

Dr hab. Katarzyna Pancer¹✉,
dr Magdalena Nowakowska²,
mgr Agnieszka Kołakowska-
Kulesza¹,

dr Katarzyna Zacharczuk²,
dr hab. Aleksandra A.
Zasada³,

mgr Karol Szymański⁴,
mgr Karol Wdowiak³,
mgr Ewelina Hallmann⁴,
mgr Natalia Wolaniuk²,
dr Tomasz Wołkowicz²,
mgr Adam Słowski⁵,
mgr inż. Kamila Formińska³,
mgr Aleksandra Sadłocha²,
dr Ewa Mosiej³,
mgr inż. Beata Gad¹,
mgr Arleta Krzysztozek¹,
dr Agnieszka Trzcńska¹

¹Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut
Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład
Higieny, Warszawa

²Zakład Bakteriologii i Zwalczania Skażeń
Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia
Publicznego – Państwowy Zakład Higieny,
Warszawa

³Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Na-
rodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Pań-
stwowy Zakład Higieny, Warszawa

⁴Zakład Badania Wirusów Grypy, Krajowy
Ośrodek ds. Grypy, Narodowy Instytut Zdro-
wia Publicznego – Państwowy Zakład Higie-
ny, Warszawa

⁵Zakład Parazytologii i Chorób Przenoszonych
przez Wektory, Narodowy Instytut Zdrowia
Publicznego – Państwowy Zakład Higieny,
Warszawa

STRESZCZENIE

Koronawirus SARS-CoV-2 odpowiedzialny jest za wystąpienie światowej pandemii choroby COVID-19, w czasie której powstała konieczność przeprowadzania bardzo dużej liczby badań na obecność tego wirusa przez laboratoria diagnostyczne. Podstawową, rekomendowaną przez WHO metodą pozwalającą na laboratoryjne potwierdzenia zakażenia wirusem SARS-CoV-2 są metody biologii molekularnej, w tym technika real-time PCR z etapem odwrotnej transkrypcji. Pozwalają one na wykrycie RNA wirusa w próbkach od osób spełniających kryteria definicji podejrzenia przypadku lub z kontaktu. Wiąże się to z ogromnym zapotrzebowaniem na odpowiednie, komercyjne testy diagnostyczne. Odpowiedzią na to zapotrzebowanie było pojawienie się na światowym rynku szeregu testów molekularnych. Testy te różnią się m.in. liczbą i rodzajem wykrywanych genów, zastosowanymi barwnikami. W pracy przedstawiono wyniki sprawdzenia różnych komercyjnych testów diagnostycznych przeprowadzonego w Laboratorium Zakładu Wirusologii NIZP-PZH w ramach dobrej praktyki laboratoryjnej.

WPROWADZENIE

W okresie trwającej pandemii COVID-19 widoczne były wyraźnie czynniki wpływające na jakość prowadzonych badań diagnostycznych. W bardzo krótkim czasie konieczne było stworzenie szeregu laboratoriów pracujących w ścisłe określonych warunkach podwyższonego bezpieczeństwa biologicznego (poziom BSL2+ lub BSL3) oraz wykonujących specjalistyczne oznaczenia metodą real-time RT-PCR, wykorzystującą reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją (ang. *real-time Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*), w celu laboratoryjnego potwierdzenia zakażenia wirusem SARS-CoV (koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego - ang. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus*). Wiele z nowopowstających obwodowych laboratoriów COVID-19 miało ograniczone doświadczenie w wirusowych badaniach diagnostycznych z zastosowaniem techniki real-time RT-PCR.

W okresie pandemii COVID-19 można wyróżnić, na podstawie doświadczeń własnych oraz danych w piśmiennictwie [1-11], kilka faz pod względem dostępności testów diagnostycznych:

Początkowy etap – badania diagnostyczne wykonywane były przez nieliczne ośrodki, głównie z zastosowaniem testów in-house real-time RT-PCR. Testy te stanowią najczęściej zmodyfikowane protokoły służące do wykrywania innych koronawirusów, betakoronawirusów takich jak SARS-CoV; koronawi-

https://doi.org/10.18388/pb.2020_363

✉ autor korespondujący: kpancer@pzh.gov.pl

Słowa kluczowe: COVID-19, SARS-CoV-2, real-time RT-PCR, diagnostyka molekularna, testy RT-PCR

