BEGLEITHEFT

Quantitative Bezugsproben zur Verbesserung der Vergleichbarkeit und Bewertung von Laborergebnissen zum Virusgenom-Nachweis von SARS-CoV-2

Informationen zur Testdurchführung und Anwendung der quantitativen Bezugsproben

inkl. Anhang
Auswertung der Ergebnisse
vom 1. Versand (03.11. 2020) und 2. Versand (17.11.2020)

3. Versand am 15. Januar 2021

Die quantitativen Bezugsproben werden auf Basis einer Kooperation zwischen

- dem Robert Koch-Institut, Abteilung für Infektionskrankheiten und Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene/Hochpathogene Viren,
- dem Konsiliarlabor für Coronaviren am Institut für Virologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin,
- INSTAND e.V. als Referenzinstitution der Bundesärztekammer für die externe Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien und
- der ad hoc-Gruppe der Gemeinsamen Diagnostikkommission der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) und der Gesellschaft für Virologie (GfV)

zur Verfügung gestellt.

Ansprechpartner:
INSTAND-Ringversuchsleiter:
Univ.-Prof. i.R. Dr. Heinz Zeichhardt
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Korrespondenzadresse:
Prof. Dr. Heinz Zeichhardt
IQVD GmbH
Institut für Qualitätssicherung
in der Virusdiagnostik
Potsdamer Chaussee 80, 14129 Berlin
Tel.: +49-(0)30-81054-300; Fax: +49-(0)30-81054-303
Email: Heinz.Zeichhardt@iqvd.de

Stellv. INSTAND-Ringversuchsleiter:
Dr. Martin Kammel
c/o INSTAND e.V.
Ubierstr. 20, 40223 Düsseldorf
Tel.: +49-(0)30-81054-300
Fax: +49-(0)30-81054-303
Email: M.Kammel@iqvd.de

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	Einführung	4
2	Beschreibung und Vorcharakterisierung der quantitativen Bezugsproben	4
2.1	Eigenschaften	4
2.2	Verwendungszweck	5
2.3	Vorcharakterisierung der quantitativen Bezugsproben durch 4 Kooperationspartner inklusive statistische Bewertung	5
3	Probenvorbereitung und Messung der quantitativen Bezugsproben	8
3.1	Vorsichtsmaßnahmen	8
3.2	Probenlagerung	8
3.3	Vorbereitung der Proben zur Bestimmung des Schwellenbereichs	8
3.4	Testdurchführung	8
3.5	Bestimmung eines laborinternen Test- und Ziel-Gen-bezogenen Schwellenbereichs	8
4	Rückmeldung der Ergebnisse für Bezugsprobe 1 und 2 im INSTAND RV-Online-System	9
4.1	Login	9
4.2	Werteingabe	9
4.3	Auswahl der Gruppe 7340	9
4.4	Ergebniseingabe	9
4.5	Eingabe eines zweiten Testsystems	10
5	Bestellung weiterer Probensätze der Bezugsproben 1 und 2	10
6	Danksagung	10
Anhang 1:	Auswertung der Ergebnisse vom 1. Versand (03.11. 2020) und 2. Versand (17.11.2020)	11
A.1	Auswertung der Ergebnisse von 234 Laboratorien für die quantitativen Bezugsproben 1 und 2 (BP 1 und BP 2) - Stand 15. Januar 2021	11
A.1.1	Darstellung der gemessenen Ct-Werte ohne Differenzierung hinsichtlich angewendeten Tests und Zielgen-Region	11
A.1.2	Darstellung der gemessenen Ct-Werte mit Differenzierung der Zielgen-Region im jeweils angewendeten Test	12
A.1.3	Darstellung der Differenzen der eingereichten Ct-Werte für Bezugsprobe 1 (BP 1 und Bezugsprobe 2 (BP 2)	13
A.1.4	Bezug zwischen individuell gemessenem Ct-Wert und SARS-CoV-2-RNA-Last	14

INHALTSVERZEICHNIS (Fortsetzung)

	Seite
A.2 Grafische Darstellung aller eingereichten Ct-Werte für Bezugsprobe 1 (10 000 000 Kopien/ml) und Bezugsprobe 2 (1 000 000 Kopien/ml) differenziert nach Zielgen-Region, Testhersteller und Testname	15
A.2.1 E-Gen – Bezugsproben 1 und 2	15
A.2.2 N-Gen – Bezugsproben 1 und 2	16
A.2.3 ORF1ab – Bezugsproben 1 und 2	17
A.2.4 RdRP-Gen – Bezugsproben 1 und 2	18
A.2.5 S-Gen – Bezugsproben 1 und 2	19
A.2.6 sonstiges/anderes Gen – Bezugsproben 1 und 2	20

1 Einführung

Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit und Bewertung von Laborergebnissen zum Virusgenom-Nachweis von SARS-CoV-2 werden von INSTAND e.V. in einer Zusammenarbeit zwischen den o.g. Kooperationspartnern zwei unterschiedlich konzentrierte quantitative Bezugsproben mit den folgenden SARS-CoV-2-RNA-Lasten angeboten:

Quantitative Bezugsprobe 1 (Ch07469) ca. 10.000.000 Kopien/ml
Quantitative Bezugsprobe 2 (Ch07470) ca. 1.000.000 Kopien/ml

Für Einzelheiten wird auf die beiden von INSTAND e.V. versendeten Ankündigungs-Emails zur Einführung dieser quantitativen Bezugsproben verwiesen:

- INSTAND-Email vom 20.10.2020: Ankündigung für den 1. Versand am 03.11.2020
- INSTAND-Email vom 02.11.2020: Ankündigung für den 2. Versand am 17.11.2020

Diese Ankündigungen geben detaillierte Informationen zu Zweck und Verwendung der quantitativen Bezugsproben. Es wird empfohlen, die Ankündigung zusammen mit dem vorliegenden Begleitheft zu verwenden.

Sollte Ihnen keine Ankündigung vorliegen, wenden Sie sich bitte an die o.g. INSTAND Ringversuchsleiter.

2 Beschreibung und Vorcharakterisierung der quantitativen Bezugsproben

2.1 Eigenschaften

Die quantitativen Bezugsproben 1 und 2 basieren auf Zellkulturüberständen von Vero-Zellen, die mit SARS-CoV-2 infiziert wurden. Die SARS-CoV-2 positiven Zellkulturüberstände wurden hitzeinaktiviert und sind nicht mehr infektiös (Tabelle 1). Zur Verdünnung der SARS-CoV-2 positiven Zellkulturüberstände wurde Zellkulturmedium verwendet. Die quantitativen Bezugsproben 1 und 2 wurden lyophilisiert und sind vor den Testungen in Aqua bidest. (steril, pyrogenfrei, PCR-Grade) bei Raumtemperatur zu resuspendieren (siehe Abschnitt 3).

Die Virus-RNA-Last von SARS-CoV-2 wurde für die quantitative Bezugsprobe 1 auf ca. 10^7 Kopien/ml und für die quantitative Bezugsprobe 2 auf ca. 10^6 Kopien/ml eingestellt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines synthetischen RNA-Quantifizierungsstandards und wurde darüber hinaus aus Messungen mittels digitaler PCR (dPCR) abgeleitet.

Tabelle 1: Eigenschaften der quantitativen Bezugsproben 1 und 2 zum Genomnachweis von SARS-CoV-2

Proben-satz enthält	**Erreger / Matrix**	**SARS-CoV-2-RNA-Last**	**Behandlung der Bezugsproben**
Bezugs-probe 1 Ch07469 (3 Röhr-chen)	SARS-CoV-2 (hitzeinaktiviert; 4 Stunden bei 60 °C) Strain: BetaCoV/ Munich/ ChVir984/2020 lyophilisierte Zellkulturüberstände, verdünnt in Zellkulturmedium	ca. 10^7 Kopien/ml	Probenversand bei Umgebungstemperatur Nach Erhalt Lagerung bei 2-8 °C Resuspendierung der Lyophilisate in 1,1 ml Aqua bidest. (steril, pyrogenfrei, PCR-Grade bei Raumtemperatur) für Details siehe Abschnitt 3
Bezugs-probe 2 Ch07470 (3 Röhr-chen)		ca. 10^6 Kopien/ml	

2.2 Verwendungszweck

Wie in Abschnitt 1.2 der Ankündigung vom 20.10.2020/02.11.2020 mitgeteilt, zeigen Studien und wissenschaftliche Artikel, dass eine erfolgreiche Virusanzucht aus Untersuchungsmaterialien von Patienten mit der Höhe der Virus-RNA-Last in dem entsprechenden Untersuchungsmaterial korreliert (siehe auch Anhang 1 der Ankündigung vom 20.10.2020/02.11.2020).
Auf Basis dieser Untersuchungen wird ein Schwellenbereich für die Virus-RNA-Last von 10^7-10^6 Kopien/ml vorgeschlagen. Oberhalb dieses Schwellenbereichs sind Untersuchungsmaterialien, die solche oder höhere Virus-RNA-Lasten aufweisen, als infektiös und die Patienten als wahrscheinlich kontagiös einzuschätzen (siehe auch https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/N/Neuartiges_Coronavirus/Vorl_Testung_nCoV.html).
Im Umkehrschluss ist es nicht zulässig, aus einer niedrigen SARS-CoV-2-RNA-Last im Untersuchungsmaterial ohne weitere Kenntnisse zum konkreten Fall prinzipiell auf eine niedrige oder keine Infektiosität des Untersuchungsmaterials und somit auf eine niedrige oder keine Kontagiosität des Patienten zu schließen (siehe Abschnitt 1.4 der Ankündigung vom 20.10.2020/02.11.2020).

Jedes Labor erhält mit dieser Aussendung jeweils 3 Röhrchen von Bezugsprobe 1 und 2 zur Analyse mit einem im Labor verwendeten Test zum Genomnachweis von SARS-CoV-2. Die quantitativen Bezugsproben 1 und 2 erlauben eine Zuweisung des o.g. Schwellenbereichs für das im Labor verwendete Testsystem.

Wie in Abschnitt 1.3 der Ankündigung vom 20.10.2020/02.11.2020 ausgeführt, werden die Laboratorien gebeten:

- die Bezugsprobe 1 und Bezugsprobe 2 in ihren routinemäßig angewendeten RT-PCRs (für jede Genregion von SARS-CoV-2 einzeln) zu messen.
- die für jede Genregion erhaltenen Ct (Cp, Cq)-Werte mit der vorgegebenen SARS-CoV-2-RNA-Last von Bezugsprobe 1 (ca. 10^7 Kopien/ml) und Bezugsprobe 2 (ca. 10^6 Kopien/ml) zu korrelieren.
  Die so ermittelten Ct-Werte markieren für die jeweilige Genregion der verwendeten RT-PCR den o.g. Schwellenbereich zur Abschätzung der Infektiosität des Untersuchungsmaterials bei der routinemäßigen Testung von Untersuchungsproben (s. Abschnitt 1.2 der Ankündigung vom 20.10.2020/02.11.2020).
- zukünftig die bei der routinemäßigen Testung von Untersuchungsproben ermittelten Ct-Werte in Relation zu dem definierten Schwellenbereich zu setzen.
- zukünftig eine Abschätzung der Infektiosität der gemessenen Untersuchungsprobe in Bezug auf den o.g. Schwellenbereich zu geben.

