

Diagnostyka w kierunku SARS-CoV-2 metodą genetyczną RT-PCR (w czasie rzeczywistym)

Opracowanie:

dr n. med. **Tomasz Ozorowski**

mgr **Anna Mól**

prof. dr hab. med. **Waleria Hryniewicz**

we współpracy z zespołem Laboratorium Mikrobiologicznego

Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego w Poznaniu,

Centralnego Ośrodka Badań Jakości w Diagnostyce Mikrobiologicznej w Warszawie

i Narodowego Programu Ochrony Antybiotyków

Spis treści

Priorytety wykonywania badań	2
Zasady pobierania i transportu materiału do badań	4
Interpretacja ujemnego wyniku badania	9
Piśmiennictwo	10
Załącznik nr 1 – Zlecenie na badanie genetyczne w kierunku SARS-CoV-2	11

Priorytety do wykonywania badań RT-PCR powinny zostać określone w sytuacjach, gdy czas oczekiwania na badanie ulega wydłużeniu ze względu na wysoką liczbę badań i ograniczone możliwości diagnostyczne.

Ustanowienie priorytetów wykonywania badań ma na celu ochronę osób podatnych na ciężki przebieg zakażenia oraz pracowników ochrony zdrowia.

Priorytety wykonywania badań metodą genetyczną RT-PCR (w czasie rzeczywistym) w kierunku SARS-CoV-2

	Priorytety do badań RT-PCR wg WHO i CDC	Priorytety wg IDSA
Priorytet 1	<ul style="list-style-type: none"> – Hospitalizowani pacjenci – Personel medyczny z objawami zakażenia 	<ul style="list-style-type: none"> – Krytycznie chorzy wymagający hospitalizacji na OIT z wirusowym zapaleniem płuc o nieznanym przyczynie lub z niewydolnością oddechową (bez względu na uprzednie podróże lub kontakty) – Każdy (w tym pracownicy ochrony zdrowia) z gorączką lub cechami choroby dolnych dróg oddechowych, które w przeciągu ostatnich 14 dni miały bliski kontakt z pacjentami z laboratoryjnie potwierdzonym COVID-19 (włączając pensjonariuszy domów opieki z potwierdzonym laboratoryjnie zakażeniem) – Chorzy z gorączką lub objawami choroby dolnych dróg oddechowych, którzy mają niedobory odporności (w tym HIV), są w podeszłym wieku lub mają choroby przewlekłe – Chorzy z gorączką lub objawami choroby dolnych dróg oddechowych którzy są kluczowi do zarządzania epidemią, jak pracownicy ochrony zdrowia, decydenci w ochronie zdrowia i inni ważni liderzy
Priorytet 2	<ul style="list-style-type: none"> – Pacjenci w zakładach opieki długoterminowej z objawami – Pacjenci > 65 roku życia z objawami – Pacjenci ze schorzeniami towarzyszącymi – Osoby z objawami, które mają pierwszy kontakt z osobami zakażonymi, np. ratownicy, studenci pomagający w prowadzeniu triage itd. 	<ul style="list-style-type: none"> – Pacjenci hospitalizowani poza OIT oraz pensjonariusze domów opieki z gorączką nieznanego pochodzenia i chorobą dolnych dróg oddechowych
Priorytet 3	<ul style="list-style-type: none"> – Osoby z objawami, których praca jest krytycznie istotna dla utrzymania infrastruktury – Osoby z objawami, którzy nie spełniają kryteriów wymienionych wyżej – Pracownicy opieki zdrowotnej i inne osoby pierwszego kontaktu z chorymi na COVID-19 	<ul style="list-style-type: none"> – Pacjenci spełniający kryteria do włączenia badań w kierunku grypy (np., objawy jak gorączka, kaszel i inne sugerujące zakażenie układu oddechowego oraz następujące: cukrzyca, POChP, niewydolność serca, wiek > 50 lat, stan obniżenia odporności) – Kobiety w ciąży – Objawowe dzieci z grup ryzyka ciężkiego przebiegu zakażenia
Priorytet 4 (bez priorytetu)	<ul style="list-style-type: none"> – Osoby bez objawów, niewymienione wyżej 	<ul style="list-style-type: none"> – Monitorowanie populacyjne wg wskazań autorytetów w obszarze chorób zakaźnych i zdrowia publicznego

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organisation*)

CDC – Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób, USA (*Centers for Disease Control and Prevention*)

IDSA – Amerykańskie Towarzystwo Chorób Zakaźnych (ang. *Infectious Diseases Society of America*)

Zasady pobierania i transportu materiału do badań metodą genetyczną RT-PCR (w czasie rzeczywistym) w kierunku SARS-CoV-2

UWAGA! Właściwy, prawidłowo pobrany i transportowany materiał do badań jest kluczowym elementem diagnostyki laboratoryjnej SARS-CoV-2.

