	100%	PCR1: wirusy: koronawirus człowieka: 229E, NL63, OC43, HKU1, koronawirus SARS i MERS, adenowirus, metapneumowirus człowieka (hMPV), wirus paragrypy 1–4, grypa A, grypa B, enterowirus, oddechowy (RSV), parechovirus i rinowirus; bakterie: <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> PCR2: wirusy: koronawirus człowieka: 229E, NL63, OC43, HKU1, koronawirus MERS, adenowirus, metapneumowirus człowieka (hMPV), wirus paragrypy 1–4, grypa A, grypa B, enterowirus, ludzki syncytialny wirus oddechowy (RSV), parechovirus i rinowirus; bakterie: <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Bordetella pertussis</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	138 (EMAG <sup>®</sup> )

Tabela 2 cd. Porównanie testów do prowadzenia badań RNA SARS-CoV-2

Nazwa testu	Zwalidowany system izolacji kwasów nukleinowych	Amplifikowane fragmenty genów	Kontrola wewnętrzna	Kontrola pobrania materiału	Czułość analityczna (95% LOD)	Czułość kliniczna	Swoistość	Zakres ocenianych reakcji krzyżowych	Liczba testów do wykonania w ciągu 8 godzin
<b>Cobas® SARS-CoV-2 Roche Diagnostics GmbH</b>	The cobas® 6800/8800 Systems (izolacja/amplifikacja)	Orf1ab, E	Tak	Nie	0.007 TCID50/mL (SARS-CoV-2) (95% CI: 0.005–0.036), 0.004 TCID50/mL (pan-Sarbecovirus) (95% CI: 0.002–0.009)	100% (95% CI: 92.9%–100%)	100% (95% CI: 96.3%–100%)	Coronavirus: 229E, OC43, HKU1, NL63, MERS coronavirus, SARS coronavirus Adenovirus B (Type 34) Human Metapneumovirus (hMPV) Parainfluenza virus Type 1 Parainfluenza virus Type 2 Parainfluenza virus Type 3 Parainfluenza virus Type 4 Influenza A (H1N1) Influenza B Enterovirus E (Type 1) Respiratory syncytial virus Rhinovirus Chlamydia pneumoniae Haemophilus influenzae Legionella pneumophila Mycobacterium tuberculosis Streptococcus pneumoniae Streptococcus pyogenes Bordetella pertussis Mycoplasma pneumoniae spulowane płyny do płukania nosa	Okolo 400
MediPAN-2G+ COVID test Medi-cofarma	Brak informacji	Orf1ab, S	Tak	Nie	–	> 95%	> 99%	Coronavirus: 229E, OC43, HKU1, NL63, MERS coronavirus, SARS coronavirus, Adenovirus 1, Enterovirus D, Enterovirus E, Influenza A (H1N1), Influenza B, Human metapneumovirus, Rhinovirus B, Respirovirus 1, Respirovirus 3, Rubulavirus 2, Rubulavirus 4, Human orthopneumovirus, Bordetella pertussis, Candida albicans, Corynebacterium diphtheriae, Haemophilus influenzae, Legionella pneumophila, Mycobacterium tuberculosis, Moraxella catarrhalis, Neisseria meningitidis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus salivarius, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes	138 (EMAG®)



Tabela 2 cd. Porównanie testów do prowadzenia badań RNA SARS-CoV-2

Nazwa testu	Zwalidowany system izolacji kwasów nukleinowych	Amplifikowane fragmenty genów	Kontrola wewnętrzna	Kontrola pobrania materiału	Czułość analizy (95% LOD)	Czułość kliniczna	Swoistość	Zakres ocenianych reakcji krzyżowych	Liczba testów możliwych do wykonania w ciągu 8 godzin
MediPAN-2G+ FAST COVID test Medicofarma	Brak informacji	Orf1ab, S	Tak	Nie	200 kopii wirusa/mL	> 99%	> 99%	Coronavirus: 229E, OC43, HKU1, NL63, MERS coronavirus, SARS coronavirus, Adenovirus 1, Enterovirus D, Enterovirus E, Influenza A (H1N1), Influenza B, Human metapneumovirus, Rhinovirus B, Respirovirus 1, Respirovirus 3, Rubulavirus 2, Rubulavirus 4, Human orthopneumovirus, Bordetella pertussis, <i>Condida albicans</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	138 (EMAG®)
MediPAN-2G CO-VID test Medicofarma	Brak informacji	Orf1ab, S	Tak	Tak	—	> 95%	> 99%	Coronavirus: 229E, OC43, HKU1, NL63, MERS coronavirus, SARS coronavirus, Adenovirus 1, Enterovirus D, Enterovirus E, Influenza A (H1N1), Influenza B, Human metapneumovirus, Rhinovirus B, Respirovirus 1, Respirovirus 3, Rubulavirus 2, Rubulavirus 4, Human orthopneumovirus, Bordetella pertussis, <i>Condida albicans</i> , <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Moraxella catarrhalis</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	138 (EMAG®)