Vorschläge für eine "3-stufige Ergebnisbewertung und Befundung von Untersuchungsergebnissen zum Genomnachweis von SARS-CoV-2 für individuelle Untersuchungsmaterialien unter Berücksichtigung des testbezogenen Schwellenbereichs" finden Sie im Abschnitt 1.4 der Ankündigung vom 20.10.2020/02.11.2020.

2.3 Vorcharakterisierung der quantitativen Bezugsproben durch 4 Kooperationspartner inklusive statistische Bewertung

Die Bezugsproben 1 und 2 wurden von 4 der genannten Kooperationspartner mit verschiedenen Testsystemen vorcharakterisiert, um Aussagen zur Probenhomogenität und Abgrenzbarkeit zwischen beiden Proben hinsichtlich ihrer 10-fach unterschiedlichen SARS-CoV-2-RNA-Last zu treffen. Dazu erhielten die 4 o.g. Kooperationspartner (Labor 1-4) jeweils 10 bis 15 zufällig ausgewählte Probenröhrchen und untersuchten diese mit verschiedenen Testsystemen auf verschiedene Ziel-Gene von SARS-CoV-2 (Abbildung 1).

<u>Homogenität</u>

Unabhängig vom eingesetzten Testsystem zeigte sich für jedes der untersuchten Ziel-Gene sowohl für Bezugsprobe 1 als auch für Bezugsprobe 2 eine sehr gute Homogenität (Abbildung 1). Dargestellt ist getrennt für jede der beiden Bezugsproben und jedes der untersuchten Ziel-Gene der jeweilige Mittelwert mit dem dazugehörenden Prädiktionsintervall. Die hier dargestellten

Prädiktionsintervalle beschreiben jeweils denjenigen Bereich um den Ct-Mittelwert, in dem weitere Messwerte mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% liegen würden (Hahn, 1977; Hedderich und Sachs, 2016). **Diese Aussage gilt für eine weitere Messung der jeweiligen Bezugsprobe (i) im selben Laboratorium, (ii) im selben Testsystem und (iii) für dasselbe Ziel-Gen.** Die Prädiktionsintervalle für Bezugsprobe 1 (in Abbildung 1 mit * bezeichnet) sowie Bezugsprobe 2 (in Abbildung 1 mit ** bezeichnet) zeigen, dass jede der beiden quantitativen Bezugsproben jeweils homogen ist.
Des Weiteren ist klar ersichtlich, dass beide Bezugsproben hinsichtlich ihrer Messwerte im jeweils verwendeten Testsystem sicher voneinander abgegrenzt werden können.

<u>Schwellenbereiche für die beiden quantitativen Bezugsproben 1 und 2</u>
Die Ergebnisse in Abbildung 1 werden zur Orientierung dargestellt und zeigen exemplarisch, wie die 4 o.g. Kooperationspartner den angestrebten Schwellenbereich bestimmt haben:

Es zeigt sich, dass unabhängig vom verwendeten Testsystem und Ziel-Gen die ermittelten Ct/Cp/Cq-Ergebnisse für Bezugsprobe 1 (ca. 10^7 Kopien/ml) und Bezugsprobe 2 (ca. 10^6 Kopien/ml) den Faktor 10 für die Abstufung der jeweiligen SARS-CoV-2-RNA-Last wiedergeben. (Abbildung 1). Der Faktor 10 spiegelt sich in den ermittelten Ct-Ergebnissen mit einem theoretischen Differenzwert von ca. 3,3 zwischen den beiden Bezugsproben wider.

Die mittleren Differenzen zwischen den Ct-Werten der Bezugsproben 1 und 2 variieren bei den Untersuchungen der 4 o.g. Kooperationspartner zwischen 3,01 (Abbildung 1a, RdRP-Gen) und 3,55 (Abbildung 1e, ORF1ab). Die signifikante Abgrenzbarkeit der Ct-Werte von Bezugsprobe 1 und 2 wird durch die gezeigten 95%-Prädiktionsintervalle bestätigt, die zwischen 0,37 (Abbildung 1b, E-Gen) und 1,48 (Abbildung 1a, RdRP-Gen) liegen. Die Prädiktionsintervalle für die Differenz der Ct-Werte von Bezugsprobe 1 und 2 sind in Abbildung 1 mit *** markiert. Diese Prädiktionsintervalle für die Differenz der Ct-Werte von Bezugsprobe 1 und 2 beschreiben jeweils denjenigen Bereich, in dem mit einer 95%-Wahrscheinlichkeit Ct-Werte für Bezugsprobe 1 und 2 zu erwarten sind (Hahn, 1977; Hedderich und Sachs, 2016). **Diese Aussage gilt für weitere Einzelmessungen von Bezugsprobe 1 und 2 (i) im selben Laboratorium, (ii) im selben Testsystem und (iii) für dasselbe Ziel-Gen.**

Hahn, G. J., A prediction interval on the difference between two future sample means and its application to a claim of product superiority, Technometrics, Vol. 19, No. 2, 1977.

Hedderich, J. und Sachs, L., Angewandte Statistik, Methodensammlung mit R, Springer Spektrum, 15. Auflage, 2016 (eBook ISBN 978-3-662-45691-0; DOI 10.1007/978-3-662-45691-0).

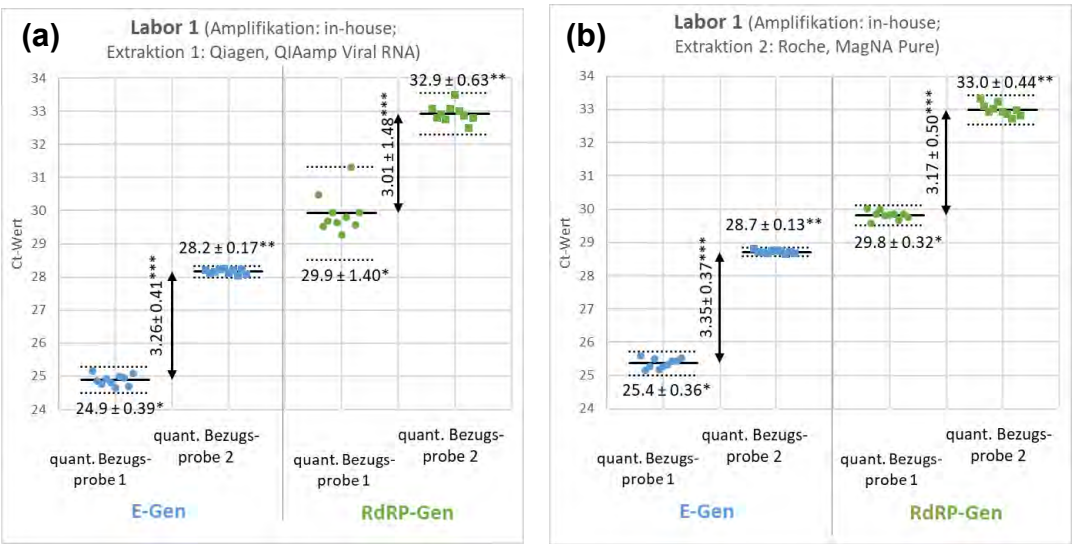
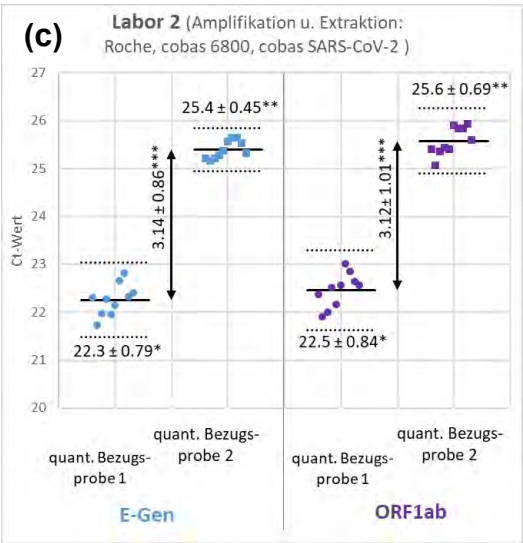
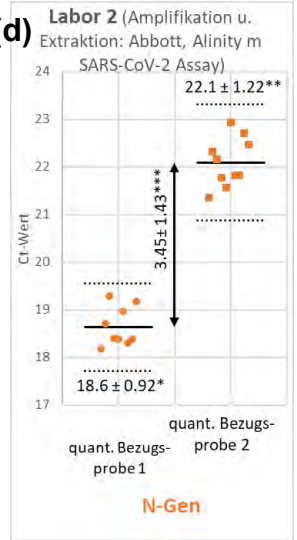
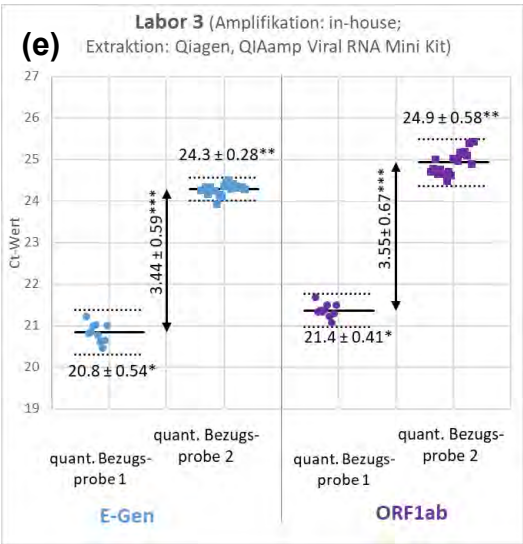


Abbildung 1 (a) und (b): Legende siehe folgende Seite





In Abbildung 1 (d) ist für Bezugsprobe 1 ein Ausreißer-Ct-Wert von 29,83 nicht gezeigt. Dieser Ausreißer-Wert wurde wegen extremer Abweichung aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen.



In Abbildung 1 (e) sind für Bezugsprobe 2 zwei Ausreißer-Ct-Werte von 21,03 (E-Gen) und 21,57 (ORF1ab) nicht gezeigt. Diese Ausreißer-Werte wurden wegen extremer Abweichungen aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen.

