

### STRESZCZENIE

**P**andemia COVID-19 podkreśliła znaczenie diagnostyki laboratoryjnej w ograniczaniu rozprzestrzeniania się wirusa i właściwego leczenia pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby. Sytuacja wymagała szybkiego zwiększenia liczby testów diagnostycznych, aby umożliwić masowe badania przesiewowe, testowanie grup wysokiego ryzyka oraz ustalenie danych epidemiologicznych dotyczących wcześniejszego narażenia na SARS-CoV-2. W celu zaspokojenia zapotrzebowania na badania, przyspieszono rozwój testów molekularnych i serologicznych. Wiedza na temat metod diagnostycznych stale się rozwija, dlatego ważne jest zrozumienie natury testów i umiejętność interpretacji wyników. W niniejszym przeglądzie omówiono aktualną literaturę dotyczącą metod diagnostycznych SARS-CoV-2, markerów prognostycznych, rekomendacji dotyczących diagnostyki, wyboru odpowiedniego testu, rodzaju materiału biologicznego i interpretacji wyników w zależności od czułości testu i czasu trwania choroby. Ponadto przeanalizowano odsetek wyników pozytywnych w wybranych krajach w dwóch odległych punktach czasowych epidemii. Dalszy rozwój technik diagnostycznych i włączenie nowych technologii do diagnostyki COVID-19 może zapewnić lepsze, dokładniejsze i szybsze narzędzia kontroli i zwalczania epidemii.

### WPROWADZENIE

W grudniu 2019 roku wykryto nowy koronawirus, obecnie znany pod nazwą SARS-CoV-2, u trzech pacjentów z zapaleniem płuc związanym z klastrem przypadków ostrej choroby układu oddechowego z Wuhan w Chinach. Po Chinach epidemia COVID-19 uległa dalszemu rozprzestrzenianiu geograficznemu i do końca lutego 2020 w kilku krajach, w tym w Europie, stwierdzono stałą lokalną transmisję wirusa [1]. W dniu 11 marca 2020 roku Dyrektor Generalny Światowej Organizacji Zdrowia ogłosił pandemię COVID19 [2]. Aktualnie mija pół roku od tego momentu, a pozytywne wyniki testów na COVID-19 stwierdzono u 31 418 301 osób na świecie, z czego najwięcej przypadków w Stanach Zjednoczonych, Indiach i Brazylii (dane na dzień 21 września 2020) [3].

Wirus SARS-CoV-2 przenosi się drogą kropelkową, a do zakażenia może dojść zarówno w wyniku bezpośredniego, jak i pośredniego kontaktu z nośnikiem. Wiriony zawieszane w postaci aerozolu utrzymują się w środowisku, w którym wcześniej przebywała osoba zakażona, w formie zdolnej do zakażenia jeszcze przez kilka godzin (3 godziny w temperaturze 21–23 st. C i wilgotności względnej wynoszącej 65%). Wirus SARS-CoV-2 jest w stanie przetrwać 4 godziny na powierzchni miedzianej, do 24 godzin na powierzchni kartonowej, do 72 godzin na powierzchni plastikowej lub ze stali nierdzewnej. Zakażenie obejmuje przede wszystkim układ oddechowy. U większości zakażonych (80,9%) występują łagodne objawy choroby (gorączka, suchy kaszel, ogólne zmęczenie), które nie wymagają hospitalizacji [4–6]. Niemniej jednak u niektórych pacjentów objawy te mogą przekształcić się w zapalenie płuc z dusznością i objawami bólu w klatce piersiowej. Ryzyko śmierci wzrasta szczególnie u osób starszych i chorych z przewlekłymi schorzeniami, takimi jak otyłość, choroby układu krążenia, cukrzyca, przewlekłe choroby układu oddechowego, nadciśnienie [7,8].

Pandemia SARS-CoV-2 stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego i ekonomii. Wiarygodna, wczesna i dokładna diagnoza ma kluczowe znaczenie dla zapewnienia szybkiej pomocy medycznej zakażonym osobom, a także pomaga agencjom rządowym zapobiegać rozprzestrzenianiu się wirusa. Fałszywie negatywne wyniki testów mogą doprowadzić do rozprzestrzenienia się epidemii w społeczności, natomiast fałszywie dodatnie wyniki mogą prowadzić do niepotrzebnego leczenia oraz negatywnych konsekwencji ekonomicznych, psychologicznych i społecznych wśród pacjentów. W związku z tym istnieje pilna potrzeba posiadania dokładnego, szybkiego, łatwo dostępnego i niezawodnego testu diagnostycznego w kierunku zakażenia SARS-CoV-2. Aktualnie do wykrywania koronawirusa wykorzystuje się testy genetyczne oraz immunologiczne.

lek. med. Monika Klimek-Tulwin✉,

dr n. farm. Dariusz Duma,

dr n. farm. Beata Wojtysiak-Duma,

prof. dr hab. Janusz Solski

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

[https://doi.org/10.18388/pb.2020\\_365](https://doi.org/10.18388/pb.2020_365)

✉ autor korespondujący: monika.klimek.tulwin@gmail.com

**Słowa kluczowe:** COVID-19, SARS-CoV-2, diagnostyka, RT-PCR, badania serologiczne

**Skróty:** AOTMiT – Agencja Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji, BAL – płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe (ang. bronchoalveolar lavage), COVID-19 – choroba koronawirusowa 2019 (ang. Coronavirus Disease 2019), ECDC – Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób (ang. European Centre for Disease Prevention and Control), NAAT – technika amplifikacji kwasu nukleinowego (ang. nucleic acid amplification techniques), PTEiLChZ – Polskie Towarzystwo Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych, rRT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (ang. real-time reverse transcription-polymerase chain reaction), SARS-CoV-2 – koronawirus ciężkiego ostrego zespołu niewydolności oddechowej 2 (ang. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2), WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

