



SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit

Instrukcja użytkowania

Zestaw do jakościowego wykrywania koronawirusa SARS-CoV-2 metodą izotermalnego namnażania kwasu nukleinowego w czasie rzeczywistym RT-LAMP.



Genomtec SA
ul. Bierutowska 57-59,
51-317, Wrocław, Poland
Tel: +48 793 440 931

Odpowiedzialność za utrzymanie zgodności z wymogami prawnymi dotyczącymi użycia i zastosowania

wyrobu medycznego, leży po stronie Użytkownika produktu.

Informacje zawarte w tym dokumencie technicznym mogą ulec zmianie bez uprzedniego powiadomienia.

Podczas pracy z produktem zawsze korzystaj z aktualnej wersji instrukcji użytkowania. Najbardziej aktualna wersja jest dostępna na stronie <http://genomtec.com/support>.

Wersja dokumentu	Data	Opis
C	16 lutego 2021	Pierwsza wersja w języku polskim
D	26 lipca 2021	Druga wersja, aktualizacja danych oraz informacji dotyczących użytkowania
E	07 stycznia 2022	Aktualizacja adresu producenta

Spis treści

1. Słownik	5
2. Referencje	6
2.1. Patenty/Zgłoszenia Patentowe	6
3. Informacje produktowe Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit	7
3.1. Przeznaczenie produktu medycznego	7
3.2. Opis produktu medycznego	7
3.3. Zasady postępowania z produktem medycznym	8
3.4. Odczynniki i wyposażenie	8
3.4.1. Dostarczone odczynniki i wyposażenie	8
3.4.2. Wymagane odczynniki i wyposażenie	9
4. Środki ostrożności dla użytkowników	10
5. Warunki transportu, przechowywania oraz trwałości	11
6. Kontrola jakości	12
6.1. Kontrole wewnętrzne dla testu	12
6.2. Pobranie, transport i przechowywanie próbek	12
7. Instrukcja wykonania badania	13
7.1. Czynności niezbędne do wykonania przed rozpoczęciem badania	13
7.1.1. Przygotowanie - krok 1	13
7.1.2. Przygotowanie - krok 2	13
7.1.3. Przygotowanie - krok 3	13
7.1.4. Przygotowanie - krok 4	13
7.2. Protokół wykonania reakcji amplifikacji	13
7.2.1. Etap 1	13
7.2.2. Etap 2	14
7.2.3. Etap 3	14
7.2.4. Etap 4	14
7.2.5. Etap 5	15
8. Interpretacja wyników	16
8.1. Interpretacja wyników analizy laboratoryjnej próbek pacjentów	16

8.2. Ograniczenia	18
9. Charakterystyka parametrów diagnostycznych	20
9.1. Czulość testu (Limit Detekcji)	20
9.2. Reaktywność analityczna	20
9.3. Swoistość analityczna (reakcje krzyżowe)	20
9.4. Walidacja kliniczna	21
9.4.1. Podsumowanie	22
10. Znaki i symbole	23
11. Kontakt i zamówienia	24

1. Słownik

Skróty	Opis
SARS-CoV-2	Wirus z grupy koronawirusów, z ang. <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
LAMP	Reakcja izotermalna amplifikacji kwasu nukleinowego, z ang. <i>Loop-Mediated Isothermal Amplification</i>
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy
RNA	Kwas rybonukleinowy
RNase	Rybonukleaza
DNase	Deoksyrybonukleaza
IFU	Instrukcja użytkownika
PI	Ulotka produktowa
MERS	Bliskowschodni zespół niewydolności oddechowej, z ang. <i>Middle East Respiratory Syndrome</i>
NAAT	Test amplifikacji kwasu nukleinowego
cDNA	Komplementarne DNA
FAM	Amidyt fluoresceiny
PCR	Łańcuchowa reakcja polimerazy
LOD	Limit detekcji
RT	Reakcja odwrotnej transkrypcji
BLAST	Narzędzie bioinformatyczne używane do lokalnego przyrównywania sekwencji nukleotydów, z ang. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
EvaGreen®	Zielony fluorescencyjny barwnik molekularny

2. Referencje

Tsugunori Notomi, Hiroto Okayama, Harumi Masubuchi, Toshihiro Yonekawa, Keiko Watanabe, Nobuyuki Amino, and Tetsu Hase. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15; 28(12): e63.

Hong TC, Mai QL, Cuong DV, et al. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5):1956-1961. doi:10.1128/jcm.42.5.1956-1961.2004

EvaGreen® jest znakiem towarowym firmy Biotium, Inc. Zakup tego produktu obejmuje poddanie się ograniczonemu, nieprzenoszalnemu zabezpieczeniu przeciwko pozwowi na podstawie patentów USA nr 7,803,943 B2, US7,776, 567 B2 oraz odpowiednich zastrzeżeń patentowych poza Stanami Zjednoczonymi Ameryki, wyłącznie do użytku w diagnostyce laboratoryjnej lub do wykorzystania w celach badawczo-rozwojowych (niezależnie od tego, czy kupujący jest jednostką akademicką, czy też podmiotem gospodarczym generującym zysk) . Informacje na temat zakupu licencji na barwnik EvaGreen® można uzyskać kontaktując się z Biotium, Inc., 46117 Landing Parkway, Fremont, CA 94545, e-mail: btinfo@biotium.com.

2.1. Patenty / Zgłoszenia Patentowe

Patent USA zatytułowany: "Methods of Using Dyes in Association with Nucleic Acid Staining or Detection and Associated Technology" Numer patentu USA: US7,803,943 B2

Patent USA zatytułowany: "Dimeric and Trimeric Nucleic Acid Dyes, and Associated Systems and Methods" Numer patentu US A: US7,776, 567 B2

3. Informacje produktowe Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit

3.1. Przeznaczenie produktu medycznego

Test genetyczny Genomtec® SARS CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit to zestaw laboratoryjny przeznaczony do diagnostyki medycznej *in vitro* (znak CE-IVD) zawierający kontrolę i odczynniki przeznaczone do wykonania odwrotnej transkrypcji i amplifikacji kwasu nukleinowego wirusa SARS CoV-2 w reakcji izotermalnej z wykorzystaniem techniki *Loop-Medicated Isothermal Amplification* (LAMP). Test jakościowy wykrywający specyficznie SARS-CoV-2 w wymazach z gardła, nosogardzieli lub ślinie u osób podejrzanych o chorobę COVID-19.

Uzyskane wyniki pozwalają zidentyfikować obecność RNA wirusa SARS-CoV-2 w próbce. Pozytywny wynik testu diagnostycznego powinien być rozpatrzony łącznie z wywiadem klinicznym pacjenta lub innymi pomocniczymi wynikami diagnostycznymi, celem ustalania ostatecznego statusu zakażenia pacjenta.

Wynik negatywny uzyskany za pomocą testu diagnostycznego Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit nie wyklucza infekcji wirusem SARS CoV-2, a przy interpretacji tego wyniku oraz określaniu statusu zakażenia, należy także uwzględnić wyniki innych badań diagnostycznych oraz historii choroby (stanu klinicznego) pacjenta.

Zestaw diagnostyczny Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit jest przeznaczony do diagnostyki molekularnej w medycznym laboratorium diagnostycznym wykonywanej przez wykwalifikowany i przeszkolony personel.

- Uwaga: - Produkt nie jest sterylny i nie wymaga sterylnej środowiska pracy.
- Uwaga: - Produkt nie służy do samo-testowania.

3.2. Opis produktu medycznego

Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit zawiera odczynniki wystarczające do wykonania 50 reakcji testowych (kontroli i mieszanin analitycznych) wymaganych do wykrycia RNA wirusa SARS-CoV-2 za pomocą metody izotermalnej RT-LAMP. Zestaw Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo potwierdza obecność genów N i/lub S kodujących odpowiednio białko strukturalne nukleokapsydu oraz białko powierzchniowe w analizowanej próbce ludzkiej.

Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit zawiera następujące odczynniki:

AmpMix	Próbówka zawierająca mieszaninę odczynników chemicznych i enzymów w ilości optymalnej do przeprowadzenia 50 reakcji odwrotnej transkrypcji i amplifikacji w badanych próbkach, wraz z kontrolą wewnętrzną oraz dodatkowymi kontrolami pozytywnymi i negatywnymi
Duo-Primers	Próbówka zawierająca bufor z kompozycją starterów rozpoznających określony fragment genów N i S wirusa SARS-CoV-2
C-Primers	Próbówka zawierająca bufor z kompozycją starterów rozpoznających określony fragment ludzkiego genomu (w celach kontroli prawidłowości pobrania próbek biologicznych i efektywności oczyszczania RNA)
Control+	Próbówka zawierająca kontrolę pozytywną Genomtec® SARS-CoV-2 w postaci cDNA odpowiadającemu fragmentom genomu wirusa SARS-CoV-2
Water	Próbówka zawierająca wodę wolną od DNAz / RNAz

Zestaw zawiera również ulotkę produktową (PI00BPLrB), która zawiera skrótoną instrukcję i link do pobrania pełnej instrukcji użytkowania (ten dokument).

3.3. Zasady postępowania z produktem medycznym

Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit jest przeznaczony do wykrywania określonych fragmentów genów N i S wirusa SARS-CoV-2, które są specyficzne dla SARS-CoV-2, pomimo faktu, iż geny N i S są również obecne w innych koronawirusach (np. SARS, MERS). Startery hybrydujące użyte w zestawie Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit rozpoznają specyficzne, konserwatywne sekwencje genów N oraz S ze 100 procentową homologią osiągniętą tylko dla wirusa SARS-CoV-2, nawet pomimo wstępowania pewnej homologii genów N oraz S wśród innych koronawirusów.

Genomtec® dostrzega trudności w kwalifikacji sytuacji epidemiologicznej i sposobu transmisji wirusa SARS-CoV-2 w populacji, dlatego zaleca się, aby Użytkownik wziął pod uwagę najnowsze wytyczne Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) podczas postępowania diagnostycznego.

Odpowiednia decyzja dotycząca statusu epidemii i przenoszenia wirusa powinna być podjęta przez właściwe organy opieki zdrowotnej i / lub epidemiologicznej w danym kraju. Genomtec nie udziela porad dotyczących stanu epidemiologicznego dla żadnego z krajów ani obszarów geograficznych.

Etapy procedury diagnostycznej obejmują:

- Pobranie próbek i oczyszczenie kwasu nukleinowego (RNA).
- Reakcję odwrotnej transkrypcji oczyszczonego RNA z jednoczesną amplifikacją cDNA przy użyciu zestawu Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit.
- Proces RT-LAMP zachodzi w stałej temperaturze (warunki izotermalne), gdzie zestaw pięciu starterów rozpoznaje siedem specyficznych sekwencji genomowych obejmujących docelowy gen N SARS-CoV-2, natomiast zestaw sześciu starterów rozpoznaje osiem specyficznych sekwencji genomowych obejmujących docelowy fragment genu S SARS-CoV-2. W pierwszym etapie reakcja odwrotnej transkrypcji (RT) generuje cDNA. Równocześnie z RT w tej samej stałej temperaturze wszystkie jedenaście starterów hybryduje i amplifikuje matrycę cDNA. W obecności poszukiwanego fragmentu genu(ów) zwiększające się stężenie cDNA powoduje wiązanie barwnika fluorescencyjnego (EvaGreen®; opisu w Rozdziale 2, Referencje), jednocześnie zwiększając intensywność fluorescencji.
- Fluorescencja jest monitorowana przy pomocy urządzenia do przeprowadzenia reakcji Real-Time PCR – zwanej dalej termocyklerem, wyposażonego w detektor kanału FAM (zielony), który generuje odczyt analityczny, aby następnie na jego podstawie wystawić opinię diagnostyczną (patrz Rozdział 8, Interpretacja wyników).

Zestaw został zwalidowany na poniższych termocyklerach Real-Time PCR:

Bio-Rad CFX96 Dx System
 Bio-Rad CFX96 System
 Roche Cobas z480
 Thermo Fisher QuantStudio 6 Flex oraz QuantStudio 7 Pro

3.4. Odczynniki i wyposażenie

3.4.1. Dostarczone odczynniki i wyposażenie

AmpMix	Próbówka zawierająca mieszaninę odczynników chemicznych i enzymów w ilości optymalnej do przeprowadzenia 50 reakcji odwrotnej transkrypcji i amplifikacji w badanych próbkach, wraz z kontrolą wewnętrzną oraz dodatkowymi kontrolami pozytywnymi i negatywnymi
Duo-Primers	Próbówka zawierająca bufor z kompozycją starterów rozpoznających określony fragment genów N i S wirusa SARS-CoV-2
C-Primers	Próbówka zawierająca bufor z kompozycją starterów rozpoznających określony fragment ludzkiego genomu (w celach kontroli prawidłowości pobrania próbek biologicznych i efektywności oczyszczania RNA)
Control+	Próbówka zawierająca kontrolę pozytywną Genomtec® SARS-CoV-2 w postaci syntetycznego cDNA wirusa SARS-CoV-2
Water	Próbówka zawierająca sterylną wodę wolną od DNaz / RNaz

3.4.2. Wymagane odczynniki i wyposażenie

- Termocykler z zielonym (FAM/Green) kanałem do wykrywania fluorescencji i 96-dołkowym blokiem grzejnym dostosowanym do płytek PCR i / lub pasków probówek PCR (z optycznie przezroczystymi wieczkami), który jest odpowiednio serwisowany według zaleceń producenta. Lista zwalidowanych instrumentów do PCR w czasie rzeczywistym znajduje się w sekcji 3.3, Zasady postępowania z produktem medycznym.
- Zamrażarka laboratoryjna: od -25°C do -10°C bez funkcji No-Frost.
- Wirówka laboratoryjna (przeznaczona dla probówek w rozmiarze od 1.5 do 2 mililitra) oraz wirówka z przystawką na płytki wielodołkowe lub / i paski PCR.
- Mieszadło laboratoryjne lub vortex.
- Pojedyncze lub / i wielokanałowe pipety zmiennopojemnościowe regulowane w zakresach objętości:
 - 0,5-10 mikrolitrów
 - 10-100 mikrolitrów
 - 100-1000 mikrolitrów
- Blok chłodzący lub dostęp do lodu.
- Płytki PCR 96-dołkowe oraz paski mikroprobówek-PCR z optycznie przezroczystymi wieczkami.
- Optyczna folia adhezyjna do płytek PCR.
- Sterylne końcówki z filtrem do pipet laboratoryjnych.

4. Środki ostrożności dla użytkowników

Procedura testu za pomocą zestawu Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit jest przeznaczona do wykonania przez wykwalifikowany i przeszkolony personel laboratorium diagnostycznego, który jest poinstruowany i przeszkolony w zakresie technik biologii molekularnej, oraz innych procedur diagnostycznych *in-vitro*. Należy używać oddzielnych obszarów roboczych do przygotowywania próbek pacjentów i kontroli, tak aby zapobiec kontaminacji.

Do pracy z próbkami oraz odczynnikami należy używać komory laminarnej w klasie drugiej bezpieczeństwa biologicznego. Stanowisko do pracy PCR powinno być sterylizowane światłem UV przez co najmniej 30 minut przed jego użyciem.

