

Uruchomienie laboratorium diagnostycznego COVID-19 w szpitalu onkologicznym – przegląd wytycznych oraz doświadczenia własne

Dagmara Michałowska¹, Aleksandra Zagrabka¹, Ewelina Czykałko¹, Natalia Skowrońska¹, Dorota Blomka¹, Krzysztof Szufnarowski¹, Ireneusz Pawlak¹, Adam Maciejczyk^{1,2}, Izabela Łacmańska^{1,3}

¹Dolnośląskie Centrum Onkologii we Wrocławiu, Wrocław

²Katedra Onkologii, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wrocław

³Katedra i Zakład Genetyki, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu, Wrocław

Pierwszy przypadek zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 został potwierdzony w grudniu 2019 roku w mieście Wuhan w Chinach, skąd w ciągu kilku tygodni wirus rozprzestrzenił się po całym świecie. W związku z alarmującym poziomem zakażeń Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization – WHO) ogłosiła 11 marca pandemię SARS-CoV-2. Dynamiczna i bezprecedensowa sytuacja epidemiologiczna wywołała pilną potrzebę wykonywania badań w kierunku SARS-CoV-2 u osób spełniających kryteria przypadku z podejrzeniem COVID-19. Według obecnych zaleceń WHO podstawą rozpoznania aktywnego zakażenia SARS-CoV-2 jest diagnostyka molekularna z zastosowaniem reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkrypcją w czasie rzeczywistym (*real-time reverse transcription, real time* – RT-PCR). Metoda ta jest wysoce specyficzna i czuła, i pozwala na wykrycie w badanej próbce nawet niewielkiej liczby cząsteczek RNA wirusa. Niewątpliwie uruchamianie laboratoriów COVID oraz wdrażanie odpowiednich procedur postępowania ma na celu zwiększenie skuteczności działań w obszarze bezpośredniej walki z pandemią SARS-CoV-2. Populacją szczególnie narażoną na wystąpienie powikłań i zgonu w wyniku zakażenia koronawirusem są pacjenci onkologiczni, dlatego w szpitalach onkologicznych kluczowe jest zapewnienie możliwości szybkiego testowania w kierunku COVID-19. W niniejszej pracy przedstawiono własne doświadczenia oraz merytoryczne i formalne zagadnienia związane z utworzeniem laboratorium do wykrywania zakażenia SARS-CoV-2.

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

Światowa pandemia SARS-CoV-2, którego pierwszy przypadek w Polsce stwierdzono 4 marca 2020 roku, spowodowała, że wiele laboratoriów medycznych stanęło przed koniecznością uruchomienia pracowni ukierunkowanych na diagnostykę zakażenia wirusem SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* – koronawirus wywołujący ciężki zespół niewydolności oddechowej typu drugiego). W tym celu, zgodnie z zaleceniami Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization* – WHO), wykonuje się testy molekularne techniką

real-time RT-PCR (*real-time reverse transcription polymerase chain reaction* – PCR w czasie rzeczywistym z odwrotną transkrypcją), które wykrywają materiał genetyczny wirusa w próbce pobranej od pacjenta [1, 2].

Materiałem do badań w kierunku SARS-CoV-2 są z wyboru próbki z górnych dróg oddechowych (wymazy z nosogardzieli lub z gardła i błon śluzowych) oraz próbki z dolnych dróg oddechowych (aspiraty przeżłuchawicze, popłuczyny oskrzelikowo-pęcherzykowe lub nieindukowana płwocina) [3–6]. Badania

Jak cytować / How to cite:

Michałowska D, Zagrabka A, Czykałko E, Skowrońska N, Blomka D, Szufnarowski K, Pawlak I, Maciejczyk A, Łacmańska I. *The launch of a COVID-19 diagnostic laboratory in an oncology hospital – a review of guidelines and the laboratory team's own experiences.* NOWOTWORY J Oncol 2020; 70: 262–266.