Wykaz stosowanych skrótów: CDC – Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*), COVID-19 – ostra choroba zakaźna układu oddechowego wywołana zakażeniem wirusem SARS-CoV-2 (ang. *coronavirus disease 2019*), Ct – wartość progowa cyklu (ang. *cycle threshold*), ECDC – Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. *European Centre for Disease Prevention and Control*), IC – kontrola wewnętrzna (ang. *internal control*), LOD – limit detekcji (ang. *limit of detection*), NAT – test wykrywający kwas nukleinowy (ang. *nucleic acid test*), NGS – sekwencjonowanie nowej generacji (ang. *next generation sequencing*), NIH – Narodowy Instytut Zdrowia (ang. *National Institute of Health*), NIID – Narodowy Instytut Chorób Zakaźnych (ang. *National Institute of Infectious Diseases*), RSV – RSV, syncytialny wirus oddechowy (ang. *Respiratory Syncytial Virus*), RT-PCR – Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. *Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*), SARS-CoV-2 – koronawirus 2 ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)

rusy nietoperza itp. [12]. Protokoły zmodyfikowanych testów opracowane zostały w referencyjnych laboratoriach na świecie zajmujących się nowo pojawiającymi się oraz powracającymi zakażeniami wirusowymi, stanowiącymi istotny problem dla zdrowia publicznego (ang. *emerging and re-emerging infections*), następnie były upowszechniane przez ECDC (ang. *European Centre for Disease Prevention and Control*), WHO (ang. *World Health Organization*), CDC (ang. *Centers for Disease Control and Prevention*) i in. oraz w publikacjach naukowych [1,3-8,11]. Protokół opracowany przez zespół Corman i in. na Uniwersytecie Medycznym Charité w Niemczech (Charité - Universitätsmedizin Berlin Institute of Virology, Berlin, Germany and German Centre for Infection Research (DZIF), Berlin, Germany) został jako jeden z pierwszych opublikowany przez WHO w dniu 17 stycznia 2020 r., oraz w EuroSurveillance, 23 stycznia 2020 r. [3,4]. Podstawą większości wprowadzanych do diagnostyki testów in-house RT-PCR były publikacje CDC w USA, CDC w Chinach, NIH (ang. *National Institute of Health*) w Tajlandii, NIID (ang. *National Institute of Infectious Diseases*) w Japonii [6-8]. W niedługim czasie pojawiły się także testy komercyjne, często sprowadzone z Chin, szybko opracowane i wprowadzone do produkcji. Zwykle charakteryzowały się bardzo ograniczoną informacją o wykrywanym obszarze/genie, rodzaju kontroli wewnętrznych itp. Część z tych testów wykrywała jedynie jeden swoisty fragment genu SARS-CoV-2. Ze względu na definicję przypadku COVID-19 czyli konieczność potwierdzenia obecności co najmniej 2 swoistych fragmentów genu wirusa, niezbędne było wykonywanie kolejnych testów potwierdzających. W Laboratorium Zakładu Wirusologii NIZP-PZH, wykorzystywano do tego celu test real-time RT-PCR wykonywany na podstawie metodologii zawartej w protokole Charité [4] oraz test klasyczny RT-PCR wykrywający gen N, obecnie zastąpiony testem real-time RT-PCR [7]. Zastosowanie testu real-time RT-PCR wg protokołu Charité pozwala na wykrycie genu przesiewowego - genu E oraz genu potwierdzenia - RdRp. Ponadto, laboratoria rozpoczynające diagnostykę COVID-19 zobowiązane były do zweryfikowania poprawności swoich oznaczeń w referencyjnych laboratoriach w Europie. W miarę przybywania kolejnych laboratoriów wykonujących badania diagnostyczne w kierunku COVID-19, wprowadzono zewnętrzną wobec nich weryfikację wyników badań laboratoryjnych w narodowych laboratoriach, które przeszły pozytywnie weryfikację w jednym z siedmiu wskazanych europejskich laboratoriów referencyjnych [4,13,14].

Wczesny etap - testy komercyjne produkowane w wielu krajach. Początkowo testy komercyjne powielaly schemat badania: wykrywanie obecności betakoronawirusów (np. gen E, sekwencje swoiste dla betakoronawirusów) oraz potwierdzanie zakażenia SARS-CoV-2 (np. gen RdRp - fragment swoisty tylko dla SARS-CoV-2). W miarę poszerzania się wiedzy nt. sekwencji SARS-CoV-2 pojawiały się testy ukierunkowane na wykrywanie swoistych dla tego wirusa fragmentów dwóch lub trzech genów. Co więcej, część testów wymagała wykonania badania w dwóch reakcjach (2 osobne mastermiksy), co znacznie ograniczało liczbę próbek badanych jednorazowo na danym aparacie, w tym samym czasie.