Rodzaje materiałów pobieranych do badania RT-PCR w czasie rzeczywistym dla SARS-CoV-2

Materiałami rekomendowanymi do badań z górnych dróg oddechowych są:

wymazy z nosogardła

wymazy z gardła (tylna ściana) i błon śluzowych nosa **pobierane jednocześnie**

Materiałami z dolnych dróg oddechowych są:

plwocina: tylko pod warunkiem, że pacjent oddaje plwocinę w sposób **nieindukowany**
aspiraty tchawicze lub BAL (popłuczyny oskrzelikowo-pęcherzykowe)

Najbardziej wiarygodne próbki od pacjentów objawowych:

- materiał z nosogardła >95% dodatnich
- wymazy z gardła oraz nosa ~63% dodatnich

Jeśli pobieramy próbkę z gardła, musi ona pochodzić z tylnej ściany gardła.

Wyposażenie pomieszczenia do pobierania próbek od pacjentów ambulatoryjnych:

- Czerwone worki na odpady medyczne
- 70 % środek alkoholowy do dezynfekcji rąk
- Środek alkoholowy do dezynfekcji powierzchni
- Chusteczki nasączone preparatem na bazie alkoholu
- Zestaw środków ochrony indywidualnej
- Zestawy do pobierania próbek
- Opakowania do transportowania próbek do laboratorium

Zestaw środków ochrony indywidualnej:

- Rękawiczki jednorazowego użycia
- Fartuch ochronny:
 - podfoliowany lub flizelinowy z zewnętrznym foliowym
 - zawsze w przypadku wymazu z nosa i gardła
 - zawsze gdy spodziewany jest bezpośredni kontakt ubrania osoby pobierającej z chorym
 - flizelinowy bez podfoliowania
 - w przypadku wymazów z nosogardła i bez kontaktu z chorym
- Maski
 - maskę chirurgiczną należy założyć dbając o jej odpowiednie ułożenie oraz ścisłe dopasowanie do krzywizny twarzy za pomocą wbudowanej metalowej listewki; gumki lub tasiemki maseczki nie powinny się krzyżować; w przypadku pobierania wymazu z gardła, jeżeli są dostępne, należy stosować maski typu FFP2/FFP3 – uwaga: w tej sytuacji stosowanie maski FFP2/FFP2 z przyłbicą nad maską chirurgiczną z przyłbicą może nie być istotne; w przypadku pobierania aspiratu tchawiczego lub BAL-u stosować maski FFP2/FFP3
- Przyłbica lub okulary ochronne lub gogle
- Stosowanie specjalnego obuwia lub ochraniaczy na obuwie nie jest wymagane

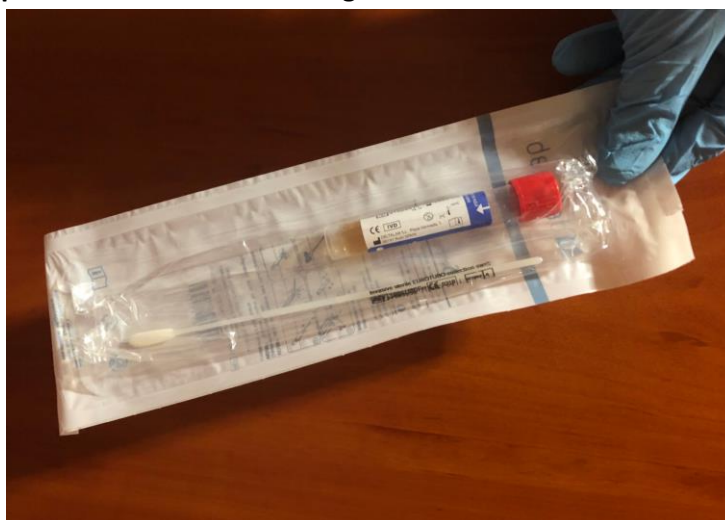
Liczba osób pobierających materiał

Ze względu na ograniczone środki ochrony osobistej należy prowadzić technikę pracy tak, aby do bezpiecznego pobrania wystarczyła jedna osoba stosująca właściwe środki ochrony osobistej.