molekularne są niezbędne, aby wykryć zakażenie wirusem SARS-CoV-2. Obecnie potwierdzona liczba przypadków w kraju przekracza 93 tysiące (stan na dzień 1 października 2020 roku) i jest wynikiem działalności ponad 197 laboratoriów. Oznacza to, że w krótkim czasie wiele laboratoriów musiało zmienić lub rozszerzyć profil swej działalności oraz dostosować pomieszczenia, sprzęt oraz procedury do molekularnej diagnostyki SARS-CoV-2 metodą *real-time* RT-PCR. W tej pracy przedstawiono własne doświadczenia w uruchomieniu Laboratorium COVID w Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu, które standardowo, przed pandemią, prowadziło diagnostykę mutacji somatycznych i germinalnych u pacjentów onkologicznych poprzez stosowanie technik *real-time* PCR, PCR, sekwencjonowania metodą Sangera oraz sekwencjonowania następnej generacji (*next generation sequencing* – NGS).

Choroby nowotworowe nadal stanowią drugą najczęstszą przyczynę zgonów w Polsce. Rocznie z tego powodu umiera prawie 100 tysięcy chorych, dziennie to około 300 osób. Według zaleceń Polskiego Towarzystwa Onkologicznego (PTO) oraz Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej (PTOK) w czasie trwania pandemii SARS-CoV-2 wszystkie podmioty medyczne, które zajmują się leczeniem onkologicznym, powinny wdrożyć wzmożone procedury bezpieczeństwa oraz bezwzględnie kontynuować opiekę nad pacjentami [7, 8]. Powszechnie wiadomo, że osoby starsze oraz z obniżoną odpornością są najbardziej narażone na rozwinięcie ciężkiej postaci COVID-19 i zgon [9]. Na podstawie danych Krajowego Rejestru Nowotworów obecnie w Polsce z chorobą nowotworową żyje około milion osób, z czego ponad 60% to osoby po 65. roku życia, co oznacza, że jest to populacja chorych obciążona szczególnym ryzykiem powikłań w wyniku zakażenia SARS-CoV-2 [10]. Zgodnie z obowiązującymi rekomendacjami Głównego Inspektoratu Sanitarnego (GIS) i Ministerstwa Zdrowia (MZ) każdy chory z podejrzeniem COVID-19 przed przyjęciem do ośrodka onkologicznego powinien mieć wykonane testy w kierunku SARS-CoV-2 [9]. Obecnie, aby zapewnić chorym kontynuację leczenia w placówkach onkologicznych, kluczowe jest wprowadzanie wzmożonych systemów ochrony pacjentów i personelu, między innymi poprzez uruchamianie laboratoriów prowadzących diagnostykę molekularną SARS-CoV-2.

Kwalifikacja i pobieranie próbek

Próbki do badania w kierunku SARS-CoV-2 pobiera się w osobnym pomieszczeniu, które znajduje się w służbie przeciwepidemicznej na terenie szpitala. Punkt pobierania wymazów jest fizycznie podzielony na 3 strefy:

- strefę pacjenta (pobieranie wymazu),
- strefę pracy (opis, pakowanie próbek),
- strefę przebrania personelu (miejsce na przebranie personelu, podręczny magazyn na środki ochrony indywidualnej (SOI), dodatkowe materiały do wymazów, utylizacji odpadów itp.).

Wszystkie rzeczy w magazynie są podzielone na mniejsze pakiety i zapakowane w szczelne pojemniki umożliwiające łatwą dezynfekcję. Na początku pandemii wymazy były pobierane w dwóch turach: porannej (08:00–10:00) i popołudniowej (13:00–15:00). Poranna tura była przeznaczona dla pacjentów Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu, popołudniowa dla personelu. Obecnie przy stabilnej sytuacji epidemicznej, wymazy pobiera się tylko rano. Wszystkie osoby umawiane są na konkretną godzinę. Personel szpitala i pacjenci są rozdzieleni, podobnie osoby z objawami. Jako ostatnie w kolejce umawiane są osoby na kolejny wymaz, w celu potwierdzenia eradykacji wirusa. Czas pomiędzy wymazami (około 5 min) jest wykorzystywany na dezynfekcję powierzchni, opis i zapakowanie próbek. Próbkę są pakowane zgodnie z wytycznymi Głównego Inspektora Sanitarnego w 3 opakowania i przechowywane w lodówce (znajdującej się w punkcie pobrań) [5]. Wymazy można również pobrać na każdym oddziale, w którym pracują osoby przeszkolone w ich pobieraniu. Grafik osób pracujących w punkcie pobrań jest układany z miesięcznym wyprzedzeniem. Do osób, które nie mogą dojechać do punktu pobrań, sporadycznie wysyła się osobę z personelu środkiem transportu wyznaczonym w szpitalu.