## Piśmiennictwo

1. Zalecenia w COVID-19, wersja 1.0 – 23.04.2020, AOTMiT.
2. „Zasady pobierania i transportu materiału do badań metodami molekularnymi rRT-PCR w kierunku SARS-CoV-2,” opracowane przez Konsultanta krajowego w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej – Katarzynę Dzierżanowską-Fangrat oraz konsultantów wojewódzkich w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej.
3. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Interim guidance. 19 March 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/10665-331501>.
4. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-at-higher-risk.html>.
5. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A. Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *JAMA*. 2020; 323(22): 2249–2251, doi: [10.1001/jama.2020.8259](https://doi.org/10.1001/jama.2020.8259), indexed in Pubmed: [32374370](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32374370/).
6. Gorzalski AJ, Tian H, Laverdure C, et al. High-throughput transcription-mediated amplification on the hologic panther is a highly sensitive method of detection for SARS-CoV-2. *J Clin Virol*. 2020; 129: 104501, doi: [10.1016/j.jcv.2020.104501](https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104501), indexed in Pubmed: [32619959](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32619959/).
7. Smith E, Zhen W, Manji R, et al. Analytical and clinical comparison of three nucleic acid amplification tests for SARS-CoV-2 detection. *J Clin Microbiol*. 2020; 58(9), doi: [10.1128/JCM.01134-20](https://doi.org/10.1128/JCM.01134-20), indexed in Pubmed: [32571894](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32571894/).
8. Pham J, Meyer S, Nguyen C, et al. Performance characteristics of a high-throughput automated transcription-mediated amplification test for SARS-CoV-2 detection. *J Clin Microbiol*. 2020; 58(10), doi: [10.1128/JCM.01669-20](https://doi.org/10.1128/JCM.01669-20), indexed in Pubmed: [32727828](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32727828/).
9. Broughton JP, Deng X, Yu G, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*. 2020; 38(7): 870–874, doi: [10.1038/s41587-020-0513-4](https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4), indexed in Pubmed: [32300245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32300245/).
10. Michel D, Danzer KM, Groß R, et al. Rapid, convenient and efficient kit-independent detection of SARS-CoV-2 RNA. *J Virol Methods*. 2020; 286: 113965, doi: [10.1016/j.jviro-met.2020.113965](https://doi.org/10.1016/j.jviro-met.2020.113965), indexed in Pubmed: [32891677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32891677/).
11. Chiara M, D’Erchia AM, Gissi C, et al. Next generation sequencing of SARS-CoV-2 genomes: challenges, applications and opportunities. *Brief Bioinform*. 2020 [Epub ahead of print], doi: [10.1093/bib/bbaa297](https://doi.org/10.1093/bib/bbaa297), indexed in Pubmed: [33279989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33279989/).
12. Wpis do wykazu laboratoriów COVID-19 Ministerstwa Zdrowia: laboratoriów (stan na 22 maja 2020 r.) <https://www.gov.pl/web/zdrowie/lista-laboratoriow-covid/>.
13. Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 16 maja 2020 r. w sprawie ustanowienia określonych ograniczeń, nakazów i zakazów w związku z wystąpieniem stanu epidemii *Dziennik Ustaw 2020 r. poz.: 878*.
14. Instrukcja obsługi ARGENE®SARS-COV-2 R-GENE®-[BIOMÉRIEUX Ref 423720, 055836 - 01 - 2020-04].
15. <https://gis.gov.pl/aktualnosci/definicja-przypadku-na-potrzeby-nadzoru-nad-zakazeniami-ludzi-nowym-koronawirusem-sars-cov-2/>.
16. <https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/>.
17. Abdalhamid B, Bilder CR, McCutchen EL, et al. Assessment of specimen pooling to conserve SARS CoV-2 testing resources. *Am J Clin Pathol*. 2020; 153(6): 715–718, doi: [10.1093/ajcp/aqaa064](https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa064), indexed in Pubmed: [32304208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32304208/).
18. Zhen W, Manji R, Smith E, et al. Comparison of four molecular diagnostic assays for the detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal specimens. *J Clin Microbiol*. 2020; 58(8), doi: [10.1128/JCM.00743-20](https://doi.org/10.1128/JCM.00743-20), indexed in Pubmed: [32341143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32341143/).
19. Ishige T, Murata S, Taniguchi T, et al. Highly sensitive detection of SARS-CoV-2 RNA by multiplex rRT-PCR for molecular diagnosis of COVID-19 by clinical laboratories. *Clin Chim Acta*. 2020; 507: 139–142, doi: [10.1016/j.cca.2020.04.023](https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.023), indexed in Pubmed: [32335089](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32335089/).
20. Abdalhamid B, Bilder CR, McCutchen EL, et al. Assessment of specimen pooling to conserve SARS CoV-2 testing resources. *Am J Clin Pathol*. 2020; 153(6): 715–718, doi: [10.1093/ajcp/aqaa064](https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa064), indexed in Pubmed: [32304208](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32304208/).
21. Wacharapluesadee S, Kaewpom T, Ampoot W, et al. Evaluating the efficiency of specimen pooling for PCR-based detection of COVID-19. *J Med Virol*. 2020; 92(10): 2193–2199, doi: [10.1002/jmv.26005](https://doi.org/10.1002/jmv.26005), indexed in Pubmed: [32401343](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32401343/).
22. Fomsgaard AS, Rosenstjerne MW. An alternative workflow for molecular detection of SARS-CoV-2 - escape from the NA extraction kit-shortage, Copenhagen, Denmark, March 2020. *Euro Surveill*. 2020; 25(14), doi: [10.2807/1560-7917.ES.2020.25.14.2000398](https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.14.2000398), indexed in Pubmed: [32290902](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32290902/).