

# Zavedenie a vývoj molekulového testovania SARS-CoV-2 v (prostredí) Medirex, a.s. – retrospektívny a prospektívny pohľad

Podobne zásadným spôsobom, akým pandémia COVID-19 zasiahla do fungovania spoločnosti, sa extrémne urgentné požiadavky na rýchlu identifikáciu pozitívnych prípadov podpísali aj na našom pracovnom – laboratórnom živote. Prakticky zo dňa na deň bolo potrebné vyriešiť množstvo administratívnych, logistických, technických, procesných a personálnych problémov so zámerom dosiahnuť čo najefektívnejšie, no zároveň čo najkvalitnejšie riešenia.

Naše dlhoročné skúsenosti a laboratórne kapacity spolu s možnosťou paralelného riešenia vznikajúcich problémov a otázok dávali dobrý predpoklad na to, že podobne ako v ostatných odvetviach laboratórnej medicíny sa aj v tejto oblasti bude môcť potreba rozsiahleho a expresného testovania oprieť o našu spoločnosť. Jednou z oblastí, ktoré si vyžadovali okamžitú pozornosť, bolo zavedenie a optimalizácia nevyhnutných laboratórnych postupov a procesov pre detekciu SARS-CoV-2 vírusu v biologických vzorkách. Na tento účel sme sa v laboratóriách v relatívne krátkom čase museli intenzívne zaoberať výberom, zavedením a optimalizáciou protokolov pre extrakciu nukleových kyselín (RNA) a následnú RT-qPCR metódu, ktorá sa celosvetovo etablovala ako príslušný „zlatý štandard“. Preto sme nielen v prvej fáze zavádzania rutinného testovania, ale aj priebežne testovali, zlepšovali, rozširovali, zrýchľovali, dopĺňali v danom čase používané laboratórne riešenia. V prípade bližšieho špecifikovania zefektívňovania procesov by sme mohli cielene uviesť mnohé príklady, z ktorých výber je prezentovaný ďalej.

Zároveň je našim všeobecným záujmom nielen testovať a implementovať komerčne dostupné riešenia, ale získané know-how sa snažíme ďalej využívať aj na ďalšie zefektívňovanie laboratórnych procesov a tiež pre biomedicínsky výskum, ktorý sa realizuje predovšetkým prostredníctvom partnerskej organizácie **MEDIREX GROUP ACADEMY (MGA)**.

## Extrakcia nukleových kyselín (RNA)

Vzhľadom na prvý krok spracovania primárnych klinických vzoriek, teda extrakciu RNA, sme sa v laboratóriách venovali testovaniu rôznych prístupov spracovania vzoriek. Postupne sa v laboratóriách prešlo z používania „kolónkových“ extrakčných kitov, ktoré mali vysoké nároky na manuálne spracovanie vzoriek (individuálne spracovanie vzoriek), na extrakčné kity založené na extrakcii prostredníctvom magnetických partikul (individuálne aj platničkové spracovanie vzoriek). Takýto prechod bol nevyhnutný z dôvodu zvyšovania výkonu laboratórií predovšetkým preto, že použitie magnetických partikul umožňuje výrazne zjednodušiť zavedenie automatizácie. Vďaka automatizácii sa na jednej strane zrýchlil celý proces, na druhej strane sa tak minimalizuje možnosť individuálnej chyby vnesenej personálom, čo v prípade vydania nesprávneho výsledku, či už falošne pozitívneho (zbytočná karanténa jednotlivca), alebo falošne negatívneho (nežiaduce šírenie ochorenia prostredníctvom neidentifikovaného infekčného jedinca), vedie k významnému zásahu do života nielen na úrovni jednotlivca, ale aj jeho širokého okolia. Pri

## VYPRACOVALI

**RNDr. Gabriel Minárik, PhD.**  
**MEDIREX GROUP ACADEMY n.o.**

**RNDr. Renata Lukačková, PhD.**  
oddelenie lekárskej genetiky  
**Medirex, a.s.**

porovnávaní rôznych komerčne dostupných riešení sme v prvom kole pracovali so 4 kitmi, pričom porovnanie sa v úvode realizovalo prostredníctvom manuálneho spracovania vzoriek. Sumarizácia výsledkov porovnania je uvedená v *tab. 1*.

**Tab. 1:** *Vyhodnotenie porovnania efektivity extrakcie nukleových kyselín pri manuálnom spracovaní vzoriek, „najlepšie“ riešenie z pohľadu senzitivity je uvedené na prvom mieste*

Poradie	Kit	Medián $C_t^*$
1.	MagMAX Viral/Pathogen Kit	28,48
2.	SeraSil-Mag Virus/Pathogen Kit**	29,82
3.	LifeRiver RNA Isolation Kit (Paramagnetic)	30,36
4.	Hui He et al. (2017)***	30,90

\* Medián  $C_t$  – relatívna hodnota vyjadrujúca výťažok extrakcie RNA (nižšia hodnota = vyšší výťažok).

\*\* Výrobca neskôr zmenil názov kitu na SeraXtracta Virus/Pathogen Kit (pozri tab. 2).

\*\*\* V laboratóriu zavedená nekomerčná metóda vychádzajúca z publikácie He H, et al. (2017).

**Tab. 2:** Vyhodnotenie porovnania efektivity extrakcie nukleových kyselín pri automatickom spracovaní vzoriek, „najlepšie“ riešenie z pohľadu senzitivity je uvedené na prvom mieste

Poradie	Kit	Medián C <sub>t</sub> *	Čas/plasty**
1.	MagMax Viral/Pathogen Kit	27,25	27/6
2.	Zybio Nucleic Acid Extraction Kit	27,53	17/5
3.	SeraXtracta Virus/Pathogen Kit	27,76	25/5
4.	RNA Viral Prep 480 Kit	28,86***	15/6
5.	Maxwell HT Viral TNA Kit	29,39	45/6
6.	BeaverBeads Viral DNA/RNA Kit	29,51	30/6
7.	RealBest UniMag Kit	31,04	60/5
8.	viRNAtrap Extraction Kit	31,25	10/5
9.	innuPrep RNA Virus Plus Kit	31,51	50/7
10.	GeneAid Magnetic Beads Virus DNA/RNA Kit	31,62	40/7

\* Medián C<sub>t</sub> - relatívna hodnota vyjadrujúca výťažok extrakcie RNA (nižšia hodnota = vyšší výťažok).  
 \*\* Čas/plasty - časová náročnosť protokolu v minútach/spotreba plastového materiálu.  
 \*\*\* Protokol využíva v porovnaní s ostatnými kitmi polovičný vstupný objem primárnej vzorky, preto je teoretickú hodnotu mediánu C<sub>t</sub> možné upraviť na 27,86.

V druhom kole bolo porovnaných 10 kitov, ktoré vychádzali z komerčných riešení a boli testované v rámci zavádzania a testovania automatizovanej extrakcie nukleových kyselín. Výsledky štúdie porovnania efektivity (rozšírenej o výkonnosť a ekonomický rozmer – čas protokolu a spotreba plastového materiálu) extrakcie nukleových kyselín sú sumarizované v tab. 2.

Na základe uvedených výsledkov sa pri rutinnom laboratórnom spracovaní vzoriek využívajú predovšetkým kity, ktoré sa umiestnili na pozíciách 2 a 3, dôvodom je okrem lepšej ekonomickej a časovej náročnosti aj ich dobrá dostupnosť na lokálnom trhu. Je potrebné podotknúť, že

klúčový parameter (medián C<sub>t</sub>) reprezentujúci relatívnu senzitivitu sa medzi kitmi na pozíciách 1 – 4 prakticky nelíši.

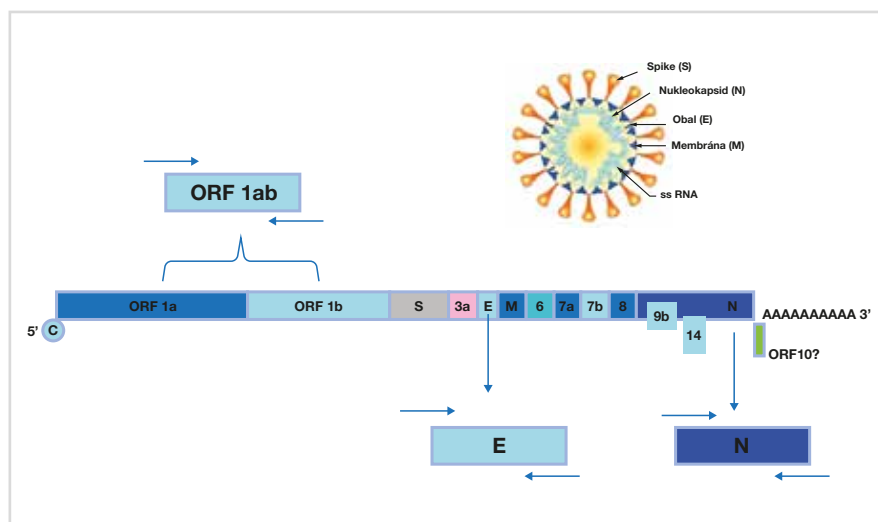
V rámci testovania automatizácie boli v laboratóriách postupne testované a rutinne zavedené tri rôzne automatické extrakčné platformy – MagnaPure od spoločnosti Roche, KingFisher Flex od spoločnosti ThermoFisher a Zybio EXM6000 od spoločnosti Zybio (a tiež Zybio EXM3000 – menej výkonná platforma s rovnakou špecifikáciou od spoločnosti Zybio). V súčasnosti sa vzhľadom na celkovú efektívitu v rutinných laboratóriách využívajú platformy KingFisher Flex a Zybio EXM6000 (prípadne Zybio EXM3000).

### Detekcia vírusovej RNA prostredníctvom RT-qPCR metódy

RT-qPCR – (Quantitative Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) sa považuje za „zlatý štandard“ v diagnostike infekcie spôsobujúcej ochorenie COVID-19.

RT-qPCR je metóda vhodná na priamu detekciu prítomnosti a kvantifikáciu špecifického genetického materiálu – RNA – koronavírusu SARS-CoV-2. Táto technika umožňuje analyzovať prítomnosť SARS-CoV-2 vírusu v izoláte z nasopharyngeálneho výteru, prípadne z iných alternatívnych odberov, ako sú napríklad sliny, kloktacie odberové súpravy alebo výter z rekta. Detekciu vírusovej RNA máme validovanú na všetky spomínané odbery.

Na genetickú detekciu SARS-CoV-2 bolo vyvinutých niekoľko súprav založených na RT-qPCR. Protokol odporúčaný Svetovou zdravotníckou organizáciou bol vyvinutý vo Virologickom ústave univerzitnej kliniky Charité v Berlíne (tzv. berlínsky protokol). RT-qPCR zahŕňa reverznú transkripciu SARS-CoV-2 RNA špecifických oblastí do komplementárnych retazcov DNA (cDNA), po ktorej bezprostredne nasleduje ich PCR amplifikácia. Medzi vírusovými genómami súvisiacimi so SARS objavili tri konzervatívne oblasti: (1) gén *RdRP* (gén pre polymerázu RNA v oblasti otvoreného čítacieho rámca *ORF1ab*), (2) gén *E* (gén pre obalový proteín) a (3) gén *N* (gén pre nukleokapsidový proteín). Test môže byť navrhnutý ako dvojkrokový systém, kde jeden prímer všeobecne deteguje skupinu koronavírusov vrátane SARS-CoV-2 a druhá skupina prímerov špecificky deteguje iba SARS-CoV-2. Touto cestou sme sa vybrali na začiatku pandémie, ale pre časovú náročnosť sme zvolili cestu multiplexnej analýzy (detekcia viacerých cieľov v jednej reakcii – jednom kroku) – na ilustráciu, ktoré gény sú zahrnuté v analýze, je schéma na obr. 1.

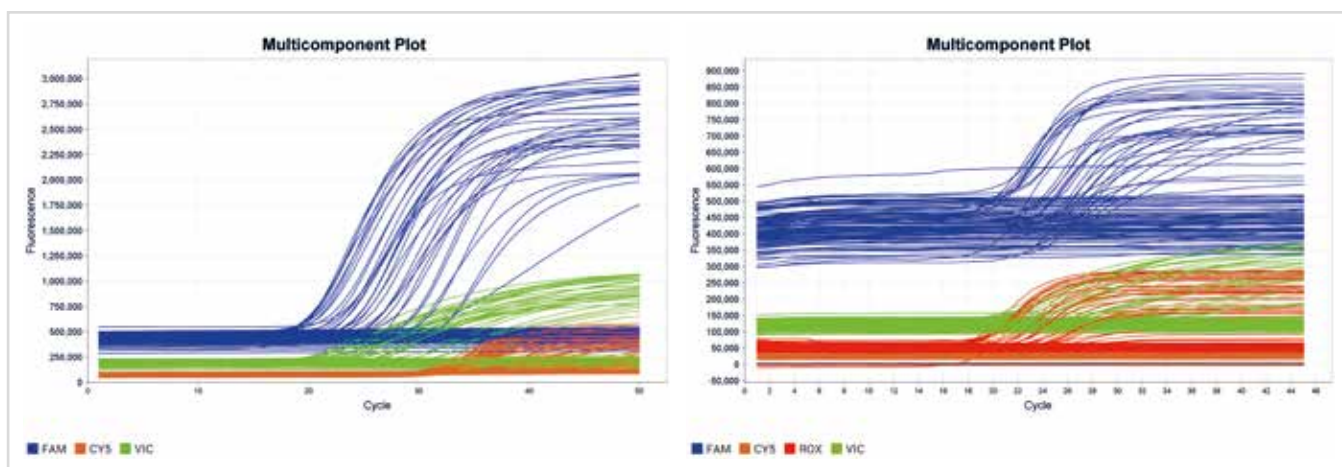


**Obr. 1:** Schéma vírusu a genómu SARS-CoV-2, vyznačenie cieľových sekvencií pre primery a próby pre multiplexnú RT-qPCR – Liferiver Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit.

Vzhľadom na zabezpečenie kvalitného riešenia pre RT-qPCR časť analýzy vzoriek boli pri dodržaní stále platných odporúčaní príslušných autorít v režime testovania a zavádzania do laboratórnej rutiny posudzované viaceré komerčne dostupné kity v kombinácii s rôznymi real-time PCR prístrojmi (Cobas Z480 – Roche, LightCycler 96 – Roche, ABI 7500 – ThermoFisher, QuantStudio 5 – ThermoFisher). Pri rozhodovaní o rutinnom využívaní sa

C				A				B				D			
1	9	17	25	1	9	17	25	1	9	17	25	1	9	17	25
2	10	18	26	2	10	18	26	2	10	18	26	2	10	18	26
3	11	19	27	3	11	19	27	3	11	19	27	3	11	19	27
4	12	20	28	4	12	20	28	4	12	20	28	4	12	20	28
5	13	21	29	5	13	21	29	5	13	21	29	5	13	21	29
6	14	22	30	6	14	22	30	6	14	22	30	6	14	22	30
7	15	23	31	7	15	23	31	7	15	23	31	7	15	23	31
8	16	24	32	8	16	24	32	8	16	24	32	8	16	24	32

Obr. 2: Detekcia SARS-CoV-2 pozitívnych vzoriek na identickom súbore vzoriek. Testované boli parametre senzitivita, špecificita a podiel neinformatívnych výsledkov vizualizované po porovnaní štyroch rôznych komerčne dostupných RT-qPCR kitov (A – D). Červeným podfarbením sú označené pozitívne, zeleným negatívne, oranžovým hranične pozitívne a žltým neinformatívne výsledky. Kity sú zľava doprava zoradené od najsenzitívnejšieho po najmenej senzitivny.



Obr. 3: Významný rozdiel vo fluorescencii cieľovej esej (modré krivky) pri identifikácii rovnakých SARS-CoV-2 pozitívnych vzoriek medzi dvomi porovnávanými RT-qPCR kitmi. Rozdiel je reprezentovaný hodnotami RFU (Y-os) dosahujúcimi v prípade prvého kitu (vľavo) 3 000 000 RFU a v prípade druhého kitu (vpravo) 900 000 RFU.

zohľadňoval celý rad výkonnostných parametrov ako senzitivita, špecificita, podiel neinformatívnych výsledkov multiplexing, interná kontrola (aj v podobe *housekeeping* génu), a tiež za bežnej situácie neočakávané aj dostupnosť na lokálnom trhu. Postupne boli na základe výsledkov testovania v rutinných laboratóriách používané kity Modular Wuhan CoV E-gene (Roche), Modular Wuhan CoV RdRP-gene (Roche), Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Liferiver), gb SARS-CoV-2 Multiplex EndoC (Generi Biotech) a SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit (Zybio). Hodnotené rozdiely v sledovaných výkonnostných parametroch medzi porovnávanými kitmi sú pre detailnejšiu ilustráciu prezentované na obr. 2 – 4.

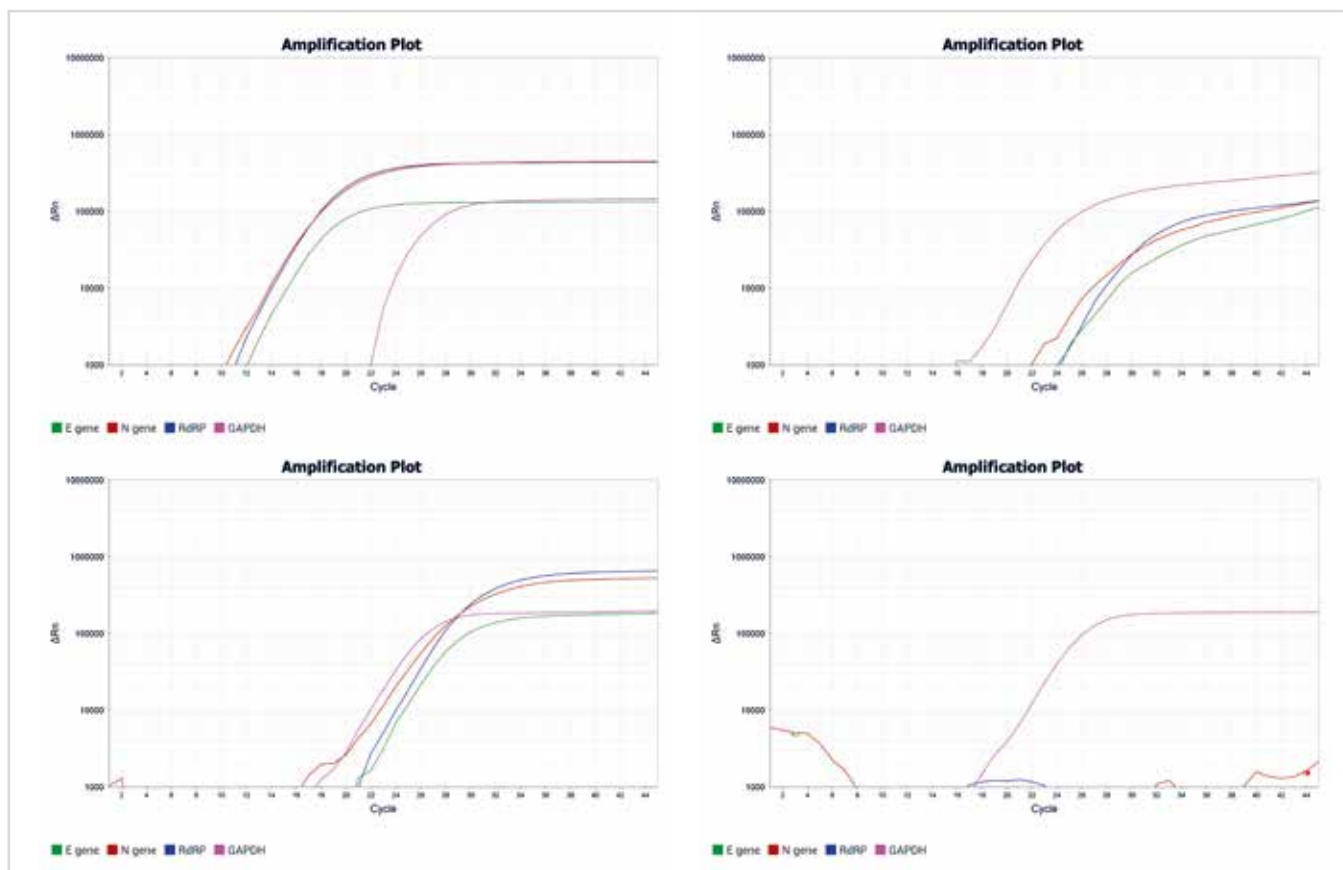
PCR metóda má svoje limitácie, a to napríklad v niektorých prípadoch (skoré štádium infekcie, prípadne pacient tesne pred vyliečením) môžu (z dôvodov nízkej koncentrácie vírusových častíc v respiračnom trakte) byť odobraté vzorky

diagnostikované ako falošne negatívne. Problémy nastávajú pri nízkej hladine vírusu vo vzorke, keď je interpretácia výsledku sťažená v dôsledku detekčného limitu metódy. Je to v prípade, keď hodnota  $C_t$  (threshold cycle – hodnota prahového cyklu PCR, keď exponenciálne stúpa amplifikačná krivka a je možné spoľahlivo hodnotiť pozitívny výsledok) je viac ako 41, čo zodpovedá len desiatkam až stovkám viriónov vo vzorke. Čím viac vírusu je vo vzorke, tým skôr je zachytený amplifikovaný signál (detekcia pri nižšej hodnote  $C_t$ ). Podľa usmernenia MZ SR vydávame pozitívnemu pacientovi  $C_t$  hodnotu len *E génu*. Táto hodnota má pomôcť lekárom zatriediť pacientov do troch skupín s rôznym rizikom infekčnosti, schematické znázornenie je na obr. 5.

Avšak  $C_t$  hodnota je orientačný – relatívny údaj, pokiaľ sa na detekciu nepoužíva kit s endogénnou kontrolou (*housekeeping* génom). Pre potreby normalizácie dát sme zvalidovali SARS-CoV-2 Nucleic Acid Detection Kit od spoločnosti Zybio, ktorého

súčasťou je esej pre *housekeeping* gén, pomocou ktorého je možné normalizovať variabilitu v množstve celkovej extrahovanej RNA, vďaka čomu je možné stanoviť množstvo vírusovej RNA výrazne presnejšie.

Súčasťou analýz realizovaných v rutinnej praxi bolo aj otestovanie relevantného počtu vzoriek s cieľom identifikácie a stanovenia podielu „britského“ variantu SARS-CoV-2 v našej populácii. Výsledky z druhej polovice februára 2021 preukázali vyšší ako 90 % podiel v pozitívne detegovaných prípadoch. Retrospektívnou analýzou anonymizovaných vzoriek sme zistili, že už v druhej polovici novembra 2020 bol podiel týchto prípadov na úrovni viac ako 20 %. Žiaľ, takto retrospektívne získaná veľmi dôležitá informácia už nemožno ovplyvniť vo februári sa zhoršujúcu pandemickú situáciu na Slovensku s následnými extrémne negatívnymi dosahmi na úrovni nemocničnej zdravotnej starostlivosti a tiež vysoké počty úmrtí na ochorenie COVID-19.



Obr. 4: Vizualizácia multiplexnej detekcie SARS-CoV-2 RNA cieľových sekvencií (E gén, N gén, RdRP gén) a housekeeping endogénnej kontroly (GAPDH gén) v jednej reakcii. Zľava doprava sú prezentované vzorky s vysokým, so stredným, s nízkym podielom vírusovej RNA a bez prítomnosti vírusovej RNA v analyzovanej vzorke.

### Vlastné know-how a budúci výskum a vývoj

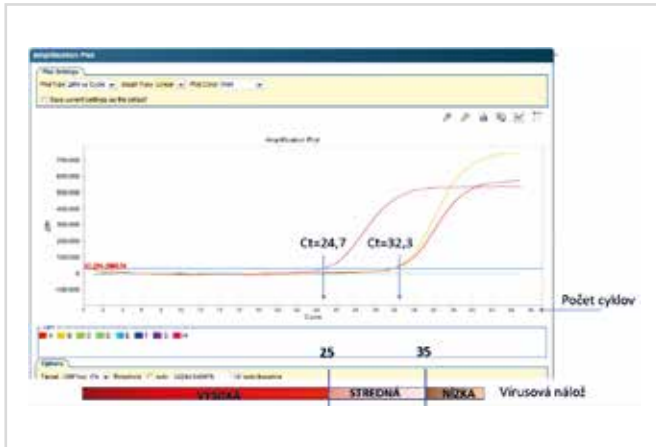
Keďže nie všetky aspekty laboratórneho testovania je možné pokryť štandardnými postupmi optimalizácie, bolo potrebné v rámci neustálych zmien súvisiacich s extrémnym nárastom potrieb testovania reagovať aj na nové problémy, resp. požiadavky. V tejto nadväznosti bolo hneď v úvode nevyhnutné nastaviť procesy v laboratóriách tak, aby bolo možné denne spracovať tisíce (potenciálne infekčných) klinických vzoriek v laboratóriách kategórie BSL2. V čase vzniku pandemickej situácie boli takéto laboratóriá na Slovensku dostupné a rutinne využívané len ojedinele a ich denná kapacita zďaleka nedosahovala potrebnú úroveň. V rámci Medirex, a.s., preto expresne museli vzniknúť takéto laboratóriá, a to aj vzhľadom na ich využívanie vo vysokopriepustnom móde v spojení s automatizáciou kritických krokov v rámci spracovania vzoriek. V súvislosti so zavedením automatizácie bolo dôležité presunúť, resp. rozšíriť personálne kapacity

laboratórií tak, aby v čase najvyššieho využitia RT-qPCR metód v laboratóriách (aktuálne sú tri v rámci Slovenska) bolo možné pracovať v troch zmenách prakticky v „24/7“ pracovnom režime pre zabezpečenie analýzy všetkých vzoriek, ktoré do laboratória boli dodané, do 48 hodín. Toto sa podarilo dosiahnuť s pomocou zapojenia 45 zamestnancov pracujúcich v období najväčšieho dopytu po testovaní v rámci laboratórnej časti. Zároveň, a najmä na interné účely ďalších optimalizácií a zefektívňovania laboratórných procesov neustále pokračovalo testovanie v rutinej diagnostike využívaných procesov, protokolov a kitov. Toto ďalšie zefektívňovanie zahŕňalo okrem iného aj úpravu podmienok realizovaných analýz, napr. skrátenie protokolov a pracovných cyklov, úpravu zloženia kitov, úpravu podmienok RT-qPCR.

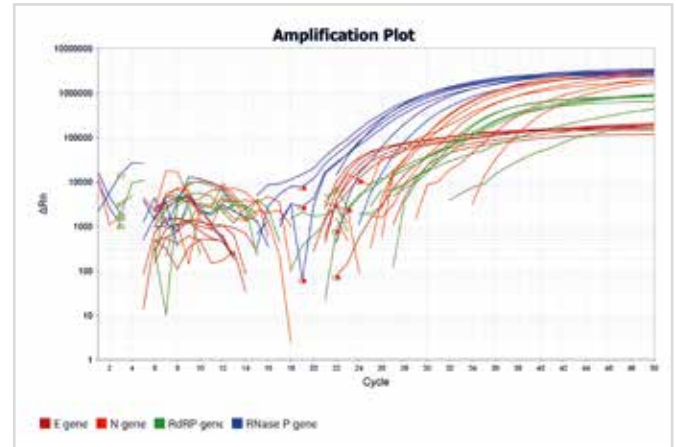
V úvodnej fáze zavádzania SARS-CoV-2 detekčných metód vychádzajúcich principiálne z RT-qPCR metódy vznikol celosvetový problém s dostupnosťou detekčných súprav a v tejto súvislosti bol v našich laboratóriách

pripravený alternatívny „kit“ vyskladaný z jednotlivých komponentov, teda z kategórie „home made“. Tento „kit“ a jeho efektívnosť bola testovaná a z kvalitatívnej stránky bola dosiahnutá v tom čase požadovaná senzitivita umožňujúca vo vzorke detegovať limitné množstvo vírusovej RNA na úrovni 100 kópií/reakcia. Zavedený „kit“ vychádzal z už vyššie spomínaného „berlínskeho“ protokolu. V našich laboratórnych podmienkach bol zavedený protokol v multiplexnom vyhotovení, vizualizácia detekcie SARS-CoV-2 pozitívnych vzoriek týmto „kitom“ je prezentovaná na obr. 6.

Na účely dlhodobej archivácie vybraných vzoriek pre využitie v rámci ďalších vedeckovýskumných projektov v biobanke MGA bolo v rámci minimalizácie zásahu do rutinej analýzy takýchto vzoriek a zároveň zachovania požadovaných kvalitatívnych a kvantitatívnych charakteristík primárnych vzoriek potrebné zaviesť protokol umožňujúci ich aspoň krátkodobú stabilizáciu. V tejto súvislosti boli testované dva rôzne komerčne dostupné stabilizačné



**Obr. 5:** Detekcia troch pozitívnych vzoriek s využitím RT-qPCR (amplifikačné krivky ružovej, žltej a červenej farby). Ružová amplifikačná krivka pretína prah (modrá čiara) skôr, teda má nižšiu hodnotu  $C_t$ , a indikuje vo vzorke viac vírusovej RNA, ako je vo vzorkách so žltou a s červenou krivkou.



**Obr. 6:** Vizualizácia analýzy SARS-CoV-2 pozitívnych vzoriek prostredníctvom alternatívneho „home made“ RT-qPCR kitu.

roztoky – DNA/RNA Shield od spoločnosti Zymo Research a viRNAtrap Lysis Buffer Concentrate od spoločnosti GeneSpector. Výsledky použitia oboch stabilizačných roztokov preukázali zníženie hodnôt  $C_t$  pri stabilizácii a krátkodobom skladovaní (2 – 5 dní pri 2 – 8 °C) o hodnoty v rozpätí od 0,825 do 1,769, teda napriek použitiu stabilizačného roztoku už v krátkodobom horizonte dochádza k zníženiu množstva detegovateľnej vírusovej RNA 1,6-násobne – 3,5-násobne. V súčasnosti pokračujú testy zamerané na ďalšiu optimalizáciu stabilizácie a stanovenie maximálneho časového obdobia, v ktorom je možné požadovanú úroveň stabilizácie primárnych vzoriek zabezpečiť.

## Sumár

Pandémia COVID-19 zasiahla do mnohých oblastí medicíny a zdravotnej starostlivosti na celom svete a jej vývoj sa dá len veľmi ťažko predvídať. Situácia sa komplikuje tým, že vírus sa ako biologický systém neustále vyvíja a pri replikácii neustále vznikajú nové mutácie, ktoré sa v špecifickej konštelácii môžu podpísať pod vznik nových variantov (tzv. britský, juhoafrický, brazílsky), ktoré môžu mať navzájom odlišné prejavy (infekčnosť, mortalita). Kľúčová je preto stále včasná detekcia vírusu SARS-CoV-2 pomocou diagnostických metód, medzi ktorými zlatým štandardom naďalej zostáva RT-qPCR metóda, ktorá je výrazne citlivejšia ako antigénové testovanie a vďaka aktuálne už dobre vybudovanej infraštruktúre laboratórií poskytuje nielen svoj vysoký diagnostický potenciál, ale je aj vysoko spoľahlivá pri

monitorovaní stavu ochorenia COVID-19. Nami využívaná RT-qPCR súprava zachytáva aj doteraz objavené „nové“ varianty (britský, brazílsky a aj juhoafrický). Presné stanovenie diagnózy pomocou validovaného kitu s vysokou senzitivitou a špecificitou je rozhodujúce pre obmedzenie šírenia ochorenia COVID-19. Kit s nízkou senzitivitou nedokáže zachytiť infikovaných jedincov pred nástupom ochorenia s nízkou vírusovou náložou a títo jedinci sú hrozbou pre šírenie nebezpečného vírusu, preto je nesmierne dôležité pracovať s najkvalitnejším a najefektívnejším PCR testom. Počas našej validácie sme vybrali tie najlepšie kity, či už na izoláciu vírusovej RNA a na jeho samotnú detekciu pomocou RT-qPCR, celý proces sme zefektívniť zjednodušením, automatizáciou, časovým skrátením laboratórnych procesov a personálnym

manažmentom. Vďaka týmto nastaveniam dokážeme kvalitne spracovať denne tisíce vzoriek. Moderná molekulárna diagnostika poskytuje základné diagnostické riešenie a umožňujú vykonať veľké množstvo testov v primeranom čase, a tak zabrániť šíreniu infekcie.

## Podakovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Výskum progresívnych metód diagnostiky COVID-19 a biomarkerov umožňujúcich skorú detekciu jedincov so zvýšeným rizikom ťažkého priebehu ochorenia, kód ITMS: 313011ATA2, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## Literatúra

1. He H, et al. Integrated DNA and RNA extraction using magnetic beads from viral pathogens causing acute respiratory infections. *Sci Rep.* 2017 Mar 23;7:45199.
2. Corman VM, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *2020 Euro Surveill.* 2020 Jan;25(3):2000045.
3. Yuzhong Xu, Minggang Cheng, et al. Current approaches in laboratory testing for SARS-CoV-2, *International Journal of Infectious Diseases*, Volume 100, 2020, Pages 7-9, ISSN 1201-9712, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.08.041>.
4. Da Silva SJR, Silva CTAD, et al. Clinical and Laboratory Diagnosis of SARS-CoV-2, the Virus Causing COVID-19. *ACS Infect Dis.* 2020 Sep 11;6(9):2319-2336. doi: 10.1021/acscinfeddis.0c00274. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32786280; PMCID: PMC7441751.
5. Reijns MAM, Thompson L, Acosta JC, et al. A sensitive and affordable multiplex RT-qPCR assay for SARS-CoV-2 detection. *PLoS Biol.* 2020 Dec 15;18(12):e3001030. doi: 10.1371/journal.pbio.3001030. PMID: 33320856; PMCID: PMC771873.