



Agencja Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji

Diagnostyka laboratoryjna SARS-CoV-2

Aktualizacja Zaleceń

Wersja 2.0

Data ukończenia – 07.04.2021 r.

Autorzy¹ aktualizacji Zaleceń

Redakcja Naukowa (Komitet Sterujący):

prof. dr hab. n. med. **Rafał Niżankowski** (Przewodniczący Rady Przejrzystości, Centrum Monitorowania Jakości w Ochronie Zdrowia)

prof. dr hab. n. med. **Michał Myśliwiec** (Wiceprzewodniczący Rady Przejrzystości, I Klinika Nefrologii i Transplantologii UM Białostok oraz PWSIP w Łomży)

prof. dr hab. n. med. **Piotr Szymański** (Wiceprzewodniczący Rady Przejrzystości, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego w Warszawie, Centralny Szpital Kliniczny MSWiA)

Panel Ekspertów²:

prof. dr hab. **Agnieszka Dobrzyń** (Dyrektor Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie)

prof. dr hab. n. med. **Katarzyna Dzierżanowska-Fangrat** (Konsultant krajowy w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej)

dr hab. **Rafał Gierczyński**, prof. NIZP-PZH (Z-ca Dyrektora ds. Bezpieczeństwa Epidemiologicznego i Środowiskowego NIZP-PZH)

dr hab. n. med. **Jerzy Jaroszewicz** (Kierownik Katedry i Oddziału Klinicznego Chorób Zakaźnych i Hepatologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach)

prof. dr hab. n. med. **Rafał Krenke** (Kierownik Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego)

dr hab. **Anna Mertas**, prof. SUM (Prezes Polskiego Towarzystwa Diagnostyki Laboratoryjnej, Katedra i Zakład Mikrobiologii i Immunologii Wydziału Nauk Medycznych w Zabrze, Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach)

prof. dr hab. n. med. **Miłosz Parczewski** (Kierownik Kliniki Chorób Zakaźnych, Tropikalnych i Nabytych Niedoborów Immunologicznych Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie)

dr hab. n. med. **Edyta Podsiadły** (Kierownik Działu Mikrobiologii, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej i Immunologii Klinicznej Wieku Rozwojowego UCK WUM, Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej WUM)

prof. dr hab. **Krzysztof Pyrc** (Kierownik Pracowni Wirusologii Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego)

prof. dr hab. med. **Maciej Smitkowski** (Konsultant Krajowy w dziedzinie Diagnostyki Laboratoryjnej, Zakład Diagnostyki Biochemicznej, Uniwersytecki Szpital Kliniczny i Uniwersytet Medyczny w Białymstoku)

¹ Konflikt interesów: Członkowie Zespołu Ekspertkiego zostali zobowiązani do złożenia deklaracji konfliktu interesu zgodnie z narzędziem ADAPTE (*The ADAPTE Collaboration (2009). The ADAPTE Process: Resource Toolkit for Guideline Adaptation. Version 2.0. <http://www.g-i-n.net>*). Szczegółowe informacje – ANEKS.

² Zespół Ekspertów uczestniczących w wypracowaniu zaleceń w zakresie diagnostyki laboratoryjnej SARS-CoV-2. Celem procesu było osiągnięcie konsensusu.

Zespół AOTMiT ds. aktualizacji Zaleceń w zakresie diagnostyki laboratoryjnej SARS-CoV-2 – opracowanie przeglądów doniesień naukowych dla metod diagnostycznych SARS-CoV-2.

Anna Kordecka – Koordynator prac Zespołu AOTMiT

Magdalena Krasztel – Lider Zespołu Analitycznego

Magdalena Łazowska – Zastępca Koordynatora

Dominika Bruszkiewicz

Magdalena Garbacz

Paulina Hałasa

Kinga Machnik

Dorota Najmrocka

Anna Rychert

Ewelina Sadowska

SPIS TREŚCI

Wstęp	6
ZALECENIA – DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA	7
1. Badania materiału genetycznego SARS-CoV-2.....	8
2. Badania antygenowe służące do wykrywania białek SARS-CoV-2	11
3. Badania serologiczne służące do wykrywania przeciwciał przeciw SARS-CoV-2.....	15
ANEKS	17
Piśmiennictwo.....	19

Wykaz skrótów

AOTMiT	Agencja Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji
COVID-19	ang. <i>Coronavirus Disease 2019</i>
ELISA	ang. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	ang. <i>European Medicines Agency</i> – Europejska Agencja Leków
FDA	ang. <i>Food and Drug Administration</i> – Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków
JRC	ang. <i>Joint Research Centre</i>
PIMS-TS	ang. <i>Paediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporarily associated with SARS-CoV-2 infection</i> – wieloukładowy zespół zapalny powiązany z COVID-19 u dzieci
POCT	ang. <i>point-of-care testing</i> – testowanie w miejscu opieki nad pacjentem
RNA	ang. <i>ribonucleic acid</i> – kwas rybonukleinowy
RT-LAMP	ang. <i>reverse transcription loop-mediated isothermal amplification</i>
RT-PCR	ang. <i>reverse transcription - polymerase chain reaction</i>
SARS-CoV-2	ang. <i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
WHO	ang. <i>World Health Organization</i> – Światowa Organizacja Zdrowia

Wstęp

25 kwietnia 2020 r. opublikowano pierwszą wersję Zaleceń w COVID-19¹, przygotowaną we współpracy z interdyscyplinarnym Zespołem Ekspertów Klinicznych (z: anestezjologii i intensywnej terapii, chorób zakaźnych, diagnostyki laboratoryjnej, epidemiologii, mikrobiologii, wirusologii, pulmonologii, radiologii, psychiatrii oraz medycyny ratunkowej), koordynowanym przez Komitet Sterujący, złożony z Prezydium Rady Przejrzystości Agencji Oceny Technologii Medycznych i Taryfikacji.

Wobec dynamicznie zmieniającej się sytuacji pandemii i ciągłego napływu nowych doniesień naukowych, dotyczących metod diagnostycznych SARS-CoV-2, Agencja przeprowadziła proces aktualizacji Zaleceń w obszarze diagnostyki laboratoryjnej SARS-CoV-2. Opracowania analityczne, przygotowane przez zespoły analityczne Agencji, stanowiły podstawę dyskusji Panelu Ekspertów Klinicznych i Komitetu Sterującego.

Zbiór zaktualizowanych zaleceń będzie podlegał aktualizacji, w zależności od napływających danych dotyczących narzędzi diagnostycznych SARS-CoV-2. Czytelników Zaleceń zapraszamy do dzielenia się z nami uwagami i sugestiami, korzystając z adresu mailowego wytiecznecovid19@aotm.gov.pl.

Komitet Sterujący

7 kwietnia 2021 r.