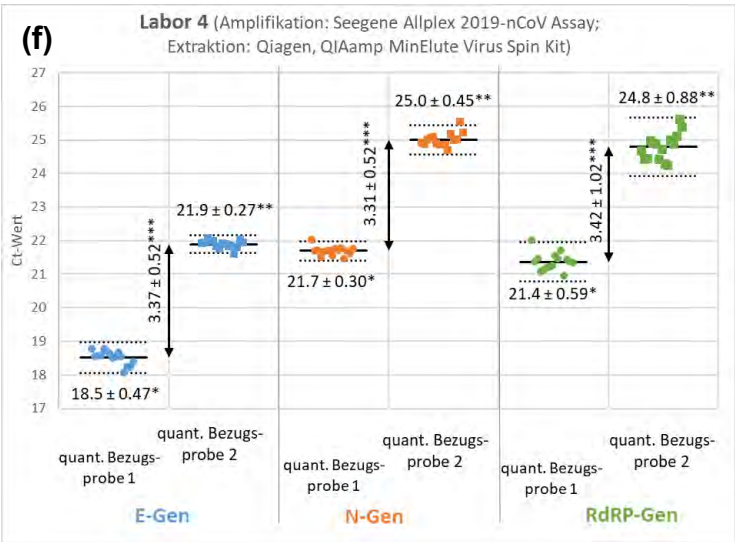


Abbildung 1 (a) - (f): Darstellung der Analysen von 4 Kooperationspartnern zum Genomnachweis von SARS-CoV-2 für die quantitativen Bezugsproben 1 und 2
Jeder Punkt entspricht einem Messergebnis (Ct-Wert). Für Bezugsprobe 1 und 2 werden für die ermittelten Ct-Werte dargestellt: Mittelwert (durchgezogene Linie); Prädiktionsintervall (95% Wahrscheinlichkeit; gepunktete Linie) für Bezugsprobe 1 (bezeichnet mit *) und Bezugsprobe 2 (bezeichnet mit **). Die Prädiktionsintervalle für die Differenz der Ct-Werte (vertikale Linie mit Pfeilen) von Bezugsprobe 1 und 2 sind mit *** markiert.

Für die Auswertung der Ergebnisse vom 1. Versand (03.11. 2020) und 2. Versand (17.11.2020) wird auf Anhang 1 dieses Begleithefts verwiesen.

3 Probenvorbereitung und Messung der quantitativen Bezugsproben

3.1 Vorsichtsmaßnahmen

Bei den Proben handelt es sich um lyophilisierte Zellkulturüberstände mit hitzeinaktiviertem (60°C, 4h) SARS-CoV-2 (Vollvirus).
Die Bezugsproben sind jeweils negativ für HIV, HBV und HCV, dennoch sind die Proben als potentiell infektiös zu behandeln.
Wie für diagnostische Proben allgemein geltend, dürfen diese Bezugsproben nur unter Einhaltung entsprechender Vorsichtsmaßnahmen verwendet werden.

3.2 Probenlagerung

Die Proben sind unmittelbar nach Erhalt im Kühlschrank (+2°C bis +8°C) zu lagern.

3.3 Vorbereitung der Proben zur Bestimmung des Schwellenbereichs

Zur Konzentrierung der teilweise lockeren Lyophilisate sollten die Röhrchen vor dem Öffnen "kurz anzentrifugiert" werden (z.B. in der Eppendorf-Tischzentrifuge kurz hochfahren und stoppen).
Zur anschließenden Resuspendierung der quantitativen Bezugsproben 1 und 2 sollen die Lyophilisate durch vorsichtige Zugabe von **1,1 ml Aqua bidest.** (steril, pyrogenfrei, PCR-Grade) für **20 min bei Raumtemperatur** gelöst und dabei mehrfach bis zur vollständigen Resuspendierung gemixt (Vortex) werden. Schaumbildung sollte während der Probenaufbereitung vermieden werden.

3.4 Testdurchführung

Die nach dem oben beschriebenen Verfahren resuspendierten quantitativen Bezugsproben 1 und 2 sind anschließend **analog der Suspension einer Untersuchungsprobe** mittels der routinemäßig angewendeten SARS-CoV-2-PCR zu analysieren und die so erhaltenen Ct-Werte für die jeweils Test- und Ziel-Gen-bezogene Schwellenbereichszuweisung zu dokumentieren (siehe Abschnitt 2.2 dieses Begleithefts).

3.5 Bestimmung eines laborinternen Test- und Ziel-Gen-bezogenen Schwellenbereichs

Die Zuweisung eines Schwellenbereichs erfolgt

- unabhängig für jedes teilnehmende Laboratorium,
- für jedes angewendete Testsystem,
- für jedes der untersuchten Ziel-Gene und
- unter Berücksichtigung valider Testergebnisse für die Bezugsproben 1 und 2.

ACHTUNG:
Stellen Sie sicher, dass Ihre ermittelten Ct/Cp/Cq-Ergebnisse der unterschiedlich konzentrierten Bezugsproben (Bezugsprobe 1: ca. 10^7 Kopien/ml; Bezugsprobe 2: ca. 10^6 Kopien/ml) den Faktor 10 für die Abstufung der jeweiligen SARS-CoV-2-RNA-Last wiedergeben. Dieser Faktor 10 sollte für die von Ihnen ermittelten Ct-Ergebnisse einem Differenzwert von ca. 3,3 entsprechen.
Zur Orientierung verweisen wir auf Abschnitt 2.3 dieses Begleithefts, in dem die Ergebnisse der Analysen von 4 Kooperationspartnern für die beiden Bezugsproben hinsichtlich angewendetem Testsystem und untersuchtem Ziel-Gen dargestellt sind.
Zusätzlich wird auf Anhang 1 dieses Begleithefts mit der Auswertung der Ergebnisse vom 1. Versand (03.11.2020) und 2. Versand (17.11.2020) verwiesen.

Bei etwaigen unerwarteten Abweichungen hinsichtlich des Differenzwerts von ca. 3,3 für die von Ihnen ermittelten Ct-Ergebnisse wird empfohlen, eine Wiederholungsmessung (ggf. mit je einem neuen Röhrchen der beiden Bezugsproben) vorzunehmen.

4 Rückmeldung der Ergebnisse für Bezugsprobe 1 und 2 im INSTAND RV-Online-System

Die Laboratorien werden gebeten, die Ergebnisse aus den Untersuchungen der quantitativen Bezugsproben 1 und 2 im INSTAND RV-Online-System unter der Gruppe 7340 „Quantitative Bezugsproben zum Virusgenom-Nachweis von SARS-CoV-2“ mit dem Datum der Messung und den dazu verwendeten Methoden einzutragen.

Über eine Auswertung der Ergebnisse dieser 3. Aussendung werden Sie gesondert informiert.

4.1 Login

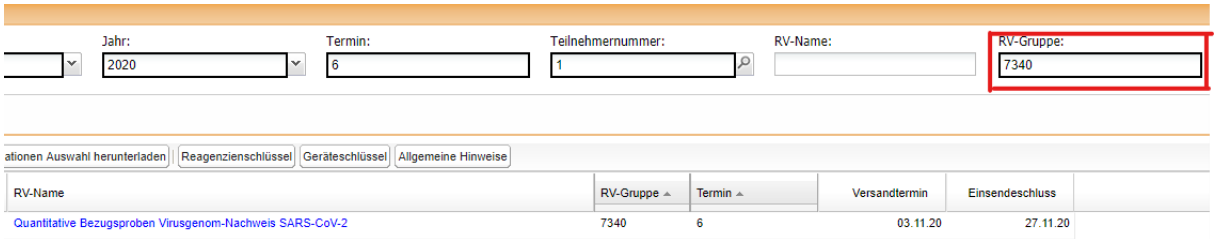
Melden Sie sich mit Ihrer E-Mail-Adresse und Passwort an.

4.2 Werteingabe

Über den Button "Werteingabe" können Sie vom Versand der Proben bis zum Einsendeschluss Ihre Ergebnisse eingeben, ergänzen und korrigieren.

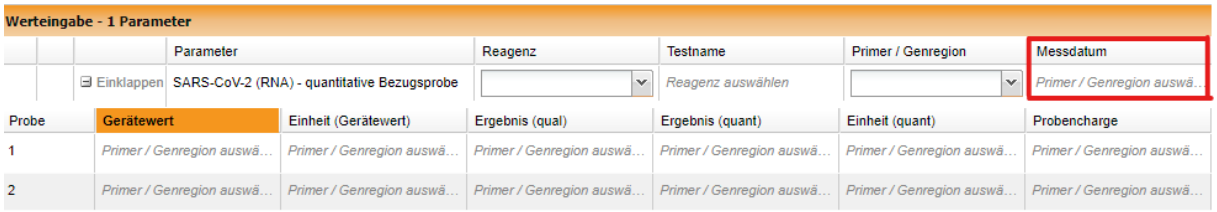
4.3 Auswahl der Gruppe 7340

Wählen Sie unter der "RV-Gruppe" die Gruppe "7340" aus ("Quantitative Bezugsproben Virusgenom-Nachweis SARS-CoV-2").



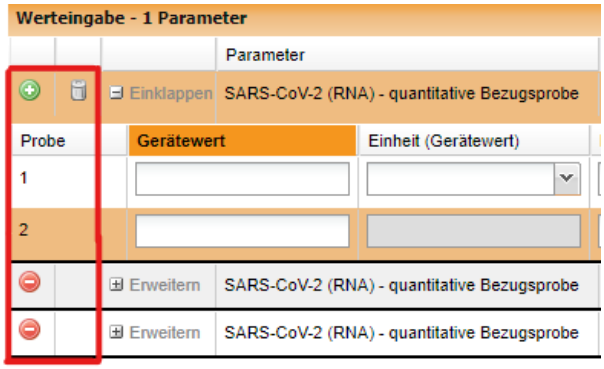
4.4 Ergebniseingabe

Bevor die Ergebniseingabe erfolgen kann, müssen zunächst der Testhersteller und der Name des verwendeten Testsystems ausgewählt werden. Nach Spezifikation der Ziel-Genregion können Sie Ihre Messergebnisse eingeben. Bitte geben Sie für jede getestete Genregion ein separates Testsystem an (siehe Punkt 4.5.). Ergänzen Sie bitte außerdem die Angaben zum Messdatum, zur Chargennummer und zum verwendeten Gerät.



