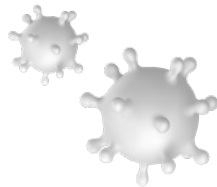


# Návod na použitie

Ver. 2.0 (sk), 04/2021



## VŠEOBECNÉ UPOZORNENIA!

- Tento kit je určený na *in vitro* diagnostické účely.
- Pred začiatkom práce si prečítajte všetky inštrukcie, ktoré sa nachádzajú v tomto návode na použitie, vonkajšom obale a štítkoch komponentov.
- SARS-CoV-2 je nebezpečný patogén, preto by sa mali dodržiavať všetky príslušné predpisy a odporúčania pre zaobchádzanie s týmto typom patogénu.
- Pozitívny výsledok získaný kitom VIVID COVID-19 LAMP Direct-G určuje prítomnosť RNA vírusu SARS-CoV-2, v stanovovanej vzorke a nemôže byť jediným kritériom na posudzovanie infekčnosti osoby, ktorá poskytla vzorku. Je nutné zvážiť aj iné faktory ako napríklad klinická prezentácia, výsledky iných diagnostických testov a osobná resp. lekárska anamnéza predmetnej osoby. Obdobne, negatívny výsledok nevyučuje infikovanosť testovanej osoby, hlavne v prípade prezentácie symptómov konzistentných s ochorením COVID-19. Výsledky by mali vždy interpretovať školený zdravotnícky personál. V prípade akýchkoľvek neznalostí medzi výsledkom testu a ostatnými klinicky relevantnými informáciami nasledujte príslušné postupy zdravotnej agentúry vo vašej jurisdikcii.

## 1. Vysvetlivky a skratky

**BSL:** úroveň biologickej bezpečnosti (skratka z angl. „biosafety level“)

**COVID-19:** ochorenie spôsobené vírusom SARS-CoV-2 (skratka z angl. „COronaVirus Disease 2019“)

**DNA:** deoxyribonukleová kyselina

**dUTP:** deoxyuridín trifosfát

**gén E:** gén kódujúci malý membránový obalový proteín vírusu SARS-CoV-2 (z angl. „envelope“)

**gén ORF1ab:** gén kódujúci otvorený čítací rámec 1ab vírusu SARS-CoV-2 (z angl. „open reading frame 1ab“)

**gén RNase P:** gén kódujúci ľudskú jadrovú ribonukleázu P

**gén N:** gén kódujúci nukleokapsidový proteín vírusu SARS-CoV-2 (z angl. „nucleocapsid“)

**LAMP:** slučkou-umožnená izotermická amplifikácia (skratka z angl. „Loop-mediated isothermal Amplification“)

**LoD:** limit detekcie (z angl. „Limit of Detection“)

**NTC:** kontrola bez templátu (skratka z angl. „Non Template Control“)

**PC:** pozitívna kontrola (skratka z angl. „Positive Control“)

**qPCR:** kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia (skratka z angl. „Quantitative Polymerase Chain Reaction“)

**RNA:** ribonukleová kyselina

**RT-LAMP:** LAMP s reverznou transkripciou

**RT-qPCR:** qPCR s reverznou transkripciou

**SARS-CoV-2:** koronavírus 2 ťažkého akútneho respiračného syndrómu (skratka z angl. „Severe Acute Respiratory Syndrome COronaVirus 2“)

## 2. Účel použitia

Diagnostický kit Vivid COVID-19 LAMP Direct-G je kvalitatívny diagnostický test *in vitro* určený na detekciu prítomnosti genetického materiálu koronavírusu SARS-CoV-2 vo vzorkách biologického materiálu získaného z horných dýchacích ciest kloktaním metódou RT-LAMP.

Diagnostický kit Vivid COVID-19 LAMP Direct-G je určený na použitie v adekvátne vybavených priestoroch s príslušnými bezpečnostnými normami, zariadením a riadne vyškoleným personálom.

## 3. Princíp testu

Diagnostický kit Vivid COVID-19 LAMP Direct-G je určený na detekciu genómovej RNA vírusu SARS-CoV-2 zo vzoriek získaných kloktaním bez predošlej extrakcie RNA.

Diagnostický kit Vivid COVID-19 LAMP Direct-G je interne vyvinutý izotermický LAMP test na detekciu vírusu SARS-CoV-2 vhodný na vizuálnu detekciu prítomnosti RNA vírusu SARS-CoV-2. Test je jednokrakový, t.j. zahŕňa RT a LAMP amplifikáciu v jednej reakcii (RT-LAMP). Okrem toho je tento test navrhnutý tak, aby pracoval iba s minimálne spracovanými vzorkami získanými kloktaním bez nutnosti predchádzajúcej extrakcie RNA; vzorky stačí iba pred prípravou reakcie zahriať/inkubovať s pribaleným inaktivačným činidlom podľa pokynov. Kit obsahuje sadu primerov na multiplexnú detekciu génov E, ORF1ab a N SARS-CoV-2. Táto zmes primerov bola špeciálne navrhnutá a optimalizovaná tak, aby interakcie primerov nevedli k nešpecifickým produktom amplifikácie a teda k falošne pozitívnym výsledkom, ktoré sú pre metódu LAMP relatívne bežné. Multiplexná LAMP detekcia zároveň výrazne zvyšuje citlivosť a znižuje rozdiely v detekčnom čase. Druhá sada primerov je určená na detekciu génu ľudskej RNázy P, ktorá slúži ako vnútorná kontrola na overenie správneho odberu vzorky pacienta, zachovania integrity RNA a vykonania testu. Aj keď sekvenčne táto sada primerov nerozlišuje medzi genómovou DNA a messengerovou RNA, v praxi vykazuje významne zvýšenú citlivosť na RNA substráty. Komplexná genomická RNA vírusu SARS-CoV-2 obohatená ľudskou RNA poskytnutá Biomedicínskym centrom Slovenskej akadémie vied je zahrnutá ako vnútorná pozitívna kontrola. Na vykonanie reakcie postačuje suchý termoblok s alebo bez ohrevu viečka, ktorý je schopný zahriať vzorky na najmenej 95 °C. Súprava navyše obsahuje nami interne vyvinutý a patentovaný kolorimetrický detekčný systém, ktorý nie je citlivý na pH vstupnej vzorky. Vďaka nemu v pozitívnych reakciách spolaľhivo dochádza k zmene farby z purpurovej na žltú, ktorá je ľahko viditeľná voľným okom.

Jedno balenie súpravy pri použití podľa odporúčania postačuje na otestovanie 200 vzoriek (200 reakcií pre SARS-CoV-2 a 200 reakcií pre RNázu P).

Podrobnosti o príprave testových reakcií nájdete v časti 7.3. Príprava reakčnej zmesi.

Test internej pozitívnej kontroly ľudskej RNázy P slúži na overenie kvality odberu a spracovania vzorky a na stanovenie prítomnosti ľudskej RNA vo vzorke, čím sa eliminujú falošne negatívne výsledky.

## 4. Zloženie kitu

- 1x zmes lyofilizovaných primerov na detekciu SARS-CoV-2, označené SARS-CoV-2 Primer Mix (musia byť rozpustené v 1100 µl PCR Water)
- 1x zmes lyofilizovaných primerov na detekciu ľudskej RNázy P, označené RNase P Primer Mix (musia byť rozpustené v 550 µl PCR Water)

- 1x lyofilizovaná PC SARS-CoV-2 BMC5 (musí byť rozpustená v 250 µl PCR Water)
- 4x 1,875 ml LAMP 2x Master Mix
- 2x 1 ml LAMP 10x Lysis Buffer
- 2x 5 ml PCR Water, nuclease free
- 1x Návod na použitie

## 5. Skladovanie a doba použiteľnosti:

### UPOZORNENIE!

Diagnostický kit nepoužívajte po uplynutí doby expirácie, ktorá je uvedená na vonkajšom aj vnútornom obale.

### PRIPOMENKY!

- Používajte vhodné ochranné oblečenie, rukavice a ochranu očí a tváre.
- Po manipulácii so vzorkami a reagensiami si vždy dôkladne umyte ruky.

Všetky zložky kitu musia byť prepravované a skladované pri -20 °C. LAMP 2x Master Mix obsahuje komponenty, ktoré sú citlivé na svetlo a mali by byť chránené pred svetlom vždy, keď je to možné. Čas použiteľnosti súpravy je maximálne 12 mesiacov od dátumu výroby. Presná doba expirácie súpravy je uvedená na vonkajšom obale a obdobie je uvedená pri jednotlivých komponentoch súpravy na vnútornom obale.

Užívateľom, ktorí uskutočňujú menší počet reakcií v rámci jedného pracovného cyklu, odporúčame všetky zložky kitu rozalíkvtovať v súlade s interne zaužívanými postupmi a štandardným počtom reakcií na jeden pracovný cyklus. Alikvotovanie zložiek kitu minimalizuje potrebu opakovaného otvárania jednotlivých skúmaviek a tým minimalizuje riziko kontaminácie zložiek kitu. Alikvotovanie zložiek kitu taktiež zabráni opakovaniu rozmrazovaniu a zmrazovaniu jednotlivých zložiek, ktoré môže viesť k zníženiu účinnosti. Pred alikvotovaním je nevyhnutné jednotlivé zložky kitu úplne rozmraziť. Tesne pred uskutočnením alikvotovania je nevyhnutné obsah skúmaviek dôkladne premiešať, aby bol úplne homogénny. V prípade skúmaviek obsahujúcich enzýmy (LAMP 2x Master Mix) odporúčame miešanie uskutočniť mnohonásobným otočením skúmavky prípadne krátkym pulzným vortexovaním. Zmesi obsahujúce enzýmy pre ich viskozitu pipetujte opatrne pre minimalizáciu pipetovacích chýb.

## 6. Spotrebný materiál a zariadenia, ktoré nie sú súčasťou kitu

- (na inaktiváciu vzoriek) Suchý termoblok schopný zahriať vzorky na najmenej 95 °C
- (na amplifikáciu) Ohrevné zahriadenie schopné ohriať vzorky na najmenej 65 °C – kit Vivid COVID-19 LAMP Direct-G bol overený a testovaný na nasledujúcich zariadeniach:
  - » Real-time PCR zariadenia: Agilent - Mx3005P® a AriaMx®; Thermo Fisher Scientific - QuantStudio™ 5; BioRad - CFX96™
  - » Termocykléry: SensoQuest - SensoQuest Gradient Labcycler
  - » Suché termobloky: Thermo Fisher Scientific - produkty rady Digital Dry Baths a produkty rady

- Vortex
- Mini centrifúga
- Centrifúga s rotorom na platničky (pri práci s PCR platničkami)
- Odberové sady na kloktanie
- Ochranné pracovné pomôcky: jednorazové laboratorné rukavice bez púdrov, ochranné okuliare, ochranný štít, respirátor FFP3, ochranné oblečenie
- Laboratórny plast bez prítomnosti DNA, RNA, DNáz a RNáz: reagenčné skúmavky, PCR skúmavky, PCR stripy, PCR platničky, PCR fólie alebo iný spotrebný materiál kompatibilný so zvolenou metódou na uskutočnenie reakcie; sterilné pipetovacie špičky s filtrom
- Autoklávovateľné nastaviteľné mikropipety
- Nádobu na biologický odpad
- Autoklávovateľné stojany na skúmavky
- Chladiace stojany na reagenčné nádoby

## 7. Pracovný postup

### UPOZORNENIE!

Prácu s kitom musí vykonávať kvalifikovaný personál.

### PRIPOMENKY!

- Pracovné priestory musia byť zabezpečené tak, aby existovali oddelené miestnosti (zóny) určené na izoláciu nukleových kyselín, na prípravu amplifikačných reakcií a na samotnú amplifikáciu/detekciu amplifikačných produktov. Produkty amplifikácie sa nikdy nesmú dostať do miestnosti (zóny) určenej na izoláciu nukleových kyselín alebo na prípravu amplifikačných zmesí.
- Udržujte samostatné špecializované laboratórne vybavenie a spotrebný materiál pre každý krok v pracovnom postupe: izolácia nukleových kyselín, príprava amplifikačných reakcií alebo amplifikácia a detekcia amplifikačných produktov.
- Používajte laboratórne plášte, rukavice a všetky ostatné ochranné pracovné pomôcky výlučne buď na izoláciu nukleových kyselín alebo na prípravu amplifikačných reakcií alebo na samotnú amplifikáciu/detekciu amplifikačných produktov. Nikdy nepoužívajte tie isté laboratórne plášte, rukavice či pomôcky v rôznych miestnostiach (zónach).
- So všetkými biologickými vzorkami manipulujte vždy ako s potenciálne infekčným materiálom. Vyhnite sa priamemu kontaktu s biologickým materiálom. Zabráňte rozliatiu vzoriek, reagensií a tvorbe aerosólov.

Na vykonanie RT-LAMP sú odporúčané aspoň 2 rozličné zdroje ohrevu:

- a) Zdroj ohrevu schopný ohriať vzorky na 95 °C – suchý termoblok s blokmi vhodnými pre 0,5 ml skúmavky, 0,2 ml PCR skúmavky/stripy alebo PCR platničky. Tento zdroj by mal byť vždy predhriaty a môže sa tiež použiť pre voľiteľný krok ukončenia reakcie (pozri časť 7.5. Parametre RT-LAMP reakcie).
- b) Zdroj ohrevu schopný ohriať vzorky na 65 °C – suchý termoblok, termocyklér alebo PCR zariadenie; vhodný pre 0,2 ml PCR skúmavky/stripy alebo PCR platničky. Môžu sa použiť reakčné nádoby s väčším objemom (napr. 0,5 ml), ale odporúčame ich nepoužívať bez zabezpečenia zahrievania viečka kvôli možným problémom s kondenzáciou vody.

## 7.1 Odber a spracovanie vzorky

### UPOZORNENIE!

Kit Vivid COVID-19 LAMP Direct-G je navrhnutý na použitie iba so vzorkami získanými kloktaním. Nedodržanie pokynov popísaných nižšie môže viesť k zhoršeniu funkčných charakteristík testu!

### PRIPOMENKY!

- Postup kloktania popísaný nižšie je iba odporúčaním a zodpovedá pokynom poskytnutým pacientom počas odberu vzorky na účely klinickej validácie. Optimálny spôsob kloktania pre detekciu SARS-CoV-2 nebol dosiaľ stanovený.
- Neodporúča sa jesť, piť, umývať si zuby, vyplachovať ústa, kloktat', žuť žuvačky alebo fajčiť/inhalovať najmenej jednu hodinu pred odberom vzorky.
- Odporúča sa použitie komerčných soľných izotonických roztokov, avšak nekomerčné na mieste pripravené roztoky sú prijateľné, pokiaľ použitá voda je kvality Aqua pro injectione alebo ekvivalentná.

### Odber vzoriek:

- Pacientovi sa podá vhodná nádoba (napríklad polypropylénová 50 ml skúmavka) obsahujúca 5 ml izotonického soľného roztoku (hmotnostných 0,9 % NaCl vo vode).
- Následne je pacient požiadaný, aby 10-krát vykloktal poskytnutý soľný roztok po dobu 5 sekúnd, pričom treba si dávať pozor, aby nedošlo k prehltnutiu roztoku. Celkové trvanie odberu je približne 1 minúta.
- Pacient potom pomaly a opatrne vypluje kloktadlo do pripravenej nádoby (napríklad do tej, v ktorej bol poskytnutý fyziologický roztok). Po vonkajšej dezinfekcii nádoby je vzorka získaná kloktaním pripravená na ďalšie spracovanie.
- Ak inaktivácia nemôže byť vykonaná okamžite, skladujte čerstvé vzorky získané kloktaním pri +4 °C počas maximálne jedného týždňa.

### Spracovanie vzorky:

- Vzorku získanú kloktaním opatrne ale dobre premiešajte, aby sa resuspendoval všetok usadený materiál. Agresívne vŕhanie môže viesť k peneniu a špliechaniu, ktoré v tomto bode nesie významné biologické riziko, pretože vzorka ešte nebola inaktivovaná.
- V skúmavke s minimálnym objemom 200 µl (napríklad PCR alebo 0,5 ml skúmavka) zmiešajte vzorku (9 dielov) s dodaným inaktivačným roztokom LAMP 10x Lysis Buffer (1 diel), konkrétne:

90 µl vzorky získanej kloktaním + 10 µl LAMP 10x Lysis Buffer

- Zatvorte skúmavku, obsah premiešajte a krátko scentrifugujte podľa potreby.
- Nechajte inkubovať pri izbovej teplote 3 minúty. Mierne dlhšie inkubačné časy (do 10 minút) nemajú negatívny efekt.
- Vzorku zahrievajte 7 minút na 95 °C. Tento krok tepelne inaktivuje vírusové častice a uvoľní vírusovú RNA do roztoku.
- Krátko (1 minúta) scentrifugujte vzorku na stolnej mini centrifúge. Vyrážané bielkoviny a iný nerozpustný materiál vytvoria na dne pelety.

