

Metody diagnostyki laboratoryjnej COVID-19

Agata Bielawska-Drózd^{1*}, Aleksander Michalski², Piotr Cieślik³,
Przemysław Makowski¹, Janusz Kocik⁴

¹ Wojskowy Ośrodek Medycyny Prewencyjnej w Modlinie, Modlin, Polska

² Centrum Reagowania Epidemiologicznego Sił Zbrojnych Rzeczypospolitej Polskiej, Polska

³ BioMerieux Polska Sp. z o.o., Warszawa, Polska

⁴ Szkoła Zdrowia Publicznego Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, Polska

SŁOWA KLUCZOWE:

- COVID-19
- SARS-CoV-2
- diagnostyka laboratoryjna
- *real-time* RT-PCR
- badania serologiczne
- ryzyko zawodowe

STRESZCZENIE

Począwszy od 2003 r. w międzynarodowej literaturze pojawiały się liczne publikacje dotyczące identyfikacji wirusa SARS-CoV. Metaanaliza wyników badań wykazała efektywność stosowania metody *real-time* RT-PCR do wykrywania koronawirusów. Poza metodami diagnostycznymi autorzy opisują ryzyko ekspozycji laboratoryjnej związane z czynnościami laboratoryjnymi z wirusem SARS-CoV-2. Nowy wirus stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia personelu medycznego, w kontakcie z chorymi, jak również dla diagnostów laboratoryjnych. W pracach diagnostycznych COVID-19 zidentyfikowano obszary ryzyka biologicznego. Celem niniejszej publikacji jest przedstawienie algorytmu identyfikacji SARS-CoV-2 wśród innych koronawirusów przy użyciu testów molekularnych i serologicznych. Zaproponowano algorytm diagnostyczny z użyciem różnych testów molekularnych i serologicznych zwiększający szansę wykrycia koronawirusa SARS-CoV-2 w różnych grupach chorych: u chorych bez i z objawami klinicznymi, objętych nadzorem epidemiologicznym, kwarantanną i izolacją. Zaproponowane testy serologiczne mogą być również przydatne na potrzeby prowadzenia dochodzeń epidemiologicznych oraz do badań retrospektywnych pandemii COVID-19.

KEYWORDS:

- COVID-19
- SARS-CoV-2
- laboratory diagnostics
- *real-time* RT-PCR
- serological studies
- occupational risk

ABSTRACT

Numerous publications pertaining identification of SARS-CoV virus appeared from 2003. A metaanalysis of the studies has shown an effectiveness of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (*real-time* RT-PCR) in Coronavirus genus detection. Despite description of laboratory diagnostic methods of SARS-CoV-2, the authors describe the exposure risk for medical staff, laboratory personnel and paramedics to a new virus which constitute a high public threat. There are several risk points in the chain of lab activities which have been identified during handling with COVID-19 suspected samples. The aim of this publication is to provide a proposal for identification of SARS-Co-2 virus using molecular and serological methods. The diagnostic algorithm is proposed with the use of the combination of above mentioned tests giving the chance to increase detection of SARS-CoV-2 in asymptomatic and symptomatic patients, under surveillance, quarantine and isolation. Proposed serological studies may be useful in epidemiological investigations and future retrospective studies on COVID-19 pandemic.

Według raportu WHO (World Health Organization, Światowa Organizacja Zdrowia) w grudniu 2019 r. w największej prowincji Chin – Wuhan (z populacją >14 mln mieszkańców) u pacjenta z ostrą niewydolnością oddechową zidentyfikowano nowego koronawirusa (2019-nCoV) (1). W krótkim czasie zakażenia odnotowano we wszystkich regionach świata. Nowy koronawirus jest przedstawicielem wirusów osłonkowych RNA i wykazuje podobieństwo genetyczne (75-80%) do wirusów występujących u nietoperzy – *Sarbecovirus*, tym samym należy do grupy wirusów SARS-CoV (*Severe Acute Respiratory Syndrome – Coronavirus*), powodując podobne objawy ze strony dróg oddechowych (2). Systematyka nowego wirusa zaproponowana została przez Międzynarodowy Komitet ds. Taksonomii Wirusów (ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*, [www.https://talk.ictvonline.org/](https://talk.ictvonline.org/)) i przedstawia się następująco:

Klasa: *Coronaviruses*; Królestwo: *Riboviria*; Rząd: *Nidovirales*; Podrząd: *Comidovirineae*; Rodzina: *Coronaviridae*; Podrodzina: *Orthocoronavirinae*; Rodzaj: *Betacoronavirus*; Podrodzaj: *Sarbecovirus*; Gatunek: SARS (3). W międzynarodowej literaturze od 2003 r. pojawiały się liczne publikacje dotyczące identyfikacji wirusa SARS-CoV. Metaanaliza badań potwierdziła przydatność stosowania reakcji *real-time* RT-PCR do wykrywania wirusów n-CoV z próbek klinicznych (4).

Ryzyko ekspozycji związane z wirusem SARS-CoV-2

W przebiegu prac diagnostycznych z wirusem zidentyfikowano kilka obszarów ryzyka ekspozycji począwszy od transportu poprzez wstępną preparatykę materiału pobranego

Adres do korespondencji: *Agata Bielawska-Drózd, Wojskowy Ośrodek Medycyny Prewencyjnej, Modlin, ul. Leśna 4D, 05-100 Nowy Dwór Mazowiecki, Polska; e-mail: abdr@wp.pl.

ISSN 2657-9669/ This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. Copyright © 2020 CMKP.

Publikowane i finansowane przez Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego; <https://doi.org/10.36553/wm.41>

z dróg oddechowych i/lub surowicę, po wszystkie czynności związane z opracowywaniem materiału klinicznego (przenoszenie, otwieranie próbek i gilz, przelewanie, dozowanie, mieszanie i wirowanie). Kolejnymi obszarami ryzyka są: diagnostyka molekularna, oparta na łańcuchowej reakcji polimerazy DNA (PCR) w połączeniu z odwrotną transkryptazą (*real-time* RT-PCR) oraz diagnostyka serologiczna oparta na wykrywaniu przeciwciał m.in. metodą ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) lub mniej czułą i swoistą metodą immunochromatograficzną. W wysoce wyspecjalizowanych laboratoriach prowadzone są hodowle *in vitro* związane z badaniami naukowymi obejmującymi namnażanie i izolację wirusa na liniach komórkowych. Podanie wirusa proliferacji lub zagęszczaniu jest procedurą szczególnie niebezpieczną dla pracowników laboratoriów. Ponadto generowane odpady zawierające czynnik zakaźny muszą być traktowane jako odpady szczególnie niebezpieczne i klasyfikowane jako odpady o kodach 18 01 02 oraz 18 01 03. Natomiast odpady zawierające namnożone wirusy na kulturach *in vitro* należy zakwalifikować jako „wysoce zakaźne odpady medyczne” (5).