Każda osoba, która pobiera wymazy, jest zabezpieczona w SOI zgodnie z wytycznymi WHO (dotyczy to zarówno punktu pobrań, oddziału, jak i wymazów dokonywanych poza terenem szpitala). Kwalifikację osób do pobrania wymazów koordynuje Zespół Kontroli Zakażeń Szpitalnych, weryfikujący wskazania do wymazu i czas jego wykonania. Listę pacjentów do przyjęcia do szpitala przygotowuje się po kwalifikacji w poradniach i uzyskaniu wstępnego ujemnego wywiadu epidemiologicznego (przez telefon) przez każdy z sekretariatów oddziałowych.

Pomieszczenia i sprzęt laboratorium

Laboratorium COVID wymaga posiadania odizolowanych pomieszczeń 2. klasy bezpieczeństwa (*biosafety level 2* – BSL-2). Idealnie, gdyby znajdowały się w osobnym budynku lub skrzydle, ale ze względu na gwałtowny wybuch pandemii i konieczność szybkiego uruchamiania laboratoriów, w większości przypadków nie jest to możliwe. W laboratorium COVID powinny być co najmniej 2 pomieszczenia – jedno przeznaczone do izolacji kwasów nukleinowych, oddzielone służą, i drugie do przeprowadzania reakcji *real-time* RT-PCR. Rozpakowywanie próbek oraz izolacja wirusowego RNA powinny się odbywać w komorze laminarnej o co najmniej 2. klasie bezpieczeństwa.

Pracownicy laboratorium wykonujący badania muszą być ubrani w odzież ochronną (w opisywanym laboratorium są to kombinezony Tyvek 500 Labo Cat. III, maski FFP2 lub FFP3 oraz przyłbice, rękawice bezpudrowe, czepki i ochraniacze na obuwie). Każde wejście i wyjście z pomieszczeń laboratorium COVID wymaga ścisłego przestrzegania bardzo szczegółowych zasad bezpieczeństwa. W związku z tym, izolację RNA wirusa SARS-CoV-2 prowadzi jeden zespół, kolejno dla wszystkich

wymazów zarejestrowanych w danym cyklu diagnostycznym. Pozwala to ograniczyć konieczność częstej zmiany odzieży ochronnej i przekraczania stref wydzielonych do tej diagnostyki. W początkowym okresie pandemii, od marca do maja 2020 roku, zespół laboratorium podzielono na 2 podzespoły, które wykonywały badania co drugi dzień. Zwiększało to bezpieczeństwo personelu, ponieważ te grupy nie miały ze sobą osobistego kontaktu. Po złagodzeniu restrykcji, od czerwca 2020 roku, powrócono do standardowego sposobu pracy laboratorium.

Oprócz komory laminarnej BSL-2 (model BIO130 Alpina) w wyposażeniu laboratorium COVID znajduje się aparat Maxwell RSC48 (Promega) do automatycznej izolacji materiału genetycznego z 48 próbek jednocześnie. Alternatywnym rozwiązaniem jest manualna izolacja materiału genetycznego, jednakże automatyzacja umożliwia skrócenie czasu potrzebnego do uzyskania wyniku oraz pozwala uzyskać RNA wysokiej jakości. Do izolacji RNA stosowane są zestawy Maxwell Blood DNA kit (Promega) oraz Maxwell RSC Viral RNA kit (Promega) przeznaczone do posiadanego sprzętu. Używa się ich zamiennie, zależnie od dostępności na rynku. Oba zestawy zostały zwalidowane przez producenta do izolacji materiału genetycznego SARS-CoV-2 i ich stosowanie zapewnia wysoką wydajność i dobrą jakość RNA.