- Wszystkie próbki pacjentów należy zawsze traktować jako potencjalnie zakaźne i / lub stwarzające zagrożenie mikrobiologiczne, zgodnie z wytycznymi zaleceń bezpiecznej pracy w laboratorium.
- Należy stosować środki ochrony indywidualnej zgodnie z lokalnymi zaleceniami dotyczącymi postępowania w pracy z materiałem potencjalnie zakaźnym.
- Należy bezwzględnie stosować sterylne końcówki z filtrem do pipet laboratoryjnych.
- Jedzenie, picie płynów oraz palenie papierosów w miejscu pracy z produktem jest zabronione.
- Producent nie udziela gwarancji, jeśli wprowadzono jakiegokolwiek modyfikacje odczynników zestawu diagnostycznego, jego protokołu wykonania oraz analizy na oprzyrządowaniu, a które stanowią naruszenie dyrektywy 98/79/EC dotyczącej diagnostyki *in-vitro*.
- Zestawu diagnostycznego nie należy używać po jego okresie przydatności podanym na opakowaniu.
- **PO PRZEPROWADZENIU ANALIZY NIE NALEŻY OTWIERAĆ PŁYTKI WIELODOŁKOWEJ PCR ANI MIKRO-PROBÓWEK PCR, PONIEWAŻ MOŻE TO SPOWODOWAĆ ZANIECZYSZCZENIE LABORATORIUM AMPLIKONAMI POCHODZĄCYMI Z REAKCJI DODATNICZ.**
- Utylizuj odpady zgodnie z lokalnymi przepisami dotyczącymi zagrożeń biologicznych. Sprawdź procedury bezpieczeństwa ustalone przez twoją instytucję dla pracy z chemikaliami i obchodzenia się z próbkami biologicznymi.
- Należy unikać kontaktu próbki lub odczynnika ze skórą, oczami i błonami śluzowymi. Jeśli dojdzie do kontaktu ze skórą, oczami lub błoną śluzową, należy przepłukać miejsce kontaktu wodą i natychmiastowo zasięgnąć porady lekarza.
- W przypadku kontaktu odczynnika lub próbki biologicznej ze skórą, oczami lub błoną śluzową, lub w wypadku połknięcia, należy postępować zgodnie z zaleceniami laboratoryjnego protokołu bezpieczeństwa.
- W przypadku rozlania odczynników zestawu diagnostycznego lub próbek biologicznych należy przemyć miejsce środkiem dezynfekującym, np. 0,5% podchlorynem sodu.
- Karty charakterystyki odczynników wchodzących w skład zestawu dostępne są na żądanie u Genomtec SA lub autoryzowanego dystrybutora.
- Wszystkich pozytywne wyniki uzyskane w danym laboratorium mogą wymagać zgłoszenia do odpowiedniego lokalnego organu sanitarnego.
- Pozytywne wyniki tego testu wskazują na obecność RNA SARS-CoV-2 w próbce pacjenta.
- Odczynniki muszą być przetrzymywane i wykorzystywane zgodnie z zaleceniami przedstawionymi w Tabeli 1.
- Sposób przygotowania (oczyszczenie) RNA może wpływać na jakość reakcji RT-LAMP, dlatego zaleca się, aby laboratoria stosowały wcześniej zwalidowaną metodę oczyszczania dla każdego rodzaju próbki (ślina, wymaz z gardła lub wymaz z jamy nosowo-gardłowej). Oczyszczanie próbek RNA w celu użycia z tym produktem zostało potwierdzone dla następujących zestawów do izolacji RNA - Roche: MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit, High Pure Viral Nucleic Acid Kit, High Pure Viral RNA Kit; Qiagen: EZ1 Virus Mini Kit v2.0, EZ1 DSP Virus Kit, QIAamp MinElute, QIAamp Viral RNA Mini Kit Virus Spin Kit, QIAamp DSP Virus Kit.

5. Warunki transportu, przechowywania oraz trwałości

UWAGA!

KONTROLĘ POZYTYWNA NALEŻ ROZDZIELIĆ NA MNIEJSZE OBJĘTOŚCI, ABY ZAPOBIEC JEJ DEGRADACJI ORAZ W CĘLU OCHRONY PRZED SPADKIEM JEJ JAKOŚCI, PORZEZ WIELOKROTNE CYKLE ZAMRAŻANIA-ROZMRAŻANIA.

AmpMix, Duo-Primers oraz C-Primers są stabilne przez co najmniej trzy cykle zamrażania-rozmrażania.

Wystąpienie osadu na dnie probówki AmpMix jest zjawiskiem całkowicie normalnym. W takim przypadku zalecane jest pozostawienie probówki na około 10 min. w temperaturze pokojowej, a następnie wymieszanie zawartości przez pipetowanie.

Tabela 1.

Odczynnik	Ilość	Objętość	Przechowywanie	Warunki transportu	Trwałość
Genomtec® SARS-CoV-2 AmpMix	1 probówka	1350 µl	-22°C to -15°C	Suchy lub mokry lód	Sześć miesięcy
Genomtec® SARS-CoV-2 Duo-Primers	1 probówka	100 µl	-22°C to -15°C	Suchy lub mokry lód	Sześć miesięcy
Genomtec® SARS-CoV-2 C-Primers	1 probówka	100 µl	-22°C to -15°C	Suchy lub mokry lód	Sześć miesięcy
Genomtec® SARS-CoV-2 Control+	1 probówka	40 µl	-22°C to -15°C	Suchy lub mokry lód	Sześć miesięcy
DNase/RNase-Free Water	1 probówka	1000 µl	-22°C to -15°C	Suchy lub mokry lód	Sześć miesięcy

Jeżeli okres dostawy produktu wynosi do 48 godzin od momentu opuszczenia wskazanego powyżej zakresu temperatur przechowywania, do zabezpieczenia wysyłki można użyć zamrożonych wkładów chłodzących.

Jeżeli okres dostawy produktu wynosi powyżej 48 godzin od momentu opuszczenia wskazanego powyżej zakresu temperatur przechowywania, wysyłka musi zostać zabezpieczona poprzez użycie suchego lodu.

6. Kontrola jakości

6.1. Kontrole wewnętrzne dla testu

Kontrola pozytywna, negatywna, jak również wewnętrzna inhibicji, muszą każdorazowo zostać włączone do wykonywanego testu, aby w sposób dokładny zinterpretować wyniki badania pacjenta. Włączenie w procedurę wykonania testu kontroli inhibicji minimalizuje występowanie wyników potencjalnie fałszywie negatywnych.

Włącz do testu następujące kontrole:

Typ kontroli	Zawartość oraz cele genetyczne	Funkcjonalność
Kontrola Pozytywna	Syntetyczny cDNA SARS-CoV-2 z mieszaniną amplifikacyjną i starterami skierowanymi przeciwko specyficznej sekwencji genów N i S	Potwierdza odpowiednie warunki reakcji oraz stabilność odczynników testowych
Kontrola Negatywna	Mieszanina amplifikacyjna ze starterami rozpoznającymi specyficzną sekwencję genów N i S SARS-CoV-2 w połączeniu z wodą wolną od DNAz / RNAz	Potwierdza brak kontaminacji krzyżowej wynikającej z postępowania laboratoryjnego podczas przygotowania analizy
Kontrola Inhibicji	Mieszanina amplifikacyjna ze starterami rozpoznającymi określoną sekwencję ludzkiego genu rybonukleazy P z dodaną próbką RNA	Kontroluje możliwość zahamowania amplifikacji i poprawność procedury pobrania materiału biologicznego oraz jakość oczyszczonego RNA

6.2. Pobranie, transport i przechowywanie próbek

Materiał biologiczny należy pobierać od pacjentów zgodnie z obowiązującymi wytycznymi laboratoryjnymi. Należą do nich wymaz z gardła, wymaz z nosogardzieli oraz ślina.

Wszystkie próbki oraz kontrole należy traktować jako materiał potencjalnie zakaźny.