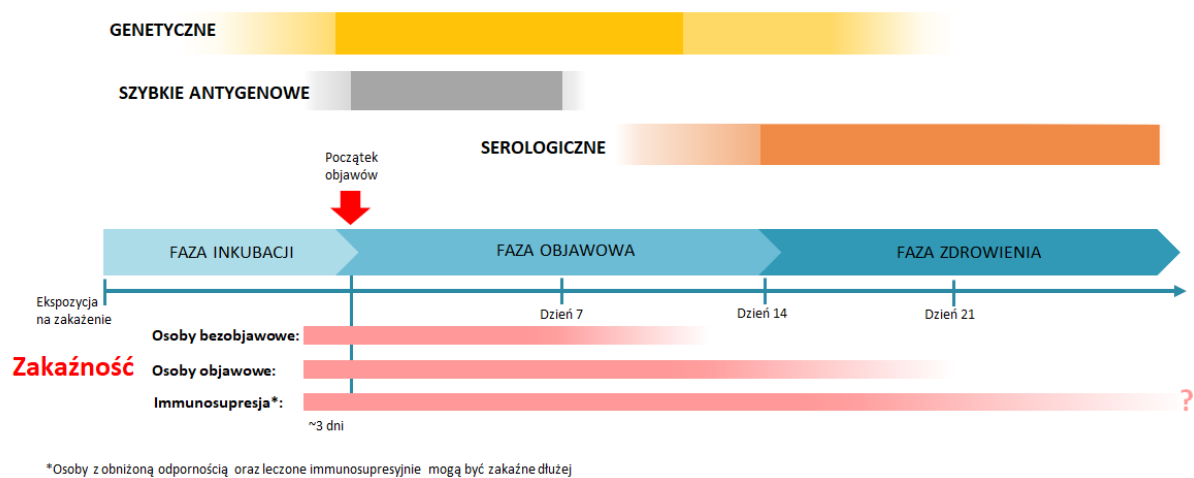
ZALECENIA – DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA

Poniżej zamieszczono diagram, obrazujący przydatność trzech rodzajów omówionych testów. Najważniejszy w wykryciu SARS-CoV-2 jest test genetyczny (RT-PCR), pozwalający wykryć RNA wirusa w wymazie z nosogardła.

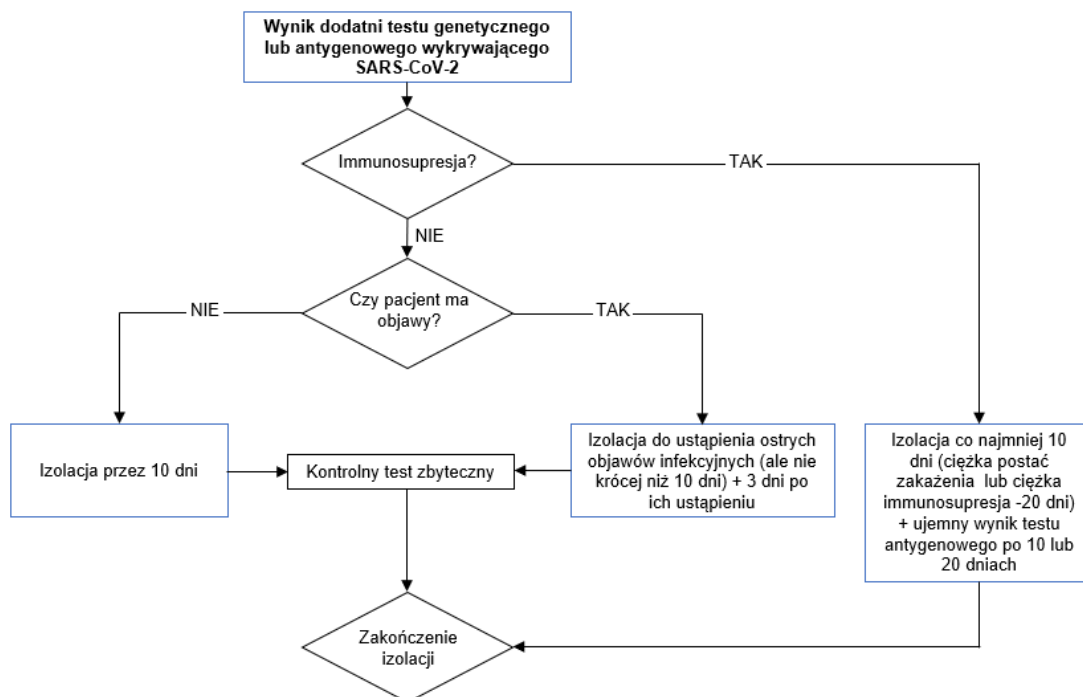
Test antygenowy wykrywa białko wirusa, jeżeli w pobranym materiale jest go wystarczająco dużo; jest szybszy i tańszy od testu genowego, jednak jest wiarygodny tylko u pacjentów objawowych. Jego przydatność w innych populacjach wymaga dalszych badań.

Trzeci rodzaj testów służy do wykrycia przeciwciał przeciwko SARS-CoV-2.

Należy podkreślić, że pozytywna i negatywna wartość prognostyczna testów zależna jest od rozpowszechnienia zakażeń w populacji badanej.



Rysunek 1. Zastosowanie testów diagnostycznych w zależności od fazy choroby (wg intensywności koloru)



Rysunek 2. Schemat postępowania po wykryciu wirusa SARS-CoV-2

1. Badania materiału genetycznego SARS-CoV-2

Diagnostyka molekularna (wykrywanie materiału genetycznego wirusa)

Zalecenia (Konsensus Ekspertów)	
1.1.	Podstawą rozpoznania zakażenia SARS-CoV-2 jest zastosowanie metod wykrywających materiał genetyczny wirusa (głównie RT-PCR).
1.2.	Testy RT-PCR powinny być wykonywane w laboratoriach wpisanych na "Listę laboratoriów COVID" Ministerstwa Zdrowia.

Uzasadnienie:

Zaletą testów genetycznych jest potwierdzenie zakażenia we wczesnej fazie, przed wystąpieniem objawów klinicznych, gdy test antygenowy jest ujemny.

Wadami są: czasochłonność i możliwość długotrwałego utrzymywania się wyników dodatnich, mimo ustąpienia objawów i zakaźności².

