

# VYSOKORÝCHLOSTNÁ RT-PCR V DIAGNOSTIKE VÍRUSU SARS-COV-2 A MOŽNOSTI JEJ ĎALŠIEHO VYUŽITIA

## High-speed RT-PCR in the diagnostics of the SARS-CoV-2 virus and the possibilities for its further use

Katarína ČUROVÁ<sup>1</sup>, Viera LOVAYOVÁ<sup>1</sup>, Viliam DONIČ<sup>2</sup>, Jozef JUREK<sup>3</sup>, Lenka POTOČŇÁKOVÁ<sup>3</sup>, Leonard SIEGFRIED<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice, prednosta Dr.h.c. prof. MUDr. L. Siegfried, CSc.

<sup>2</sup>Ústav lekárskej fyziológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Košice, prednosta prof. MUDr. V. Donič, CSc.

<sup>3</sup>Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Univerzitná nemocnica L. Pasteura, Košice, prednosta Dr.h.c. prof. MUDr. L. Siegfried, CSc.

### Abstrakt

**Úvod:** Koronavírus SARS-CoV-2 je vírus závažného akútneho respiračného syndrómu, ktorý u ľudí vyvoláva infekčné ochorenie označované COVID-19. V klinickej mikrobiologickej diagnostike vírusu SARS-CoV-2 je reverzná transkriptázová polymerázová reakcia (RT-PCR) považovaná za ideálnu štandardnú metódu.

**Metódy:** V tejto práci sme porovnávali schopnosť štandardnej RT-PCR metódy (FTD™ SARS-CoV-2 Test) a novej vysokorýchlostnej RT-PCR metódy (NextGenPCR™ SARS-CoV-2 Test) detegovať vírus SARS-CoV-2. Do štúdie bolo zahrnutých celkovo 100 pacientov s podozrením na COVID-19, od ktorých boli odoberané výtery z nazofaryngu a analyzované oboma metódami.

**Výsledky:** Počet vzoriek, ktoré boli oboma metódami vyhodnotené ako pozitívne, bol 35 a počet vzoriek vyhodnotených oboma metódami ako negatívne bol 62. Pri troch vzorkách sme zaznamenali odlišné výsledky. Zhoda oboch metód dosiahla úroveň 97 %, klinická citlivosť 92,1 % a klinická špecifickosť 100 %.

**Záver:** Vysokorýchlostná NextGenPCR metóda umožňuje jednoduché spracovanie vzorky, analýzu a vyhodnotenie, poskytuje výsledok v priebehu 57 - 82 minút po odbere vzorky a nevyžaduje si izoláciu RNA. Vzhľadom na dosiahnuté výsledky má táto metóda potenciál uplatniť sa ako diagnostická metóda pri detekcii SARS-CoV-2 aj v klinických laboratóriách. Vo výskume sa môže uplatniť pri detekcii sekvencií génov rôznych mikroorganizmov (tab. 2, lit. 11). Text v PDF [www.lekarsky.herba.sk](http://www.lekarsky.herba.sk).

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** SARS-CoV-2, diagnostika, vysokorýchlostná RT-PCR, NextGenPCR.

Lek Obz 2025, 74 (1): 34-37

### Abstract

**Introduction:** The SARS-CoV-2 coronavirus is a severe acute respiratory syndrome virus that causes the infectious disease known as COVID-19 in humans. In clinical microbiological diagnostics of SARS-CoV-2 virus, the reverse transcriptase polymerase reaction (RT-PCR) is considered the gold standard method.

**Methods:** In this work we compared the ability of the standard RT-PCR method (FTD™ SARS-CoV-2 Test) and the new ultra-fast RT-PCR method (NextGenPCR™ SARS-CoV-2 Test) to detect the SARS-CoV-2 virus. A total of 100 patients suspected of having COVID-19 were included in the study. Nasopharyngeal swabs were collected from each patient and analyzed by both methods.

**Results:** The number of samples evaluated as positive by both methods was 35 and the number of samples evaluated as negative by both methods was 62. We recorded different results for three samples. The agreement between both methods reached the level of 97%, clinical sensitivity of 92.1% and clinical specificity of 100%.

**Conclusion:** The ultra-fast NextGenPCR method allows simple sample processing, analysis, and evaluation, providing a result within 57 - 82 minutes after sample collection and does not require RNA isolation. Considering the results achieved, this method has the potential to be applied as a diagnostic method for the detection of SARS-CoV-2 in clinical laboratories. Additionally, it can be used in research to detect the gene sequences of various microorganisms (Tab. 2, Ref. 11). Text in PDF [www.lekarsky.herba.sk](http://www.lekarsky.herba.sk).

**KEY WORDS:** SARS-CoV-2, diagnostics, ultrafast RT-PCR, NextGenPCR.

Lek Obz 2025, 74 (1): 34-37

### Úvod

Koronavírusy predstavujú veľkú skupinu RNA vírusov so schopnosťou infikovať ľudí aj zvieratá. U ľudí vyvolávajú buď bežné, mierne prebiehajúce respiračné infekcie (nádcha) alebo závažné respiračné infekcie.

Koronavírus SARS-CoV-2 je vírus závažného akútneho respiračného syndrómu, ktorý u ľudí vyvoláva infekčné ochorenie označované COVID-19. Genóm SARS-CoV-2 preukazuje zhodu s genetickou informáciou koronavírusov netopierov na úrovni 96 % a s genetickou informáciou

ciou vírusu SARS-CoV-1 na úrovni 70 %. Vírus sa z človeka na človeka prenáša kvapôčkami aerosólu pri kýchaní, kašľaní, rozprávaní a kontaminovanými rukami. SARS-CoV-2 sa vyznačuje vysokou frekvenciou mutácií, čo vedie k vzniku nových variantov vírusu s odlišnými vlastnosťami a schopnosťou vyvolať epidémiu (1, 2).

Štandardnou diagnostickou metódou pri detekcii SARS-CoV-2 je real-time RT-PCR. Metóda umožňuje detegovať RNA vírusu po jeho izolácii z infekčného materiálu, najčastejšie z nazofaryngového výteru. Výhodou tejto metódy je vysoká citlivosť a špecifickosť, pri väčšine komerčných testov takmer na úrovni 100 %. Fenotypové testy zamerané na dôkaz antigénu vírusu sú podstatne rýchlejšie ako PCR, ich realizácia a vyhodnotenie trvá niekoľko minút, kým pri PCR si tento proces vyžaduje niekoľko hodín, ale ich citlivosť je nižšia. V snahe o rýchlu identifikáciu pôvodcov infekčných ochorení boli vyvinuté aj tzv. point of care testy založené na princípe PCR. Izotermálna amplifikácia RNA si zvyčajne nevyžaduje izoláciu a výsledok poskytuje v priebehu niekoľkých minút. Tieto testy sa využívajú aj pri detekcii SARS-CoV-2 (3, 4).

Vysokorýchlostná RT-PCR je laboratórne vyvinutá metóda, ktorá využíva špeciálny termocyklér (NextGenPCR) so schopnosťou urýchliť niekoľkonásobne priebeh PCR reakcie. Detekcia SARS-CoV-2 je založená na multiplexnej RT-PCR. Nevyžaduje si extrakciu RNA, pracuje priamo so vzorkou, ktorá je tepelne inaktivovaná. Celá reakcia trvá 27 minút a umožňuje vyšetriť súčasne 96 vzoriek (5).

Cieľom tejto práce bolo porovnať vysokorýchlostnú RT-PCR so štandardnou RT-PCR metódou pri diagnostike SARS-CoV-2 z nazofaryngových výterov odoberaných od pacientov s podozrením na ochorenie COVID-19 z hľadiska citlivosti, špecifickosti a časového priebehu RT-PCR reakcie.

## Súbor a metódy

### Klinické vzorky

Do štúdie bolo zahrnutých celkovo 100 pacientov s podozrením na COVID-19, z nich bolo 46 mužov (46 %) a 54 žien (54 %) vo veku od 18 do 92 rokov. Od každého pacienta boli v mobilnom odberovom centre Univerzitnej nemocnice L. Pasteura v Košiciach odoberané dva nazofaryngové výtery a vložené do skúmavky s transportným médiom. Na účely štandardnej RT-PCR bolo použité transportné médium InActiv Blue, na účely vysokorýchlostnej RT-PCR transportné médium Liquid Amies. Vzorky boli odoberané počas mesiacov august a september 2022 a analyzované v priebehu 48 hodín po odbere.

### Príprava vzoriek k RT-PCR analýze

Príprava vzoriek k štandardnej RT-PCR spočívala v izolácii RNA pomocou systému Versant kPCR Molecular System s využitím kitu Versant SP 1.0. K RT-PCR reakcii bolo použitých 10  $\mu$ l eluátu. Príprava vzoriek k vysokorýchlostnej RT-PCR zahŕňala tepelnú inaktiváciu skúmavky so vzorkou v transportnom médiu pri 100 °C 10 minút. Do reakcie boli použité 4  $\mu$ l média.

### Štandardná RT-PCR analýza

Ako štandardná metóda RT-PCR bol použitý FTD™ SARS-CoV-2 test, pri ktorom sú amplifikované sekvencie ORF1ab oblasti a N génu. Reakčná zmes s celkovým objemom 25  $\mu$ l obsahovala 10  $\mu$ l RNA, 12,5  $\mu$ l 2x RT PCR pufor, 1,5  $\mu$ l primér/sonda mix a 1  $\mu$ l 25x RT-PCR enzým. Reakcia prebiehala v termocykléri Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Súčasťou testu boli pozitívne a negatívne kontroly. Výsledky boli vyhodnotené ako CT hodnota (cycle threshold value) podľa odporúčaní výrobcu (CT hodnota  $\leq$  36,4 predstavuje pozitívny výsledok a CT hodnota  $>$  36,4 a negatívny výsledok).

### Vysokorýchlostná RT-PCR analýza

Vysokorýchlostná RT-PCR využíva priamy RT-PCR test (NextGenPCR™ SARS-CoV-2 Test), pri ktorom sú amplifikované sekvencie ORF1ab oblasti a N génu. Reakčná zmes mala celkový objem 20  $\mu$ l a zahŕňala 4  $\mu$ l vzorky, 10  $\mu$ l RT-PCR Chemikálie 2x, 1,6  $\mu$ l SARS-CoV-2/hRNázaP priméry a sondy a 4,4  $\mu$ l H<sub>2</sub>O (na účely PCR). Súčasťou testu boli pozitívne a negatívne kontroly. Mikroplatnička so vzorkami a kontrolami bola prekrytá transparentnou fóliou a zatavená v poloautomatickom zatavovači (NextGenPCR Semiautomatic Heat Sealer, MBS, Netherlands). Následne bola prenesená do termocykléra (NextGenPCR Thermal Cycler, MBS, Netherlands), kde prebiehala RT-PCR s celkovou dĺžkou 27 minút (tab. 1). Po skončení reakcie boli výsledky vyhodnotené na základe nameranej fluorescencie v spektrofotometri (FLUOstar Omega Microplate Reader, BMG Labtech, Germany).

**Tabuľka 1. Program testu vysokorýchlostnej RT-PCR (NextGenPCR™ SARS-CoV-2 Test).**

**Table 1. The program of ultrafast RT-PCR test (NextGenPCR™ SARS-CoV-2 Test).**

Krok	Počet cyklov	Teplota	Čas
Reverzná transkripcia	1	50 °C	5 min
Pre-denaturácia		98 °C	1 min
Úvodná denaturácia	5	98 °C	10 s
Úvodný annealing		60 °C	20 s
Úvodná elongácia		72 °C	3 s
Denaturácia	45	98 °C	5 s
Annealing		60 °C	12 s
Elongácia		72 °C	3 s

## Výsledky

Do tejto štúdie boli zahrnuté neduplicitné vzorky nazofaryngových výterov od 100 pacientov s podozrením na COVID-19, z ktorých bolo 46 mužov (46 %) a 54 žien (54 %). Priemerný vek pacientov bol 54,8 roka.

Počet vzoriek, ktoré boli oboma metódami (štandardná RT-PCR a vysokorýchlostná RT-PCR) vyhodnotené ako pozitívne, bol 35 (35 %), počet vzoriek vyhodnotených oboma metódami ako negatívne bol 62 (62 %). Pri troch vzorkách sme zaznamenali odlišné

výsledky, všetky tieto vzorky boli po štandardnej RT-PCR analýze vyhodnotené ako pozitívne a po vysokorychlostnej RT-PCR analýze ako negatívne. Porovnanie výsledkov oboch testov je v tabuľke 2.

**Tabuľka 2. Zhoda výsledkov medzi vysokorychlostnou (NextGenPCR) RT-PCR analýzou a štandardnou RT-PCR analýzou.**  
**Table 2. Agreement of results between ultrafast (NextGenPCR) RT-PCR analysis and standard RT-PCR analysis.**

		Štandardná RT-PCR			
		pozitívna		negatívna	
		Počet	%	Počet	%
Vysokorychlostná RT-PCR	pozitívna	35	35	0	0
	negatívna	3	3	62	62
Spolu		38	38	62	62

Pri pozitívnych vzorkách analyzovaných štandardnou RT-PCR boli zaznamenané hodnoty CT v rozmedzí od 12 do 34 (priemerná hodnota 21,4). Z nich boli tri vzorky v NextGenPCR vyhodnotené ako negatívne. Hodnoty CT týchto vzoriek boli v rozmedzí 30 – 33 (priemerná hodnota 32). Z týchto analýz a porovnaní oboch metód vyplýva, že klinická citlivosť dosahuje hodnotu 92,1 % (35/38) a klinická špecifickosť hodnotu 100 % (62/62).

Celkový čas štandardnej RT-PCR bol v rozmedzí 209 – 399 minút, podľa počtu vzoriek testovaných naraz v jednej RT-PCR reakcii (20 – 96 vzoriek). Prvým krokom bola príprava vzoriek k izolácii RNA, ktorá spočívala v pipetovaní a centrifugácii (20 – 40 minút). Izolácia RNA systémom Versant kPCR Molecular System trvala 80 minút (20 vzoriek) – 220 minút (96 vzoriek). Príprava platničky k RT-PCR si vyžadovala 10 – 45 minút. Čas RT-PCR reakcie bol 89 minút a vyhodnotenia výsledkov 10 – 20 minút. Celkový čas vysokorychlostnej RT-PCR bol v rozmedzí 57 – 82 minút v závislosti od počtu testovaných vzoriek v jednej reakcii. Otestovali sme aj prácu s plnou platničkou obsahujúcou 96 vzoriek, aby sme mohli vyhodnotiť celkový čas potrebný na vysokorychlostnú RT-PCR. V sledovanom období sme pracovali s počtom 4 – 21 vzoriek v jednej reakcii. Prvým krokom bola inaktivácia vzoriek v trvaní 10 minút. Čas potrebný na prípravu platničky k RT-PCR a na vyhodnotenie bol rovnaký ako pri štandardnej RT-PCR. Čas vysokorychlostnej RT PCR bol 27 minút.

## Diskusia

Rýchla a spoľahlivá diagnostika SARS-CoV-2 vírusu je nenahraditeľná, ak chceme zabezpečiť správny manažment pacientov, zamedziť šíreniu infekcie COVID-19 a prepuknutiu epidémií. Molekulovobiologické testy používané v klinických laboratóriách pracujú so vzorkami z horných dýchacích ciest a využívajú na diagnostiku vírusu špecifické sekvencie genómu. Podľa viacerých štúdií (6, 7) sú sekvencie ORF1ab oblasti a N génu vhodné na potvrdenie SARS-CoV-2. RNA-dependentná RNA polymeráza (kódovaná génom ORF1ab) zodpovedá za transkripciu a transláciu (6). N proteín (kódovaný

N génom) má úlohu v apoptóze infikovaných buniek a v procesoch replikácie, transkripcie a translácie vírusu (8). V tejto štúdií sme porovnali dve amplifikačné metódy zamerané na detekciu oboch génov vírusu SARS-CoV-2 N súčasne v jednej reakčnej zmesi.

Celkovo 100 vzoriek nazofaryngových výterov bolo testovaných a vyhodnotených dvoma RT-PCR testami, štandardným testom (FTD™ SARS-CoV-2 test) a priamym RT-PCR testom (NextGenPCR™ SARS-CoV-2 Test). Odlišné výsledky sme zaznamenali pri troch vzorkách, všetky boli v štandardnej RT-PCR vyhodnotené ako pozitívne a v NextGenPCR ako negatívne. Dôvodom môže byť dvojnásobný výter z nazofaryngu od jedného pacienta, kde nemožno zaručiť, že oba výtery boli zrealizované úplne rovnako. Toto považujeme za limitáciu v našej štúdií.

Pri priamom RT-PCR teste NextGenPCR nie je potrebná izolácia RNA, vzorka je tepelne inaktivovaná s cieľom indukovať lýzu epitelových buniek. Niektoré štúdie uvádzajú, že tento proces môže mať negatívny vplyv na detekciu vírusu, pretože môže znižovať citlivosť amplifikačnej metódy (9, 10). V našej štúdií nezhoda v prípade troch vzoriek bola zaznamenaná pri hodnotách CT v štandardnom RT-PCR teste  $\geq 30$ . V jednej štúdií bola porovnávaná citlivosť troch rôznych testov RT-PCR: štandardný test spojený s izoláciou RNA, test, ktorý si vyžaduje tepelnú inaktiváciu bez izolácie RNA, a test, ktorý si nevyžaduje vôbec žiadnu prípravu vzorky (9). Porovnaním 98 vzoriek pozitívnych v štandardnom teste autori zistili nezhodu medzi štandardným testom a testom, ktorý si vyžaduje inaktiváciu pri 8 vzorkách (8,2 %). Klinická citlivosť v tejto štúdií dosiahla 90,8 %, čo je porovnateľné s NextGenPCR testom v našej štúdií (92,1 %).

Štandardné testy založené na princípe RT-PCR, počet spracovaním vzorky a končiac vyhodnotením výsledkov, si zvyčajne vyžadujú niekoľko hodín. Pri FTD™ SARS-CoV-2 teste je celkový čas analýzy od spracovania po vyhodnotenie 209 – 399 minút (3,5 – 6,7 hodín). Tento čas možno znížiť pri použití robotických automatizovaných systémov na 2,5 – 3,5 hodiny. Pri použití NextGenPCR testu sme výsledky vyhodnotili v priebehu 57 – 82 minút. V štúdií Domnich et al. (9) bol priemerový čas štandardného testu 270 minút, testu, ktorý si vyžaduje tepelnú inaktiváciu bez izolácie RNA, 163 minút a testu, ktorý si nevyžaduje prípravu vzorky, 156 minút.

Vysokorychlostná NextGenPCR metóda už bola v mikrobiológii testovaná s cieľom identifikovať baktérie *E. coli* v moči. Analyzované boli fylogenetické skupiny a gény špecifické pre uropatogénne *E. coli*. Čas amplifikácie bol 16 minút (11). Z tohto hľadiska vysokorychlostná NextGenPCR metóda, ktorá využíva pri PCR špeciálny termocyklér, má potenciál uplatniť sa pri detekcii génov akýchkoľvek mikroorganizmov, nielen vírusu SARS-CoV-2 a baktérie *E. coli*.

## Záver

V tejto štúdií sme porovnávali dve RT-PCR metódy na detekciu sekvencií ORF1ab a N génov vírusu SARS-

CoV-2, vysokorýchlostnú RT-PCR metódu (NextGenPCR) a štandardnú RT-PCR metódu. Z výsledkov vyplýva, že pomocou NextGenPCR bolo 97 % vzoriek vyhodnotených správne. Klinická citlivosť dosiahla hodnotu 92,1 % a klinická špecifickosť hodnotu 100 %. K výhodám vysokorýchlostnej RT-PCR metódy patrí jednoduché spracovanie, analýza a vyhodnotenie, tepelná inaktivácia transportného média so vzorkou a časová úspora v porovnaní so štandardnou RT-PCR. Metóda má potenciál aj v klinickej diagnostike pri detekcii sekvencií génov rôznych mikroorganizmov.\*

**\*Grantová podpora:** Táto práca vznikla s podporou projektu „Návrh a implementácia pokročilých metód ventilačnej liečby a diagnostiky vírusových pneumónií vrátane COVID-19 s možnosťou ich rýchleho osvojenia“, ITMS2014+: 313011ASX1, v rámci operačného programu Integrovaná infraštruktúra financovaného Európskym fondom regionálneho rozvoja.

**Vyhlasenie o ľudských právach:** Autori prehlasujú, že všetky použité postupy boli v súlade s etickými normami príslušnej etickej komisie pre klinickú prácu s ľuďmi a práca bola realizovaná v súlade s Helsinskou deklaráciou.

**Konflikt záujmov:** Autori publikácie vyhlasujú, že nemajú žiadny konflikt záujmov.

## Literatúra

1. HU B, GHUO H, ZHOU P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 2021, 19: 141 – 154.
2. MARKOV PV, GHAFARI M, BEER M, et al. The evolution of SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 2023, 21: 361 – 379.
3. WHO: Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases: interim guidance, 19 March 2020. World Health Organization, 2020. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501>.
4. CDC: Interim Guidelines for Collecting and Handling of Clinical Specimens for COVID-19 Testing, Centers for disease control and prevention, 2022. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/guidelines-clinical-specimens.html>.
5. STRUIJK R, VANDEN OUDEN A, LOUWERSE J, ČUROVÁ K, et al. Ultrafast RNA Extraction-Free SARS-CoV-2 Detection by Direct

RT-PCR Using a Rapid Thermal Cycling Approach. *Diagn Microbiol and Inf Dis* 2023, May, 115975.

6. ASTUTI I, YSRAFIL Y. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes Metab Syndr* 2020, 14 (4): 407 – 412.
7. SHEN L, CUI S, ZHANG D, et al. Comparison of four commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19 in China. *J Clin Lab Anal* 2021, 35 (1): e23605.
8. TAI W, HE L, ZHANG X, PU J, et al. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol Immunol* 2020, 17 (6): 613 – 620.
9. DOMNICH A, DE PACEV, PENNATI BM, et al. Evaluation of extraction-free RT-qPCR methods for SARS-CoV-2 diagnostics. *Arch Virol* 2021, 166: 2825 – 2828.
10. CAMERON A, PECORA ND, PETTINGILL MA. Extraction-free methods for the detection of SARS-CoV-2 by reverse transcription-PCR: a comparison with the Cepheid Xpert Xpress SARS-CoV-2 assay across two medical centers. *J Clin Microbiol* 2021, 59: e02643 – e2720.
11. BRONS JK, VINK SN, DE VOS MGJ, et al. Fast identification of *Escherichia coli* in urinary tract infections using a virulence gene based PCR approach in a novel thermal cycler. *J Microbiol Methods* 2020, 169: 105799.

Do redakcie došlo 28. 9. 2024.

**Adresa pre korešpondenciu:**

**RNDr. Katarína Čurová, PhD.**

Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie LF UPJŠ

Trieda SNP 1

040 11 Košice

E-mail: [katarina.curova@upjs.sk](mailto:katarina.curova@upjs.sk)