Próbkę należy przewozić na uniwersalnym medium transportowym lub innym zalecanym odpowiedniku mającym zastosowanie do tego typu próbek. Media transportowe zawierające Tiocyjany guanidyny mogą powodować inhibicję reakcji amplifikacji i nie powinny być używane. Próbkę można przebadać natychmiast po pobraniu, a jej przechowywanie musi być zgodne z wymaganiami producenta medium transportowego (w zakresie czasu trwania i temperatury przechowywania). Unikaj powtarzających się cykli zamrażania i rozmrażania. Próbki RNA należy transportować na suchym lodzie.

- Uwaga: próbki aspiratu z nosogardzieli i popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych (BAL) nie zostały zwalidowane do użytku.
- Uwaga: próbki śliny zostały przebadane pod kątem analitycznym poprzez wzbogacenie natywnej ludzkiej śliny ciepłonie inaktywowanym wirusem SARS-CoV-2 w różnych jego stężeniach, a następnie przeprowadzono reakcję izolacji RNA takich próbek. Próbki śliny nie zostały uwzględnione w walidacji klinicznej opisanej w rozdziale 9.4.

7. Instrukcja wykonania badania

7.1. Czynności niezbędne do wykonania przed rozpoczęciem badania

UWAGA WAŻNE

- W przypadku pracy z dużą liczbą próbek, aby zminimalizować wpływ czasu i temperatury na degradację RNA, zaleca się przechowywanie płytki wielodołkowej / mikropróbówek PCR, a także samego oczyszczonego RNA na lodzie / w bloku chłodzącym, aż do momentu załadowania do termocyklera.
- Użyj termocyklera Real-Time PCR do analizy zaraz po przygotowaniu wszystkich reakcji. Brak analizy zaraz po zakończeniu składania reakcji amplifikacji może doprowadzić do degradacji RNA.
- Zapobiegaj zanieczyszczeniu używając oddzielnych obszarów do oczyszczania RNA i amplifikacji kwasu nukleinowego; pracę z odczynnikami należy prowadzić w komorze laminarnej z funkcją sterylizacji promieniami UV oraz używać oddzielnych pipet do przygotowywania kontroli i próbek, oraz zawsze używać sterylnych końcówek z filtrem do pipet.
- Utrzymuj środowisko wolne od RNAz.
- Odczynniki zestawu, a w szczególności AmpMix, należy chronić przed światłem.
- Każda próbka wymaga jednoczesnego przeprowadzenia analizy kontroli inhibicji. Każde oznaczenie przeprowadzane w płytce wielodołkowej lub paskach mikro-próbówek PCR wymaga obecności kontroli pozytywnej i negatywnej (patrz w "Kontrola jakości", rozdział 6.)
- Po rozmrożeniu (rozmrzać w temperaturze $\leq 4^{\circ}\text{C}$) zaleca się umieszczenie wszystkich odczynników w bloku chłodzącym lub na lodzie, aby zachować ich funkcjonalność o ile nie dochodzi do wytracenia się osadu w próbówce AmpMix (patrz rozdział 5. Warunki transportu, przechowywania oraz trwałości)

7.1.1. Przygotowanie - krok 1

Pierwszym krokiem procedury diagnostycznej jest pobranie materiału biologicznego (wymazu z gardła, wymazu z nosogardzieli lub śliny) i wyizolowanie RNA z próbki (odpowiednio dla typu pobranej próbki).

7.1.2. Przygotowanie - krok 2

Jakość wyizolowanego RNA może wpłynąć na jakość reakcji RT-LAMP, w związku z tym zaleca się, aby laboratoria stosowały wcześniej zwalidowaną metodę izolacji z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu. W przypadku próbki śliny, zalecana minimalna objętość potrzebna do oczyszczania RNA, wynosi 200 μl .

7.1.3. Przygotowanie - krok 3

Wszystkie dostarczone i niezbędne odczynniki oraz składniki testu należy rozmrozić w temperaturze $\leq 4^{\circ}\text{C}$, a następnie delikatnie zworteksować (wymieszać) i szybko odwirować (w celu zebrania cieczy z nakrętki).

7.1.4. Przygotowanie - krok 4

Przygotuj reakcję zgodnie z punktem 7.2 Protokołu wykonanie reakcji amplifikacji.

7.2. Protokół wykonania reakcji amplifikacji

7.2.1. Etap 1

Przygotuj wszystkie kontrole testu i próbki zgodnie z Tabelą 2. Każda próbka wymaga równoczesnej analizy z kontrolą inhibicji. Każdorazowa analiza płytki lub pasków mikropróbówek PCR wymaga obecności kontroli pozytywnej i negatywnej. Nanieś pipetą AmpMix wymieszany z starterami (Duo-Primers) do detekcji poszukiwanych genów wirusa SARS-CoV-2 lub z kontrolnymi starterami (C-Primers) do wyznaczonych dołków, a następnie dodaj sterylną wodę wolną od DNAz / RNAz lub próbkę lub wymaganą kontrolę. Końcowa objętość w każdym dołku wynosi 20 μl .

Tabla 2. Przygotowanie reakcji.

Odczynniki	Analit	Kontrola Inhibicji	Kontrola Pozytywna	Kontrola Negatywna
Genomtec® SARS-CoV-2 AmpMix	13,5 µl	13,5 µl	13,5 µl	13,5 µl
Genomtec® SARS-CoV-2 Duo-Primers	1,5 µl	-	1,5 µl	1,5 µl
Genomtec® SARS-CoV-2 C-Primers	-	1,5 µl	-	-
Próbka RNA pochodząca od pacjenta	5 µl	5 µl	-	-
Genomtec® SARS-CoV-2 Control+	-	-	5 µl	-
Woda wolna od DNAz/RNAz	-	-	-	5 µl
Całkowita objętość	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

7.2.2. Etap 2

Pipetuj kilkakrotnie każdorazowo dodaną ciecz do mieszaniny reakcyjnej w celu jej dokładnego wymieszania.

7.2.3. Etap 3

Zaklej płytkę PCR folią optyczną, a następnie szybko zwiń, aby zebrać całość płynnej mieszaniny na dnie dołka / mikro-probówki PCR.

7.2.4. Etap 4

Umieść płytkę wielkodołową lub mikro-probówki PCR w instrumencie RT-PCR, który został zaprogramowany w następujący sposób:

Etap	Temperatura [°C]	Czas [sek.]	Detekcja fluorescencji	Cykle / powtórzenia
Amplifikacja 1	64	30		30
Amplifikacja 2*	64	30	FAM / Green	

* Odczyt sygnału fluorescencji jest wykonywany podczas kroku 2 każdego powtórzenia.

Odczyt fluorescencji następuje po każdej minucie cyklu grzania (sumarycznie 29 odczytów składających się na ostateczny wynik krzywej amplifikacji). Przykładowy program dla systemu Bio-Rad CFX96 Dx System przedstawiony został na poniżej rycinie.



ETAP OPCJONALNY:

Kiedy wymagane jest to odrębnymi przepisami, w celu dokładnego określenia, które geny (N i / lub S) zostały wykryte w teście, po reakcji amplifikacji przeprowadź analizę krzywej topnienia celem odróżnienia amplikonu genu N od amplikonu genu S. Amplikony są identyfikowane na podstawie ich

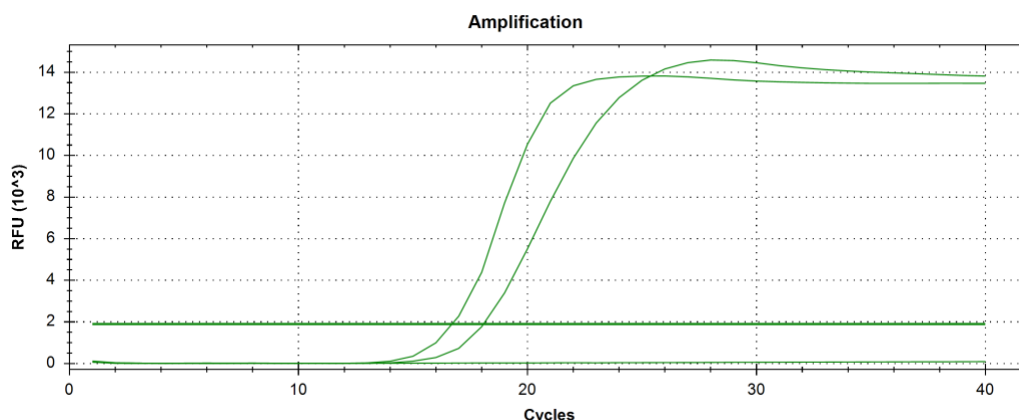
temperatury topnienia. Poniższa tabela przedstawia ustawienie do odczytu dla instrumentu PCR w czasie rzeczywistym.