Etap pandemii zaawansowanej - modyfikacje testów mające na celu ograniczenie liczby prowadzonych reakcji, czyli osiągnięcie efektu: jedna próbka = jedna reakcja, podczas której istniała możliwość jednoczesnej identyfikacji 2, 3 bądź 4 genów (w tym kontroli wewnętrznej testu PCR (ang. *IC, Internal Control*) czasem także dodawanej na etapie izolacji RNA w celu kontroli procesu izolacji lub kontroli wewnętrznej pozwalającej również na ocenę próbki poprzez wykrywanie ludzkiego materiału genetycznego). Wprowadzenie takich 3 lub 4 genowych testów komercyjnych pozwoliło na znaczne przyspieszenie procesu diagnostycznego. Wprawdzie zgodnie z wytycznymi WHO [2,3,5] możliwe było, na terenie występowania licznych zakażeń, potwierdzanie zakażenia na podstawie dodatniego wyniku tylko 1 genu, jednak w Polsce utrzymano poprzednią definicję. Polska nie była terenem o nasilonym szerzeniu się koronawirusa SARS-CoV-2, dlatego w celu potwierdzenia zakażenia konieczne było wykazanie obecności co najmniej 2 różnych swoistych fragmentów genów lub obszarów genu.

Etap pandemii „jesiennej” - obecnie, ze względu na zbliżający się okres częstych infekcji oddechowych, w tym zachorowań na grypę, wprowadzane są testy pozwalające na wykrycie w jednej próbce/reakcji 2 lub 3 różnych patogenów, w tym najczęściej SARS-CoV-2, wirusów grypy oraz niekiedy RSV (syncytialny wirus oddechowy - ang. *Respiratory Syncytial Virus*). Ponadto, w dniu 11 września 2020 r., WHO opublikowało nowe wytyczne dopuszczające wykorzystanie w celu diagnostyki COVID-19 także testów antygenowych [16] - jednak z pewnymi ograniczeniami.

STOSOWANE TESTY DIAGNOSTYCZNE REAL-TIME RT-PCR

Jednym z podstawowych problemów pracy w laboratorium, w szczególności w pierwszych miesiącach trwania pandemii był brak stałej dostępności testów diagnostycznych na rynku. Po wyczerpaniu zapasów jednego testu konieczne było wprowadzenie do diagnostyki w laboratorium kolejnego testu, zwykle innego producenta. Zgodnie z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej konieczne było przeprowadzenie sprawdzenia każdego nowego testu, który rozważano jako możliwy do stosowania.

W Laboratorium NIZP-PZH do dnia 25.09.2020 r. przeprowadzono sprawdzenia 17 różnych komercyjnych testów diagnostycznych. Na potrzeby tej pracy prezentowane są wyniki sprawdzenia 10 testów (Tab. 1), które były najczęściej wykorzystywane. W Laboratorium Zakładu Wirusologii NIZP-PZH, punktem odniesienia do wyników uzyskanych sprawdzanymi testami, były przede wszystkim wyniki uzyskiwane wg protokołu Charité (wykrywa gen RdRp i gen E), natomiast wyniki testu przesiewowego (komercyjnego) traktowane były jako uzupełnienie analizy.

W procesie sprawdzenia każdego nowego testu komercyjnego uwzględniano następujące parametry: dokładność, czułość testu oraz powtarzalność. Analizowano także dane dostarczane przez producenta: określoną granicę wykrywalności (*LOD*, ang. *limit of detection*), wykrywany obszar

genomu/gen, zastosowane barwniki. Badania prowadzono z użyciem termocyklera Light Cycler 480 II (Roche; Szwajcaria) oraz CFX 96 (BioRad; USA). Nie określano swoistości badanych testów, ponieważ nie badano próbek pobranych

przed styczniem 2020 r. od osób z objawami zakażenia dróg oddechowych. Ze względu na wysoki odsetek zakażeń bezobjawowych SARS-CoV-2 istniało prawdopodobieństwo, że słabo dodatni/nierozstrzygający wynik uzyskany

Tabela 1. Wyniki sprawdzania wybranych testów komercyjnych przeprowadzanego w Laboratorium Zakładu Wirusologii NIZP-PZH

