



Rozšíření nákazy SARS-CoV-2 a postupné vyhlášení epidemie a nouzového stavu představovalo zcela nový druh výzvy pro celý zdravotnický systém v ČR a jednotlivá zdravotnická zařízení. Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha (dále jen ÚVN) ihned po vyhlášení nouzového stavu dne 12. března 2020 se již v sobotu 13. března 2020 zřízením odběrového místa aktivně zapojila do systému testování a screeningu infekce SARS-CoV-2. Nafukovací stan postavený v areálu ÚVN pro odběry nazofaryngeálních stěrů se tak stal jedním z prvních podobných testovacích míst v ČR.¹

Validace použití samoodběrové soupravy GARGTEST pro provedení testu cobas® SARS-CoV-2 Roche

plk. gšt. MUDr. MILOŠ BOHONĚK, Ph.D., Ing. LUDMILA LANDOVÁ, Ph.D.

Oddělení hematologie a krevní transfuze, Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice Praha

Odebrané vzorky byly zpočátku zasílány k laboratornímu vyšetření do externích laboratoří, proto byly zanedlouho po otevření prvního odběrového místa podniknuty nezbytné kroky, aby mohla být zahájena laboratorní vyšetření vzorků v ÚVN co nejdříve. Aktivitu v tomto směru vyvinulo Oddělení hematologie a krevní transfuze (dále jen OHKT), které má několikaletou zkušenost s velkoobjemovým automatizovaným vyšetřováním dárců krve a jejich složek metodou přímé detekce nukleové kyseliny, a volba padla na vysoce kapacitní systém fy Roche cobas® 6800 s právě na evropský trh uvedeným testem RT PCR SARS-CoV-2. Po nutných drobných stavebních úpravách a instalaci v rekordním čase laboratoř na vyšetřování RT PCR SARS-CoV-2 na OHKT zahájila provoz 3. dubna 2020. V té době se jednalo o nejvýkonnější laboratoř na testování RT PCR SARS-CoV-2 v ČR s možnou kapacitou až 1 000 provedených testů za 24 hodin.¹

Kit cobas® SARS-CoV-2 je kvalitativní test pro použití v systému cobas® 6800 a systému cobas® 8800 pro detekci RNA nového koronaviru z roku 2019 (SARS-CoV-2) v individuálních nebo poolovaných vzorcích nazálních, nazofaryngeálních a orofaryngeálních výtěrů odebraných v médiu

Copan Universal Transport Medium System (UTM-RT), médiu BD™ Universal Viral Transport System (UVT), médiu cobas® PCR Media nebo v 0,9% fyziologickém roztoku. Při zpracování se do každého vzorku přidává RNA interní kontrola, která se používá pro monitorování celé přípravy vzorku a procesu amplifikace při PCR. Test navíc využívá externí kontroly (pozitivní kontrolu s nízkým titrem a negativní kontrolu).²

Běžnou a většinovou praxí jsou odběry individuálních vzorků z nazofaryngeálního výtěru, u nově definovaných preventivních vyšetření jsme od června 2021 zavedli poolování s použitím rozpipetovacího automatu Microlab® HAMILTON STAR IVD v systému cobas® Synergy SOFTWARE v poolu 6.

V souvislosti s diskusí o širším zavedení PCR testování ve školách jsme hledali vhodnou odběrovou soupravu na odběry slin, abychom tuto možnost mohli případně nabídnout potenciálním zákazníkům.

Možnou soupravou pro otestování byla zvolena samoodběrová sada GARGTEST na principu kloktání dutiny ústní a hltanu, výrobce IntellMed, s.r.o., Olomouc. Sada je určena k odběru vzorků, které se vyhodnocují na přítomnost virů infikujících dutinu ústní a horní cesty dýchací ve zdravotnické laboratoři metodou přímého průkazu nukleové kyseliny. Virus v transportním médiu zůstává vitální a lze ho použít i pro kultivační vyšetření. Odebraný vzorek je stabilizován speciálním pufrem, není třeba jej uchovávat a převážet do laboratoří při snížené



NÁVOD K POUŽITÍ

Při samotném odběru přesně dodržte uvedené instrukce.