4.5 Eingabe eines zweiten Testsystems

Zur Eingabe von Ergebnissen eines weiteren Testsystems bzw. einer weiteren Gen-Region klicken Sie auf das grüne "Plus-Zeichen" und geben Sie die Ergebnisse entsprechend des in der Anleitung genannten Punktes 4.4 ein



5 Bestellung weiterer Probensätze der Bezugsproben 1 und 2

Eine Bestellung von weiteren Probensätzen ist im INSTAND RV-Online-System (https://rv-online.instandev.de/index.shtml) möglich. Die Details zu den Bestell- und Versandterminen sind nach Einloggen im INSTAND RV-Online-System unter der Gruppe 7340 ersichtlich.

Pro Aussendung kann von Bezugsprobe 1 und 2 jeweils nur ein Probensatz pro Versandtermin bestellt werden (1 Probensatz = Bezugsprobe 1 und 2 mit je 3 Röhrchen à 1,1 ml).

Die Kosten für 1 Probensatz betragen 190,00 EUR (zuzüglich 10,00 EUR Versandkosten).

Das Bundesministerium für Gesundheit hat dankenswerter Weise die Finanzierung dieser quantitativen Bezugsproben zum Virusgenom-Nachweis von SARS-CoV-2 für die jeweils ersten Probenaussendungen im Jahr 2020 und 2021 übernommen. Somit kann INSTAND e.V. den teilnehmenden Laboratorien die Kosten für die ersten Probenaussendungen erlassen (solange der Vorrat reicht).

6 Danksagung

Wir danken allen Kooperationspartnern:
Robert Koch-Institut, Abteilung für Infektionskrankheiten und Zentrum für Biologische Gefahren und Spezielle Pathogene/Hochpathogene Viren
Prof. Dr. Martin Mielke, Prof. Dr. Andreas Nitsche
Konsiliarlabor für Coronaviren, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Institut für Virologie
Prof. Dr. Christian Drosten, Dr. Victor Corman
Leitung der Referenzinstitution INSTAND e.V.
Prof. Dr. Michael Spannagl, Prof. Dr. Ingo Schellenberg
ad hoc-Gruppe der Gemeinsamen Diagnostikkommission der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV e.V.) und Gesellschaft für Virologie (GfV e.V.)
Prof. Dr. Holger F. Rabenau, Prof. Dr. Heinz Zeichhardt, Dr. Rolf Kaiser,
Dr. Martin Obermeier, Prof. Dr. Jonas Schmidt-Chanasit

sowie für die Beratung bei der statistischen Auswertung:
ACOMED statistik
Dr. Thomas Keller.

Anhang 1

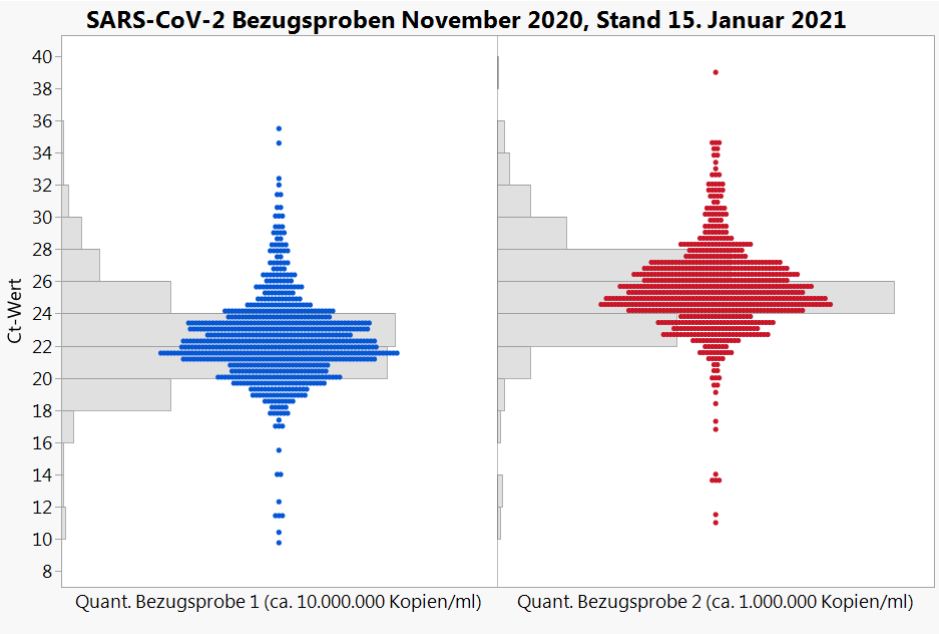
Auswertung der Ergebnisse vom 1. Versand (03.11. 2020) und 2. Versand (17.11.2020) - Stand 15. Januar

A.1 Auswertung der Ergebnisse von 234 Laboratorien für die quantitativen Bezugsproben 1 und 2 (BP 1 und BP 2)

Die quantitativen Bezugsproben 1 und 2 wurden erstmals am 03. November 2020 und danach erneut am 17. November 2020 versendet (1. und 2. Aussendung). Die Laboratorien meldeten sich über das INSTAND-Portal – analog zur Anmeldung für Ringversuche – unter der Programmnummer 7340 an. Der 15. Januar 2021 war der Einsendeschluss für die Ergebnisse, die die Laboratorien für die Bezugsproben 1 und 2 des 1. und 2. Versands bestimmt hatten.

A.1.1 Darstellung der gemessenen Ct-Werte ohne Differenzierung hinsichtlich angewendeten Tests und Zielgen-Region

Bis zum 15. Januar 2021 berichteten insgesamt 234 Laboratorien für jede der beiden Bezugsproben die Ergebnisse (jeweils 754 Analysen) für die verwendeten Testsysteme (jeweils differenziert nach Zielgen-Region). Für die nachfolgende Auswertung der Ct-Werte wurden davon 750 Analysen je Bezugsprobe berücksichtigt, für die Ct-Werte eingereicht wurden. Unberücksichtigt blieben Ergebnisse von isothermaler Amplifikation (3 Analysen je Bezugsprobe) und von digitaler PCR (1 Analyse je Bezugsprobe).
Abbildung 2 zeigt für die bis zum 15. Januar 2021 eingereichten Ergebnisse (unabhängig vom verwendeten Test und von der Zielgen-Region), dass die Ct-Werte für Bezugsprobe 1 zwischen 9,8 und 35,5 und für Bezugsprobe 2 zwischen 11,0 und 39,0 liegen. Die mittleren Ct-Werte (22,27 für Bezugsprobe 1 und 25,38 für Bezugsprobe 2) geben den Faktor 10 zwischen beiden Bezugsproben sehr gut wieder, wohingegen die Einzelwerte für die jeweilige Bezugsprobe stark streuten, was sich bei Betrachtung der Standardabweichungen in einer beträchtlichen Überlappung der Ct-Werte für die quantitativen Bezugsproben 1 und 2 widerspiegelt (Abbildung 2).



	Quant. Bezugsprobe 1 (BP 1) (ca. 10 000 000 Kopien/ml)	Quant. Bezugsprobe 2 (BP 2) (ca. 1 000 000 Kopien/ml)
arithmetischer Mittelwert	22,27	25,38
Standardabweichung	2,69	2,72
95% Konfidenzintervall	18,8 - 27,0	21,9 - 30,1

Abbildung 2: Eingereichte Ct-Werte für die quantitativen Bezugsproben 1 und 2 (Punkte) und deren Häufigkeit (Balken) (Stand 15. Januar 2021)

Es ist festzustellen, dass die Streuung der Ct-Werte unterschiedlicher Teste mit Spezifität für verschiedene Genregionen in den verschiedenen Laboratorien keine generelle Zuordnung eines definierten Ct-Wertes zur Viruskonzentration der quantitativen Bezugsproben BP 1 und BP 2 erlaubt.

A.1.2 Darstellung der gemessenen Ct-Werte mit Differenzierung der Zielgen-Region im jeweils angewendeten Test

Die erhaltenen Ct-Werte der 234 Laboratorien werden in Abbildung 3 (a) - (f) für jedes Zielgen (E-Gen, N-Gen, ORF1ab, RdRP-Gen, S-Gen, andere Genregion) getrennt für Bezugsprobe 1 und Bezugsprobe 2 dargestellt.

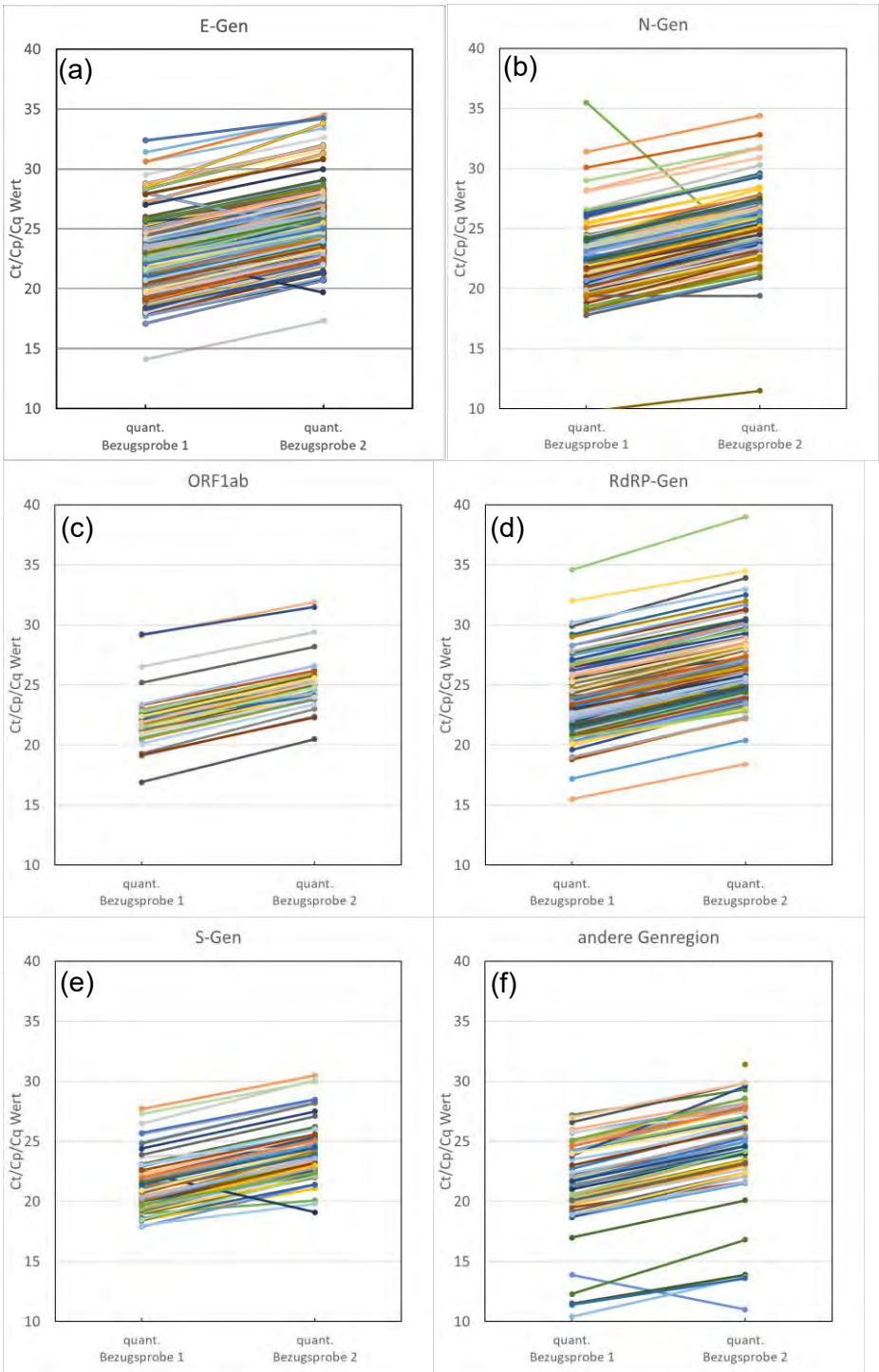


Abbildung 3: Ergebnisse für die quantitativen Bezugsproben 1 und 2 differenziert nach Zielgen-Region von 234 Laboratorien. Jede Linie repräsentiert die Ergebnisse eines Labors für den jeweils gewählten Test für die jeweilige Zielgen-Region (Stand 15. Januar 2021).
(a) E-Gen; (b) N-Gen; (c) ORF1ab; (d) RdRP-Gen; (e) S-Gen; (f) sonstige/andere Genregion