Test	Opis testu sprawdzanego: wykrywane geny /barwniki Kontrolne wewn/izol	Wynik testu *	Wynik badania próbki wg testu odniesienia			Ogółem liczba badanych próbek **	Dokładność*** %	Czułość %
			Dodatni	Nierozstrzygający	Ujemny			
1 etap pandemii	Genesig Coronavirus COVID-19 Real-Time PCR Assay (Primerdesign Ltd., Wielka Brytania)	+	8	2	4	52	92	100
		+/- #	0	0	0			
		-	0	25	40			
		razem	8	27	44			
	Real-Time Fluorescent RT-PCR kit for detecting SARS-2019-nCoV (BGI, Chiny)	+	26	8	6	67	91	100
		+/- #	0	0	0			
		-	0	0	35			
		razem	26	8	41			
	Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks, Turcja)	+	16	0	0	74	93	89
		+/- #	3	0	0			
		-	2	4	53			
		razem	21	4	53			
1copy COVID-19 qPCR Kit (1drop Inc., Korea)	+	7	1	2	60	92	100	
	+/-	0	4	5				
	-	0	5	46				
	razem	7	10	53				
Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit, Detection for 3 genes (Liferiver, Chiny)	+	28	2	0	75	91	97	
	+/- #	1	4	5				
	-	1	0	40				
	razem	30	6	45				
STANDARD M nCoV Real-Time Detection kit (SD Biosensor Inc., Korea)	+	16	1	1	48	94	100	
	+/- #	2	2	0				
	-	0	8	29				
	razem	18	11	30				
2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Triplex RT-qPCR Detection Kit (Vazyme, Chiny)	+	25	4	1	65	95	100	
	+/- #	2	1	0				
	-	0	0	37				
	razem	27	5	38				
Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (Vitassay Healthcare, S.L.U., Hiszpania)	+	20	6	1	43	95	100	
	+/- #	1	4	0				
	-	0	5	21				
	razem	21	15	22				

3 etap pandemii	MediPAN-2G+FAST COVID (Medicofarma, Polska)	Orf1ab/FAM;	+	19	3	0	55	98	95
		gen S/HEX;	+/- #	0	0	0			
		IC testu i K izolacji (IC)/Cy5	-	1	0	35			
		razem	20	3	35				
	MutaPLEX Coronavirus (SARS-CoV-2) real time RT-PCR Kit (Immundiagnostik AG, Niemcy)	Gen RdRp/FAM; gen S/FAM oraz gen E/Cy5; IC testu (IPC)/HEX; K izolacji i próbki (ISC)/ROX/Red610	+	19	0	0	55	98	95
			+/- #	0	0	0			
			-	1	3	35			
			razem	20	3	35			

*interpretacja wg instrukcji producenta, #wynik nierozstrzygujący wg producenta testu; **ogółem liczba badanych próbek dodatnich oraz ujemnych (wg testu odniesienia) – nie uwzględniono próbek wątpliwych wg algorytmu NIZP-PZH;

***w analizie uwzględniano jedynie wyniki próbek uznanych na podstawie testu odniesienia jako dodatnie lub ujemne

sprawdzanym testem mógł świadczyć o zakażeniu, nawet, jeśli w teście odniesienia był on ujemny. Istniała bowiem możliwość, że granica wykrywalności sprawdzanego testu była poniżej limitu detekcji (LOD) testów odniesienia. Zgodnie z danymi w piśmiennictwie [4] LOD testu przesiewowego (gen E) wg protokołu Charite został oznaczony na średnim poziomie 5,2 kopii RNA/reakcję przy przedziale ufności 95% wynoszącym 3,7–9,6 kopii RNA/reakcję, natomiast dla testu potwierdzenia, tj. genu RdRp, limit detekcji oznaczono na średnim poziomie 3,8 kopii RNA/reakcję przy przedziale ufności 95% wynoszącym 2,7–7,6 kopii RNA/reakcję. Jednak ze względu na stwierdzane występowanie mutacji punktowych (mismatches) w genie RdRp oraz E, możliwa jest niższa wydajność reakcji. Wartości LOD podawane przez producentów testów są bardzo różne i wahają się od 1 kopii/reakcję (np. 1Copy – 200 kopii/ml) poprzez 5 kopii/reakcję (np. Liferiver 10³ kopii/ml) lub 10 kopii/reakcję (np. Vitassay qPCR SARS-CoV-2, MutaPLEX Coronavirus SARS-CoV-2 real time RT-PCR Kit) do 25 kopii/reakcję (np. Bosphore Novel Coronavirus 2019-nCoV Detection Kit).

Zastosowane definicje [18]

- czułość = [liczba prawdziwie dodatnich wyników / (liczba prawdziwie dodatnich wyników + liczba fałszywie ujemnych wyników)] X 100%
- dokładność = (liczba wyników prawidłowych / liczba wszystkich wyników) × 100%
- granica wykrywalności (LOD) – najmniejsze stężenie parametru w próbce, które można wykryć daną metodą.