Krzywa topnienia	Temperatura	Czas [min.]
Etap 1	65.0°C do 95.0 °C, przyrost co 0.5 °C	0:05
Etap 2	80.0°C	5:00
Etap 3	10.0°C	10:00

7.2.5. Etap 5

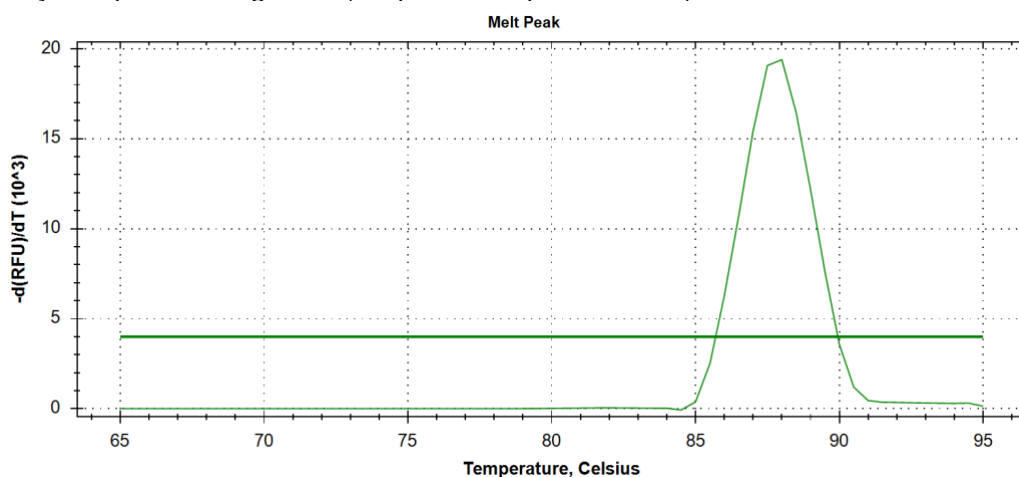
Objętość mieszaniny reakcyjnej to 20 µl w pojedynczym dołku wielodołkowej płytki PCR lub pojedynczej probówce paska mikro-probówek PCR z optycznie przezroczystymi wieczkami. Dodatkowo termocykler Real-Time PCR musi być wyposażony w filtry optyczne umożliwiające odczyt fluorescencji w kanale FAM / Green (zielonym). Lista zwalidowanych instrumentów RT-PCR znajduje się w rozdziale 3.3 „Zasady postępowania z produktem medycznym”. Ustaw protokół przebiegu reakcji amplifikacji w oprogramowaniu instrumentu RT-PCR. Poniżej przedstawiono przykład krzywych amplifikacji uzyskanych dla próbek dodatnich i ujemnych, a także wartość progową tła. Dla kontroli inhibicji sygnał fluorescencji musi pojawić się najdalej w 25 minucie reakcji amplifikacji

Zaleca się, aby wartość progową tła ustalić pomiędzy $1,5 \cdot 10^3$ RFU a $3 \cdot 10^3$ RFU dla instrumentu producenta BioRad.

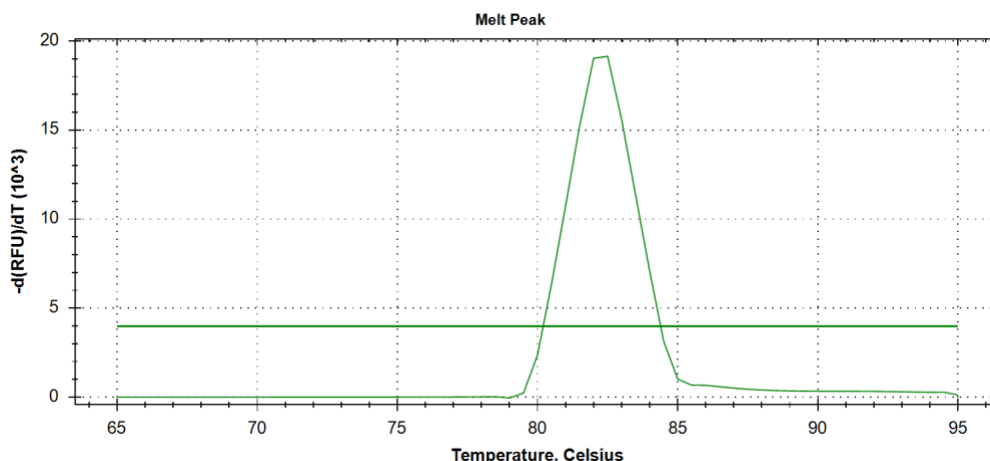


Poniżej przykład krzywej topnienia uzyskanej dla ampikonu genu *N*, z T_m ok. 88.0°C, a także dla ampikonu genu *S*, z T_m ok. 82.5°C oraz kontroli inhibicji, z T_m ok. 84.0°C. Wyniki analizy topnienia zostały uzyskane na instrumencie Bio-Rad CFX96 Dx System. Na innym termocyklerze Real-Time PCR, temperatury T_m mogą się nieco różnić od wskazanych poniżej, jednak powinny zostać w przedziale od 82.5°C do 83.5°C dla genu *S* SARS-CoV-2, od 87.5°C od 88°C dla genu *N* SARS-CoV-2 oraz od 83.5°C od 84.5°C dla genu kontroli inhibicji.

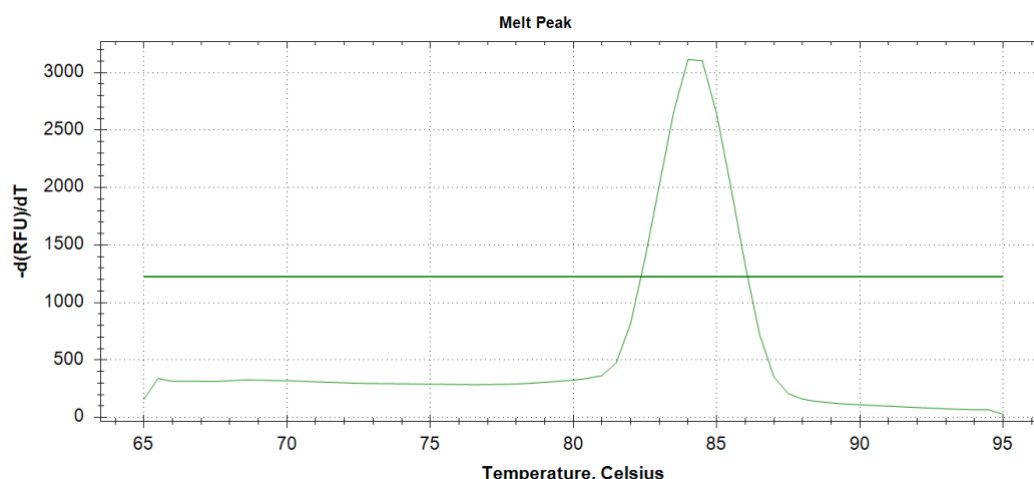
Krzywa topnienia dla genu *N* (temperatura topnienia 88° C)



Krzywa topnienia dla genu S (temperatura topnienia 82.5° C)



Krzywa topnienia dla genu kontroli inhibicji (temperatura topnienia 84.0° C)



8. Interpretacja wyników

8.1. Interpretacja wyników klinicznych próbek pacjentów

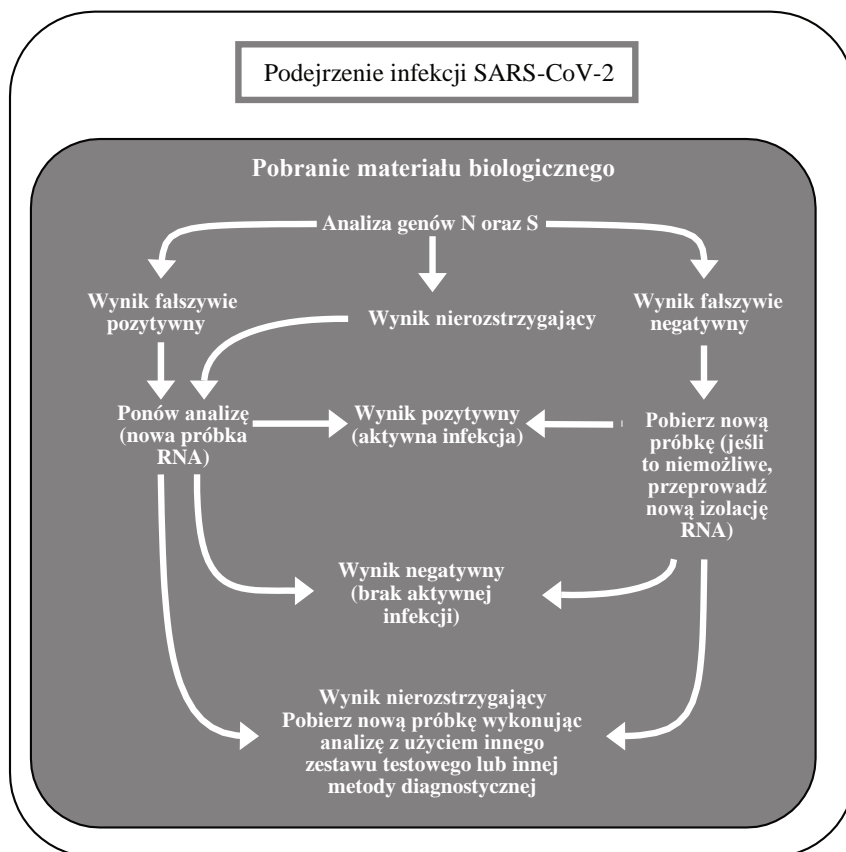
Zalecenia Genomtec® dotyczące użytkowania produktu Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit są następujące:

- W przypadku zaistnienia nowych lub podejrzanych przypadków choroby COVID-19 w populacji należy zastosować zestaw odczynnikowy Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit w celu rozpoznania diagnostycznego SARS-CoV-2. Wynik dodatni dla SARS-CoV-2 (wykryty sygnał fluorescencyjny w analizie) wraz z obecnością poprawnych wyników kontroli testu, powinien wystarczyć dla wskazania aktywnej infekcji.
- Jeżeli potwierdzenie genów specyficznych ampikonów powstałych podczas reakcji jest wymagane przez system prawny / regulacyjny w danym kraju, należy przeprowadzić analizę topnienia, jak opisano w rozdziałach 7.2.4 i 7.2.5. W oparciu o otrzymane krzywe topnienia, diagnostyczne potwierdzenie wyniku testu jest osiągnięte w momencie wykrycia co najmniej jednego z ampikonów genów (N i / lub S). Jednocześnie wszystkie kontrole testu powinny wskazywać na prawidłowy przebieg analizy.

Aby ocenić poprawność wyniku analizy, kontrola pozytywna dla każdej serii analiz powinna wykazywać sygnał fluorescencji, podczas gdy sygnał fluorescencji z kontroli negatywnej nie powinien przekraczać progu szumu. Kontrola inhibicji powinna wykazywać sygnał dodatni przy każdej analizowanej próbce pacjenta.

W przypadku wykrycia sygnału w kontroli negatywnej lub braku sygnału w kontroli pozytywnej reakcję amplifikacji należy powtórzyć.

Proszę zapoznać się z poniższym schematem „COVID-19 ścieżka diagnostyczna”



Dla interpretacji wyników testu, należy postępować zgodnie ze wskazówkami zawartymi w Tabeli 3.

Tabela 3. Interpretacja wyniku badania próbki pacjenta.

Próbka RNA	Kontrola Inhibicji	Interpretacja wyniku
+	+	POZYTYWNY
-	+	NEGATYWNY
+	-	NIEROZSTRZYGAJĄCY
+	-	FAŁSZYWIE POZYTYWNY (w przypadku detekcji sygnału fluorescencji w kontroli negatywnej)
-	-	FAŁSZYWIE NEGATYWNY

POSTĘPOWANIE PRZY UZYSKANU OKREŚLONEGO WYNIKU:

- POZYTYWNY – należy zgłosić wyniki odpowiedniemu organowi nadzoru sanitarnego / organizacji zdrowia publicznego, jeśli ma to zastosowanie.
- NEGATYWNY – należy zraportować wyniki świadczeniodawcy; jeśli pacjent

poddawany ocenie diagnostycznej wykazuje objawy chorobowe, należy rozważyć dalszą diagnostykę w kierunku innych patogenów.

- **NIEROZSTRZYGAJĄCY** – należy powtórzyć test na świeżo wyizolowanym RNA z badanego materiału biologicznego (użycie starej, oczyszczonej próbki RNA tylko w przypadku, kiedy świeża izolacja nie jest możliwa). W przypadku, kiedy powtórzony wynik nadal jest nierozstrzygujący, rozważyć należy ponowne pobranie materiału biologicznego od pacjenta lub zastosowanie innego testu genetycznego lub innej metody diagnostycznej.
- **FAŁSZYWIE POZYTYWNY** (w przypadku obecności sygnału amplifikacji pochodzącego z kontroli negatywnej) – należy powtórzyć test z wcześniej wyizolowaną próbką RNA po dekontaminacji komory laminarnej wykorzystywanej do przygotowania reakcji amplifikacji.
- **FAŁSZYWIE NEGATYWNY** – należy powtórzyć test genetyczny zalecając ponowne pobranie materiału biologicznego. Jeśli uzyskany, powtórzony wynik pozostaje fałszywie negatywny lub niejednoznaczny, należy rozważyć zastosowanie innego testu diagnostycznego lub procedury diagnostycznej.
- Jeśli powtórna analiza potwierdzi obecność zarówno RNA wirusa SARS-CoV-2, jak i ludzkiego RNA (kontrola inhibicji jest dodatnia), należy przyjąć wynik jako prawdziwie pozytywny.
- Jeśli powtórna analiza nie daje sygnału fluorescencji w reakcji wykrywającej RNA SARS-CoV-2, a kontrola inhibicji jest dodatnia, wynik jest prawdziwie negatywny.

8.2. Ograniczenia

Zestaw odczynnikowy Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit jest przeznaczony do użytku w medycznym laboratorium diagnostycznym przez wykwalifikowany i przeszkolony personel. Laboratorium powinno mieć wdrożony system jakości i działać zgodnie z GLP oraz zgodnie z wytycznymi przedstawionymi w niniejszym Dokumencie. Ma to na celu zapobiegania zanieczyszczeniu krzyżowemu pomiędzy próbkami RNA pacjentów oraz innymi składowymi (odczynnikami) zestawu.

- Zestaw odczynników Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit został zweryfikowany w zewnętrznym badaniu przeprowadzonym na wymazach z gardła i nosogardzieli, w celu wykrycia SARS-CoV-2. Walidację kliniczną opisano w sekcji 9.4.
- Instrumenty RT-PCR opisane w rozdziale 3.3 „Zasady postępowania z produktem medycznym”, zostały wykorzystane w celach walidacji zestawu diagnostycznego.
- Pobieranie materiału biologicznego, jego transport i przechowywanie należy przeprowadzać zgodnie z informacjami zawartymi w rozdziale 5 niniejszego dokumentu oraz krajowymi wytycznymi dotyczącymi postępowania z materiałem biologicznym i jego przechowywania.
- Wszystkie odczynniki zestawu diagnostycznego należy przechowywać zgodnie z warunkami przedstawionymi w Tabeli 1. Nieprzestrzeganie wytycznych może negatywnie wpłynąć na uzyskane wyniki procedury diagnostycznej, zakłámując je.
- Aby zapewnić najwyższą jakość wyizolowanego RNA, należy obowiązkowo używać wcześniej zwalidowanej w danym laboratorium metody oczyszczania RNA, odpowiedniej dla każdego stosowanego rodzaju materiału badanego.
- **FAŁSZYWIE NEGATYWNE** wyniki mogą wskazywać na:
 - Nieprawidłowe pobranie materiału biologicznego.
 - Degradację RNA podczas jego przechowywania / transportu (niezachowanie wytycznych opisanych w tym dokumencie).
 - Nieefektywne oczyszczenie RNA.
 - Obecność inhibitorów RT-LAMP w reakcji (zewnętrzne zanieczyszczenie środowiska pracy i / lub laboratoryjnych materiałów zużywalnych do PCR).
 - Mutacja w docelowych fragmentach genów SARS-CoV-2 (Genomtec stale monitoruje zdolność zestawu do rozpoznania sekwencji genomowych w innych szczepach SARS-CoV-2, aby zminimalizować to ryzyko).
 - Nieprzestrzeganie wytycznych procedury diagnostycznej zawartej w załączonym Dokumencie.

- FAŁSZYWIE POZYTYWNE wyniki mogą wskazywać na :
 - Zanieczyszczenie krzyżowe komponentów zestawu diagnostycznego lub / i próbek RNA podczas przygotowywania reakcji.
 - Pomieszanie próbek.
 - Zanieczyszczenie zewnętrzne RNA podczas prac laboratoryjnych.
- Wynik negatywny uzyskany za pomocą testu diagnostycznego Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit nie wyklucza infekcji wirusem SARS CoV-2, a przy interpretacji tego wyniku oraz określaniu statusu zakażenia, należy także uwzględnić wyniki innych badań diagnostycznych oraz historii choroby (stanu klinicznego) pacjenta.
- Laboratoria powinny zgłosić wszystkie uzyskane wyniki pozytywne do odpowiedniej instytucji wskazanej obowiązującymi przepisami.

9. Charakterystyka parametrów diagnostycznych

9.1. Czulość testu (Limit Detekcji)

Limit detekcji (LOD) jest najmniejszą liczbą ekwiwalentów genomowych (GE) SARS-CoV-2, którą można wykryć za pomocą zestawu Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit.

Limit detekcji testu określono wykonując 20 powtórzeń dla serii rozcieńczeń standardu RNA – pełnego genomu inaktywowanego termicznie wirusa SARS-CoV-2, szczep USA-WA1 / 2020. Założono, że wynik uznaje się za prawdziwy, dla minimalnej liczby ekwiwalentów genomowych osiągniętej w przedziale ufności (CI) wynoszącym 95%. LOD testu SARS-CoV-2 Duo Kit zostało ustanowione na 20 ekwiwalentów genomowych na reakcję (dla poszukiwanych sekwencji na genie S i / lub N w teście).

9.2. Reaktywność analityczna

Startery testowe zmapowano do referencyjnej sekwencji kompletnego genomu SARS-CoV-2 NC_045512.2: 28274-29533, szczepu koronawirusa 2 Wuhan-Hu-1 (odpowiedzialnego za wystąpienie ciężkiego ostrego zespołu oddechowego). Startery LAMP (pięć) rozpoznające siedem sekwencji flankujących genu N SARS-CoV-2 wykazały 100% homologii z analizowanym genomem SARS-CoV-2. Startery LAMP (sześć) rozpoznające osiem sekwencji genu S SARS-CoV-2 wykazały 100% homologii z analizowanym genomem SARS-CoV-2. Startery zostały zaprojektowane w celu rozpoznania i namnożenia wysoce konserwatywnej sekwencji genów N i S wirusa SARS-CoV-2.

W celu potwierdzenia pokrycia celowanych sekwencji przez startery, przeprowadzono analizę dopasowania 45 sekwencji genu N i 44 sekwencji genu S aktualnie występujących w publicznych genomowych bazach danych, a uzyskanych poprzez sekwencjonowanie genomu SARS-CoV-2. 100% swoistości potwierdzono dla 6 z 7 regionów amplifikowanego fragmentu genu N (miejsce mutacji wykryto na końcu 5' jednego ze starterów, co ze względu na charakter technologii amplifikacji nie wpływa na wydajność reakcji), oraz dla 8 regionów amplifikowanego fragmentu genu S. Uzupełniająca analiza specyficzności w kierunku zmutowanych szczepów wirusa przeprowadzona *in-silico* oraz w wyniku dodania do mieszaniny złożonej z AmpMix i starterów rozpoznających fragmenty genów N oraz S cDNA fragmentów genów S oraz N pochodzących ze zmutowanych szczepów wirusa SARS-CoV-2 potwierdziła, iż zestaw Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit z powodzeniem wykrywa zdefiniowane poniżej szczepy wirusa:

Numer dostępowy	Wariant	Klasyfikacja WHO
EPI_ISL_723044	B.1.1.7	Alfa
EPI_ISL_825139	B. 1.351	Beta
EPI_ISL_792680	P.1	Gamma
EPI_ISL_2650470	B.1.617.2	Delta
EPI_ISL_2631197	B.1.427/B.1.429	Epsilon
EPI_ISL_2614193	P.2	Zeta
EPI_ISL_1563854	B.1.525	Eta
EPI_ISL_1122452	P.3 (version: 2021-04-01)	Theta
EPI_ISL_2647531	B.1.526	Iota
EPI_ISL_1415353	B.1.617.1	Kappa
EPI_ISL_2536799	C.37	Lambda
EPI_ISL_1259297	Breton (hCoV-19/France/BRE-IPP04233/2021)	N/A

Dodatkowo, przeprowadzona analiza *in silico* sprawdziła czy startery nie reagują krzyżowo z innymi patogenami o wysokiej częstotliwości występowania w drogach oddechowych i mikrobiomem występującym w próbce materiału biologicznego. W tym celu wykorzystano algorytm BLAST. Analiza BLAST wykazała > 85% homologii dla SARS-CoV w dwóch (F3 i B3) z pięciu indywidualnych starterów w zestawie nakierowanym na wykrycie fragmentu genu N. Zestaw starterów genu S nie wykazał żadnej znanej homologii w analizie BLAST.

9.3. Swoistość analityczna (reakcje krzyżowe)

Swoistość zestawu Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit została dodatkowo potwierdzona w analizie, gdzie mieszanina amplifikacyjna (zawierająca AmpMix i startery rozpoznające fragmenty genów N i S) została wzbogacona materiałem genetycznym patogenów wymienionych poniżej w tabeli, po czym poddano ją reakcji testowej RT-LAMP.

Poniżej lista trzydziestu (30) patogenów objętych oceną laboratoryjną zagrożenia wystąpienia reakcji krzyżowej. Żaden z wymienionych poniżej patogenów nie wykazał wyniku pozytywnego w reakcji RT-LAMP dla analizowanego testu.