In Abbildung 3 repräsentiert jede Linie die Analyseergebnisse eines individuellen Laboratoriums für Bezugsprobe 1 und Bezugsprobe 2. Positiv hervorzuheben ist, dass die Analysen der einzelnen Laboratorien die Konzentrationsunterschiede der beiden Proben gut wiedergeben, was durch den parallelen Linienverlauf repräsentiert wird. Die parallel verschobenen Linien der Ct-Wert-Messungen der einzelnen Laboratorien spiegeln jedoch eine starke Ct-Wert-Variation der einzelnen Messsysteme wider. Zum Beispiel zeigen die parallel verlaufenden Linien für das E-Gen Ct-Wert-Unterschiede von bis zu 18,3 Ct-Stufen.
Zusätzlich fällt auf, dass die Analyseergebnisse einzelner Laboratorien für das Probenpaar nicht dem erwarteten Linienverlauf folgen, was entweder durch Probenvertauschung und/oder Fehleintragungen im Protokoll oder durch Fehlmessungen bedingt sind.

Im Anhang 1/A.2 werden für die Bezugsproben 1 und 2 die erhaltenen Ct-Werte unter Berücksichtigung der Testhersteller, der Testnamen und der Zielgen-Regionen differenziert dargestellt. Jedes teilnehmende Laboratorium kann sich in den Abbildungen (Box-Plots) in Anhang 1/A.2 mit seinen Messwerten hinsichtlich (i) des angewendeten Testsystems und (ii) der jeweiligen Zielgen-Region mit den Ergebnissen aller anderen Laboratorien vergleichen. Unberücksichtigt bleibt dabei der Einfluss der gewählten Extraktionsmethode auf das Testergebnis.

A.1.3 Darstellung der Differenzen der eingereichten Ct-Werte für Bezugsprobe 1 (BP 1) und Bezugsprobe 2 (BP 2)

Für jedes teilnehmende Labor wurde für das jeweils angewendete Testsystem unter Berücksichtigung der einzelnen Zielgen-Regionen die Differenz zwischen den eingereichten Ct-Werten für Bezugsprobe 1 und 2 berechnet und entsprechend ihrer Häufigkeit in Abbildung 4 dargestellt.
Die theoretisch zu erwartende Differenz von 3,3 Ct-Stufen zwischen Ct-Wert BP2 minus Ct-Wert BP1 wurde von der Mehrzahl der Laboratorien erhalten und geben damit den Faktor 10 zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen von Bezugsprobe 1 und 2 wieder.
Bei Zugrundelegung einer Ct-Wert-Differenz von 3,3 und Berücksichtigung einer Abweichung von +/- 1,65 liegen 733 von 750 (97,7 %) Ct-Wert-Differenzen in einem Bereich der Ct-Wert-Differenz von 1,65-4,95.
Die Abweichung der Ct-Wert-Differenz von 1,65 orientiert sich an der RiliBÄK 2019 (Tabelle B3-1 a) (https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/downloads/pdf-Ordner/QS/Rili_BAEK_Qualitaetssicherg_laboratoriumsmedUntersuchungen_2019.pdf).
In der RiliBÄK 2019 wird für die interne Qualitätssicherung der quantitativen Untersuchungen auf CMV-DNA, HBV-DNA, HCV-RNA und HIV-1-RNA eine Abweichung von +/- 0,5 log10 zwischen dem logarithmierten Einzelwert und logarithmierten Sollwert zugelassen. 0,5 log10 entspricht einer Ct-Wert-Differenz von 1,65.

Laboratorien mit starken Abweichungen hinsichtlich der Ct-Wert-Differenz von ca. 3,3 wird empfohlen, eine Wiederholungsmessung (ggf. mit je einem neuen Röhrchen der beiden Bezugsproben) vorzunehmen.

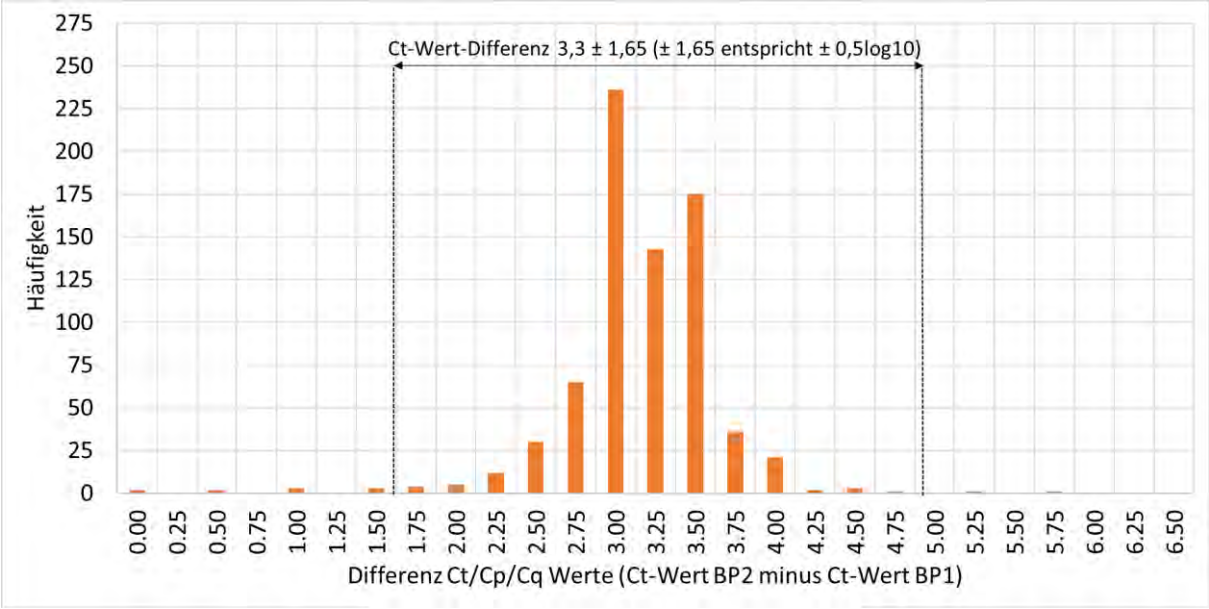


Abbildung 4: Histogramm der errechneten Differenzen der eingereichten Ct-Werte für Bezugsprobe 2 und Bezugsprobe 1 (Stand 15. Januar 2021)

A.1.4 Bezug zwischen individuell gemessenem Ct-Wert und SARS-CoV-2-RNA-Last

Nach Auswertung der eingereichten Ergebnisse der teilnehmenden Laboratorien für die Ct-Werte kann hinsichtlich der SARS-CoV-2-RNA-Last der quantitativen Bezugsproben (BP) 1 und 2 zusammenfassend festgestellt werden:

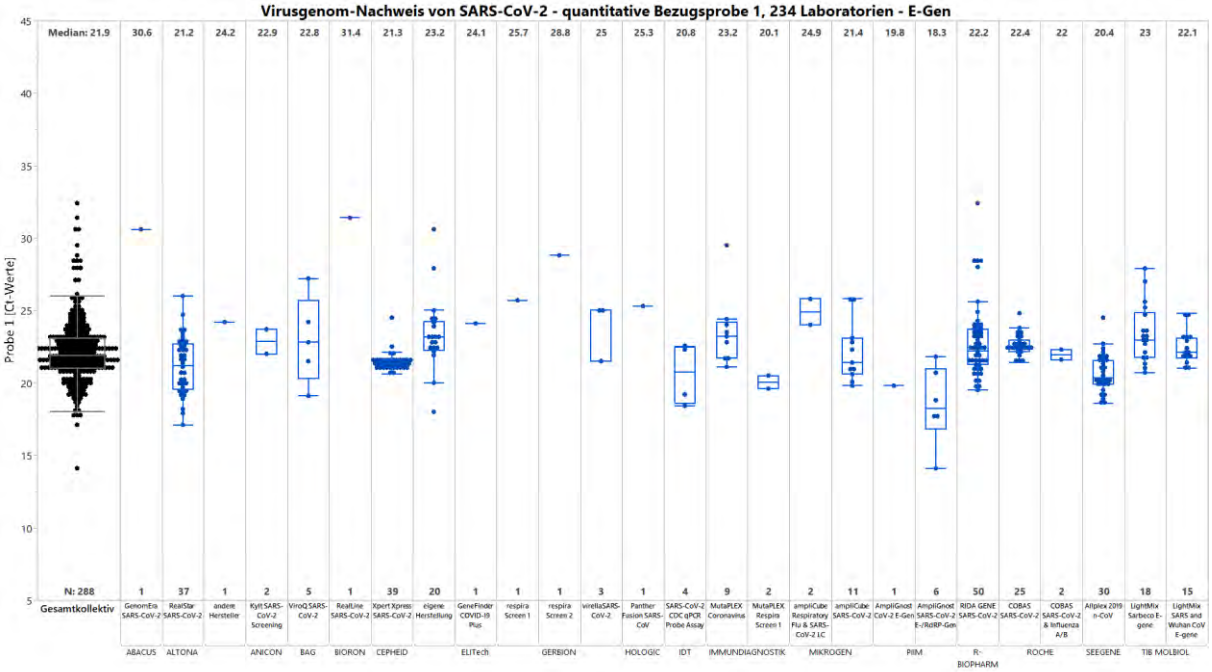
Durch Anwenden der quantitativen Bezugsproben (BP) 1 und 2 kann jedes einzelne Labor einen Ct-Wert, der mit einem bestimmten Test für eine bestimmte Genregion erhalten wurde, an den zugewiesenen Viruskonzentrationen der Bezugsproben (BP) 1 und 2 verankern.
Mit Hilfe der Bezugsproben 1 und 2 kann sich somit jedes Laboratorium Kriterien zur Beurteilung von Untersuchungsproben in der Routinediagnostik erstellen.