W tabeli 1 zaprezentowano wyniki sprawdzenia 10 testów wykonanych w 3 różnych etapach pandemii COVID-19 – zgodnie z tym, w jakim okresie otrzymano je do sprawdzenia. W trakcie sprawdzania testów komercyjnych opracowanych w celu diagnostyki COVID-19 stosowano się do zaleceń w instrukcji, także w zakresie interpretacji uzyskanego wyniku. Punktem odniesienia były wyniki uzyskane w badaniu zgodnie z algorytmem diagnostycznym Laboratorium Zakładu Wirusologii NIZP-PZH: wyniki testu przesiewowego komercyjnego, następnie wyniki testu wg protokołu Charite: testu przesiewowego – gen E oraz testu potwierdzenia – gen RdRp. Ponadto, uzyskany

wynik dodatni potwierdzano przez wykrycie swoistego fragmentu genomu SARS-CoV-2 w innym obszarze, najczęściej poprzez wykrycie obecności genu N lub fragmentu Orf1ab. Wynik uznawano za dodatni, gdy wykryto obecność wszystkich badanych genów albo gdy wykryto swoiste sekwencje w co najmniej 2 obszarach/genach [19]. Wynik ujemny oznaczał brak wykrycia któregokolwiek z badanych genów przy wyniku pozytywnym dla kontroli wewnętrznej albo wykrycie obecności tylko genu E, przy braku pozostałych genów swoistych dla SARS-CoV-2. Wynik nierozstrzygujący wydawano w następujących sytuacjach:

- dodatni wynik komercyjnego testu przesiewowego, ale w zakresie wysokiej (późnej) wartości Ct (wartość progowa cyklu – ang. *cycle threshold*); dodatni wynik oznaczania genu E (Ct >36) oraz ujemny wynik oznaczania genu RdRp. Późne wyniki (wysokie Ct) testów przesiewowych mogą wskazywać na niewielkie stężenie RNA wirusa lub obecność substancji hamujących reakcję PCR. Ze względu na różnicę w LOD testów, istnieje możliwość uzyskania ujemnego wyniku w teście potwierdzenia jakim jest wykrycie genu RdRp swoistego dla SARS-CoV-2;
- wykrycie obecności tylko jednego fragmentu genomu swoistego dla SARS-CoV-2. Natomiast, oznaczanie drugiego genu poza zakresem akceptowalnym jako wynik dodatni (wg instrukcji producenta), nieprawidłowy kształt krzywej amplifikacji lub brak całkowitej reakcji w tym kanale w danej próbce (ujemny wynik).

WŁAŚCIWOŚCI TESTÓW DIAGNOSTYCZNYCH REAL-TIME RT-PCR DO DIAGNOSTYKI COVID-19 ORAZ KRYTERIA INTERPRETACJI WYNIKU

Wśród krajów europejskich tylko nieliczne, takie jak Belgia, Niderlandy, Francja oraz Wielka Brytania opublikowały kryteria określające minimalne właściwości testów dopuszczonych do badań diagnostycznych. Zgodnie z tymi kryteriami testy diagnostyczne powinny charakteryzować się minimum czułości 85–98% w badaniu próbek klinicznych, natomiast minimum swoistości w badaniu próbek klinicznych zostało określone na poziomie >98%, a w Belgii >98,5% [20]. Zgodnie z zaleceniami WHO [21] powinny być spełnione następujące kryteria: czułość – pożądany poziom >98%, akceptowalny >95% oraz swoistość – pożądany poziom >99%, akceptowalny >99%. Jednak kryteria te dotyczą

jedynie testów serologicznych, wykrywających przeciwciała swoiste dla SARS-CoV-2. W zakresie wykrywania obecności swoistych fragmentów genomu SARS-CoV-2 metodami amplifikacji kwasów nukleinowych (NAT – test wykrywający kwas nukleinowy; ang. *nucleic acid test*) w diagnostyce klinicznej, wymagane są jedynie certyfikaty dopuszczenia do badań diagnostycznych w Unii Europejskiej (IVD oraz CE). Brak określonych wytycznych w zakresie minimalnych kryteriów dla testów NAT był przyczyną wielośrodkowego badania czułości i swoistości testów komercyjnych dostępnych w Europie. Powstał zespół pod kierunkiem Ivo van Walle (20), w skład którego wchodziły osoby z kilkunastu laboratoriów w Europie, w tym zespół z NIZP-PZH, jako jeden z dwóch zespołów z Polski. W ramach wspomnianego badania, przeprowadzono sprawdzenia testów diagnostycznych, zarówno NAT, jak i wykrywających przeciwciała przeciw SARS-CoV-2, a wyniki zostały poddane wspólnej analizie. Okazało się, że podawane przez producentów testów parametry czułości i swoistości są często zawyżane, w szczególności dotyczyło to czułości. Znacząco zawyżone wartości czułości wystąpiły w 11 spośród 32 badanych testów (34,4%), a swoistości w 4 z 33 (12,1%) [20].