Według najnowszego raportu prezentującego wyniki z zewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości badań molekularnych w kierunku SARS-CoV-2, który przygotowały międzynarodowe organizacje: The European Molecular Genetics Quality Network (EMQN) i Quality Control for Molecular Diagnostic (QCMD), odsetek prawidłowych wyników uzyskanych z wykorzystaniem zestawu Promega Maxwell RSC Viral wynosi 95,5% ($n = 176$, $p = 0,644$) [11]. Izolacja jest prowadzona według procedury producenta z jedną modyfikacją: każda zwilżona solą fizjologiczną wymazówka, po pobraniu materiału umieszczona w osobnej, suchej próbówce, jest przenoszona do sterylnej próbki typu eppendorf i odłamywana od patyczka poprzez przytrzymywanie wieczkiem. Następnie do próbki dodawane jest 300 μ l buforowanego roztworu soli fizjologicznej (*phosphate-buffered saline* – PBS). Przy próbkach, które pobrano do soli fizjologicznej, ten krok jest pomijany. Po krótkim zworteksowaniu podaje się 300 μ l buforu do lizy oraz 30 μ l proteinazy. Próbkę jest worteksowana 15 sekund i inkubowana 15 minut w 56°C. Kolejne etapy przebiegają zgodnie z instrukcją producenta.

W opisywanym laboratorium zdecydowano się na ten sposób pobierania i izolacji (w przeciwieństwie do izolacji z roztworu soli fizjologicznej, którym zwykle zalewane są całe wymazówki), ponieważ znacznie ułatwia on przenoszenie materiału biologicznego z długiej próbki, w której umieszczona jest wymazówka, do próbki typu eppendorf oraz ogranicza ryzyko przeniesienia roztworu, w którym potencjalnie obecny jest wirus, na rękawiczki lub powierzchnie robocze. Zgodnie z rekomendacjami Ministerstwa Zdrowia z 21 kwietnia 2020

roku w procesie weryfikacji metody badawczej dopuszczalne jest wykorzystanie zamienników wyposażenia i/lub odczynników bez konieczności przeprowadzenia pełnej walidacji metody, o ile w ocenie laboratorium zastosowanie zamiennika pozwala na prawidłowe wykonanie testu [12].

Stężenie i jakość uzyskanego izolatu ocenia się przy użyciu urządzenia NanoPhotometer N60 (Implen). Próbkę o stężeniach nieoznaczalnych i poniżej 10 ng/ μ l lub złej jakości, są zgłaszane do powtórnego pobrania wymazu. Szczególnie istotne jest to przy zastosowaniu testów diagnostycznych bez kontroli wewnętrznej dla genu referencyjnego (*housekeeping gene*). Zastosowanie jako kontroli wewnętrznej syntetycznego, bakteriofagowego RNA, dodawanego do odczynników, nie pozwala sprawdzić, czy w badanej próbce osiągnięto po izolacji odpowiednie stężenie RNA.

Oprócz podstawowego wyposażenia badawczego oraz standardowego drobnego sprzętu (mikrowirówki, pipety, statywy itp.), którego używa się w laboratoriach molekularnych, i który przeznaczony jest do każdego z dwóch pomieszczeń (sprzęt nie jest przenoszony pomiędzy pomieszczeniami), bardzo użyteczne są przepływowe lampy UV oraz bezpośrednie lampy UV do naświetlania powierzchni. Zaletą tych pierwszych jest to, że mogą być włączone w trakcie pracy diagnostów.