Zalecenia (Konsensus Ekspertów)	
1.3.	Szybkie testy genetyczne (RT-PCR lub izotermiczne RT-LAMP) mogą być stosowane przy łóżku chorego przez przeszkolony personel, jeżeli producent testu uwzględnił taką możliwość w procedurze rejestracji wyrobu medycznego do diagnostyki in vitro. Nadzór nad jakością tych badań pełni laboratorium wpisane na "Listę laboratoriów COVID" Ministerstwa Zdrowia.
1.4.	W przypadku ograniczonej dostępności do badań genetycznych, priorytetowo należy traktować próbki pobrane od pacjentów z niewydolnością oddechową lub pogorszeniem stanu klinicznego oraz w stanach nagłych.
1.5.	Priorytetowo należy również traktować diagnostykę szeroko pojętego personelu medycznego, pracującego z chorymi na COVID-19 i pacjentami mogącymi być nosicielami wirusa oraz manifestującego objawy COVID-19.

Uzasadnienie:

Szybkie testy genetyczne (czas otrzymania wyniku 15-45 minut) mogą stać się ważnym narzędziem diagnostycznym, zwłaszcza w pilnych przypadkach^{3,4}.

Czułość badania genetycznego zależy od fazy zakażenia (najwyższy ładunek wirusa w drogach oddechowych obserwuje się w 4-7 dobie od wystąpienia objawów), rodzaju i sposobu pobrania materiału oraz jego transportu.

Zalecenia (Konsensus Ekspertów)	
1.6.	Materiałami zalecanymi w diagnostyce są wymazy z nosogardła, gardła i nosa (pobierane jednocześnie), aspiraty tchawicze lub BAL. U pacjentów z kaszlem i wykrztuszaniem dobrym materiałem diagnostycznym może być także płwocina. Nie zaleca się jednak indukcji płwociny ze względu na narażenie personelu medycznego na powstający zakaźny aerozol. Należy stosować materiał zalecany i zatwierdzony dla konkretnego testu diagnostycznego.

Uzasadnienie:

Czułość badań molekularnych w poszczególnych rodzajach materiału przedstawia tabela poniżej:

Tabela 1. Czulość badañ molekularnych w zale¿noœci od rodzaju badanego materiału biologicznego

Rodzaj materiału	Czulość*
Wymaz z gardła i nosa pobierany równocześnie	97% ³
Wymaz z nosogardła	92,2% ⁴
Ślina [^] pobrana z gardła / ślina [^] z tylnej czœci jamy ustno-gardłowej	90,1% ⁵
Plwocina	87,5% ⁵
Wymaz z gardła [^]	84% ³
Ślina ^{**^}	83,9% ⁵
Wymaz z nosa	82% ³
Kał	46% ⁵
Łzy / wymaz ze spojówki	17,4% ⁵
Krew	7,3% ⁶
Mocz	0% ⁶

* Czulość metody RT-PCR z uwzględnieniem różnych materiałów badanych w porównaniu do wymazu z nosogardła (badania Lee 2020, Ibrahim 2021, Böger 2021) lub w porównaniu do wymazu z nosogardła / wymazu z gardła (ang. oropharyngeal swab) lub obu metod jednocześnie (badanie Moreira 2021);

[^] Ślina – materiał łatwy do pobrania ale trudniejszy do opracowania; & Wymaz z gardła (ang. oropharyngeal swab);** Ślina bez określenia sposobu pobrania

Uzasadnienie:

Procedury związane z indukcją plwociny do celów diagnostycznych są uznawane za generujące aerozol i powiązane ze zwiększonym ryzykiem przenoszenia koronawirusów⁵.

Interpretacja wyniku testu genetycznego

Metody te pozwalają na wykrycie szeregu genów SARS-CoV-2 – między innymi N, E, S, RdRP oraz ORF1ab⁶.

³ Lee R.A., Herigon J.C., Benedetti A., Pollock N.R., Denkinger C.M. Performance of Saliva, Oropharyngeal Swabs, and Nasal Swabs for SARS-CoV-2 Molecular Detection: A Systematic Review and Meta-analysis. MedRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.12.20230748>; this version posted November 13, 2020

⁴ Ibrahim N., Delaunay-Moisan A., Hill C., Le Teuff G., Rupprecht J.F., Thuret J.Y., Chaltie D., Potier M.C. Screening for SARS-CoV-2 by RT-PCR: saliva or nasopharyngeal swab? Systematic review and meta-analysis. MedRxiv preprint February 12, 2021; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.10.21251508>

⁵ Moreira V. M., Mascarenhas P., Machado V., Botelho J., Mendes J.J., Taveira N., Almeida M.G. Diagnosis of SARS-Cov-2 Infection by RT-PCR Using Specimens Other Than Naso- and Oropharyngeal Swabs: A Systematic Review and Meta-Analysis. Diagnostics 2021, 11, 363

⁶ Böger B., Fachi M.M., Vilhena R.O., Cobre A.F., Tonin F.S., Pontarolo R. Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. American Journal of Infection Control 49 (2021) 21–29

Zalecenia (Konsensus Ekspertów)	
1.7.	Wg WHO, w obszarach, gdzie dochodzi do zakażeń populacyjnych COVID-19 ⁷ , wykrycie obecności pojedynczego genu wirusa wystarcza do potwierdzenia zakażenia. W Polsce, zgodnie z obowiązującą definicją przypadku COVID-19 z dn. 31.10.2020 r. ⁸ , wykrycie pojedynczego genu wirusa pozwala na laboratoryjne potwierdzenie przypadku COVID-19. Jednak ze względu na ryzyko wyników fałszywie ujemnych, związanych z pojawieniem się nowych wariantów wirusa, WHO ⁹ rekomenduje stosowanie testów diagnostycznych wykrywających 2 lub więcej fragmentów genomu SARS-CoV-2. Z tego względu, w Polsce, zaleca się stosowanie testów co najmniej 2. genowych, a optymalnie wykrywających 3 lub więcej obszarów genomu SARS-CoV-2.
1.8.	Procedury diagnostyki genetycznej wymagają odpowiedniej walidacji/weryfikacji laboratoryjnej, a interpretację wyniku należy przeprowadzić na podstawie zaleceń producenta testu.
1.9.	Wynik dodatni świadczy o zakażeniu SARS-CoV-2; wynik nierozstrzygujący - nie wyklucza ani nie potwierdza zakażenia. W takim przypadku zalecane jest badanie kolejnej próbki, pobranej po upływie 24-48 godz.
1.10.	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 środków ochrony osobistej, z potwierdzonym przypadkiem COVID-19, niezależnie od rodzaju i natężenia prezentowanych objawów klinicznych.
1.11.	W przypadku pacjenta hospitalizowanego, u którego w pierwszorazowym badaniu genetycznym uzyskano wynik ujemny, badanie należy powtórzyć w następujących sytuacjach: <ul style="list-style-type: none"> a) gdy istnieje duże prawdopodobieństwo zakażenia, ocenione na podstawie wywiadu epidemiologicznego, obrazu klinicznego i wyniku badania obrazowego klatki piersiowej - kolejne badanie zlecić w 24-48 godz. po pobraniu pierwszej próbki, b) gdy stwierdzone jest nasilenie objawów ze strony układu oddechowego - kolejne badanie zlecić w 24-48 godz. po pobraniu pierwszej próbki, c) gdy pacjent wymaga intubacji i jest możliwość pobrania materiału z dolnych dróg oddechowych.
1.12.	Badanie zawsze należy powtórzyć w przypadku, gdy zostało wykonane nieprawidłowo (np. niewłaściwie pobrany lub przechowywany materiał) - kolejne badanie należy zlecić niezwłocznie.