Mycoplasma genitalium	Escherichia coli
Streptococcus pyogenes	Candida albicans
Enterococcus faecalis	Mycoplasma pneumoniae
Moraxella catarrhalis	Klebsiella pneumoniae
Legionella pneumophila	Staphylococcus aureus methicilin sensitive (MSSA)
Enterococcus faecium	Acinetobacter baumannii
Mycoplasma hominis	Ureoplasma urealyticum
Haemophilus influenzae	Human genomic DNA
Bordetella pertussis	Staphylococcus aureus methicilin resistant (MRSA)
Pseudomonas aeruginosa	Listeria monocytogenes
Haemophilus ducreyi	Campylobacter jejuni
Chlamydia pneumoniae	Mobiluncus mulieris
Influenza A (H1N1, H3N2)	Influenza B
HCoV-OC43	HCoV-229E
SARS-CoV	MERS

9.4. Walidacja kliniczna

W celu oceny działania zestawu diagnostycznego Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit przeprowadzono badanie kliniczne na grupie wymazów z gardła i nosogardzieli uzyskanych od pacjentów podejrzanych o zakażenie wirusem SARS-CoV-2 lub z objawami choroby COVID-19 na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej. Materiał biologiczny użyty w badaniu obejmował próbki resztkowe z rutynowo pobieranych wymazów do diagnostyki COVID-19 i postępowania klinicznego, które w przeciwnym razie zostałyby zutilizowane. W badaniu użyto pilotażową wersję zestawu diagnostycznego, a samo badanie zostało przeprowadzone w jednym niezależnym medycznym laboratorium diagnostycznym w Polsce w IV kwartale 2020 roku, na łącznej liczbie 40 próbek klinicznych.

Sposób pobierania próbek i zastosowane medium transportowe (rodzaj i producent) były zgodne z ogólnymi przepisami obowiązującymi w obszarze laboratoryjnej diagnostyki klinicznej w Polsce (zalecenia NIZP-PZH), a także z zaleceniami WHO.

Pacjenci, którym pobrano wymaz, zostali na niego skierowani na podstawie objawów klinicznych, podejrzenia zarażenia się wirusem SARS-CoV-2 w wyniku bliskiego kontaktu z osobą (osobami) zakażonymi, lub podróżni, którzy przyjechali na terytorium Polski z zagranicy i byli poddawani kwarantannie. Wszyscy pacjenci zostali skierowani na badanie diagnostyczne w kierunku obecności wirusa SARS-CoV-2 przez pracownika służby zdrowia w Polsce.

Każdy pacjent miał pobrany jeden wymaz, który w pierwszej kolejności poddany został badaniu z wykorzystaniem standardowego testu diagnostyki molekularnej opartego na technologii Real-Time PCR. Jeśli pozostała próbka RNA zawierała wystarczającą ilość materiału genetycznego do wykonania testu z użyciem pilotażowej wersji zestawu diagnostycznego Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit, materiał ten posłużył do wykonania reakcji amplifikacji na termocyklerze Real-Time PCR. Do badania wykorzystano zarówno świeże jak i przechowywane w temperaturze poniżej -70°C próbki RNA.

W ocenie działania jako metodę referencyjną wykorzystano zestawy diagnostyczne RT-PCR CE-IVD (wykrywające co najmniej dwa geny wirusa SARS-CoV-2), a protokół przeprowadzenia reakcji był zgodny z zaleceniami producenta. Próbki były również badane za pomocą pilotażowej wersji zestawu Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit, zgodnie z instrukcją zawartą w tym dokumencie technicznym. Oczyszczanie kwasu nukleinowego przeprowadzono za pomocą jednego z komercyjnie dostępnych zestawów do izolacji RNA. Do badania klinicznego włączono łącznie 39 próbek. W jednym przypadku próbka, która dała wynik nierozstrzygający w analizie RT-PCR czasu rzeczywistego, a pozytywny wynik na zestawie pilotażowym Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit. Próbka ta została wykluczona z badania klinicznego (brak potwierdzenia diagnostycznego według producenta zestawu RT-PCR). Tabela 4 zbiorczo przedstawia parametry diagnostyczne uzyskane w badaniu dla próbek w porównaniu do standardowej metody RT-PCR czasu rzeczywistego.









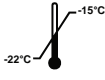







Tabela 4.

		Wyniki referencyjnej metody RT-PCR czasu rzeczywistego		
		Pozytywne	Negatywne	Ogółem
Genomtec® SARS-CoV-2 RT- LAMP CE-IVD Duo Kit	Pozytywne	16	-	16
	Negatywne	-	23	23
	Ogółem	16	23	39
Czułość (SE)		16/16 = 100% (95% CI: 79.41%-100.00%)		
Swoistość (SP)		23/23 = 100% (95% CI: 85.18%-100.00%)		
Dodatnia wartość predykcyjna (PPV)		16/16 = 100% (95% CI: 75.93%-100.00%)		
Negatywna wartość predykcyjna (NPP)		23/23 = 100% (95% CI: 82.20%-100.00%)		

9.3.1 Podsumowanie

Potwierdzono, że test Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT-LAMP CE-IVD Duo Kit wykazuje 100% czułość i swoistość w porównaniu ze standardowym (CE-IVD) laboratoryjnym testem diagnostycznym RT-PCR z pomiarem ilości przyrostu produktu w czasie rzeczywistym, dla procedury wykrywania obecności, lub jej braku, wirusa SARS-CoV-2 w próbkach klinicznych. Zarówno wartości PPV, jak i NPP uzyskano na poziomie 100%. Precyzja diagnostyczna testu (prawdopodobieństwo prawidłowej klinicznej klasyfikacji pacjenta) została uzyskana na poziomie 100% (95% CI: 90,97% -100,00%).

10. Znaki i symbole

Symbole (IEC 15223-1 2016)	Opis
	Wskazuje na potrzebę zapoznania się przez użytkownika z instrukcją.
	Wskazuje kod serii producenta, w celach identyfikacji partii lub serii.
	Wskazuje całkowitą liczbę testów IVD, które można wykonać za pomocą zestawu IVD.
	Wskazuje numer katalogowy producenta, w celach identyfikacji wyrobu medycznego.
	Wskazuje wyrób medyczny przeznaczony do użytku w medycznej diagnostyce <i>in-vitro</i> .
	Wskazuje wyrób medyczny zgodny z najnowszą dyrektywą UE.
	Wskazuje datę, po której wyrób medyczny nie może być używany.
	Wskazuje producenta urządzenia medycznego zgodnie z dyrektywami UE 90/385/EEC, 93/42/EEC i 98/79/EC.
	Wskazuje przedział temperatur, który gwarantuje bezpieczeństwo przechowywania produktu.
	Wskazuje wyrób medyczny, którego nie należy używać, jeśli opakowanie zostało naruszone lub otwarte.
	Wskazuje wyrób medyczny wymagający ochrony przed źródłami światła.
	Wskazuje produkt cząstkowy Genomtec® SARS-CoV-2 AmpMix.
	Wskazuje produkt cząstkowy Genomtec® SARS-CoV-2 Duo-Primers Mix.
	Wskazuje produkt cząstkowy Genomtec® SARS-CoV-2 C-Primers Mix.
	Wskazuje produkt cząstkowy Genomtec® SARS-CoV-2 Positive Control.
	Wskazuje produkt cząstkowy DNase/RNase-Free Water.

11. Kontakt i zamówienia

Produkt	Nr katalogowy
Genomtec® SARS-CoV-2 EvaGreen® RT- LAMP CE-IVD Duo Kit – Polska wersja językowa	GA00B

W celu składania zamówień:

<https://genomtec.com/kontakt/>

W celu wsparcia technicznego:

<https://genomtec.com/wsparcie-techniczne/>