Wymazówki

Wybór wymazówek do pobierania wymazu z nosogardzieli w drugim kwartale roku był ograniczony ze względu na duże zapotrzebowanie na całym świecie. Wymagane są wymazówki wykonane ze sztucznych materiałów (polistyren lub wiskoza). Każde laboratorium powinno po wyborze wymazówek sprawdzić jakość pobieranych próbek i dostosować sposób pobrania do własnych procedur. Z uwagi na fakt, że opisywane laboratorium COVID działało już w marcu 2020 roku, na początku testowano sposób pobrania wymazu z nosogardzieli u osób zdrowych. Izolacji z wymazówki podlega całkowite RNA, także ludzkie, więc ocena stężenia w izolacie pozwoliła stwierdzić, że stosowane wymazówki (Equimed) są odpowiednie. Wymaz pobierano na suchą wymazówkę zwilżoną tuż przed pobraniem kilkoma kroplami soli fizjologicznej. Zalewanie suchych wymazówek 2 ml roztworu soli fizjologicznej powodowało zmniejszenie wydajności izolacji kwasów nukleinowych oraz utrudniało jej pierwszy etap, czyli oddzielanie wymazówek od patyczka. Występowały też trudności w przelewaniu roztworu z próbki z wymazówką do próbki eppendorf. Należy także zwrócić uwagę na jakość pobranego wymazu: wymazy nie powinny być skrwawione lub zanieczyszczone (mogą zawierać inhibitory reakcji PCR). Wymazówki transportowano zgodnie z wytycznymi WHO oraz zasadami opisanymi w dokumencie opublikowanym na stronie Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych (<https://kidl.org.pl/get-file/2671>).

W początkowym okresie pandemii, z powodu ograniczonego wyboru testów dostępnych wtedy na rynku, opisywane laboratorium stosowało test dwugenowy Vitassay qPCR SARS-

-CoV-2 (Vitassay) CE-IVD (geny wirusa SARS-CoV-2: *ORF1ab* [sygnał FAM] i gen *N* [sygnał ROX] oraz kontrola wewnętrzna RNA [sygnał HEX]). Jednak nie rozwiązywało to potrzeby kontroli jakości wyizolowanego materiału genetycznego (dla próbek bez kwasów nukleinowych otrzymywano takie same wyniki jak dla tzw. kontroli zerowych).

Obecnie – ze względu na lepsze parametry – stosowany jest tzw. test trójtargowy (geny wirusa SARS-CoV-2: *ORF1ab* [sygnał FAM] i gen *N* [sygnał ROX] oraz gen ludzki: *GAPDH* [sygnał CY5]) GeneFirst-Novel Coronavirus (COVID-19) Nucleic Acid Test Kit, CE-IVD (GeneFirst). Reakcja przebiega z użyciem aparatu CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Limit detekcji dla testu wynosi 10–100 kopii na reakcję wirusowego RNA. Reakcja jest prowadzona według protokołu producenta dla próbek badanych oraz kontroli dodatniej (zawierającej zsyntetyzowane sekwencje kwasu nukleinowego do detekcji genu *ORF1ab* oraz *N* wirusa SARS-CoV-2, jak również *GAPDH*) i kontroli ujemnej (*non-template control* – NTC). Niewątpliwą zaletą tego zestawu jest detekcja ludzkiego genu *GAPDH*, który umożliwia kontrolę obecności RNA pacjenta w badanej próbce i znacznie zmniejsza ryzyko wyniku fałszywie ujemnego. Ponadto, jak wspomniano wyżej, w każdej próbce przed reakcją oznaczane jest stężenie kwasów nukleinowych. Jednocześnie dla każdej serii próbek, razem ze stosowaniem kontroli pozytywnej i negatywnej dołączonych do zestawu, wprowadzono kontrolę izolacji, tzw. kontrolę zerową, czyli izolację z czystej wymazówki, zwilżonej solą fizjologiczną. Pozwala to ocenić czystość izolacji – wynik dodatni jest dowodem na kontaminację i powoduje konieczność powtórzenia całej serii badań.

Jakość wyizolowanego materiału w dużej mierze zależy od sposobu pobrania wymazu, a ze względu na fakt wspólnej izolacji RNA wirusa oraz pacjenta, mimo oceny stężenia RNA, nie ma pewności, że próbka zawiera kwas nukleinowy SARS-CoV-2. Może to być przyczyną uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych.