Zestawy do pobierania próbek

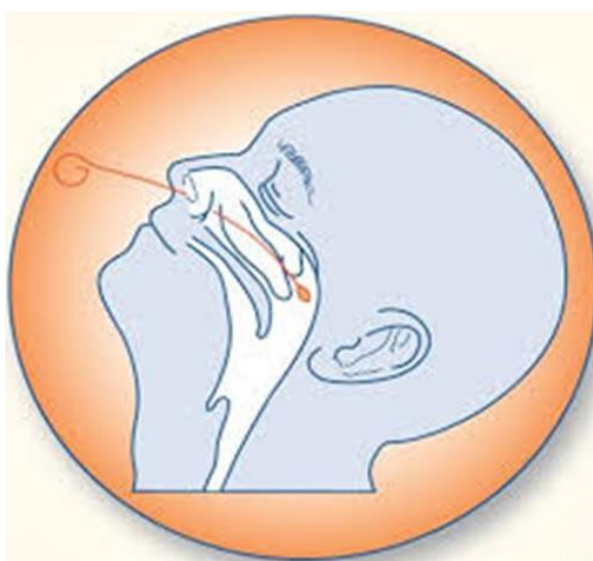
- Komercyjne zestawy do pobierania wymazów z nosogardła
 - zawierają giętką flokowaną wymazówkę oraz probówkę z podłożem wirusologicznym
- Zestawy do pobierania wymazów z gardła i nosa tzw. „home-made”
 - zawierają jałowe flokowane lub standardowe wymazówki wykonane z tworzywa sztucznego z wacikami z dakronu, wiskozy lub sztucznego jedwabiu oraz probówki z jałowym roztworem soli fizjologicznej

Komercyjny zestaw do pobierania materiału z nosogardła



Pobranie materiału z nosogardła:

- tak głęboko jak to możliwe
- oba nozdrza
- rotacyjny obrót wymazówki 3-krotnie lub przez 10 sekund



Pobieranie wymazu z nosa i gardła przy wykorzystaniu zestawie typu „home-made”

Stosowane są:

- Dwie wymazówki, jeżeli dostępne:
 - jedna wymazówką pobieramy wymaz z gardła,
 - drugą z obu nozdrzy przednich.
- Jedna wymazówka:
 - jedną wymazówką najpierw pobieramy wymaz z gardła, a następnie z obu nozdrzy przednich.

Pierwszą wymazówkę należy włożyć do próbówki i złamać wystającą końcówkę, dodać sól fizjologiczną w objętości takiej, aby zalać jedynie waciki; następnie pobrać materiał drugą wymazówką i włożyć ją do tej samej próbówki i szczelnie zamknąć. W przypadku gdy dostępna jest próbówka z roztworem soli fizjologicznej lub płynnym podłożem wirusologicznym należy w niej umieścić obie wymazówki – złamać końcówki i szczelnie zamknąć.

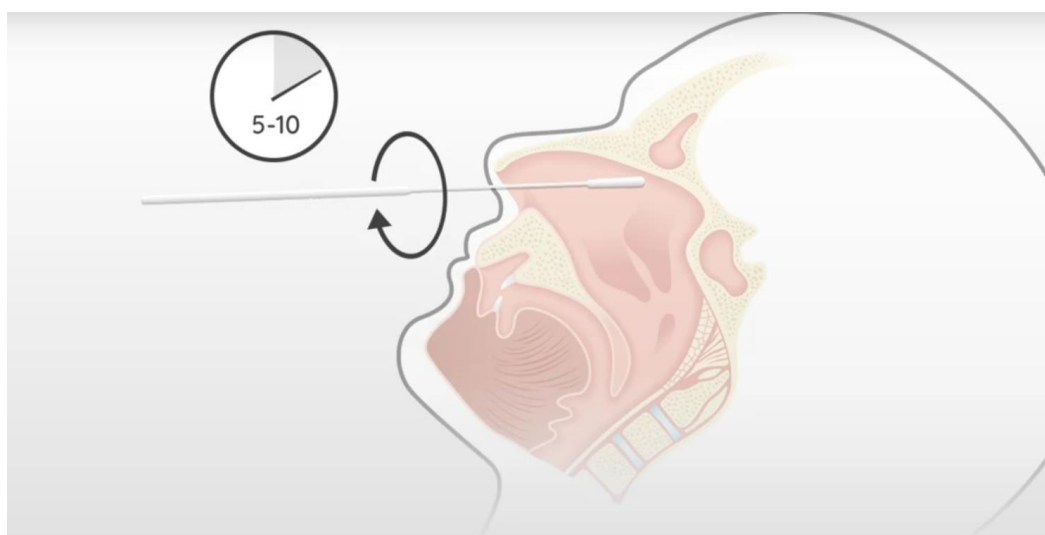
Uwaga: należy zwrócić uwagę na bezpieczne ułamanie końcówki wymazówki.