Uzasadnienie:

Treść zaleceń ustalona na podstawie konsensusu eksperckiego oraz literatury^{7,8,9}.

Monitorowanie wirusologiczne u osób z potwierdzonym zakażeniem

Zalecenia (Konsensus Ekspertów)	
1.13.	U osób z potwierdzonym zakażeniem SARS-CoV-2 nie zaleca się wykonywania kontrolnych badań genetycznych w celu udokumentowania eradykacji wirusa.

Uzasadnienie:

Wyniki wielu badań wskazują, że RNA SARS-CoV-2 może być wykrywany w materiałach klinicznych przez długi czas, mimo ustąpienia objawów choroby i zakaźności.

⁷ [https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(2019-ncov\)](https://www.who.int/publications-detail/global-surveillance-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(2019-ncov))

⁸ <https://www.gov.pl/web/gis/definicja-przypadku-covid19-na-potrzeby-nadzoru-epidemiologicznego-nad-zakazeniami-wirusem-sars-cov-2-definicja-z-dnia-31102020->

⁹ Genomic sequencing of SARS-CoV-2: a guide to implementation for maximum impact on public health. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1326052/retrieve>

Monitorowanie wirusologiczne u pracowników ochrony zdrowia po ryzykownym kontakcie z osobą zakażoną SARS-CoV-2

Zalecenia (Konsensus Ekspertów)
1.14. Przez kontakt ryzykowny rozumie się bezpośredni kontakt z zakażonym, w czasie którego pracownik nie był zabezpieczony w odpowiednie środki ochrony osobistej.
1.15. Nieszczepiony pracownik ochrony zdrowia, który miał wyżej opisany kontakt ryzykowny podlega kwarantannie. U pracownika ochrony zdrowia, u którego nie występują żadne objawy kliniczne, dopuszcza się wykonanie badania genetycznego po min. 7 dniach od kontaktu i jeśli wynik jest ujemny, można rozważyć przywrócenie do pracy. Uzyskanie ujemnego wyniku nie wyklucza konieczności dalszej obserwacji klinicznej.
1.16. Zaszczepiony pracownik ochrony zdrowia, który miał kontakt ryzykowny nie podlega kwarantannie. Tym niemniej, ze względu na fakt, że szczepienie nie zabezpiecza w pełni przed zakażeniem, zaleca się wykonanie kontrolnego badania genetycznego po min. 7 dniach od kontaktu, jeśli nie występują objawy zakażenia oraz w każdym przypadku pojawienia się objawów klinicznych.

Uzasadnienie:

Zalecenie sformułowane na podstawie konsensusu eksperckiego, wynikającego z bieżącej sytuacji epidemiologicznej.

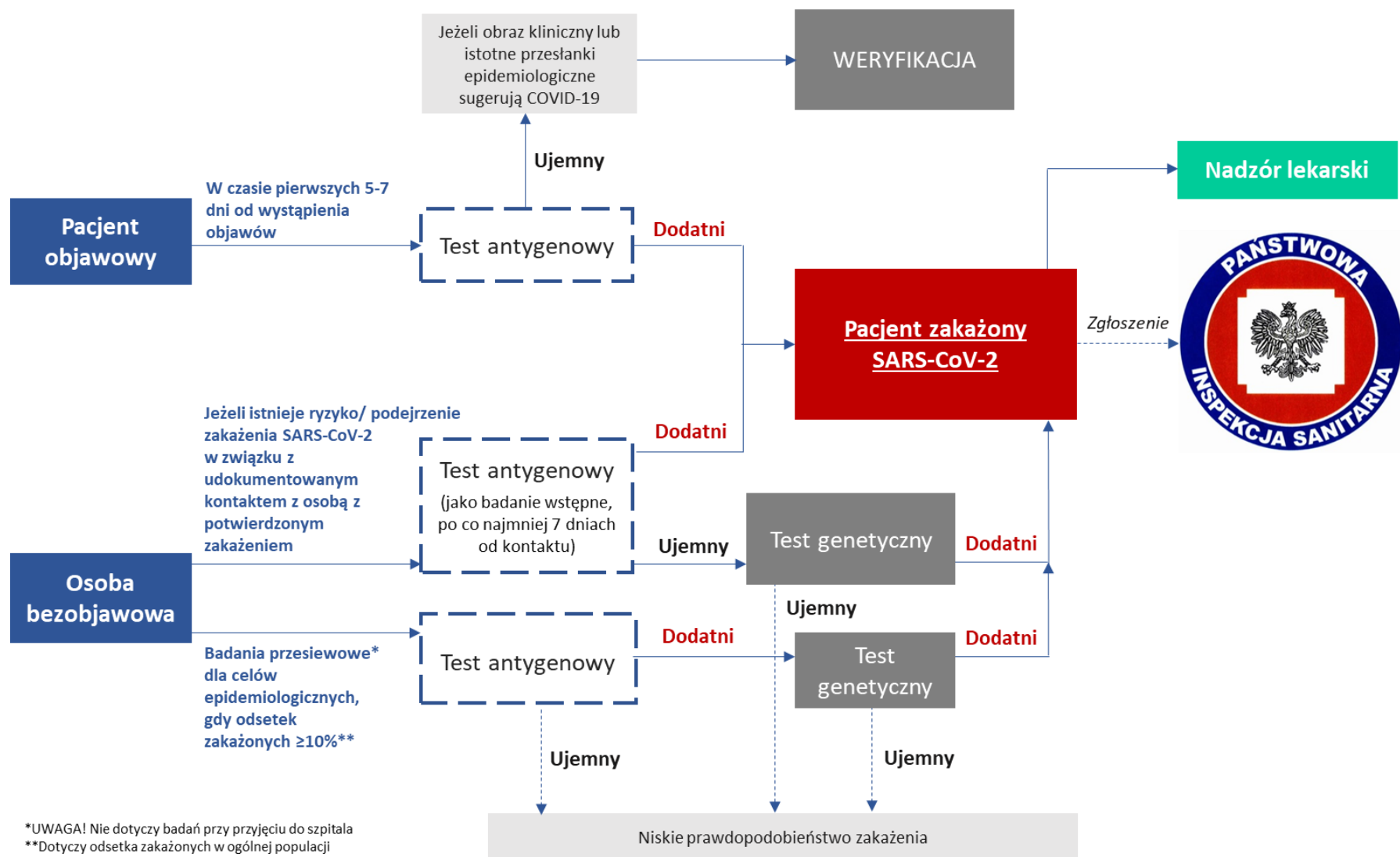
2. Badania antygenowe służące do wykrywania białek SARS-CoV-2