Bezpieczeństwo pracy laboratoryjnej z wirusem SARS-CoV-2

Opracowanie materiału klinicznego z podejrzeniem o obecność w nich wirusa SARS-CoV-2 w kierunku badań molekularnych należy wykonywać w oparciu o prawo krajowe: Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 kwietnia 2005 roku w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki (Dz. U. Nr 81 poz. 716 z późn. zm.) oraz zgodnie z wytycznymi WHO *Laboratory Biosafety Manual, Third Edition, Geneva: World Health Organization; 2004* (6). Czynności diagnostyczne powinny odbywać się w warunkach laboratoryjnych co najmniej drugiego stopnia hermetyczności BSL-2 (Biosafety Laboratory 2) (7). Warto podkreślić, że wszystkie czynności przy preparatyce wstępnej, diagnostyce serologicznej lub izolacji kwasu nukleinowego, powinny mieć miejsce w komorze bezpieczeństwa biologicznego klasy II (BSC-2 – Biosafety Cabinet 2), która posiada aktualny certyfikat o sprawności filtrów. Należy unikać lub zachowywać szczególną ostrożność podczas czynności generujących aerozole (np. wirowanie, otwieranie gilz, mieszanie, sonikacja). Dodatkową ochronę stanowią maski – respiratory typu FFP2/FFP3 (*Filtering face piece*). Personel powinien nosić przeznaczoną do tego typu pracy odzież ochronną – fartuch typu „*solid front*” ze ściągaczami przy nadgarstkach, jednorazowe obuwie, rękawiczki jednorazowe oraz jeśli jest to wskazane, osłony oczu (okulary, gogle) lub twarzy (tarcza – przyłbica). Wszelkie prace z materiałem klinicznym podejrzanym o obecność wirusa należy wykonywać w komorze laminarnej.

Izolacja kwasów nukleinowych jest poprzedzona inaktywacją wirusa. Inaktywowany lizat podczas kolejnych etapów oczyszczania nie stanowi materiału niebezpiecznego, zatem nie ma konieczności prowadzenia inaktywacji termicznej. Natomiast przy diagnostyce serologicznej w celu ograniczenia ryzyka, zwłaszcza w przypadku gdy czytelniki płytek ELISA są poza komorą, należy wykonać inaktywację wirusa metodą termiczną np. przez 30 min w temp. 60°C (8). Powyższe czynności, jeżeli są wykonane w komorze BSC-2, redukują ryzyko zakażenia. Pierwsze w Polsce badania diagnostyczne *real-time* RT-PCR wprowadzone były w laboratorium Zakładu Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego

Państwowego Zakładu Higieny (Warszawa). Obecnie 61 laboratoriów i sieci stacji sanitarno-epidemiologicznych zostało dopuszczonych do wykonywania badań, m.in.: WSSE Olsztyn, Wrocław, Gdańsk, Katowice, Rzeszów, Poznań, Kielce, Gorzów Wielkopolski, Łódź, Warszawa i Lublin (stan na 08.04.2020, www.gis.gov.pl). Badania wykonywane są również przez firmę Warsaw Genomics (Warszawa). Według Ministerstwa Zdrowia średnio wykonuje się od 4 do nawet 11 tys. badań dziennie na obecność koronawirusa (stan na 15.04.2020). Wskazane jest, aby nowe laboratoria przystępujące do diagnostyki potwierdzały standard pracy i zabezpieczenia w wybranych referencyjnych laboratoriach WHO (7). Warto tym samym podkreślić, że diagnostyka COVID-19, jako część diagnostyki laboratoryjnej, powinna opierać się na zarejestrowanych medycznych laboratoriach diagnostycznych spełniających stosowne kryteria systemu jakości określone przez Ministra Zdrowia, a badania powinny być wykonywane przez uprawnionych diagnostów laboratoryjnych. Diagnostyki tej nie powinny, nawet w sytuacji kryzysowej, wykonywać laboratoria naukowe, weterynaryjne czy polowe kontenerowe (9).

W Polsce, jak do tej pory, prace badawczo-rozwojowe nad wirusem prowadzone są wyłącznie w Małopolskim Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w zespole Profesora Krzysztofa Pyrcia. Namnożony wirus jest szczególnie niebezpieczny i wymaga posiadania laboratorium 3 stopnia hermetyczności (BSL-3) z ujemnym ciśnieniem, systemem filtracji wentylacyjnej z filtracją HEPA, a namnożony wirus należy traktować jako materiał kategorii A (UN 2814, instrukcja pakowania P620) (10).

Zasady laboratoryjnej identyfikacji wirusa SARS-CoV-2

Według rekomendacji WHO materiałem klinicznym do badań molekularnych i serologicznych są próbki wskazane w Tabeli 1. (7). Materiał kliniczny należy pobierać zgodnie z procedurami medycznymi rekomendowanymi przez WHO według algorytmu podanego w Tabeli 2. Materiał kliniczny podejrzan o obecność SARS-CoV-2 traktowany jest jak zakaźny (materiał kategorii B, kod UN 3373, instrukcja pakowania P650). Według instrukcji P650 stosować należy opakowanie wewnętrzne – pierwotne, opakowanie wtórne – hermetycznie zamknięte i odporne na ewentualne zgniecenie oraz opakowanie transportowe – zewnętrzne (termoizolacyjne) z opisem nadawcy oraz dołączoną kopertą zawierającą dokumentację (10).

Droga do ustanowienia standardu identyfikacji SARS-CoV-2 wśród innych koronawirusów

Zastosowanie metody *real-time* RT-PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym z zastosowaniem odwrotnej transkrypcji) mającej na celu identyfikację nowego koronawirusa możliwe było dzięki udostępnieniu wzoru jego genomu w bazie GISAID (*Global Initiative on Sharing All Influenza Data*). Genom został tam opisany pod numerem MN908947. Takie rozwiązanie rozpoczęło serię próbnych testów w celu wyszukania, a następnie wybrania konserwatywnych sekwencji nowego koronawirusa, które z powodzeniem mogłyby być wykorzystane do metody *real-time* RT-PCR (11). Wysokie podobieństwo genetyczne w obrębie rodzaju Coronavirus, (alfa-, beta-, gamma- i delta- koronawirusy) stanowiło dużą trudność w wyszukiwaniu

Tabela 1. Rekomendacje postępowania z materiałem diagnostycznym wg WHO (10).

	Test	Typ próbki	Czas poboru
Pacjent	Badanie molekularne	Próbki z górnych dróg oddechowych: wymazy z gardła lub nosogardła, popłuczyny lub aspiraty z nosogardła W razie konieczności ze względów diagnostycznych próbki z dolnych dróg oddechowych: płwocina, aspirat, popłuczyny ¹ [Gdy to konieczne ze względów epidemiologicznych, a nie diagnostycznych]* warto rozważyć próbki kału, moczu lub próbki <i>post mortem</i> z autopsji	Zebrać od razu W miarę możliwości pobierać powtórnie w celu monitorowania eradykacji wirusa
Pacjent	Serologia	Surowica (w momencie dostępności zwalidowanego testu)	Konieczne są sparowane próbki dla oceny: pierwsze w pierwszym tygodniu oraz następne po 2-4 tyg. [szczyt po 2 tyg. dla IgM i 4 tyg. dla IgG, okres ten będzie sprecyzowany później]*
Kontakty	Badanie molekularne	Wymaz z gardła lub nosogardła	W okresie inkubacji od czasu ostatniego kontaktu z chorą osobą
Kontakty	Serologia	Surowica (w momencie dostępności do zwalidowanego testu)	Konieczne są sparowane próbki dla oceny pierwsze w pierwszym tygodniu oraz następne po 2-4 tyg. [szczyt po 2 tyg. dla IgM i 4 tyg. dla IgG, okres ten będzie sprecyzowany później]*

* Komentarz własny.

¹ U pacjentów podejrzanych o COVID-19 pobieranie materiału tą drogą jest procedurą wysokiego ryzyka rozprzestrzeniania aerozolu zakaźnego i powinno być wykonywane wyłącznie u pacjentów w ciężkim stanie, intubowanych, w przypadku, w którym ostateczne rozpoznanie różnicowe może coś zmienić w postępowaniu leczniczym lub procedurach ratujących życie. Bronchoskopia powinna być wykonywana w pomieszczeniach z ujemnym ciśnieniem i przy maksymalnym zabezpieczeniu operatora. W miarę możliwości należy używać bronchoskopów jednorazowych.

Tabela 2. Zasady pobierania materiału diagnostycznego przy podejrzeniu COVID-19.

Typ próbki	Materiał do pobierania	Temperatura przechowywania przed badaniem	Rekomendowana temperatura transportu i czas transportu
Wymazy nosogardłowe i ustnogardłowe	Wymazówki z dakronu lub flokowanego poliestru*	2-8°C	2-8°C ≤5 dni -70°C (suchy lód) >5 dni
Popłuczyny oskrzelowe	Sterylny pojemnik*	2-8°C	2-8°C ≤2 dni -70°C (suchy lód) >2 dni
Aspirat z tchawicy, popłuczyny lub aspirat z nosogardła lub nosa	Sterylny pojemnik*	2-8°C	2-8°C ≤2 dni -70°C (suchy lód) >2 dni
Płwocina	Sterylny pojemnik	2-8°C	2-8°C ≤2 dni -70°C (suchy lód) >2 dni
Tkanka z biopsji lub autopsji także z płuc	Sterylny pojemnik z płynem fizjologicznym, PBS (<i>Phosphae Buffer Saline</i>) lub VTM (<i>Viral Transport Medium</i>)	2-8°C	2-8°C ≤24 godz. -70°C (suchy lód) >24 godz.
Surowica	Probówki separujące surowicę (u dorosłych: pobrać 3-5 ml pełnej krwi)	2-8°C	2-8°C ≤5 dni -70°C (suchy lód) >5 dni
Pełna krew	Probówka do poboru krwi	2-8°C	2-8°C ≤5 dni
Kał	Sterylny pojemnik na próbki kału	2-8°C	2-8°C ≤5 dni -70°C (suchy lód) >5 dni
Mocz	Sterylny pojemnik na mocz	2-8°C	2-8°C ≤5 dni -70°C (suchy lód) >5 dni

Źródło: wytyczne WHO „Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases”, 19 marca 2020.

* W transporcie próbek do wykrywania wirusów należy używać podłoża transportowego (VTM) zawierającego antybiotyki i substancje grzybobójcze. Należy unikać zamrażania i rozmrażania próbek. Jeżeli VTM nie jest dostępne, może być wykorzystany sterylny płyn fizjologiczny lub PBS w tej sytuacji czas transportu 2-8°C może ulec skróceniu.

specyficznych sekwencji oraz odróżnieniu SARS-CoV-2 od innych (11, 12, 13).

Podobnie jak, w przypadku wykrywania innych koronawirusów, które w przeszłości wywoływały epidemie światowe SARS-CoV i MERS-CoV, metoda *real-time* RT-PCR okazała się skuteczna. W przypadku wirusa SARS zaproponowano kilka opcji wykrywania opierających się na wieloetapowej detekcji kilku sekwencji *COR1* i *COR2* w próbkach wymazów z odbytu, moczu i górnych dróg oddechowych (14). Z kolei Emery i wsp. (2004) zaproponowali algorytm składający się z dwóch etapów. W pierwszym zastosowano metodę przesiewową umożliwiającą wykrycie trzech fragmentów genomu: SARS1 – gen polimerazy RNA zależnej od RNA wirusa, SARS2 i SARS23 – geny nukleokapsydu. W kolejnym etapie potwierdzano obecność trzech nowych sekwencji: *N3* (gen kodujący białko nukleokapsydu), *3'NTR* (region nie ulegający transkrypcji 3') i *M* (gen kodujący białko membranowe). W rezultacie przeprowadzonych badań wykazano dużą czułość i specyficzność opracowanej metody (15).

W badaniach Książka i wsp. (2003) wykorzystano oligonukleotydy wobec sekwencji *ORF1b* (*Open reading frame* – otwarta ramka odczytu) w genomie SARS-CoV. Wybór został dokonany po porównaniu genomu SARS-CoV z szeregiem wirusów blisko spokrewnionych, np. ludzkiego koronawirusa 229E, OC43 i innych (16). Wybrana sekwencja docelowa *ORF1b* posłużyła następnie do opracowania kolejnego zestawu starterów *IN-2* i *IN-4* amplifikujących konserwatywny region koronawirusa w obrębie *ORF1b*. Ostatnim etapem było wyszukanie i wybranie wysoce konserwatywnego regionu tylko dla wirusa SARS-CoV, wobec którego zaprojektowano zestaw oligonukleotydów *Cor-p-F2*, *Cor-p-F3* i *Cor-p-R1*. Wobec przygotowanych starterów przeprowadzone zostały badania specyficzności wobec szerokiej gamy wirusów tj. wirusy paragrypy 1, 2 i 3, wirus grypy A i B (16). W rezultacie nie stwierdzono żadnych reakcji krzyżowych pomiędzy zaprojektowanymi starterami dla SARS-CoV i innymi wirusami.

Z kolei Nijsche i wsp. (2004) opracowali metodę *real-time* RT-PCR zorientowaną na wykrywanie 3 sekwencji docelowych: dwie znajdujące się w genach kodujących białka niestrukturalne NSpp1A i NSpp1ab oraz gen kodujący białko powierzchniowe SSGP (17).

Ponadto w literaturze dostępne są propozycje wykrywania różnych kombinacji genów: geny kodujące białko nukleokapsydu N, polimerazę RNA zależną od RNA i sekwencji *ORF1b* (18, 19, 20, 21, 22, 23).

W kolejnej propozycji użycia metody *real-time* RT-PCR opracowanej przez Corman'a i wsp. (2020), autorzy założyli wykorzystanie kilku sekwencji docelowych umożliwiających grupowanie do koronawirusów (gen polimerazy RNA zależnej od RNA), identyfikację do podrodzaju *Sarbecovirus* (gen osłonki *E* oraz nukleokapsydu *N*) oraz specyficznych dla gatunku SARS-CoV-2 (gen polimerazy RNA zależnej od RNA) (11).

Centra Kontroli i Prewencji Chorób (CDC) zaproponowały algorytm identyfikacji SARS-CoV-2 oparty na układzie różnych zestawów oligonukleotydów, w tym specyficznych dla genów nukleokapsydu (*N1*, *N2*, *N3*) oraz genu *RP* (24, 25).

Na stronie WHO znajduje się lista prac naukowych w zakresie identyfikacji molekularnej SARS-CoV-2. Godnym uwagi jest fakt, że w większości opisanych metod występują te same sekwencje, które posłużyły do wykrywania i identyfikacji SARS-CoV i MERS-CoV (26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33).

Obecnie laboratoria diagnostyki molekularnej opierają się na gotowych zestawach do *real-time* RT-PCR, gdzie

proces przygotowywania próbek jest uproszczony i polega na zastosowaniu mieszanin reakcyjnych w postaci liofilizowanej.

Na rynku dostępne są testy komercyjne posiadające certyfikaty CE i IVD: SARS-CoV-2 *Real-Time* PCR Detection Kit (CerTest Biotec, Hiszpania), Genesig *Real-Time* PCR COVID-19 (Primerdesign Ltd., Wielka Brytania), Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks, Turcja) czy Vitassay qPCR SARS-CoV-2 (Vitassay, Hiszpania).

W celu szybkiej diagnostyki zakażeń wirusem SARS-CoV-2 można również wykorzystać komercyjnie dostępny aparat FilmArray (BioFire). Zestaw ten został zaaprobowany przez FDA i opracowany wspólnie z Departamentem Obrony USA (*Department of Defence United States of America*). Specjalnie do celu wykrywania powyższego wirusa wprowadzony zostanie panel BIOFIRE® Respiratory Panel 2.1 (RP2.1), który będzie również umożliwiał identyfikację innych czynników wirusowych mogących dawać podobne objawy chorobowe (<https://www.biofire.com/products/the-filmarray-panels/filmarrayrp/>). Powyższy panel będzie kompatybilny z urządzeniami FilmArray 2.0 oraz FilmArray Torch. Inną ofertą firmy bioMérieux jest test SARS-COV-2 R-GENE® wykorzystujący metodę PCR czasu rzeczywistego (*real-time* PCR), która można zaadoptować do większości dostępnych urządzeń PCR (www.biomerieux.com).

Sposób realizacji testów molekularnych

Aktualne rekomendacje WHO dotyczące badań molekularnych dla obszarów, w których dotychczas wirus nie cyrkulował, wskazują konieczność wykrycia co najmniej dwóch genów, jednego specyficznego dla nowego wirusa i drugiego specyficznego dla rodzaju lub grupy koronawirusów. W przypadku stwierdzenia transmisji wirusa od przypadków miejscowych wystarczy wykrycie jednego genu specyficznego dla SARS-CoV-2.

WHO rekomenduje, aby testy molekularne zawierały kontrole: izolacji, amplifikacji, wewnętrzną dodatnią i ujemną. Wszystkie badania z wynikami wątpliwymi powinny być wykonane z próbek pobranych powtórnie. Ponadto wyniki negatywne u pacjentów z symptomami choroby lub z bliskiego kontaktu z chorymi powinny być powtórzone. W przypadku drugiego ujemnego wyniku u pacjentów z objawami rekomenduje się pobranie próbek z dolnych dróg oddechowych (7). Jak wspomniano wcześniej, należy tę procedurę ograniczyć do wybranych przypadków, gdzie potwierdzenie zakażenia jest niezbędne, zdaniem autora [JK], bardziej ze wskazań klinicznych, w interesie danego pacjenta, niż ze względów epidemiologicznych.

W Polsce od 5 marca 2020 r. obowiązuje algorytm diagnostyczny PZH (34), który oparty jest na rekomendacjach WHO i ECDC oraz doświadczeniach własnych autorów. Mimo, że Minister Zdrowia nie wydał decyzji o stworzeniu ośrodka referencyjnego na podstawie art. 9 Ustawy (Ustawa z dnia 5 grudnia 2008 r. o zapobieganiu oraz zwalczaniu zakażeń i chorób zakaźnych u ludzi, Dz. U. 2008 Nr 234 poz. 1570), to opisany algorytm w celu nadzoru nad COVID-19 w Polsce ma jego cechy i opiera się na laboratorium centralnym i laboratoriach obwodowych. Taki schemat na pewno pozwala na uzyskanie wiarygodnych wyników. Z analizy wymagań WHO w Polsce, ze względu na potwierdzone występowanie wirusa, taki schemat nie jest konieczny. W aktualnej sytuacji, gdzie wykonuje się wciąż zbyt mało testów, a czas oczekiwania jest

stosunkowo długi, algorytm powinien być pilnie zmieniony, tak aby uzyskiwana informacja była przydatna klinicznie i epidemiologicznie i objęła jak najszerszą grupę pacjentów ze wskazań medycznych.

Od 31 marca 2020 r. NIZP-PZH pełni funkcję krajowego laboratorium centralnego i zgodnie z wytycznymi ECD prowadzi weryfikację wyników badań laboratoryjnych w kierunku COVID-19 w Polsce (<https://www.ecdc.europa.eu/en/novel-coronavirus/laboratory-support>) – dane dot. weryfikacji na stronie internetowej NIZP-PZH.

Wartość diagnostyczna testów immunologicznych

Czułość testów PCR z upływem czasu (około tygodnia od wystąpienia symptomów klinicznych) maleje, i tym samym, pomimo toczącego się zakażenia, cząstki wirusa mogą być nie wykryte. W takim przypadku możemy otrzymać wynik fałszywie ujemny. Wówczas ważną rolę w diagnostyce mogą odegrać testy serologiczne.

W badaniach Yam i wsp. (2003) wykazano, że próbki pochodzące od pacjentów immunododatnich w kierunku SARS w 20 do 50% nie zostały potwierdzone techniką *real-time* RT-PCR, co może wskazywać na błędy podczas poboru próbek (materiał niediagnostyczny) lub w trakcie kolejnych etapów reakcji *real-time* RT-PCR (izolacja, odwrotna transkrypcja, amplifikacja) (35).

W badaniach Cai i wsp. (2020) zaproponowano metodę opartą na luminescencji MCLIA (*Magnetic chemiluminescence enzyme immunoassay*), w efekcie której umożliwiono wykrycie IgG w 71,4% oraz IgM w 57,2%. Jednakże należy zauważyć, że wykrywanie obu klas przeciwciał znacznie podnosi częstość dodatnich potwierdzeń tzw. „*detection rate*” do 81,5% (36). Różnice w wykrywalności obu klas przeciwciał wykazano również w badaniach nad SARS techniką ELISA przeprowadzonych przez Woo i wsp. (2005) (37).

Obecnie na rynku dostępne są zestawy serologiczne oparte na metodzie ELISA oraz szybkie testy immunochromatograficzne: Viruse COVID-19 IgG/IgM, Covid-19 Ag Respi-Strip (bioConnections), Coronavirus (COVID-19) IgM/IgG Rapid Test Kit (RayBiotech), Human SARS-CoV-2 IgG/IgM (2019-nCoV/Coronavirus) ELISA Kit (MyBioSource), Accu-Tell COVID-19 IgG/IgM Rapid Test Coronavirus (Gentaur), COVID-19 IgG/IgM Combo Rapid Test Device (Liming Bio), STANDARD Q COVID-19 IgM/IgG Duo (Biosensor), EDI™ Novel Coronavirus COVID-19 ELISA Kits (Epitope Diagnostics), COVID-19 IgM & IgG „Corona Virus” Rapid Test kit Box (Swiss Point of Care), Anty-SARS-CoV-2 ELISA IgA, IgG (Euroimmun), ALLTEST 2019-nCoV IgM/IgG Rapid (BioMaxima i Novazym).

Należy pamiętać, aby przed wyborem testu upewnić się, że jest on dopuszczony do użytku na terenie Unii Europejskiej (certyfikat CE), czy może być wykorzystany do badań próbek pochodzących od ludzi (certyfikat IVD) i czy jest dostępny w Polsce.

Testy immunologiczne uzupełnieniem *real-time* RT-PCR w określonych przypadkach

Propozycję połączenia obu technik zaprezentował Liu i wsp. (2020), przeprowadzając analizę testem ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assays*), opartą na użyciu rekombinowanego fragmentu białka N SARS-CoV-2 do wykrywania przeciwciał klasy IgM i IgG oraz *real-time*

RT-PCR u pacjentów z potwierdzeniem i podejrzeniem COVID-19. Badania przeprowadzono we wstępnej fazie choroby, od czasu pojawienia się symptomów klinicznych oraz po 11 dniach od ich wystąpienia. Wykazano przewagę techniki *real-time* RT-PCR w początkowej fazie choroby i spadek jej wartości w późniejszym przebiegu (od 5 do 11 dni), gdzie test ELISA okazał się skuteczny na poziomie 80%, a *real-time* RT-PCR zaledwie 60% wykrywalności. Połączenie obu technik: *real-time* RT-PCR i testu ELISA u chorych z wczesnymi objawami lub z podejrzeniem o zakażenie może podnieść wykrywalność zakażeń na różnych etapach choroby (38). Jednakże ta praca ukazała się w tej chwili jako preprint, nie została poddana recenzji i nie może stanowić podstawy wytycznych klinicznych.

W badaniach Zhao i wsp. (2020) wykazano skuteczność technik immunologicznych na poziomie od 40% w pierwszych siedmiu dniach od pojawienia się objawów klinicznych, przy czym ich skuteczność wzrastała wraz z upływem dni (od 15 do 30), osiągając wartość 94,3% dla przeciwciał klasy IgM oraz 79,8% dla klasy IgG. Dla porównania wykrywalność wirusa testem *real-time* RT-PCR w pierwszej fazie choroby (do 7 dni) wynosiła 66,7% i z upływem dni obniżyła się do wartości 45,5% (39). Zjawisko to jest zrozumiałe i związane z opóźnioną produkcją przeciwciał oraz ograniczeniem proliferacji wirusa w organizmie w procesie zdrowienia.

W innych badaniach Jia i wsp. (2020) skuteczność użytej techniki immunofluorescencji (*Fluorescence immunochromatographic assay method*) dla podejrzanych przypadków COVID-19 wyniosła kolejno dla pacjentów *real-time* RT-PCR pozytywnych 72,73% oraz 87,5% dla pacjentów *real-time* RT-PCR negatywnych. Zdaniem autorów z uwagi na prostotę i łatwość wykonania testu oraz wysoką czułość technika immunofluorescencji może być z powodzeniem stosowana w połączeniu z techniką *real-time* RT-PCR w diagnostyce COVID-19 (40).

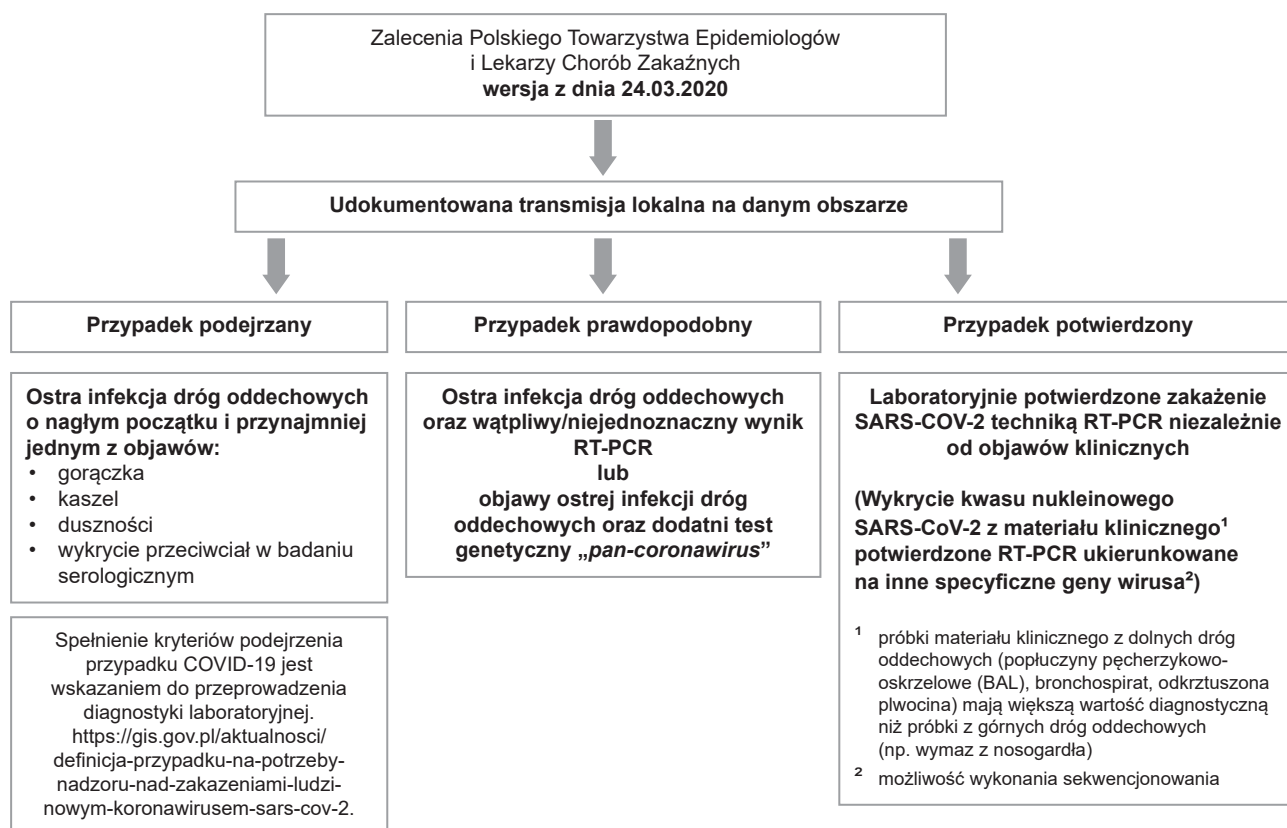
W ocenie Zhang i wsp. (2020) przypadki COVID-19 wykryte przy użyciu technik immunologicznych między 7 a 12 dniem od pojawienia się symptomów klinicznych choroby w 30-50% zostały potwierdzone testem w oparciu o detekcję RNA wirusa. Badania dowodzą niższej skuteczności techniki *real-time* RT-PCR w kolejnych dniach choroby (41).

W badaniach Xiang i wsp. (2020) wydajność wykrywania obecności przeciwciał klasy IgM i IgG testem ELISA oraz GICA (*Gold immunochromatography colloied assay*) mieściła się na poziomie kolejno 97,3% i 82,4%. Skuteczność techniki PCR osiągnęła wartość 52% (42).

Podsumowanie

Biorąc pod uwagę ewentualną możliwość zaistnienia wskazanych powyżej ograniczeń techniki *real-time* RT-PCR, a mając na uwadze szybkość i prostotę wykonania testu immunologicznego, mogłoby być uzasadnione użycie go jako dodatkowego narzędzia w procesie laboratoryjnej diagnostyki COVID-19.

Według obecnych wytycznych Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych rozpoznanie COVID-19 opiera się na zastosowaniu techniki *real-time* RT-PCR i jest podstawą rozpoznania aktywnego zakażenia SARS-CoV-2. Jednakże łączne stosowanie obu testów zwiększa szansę wykrycia zakażeń nowym koronawirusem zarówno przypadków klinicznie objawowych, jak i bezobjawowych, objętych nadzorem epidemiologicznym lub kwarantanną.



Schemat 1. Kryteria rozpoznania COVID-10.

Badaniu wykrywającemu materiał genetyczny wirusa powinny zostać poddane osoby spełniające kryteria przypadku podejrzanego COVID-19 (Schemat nr 1).

Przy zastosowaniu metod serologicznych [w badaniach przesiewowych przypadków podejrzanych – przyp. JK] powinny być używane testy wykrywające wyłącznie przeciwciała klasy IgM. Jeżeli są to testy IgM/IgG, należy pamiętać, że wynik dodatni może świadczyć o przebyłym, nieaktywnym zakażeniu. Ujemne wyniki badań serologicznych nie wykluczają zakażenia SARS-CoV-2, gdyż czas produkcji przeciwciał może wynosić >7 dni. Wynik dodatni testu może świadczyć o przebyłym lub trwającym zakażeniu innymi niż SARS-CoV-2 ludzkimi koronawirusami.

Pomimo iż powyższe przykłady mogą wskazywać na skuteczność łączenia obu metod opartych na wykrywaniu

RNA z metodami serologicznymi w diagnostyce COVID-19, to z uwagi na możliwość otrzymania w przypadku testów serologicznych wyników fałszywie ujemnych (okienko serologiczne) lub fałszywie dodatnich (produkcja przeciwciał spowodowana przebytą lub obecną infekcją innymi niż SARS-CoV-2 ludzkimi koronawirusami, np. HKU1, OC43, NL63, 229E do interpretacji wyników testów należy podchodzić z ogromną ostrożnością.

Zgodnie z zaleceniem Konsultant Krajowej w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej prof. Katarzyny Dzierżanowskiej-Fangrat tylko zastosowanie testów molekularnych jest warunkiem spełnienia laboratoryjnego kryterium potwierdzenia przypadku COVID-19 zgodnie z definicją przypadku na potrzeby nadzoru epidemiologicznego nad zakażeniem SARS-CoV-2. Dlatego też wyniki badań serologicznych

Tabela 3. Interpretacja wyników dostępnych testów molekularnych i serologicznych.

Wynik testów			Znaczenie kliniczne
PCR	IgM	IgG	
+	-	-	Pacjent może być w „okienku” serologicznym
+	+	-	Pacjent może być we wczesnej fazie zakażenia
+	+	+	Pacjent jest w aktywnej fazie zakażenia
+	-	+	Pacjent może być w późnej fazie lub nawrotu zakażenia
-	+	-	Pacjent może być we wczesnej fazie zakażenia Wynik PCR może być fałszywie negatywny
-	-	+	Pacjent mógł dawno przejść infekcję i wyzdrowiał
-	+	+	Pacjent może być w stanie rekonwalescencji Wynik PCR jest fałszywie negatywny

Tabela 4. Algorytm diagnostyczny – wykorzystanie uzupełniające dostępnych technik diagnostycznych.

Osoba	Miejsce	Diagnostyka	Uwagi
Pacjenci przyjmowani do szpitala	Szpital	Możliwość wykorzystania testów immunologicznych jeśli IgM (+) → osoba podejrzana COVID-19 jeśli IgM (-) powtórzyć za kilka dni (ryzyko okienka)	Pacjenci bez objawów przyjmowani z innych przyczyn do szpitali
Osoby z kontaktu COVID-19	Nadzór epidemiologiczny	Możliwość wykorzystania testów immunologicznych jeśli IgM (+) → osoba podejrzana COVID-19 jeśli IgM (-) powtórzyć za kilka dni (ryzyko okienka)	Brak kryterium epidemiologicznego bliskiego kontaktu * Wykonywać preferencyjnie w 2 drugiej części 14 dniowego okresu po potencjalnej ekspozycji, do maksymalnego obserwowanego okresu inkubacji
	Kwarantanna	Brak diagnostyki PCR w przypadku pogorszenia stanu jeśli spełnione kryterium*, → osoba podejrzana COVID-19	Możliwość wykorzystania testów immunologicznych jeśli IgM (+) → osoba podejrzana COVID-19 jeśli IgM (-) powtórzyć za kilka dni (ryzyko okienka)
Osoby podejrzane* COVID -19	Kwarantanna lub szpital	Badanie PCR jeśli (+) → osoba COVID-19 potwierdzona jeśli (-) → obserwować pacjenta do wyzdrowienia nie krócej niż 14 dni i powtórzyć jeśli (-) – zakończenie izolacji/hospitalizacji w przypadku pogorszenia stanu, powtórzyć jeśli (+) → osoba COVID-19 potwierdzona	Przy ograniczonej podaży testów PCR lub możliwościach laboratoriów proponuje się wykorzystanie testów immunologicznych, w połączeniu z PCR jeśli IgM (+) → test PCR jeśli IgM (-) powtórzyć za kilka dni (ryzyko okienka), ** Spełnianie kryterium przypadku podejrzanego GIS (22.03.2020) lub pozytywny wynik serologiczny
Możliwy kontakt? COVID -19	Izolacja/szpital	Badanie PCR (specyficzne dla SARS-CoV-2) jeśli (+) → diagnoza COVID-19 potwierdzona jeśli (-) → obserwować pacjenta do wyzdrowienia nie krócej niż 14 dni i powtórzyć jeśli (-) – zwolnienie do domu w przypadku pogorszenia stanu, powtórzyć jeśli (+) → osoba COVID-19 potwierdzona	** Wynik dodatni w teście PCR „pan-coronawirus” – testy rzadko stosowane
Potwierdzone przypadki COVID-19	Izolacja/szpital	Badanie PCR po ustąpieniu objawów (nie mniej niż 10-12 dni) jeśli (-) → po 24 godz. powtórzyć, jeśli (-) → zakończenie izolacji lub hospitalizacji jeśli (+) → kolejne badanie po 7 dniach aż do uzyskania dwóch wyników (-)	

Wynik PCR wątpliwy

- zawsze wykonać ponowne badanie PCR na nowej próbce lub innym zestawem PCR (inna sekwencja docelowa), w przypadku dalszych niepowodzeń skorzystać z laboratorium referencyjnego WHO do reinterpretacji,

Badanie PCR

- obejmuje jeden gen specyficzny dla SARS-Cov-2 i nie wymaga potwierdzenia w PZH (zgodnie z rekomendacjami WHO z 19 marca 2020 r.),

Test immunologiczny IgM/IgG

- IgG (-) oraz IgM (+) prawdopodobieństwo infekcji wirusem SARS-CoV-2 lub pokrewnym,

Test immunologiczny IgM/IgG

- IgG (+) oraz IgM (-) prawdopodobieństwo przebytej infekcji SARS-CoV-2 lub pokrewnym **lub okienko serologiczne**,

Test immunologiczny IgM/IgG

- IgM (-) i IgG (-) małe prawdopodobieństwo infekcji wirusem SARS-CoV-2 lub pokrewnym **lub okienko serologiczne**.

nie powinny być wykorzystywane jako podstawa do diagnozowania, wykluczenia zakażenia SARS-CoV-2 ani do informowania o stanie zakażenia.

W opinii współautorów mogłyby one być przydatne do uzupełniania badań diagnostycznych, na potrzeby prowadzenia dochodzeń epidemiologicznych, do retrospektywnych badań dotyczących zakażeń SARS-CoV-2, a także jako badania przesiewowe w następujących przypadkach:

- u pracowników służb medycznych: ratowników medycznych, lekarzy, pielęgniarek, diagnostów laboratoryjnych oraz funkcjonariuszy służb mundurowych: żołnierzy, policjantów, strażaków, służb granicznych, służb miejskich, patrol żołnierzy WOT;
- u pacjentów bez objawów klinicznych, szczególnie w późnym okresie średniego czasu inkubacji lub pod koniec maksymalnego okresu inkubacji, liczonego od momentu potencjalnej ekspozycji (7-24 dni);
- u pacjentów skąpo objawowych, z przebiegiem choroby niecharakterystycznym, w celu różnicowania innych zakażeń grypopodobnych tzw. „utajeni nosiciele”;
- u osób pracujących w nadzorze epidemiologicznym, z niejasnym statusem kontaktu, w późnym okresie od potencjalnego momentu ekspozycji (7-24 dni);
- u osób objętych kwarantanną z powodu kontaktu z osobą zakażoną, także po jej zakończeniu (proponowany okres od 7 do 28 dnia dla IgM/IgG);
- u osób z powikłaniami po przebyciu infekcji grypopodobnych;
- u osób przybywających na oddziały niezakaźne w celach interwencyjnych (zabiegi chirurgiczne).

Interpretacje i znaczenie kliniczne wyników testów *real-time* RT-PCR i serologicznych przedstawiono w Tabeli 3. Proponowany algorytm diagnostyczny został przedstawiony w Tabeli 4.

Konflikt interesów

Istnieje konflikt interesów. Jeden ze współautorów pracuje w firmie BioMerieux.

PIŚMIENICTWO:

1. World Health Organization. Novel Coronavirus (2019-nCoV). Situation report – <http://www.who.int/docs/default-source/coronaviruses/situation-reports/20200121-strip-1-2019-ncov.pdf>.
2. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. Discovery of a novel coronavirus associated with the recent pneumonia outbreak in humans and its potential bat origin. *BioRxiv*; 2020 Jan 1. DOI: 10.1101/2020.01.22.914952.
3. Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020; (5):536-544. DOI:10.1038/s41564-020-0695-z.
4. Lin C, Ye R, Xia YL. A meta-analysis to evaluate the effectiveness of real-time PCR for diagnosing novel coronavirus infections. *Genet Mol Res* 2015;14:15634-41. DOI:10.4238/2015. December.1.15.
5. Ustawa z dnia 14 grudnia 2012 r. o odpadach (Dz. U. 2013 poz. 21 z póź. zm.); Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 5 października 2017 r. w sprawie szczegółowego sposobu postępowania z odpadami medycznymi (Dz. U. 2017 poz. 1975).
6. World Health Organization, Laboratory biorisk management for laboratories handling human specimens suspected or confirmed to contain novel coronavirus: Interim recommendations, https://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/Biosafety, reviewed 5th April 2020.
7. WHO Biosafety Guidelines for handling of SARS Specimens. World Health Organization. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases: interim guidance, 2nd March 2020. www.who.int.
8. Chang L, Yan Y, Wang L. Coronavirus disease 2019: coronaviruses and blood safety. *Transfus Med Rev* 2020. DOI:10.1016/j.tmr.2020.02.003.
9. Ustawa z dnia 27 lipca 2001 r. o diagnostyce laboratoryjnej. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 3 marca 2004 r. w sprawie wymagań, jakim powinno odpowiadać medyczne laboratorium diagnostyczne (Dz. U. 2019 poz. 849; 2004).
10. World Health Organization. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019-2020: applicable from 1 January 2019. World Health Organization; 2019.
11. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 2020; 25 (3). DOI:10.2807/1560-7917.
12. Chu DK, Pan Y, Cheng S, et al. Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of pneumonia. *Clin Chem* 2020. DOI:10.1093/clinchem/hvaa029.
13. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa2001017.
14. Chan PK, To WK, Ng KC, et al. Laboratory diagnosis of SARS. *Emerg Infect Dis* 2004;10 (5):825. DOI:10.3201/eid1005.030682.
15. Emery SL, Erdman DD, Bowen MD, et al. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for SARS-associated coronavirus. *Emerg Infect Dis* 2004; 10 (2):311. DOI:10.3201/eid1002.030759.
16. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 2003; 15 (20):1953-66. DOI:10.1056/NEJMoa030781.
17. Nitsche A, Schweiger B, Ellerbrok H, et al. SARS coronavirus detection. *Emerg Infect Dis* 2004; 10 (7):1300. DOI:10.3201/eid1007.030678.
18. Zhai J, Briese T, Dai E, et al. Real-time polymerase chain reaction for detecting SARS coronavirus, Beijing, 2003. *Emerg Infect Dis* 2004; 10 (2):311. DOI:10.3201/eid1002.030799.
19. Poon LL, Chan KH, Wong OK, et al. Detection of SARS coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome by conventional and real-time quantitative reverse transcription-PCR assays. *Clin Chem* 2004; 50 (1):67-72. DOI:10.1373/clinchem.2003.023663.
20. Corman V, Müller M, Costabel U, et al. Assays for laboratory confirmation of novel human coronavirus (hCoV-EMC) infections. *Euro Surveill* 2012; 17 (49):27.
21. Lu X, Whitaker B, Sakthivel SK, et al. Real-time reverse transcription-PCR assay panel for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol* 2014; 52 (1):67-75. DOI:10.1128/JCM.02533-13.
22. Huang P, Wang H, Cao Z, et al. A rapid and specific assay for the detection of MERS-CoV. *Front Microbiol* 2018; 29 (9):1101. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01101.
23. Hashemzadeh MS, Rasouli R, Zahraei B, et al. Development of dual taqman based one-step rRT-PCR assay panel for rapid and accurate diagnostic test of MERS-CoV: a novel human coronavirus, ahead of hajj pilgrimage. *Iran Red Crescent Med J* 2016; 18 (11). DOI:10.5812/ircmj.23874.
24. Center of Disease Control and Prevention. CDC. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-panel-primer-protocols.html>. USA 2020.

25. Center of Disease Control and Prevention. CDC. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/rt-pcr-detection-instructions.html>. CDC 2020.
26. Specific primers and probes for detection 2019 novel coronavirus. National Institute for Viral Disease Control and Prevention. China 2020. http://ivdc.chinacdc.cn/kyjz/202001/t20200121_211337.html.
27. Diagnostic detection of 2019-nCoV by real-time RT-PCR, protocol 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/protocol-v2-1.pdf?sfvrsn=a9ef618c_2.
28. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR, protocol. HKU MED, LKS Faculty of Medicine. School of Public Health. 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4.
29. PCR and sequencing protocol for 2019-nCoV – Department of Medical Sciences, Ministry of Public Health. Thailand 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/conventional-rt-pcr-followed-by-sequencing-for-detection-of-n-cov-riri-nat-inst-health-t.pdf?sfvrsn=42271c6d_4.
30. PCR and sequencing protocols for 2019-nCoV – National Institute of Infectious Diseases, Protocol. Japan 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/method-niid-20200123-2.pdf?sfvrsn=fbf75320_7.
31. US CDC Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Coronavirus, Center of Disease Control and Prevention; Protocol. USA 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscdcr-rt-pcr-panel-for-detection-instructions.pdf?sfvrsn=3aa07934_2.
32. US CDC Real-Time RT-PCR Panel for Detection 2019-Novel Coronavirus, 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes. Center of Disease Control and Prevention, Protocol. USA 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/uscdcr-rt-pcr-panel-primer-probes.pdf?sfvrsn=fa29cb4b_2.
33. Real-time RT-PCR assays for the detection of SARS-CoV-2, Institute of Pasteur, Paris, Protocol. France 2020. https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_2.
34. Algorytm postępowania diagnostycznego w przypadku osób zakażonych/podejrzanych o zakażenie 2019-nCoV od dnia 05.03.2020. Państwowy Zakład Higieny – Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego. Polska 2020.
35. Yam WC, Chan KH, Poon LL, et al. Evaluation of reverse transcription-PCR assays for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome associated with a novel coronavirus. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (10):4521-4524. DOI:10.1128/JCM.41.10.4521-4524.2003.
36. Cai X, Chen J, Hu J, et al. A Peptide-based Magnetic Chemiluminescence Enzyme Immunoassay for Serological Diagnosis of Corona Virus Disease 2019 (COVID-19). *medRxiv*. 1 Jan 2020. DOI:10.1101/2020.02.22.20026617.
37. Woo PC, Lau SK, Wong BH, et al. Differential sensitivities of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike polypeptide enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and SARS coronavirus nucleocapsid protein ELISA for serodiagnosis of SARS coronavirus pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2005; 43 (7):3054-3058. DOI:10.1128/JCM.43.7.3054-3058.2005.
38. Liu L, Liu W, Wang S, et al. A preliminary study on serological assay for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in 238 admitted hospital patients. *medRxiv* 2020. DOI:10.1101/2020.03.06.20031856.
39. Zhao J, Yuan Q, Wang H, et al. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *The Lancet*, preprint, manuscript number THELANCET-D-20-02366.
40. Jia X, Zhang P, Tian Y, et al. Clinical significance of IgM and IgG test for diagnosis of highly suspected COVID-19 infection. *medRxiv* 2020. DOI:10.1101/2020.02.28.20029025.
41. Zhang J, Liu J, Li N, et al. Serological detection of 2019-nCoV respond to the epidemic: A useful complement to nucleic acid testing. *medRxiv* 2020. DOI:10.1101/2020.03.04.20030916.
42. Xiang J, Yan M, Li H, et al. Evaluation of Enzyme-Linked Immunoassay and Colloidal Gold-Immunochromatographic Assay Kit for Detection of Novel Coronavirus (SARS-Cov-2) Causing an Outbreak of Pneumonia (COVID-19). *medRxiv* 2020. DOI: 10.1101/2020.02.27.20028787.