Zestaw transportowy „home-made”



Pobieranie wymazu z nosa:

1. Delikatnie wprowadzić wymazówkę przez nozdrza przednie tak głęboko jak to możliwe, następnie przez 5 do 10 sekund ruchem rotacyjnym pobrać materiał
2. W ten sam sposób, tą samą wymazówką pobrać materiał z drugiego otworu nosowego



Pobieranie wymazu z gardła – równocześnie przy pobraniu wymazu z nosa:

- Przyciskamy szpatułką język
- Docieramy do tylnej ściany gardła
- Rotacyjnie pocierając tylną ścianę gardła bez dotykania powierzchni jamy ustnej, migdałków i języka



W transportowaniu pobranych próbek do laboratorium obowiązuje zasada potrójnego opakowania:

- **opakowanie pierwsze – zasadnicze** stanowią wymazówki z pobranym materiałem umieszczone w probówce lub pojemniki zawierające materiał z dolnych dróg oddechowych
- **opakowanie drugie** – to zakręcany plastikowy pojemnik najlepiej ze znakiem BIOHAZARD lub próbówka typu falcon
- **opakowanie trzecie – zewnętrzne** stanowi termotorba lub skrzynka transportowa oznaczone piktogramem BIOHAZARD

Osoba pobierająca materiał:

- Przygotowuje zestaw do pobierania oraz transportu próbki
- Opisuje opakowanie zasadnicze danymi pacjenta – imieniem, nazwiskiem i nr PESEL
- Dezynfekuje ręce
- Zakłada fartuch ochronny
- Zakłada maskę
- Następnie zakłada przyłbicę
- Zakłada rękawiczki ochronne jednorazowego użycia – powinny zachodzić na rękawy fartucha

Postępowanie po pobraniu

Osoba pobierająca:

- Zdejmuje rękawiczki i wyrzuca je do worka lub pojemnika na odpady medyczne
- Dezynfekuje ręce i zakłada czystą parę rękawiczek
- Ściąga fartuch ochronny nie dotykając jego powierzchni zewnętrznej i wyrzuca go do pojemnika na odpady medyczne (sposób zdejmowania ubrania ochronnego patrz zalecenia WHO i CDC)
- Ściąga przyłbicę
- Ściąga maskę chirurgiczną i wyrzuca do pojemnika na odpady medyczne
- Dezynfekuje ręce
- Zakłada kolejną parę rękawiczek
- Dezynfekuje przyłbicę przy pomocy chusteczek nasączonych środkiem alkoholowym
- Pakuje pobrany materiał do pojemnika wtórnego
- W opakowaniu wtórnym może znajdować się kilka opakowań zasadniczych
- Dezynfekuje powierzchnię opakowania wtórnego przy pomocy chusteczek nasączonych środkiem alkoholowym i umieszcza go w opakowaniu zewnętrznym
- Zdejmuje rękawiczki
- Dezynfekuje ręce

Do każdej próbki należy dołączyć zlecenie na badanie, które oprócz danych pacjenta powinno zawierać dane jednostki kierującej, lekarza zlecającego i osoby pobierającej materiał oraz datę i godzinę pobrania.

Jeśli jest to możliwe, wskazane jest przesłanie zlecenia w formie elektronicznej.

Transport materiału do laboratorium:

- Materiał powinien zostać niezwłocznie przetransportowany do laboratorium,
- Materiał może być przechowywany w temperaturze 2-8 °C do 72 h lub zamrożony w -70 °C i badany natychmiast po rozmrożeniu. Materiału nie wolno zamrażać ponownie.

Interpretacja ujemnego wyniku badania metodą genetyczną RT-PCR (w czasie rzeczywistym) w kierunku SARS-CoV-2

Czułość badania RT-PCR jest zależna od:

- Jakości pobranej próbki
- Warunków transportu próbki
- Okresu pobrania od początku objawów: największe stężenie wirusa w gardle i nosie jest notowane w okresie 4-10 doby od początku objawów
- Rodzaju próbki: największa dla BAL, najmniejsza dla wymazu z gardła
 - na próbie 1070 próbek pobranych od 205 pacjentów przyjmowanych do szpitala z ostatecznym potwierdzeniem COVID-19 stwierdzono następujące odsetki badań dodatnich:
 - BAL 14 na 15 (93%)
 - Plwocina 72 na 104 (72%)
 - Wymaz z nosa 5 z 8 (63%)
 - Wymaz z gardła 126 z 398 (32%)

Ujemny wynik badania RT-PCR w kierunku COVID-19 może oznaczać, że RNA SARS-CoV-2 w próbce było obecne poniżej poziomu wykrywalności (zależy od czułości testu).