Dostępne obecnie testy, służące do wykrywania białkowych antygenów SARS-CoV-2 w materiale z dróg oddechowych są to: jakościowe testy immunochromatograficzne (testy kasetkowe), inaczej nazywane szybkimi testami antygenowymi oraz ilościowe i ilościowe immunochemiczne testy diagnostyczne. Te ostatnie mają wysoką czułość i swoistość diagnostyczną (technika ELISA w wersji klasycznej lub zmodyfikowanej oraz techniki chemiluminescencyjne dedykowane automatycznym analizatorom). Zaletą szybkich testów antygenowych jest krótki czas trwania badania, natomiast ich wady to niższa czułość i możliwość uzyskania wyniku ujemnego u osoby zakażonej SARS-CoV-2.

Zalecenia (Konsensus Ekspertów)
2.1. Szybkie testy antygenowe mogą być wykorzystywane do diagnostyki zakażeń SARS-CoV-2 u pacjentów objawowych w czasie pierwszych 5-7 dni od wystąpienia objawów. Osoby objawowe z dodatnim wynikiem testu wykrywającego antygen SARS-CoV-2 należy traktować jako zakażone, natomiast ujemny wynik tego testu wymaga weryfikacji, jeżeli obraz kliniczny lub istotne przesłanki epidemiologiczne sugerują COVID-19, ponieważ ujemny wynik testu antygenowego nie wyklucza zakażenia. Weryfikacji można dokonać testem genetycznym tego samego dnia lub powtórzonym w kolejnych dniach testem antygenowym.
2.2. U osób bezobjawowych, u których istnieje ryzyko/podejrzenie zakażenia SARS-CoV-2 w związku z udokumentowanym kontaktem z osobą z potwierdzonym zakażeniem SARS-CoV-2 (zwłaszcza w ogniskach zakażeń), wstępne badanie można przeprowadzić testem antygenowym i osoby z wynikiem dodatnim traktować jako zakażone, natomiast u osób z wynikiem ujemnym należy wykonać test genetyczny.
2.3. Szybkie testy antygenowe mogą być stosowane bezpośrednio w miejscu opieki nad pacjentem (POCT), jeżeli producent testu uwzględnił taką możliwość w procedurze rejestracyjnej wyrobu medycznego do diagnostyki in vitro.

2.4. Nie zaleca się stosowania szybkich testów antygenowych w badaniach przesiewowych (np. w analizie rozpowszechnienia wirusa w populacji ogólnej) oraz przed udzielaniem świadczenia medycznego.

2.5. Gdy odsetek wyników dodatnich badań w kierunku SARS-CoV-2 wynosi 10% lub więcej w danej populacji to dopuszcza się badanie testem antygenowym osób bezobjawowych bez wskazań epidemiologicznych (badania przesiewowe). Pierwszy dodatni wynik testu antygenowego u osoby bezobjawowej powinien być zweryfikowany testem genetycznym.



Rysunek 3. Algorytm diagnostyki zakażenia SARS-CoV-2 z użyciem testu antygenowego

Uzasadnienie:

Dopuszczone do użytku przez FDA i/lub EMA testy antygenowe, wykrywające antygeny SARS-CoV-2 w materiale z dróg oddechowych, charakteryzują się niższą czułością (zwłaszcza w przypadku zakażeń przebiegających bezobjawowo) w porównaniu do testów genetycznych, ale wysoką swoistością. Testy te dają wyniki dodatnie w okresie, gdy ilość wirusa w drogach oddechowych jest największa, czyli od 1-3 dni przed wystąpieniem objawów do 5-7 dni po wystąpieniu objawów. U pacjentów, u których choroba trwa powyżej 5-7 dni, większe jest ryzyko uzyskania wyników fałszywie ujemnych.

Zaleca się stosowanie testów antygenowych o czułości diagnostycznej co najmniej 90% i swoistości diagnostycznej co najmniej 97%, w odniesieniu do danych walidacyjnych deklarowanych przez producenta w procesie rejestracji wyrobu medycznego do diagnostyki *in vitro*¹⁰ oraz popartych walidacją niezależną (konsensus ekspercki). Ujemny lub wątpliwy wynik testu nie wyklucza zakażenia i wymaga weryfikacji, jeżeli obraz kliniczny lub istotne przesłanki epidemiologiczne sugerują COVID-19.

Na podstawie dokumentu Komisji Europejskiej z dnia 17 lutego 2021 roku (częściowa aktualizacja dokumentu 19 marca)¹¹, nawiązującego do zaleceń Rady Europejskiej z dnia 21 stycznia 2021 roku w sprawie wspólnych ram stosowania i walidacji szybkich testów antygenowych oraz wzajemnego uznawania wyników testów w kierunku COVID-19 w UE¹², zainicjowano stworzenie wspólnego wykazu szybkich testów antygenowych do diagnostyki COVID-19, w oparciu o dane walidacyjne przekazywane przez państwa członkowskie. Umieszczone na wykazie testy antygenowe powinny spełniać określone wymagania, t.j.:

1) oznakowanie CE,

2) czułość ≥ 90 % oraz swoistość ≥ 97 %,

3) zatwierdzenie do stosowania w przypadku COVID-19 przez co najmniej 1 państwo członkowskie, które podało szczegółowe informacje na temat metodyki i wyników badań walidacyjnych, takie jak: rodzaj próbki, warunki, w których oceniono stosowanie testu oraz ewentualne trudności w odniesieniu do wymaganych kryteriów czułości lub innych czynników).

Zgodnie z treścią dokumentu, zebrane dane walidacyjne poddawane będą aktualizacji i udostępniane na platformie JRC (ang. *Joint Research Centre*)¹³.