1 Elektronická žádanka
Před provedením testu vyplňte elektronickou žádanku dostupnou na webu GARGTESTU.

2
Opatrně otevřete krabičku a vyndejte obsah. Krabičku nepoškozujte, bude použita pro zpětný transport Vašeho odebraného vzorku.

3 5 ml
Napustte vodu do přiložené odměrky přesně po rysku 5 ml.

4
Zhluboka se nadechněte a zakašlejte. Tím zvýšíte pravděpodobnost záchytu infekce z dolních cest dýchacích.

5
Obsah odměrky vlejte do úst - nepolykejte! Pokud omylem polknete, postup opakujte od bodu 3.

6 20-30 s
Kloktejte v rozmezí 20 až 30 vteřin. Kloktat můžete i přerušovaně, dodržte však min. celkovou doporučenou dobu kloktání.

7
Vyklotaný obsah úst vyplivněte zpět do odměrky.

8
Vyklotaný obsah odměrky opatrně přelijte do přiložené zkumavky. Ve zkumavce je stabilizační prášek, který nesmíte vyspat.

9
Zkumavku pečlivě uzavřete a protřepejte. Na štítek napište své jméno, rodné číslo, u cizinců datum narození.

10
Uzavřenou zkumavku vložte do sáčku společně s absorpční vložkou. Pak uzavřete.

11
Zkumavku v uzavřeném vnějším sáčku vložte do nepoškozené krabičky a uzavřete. Krabičku odneste na odběrové místo, sběrné místo, k lékaři nebo do laboratoře.

Odebraný vzorek uchovejte při teplotě 4-37 °C, je takto stabilní po dobu nejméně 1 týdne. Nevystavujte mrazul

▲ Obr. 1: Návod k použití odběrové soupravy GARGTEST

teplotě. V roztoku virus zůstává dlouhodobě stabilní v širokém rozpětí teplot (4–37 °C) po dobu nejméně 1 týdne.

Jako srovnávací test byl použit rutinně zavedený odběrový set COROTEST VTM (výrobce LabMediaServis s.r.o., Hradec Králové) pro nazofaryngeální odběr vzorku. Jedná se o polypropylenovou zkumavku s transportním médiem s 2 odběrovými tyčinkami. Médium obsahuje BSF: bovinní fetální sérum, guanidin thiokyanát, ATB potlačující růst mikroflóry, PBS pufr (pH = 7,3/25 °C).

Předmět, cíl a metoda validace

Cílem validace bylo provést ověření a potvrzení funkčnosti metody SARS-CoV-2 kitem **cobas**® SARS-CoV-2 (Roche, Rotkreuz, Švýcarsko) s následnou evaluací samoodběrové sady GARGTEST v rámci komparace s nazofaryngeálním odběrem do transportního média. Nedílnou součástí validace bylo provedení analytické návaznosti na testování externích

kontrol kvality INSTAND EQAS Düsseldorf a externích kontrol AccuPLex SARS-CoV-2 (SeraCare).

Výpočty byly prováděny statistickým softwarem Statistica® společnosti StatSoft/DELL (verze 12 – Oklahoma, USA), určeným k biostatistickým a lékařským výpočtům klinických studií.

Rozsah validace

Specifita

Specifita, tj. těsnost souladu mezi jedním výsledkem měření a dohodnutou referenční hodnotou daného parametru. Očekávaný výsledek je 10 negativních vzorků pro daný kvalitativní parametr a minimálně 5 reaktivních vzorků (reaktivní výsledek u vzorků obsahující RNA daného viru).