Trwający, bezprecedensowy w skali światowej wybuch epidemii COVID-19 podkreślił znaczenie diagnostyki laboratoryjnej dla ograniczenia rozprzestrzeniania się wirusa SARS-CoV-2 i właściwego leczenia pacjentów z ciężkim przebiegiem choroby. Wiedza na temat metod diagnostycznych w kierunku SARS-CoV-2 wciąż się rozwija, dlatego ważne jest zrozumienie natury testów i umiejętność interpretacji wyników. Celem niniejszego opracowania jest omówienie dostępnych badań dotyczących metod diagnostycznych zakażeń COVID-19.

## REKOMENDACJE DOTYCZĄCE DIAGNOSTYKI SARS-COV-2

Według obowiązujących zaleceń National Health Commission, do rozpoznania zakażenia COVID-19 wymagane jest stwierdzenie jednego z kryteriów: (1) dodatni wynik wykrywania kwasu nukleinowego SARS-CoV-2 za pomocą rRT-PCR; (2) sekwencjonowanie genomu i określenia sekwencji wirusa SARS-CoV-2 w próbce; (3) wykrycie obecności specyficznych przeciwciał IgM i IgG; (4) serokonwersja IgG odczynu ujemnego w dodatni lub miano przeciwciał IgG w fazie zdrowienia co najmniej 4-krotnie wyższe niż w fazie ostrej [9].

Zgodnie z rekomendacjami WHO, ECDC, AOTMiT oraz PTEiLChZ podstawową techniką stosowaną w potwierdzaniu zakażenia SARS-CoV-2 są testy molekularne oparte na metodzie reakcji łańcuchowej polimerazy, wykrywające materiał genetyczny wirusa w wydzielinach i wydalinach chorego, zwłaszcza z błon śluzowych gardła i nosa. Według tych rekomendacji, wykrycie swoistych przeciwciał ma znaczenie uzupełniające, wskazując na przebyte zakażenie SARS-CoV-2. Potencjalne zastosowania testów serologicznych obejmują badania populacyjne służące do oceny odsetka osób, które miały kontakt z wirusem, prowadzenie dochodzeń epidemiologicznych, a także badanie ozdrowieńców, w celu uzyskania osocza do celów terapeutycznych [1,10,11].

## BADANIA WYKONYWANE METODĄ RT-PCR

Podstawą rozpoznania zakażenia SARS-CoV-2 jest zastosowanie metod molekularnych, technik amplifikacji kwasu nukleinowego, wykrywających materiał genetyczny wirusa. Sekwencja genomu wirusa SARS-CoV-2 została udostępniona w publicznych bazach medycznych *virological.org* 10 stycznia 2020 roku, w celu natychmiastowego wsparcia zdrowia publicznego, co pozwoliło na bardzo szybkie opracowanie i zastosowanie metod molekularnych w diagnostyce wirusa. W przypadku diagnostyki COVID-19 stosuje się specyficzną odmianę metody PCR, czyli PCR z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym. RT-PCR w czasie rzeczywistym jest metodą, za pomocą której możemy wykryć obecność specyficznego docelowego materiału genetycznego nawet w bardzo małej próbce. PCR w czasie rzeczywistym pozwala śledzić proces namnażania się DNA i tym samym monitorować ilość produktów powstających podczas kolejnych cykli [12,13]. Wykrywanie obecności materiału genetycznego wirusa jest możliwe tylko w aktywnej fazie choroby, gdy obecna jest replikacja w tkankach, z których

materiał został pobrany. W związku z tym test molekularny jest podstawową metodą pozwalającą stwierdzić, czy dana osoba ma aktywną infekcję COVID-19. Czulość w diagnostyce zakażeń COVID-19 według różnych badań waha się w granicach 71–100% [13,14].

Metody oparte na tradycyjnych technikach PCR wymagają skomplikowanych procedur, kosztownych instrumentów i specjalistycznej wiedzy. Dlatego w celu zapewnienia szybkiej diagnostyki w nagłych przypadkach, przy łóżku pacjenta wprowadza się zestawy szybkich testów, które mogą być wykonywane przy użyciu prostego, przenośnego i taniego sprzętu. Według obowiązujących w Polsce rekomendacji, szybkie testy molekularne z zastosowaniem technologii RT-PCR i izotermicznej, wykrywające RNA wirusa, mogą być wykonywane w przypadkach pilnych. Czas otrzymania wyniku w przypadku szybkich testów kasetkowych wynosi zwykle około 15–45 minut [11,15]. Przykładem takiego testu jest CovidNudge, wprowadzony w maju 2020 w szpitalach brytyjskich. Test CovidNudge jest czułym, specyficznym i szybkim testem punktowym na obecność SARS-CoV-2. Kluczową zaletą metody typu „point-of-care” jest fakt, że jest ona w pełni zautomatyzowana, co eliminuje potrzebę posiadania infrastruktury laboratoryjnej wymaganej dla tradycyjnego RT-PCR. W przeprowadzonych badaniach test CovidNudge dla SARS-CoV-2 miał czulość 94% i swoistość 100% w porównaniu ze standardowym RT-PCR [16].

Obszerny przegląd dostępnych komercyjnych i niekomercyjnych zestawów diagnostycznych został przedstawiony w pracy Oishee i wsp. [17] opublikowanej jako preprint. Tylko kilka z dostępnych testów otrzymało autoryzację amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA), ponieważ wciąż brakuje rzetelnych badań naukowych potwierdzających diagnostyczną przydatność poszczególnych testów.

## BADANIA SEROLOGICZNE

Wśród testów serologicznych wykrywających swoiste przeciwciała znalazły zastosowanie szybkie kasetkowe testy immunochromatograficzne, zautomatyzowane testy chemiluminescencyjne oraz testy immunoenzymatyczne (ELISA). Walidowane immunochemiczne testy diagnostyczne o wysokiej czułości i swoistości diagnostycznej określające stężenie/miano przeciwciał anty-SARS-CoV-2 są uznawane za jedyne wiarygodne badania serologiczne. Do oznaczeń wykonywanych w laboratoriach wykorzystuje się technikę ELISA w wersji klasycznej oraz modyfikację tej metody, dedykowaną automatycznym analizatorom metodę chemiluminescencji (CLIA) [11]. Do najpowszechniej stosowanych metod serologicznych w laboratoriach należy metoda ELISA. Testy serologiczne z krwi żyłnej wykrywają przeciwciała anty-SARSCoV-2 w klasie IgA, IgM oraz IgG. Opisano intensywną syntezę przeciwciał anty-SARSCoV-2 w klasie IgM i IgA u chorych na COVID-19, jednak aktualnie brak jest wiarygodnych danych, oceniających przydatność kliniczną testów wykrywających te typy przeciwciał [18]. Przeciwciała w klasie IgG są obecne u ozdrowieńców, czyli osób które przechorowały daną chorobę, jednak pozytywny wynik badania serologicznego musi być potwier-

dzony badaniem molekularnym. Obecność przeciwciał anti-SARS-CoV-2 klasy IgG, w skojarzeniu z ujemnym wynikiem testu molekularnego, może świadczyć o przebyciu zakażenia. Niemniej jednak wartość diagnostyczna badań serologicznych jest ograniczona, dlatego Światowa Organizacja Zdrowia nie rekomenduje podejmowania decyzji klinicznych oraz rozpoznawania COVID-19 na tej podstawie. Ponadto, występowanie reakcji krzyżowych pomiędzy przeciwciałami anti-SARSCoV-2 a przeciwciałami istniejącymi w populacji wytworzonymi przeciwko innym, powszechnie występującym koronawirusom takim jak 229E, NL63, OC43, czy HKU1 istotnie ogranicza specyficzność testów immunologicznych. Reaktywność krzyżowa może być przyczyną wyników fałszywie dodatnich zarówno we frakcji IgM, jak i IgG. Z tej przyczyny niezmiernie ważnym jest walidowanie specyficzności testów serologicznych w stosunku do innych koronawirusów. Tymczasem duży odsetek wyników fałszywie ujemnych jest spowodowany występowaniem okienka serologicznego, czyli okresu pomiędzy początkiem infekcji a wytworzeniem przeciwciał. Dla IgM szczyt występuje po 2 tygodniach, natomiast dla IgG po 4 tygodniach [19–21]. Przegląd systematyczny 65 badań wskazuje, że czułość testów serologicznych waha się od 0% do 100%, a specyficzność od 78% do 100%, przy czym wydajność zmienia się w zależności od czasu trwania choroby, przyjmując bardzo ograniczone ramy czasowe, co odzwierciedla dynamikę serokonwersji [22].

Nie zaleca się stosowania jakościowych tzw. szybkich testów kasetkowych wykrywających przeciwciała anti-SARS-CoV-2 w opiece nad pacjentami ze względu na brak wystarczających danych potwierdzających ich dokładność. Zasada działania tych testów polega na reakcji obecnych w próbce surowicy, osocza bądź pełnej krwi, przeciwciał ze znakowanymi antygenami wirusa. W opublikowanych badaniach czułość i specyficzność waha się odpowiednio od 9% do 88,6% i od 88,9% do 91,7% [22]. Zaletą tych testów jest prostota wykonania oraz krótki czas uzyskania wyniku. W wielu krajach, w tym również w Polsce, testy te znalazły zastosowanie w specjalnych mobilnych punktach pobrań typu „DriveThru”, należy jednak pamiętać, że często są to testy o niepotwierdzonej wiarygodności i braku walidacji. W związku z powyższym, WHO nie zaleca ich stosowania na obecnym etapie, jednak rekomenduje prowadzenie dalszych badań nad ich wydajnością i potencjalną użytecznością diagnostyczną [11,23].

Zaproponowano kilka szybkich testów antygenowych dla wykrywania białek wirusa SARS-CoV-2. Badania antygenowe są najczęściej immunochromatograficzne lub oparte o technologię ELISA. Mimo zalet jakimi są niski koszt i krótki czas trwania badania, główne obawy budzi wysoki wskaźnik wyników fałszywie ujemnych wynikający z niskiej lub zmiennej wiremii, możliwość reakcji krzyżowych z innymi powszechnie występującymi koronawirusami oraz brak odpowiedniej walidacji [23,24].