A.2 Grafische Darstellung aller eingereichten Ct-Werte für Bezugsprobe 1 (10 000 000 Kopien/ml) und Bezugsprobe 2 (1 000 000 Kopien/ml) differenziert nach Zielgen-Region, Testhersteller und Testname

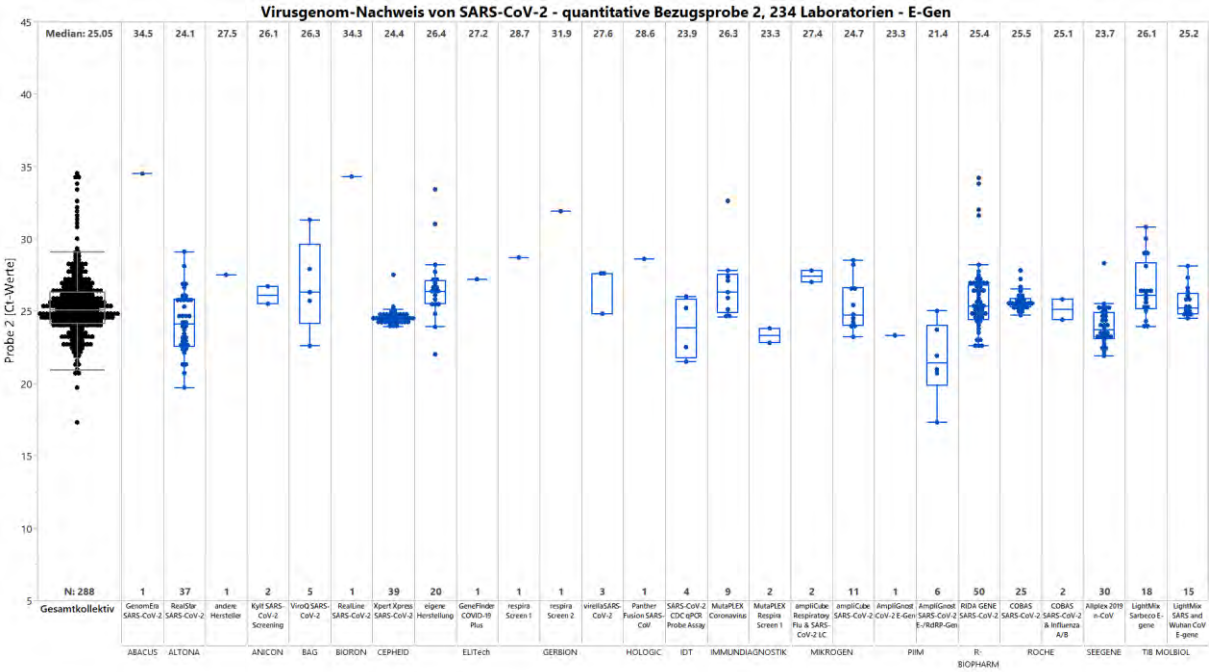
Nachfolgend werden die eingereichten Ct-Werte für die Bezugsproben 1 und 2 hinsichtlich der Zielgen-Region differenziert. Um die Abstufung der SARS-CoV-2-RNA-Last beider Proben vergleichend zu erfassen, werden Box-Plots-Diagramme für Bezugsprobe 1 und Bezugsprobe 2 untereinander dargestellt.

A.2.1 E-Gen – Bezugsproben 1 und 2

E-Gen, Bezugsprobe 1 (10 000 000 Kopien/ml)

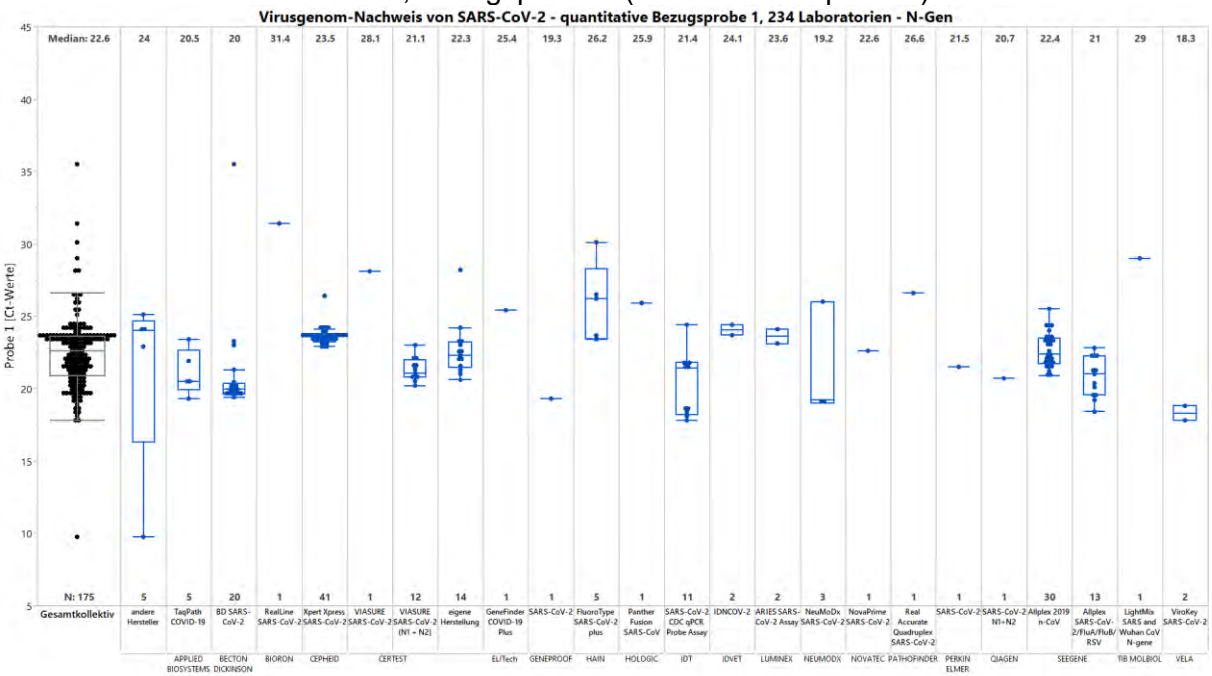


E-Gen, Bezugsprobe 2 (1 000 000 Kopien/ml)

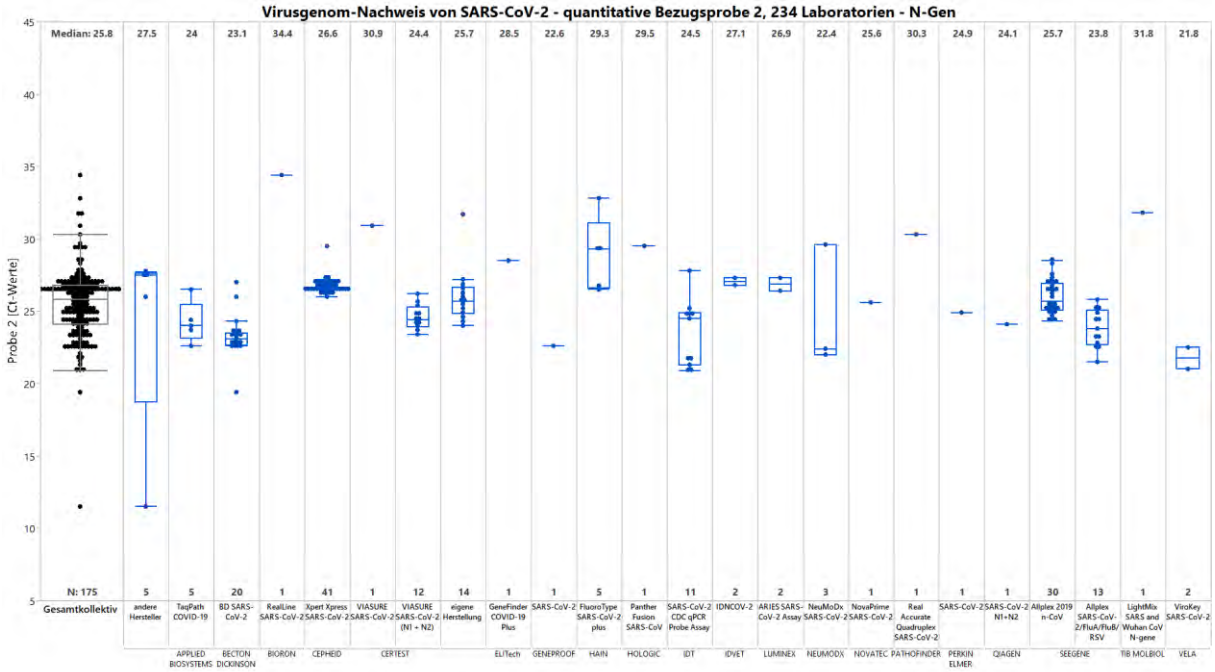


A.2.2 N-Gen – Bezugsproben 1 und 2

N-Gen, Bezugsprobe 1 (10 000 000 Kopien/ml)