Detekční limit

Detekční limit, tj. nejnižší spolehlivě detekovatelné množství nukleové kyseliny (NK) ve vzorku, která nemusí být

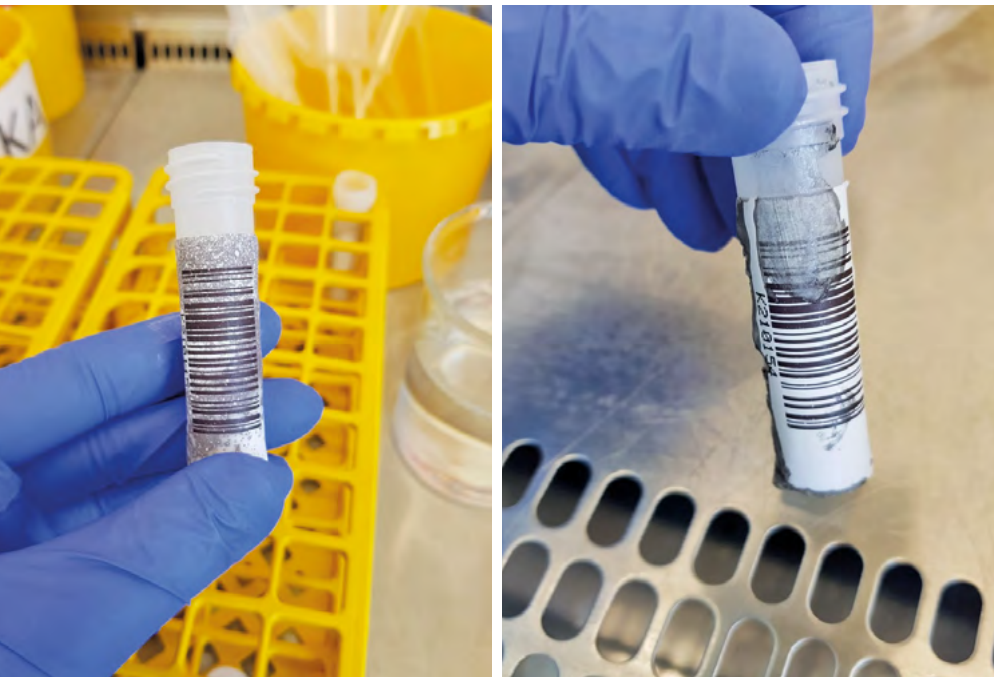
stanovena kvantitativně. Jasně a spolehlivě stanovení NK od matrix vzorku (LoD, limit of detection) analytického postupu je dáno nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale které nemusí být stanovitelné jako exaktní hodnota. Očekávaný výsledek a kritérium přijatelnosti je detekce ve 100% všech spuštěných běhů.

Robustnost

Robustnost, tj. míra schopnosti metody stanovit správné a přesné výsledky při malých změnách pracovních podmínek, ke kterým dochází při rutinní analýze, ale s dodržením pracovního postupu. Očekávaný výsledek a kritérium přijatelnosti je pozitivita všech spike vzorků.

Vyhodnocení validace

V rámci validace bylo odebráno celkem 310 synchronních odběrů (samoodběr vs. nazofaryngeální stěr), z toho 279 bylo zařazeno do studie z důvodu velkého množství neshod (viz dále).



▲ Obr. 2 a 3: Náhledy na poškozené ID barcody



▲ Obr. 4 a 5: Náhledy na precipitáty uvnitř zkumavek

Všechny vzorky byly testovány IDT, následně nazofaryngeální stěr také primárním poolem 6 (viz **tab. 1**).

Vyhodnocení preanalytické fáze

Při příjmu materiálu odebraného do soupravy GARGTEST bylo zjištěno množství neshod (celkem 31):

1) poškození ID barcodu (poškození vodou – postříkání po vyplivnutí nebo

nalévání vody do připraveného kalíšku) – při možném budoucím používání je nutné volit laserový lesklý štítek.

2) četné precipitáty a zbytky jídla uvnitř vlastního vzorku. Ani po ředění a lyzaci nebylo možné některé vzorky změřit – při vlastním měření byla v SW **cobas**® 6800 informace o přítomnosti sraženiny (clotu) nebo poruchy aspirace při pipetování vzorku.

Vyhodnocení kvalitativní metody SARS-CoV-2

Specifita

Použité vzorky byly testované jako negativní a pozitivní (viz **tab. 2–7**).