¹⁰ Stanowisko Zespołu do spraw koordynacji sieci laboratoriów COVID w sprawie możliwości wykorzystania testów wykrywających antygen SARS-CoV-2 w diagnostyce COVID-19 w Polsce z dnia 03.11.2020 [<https://www.gov.pl/attachment/baa5cd38-63e9-474b-bd8d-6266d52ae9a5>]

¹¹ EU health preparedness: A common list of COVID-19 rapid antigen tests, including those of which their test results are mutually recognised, and a common standardised set of data to be included in COVID-19 test result certificates [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/preparedness_response/docs/covid-19_rat_common-list_en.pdf]

¹² Council Recommendation on a common framework for the use and validation of rapid antigen tests and the mutual recognition of COVID-19 test results in the EU [<https://data.consilium.europa.eu/doc/document/ST-5451-2021-INIT/en/pdf>]

¹³ Dokument KE z wykazem testów (ANNEX I): https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/preparedness_response/docs/covid-19_rat_common-list_en.pdf

Platforma JRC: <https://covid-19-diagnostics.jrc.ec.europa.eu/devices>

3. Badania serologiczne służące do wykrywania przeciwciał przeciw SARS-CoV-2

Zalecenia (Konsensus Ekspertów)	
3.1.	Materiałem do badań serologicznych jest surowica lub osocze krwi, pobranej zgodnie z obowiązującymi zaleceniami. ¹⁰ W przypadku osocza, rodzaj zastosowanego antykoagulantu uwarunkowany jest zaleceniami producenta zestawu odczynników, który zostanie wykorzystany do oznaczania stężenia/miana przeciwciał anty-SARS-CoV-2. <ul style="list-style-type: none">• Materiał do badań serologicznych można przechowywać w temperaturze 2-8°C (≤5 dni) lub ≤ -70°C (>5 dni). Praktyka laboratoryjna wskazuje, że temperatura -20°C jest wystarczająca.
3.2.	Wskazaniami do badań serologicznych są: ocena stężenia / miana przeciwciał u ozdowieńców oddających osocze do celów terapeutycznych (przeciwciała klasy IgG specyficzne względem białka S wirusa SARS-CoV-2), ocena odpowiedzi immunologicznej na szczepienie u osób z niedoborami odporności lub podczas leczenia immunosupresyjnego (przeciwciała klasy IgG specyficzne względem białka S SARS-CoV-2), prowadzenie dochodzeń epidemiologicznych i diagnostyki retrospektywnej zakażeń SARS-CoV-2 (w celu oszacowania liczby / odsetka osób, które miały kontakt z wirusem), a także badania populacyjne.
3.3.	Dodatni wynik testu serologicznego może wskazywać na szczepienie lub kontakt z koronawirusem i nie może być wykorzystywany do rozpoznania aktualnego zakażenia SARS-CoV-2 lub wnioskowania o zakaźności.
3.4.	Badania serologiczne tzw. surowic parzystych – tj. pobranych od tego samego pacjenta w odstępie co najmniej 2 tygodni mogą służyć do wykrycia serokonwersji* lub wzrostu miana przeciwciał, szczególnie u pacjentów z objawami COVID-19, u których nie wykryto obecności materiału genetycznego/antygenowego SARS-CoV-2. Serokonwersja lub zwiększenie miana przeciwciał może służyć do retrospektywnego potwierdzenia etiologii i podejmowania decyzji terapeutycznych, np. w śródmiąższowym zapaleniu płuc lub burzy cytokinowej oraz do oceny immunizacji po ekspozycji na zakażenie.
3.5.	Badania serologiczne do wykrywania przeciwciał anty-SARS-CoV-2 klasy IgG ± IgM** mogą służyć do potwierdzenia laboratoryjnego COVID-19 u pacjentów z objawami utrzymującymi się powyżej 8-14 dni, w przypadku uzyskania ujemnego wyniku w badaniu genetycznym.
3.6.	Badania serologiczne do wykrywania przeciwciał anty-SARS-CoV-2 klasy IgM i IgG są jedną z podstawowych metod w diagnostyce wieloukładowego zespołu zapalnego powiązanego z COVID-19 u dzieci (ang. <i>Paediatric Inflammatory Multisystem Syndrome Temporarily associated with SARS-CoV-2 infection</i> , PIMS-TS;), szczególnie u pacjentów z ujemnym wynikiem testu genetycznego w kierunku SARS-CoV-2 z wymazu z nosogardła.

* Pojawienie się przeciwciał

** Przeciwciała klasy IgM i IgG anty SARS-CoV-2 pojawiają się prawie równocześnie. W przypadku otrzymania wyniku dodatniego wyłącznie dla przeciwciał klasy IgM, należy wykluczyć wczesną fazę zakażenia przez wykonanie badania metodą RT-PCR w kierunku SARS-CoV-2 z wymazu z nosogardła.

Uzasadnienie:

Badania serologiczne wykonywane są w celu: oceny stężenia/miana przeciwciał u ozdowieńców oddających osocze do celów terapeutycznych, oceny odpowiedzi immunologicznej u ozdowieńców, oceny odpowiedzi na szczepienie oraz w dochodzeniach epidemiologicznych, diagnostyce retrospektywnej i badaniach populacyjnych. Badania te są również przydatne do podejmowania decyzji o sposobie zastosowanego leczenia w zależności od fazy infekcji. Przykładowo, w fazie replikacji wirusa przeciwciała IgG są niewykrywalne, pojawiają się w późnych stadiach choroby np. burzy cytokinowej.

Diagnostyka serologiczna pozwala na wykrycie obecności swoistych przeciwciał i może mieć znaczenie w szczególności u osób, u których infekcja przebiegała bezobjawowo lub z łagodnymi objawami^{11,12}.

Testy serologiczne powinny być traktowane jako uzupełnienie metod molekularnych¹³ albo do oceny odpowiedzi immunologicznej osób, które miały kontakt z osobą zakażoną SARS-CoV-2 lub po szczepieniu. Określenie optymalnego czasu wykonywania testów serologicznych jest związane ze zjawiskiem tzw. „**okienka serologicznego**” (w przypadku COVID-19: **7-14 dni**)¹⁴. Ujemne wyniki badań serologicznych nie wykluczają zakażenia SARS-CoV-2, gdyż przeciwciała mogą pojawiać się późno. W okresie do 10 dni od wystąpienia objawów przeciwciała wykrywano tylko u 50-66% badanych^{15,16}.

Uzyskane wyniki mogą być fałszywie negatywne (brak serokonwersji) lub fałszywie pozytywne (reakcja krzyżowa innych przeciwciał z antygenem SARS-CoV-2). Wyniki fałszywie dodatnie mogą być spowodowane m.in. przebytą lub trwającą infekcją koronawirusami innymi niż SARS-CoV-2, takimi jak koronawirus HKU1, NL63, OC43 lub 229E lub innymi wirusami, albo obecnością autoprzeciwciał i czynnika reumatoidalnego oraz przeciwciał poszczepiennych (grypa). W celu potwierdzenia lub wykluczenia aktualnego zakażenia SARS-CoV-2, należy wykonać badanie techniką molekularną¹⁷.