Opieranie się wyłącznie na danych producenta, dotyczących czułości i swoistości testów komercyjnych może być przyczyną błędów w interpretacji wyników. Dlatego tak wielkie znaczenie ma sprawdzanie testów NAT przed wprowadzeniem ich do zastosowania w badaniach diagnostycznych w danym laboratorium. Większość testów sprawdzanych w Laboratorium Zakładu Wirusologii NIZP-PZH charakteryzowało się wysoką czułością. Dokładność, czyli zgodność wyników testów sprawdzanych z wynikami testu odniesienia, mieściła się na poziomie > 90% - dla prezentowanych testów. Jak wspomniano uprzednio, nie określano swoistości testów ponieważ konieczne byłoby wykorzystanie próbek pobieranych od osób ze zdiagnozowanymi innymi wirusowymi lub bakteryjnymi zakażeniami dróg oddechowych. Wydaje się, że niektóre testy powinny mieć skorygowane zakresy wartości Ct w granicach jakich istnieje pewność uzyskania dodatniego wyniku. Na podstawie analizy wyników uzyskiwanych w laboratorium NIZP-PZH określaliśmy zakres tzw. „pewnych wyników dodatnich”. Wyniki z wartością Ct powyżej tego limitu traktowane były jako wątpliwe, mimo, że instrukcja producenta wskazywała na wynik dodatni. We współpracy z Małopolskim Centrum Biotechnologii w Krakowie przeprowadzono sekwencjonowanie. W 2 spośród 4 tzw. „wątpliwych” badanych próbek, w których przeprowadzono sekwencjonowanie następnej generacji (NGS, ang. *next generation sequencing*), potwierdzono obecność RNA wirusa SARS-CoV-2 (dane niepublikowane). Być może ze względu na niską zawartość wirusa w próbce nie uzyskano wyniku dodatniego w testach potwierdzających. Określenie „wewnętrznego” zakresu wyniku dodatniego i wątpliwego ma szczególne znaczenie w przypadku testów przesiewowych. Przykładem takich testów, dla których wyznaczono w NIZP-PZH dwa zakresy jest test Real-Time Fluorescent RT-PCR kit for detecting SARS-2019-nCoV (BGI, Chiny).

PODSUMOWANIE

Trwająca od miesięcy pandemia COVID-19 wymaga prowadzenia przez laboratoria diagnostyczne tysiący badań

na obecność wirusa SARS-CoV-2, co wiąże się z ogromnym zapotrzebowaniem na odpowiednie testy diagnostyczne. Odpowiedzią na to zapotrzebowanie jest pojawianie się na światowym rynku w szybkim tempie nowych zestawów testów real-time RT-PCR do diagnostyki SARS-CoV-2, które różnią się zarówno liczbą i rodzajem wykrywanych genów, jak i limitem detekcji, czułością i dokładnością. Przedstawiona analiza oraz dotychczasowe doświadczenia w wykorzystaniu komercyjnie dostępnych zestawów testów wskazuje na bezwzględną konieczność sprawdzenia/walidacji tych testów w każdym laboratorium diagnostycznym ze względu na obserwowane rozbieżności pomiędzy danymi zawartymi w instrukcjach producenta testu a wynikami badań uzyskiwanymi w laboratorium diagnostycznym. Należy mieć również na uwadze możliwość wystąpienia mutacji w obrębie badanych genów, co będzie miało wpływ na wyniki badania, poprzez obniżenie parametrów testów (czułości i limitu detekcji), z uzyskaniem fałszywie ujemnych wyników włącznie. Dlatego istotne jest również monitorowanie w czasie uzyskiwanych wyników badań [23-25].

Niniejsza praca dotyczy wyłącznie analizy testów real-time RT-PCR. Należy jednak podkreślić, że etapy badania diagnostycznego poprzedzające przeprowadzenie reakcji RT-PCR mają kluczowe znaczenie dla wyniku badania diagnostycznego. Dlatego też sprawdzenia powinny obejmować również różne wymazówki wraz z podłożem transportowym czy inaktywującym, które stosowane są do pobierania próbek do badań, a także metodę izolacji RNA lub rozszerzanie matrycy badania (rodzaju materiału klinicznego). Dostępne publikacje wskazują na znaczące różnice pomiędzy różnymi typami wymazówek, wpływające na wynik badania [22], jak również różnice w wydajności izolacji RNA oraz jakości uzyskiwanego preparatu przy zastosowaniu różnych zestawów do izolacji [23]. Każda zmiana w procesie diagnostycznym powinna zostać sprawdzona i zwalidowana – o ile to tylko możliwe [18, 22-26].

PIŚMIENNICTWO

1. Muenchhoff M, Mairhofer H, Nitschko H, Grzimek-Koschewa N, Hofmann D, Berger A, Rabenau H, Widera M, Ackermann N, Konrad R, Zange S, Graf A, Krebs S, Blum H, Sing A, Liebl B, Wölfel R, Ciesek S, Drosten C, Protzer U, Boehm S, Keppler OT (2020) Multicentre comparison of quantitative PCR-based assays to detect SARS-CoV-2 Euro Surveill 25(24):pii=2001057 <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.24.2001057>
2. <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-target-product-profiles-for-priority-diagnostics-to-support-response-to-the-covid-19-pandemic-v.0.1>
3. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases Interim guidance 17 January 2020. [https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-of-2019-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)-in-suspected-human-cases-interim-guidance-17-january-2020](https://www.who.int/publications/i/item/laboratory-testing-of-2019-novel-coronavirus-(2019-ncov)-in-suspected-human-cases-interim-guidance-17-january-2020)
4. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu D KW, Bleicker T, Brünink S, Schneider J, Schmidt ML, Mulders D GJC, Haagmans BL, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, Goderski G, Romette JL, Ellis J, Zambon M, Peiris M, Goossens H, Reusken C, Koopmans M PG, Drosten C (2020) Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. Euro Surveill 25(3):pii=2000045 <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
5. World Health Organization (2020) Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 19 March 2020. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

6. CDC (2020) 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel: Primers and Probes
7. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscd-crt-pcr-panel-primer-probes.pdf?sfvrsn=fa29cb4b_2
8. Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health (2020) Diagnostic detection of Novel coronavirus 2019 by Real time RT-PCR, https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/conventional-rt-pcr-followed-by-sequencing-for-detection-of-ncov-rirl-national-health-t.pdf?sfvrsn=42271c6d_4.
9. National Institute for Viral Disease Control and Prevention (2020) Specific primers and probes for detection 2019 novel coronavirus, http://ivdc.chinacdc.cn/kjyz/202001/t20200121_211337.html
10. COVID-19 Target product profiles for priority diagnostics to support response to the COVID-19 pandemic v.0.1 of 31 July 2020. <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-target-product-profiles-for-priority-diagnostics-to-support-response-to-the-covid-19-pandemic-v.0.1>
11. Diagnostic testing for SARS-CoV-2 Interim guidance 11 September 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>
12. Chu DK, Pan Y, Cheng S, Hui KP, Krishnan P, Liu Y, Ng DY, Wan CK, Yang P, Wang Q, Peiris M, Poon LLM (2020) Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin Chem* 66, 549–555 [10.1093/clinchem/hvaa029](https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa029)
13. Corman VM, Eckerle I, Bleicker T, Zaki A, Landt O, Eschbach-Bludau M, van Boheemen S, Gopal R, Ballhause M, Bestebroer TM, Muth D, Müller MA, Drexler JF, Zambon M, Osterhaus AD, Fouchier RM, Drosten C (2012) Detection of a novel human coronavirus by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *Euro Surveill* 17(39):pii=20285 <https://doi.org/10.2807/ese.17.39.20285-en>
14. Reusken C BEM, Broberg EK, Haagmans B, Meijer A, Corman VM, Papa A, Charrel R, Drosten C, Koopmans M, Leitmeyer K, on behalf of EVD-LabNet and ERLI-Net (2020) Laboratory readiness and response for novel coronavirus (2019-nCoV) in expert laboratories in 30 EU/EEA countries. *Euro Surveill* 25(6):pii=2000082 <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.6.2000082>
15. <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/surveillance/case-definition>
16. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays Interim guidance 11 September 2020 <https://www.who.int/publications/i/item/antigen-detection-in-the-diagnosis-of-sars-cov-2-infection-using-rapid-immunoassays>
17. Pfeifferle S, Reucher S, Nörz D, Lütgehetmann M (2020) Evaluation of a quantitative RT-PCR assay for the detection of the emerging coronavirus SARS-CoV-2 using a high throughput system. *Euro Surveill* 25(9):pii=2000152 <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.9.2000152>
18. Stefaniuk E, Bosacka K, Hryniewicz W (2015) Walidacja i weryfikacja metod i testów diagnostycznych w laboratorium mikrobiologicznym *Post Mikrobiol* 54, 4, 415–424 <http://www.pm.microbiology.pl>
19. Definicja zakażenia SARS-CoV-2 (COVID-19) - (wersja z 5.03.2020 oraz 16.06.2020): http://wwwold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html
20. Van Walle I, Leitmeyer K, Broberg EK, The European COVID-19 microbiological laboratories group (2020) Meta-analysis of the clinical performance of commercial SARS-CoV-2 nucleic acid, antigen and antibody tests up to 22 August medRxiv 2020.09.16.20195917; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.16.20195917>
21. COVID-19 Target product profiles for priority diagnostics to support response to the COVID-19 pandemic v.0.1 of 31 July 2020. <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-target-product-profiles-for-priority-diagnostics-to-support-response-to-the-covid-19-pandemic-v.0.1>
22. Zasada AA, Zacharczuk K, Woźnica K, Główska M, Ziółkowski R, Malinowska E (2020) The influence of a swab type on the results of point-of-care tests. *AMB Express* 10: 46 doi: [10.1186/s13568-020-00978-9](https://doi.org/10.1186/s13568-020-00978-9)
23. Vogels CB, Brito AF, Wyllie AL, Fauver JR, Ott IM, Kalinich CC, Petrone ME, Casanovas-Massana A, Muenker MC, Moore AJ et al. (2020) Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. *Nature microbiology* 1–7. [10.1038/s41564-020-0761-6](https://doi.org/10.1038/s41564-020-0761-6)
24. Xu R., Shieh YC, Stewart DS. Comparison of RNA extraction kits for the purification and detection of an enteric virus surrogate on green onions via RT-PCR. *J Virol Methods*, 2017, 239: 61–68
25. Jung Y, Park GS, Moon JH, Ku K, Beak SH, Lee CS, Kim S, Park EC, Park D, Lee JH, Byeon CW, Lee JJ, Maeng JS, Kim SJ, Kim SI, Kim BT, Lee MJ, Kim HG (2020) Comparative Analysis of Primer-Probe Sets for RT-qPCR of COVID-19 Causative Virus (SARS-CoV-2). *ACS Infect Dis* Sep 11;6(9):2513–2523. doi: [10.1021/acscinfed.0c00464](https://doi.org/10.1021/acscinfed.0c00464). Epub 2020 Aug 29. PMID: 32786273; PMCID: PMC7460803

Molecular diagnosis of COVID-19 – present experiences

Dr hab. Katarzyna Pancer^{1✉}, dr Magdalena Nowakowska², mgr Agnieszka Kołakowska-Kulesza¹, dr Katarzyna Zacharczuk², dr hab. Aleksandra A. Zasada³, mgr Karol Szymański⁴, mgr Karol Wdowiak³, mgr Ewelina Hallmann⁴, mgr Natalia Wolaniuk², dr Tomasz Wołkowicz², mgr Adam Słoński⁵, mgr inż. Kamila Formińska³, mgr Aleksandra Sadłocha², dr Ewa Mosiej³, mgr Beata Gad¹, mgr Arleta Krzysztozek¹, dr Agnieszka Trzcińska¹

¹Department of Virology, National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Chocimska 24, 00-791 Warsaw, Poland

²Department of Bacteriology and Biocontamination Control, National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Chocimska 24, 00-791 Warsaw, Poland

³Department of Sera and Vaccines Evaluation, National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Chocimska 24, 00-791 Warsaw, Poland

⁴Department of Influenza Research, National Influenza Center, National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Chocimska 24, 00-791 Warsaw, Poland

⁵Department of Parasitology and Vector-borne Diseases, National Institute of Public Health-National Institute of Hygiene, Chocimska 24, 00-791 Warsaw, Poland

✉Corresponding author: kpancer@pzh.gov.pl

Key words: COVID-19, SARS-CoV-2, real-time RT-PCR, molecular diagnostic, RT-PCR test

SUMMARY

Severe acute respiratory syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2), a new highly emerging and pathogenic for human RNA virus, is responsible for the present COVID-19 pandemic. Molecular diagnostic methods, including real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR) assay are the recommended methods for the identification and laboratory confirmation of COVID-19 cases. RT-PCR allows for detection the RNA of the virus in clinical specimens from patients suspected of COVID-19 with high specificity and sensitivity. Testing is still crucial for rapid detection of infected persons, implementation of appropriate measures to suppress further virus transmission and mitigate its impact. In response to demand of a molecular diagnostic test for SARS-CoV-2, within a first few months ongoing pandemic many commercial kits has become available on the market. However, these tests have varied in number and type of molecular targets, time of reaction as well as quality. In this study we compared different commercial tests for the detection of SARS-CoV-2 in clinical samples sending to Laboratory of Department of Virology, NIPH-NIH.