Závěr vyhodnocení specifity

Test **cobas**® SARS-CoV-2 má 100% specifitu v samoodběrové sadě GARGTEST a skutečně stanovuje negativní výsledek v externích kontrolách AccuPlex.

Výsledek byl pozitivní pouze u 3 vzorků, 276 vzorků bylo negativních. Byla provedena komparace mezi nazofaryngeální odběrovou soupravou COROTEST VTM, kdy všechny vzorky byly změřeny jak v primárním poolu 6, tak i jako IDT. Veškeré pooly a IDT byly negativní. Odchylka v negativitě oproti GARGTESTům může být způsobena např. chybně provedeným nazofaryngeálním stěrem apod.

Specifita je pro COROTEST o 1,075% nižší než u GARGTESTu. Výrobce testu **cobas**® SARS-CoV-2 fa Roche v příbalovém letáku uvádí specifitu testu v poolu 6 100% (95% CI: 83,9–100%), konfidenční interval tak odpovídá našemu zjištění specifity 98,9%.

Vzhledem k malému počtu pozitivních vzorků a všech negativních vzorků v COROTESTu nelze provést statistickou analýzu specifity při porovnání těchto dvou odběrových souprav a vyhodnocení specifity není možné uzavřít.

Detekční limit a analytická senzitivita

Použité vzorky a metodika

Byla použita 1 nezávislá série ředění pozitivních vzorků (STD SZÚ), které byly testovány ve dvou odlišných dnech; celkem změřeno 12 výsledků pro ředící řadu následujícím způsobem: 6 replikátů pro každé ředění – 2 dny – 1 ředící řada. Dále byl použit Accuplex™ SARS-CoV-2 SeraCare, který byl také použit pro vývoj kity Roche, kdy byla do vzorku vody přidána kontrola v poměru 1 : 10 (viz **tab. 8–9**).



Typ testu	Počet neg.	Počet poz.
GARGTEST IDT	276	3
COROTEST VTM IDT	279	0
COROTEST VTM PP6	279	0

▲ Tab. 1: Základní vyhodnocení

Parametr	Počet použitých vzorků ÚVN	Použitá metoda	Reagenční kit cobas® SARS-CoV-2 Lot/Exp.
SARS-CoV-2 RNA +	3		
SARS-CoV-2 RNA -	276	PCR	H093183/31.3.2022

Použitý reagenční kit **cobas®** SARS-CoV-2 nerozlišuje jednotlivé genotypy/varianty/delece atd., pouze detekuje reaktivitu vzorku, jde tedy o kvalitativní metodu.

▲ Tab. 2: Použité reaktivní a negativní vzorky (odběrová souprava GARGTEST)

Reagent lot/exp.	Sample type	Počet vzorků	Výsledek Target 1	Výsledek Target 2	Výsledek externí kontroly TGT1 TGT2	Výsledek interní kontroly
SARS-CoV-2						
H093183/31.3.2022	IDT	276	negative	negative	negative	valid

▲ Tab. 3: Přehled vyšetření – negativní vzorky – **cobas®** 6800 GARGTEST

Reagent lot/exp.	Sample type	Počet vzorků	Výsledek Target 1	Výsledek Target 2	Výsledek externí kontroly TGT1 TGT2	Výsledek interní kontroly
SARS-CoV-2						
H093183/31.3.2022	IDT	279	negative	negative	negative	valid

▲ Tab. 4: Přehled vyšetření – negativní vzorky – **cobas®** 6800 COROTEST VTM

Reagent lot/exp.	Sample type	Počet vzorků	Výsledek Target 1	Výsledek Target 2	Výsledek externí kontroly TGT1 TGT2	Výsledek interní kontroly
SARS-CoV-2						
H093183/31.3.2022	IDT	3	reactive	reactive	reactive	valid

▲ Tab. 5: Přehled výsledků jednotlivých IDT – pozitivní vzorky – **cobas®** 6800 – GARGTEST

Pozit. vzorek	CT1	CT2
1	38,7	38,8
2	38,8	38,9
3	37,9	38,1

▲ Tab. 6: Přehled CT hodnot u pozitivních vzorků

Reagent lot/exp.	Sample type	Počet vzorků	Výsledek Target 1	Výsledek Target 2	Výsledek interní kontroly
SARS-CoV-2					
G030835/30.11.2021	IDT	5	positive	positive	valid
	IDT	5	negative	negative	valid

▲ Tab. 7: Přehled testování na referenčním panelu SARS-CoV-2 AccuPlex™ Verification Reference Material kit



Parametr SARS-CoV-2	Počet replikátů	Metodika	% reaktivních vzorků v cobas® 6800	LOD 95% detekční hranice Roche
Dilution level 1	6	IDT	100	25/32 cps/ml
Dilution level 2	6		100	
Dilution level 3	6		100	
Dilution level 4	6		100	
Dilution level 5	6		100	
Dilution level 6	6		100	

* Vzhledem k vysoké virové náloži v primárním standardu dále ředěn poslední testovaný vzorek 1 : 10 vždy předchozím dilučním levellem až do hodnoty 180 cps/ml.

Parametr SARS-CoV-2 (AccuPlex™)	Počet replikátů	Metodika	% reaktivních vzorků v cobas® 6800	LOD 95% detekční hranice Roche
Dilution level 1–100	6	IDT	100	25/32 cps/ml
Dilution level 2–50	6		100	
Dilution level 3–25	6		75	
Dilution level 4–12,5	6		50	

▲ Tab. 8 a 9: Výsledky testování SARS-CoV-2 cobas® 6800

Závěr vyhodnocení detekčního limitu a analytické senzitivity

U parametru SARS-CoV-2 bylo provedeno ředění vzorků dle postupu v příbalovém letáku. Z těchto naředěných vzorků byly vytvořeny ředící řady, kdy se každé ředění testovalo v 6 replikátech.

Všechny ředící řady v jednotlivých měřeních byly vyhodnoceny procentuálně. Po vyhodnocení výsledků jednotlivých výsledků ředících řad je možné konstatovat, že lze spolehlivě detekovat přítomnost nukleové kyseliny viru kitem cobas® SARS-CoV-2.

Pro stanovení nejnižších detekovatelných dávek (LOD) byly použity referenční panely z externí firmy SeraCare se 100% detekcí do 50 cps/ml, standard SZÚ. Vyhodnocení bylo provedeno dle mezinárodních standardů: jako nejnižší detekovatelná hladina/senzitivita použita hladina viru, kde je detekováno 100 % reaktivit ve všech bězích s použitím 6 replikátů. V našem případě tedy jde o hladinu 50 cps/ml (AccuPlex™).

Lze předpokládat, že další ředění by ukázalo pozitivitu i v dalším násobném ředění, což ukazují hladiny specifity, viz výše.

Kvůli nedostatku materiálu ale nebylo možné tento předpoklad ověřit.

Robustnost

Bylo použito 5 náhodně vybraných negativních vzorků k vytvoření „spike sample“ s přibližným 3násobkem 95% LOD, tj. 150 cps/ml. Všechny vzorky v běhu byly reaktivní.

Závěr vyhodnocení robustnosti

Test cobas® SARS-CoV-2 je vysoce robustní, ve všech námi testovaných vzorcích byla zjištěna reaktivita v obou cílech (ORF1ab, E-gen).

Závěr

Při vyhodnocení preanalytické fáze lze konstatovat, že odběry vzorků na vyšetření PCR SARS-CoV-2 pomocí odběrové soupravy GARGTEST nepředstavují optimální způsob provedení odběru biologického materiálu pro PCR vyšetření, obzvláště v automatizovaném systému (poškozené štítky s ID barcodey, precipitáty a zbytky potravy), což je z velké části dáno laickým samoodběrem, který prakticky vylučuje jakoukoli standardizaci vzorku. Část odebraných vzorků nelze

použít pro vlastní analytickou fázi vyšetření, což následně znehodnocuje celý případný screeningový proces.

Ve validační studii byla prokázána vyšší specifita PCR testu cobas® SARS-CoV-2 (Roche) ve vzorcích odebraných soupravou GARGTEST (o 1,075% více než u vzorků odebraných běžným nazofaryngeálním stěrem soupravou COROTEST). Bohužel toto konstatování je obecné, neboť nelze vyslovit spolehlivý závěr s pouze třemi pozitivními vzorky.

Vzhledem k tomuto nízkému počtu pozitivních vzorků v GARGTESTu a všem negativním vzorkům v COROTESTu nelze provést statistickou analýzu specifity při porovnání těchto dvou odběrových souprav.

Vzorky odebrané soupravou GARGTEST i COROTEST, které byly způsobilé pro analytickou fázi vyšetření, splňují podmínky pro dosažení detekčního limitu, analytické senzitivity a robustnosti a pro detekci přítomnosti nukleové kyseliny viru SARS-CoV-2 kitem cobas® SARS-CoV-2 jsou spolehlivé, nicméně by bylo vhodné provést validační studii s větším množstvím pozitivních vzorků.



plk. gšt. MUDr. Miloš Bohoněk, Ph.D.

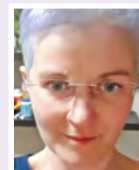
Oddělení hematologie a krevní transfuze, Ústřední vojenská nemocnice Praha – Vojenská fakultní nemocnice Praha
Kontakt: milos.bohonek@uvn.cz

Pracuje jako primář Oddělení hematologie a krevní transfuze ÚVN Praha, je hlavním odborníkem pro hematologii a transfuzní službu Zdravotnické služby AČR a v současnosti též předsedou Společnosti pro transfuzní lékařství ČLS JEP a Společnosti vojenské medicíny ČLS JEP. Ve výzkumné a vědecké činnosti se věnuje zejména otázkám kryokonzervace krve, moderním metodám testování dárců krve a v uplynulém roce mj. i vysoce aktuální problematice výroby tzv. rekonvalescentní plazmy pro léčbu onemocnění COVID-19. Na jaře 2020 se spolu s laboratorním týmem OHKT ÚVN aktivně zapojil do diagnostiky COVID-19, nyní se v této oblasti věnuje zejména otázkám protilátkové odpovědi proti SARS-CoV-2. Zúčastnil se rovněž dvou zahraničních misí AČR – v roce 2013 mise Iraqi Freedom se 6. polní nemocnicí AČR v Basře a na přelomu let 2014/15 mise NATO Winter Race v zemětřesení postiženém Kašmíru (Pákistán).

Ing. Ludmila Landová, Ph.D.

Oddělení hematologie a krevní transfuze, Ústřední vojenská nemocnice Praha – Vojenská fakultní nemocnice Praha
Kontakt: ludmila.landova@uvn.cz

Pracuje jako bioanalytik pro klinickou hematologii a transfuzní službu Oddělení hematologie a krevní transfuze ÚVN Praha, přednáší v rámci oboru Zdravotní laborant na FBMI ČVUT. Podílela se na zavádění PCR metod pro vyšetření SARS-CoV-2 RNA v ÚVN Praha včetně zavedení screeningového poolování vzorků.



Základní informace o IVD zdravotnickém prostředku firmy Roche – analyzátoru **cobas**[®] 6800, testu **cobas**[®] SARS-CoV-2, softwaru **cobas**[®] Synergy SOFTWARE a kultivačním médiu **cobas**[®] PCR Media – najdete na webu go.roche.com/Navody. Podrobné návody k použití naleznete na go.roche.com/CZ_eLabDoc. Základní informace o zmíněných IVD zdravotnických prostředcích jiných dodavatelů žádejte u zodpovědných firem.

LITERATURA

- 1 Bohoněk M. et al, ÚVN Praha a koronavirus, Zpravodaj vojenského zdravotnictví, 1-2/2020: 5–13.
- 2 <https://diagnostics.roche.com/cz/cs/products/params/cobas-sars-cov-2-test.html>.