## RODZAJ MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO W DIAGNOSTYCE SARS-COV-2

Obecnie wykonywane badania diagnostyczne technikami molekularnymi rRT-PCR w kierunku zakażeń SARS-

-CoV-2 mogą być fałszywie ujemne z powodu niewystarczającej ilości materiału wirusowego w próbce, ograniczeń związanych z niskim poziomem gotowości technologicznej, różnicami w poziomie wykrywalności zestawów pochodzących od różnych producentów, niską wiremii pacjentów, nieprawidłowym pobieraniem lub transportem próbek biologicznych lub błędem laboratoryjnego. Dane porównujące czułość testów rRT-PCR sugerują, że może ona się różnić w zależności od rodzaju pobranego materiału, czasu jaki minął od początku objawów oraz natężenia objawów u chorego. Pobranie odpowiedniej próbki ma kluczowe znaczenie dla wykrycia wirusa SARS-CoV-2. Próbkę do badań diagnostycznych w kierunku SARS-CoV-2 mogą być pobierane z górnych dróg oddechowych (wymaz z nosogardła, wymaz z gardła, wymaz z błon śluzowych nosa, płukanie gardła, ślina) lub dolnych dróg oddechowych (plwocina, aspirat z tchawicy, płukanie oskrzelowo-pęcherzykowe) [19].

Wymazy z jamy ustno-gardłowej i nosowo-gardłowej są obecnie najbardziej popularnymi i powszechnie stosowanymi testami diagnostycznymi. Jednak badania wykazują, że wymaz z jamy nosowo-gardłowej wykazuje wyższą wiremii, a wirusowe RNA jest istotnie częściej wykrywane w porównaniu do wymazu z jamy ustno-gardłowej [25]. Ponadto wykazano, że wysoka wiremii występuje we wczesnej i postępującej fazie choroby, natomiast stopniowo zmniejsza się w fazie zdrowienia [26,27]. Ilość RNA wirusa SARS-CoV-2 w górnych drogach oddechowych jest najwyższa w pierwszym tygodniu i osiąga maksymalne wartości od 4 do 6 dni po wystąpieniu objawów [28,29].

W badaniu Yang i wsp. [30], w pierwszym tygodniu od początku objawów czułość wynosiła odpowiednio u pacjentów z ciężkimi i łagodnymi objawami choroby – 89% i 82% dla próbki plwociny, 73% i 72% dla próbki z wymazu z nosa, 60% i 61% dla próbki z wymazu z gardła. W kolejnych 8–14 dniach od początku objawów czułość testów maleje i waha się kolejno 83% i 74% dla próbki plwociny, 72% i 53% dla próbki z wymazu z nosa, 50% i 30% dla próbki z wymazu z gardła. Najlepszym materiałem diagnostycznym są popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe, którego czułość w ciężkich przypadkach sięga 100% w 8–14 dniu od początku objawów. Jednak BAL jest badaniem pracochłonnym, wymagającym zaawansowanych umiejętności i jest bolesne dla pacjenta, dlatego nie jest rutynowo zalecane w diagnostyce. Podobne wyniki uzyskał Wang i wsp. [31], stwierdzając najwyższą czułość diagnostyczną płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (93%), następnie plwociny (72%), wymazu z nosa (63%), biopsji szczoteczką fibrobronchoskopu (46%), wymazu z gardła (32%), próbki kału (29%).

Zespół badawczy z Centers for Disease Control and Prevention wykazał, że spośród 117 par próbek wymazów z jamy nosowo-gardłowej oraz wymazów z jamy ustno-gardłowej pochodzących od 12 pacjentów zakażonych SARS-CoV-2, 38% par miało sprzeczne wyniki. Spośród niezgodnych par z jedną dodatnią próbką, próbka z nosogardła była dodatnia u 66%, natomiast próbka z jamy ustno-gardłowej u 34% [32]. Z kolei badania Wölfel i wsp. [29] nie wykazały

wyższych poziomów RNA wirusa w nosogardle w porównaniu z materiałem z jamy ustno-gardłowej.

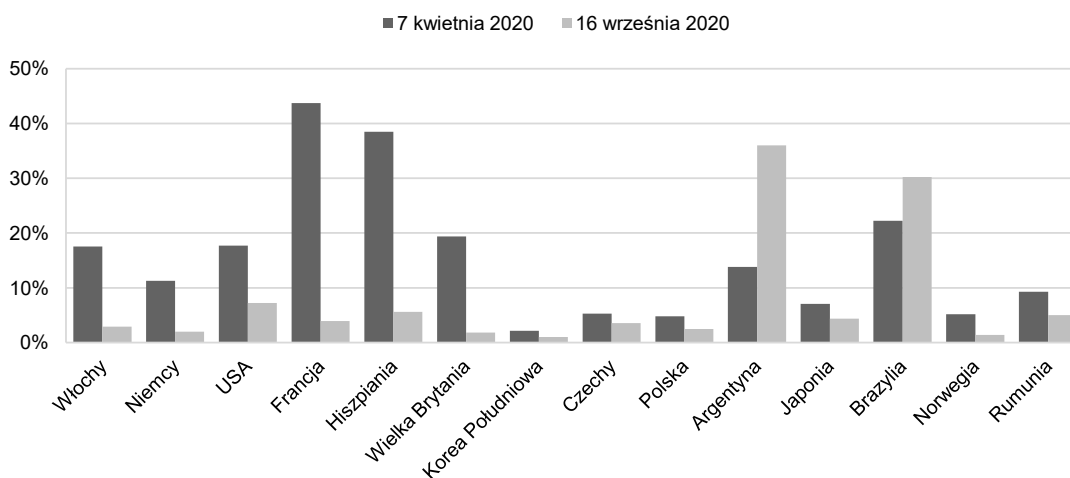
W diagnostyce COVID-19 testy z próbki śliny stanowią obiecującą alternatywę dla wymazów z nosogardła. Ślina jest materiałem biologicznym, który może być pobrany samodzielnie w sposób nieinwazyjny i może być materiałem zastępczym w sytuacji, gdy wymaz z nosogardła lub inny wyżej wymieniony materiał jest niemożliwy do pobrania. Ponadto, test ze śliny może mieć znaczący wpływ na zwiększenie dostępności badań w kierunku COVID-19 [33]. Metaanaliza pięciu badań dotycząca skuteczności i powtarzalności wykrywania wirusowego RNA SARS-CoV-2, do której włączono łącznie 123 pacjentów wykazała 91% czułości testów z próbki śliny i 98% czułości w przypadku wymazów z nosogardła [34]. Badania naukowców z Uniwersytetu Yale wśród 70 pacjentów z COVID-19 wykazały większy odsetek dodatnich testów z próbek śliny niż próbek wymazu z nosogardła. Od 1. do 5. dnia od rozpoznaniu choroby, 81% badanych próbek śliny było dodatnich, natomiast próbek z jamy nosowo-gardłowej 71%. Między 6. a 9. dniem od rozpoznania 76% próbek śliny miało wynik dodatni [35]. Wyniki te sugerują, że testy z próbki śliny i wymazu z jamy nosowo-gardłowej mają podobną czułość w wykrywaniu SARS-CoV-2. Wyniki badania Becker i wsp. [36] opublikowane jako preprint sugerują, że wśród chorych z łagodnymi objawami czułość wymazów z nosogardła wynosi 98,9%, natomiast czułość testów na ślinę zaledwie 69,2%. Podobnie Jamal i wsp. [37] wykazali o 17% większą czułość wymazu z nosogardła w wykrywaniu SARS-CoV-2 w porównaniu do próbek śliny (89% vs 72%), a różnica czułości była największa dla par próbek pobranych w późniejszym okresie choroby. Mimo obiecujących wstępnych wyników, przed wprowadzeniem testów ze śliny do praktyki klinicznej, konieczne jest potwierdzenie ich skuteczności.

#### ODSETEK POZYTYWNYCH WYNIKÓW W KIERUNKU SARS-COV-2

Według aktualnych wytycznych pacjentom z objawami COVID-19 lub osobom podejrzanym o zakażenie dedykowany jest test rRT-PCR, natomiast testy serologiczne są

wykorzystywane do oceny czy dana osoba miała kontakt z wirusem. Kombinacja obu technik, testu ELISA oraz rRT-PCR, mogą podnieść skuteczność wykrywalności zakażeń na różnych etapach. Wykazano, że test rRT-PCR jest najbardziej skuteczny w początkowej fazie choroby. W pierwszym tygodniu od pojawienia się pierwszych objawów ilość materiału genetycznego jest najwyższa. Wykrywalność materiału genetycznego wirusa istotnie maleje w późniejszym przebiegu (od 5 do 11 dni). Natomiast stężenie przeciwciał u większości osób zakażonych SARS-CoV-2 wzrasta znacząco dopiero między 10. a 21. dniem od wystąpienia objawów. Liu i wsp. [38] w swojej analizie zidentyfikowali 11. dobę od wystąpienia objawów jako kluczowy moment w procesie chorobowym. To wtedy większość zakażonych pacjentów wytwarza przeciwciała przeciwwirusowe i w oparciu o badania serologiczne można podejrzewać infekcję. Test ELISA wykonany po 11 dniach od początku objawów okazał się skuteczny na poziomie 81%, a RT-PCR osiągnął jedynie 64% wykrywalności. Niemniej jednak dla potwierdzenia infekcji przed 11. dobą od początku objawów zalecany jest test rRT-PCR. Zatem należy zwrócić uwagę, że czas od pojawienia się objawów jest bardzo ważnym wyznacznikiem interpretacji testów w kierunku COVID-19 [21,38-40].

Niezależnie od czułości testów i innych ograniczeń związanych z diagnostyką zakażeń COVID-19, największy wpływ na ilość potwierdzonych przypadków w poszczególnych krajach ma ilość wykonywanych testów w kierunku SARS-CoV-2. Odsetek pozytywnych wyników w stosunku do liczby przeprowadzonych testów może być dobrym wykładnikiem fazy epidemii w danym kraju oraz wydolności systemu opieki zdrowotnej. Malejący odsetek testów pozytywnych korelujący ze zwiększającą się liczbą przypadków, może świadczyć o fazie opanowywania epidemii, podczas której w danym kraju przeprowadza się dużo testów wśród osób o małym ryzyku zakażenia. Z kolei zmniejszająca się liczba nowych przypadków i rosnący odsetek testów pozytywnych może świadczyć o pogarszającej się sytuacji w kraju z powodu przeciążenia systemu opieki zdrowotnej i niedoboru testów, które zarezerwowane są tylko dla osób z objawami COVID-19. W tym przypadku rzeczywista liczba zakażonych jest niedoszacowana. Bardzo wysoki odse-



Rycina 1. Odsetek wyników pozytywnych w stosunku do liczby przeprowadzonych testów w wybranych krajach w dniu 7 kwietnia 2020 oraz w dniu 16 września 2020

tek testów pozytywnych obserwowano u szczytu epidemii we Francji (44%) oraz Hiszpanii (39%). Wtedy spośród 1 346 004 zakażonych osób na świecie, najwięcej przypadków odnotowano w Stanach Zjednoczonych, Hiszpanii i Włoszech (dane z 7 kwietnia 2020). Aktualnie najwyższy odsetek testów pozytywnych spośród analizowanych próbek obserwuje się w Argentynie (36%) oraz Brazylii (30%). Ameryka Łacińska jest obecnie najbardziej dotkniętym pandemią regionem na świecie. Aktualnie sytuacja epidemiczna we Włoszech, Niemczech, USA, Francji, Hiszpanii i UK uległa istotnej poprawie w porównaniu do stanu sprzed pół roku. Natomiast w Korei Południowej, Czechach, Polsce, Japonii, Norwegii i Rumunii przez ostatnie pół roku odsetek testów pozytywnych utrzymuje się stabilnie na poziomie od 1 do 5% (Ryc. 1).

W niniejszej analizie uwzględniono dane pochodzące z oficjalnych rządowych raportów zebranych przez serwis Worldometers.info [3]. Niemniej jednak całkowita liczba przypadków i wykonanych testów może być zaniżona z powodu nieusystematyzowanych reguł raportowania przez różne państwa oraz częstego bezobjawowego lub skąpoobjawowego przebiegu choroby, przez co część chorych nigdy nie została przebadana w kierunku COVID19 [41].

Biorąc pod uwagę powyższe, można zauważyć, że nastąpiło znaczne przetasowanie w światowych danych statystycznych dotyczących chorych na COVID-19. Jednak w wielu krajach stale utrzymuje się zbliżony odsetek testów pozytywnych. Polemika dotycząca tego, czy aktualnie mamy do czynienia z „drugą falą pandemii” czy „odrodzeniem się pierwszej fali pandemii”, choć nie wpływa na postępowanie kliniczne, to ma istotne znaczenie psychologiczne i społeczne. Wbrew początkowym nadziejom, koronawirus SARS-CoV-2 nie wykazuje sezonowości zachorowań. Niemniej jednak, na podstawie światowych trendów można zaobserwować fluktuację liczby zakażeń, co może sugerować występowanie kolejnych fal pandemii. Jednak aby mówić o drugiej fali pandemii, konieczne byłoby zakończenie pierwszej, dlatego w świetle aktualnych danych podział ten wydaje się niewłaściwy. Epidemiologiczny punkt końcowy nastąpi, gdy zostanie osiągnięta odporność populacyjna, wystarczająca, aby zapobiec powszechnemu, ciągłemu przenoszeniu wirusa. Ewentualnie w momencie, w którym wszystkie aspekty życia społecznego i gospodarczego będą mogły zostać wznowione bez obawy o ciągłą śmiertelność i długoterminowe konsekwencje zdrowotne związane z COVID-19. W związku z tym bardziej trafne wydaje się określenie, że aktualnie mamy do czynienia z „jedną wielką falą”, która będzie rosła i opadać aż do czasu osiągnięcia punktu końcowego.

#### **MARKERY PROGNOSTYCZNE CIĘŻKIEGO PRZEBIEGU COVID-19**

Aktualnie nie ma wiarygodnego narzędzia stratyfikacji ryzyka dla pacjentów z ciężką postacią COVID-19, jednak zidentyfikowano potencjalne markery biochemiczne, które mogą w praktyce stanowić użyteczne narzędzie do oceny rokowania i ryzyka wczesnego pogorszenia się stanu chorego. Dotychczasowe analizy wykazały silną zależność między progresją choroby a spadkiem saturacji krwi tlenem (SaO<sub>2</sub>),

podwyższeniem poziomu stężenia dimeru D, azotu mocznikowego, wskaźnika neutrofilowolimfocytowego (NLR), białka C-reaktywnego (CRP), dehydrogenazy mleczanowej (LDH), a także obniżonej natremii i albuminemii [6,7,42,43]. Ponadto, badania sugerują, że występowanie „burzy cytokinowej” i hiperaktywacji cytotoksycznych limfocytów T z wydzielaniem interleukiny 6 (IL-6), jako jednego z mediatorów odpowiedzi zapalnej, jest jednym z istotnych mediatorów niewydolności oddechowej, wstrząsu i niewydolności wielonarządowej. W związku z tym, ocena stężenia IL-6 w surowicy również jest przydatna jako badanie prognostyczne dla ciężkiego przebiegu zakażenia [7,43,44]. Tanie i łatwe do zmierzenia parametry mogą okazać się skuteczne we wczesnej ocenie rokowania chorych z COVID-19. Ich zastosowanie na wczesnym etapie choroby może pomóc w usprawnieniu postępowania poprzez ukierunkowanie działań na chorych z grup podwyższonego ryzyka, zabezpieczenia odpowiednich środków oraz wcześniejszego skierowania do oddziałów intensywnej terapii [6].

#### **PODSUMOWANIE**

W niniejszej pracy opracowano praktyczne podsumowanie markerów biochemicznych użytecznych klinicznie w diagnostyce COVID-19. Przegląd dostępnych dowodów dotyczących metod diagnostyki COVID-19 wskazuje, że prawdopodobieństwo wykrycia zakażenia zależy przede wszystkim od wyboru odpowiedniego testu diagnostycznego, jego czułości, czasu jaki minął od początku objawów oraz rodzaju materiału biologicznego.

Zarówno testy RT-PCR, jak i testy immunologiczne pomagają nam w walce z wybuchem pandemii COVID-19, który wpłynął na życie ludzi i światową gospodarkę. Test RT-PCR w czasie rzeczywistym pozostaje molekularnym testem z wyboru do etiologicznej diagnostyki przypadków COVID-19. Natomiast test immunologiczny oparty na przeciwciałach jest wykorzystywany jako dodatkowe narzędzie do badań przesiewowych w całym społeczeństwie i wymaga potwierdzenia testem molekularnym. Testy immunoenzymatyczne wykrywające przeciwciała klasy IgG wydają się być najbardziej obiecujące w badaniach epidemiologicznych, gdyż utrzymują się na podwyższonym poziomie długo po przechorowaniu. Niestety, na tym etapie epidemii, nie mamy jeszcze dowodów na to, jak długo trwa potencjalna odporność u osób zakażonych SARS-CoV-2, zarówno bezobjawowych, jak i objawowych.

Należy pamiętać, że interpretacja wyników badań diagnostycznych zawsze powinna być prowadzona przez wyspecjalizowane osoby, w kontekście informacji klinicznych. Większość dostępnych danych dotyczy populacji dorosłych, które nie mają obniżonej odporności. Przebieg choroby, dynamika dodatniego wyniku PCR i serokonwersji może być różny u dzieci i innych grup, w tym dużej populacji osób bezobjawowych, które nie są zdiagnozowane i pozostają bez aktywnego nadzoru.

Dalszy rozwój technik diagnostycznych i włączenie nowych technologii do diagnostyki COVID-19 może zapewnić lepsze, dokładniejsze i szybsze narzędzia kontroli i zwalczania epidemii. Rozwój ten może również zmniejszyć

zapotrzebowanie na zaawansowany sprzęt i specjalistyczne szkolenia, co pomoże nam dotrzeć do szerokiej społeczności w zakresie badań przesiewowych i diagnostyki zakażeń.

## PIŚMIENNICTWO

1. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2020) Coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: increased transmission in the EU/EEA and the UK – seventh update 25 March 2020. Stockholm
2. World Health Organization (2020) WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. <https://www.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19--11-march-2020>. Dostęp: 3 maja 2020
3. Worldometers.info. Dover, Delaware, U.S.A. <https://www.worldometers.info/coronavirus/>. Dostęp: 16 września 2020
4. Novel Coronavirus Pneumonia Emergency Response Epidemiology Team (2020) The epidemiological characteristics of an outbreak of 2019 novel coronavirus diseases (COVID-19) in China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 41: 145–151. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2020.02.003>
5. Pawlik L, Śpiołek E, Fichna J, Tarasiuk A (2020) Charakterystyka wirusa SARS-CoV-2 i potencjalne farmakologiczne sposoby leczenia. *Postępy Biochem* 66: 83–90. [https://doi.org/10.18388/pb.2020\\_321](https://doi.org/10.18388/pb.2020_321)
6. Bennour S, Cherif AB, Kessira A, et al (2020) Usefulness of biological markers in the early prediction of corona virus disease-2019 severity. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 0: 1–8. <https://doi.org/10.1080/00365513.2020.1821396>
7. Zhou F, Yu T, Du R, et al (2020) Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *The Lancet* 395: 1054–1062. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
8. Gold MS, Sehayek D, Gabrielli S, et al (2020) COVID-19 and comorbidities: a systematic review and meta-analysis. *Postgraduate Medicine* 0: 1–7. <https://doi.org/10.1080/00325481.2020.1786964>
9. China National Health Commission. (2020) Diagnosis and Treatment Protocol for Novel Coronavirus (trial version 8). Beijing: <https://covid19.alliancebrh.com/covid19en/c100036/202008/12b-9b42813a94755bbf442008fe86f63.shtml>. Dostęp: 16 września 2020
10. Dzierżanowska-Fangrat K, Horban A, Szmitkowski M, Flisiak R (2020) Stanowisko Konsultantów Krajowych w dziedzinie Mikrobiologii Lekarskiej, Chorób Zakaźnych, Diagnostyki Laboratoryjnej oraz Prezesa Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych w sprawie oznaczania swoistych przeciwciał i antygenów w diagnostyce zakażenia SARS-CoV-2
11. Agencja Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji (2020) Zalecenia w COVID-19. Polskie zalecenia diagnostyczno-terapeutyczne oraz organizacyjne w zakresie opieki nad osobami zakażonymi lub narażonymi na zakażenie SARS-CoV-2. Wersja 1.1 - 25.04.2020 r.
12. Tang Y-W, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW (2020) Laboratory diagnosis of COVID-19: Current issues and challenges. *Journal of Clinical Microbiology* 58. <https://doi.org/10.1128/JCM.00512-20>
13. Mathuria JP, Yadav R, Rajkumar (2020) Laboratory diagnosis of SARS-CoV-2 - A review of current methods. *J Infect Public Health* 13: 901–905. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.06.005>
14. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al (2020) Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 25. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>
15. Woo CH, Jang S, Shin G, et al (2020) Sensitive fluorescence detection of SARS-CoV-2 RNA in clinical samples *via* one-pot isothermal ligation and transcription. *Nature Biomedical Engineering* 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-00617-5>
16. Gibani MM, Toumazou C, Sohbaty M, et al (2020) Assessing a novel, lab-free, point-of-care test for SARS-CoV-2 (CovidNudge): a diagnostic accuracy study. *The Lancet Microbe*. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30121-X](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30121-X)
17. Oishee MJ, Ali T, Jahan N, et al (2020) COVID-19 diagnostics: Current and Prospective Tools. <https://doi.org/10.31219/osf.io/r9d6f>
18. Amanat F, Stadlbauer D, Strohmeier S, et al (2020) A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine* 26: 1033–1036. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5>
19. Michalski A, Bielawska-Drózd A, Cieślak P, et al (2020) Metody diagnostyki laboratoryjnej COVID-19. 1 1–9. <https://doi.org/10.36553/wm.41>
20. Long Q-X, Liu B-Z, Deng H-J, et al (2020) Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature Medicine* 26: 845–848. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0897-1>
21. Bastos ML, Tavaziva G, Abidi SK, et al (2020) Diagnostic accuracy of serological tests for covid-19: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 370. <https://doi.org/10.1136/bmj.m2516>
22. La Marca A, Capuzzo M, Paglia T, et al (2020) Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19): a systematic review and clinical guide to molecular and serological in-vitro diagnostic assays. *Reprod Biomed Online* 41:483–499. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.06.001>
23. World Health Organization (2020) Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19. <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/advice-on-the-use-of-point-of-care-immunodiagnostic-tests-for-covid-19>. Accessed 18 Sep 2020
24. Diao B, Wen K, Chen J, et al (2020) Diagnosis of acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection by detection of nucleocapsid protein. *medRxiv* 2020.03.07.20032524. <https://doi.org/10.1101/2020.03.07.20032524>
25. Mawaddah A, Gendeh HS, Lum SG, Marina MB (2020) Upper respiratory tract sampling in COVID-19. *Malays J Pathol* 42: 23–35
26. Yu F, Yan L, Wang N, et al (2020) Quantitative detection and viral load analysis of SARS-CoV-2 in infected patients. *Clin Infect Dis* 71: 793–798. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa345>
27. To KK-W, Tsang OT-Y, Leung W-S, et al (2020) Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* 20: 565–574. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30196-1)
28. Pan Y, Zhang D, Yang P, et al (2020) Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *Lancet Infect Dis* 20: 411–412. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30113-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30113-4)
29. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, et al (2020) Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature* 581:465–469. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>
30. Yang Y, Yang M, Shen C, et al (2020) Evaluating the accuracy of different respiratory specimens in the laboratory diagnosis and monitoring the viral shedding of 2019-nCoV infections. *medRxiv* 2020.02.11.20021493. <https://doi.org/10.1101/2020.02.11.20021493>
31. Wang W, Xu Y, Gao R, et al (2020) Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA* 323: 1843–1844. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3786>
32. Kujawski SA, Wong KK, Collins JP, et al (2020) Clinical and virologic characteristics of the first 12 patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in the United States. *Nature Medicine* 26: 861–868. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0877-5>
33. Iwasaki S, Fujisawa S, Nakakubo S, et al (2020) Comparison of SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swab and saliva. *Journal of Infection* 81: e145–e147. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.071>
34. Czumbel LM, Kiss S, Farkas N, et al (2020) Saliva as a candidate for COVID-19 diagnostic testing: a meta-analysis. *Front Med* 7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00465>
35. Wyllie AL, Fournier J, Casanovas-Massana A, et al (2020) Saliva or nasopharyngeal swab specimens for detection of SARS-CoV-2. *New England Journal of Medicine* 0:null. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2016359>
36. Becker D, Sandoval E, Amin A, et al (2020) Saliva is less sensitive than nasopharyngeal swabs for COVID-19 detection in the community setting. *medRxiv* 2020.05.11.20092338. <https://doi.org/10.1101/2020.05.11.20092338>

37. Jamal AJ, Mozafarihashjin M, Coomes E, et al (2020) Sensitivity of Nasopharyngeal swabs and saliva for the detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *Clin Infect Dis*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa848>
38. Liu L, Liu W, Zheng Y, et al (2020) A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients. *Microbes Infect* 22: 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2020.05.008>
39. Sethuraman N, Jeremiah SS, Ryo A (2020) Interpreting diagnostic tests for SARS-CoV-2. *JAMA* 323: 2249–2251. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.8259>
40. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al (2020) Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin Infect Dis*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa344>
41. Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, Chowell G (2020) Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Euro Surveill* 25. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.10.2000180>
42. Gong J, Ou J, Qiu X, et al (2020) A tool for early prediction of severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A multicenter study using the risk nomogram in Wuhan and Guangdong, China. *Clin Infect Dis* 71: 833–840. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa443>
43. Gao Y, Li T, Han M, et al (2020) Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. *Journal of Medical Virology* 92: 791–796. <https://doi.org/10.1002/jmv.25770>
44. Yuan J, Zou R, Zeng L, et al (2020) The correlation between viral clearance and biochemical outcomes of 94 COVID-19 infected discharged patients. *Inflamm Res* 69: 599–606. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01342-0>

## Diagnostic strategies for SARS-CoV-2 infection

Monika Klimek-Tulwin , Dariusz Duma, Beata Wojtysiak-Duma, Janusz Solski

Department of Laboratory Diagnostics, Medical University of Lublin

✉ Corresponding author: monika.klimek.tulwin@gmail.com

**Key words:** COVID-19, SARS-CoV-2, diagnostics, RT-PCR, serological tests

### SUMMARY

COVID-19 pandemic highlighted the importance of laboratory diagnostics to reduce the spread of SARS-CoV-2 and to treat patients with severe coronavirus disease. The situation required a rapid development of molecular and serological tests to enable mass screening, testing of high-risk groups, and establishing epidemiological data. Knowledge of diagnostic methods is continuously evolving, so it is crucial to understand the nature of the tests and to be able to interpret their results. This review discusses the current literature on diagnostic methods, prognostic markers, diagnostic recommendations, choice of the appropriate test, type of biological material, and interpretation of results depending on test sensitivity and disease duration. Also, the percentage of positive results in the selected countries at two distant time points of the epidemic was analyzed. Further development of diagnostic techniques and incorporation of new technologies can provide more accurate and faster tools for control the epidemic.