Ujemny wynik badania nie wyklucza zakażenia COVID-19 i nie powinien być traktowany jako jedyne kryterium wykluczania zakażenia.

Ujemny wynik badania RT-PCR powinien być interpretowany w kontekście:

- wywiadu epidemiologicznego, w szczególności ekspozycji na COVID-19
- obecności objawów klinicznych
- wyniku badania tomografii komputerowej klatki piersiowej

Kiedy wykonywać ponowne badania RT-PCR, jeżeli pierwsze badanie było ujemne?

- Jeżeli pierwsze badanie zostało wykonane nieprawidłowo np. niewłaściwy materiał przestany do badania – kolejne badanie należy zlecić niezwłocznie
- U pacjentów, u których pierwszy wynik jest ujemny a istnieje prawdopodobieństwo zakażenia ocenione na podstawie wywiadu epidemiologicznego, obrazu klinicznego i wyniku badania tomografii komputerowej klatki piersiowej- kolejne badanie zlecić w okresie nie wcześniej niż 48 godz. po pobraniu pierwszej próby
- U pacjentów, u których stwierdzone jest pogorszenie obrazu klinicznego ze strony układu oddechowego – kolejne badanie zlecić w okresie 48 godz. po pobraniu pierwszej próby
- Gdy pacjent podlega intubacji i jest możliwość pobrania materiału z dolnych dróg oddechowych

Piśmiennictwo

- WHO: Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases Interim guidance 19 March 2020
- CDC: Priorities for testing patients with suspected COVID-19, 26 march 2020
- 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).
- CDC: Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)
- CDC: Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)
- CDC: Sequence for Donning and Removing Personal Protective Equipment
- WHO: Infection prevention and control during health care when COVID-19 is suspected
- <https://www.gov.uk/government/publications/wuhan-novel-coronavirus-guidance-for-clinical-diagnostic-laboratories/laboratory-investigations-and-sample-requirements-for-diagnosing-and-monitoring-wn-cov-infection>
- CDC: Fact sheet for healthcare providers. CDC-2019-nCoV Real Time RT-PCR Diagnostic Panel, updated: March 13,2020
- Lippi G., Simundic A., Plebani M.: Potential preanalytical and analytical vulnerabilities in the laboratory diagnosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19), Clin Chem Lab Med. 2020 march 10, 2020
- Sharfstein JM, Becker SJ, Mello MM. Diagnostic testing for the novel coronavirus. J Am Med Assoc 2020. Doi:10.1001/ jama.2020.3864.
- Wang W., Xu Y., Gao R., i wsp.: Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens, JAMA 11 march, 2020
- Surviving Sepsis Campaign: Guidelines on the Management of Critically Ill Adults with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)

**ZLECENIE NA BADANIE GENETYCZNE
W KIERUNKU SARS CoV-2**

- PILNE**
 STANDARD

Badanie pilne: hospitalizowani pacjenci i personel medyczny z objawami zakażenia

Jednostka zlecająca badanie:

Lekarz zlecający badanie:

Nazwisko i imię pacjenta: **Płeć:** kobieta mężczyzna

PESEL **Data urodzenia** Pacjent rozliczany z NFZ Personel medyczny

Adres pacjenta:

Doba hospitalizacji:

Adres mailowy przesłania wyniku* / osoba uprawniona do odebrania wyniku:

Telefon kontaktowy do osoby odpowiedzialnej za odbiór wyniku

*Wynik zostanie przesłany jako zaszyfrowany plik

Rodzaj materiału:

wymaz z nosogardła wymaz z nosa i gardła plwocina BAL aspirat tchawiczy

Imię i nazwisko, NPWZ osoby pobierającej:

Data pobrania:

Godzina pobrania:

Istotne dane kliniczne i epidemiologiczne:

chory, od kiedy, jakie objawy?

kwarantanna od kiedy?.....

kontakt z osobą zakażoną SARS CoV-2 , kiedy?.....

inne

Podpis i pieczętka lekarza zlecającego

Data i godzina przyjęcia próbki do Laboratorium:

Stan próbki:

Nr badania: