

## Zpráva o výsledcích EHK SARS-CoV-2 - 2020

Vzorky k testování připravila Národní referenční laboratoř pro chřipku a nechřipková virová respirační onemocnění NRL připravila celkem 9 vzorků po 1 ml. Všechny vzorky byly získány po namnožení a izolaci SARS-CoV-2 viru na VERO buňkách (na původní divoké linii). Tento namnožený kmen byl v NRL otestován a naředěn tak, aby nejvyšší koncentrace odpovídala běžnému pozitivnímu klinickému materiálu. Další ředění odpovídalo desítkové řadě. Všechny vzorky byly ředěny virologickým odběrovým médiem připraveným v SZÚ a se všemi pozitivními vzorky bylo manipulováno v BSL3 laboratoři.

Negativní vzorky byly připravovány zcela odděleně v laboratoři pro rutinní provoz, a nikdy nepřišly do styku s virem. Ke vzorku číslo 9 byl přidán virus chřipky izolovaný na kuřecích embryích.

Vzorky byly neinaktivované, živé, infekční, a proto NRL vydala doporučení, aby s nimi bylo zacházeno jako se SARS-CoV-2 pozitivním klinickým materiálem. Koncentrace viru v žádném ze vzorků nepřesáhla koncentraci viru v běžném klinickém materiálu. Vzhledem k velmi nízké koncentraci viru v některých vzorcích, především pak ve vzorku č. 5, byla příprava velmi přísně hlídána tak, aby se všemi vzorky/aliquoty bylo nakládáno za stejných podmínek bez výkyvů teploty. Proto také požadovala NRL, aby transport byl proveden tak, aby nedocházelo k rozmražení vzorků, případně ke kolísání teploty, které by mohly nepříznivě ovlivnit kvalitu materiálu a tedy i dosažených výsledků.

Vzhledem k distribuci infekčního materiálu, byly vzorky baleny tak, aby splňovaly transportní podmínky pro kategorii biologického materiálu spadající pod UN3373. Proto také NRL a SZÚ vyžadovalo zajištění transportu od testujících laboratoří, respektive institucí.

Vzorek číslo 5 byl tak naředěn, že při typickém provedení PCR reakce, bylo ve vyšetřovaném objemu maximálně 5 kopií virové RNA. Proto tento vzorek není zahrnut do ohodnocení laboratoře.

Laboratoře, které využívají více detekčních metod, měly možnost zaslat více výsledků, proto je hodnocení rozděleno na finální a testovací sadu. Cílem testovacích sad bylo získání přehledu o diagnostikách, jejich relevanci a možnost jejich porovnání na stejných vzorcích.

**Souhrnné vyhodnocení:**

Celkem zasláno výsledků	149
Celkem odpovědělo laboratoří:	80
Celkem distribuováno souprav:	86
Celkem k finálnímu k hodnocení	80
Počet testovacích odpovědí	69

**Tabulka č. 1. Předpokládané výsledky a úspěšnost detekce viru – finální sada**

	počet kopií vRNA/20 µl vzorku	Správných odpovědí finálních	Procento úspěšnosti	
vzorek 1	5,00E+03	80	100	
vzorek 2	5,00E+06	80	100	
vzorek 3	<b>negativní</b>	<b>75</b>	<b>93,75</b>	4x pozitivní, 1x nejasný (1 gen negativní, 1 gen pozitivní)
vzorek 4	5,00E+05	80	100	
vzorek 5	5,00E+00	10	12,5	22x nejasný, 48x negativní
vzorek 6	5,00E+02	73 + *1	92,5	1x negativní, 5x nejasný, *1x pozitivní až po zakoncentrování, což zřejmě není běžná manipulace
vzorek 7	5,00E+01	54	67,5	17x negativní, 9x nejasný
vzorek 8	5,00E+04	80	100	
vzorek 9	<b>negativní</b>	<b>77</b>	<b>96,25</b>	3x pozitivní/nejasný

:

**Dodatky**

1 laboratoř 1 vzorek falešně negativní, jeden vzorek pozitivní jako nejasný

1 laboratoř hraniční vzorek negativní, ale negativní vzorek pozitivní

Ct &gt; 40: u laboratoří, které výsledky nekomentovaly, byla tato Ct považována za negativní výsledek, v případě více genů pak hodnoceno jako nejasný

1 laboratoř zaslala 2 sady výsledků označené jako testovací, 1 sada byla změněna na finální

Tabulka č. 2. Předpokládané výsledky a úspěšnost detekce viru – testovací sada

	Počet kopií vRNA/20 µl vzorku	Počet správných odpovědí testovacích	Procento úspěšnosti	
vzorek 1	5,00E+03	65	95,59	1x netestováno, 3x nejasný
vzorek 2	5,00E+06	69	100	
vzorek 3	negativní	66	95,65	2x pozitivní, 1x nejasný
vzorek 4	5,00E+05	68	100	1x netestováno
vzorek 5	5,00E+00	13	19,12	8x nejasný, 47x negativní, 1x netestováno
vzorek 6	5,00E+02	59	85,51	4x nejasný, 6x negativní
vzorek 7	5,00E+01	38	55,07	21x negativní, 10x nejasný
vzorek 8	5,00E+04	68	100,00	1x netestováno
vzorek 9	negativní	66	97,06	1x netestováno, 2x pozitivní

**Hodnocení finální sady**

<b>Maximální počet bodů</b>	<b>16</b>
<b>Průměr bodového zisku</b>	<b>15,23</b>
<b>SD (směrodatná odchylka)</b>	<b>1,22</b>

**Limit pro úspěšné absolvování EHK** **12,79**

Výpočet limitu: hodnota průměru minus (2 SD)

Výsledky ve shodě s předpokládanými byly hodnoceny 2 body, výsledky v neshodě nulovým ziskem. Částečně správné odpovědi byly hodnoceny 1 bodem.

Veškeré informace naznačují a potvrzují teoretický předpoklad, že vstupní a eluční objem nehraje významnou roli v citlivosti záchytu.

Jedenáct laboratoří vyhodnotilo všechny vzorky správně., včetně vzorku s nejnižší koncentrací viru nehodnoceného v EHK  
Čtyři z nich využívají plně automatizovaný detekční systém, 3x GeneXpert (Cepheid), 1x Cobas (Roche). Automatická extrakce NA byla využita v 6 případech, vždy s použitím systému Nextractor – Genolution, v 6 případech byla použita manuální extrakce (výrobci Elisabeth Pharmacon – 1x, Machery Nagel – 1x, Taigen Bioscience – 3x, CatchGene Viral DNA/RNA Kit – 1x).

Pro vlastní diagnostiku byly použity PCR kity od výrobců: Liferiver -7x, Seegene – 2x, Vitassay -2x, Osang Health Care – 1x.

PCR platformy: Rotor gene 600 – 2x, CFX96 – 5x, ELITE InGenius – 1x, MIC qPCR – 3x, Quant Studio 5 – 1x.

Bohužel, v některých případech zřejmě došlo k nedorozumění při vyplňování dotazníku, například jedna laboratoř uvedla, že jako interní kontrolu používá Cy5.

Laboratoře, které užívají jako interní kontrolu úsek lidského genu, často uváděly, že interní kontrola byla nevalidní či negativní. To zcela odpovídá situaci, neboť se jednalo o 3. pasáž virové kultury namnožené na VERO buňkách.

Závěr:

V EHK bylo hodnoceno pouze 8 vzorků, maximální dosažitelný počet bodů byl 16, průměrný zisk 15,23 (SD 1,22), limit pro úspěšné absolvování 12,79 bodů.

Sedmdesát šest laboratoří se úspěšně zhostilo EHK, 51 laboratoří se 100% úspěšností. Tři laboratoře dosáhly varovně nízké procentuální úspěšnosti 81,25% (13 bodů). Tři další laboratoře byly hodnoceny jako úspěšné, přestože úspěšnost v testu byla pouze 75 % (12 bodů) a dle klasické metodiky pro hodnocení EHK by neprošly o 0,79 bodu. Nicméně pokyny pro zadání výsledků v testu Survio nebyly zadány zcela jednoznačně, a proto lze i tyto laboratoře považovat za úspěšné. Pouze jedna laboratoř neprošla, se ziskem pouhých 10 bodů a úspěšností 65,6 %.

Za nejzávažnější chybu ve stanovení lze považovat označení negativních vzorků za pozitivní, případně jen zapsání výsledku (tedy hodnoty Ct) bez dalšího komentáře. Z EHK lze jasně usoudit, že výsledky s Ct vyšším než 39 mohou být falešně pozitivní. Proto u všech stanovení, kdy nejsou všechny geny jasně pozitivní s Ct menším než 38 (bez ohledu na to, jaké úseky RNA daná souprava či in house metoda využívá), nelze takovéto výsledky vydat jako jasně pozitivní, ale je nutné vydat je jako nejasné a vyžádat si opakovaný odběr.

Laboratoře – celkem 3 subjekty, kterým dělal problém vzorek číslo 6, by měly bedlivě projít celý proces a zvážit případné změny vedoucí ke zvýšení citlivosti záchytu.

Dokumenty o absolvování EHK budou rozeslány do konce září. Prosím všechny laboratoře, aby překontrolovaly své kontaktní informace a to tak, aby jako hlavní kontakt byla uvedena zodpovědná osoba za molekulární diagnostiku.

Současně informuji o EHK organizované WHO pro testující národní laboratoře. NRL bude v průběhu září distribuovat celkem 106 panelů (WHO EQAP) o 5 vzorcích, se 4 týdenní lhůtou pro zadání výsledků. Každá laboratoř dostane informace od WHO o způsobu zadávání (obdrží link pro zadávání výsledků), i z tohoto hlediska je důležité nahlásit korektní kontaktní údaje přímo na vedoucího dané laboratoře.

Zpracovala:

RNDr. Helena Jiřincová

Vedoucí Národní referenční laboratoře pro chřipku a nechřipková virová respirační onemocnění  
CEM, SZÚ

V Praze dne: 7. 8. 2020