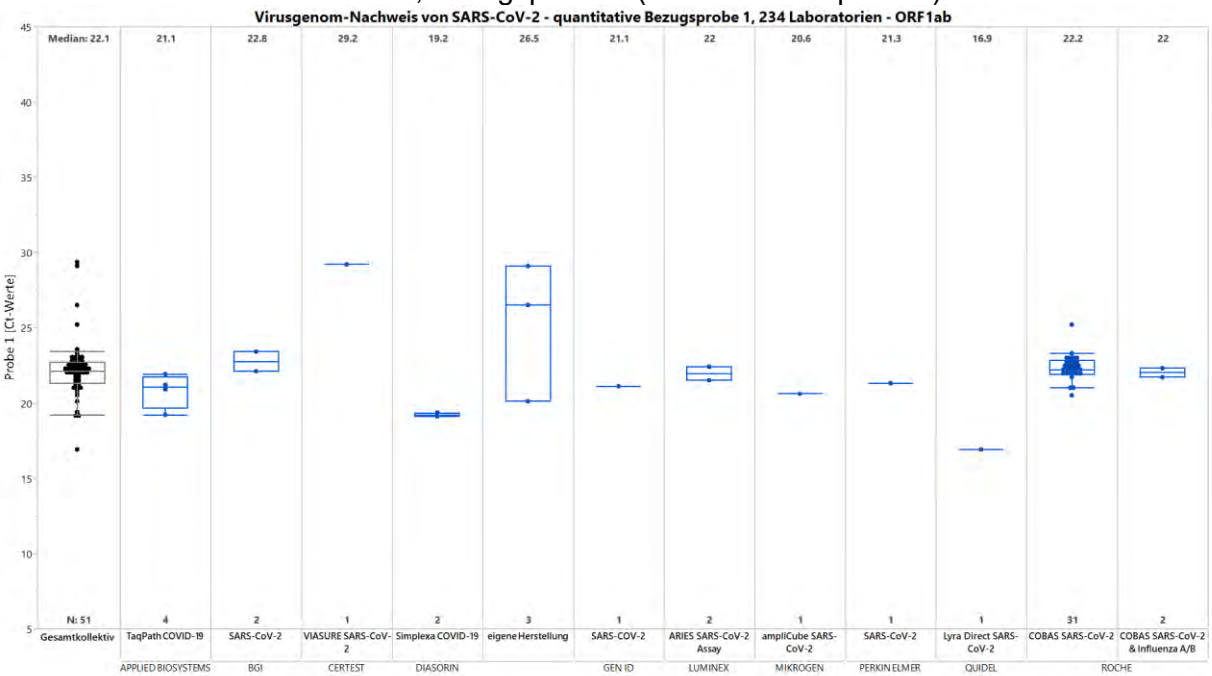


N-Gen, Bezugsprobe 2 (1 000 000 Kopien/ml)

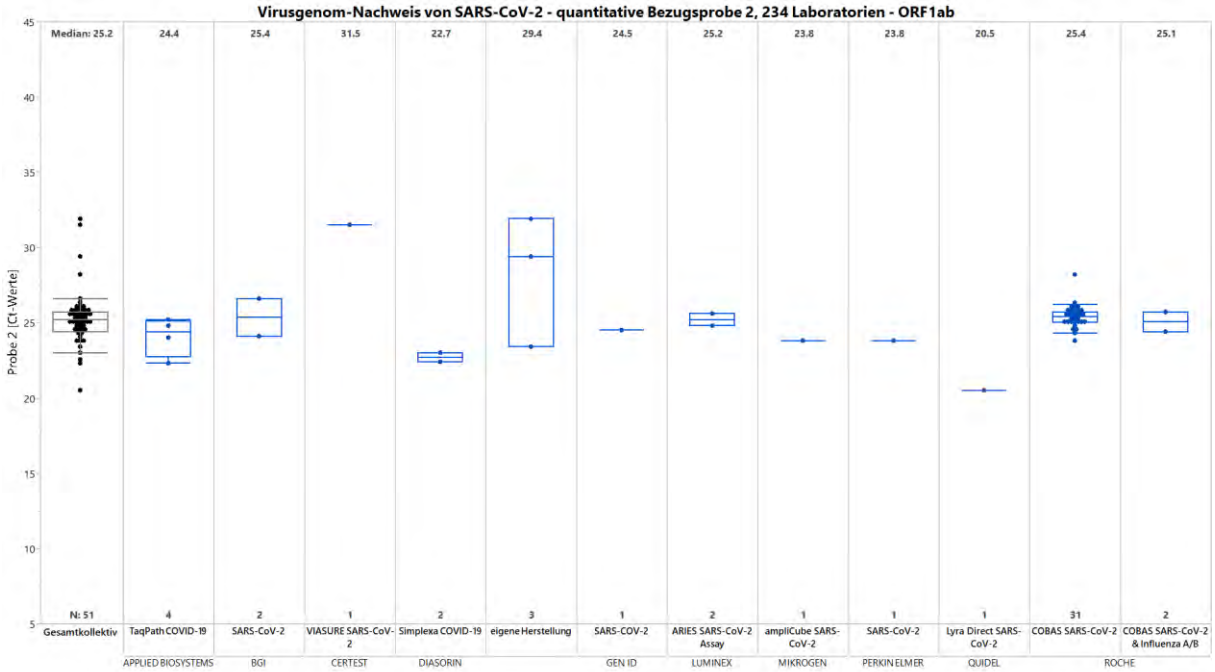


A.2.3 ORF1ab – Bezugsproben 1 und 2

ORF1ab, Bezugsprobe 1 (10 000 000 Kopien/ml)

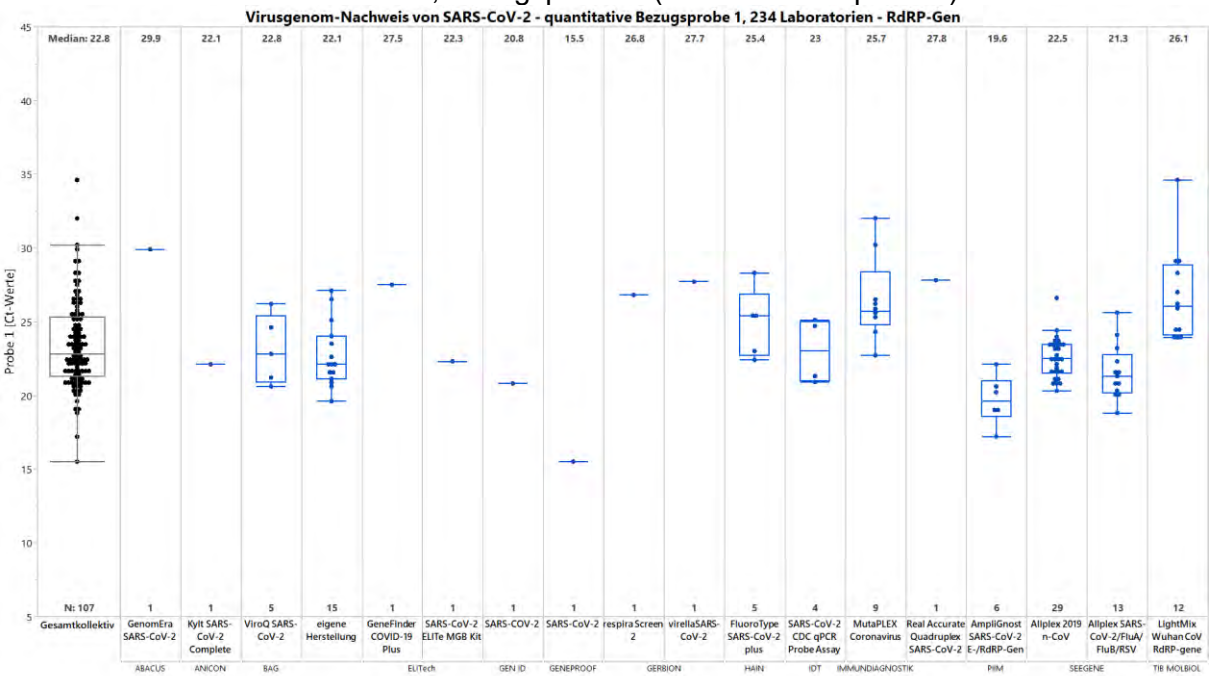


ORF1ab, Bezugsprobe 2 (1 000 000 Kopien/ml)

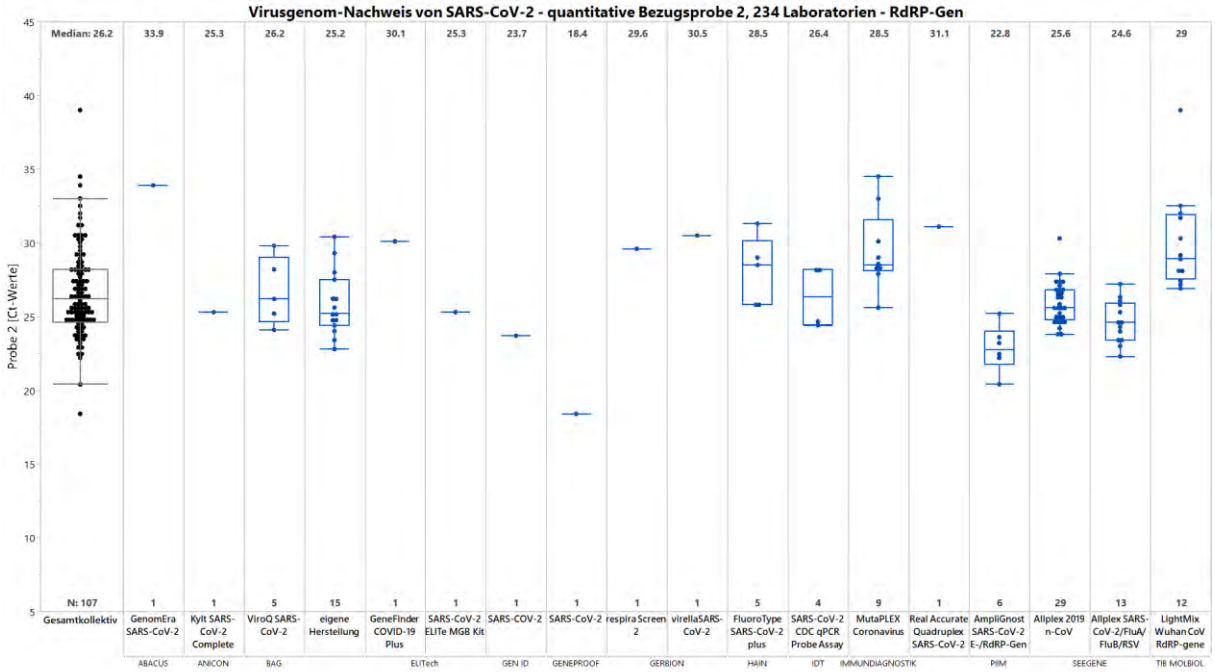


A.2.4 RdRP-Gen – Bezugsproben 1 und 2

RdRP-Gen, Bezugsprobe 1 (10 000 000 Kopien/ml)

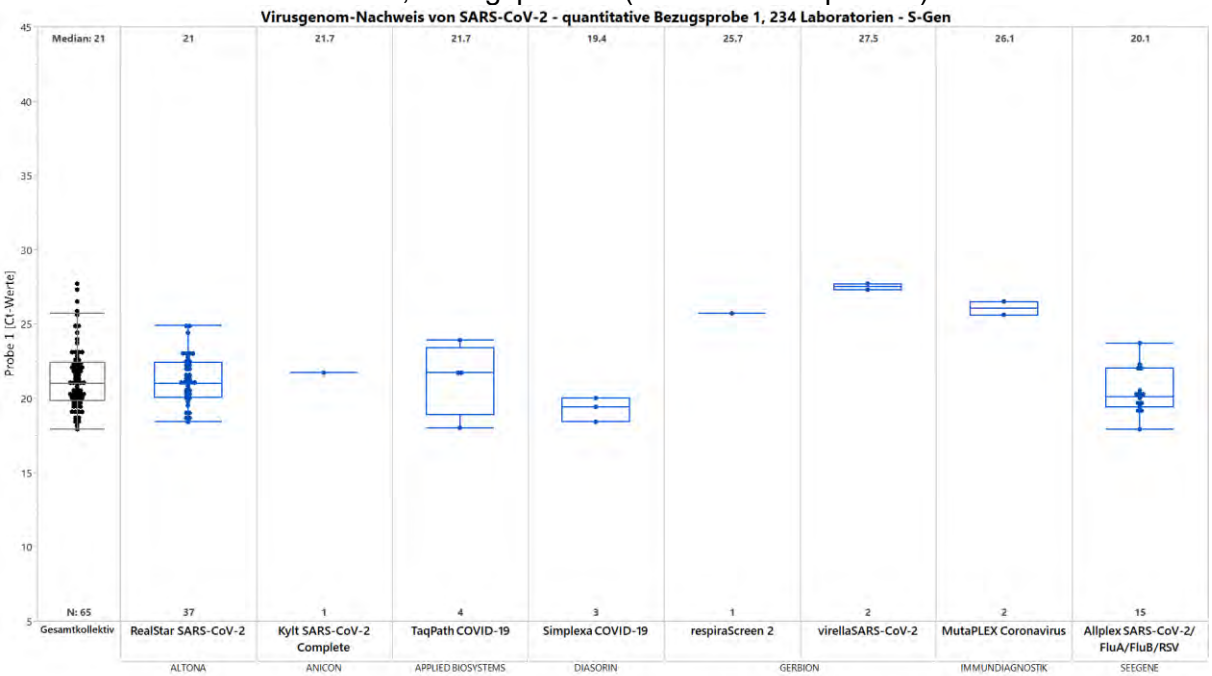


RdRP-Gen, Bezugsprobe 2 (1 000 000 Kopien/ml)

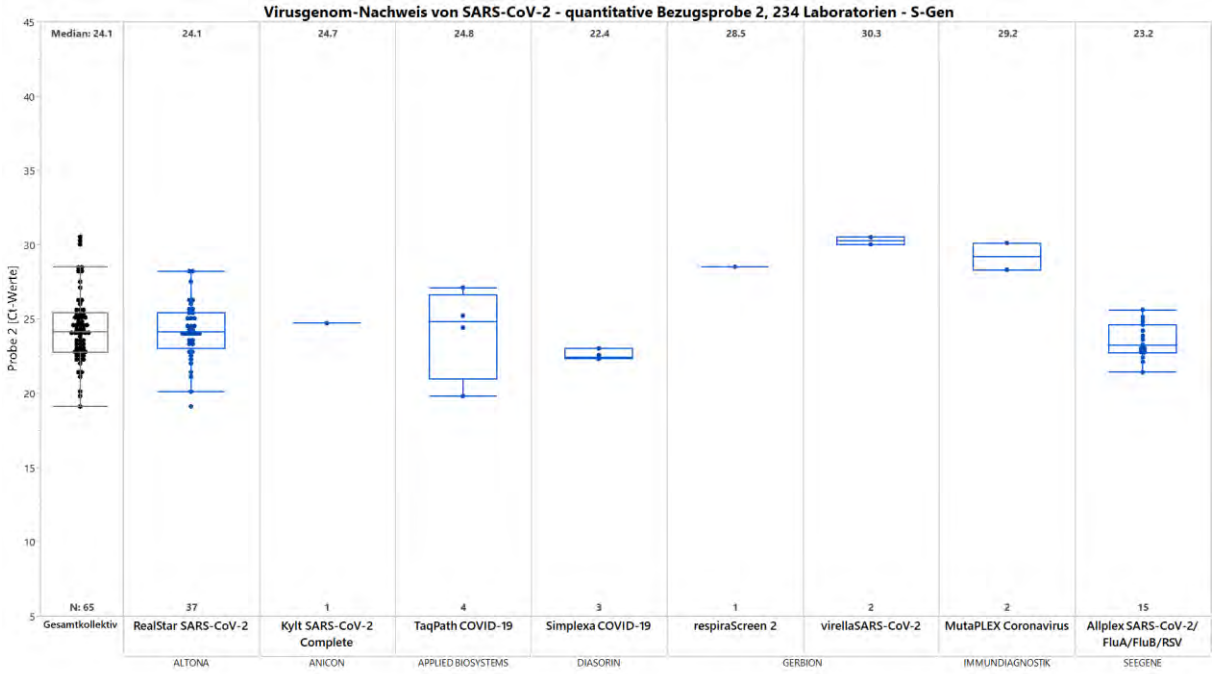


A.2.5 S-Gen – Bezugsproben 1 und 2

S-Gen, Bezugsprobe 1 (10 000 000 Kopien/ml)

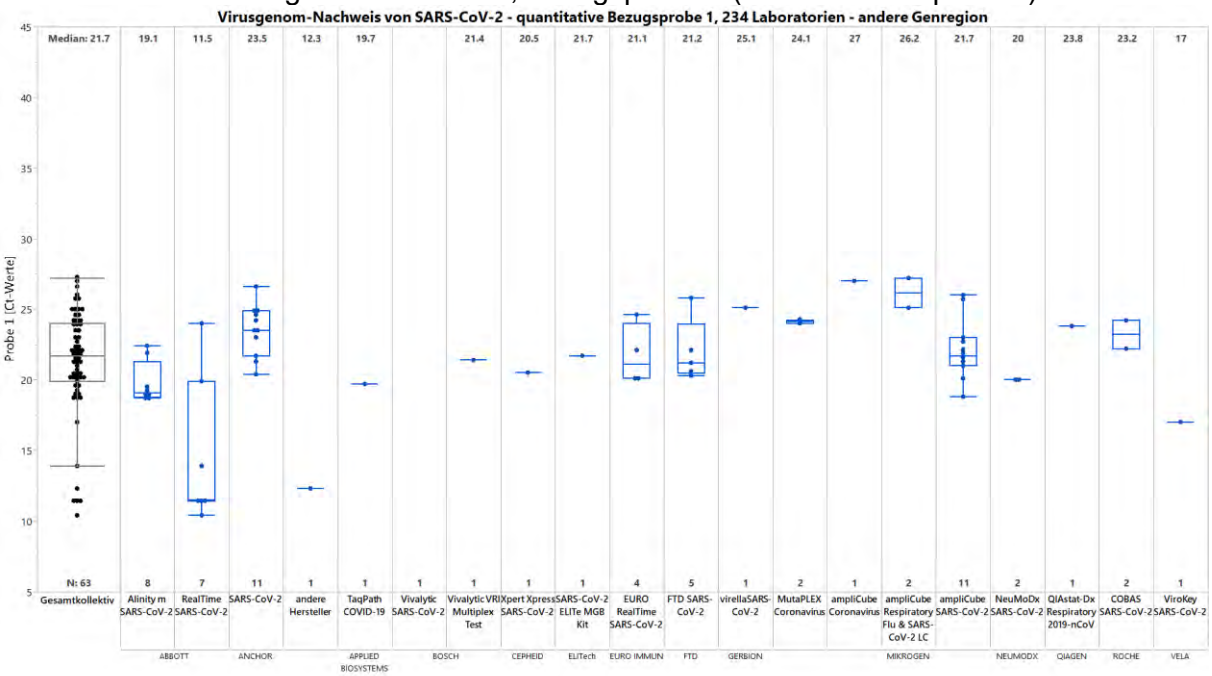
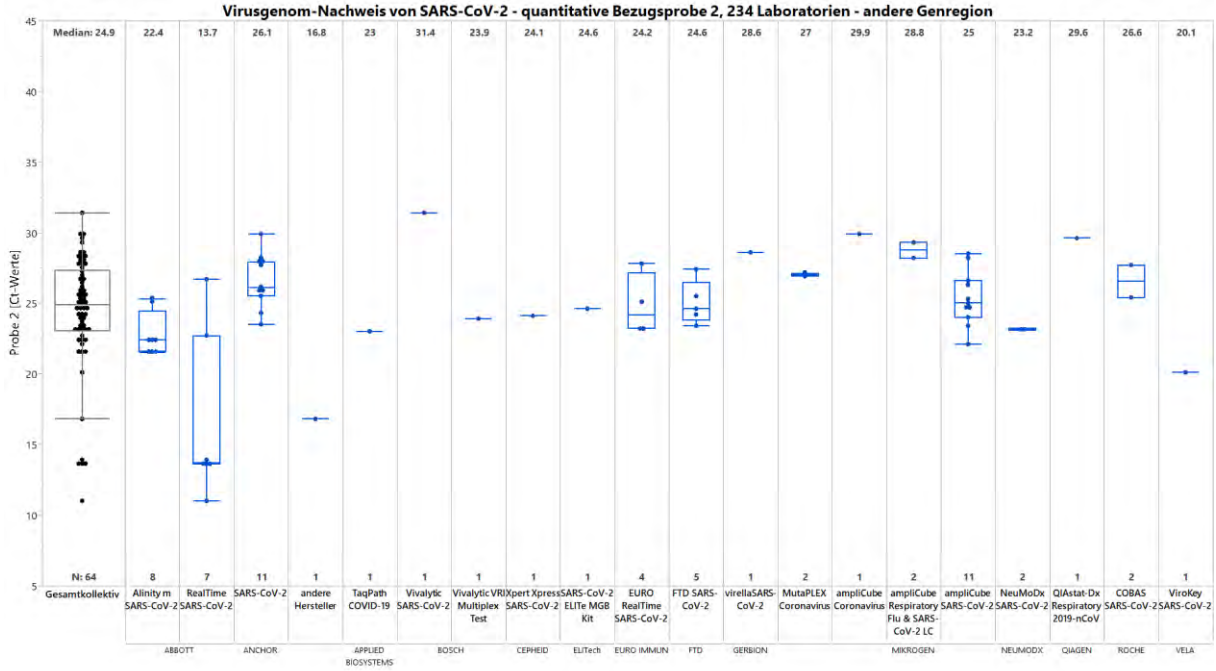


S-Gen, Bezugsprobe 2 (1 000 000 Kopien/ml)



A.2.6 sonstiges/anderes Gen – Bezugsproben 1 und 2

sonstiges/anderes Gen, Bezugsprobe 1 (10 000 000 Kopien/ml)



sonstiges/anderes Gen, Bezugsprobe 2 (1 000 000 Kopien/ml)