Analiza danych uzyskanych z reakcji *real-time* RT-PCR jest prowadzona przy użyciu oprogramowania Bio-Rad CFX Maestro (Bio-Rad) zgodnie z instrukcją producenta. Według instrukcji za dodatnią należy uznać każdą próbkę, dla której dla obu badanych genów obserwuje się krzywe fluorescencji o prawidłowym kształcie i przecinające tzw. próg odcięcia (*threshold*). W próbkach stwierdza się obecność wirusa SARS-CoV-2, jeżeli w kanałach FAM i ROX występuje amplifikacja sygnału z wartością $C_t \leq 39$. Uznaje się, że próbki są ujemne, jeżeli w kanałach FAM i ROX występuje amplifikacja sygnału z wartością $C_t > 39,0$ albo bez C_t . Jeżeli jeden z dwóch badanych elementów w kanałach FAM albo ROX da wynik dodatni, próbka może być pozytywna i należy u pacjenta przeprowadzić ponowne badanie. Istotne jest, by postępować zgodnie z wytycznymi producenta testu, co pozwala ograniczyć ryzyko wyników fałszywie dodatnich. Próbkę z dodatnim sygnałem, jednak poniżej progu, dla których podejrzewany jest początek zakażenia (niska

wiremia) w opisywanym laboratorium zgłaszane są zawsze do drugiego pobrania. W większości takich przypadków (8/14, 57%) analizowanych w miesiącach marzec–kwiecień 2020 roku, po kilku dniach potwierdzano zakażenie (wynik dodatni). Należy też podkreślić, że w wytycznych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny (NIZP-PZH) zwrócono uwagę, iż uzyskanie ujemnego wyniku testu nie jest jednoznaczne z brakiem zakażenia, a wynik testu powinien być interpretowany w odniesieniu do danych klinicznych.

Personel laboratorium

W laboratorium zatrudnieni są diagnostycy laboratoryjni z dużym doświadczeniem w biologii molekularnej, ponadto dwie osoby pracowały wcześniej przy diagnostyce molekularnej wirusów. Doświadczenie tych dwóch pracowników ułatwiło dostosowanie zarówno pomieszczeń, jak i układu sprzętu w pomieszczeniach do diagnostyki SARS-CoV-2, a także przygotowanie własnych procedur dekontaminacji laboratorium opartych na zaleceniach WHO. Ze względu na obowiązek raportowania wyników do różnych instytucji, w pracę Laboratorium COVID zaangażowany jest także liczny personel administracyjny.

Dekontaminacja laboratorium

W związku z dużą liczbą próbek SARS-CoV-2 w jednym czasie i miejscu, rozmiarem genomu wirusa około 30 kb oraz wysoką wiremiami niektórych pacjentów, mimo stosowania wszelkich możliwych zabezpieczeń, w laboratorium molekularnym wykonującym ten rodzaj diagnostyki istnieje wysokie ryzyko kontaminacji próbek i uzyskania wyników fałszywie dodatnich.

Każde laboratorium powinno opracować i wdrożyć procedury ograniczające to ryzyko, np. szczegółowe zasady pracy w obrębie komory laminarnej BSL-2, postępowanie z pozytywnymi próbkami kontrolnymi, postępowanie z próbkami od pacjentów, a także stosować regularną dekontaminację sprzętów i powierzchni.

Poza codzienną, dokładną dezynfekcją należy systematycznie, w wyznaczonym dniu, przeprowadzać generalną dekontaminację pomieszczeń, w tym powierzchni i całego sprzętu. Częstość dekontaminacji powinna wzrastać wraz z liczbą procedowanych próbek. Według wytycznych WHO oprócz 70% etanolu należy do tego celu stosować: 0,1% podchloryn sodu (tzw. preparaty *ace*, *bleach*), nadtlenek wodoru, czwartorzędowe związki amoniowe oraz związki fenolowe (zgodnie z zaleceniami producenta). Dobre rezultaty daje także regularne stosowanie roztworów do dezintegracji kwasów nukleinowych (np. PDS-250 Biosan) – bezpośrednio na powierzchni w komorze laminarnej oraz na drobnym sprzęcie.

Zewnętrzna kontrola jakości

Laboratorium, które wykonuje badania w kierunku zakażenia SARS-CoV-2, musi być wpisane na listę Ministerstwa Zdrowia oraz ma obowiązek poddać się zewnętrznej kontroli jakości prowadzonej nieodpłatnie przez NIZP-PZH w Warszawie. Test

jakości polega na przekazaniu 15 własnych próbek (wymazówek lub podłoża (soli fizjologicznej), w którym umieszczono wymazówkę), w tym 5 próbek dodatnich i 10 ujemnych, wraz z wymaganą dokumentacją oraz informacjami o stosowanej metodzie. Obecnie uruchomione są także międzynarodowe programy kontroli jakości dla diagnostyki SARS-CoV-2. Uczestnictwo w takim programie znacząco wpływa na zwiększenie wiarygodności wyników uzyskiwanych w laboratorium. Międzynarodowe organizacje European Molecular Quality Network (EMQN) i Quality Control for Molecular Diagnostics (QCMD) wprowadziły pilotażowy program zewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości badań diagnostycznych w kierunku SARS-CoV-2. Wyniki badań zostały opublikowane w pracy Mattheuussen i wsp. i przedstawiają podsumowanie kontroli, jaka odbyła się w 365 laboratoriach z 36 krajów [11].

Opisywane Laboratorium ma wdrożony system zarządzania jakością (SZJ) i prowadzi rejestr błędów przedlaboratoryjnych. Każde odstępstwo zgłaszane jest jednostce zlecającej oraz Działowi Epidemiologii w Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu. W przypadku stwierdzenia błędu przedlaboratoryjnego lub laboratoryjnego, jak również wyników nierozstrzygających, zgłaszana jest potrzeba ponownego pobrania wymazu.

Raportowanie wyników

Istotną częścią pracy laboratorium COVID jest raportowanie uzyskanych wyników. Poniżej lista portali oraz instytucji wymagających codziennych raportów.

- Ministerstwo Zdrowia – raport poprzez portal: <https://wsse.mz.gov.pl> (*WSSE 1 razy dziennie* (testy) o godz. 8:00 oraz *WSSE 2 razy dziennie* (kolejki) o godzinie 8:00 i 20:00) zawierający liczbę aktualnie posiadanych testów, liczbę samodzielnie zamówionych testów, liczbę wykonanych testów od pacjentów w ciągu ostatnich 24 godzin, liczbę wyników dodatnich u nowych pacjentów w ciągu ostatnich 24 godzin, liczbę badań możliwych do wykonania jednorazowo, liczbę próbek w trakcie badania, liczbę próbek oczekujących w kolejce oraz liczbę próbek w izolacji.
- Wojewódzka Stacja Sanitarно-Epidemiologiczna (WSSE) – raport o pojawieniu się przypadków dodatnich (3 razy dziennie, o godzinie 7:00, 13:00 i 19:00).

Ponadto, w zależności od uzyskanego wyniku ujemnego lub dodatniego, laboratorium COVID zobowiązane jest do niezwłocznego przekazania informacji o:

- wyniku dodatnim wraz z danymi badanego:
 - zleceniodawcy,
 - szpitalowi jednoimiennemu właściwemu ze względu na miejsce zamieszkania badanego (skan wyniku oraz ZLB.1),
 - Powiatowemu Inspektorowi Sanitarnemu właściwemu ze względu na miejsce zamieszkania badanego (skan wyniku oraz ZLB.1),
 - Wojewódzkiej Stacji Sanitarно-Epidemiologicznej (druk ZLB.1),

- wyniku ujemnym wraz z danymi badanego:
 - zleceniodawcy,
 - Powiatowemu Inspektorowi Sanitarnemu właściwemu ze względu na miejsce zamieszkania badanego (skan wyniku).

Laboratorium COVID zobligowane jest także do przekazywania cotygodniowych sprawozdań z liczby wykonanych testów molekularnych Wojewódzkiemu Inspektorowi Sanitarnemu. W przypadku badań finansowanych przez Narodowy Fundusz Zdrowia laboratorium ma obowiązek uzupełniania danych oraz wpisywania wyników w systemie EWP3 (<https://ewp3.mz.gov.pl>).

Codziennie przygotowywane są również raporty dotyczące uzyskanych wyników oraz raporty o stanie środków ochrony osobistej dla jednostki macierzystej opisywanego laboratorium.

Podsumowanie

Od marca do końca września 2020 roku laboratorium COVID w Dolnośląskim Centrum Onkologii we Wrocławiu wykonało ponad 5700 badań na potrzeby własne szpitala (u pracowników oraz pacjentów, w tym pacjentów hospitalizowanych w okresie pandemii oraz przed przyjęciem). Umożliwiło to sprawne funkcjonowanie szpitala w najgorętszym okresie pandemii, a także po zniesieniu części restrykcji i obecnie jest stałą składową jego działalności.

W przedstawionym artykule opisano najważniejsze aspekty związane z uruchomieniem i prowadzeniem laboratorium COVID w szpitalu onkologicznym. Autorzy mają nadzieję, że ich doświadczenia ułatwią nowym jednostkom planowanie i wdrożenie diagnostyki zakażenia SARS-CoV-2. Jednocześnie, w związku z tym, że w Polsce nikt wcześniej nie zajmował się diagnostyką zakażeń tym mikroorganizmem i doświadczenie w tym zakresie zdobywane jest od połowy marca 2020 roku, autorzy tego artykułu są otwarci na wszystkie konstruktywne, krytyczne uwagi.

Konflikt interesów: nie zgłoszono

Izabela Łacmańska

*Dolnośląskie Centrum Onkologii we Wrocławiu
pl. Hirsfelda 12
53-413 Wrocław*

Otrzymano: 21 września 2020

Zaakceptowano: 29 września 2020

Piśmiennictwo

- Laboratory testing for coronavirus disease 2019 (COVID-19) in suspected human cases. Interim guidance, 2 March 2020, WHO.
- Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19) Interim guidance, 12 February 2020, WHO.
- Katarzyna Dzierżanowska-Fangrat, Konsultant krajowy w dziedzinie mikrobiologii lekarskiej, Zasady pobierania i transportu materiału do badań metodami molekularnymi RT PCR w kierunku SARS-CoV-2, aktualizacja 14.04.2020. <https://kidl.org.pl/get-file/2671> (13.05.2020).

4. Rekomendacje NIZP-PZH w zakresie diagnostyki molekularnej SARS-CoV-2 Warszawa 24.04.2020. <https://www.pzh.gov.pl/wp-content/uploads/2020/04/Rekomendacje-w-zakresie-diagnostyki-molekularnej-SARS-CoV-2.pdf> (13.05.2020).
5. Rekomendacje NIZP-PZH: 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). Warszawa 29.02.2020. <https://www.pzh.gov.pl/wp-content/uploads/2020/02/Wymagania-dotycz%C4%85ce-materia%C5%82u-do-bada%C5%84-COVID-19-29.02.2020.pdf> (13.05.2020).
6. CDC Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).
7. Zalecenia i rekomendacje Polskiego Towarzystwa Onkologicznego dla pacjentów onkologicznych w związku z epidemią wirusa SARS-CoV-2 08.04.2020.
8. Leczenie systemowe pacjentów z rozpoznaniem choroby nowotworowej w kontekście pandemii SARS-CoV-2 — stanowisko Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej 20.03.2020.
9. Guan WJ, Ni ZY, Hu Yu, et al. China Medical Treatment Expert Group for Covid-19. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med.* 2020; 382(18): 1708–1720, doi: 10.1056/NEJMoa2002032, indexed in Pubmed: 32109013.
10. Wojciechowska U, Didkowska J. Zachorowania i zgony na nowotwory złośliwe w Polsce. Krajowy Rejestr Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy. <http://onkologia.org.pl/raporty/> (13.05.2020).
11. Matheeußen V, Corman VM, Donoso Mantke O, et al. RECOVER project and collaborating networks. International external quality assessment for SARS-CoV-2 molecular detection and survey on clinical laboratory preparedness during the COVID-19 pandemic, April/May 2020. *Euro Surveill.* 2020; 25(27), doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.27.2001223, indexed in Pubmed: 32672149.
12. Rekomendacje dotyczące walidacji badań molekularnych w kierunku SARS-CoV2 w sieci laboratoriów COVID, Ministerstwo Zdrowia 21.04.2020.