Zalecenia (Konsensus Ekspertów)	
3.7.	Nie zaleca się stosowania jakościowych, tzw. szybkich testów kasetkowych (immunochemicznych), wykrywających przeciwciała anty-SARS-CoV-2.
3.8.	Do oznaczania stężenia/miana przeciwciał anty-SARS-CoV-2 zaleca się odpowiednio zwalidowane wg. standardu WHO immunochemiczne testy o wysokiej czułości i swoistości diagnostycznej (technika ELISA w wersji klasycznej lub zmodyfikowanej, dedykowanej automatycznym analizatorom albo techniki chemiluminescencyjne), wykrywające swoiste przeciwciała anty-SARS-CoV-2 z wykorzystaniem automatycznego systemu detekcji (ponieważ ocena wyłącznie wizualna jest mało obiektywna).
3.9.	Wskazane jest, aby w przypadku oznaczania przeciwciał u osób szczepionych przeciw COVID-19 oraz ozdowieńców oddających osocze do celów terapeutycznych, używać testów wykrywających przeciwciała przeciwko białku S SARS-CoV-2.

Uzasadnienie:

Brak jest pełnych danych, oceniających przydatność kliniczną testów do wykrywania przeciwciał anty-SARS-CoV-2 klasy IgA.

Szybkie testy immunochemiczne (tzw. jakościowe testy kasetkowe), wykrywające obecność przeciwciał anty-SARS-CoV-2, mają ograniczoną przydatność ze względu na niską czułość i swoistość diagnostyczną oraz wysokie ryzyko uzyskania wyniku fałszywie ujemnego oraz fałszywie dodatniego, dlatego też nie zaleca się stosowania ich w diagnostyce COVID-19. Oznaczanie stężenia/miana przeciwciał anty-SARS-CoV-2 przeprowadza się za pomocą odpowiednio zwalidowanych i wystandaryzowanych testów immunochemicznych o wysokiej czułości i swoistości diagnostycznej (technika ELISA w wersji klasycznej¹⁴ oraz modyfikacje tej metody, dedykowane automatycznym analizatorom lub techniki chemiluminescencyjne), wykrywające swoiste przeciwciała anty-SARS-CoV-2 z wykorzystaniem automatycznego systemu detekcji (ponieważ ocena wyłącznie wizualna jest mało obiektywna). Konstatacja przeciwciał u ozdowieńców i osób szczepionych jest różna (u ozdowieńców występują przeciwciała przeciwko białkom S i N wirusa, natomiast u osób szczepionych aktualnie dostępnymi szczepionkami występują tylko przeciwciała anty S). Dlatego w przypadku oznaczania przeciwciał u osób szczepionych przeciw COVID-19 oraz ozdowieńców oddających osocze do celów terapeutycznych należy używać testów wykrywających przeciwciała przeciwko białku S SARS-CoV-2.

¹⁴ Raportowane w badaniach wartości czułości i specyficzności dla testów oznaczeń stężenia/mian przeciwciał różnią się w zależności od ocenianych przeciwciał. W badaniu Xiang 2020 wartości czułości i specyficzności testów opartych na metodzie Elisa wykrywających przeciwciała u pacjentów z potwierdzonym zachorowaniem COVID-19 wynosiły dla przeciwciał IgM odpowiednio 77,3% i 100%; dla przeciwciał IgG - 83,3% i 95,0%. U pacjentów z potwierdzonym COVID-19 wartości czułości i specyficzności dla przeciwciał IgM wynosiły odpowiednio 87,5% i 100% oraz dla przeciwciał IgG - 70,8% i 96,6%. Xiang F, Wang X, et al Antibody Detection and Dynamic Characteristics in Patients with COVID-19. Clin Infect Dis. 2020 Apr 19. pii: ciaa461. doi: 10.1093/cid/ciaa461.

ANEKS

Załącznik 1. Zgłoszony przez Ekspertów rzeczywisty lub potencjalny konflikt interesów

Zgłoszony rzeczywisty lub potencjalny konflikt interesów przedstawiono poniżej:

Imię i nazwisko (numery pytań, w których deklarowano potencjalny konflikt interesów); „-” oznacza brak zadeklarowanego konfliktu interesów w ramach któregośkolwiek z pytań

prof. dr hab. n. med. Rafał Niżankowski (-), prof. dr hab. n. med. Michał Myśliwiec (-), prof. dr hab. n. med. Piotr Szymański (9), prof. dr hab. Agnieszka Dobrzyń (-), prof. dr hab. n. med. Katarzyna Dzierzanowska-Fangrat (1), dr hab. Rafał Gierczyński, prof. NIZP-PZH (1,2), dr hab. n. med. Jerzy Jaroszewicz (1,2), prof. dr hab. n. med. Rafał Krenke (10), dr hab. Anna Mertas, prof. SUM (-), prof. dr hab. n. med. Miłosz Parczewski (1,2), dr hab. n. med. Edyta Podsiadły (-), prof. dr hab. Krzysztof Pyrc (-), prof. dr hab. med. Maciej Szmitkowski (1,2)

Załącznik 2. Deklaracja konfliktu interesów (DKI) – formularz

DEKLARACJA UJAWNIEŃ KONFLIKTU INTERESÓW¹⁵

Dotyczy aktywności realizowanej w ramach zespołu ekspertów powołanego do realizacji zlecenia Ministra Zdrowia dotyczącego przygotowania, w oparciu o dostępne dowody naukowe i istniejące wytyczne, propozycji wszechstronnego, wielospecjalistycznego zestawu kluczowych zaleceń odnoszących się do organizacji i postępowania medycznego (diagnostyki i leczenia) w zakresie opieki nad pacjentami z zakażeniem wirusem SARS-CoV-19.

NAZWISKO I IMIĘ:

NAZWA PANELU/I:

Poniższe pytania mają na celu umożliwienie członkom grupy oceniającej wytyczne ujawnienie wszelkich rzeczywistych lub potencjalnych konfliktów interesów w odniesieniu do ich działań w zakresie opracowywania wytycznych. Konflikt interesów obejmuje również udział oceniających w opracowywaniu lub zatwierdzaniu którychkolwiek z wytycznych źródłowych podlegających przeglądowi w ramach opracowywanej, nowej adaptacji. Może on również obejmować związki z firmami farmaceutycznymi lub innymi korporacjami, których produkty lub usługi są powiązane z zakresem wytycznych. Interesy finansowe lub związki wymagające ujawnienia obejmują honoraria, usługi konsultingowe, zatrudnienie lub posiadanie akcji, ale nie są do tego ograniczone.

Celem deklaracji jest zidentyfikowanie przez uczestników oceny wytycznych wszelkich możliwych konfliktów interesów związanymi z jakimikolwiek rozpatrywanymi wytycznymi, aby członkowie grupy oceniającej mogli sformułować własny osąd, jednocześnie biorąc pod uwagę konflikt interesów innych członków grupy.

Ujawnienie istniejącego lub potencjalnego konfliktu interesów nie wyklucza osoby z udziału w pracach nad wytycznymi, ale musi być znane wszystkim uczestnikom i osobom korzystającym z Wytycznych.

Proszę odpowiedzieć na każde z poniższych pytań, zakreślając „NIE” albo „TAK”. W przypadku udzielenia odpowiedzi „TAK” na którekolwiek pytanie, proszę opisać charakter interesu lub związku oraz określić powiązany podmiot komercyjny.

1. UDZIAŁ W OPACOWYWANIU WYTTCZYNYCH

Czy był Pan zaangażowany / była Pani zaangażowana w opracowywanie którychkolwiek z rozpatrywanych wytycznych (np. jako członek komitetu opracowującego wytyczne)?

NIE TAK

Jeśli TAK, proszę podać wytyczne i opisać swoje zaangażowanie:

Tytuł wytycznych: _____

2. ZATWIERDZENIE WYTTCZYNYCH

Czy uczestniczył Pan / uczestniczyła Pani bezpośrednio w jakichkolwiek procesach celem formalnego zatwierdzenia którychkolwiek z rozpatrywanych wytycznych?

NIE TAK

Jeśli TAK, proszę podać wytyczne i opisać swoje zaangażowanie:

Tytuł wytycznych: _____

¹⁵ na podstawie: *The ADAPTE Collaboration (2009). The ADAPTE Process: Resource Toolkit for Guideline Adaptation. Version 2.0. Dostępne pod adresem: <http://www.g-i-n.net>. - zmodyfikowane*

3. ZATRUDNIENIE

Czy jest Pan lub był zatrudniony / jest lub była Pani zatrudniona przez autora wytycznych lub podmiot mający interes komercyjny w którychkolwiek z rozpatrywanych wytycznych?

NIE TAK

Jeśli TAK, proszę opisać:

4. DORADZTWO

Czy pracował Pan / pracowała Pani jako konsultant dla dowolnego autora wytycznych lub podmiotu, który ma komercyjny interes w którejkolwiek z rozpatrywanych wytycznych?

NIE TAK

Jeśli TAK, proszę opisać:

5. INTERESY DOTYCZĄCE WŁASNOŚCI – CZĘŚĆ A

Czy posiada Pan/Pani jakiekolwiek udziały (w tym opcje na akcje) w jakiejkolwiek jednostce, której akcje nie są przedmiotem publicznego obrotu, która ma komercyjny interes w którejkolwiek z rozpatrywanych wytycznych?

NIE TAK

Jeśli TAK, proszę opisać:

6. INTERESY DOTYCZĄCE WŁASNOŚCI – CZĘŚĆ B

Czy posiada Pan/Pani jakiekolwiek udziały (w tym opcje na akcje, ale z wykluczeniem inwestycji pośrednich (portfelowych) z wykorzystaniem funduszy inwestycyjnych itp.) o wartości 1500 USD lub wyższej w jakimkolwiek podmiocie, który ma interes komercyjny w którejkolwiek z rozpatrywanych wytycznych?

NIE TAK

Jeśli TAK, proszę opisać:

7. FINANSOWANIE BADAŃ

Czy obecnie otrzymuje lub otrzymywał Pan / otrzymuje lub otrzymywała Pani fundusze na badania od dowolnego podmiotu, który ma interes komercyjny w którejkolwiek z rozpatrywanych wytycznych?

NIE TAK

Jeśli TAK, proszę opisać:

8. HONORARIA

Czy otrzymał Pan / otrzymała Pani honoraria lub prezenty o wartości równej lub wyższej niż 3500 USD rocznie lub 7500 USD w ciągu ostatnich trzech lat od autora wytycznych lub podmiotu mającego komercyjny interes w którejkolwiek z rozpatrywanych wytycznych lub od twórców którejkolwiek z rozpatrywanych wytycznych?

NIE TAK

Jeśli TAK, proszę opisać:

9. INNE POTENCJALNE KONFLIKTY INTERESÓW

10. POTENCJALNE KONFLIKTY INTERESÓW OSÓB BLISKICH (MAŁŻONKA, ZSTĘPNYCH I WSTĘPNYCH W LINII PROSTEJ ORAZ OSÓB, Z KTÓRYMI PAN/PANI POZOSTAJE WE WSPÓLNYM POŻYCIU)

PODPIS

DATA

Piśmiennictwo

1. 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 kwietnia 2020 r.), AOTMiT
2. CDC (2020). Fact sheet for healthcare providers. CDC-2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel. Updated: 13.03.2020. Pozyskano z: <https://www.fda.gov/media/134922/download>, dostęp z 09.04.2020
3. Rapid communication on the role of the GeneXpert® platform for rapid molecular testing for SARS-CoV-2 in the WHO European Region. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
4. European Centre for Disease Prevention and Control. An overview of the rapid test situation for COVID-19 diagnosis in the EU/EEA. 1 April 2020. Stockholm: ECDC; 2020
5. Tran K, Cimon K, Severn M, Pessoa-Silva CL, Conly J. Aerosol generating procedures and risk of transmission of acute respiratory infections to healthcare workers: a systematic review. *PLoS One*. 2012;7(4):e35797-e.
6. Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance. World Health Organization, 19 March 2020. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331329>
7. PZH-NIZP: Wymagania dotyczące pobrania i transportu materiału do badań metodą RT-PCR w kierunku zakażeń układu oddechowego powodowanych przez koronawirusy (SARS; MERS; SARS-CoV-2 – COVID-19).
8. CDC Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)
9. WHO: Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases Interim guidance 19 March 2020
10. EFLM – COLABIOCLI (2020). Wspólne zalecenia EFLM-COLABIOCLI dotyczące pobierania krwi żyłnej. *Diagn.Lab.* 2018; 54(4): 291-312
11. Guo, L., Ren, L., Yang, S., Xiao, M., Chang, D., Yang, F., ... & Zhang, L. (2020). Profiling Early Humoral Response to Diagnose Novel Coronavirus Disease (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases*
12. Li, Z., Yi, Y., Luo, X., Xiong, N., Liu, Y., Li, S., ... & Zhang, Y. (2020). Development and Clinical Application of A Rapid IgM-IgG Combined Antibody Test for SARS-CoV-2 Infection Diagnosis. *Journal of medical virology*.
13. Flisiak, R. et al. (2020). Zalecenia postępowania w zakażeniach SARS-CoV-2 Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych. Wersja 31-03-2020
14. WHO (2020). Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases Interim guidance. 19.03.2020
15. Liu, W., Liu, L., Kou, G., Zheng, Y., Ding, Y., Ni, W., ... & Xiong, Z. (2020). Evaluation of Nucleocapsid and Spike Protein-based ELISAs for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*.
16. Zhao, J., Yuan, Q., Wang, H., Liu, W., Liao, X., Su, Y., ... & Qian, S. (2020). Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019.
17. Flisiak, R. et al. (2020). Zalecenia postępowania w zakażeniach SARS-CoV-2 Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych. Wersja 31-03-2020