- Získaný supernatant sa použije ako vstupný materiál pre RT-LAMP reakciu.
- V ideálnom prípade by sa mali inaktivované vzorky získané kloktaním analyzovať čo najskôr; sú však stabilné po dobu jedného dňa pri -20 °C. Z dlhodobého hľadiska by sa inaktivované vzorky mali skladovať pri -70 °C alebo nižšej teplote. Zabráňte opakovanému zmrazovaniu a rozmrazovaniu vzoriek.

### UPOZORNENIE!

Počas pracovného postupu nosíte vždy osobné ochranné prostriedky a pracujete na určenom mieste. So všetkými vzorkami manipulujte opatrne a zaobchádzajte s nimi ako s potenciálne infekčným materiálom.

## 7.2. Príprava reagensií

### UPOZORNENIA!

Ak je to možné, použite cyklus UV dekontaminácie pred a po ôdkladnej manuálnej dekontaminácii pracovného priestoru.

Reagencie na amplifikáciu pripravujte vždy osobitne a pripravujte ich výlučne na jednu analýzu.

### PRIPOMENKY!

- Používajte iba reagentie nachádzajúce sa v tomto kite.
- Nekombinujte a nezmiešavajte reagentie z rôznych šarží.

Zmesi primerov určené na detekciu SARS-CoV-2 a ľudskej RNázy P a pozitívna kontrola sú kvôli zvýšeniu stability dodávané v lyofilizovanej podobe. Pri prvom použití kitu je preto nutné zmesi primerov a pozitívnej kontroly rozpustiť v PCR vode. Pretože množstvo primerov v zmesi SARS-CoV-2 Primer Mix je veľmi vysoké, môže rozpustenie celej pelety trvať dlhšie, než by sa dalo očakávať. Lyofilizované zložky kitu nariedte nasledovne:

Tabuľka 1. Príprava lyofilizovaných reagensií

Zložka kitu	Objem PCR vody na rozpustenie	Využitelný počet reakcií
SARS-CoV-2 Primer Mix	1100 µl	200
RNase P Primer Mix	550 µl	200
PC SARS-CoV-2 BMC5	250 µl	40

### UPOZORNENIE!

Pelety lyofilizovaných primerov a pozitívnej kontroly sa môžu počas prepravy uvoľniť, preto je nevyhnutné každú skúmavku pred otvorením krátko scentrifugovať. Vynechanie tohto kroku môže viesť k strate materiálu zo skúmavky, čo môže ovplyvniť funkčné charakteristiky kitu.

## 7.3. Príprava reakčnej zmesi

Odporúčaný celkový objem jednej reakcie je 50 µl pre detekciu SARS-CoV-2 a 25 µl pre detekciu RNázy P. Na prípravu reakčnej zmesi musia byť jednotlivé zložky kitu zmiešané v nasledujúcom pomere:

Tabuľka 2. Príprava reakčnej zmesi

Zložka kitu	Objem zložky na reakciu	
	SARS-CoV-2	RNáza P
PCR Water	12 µl	6 µl
LAMP 2x Master Mix	25 µl	12.5 µl
SARS-CoV-2 Primer Mix	5 µl	-
RNase P Primer Mix	-	2.5 µl
<b>Celkový objem</b>	<b>42 µl</b>	<b>21 µl</b>

Do každej analýzy je nutné zahrnúť minimálne 1 negatívnu kontrolu na overenie prítomnosti kontaminácie. Ako negatívna kontrola slúži kontrola bez templátu (NTC) obsahujúca PCR vodu namiesto neznamenej vzorky. Každá testovaná kombinácia primerov (SARS-CoV-2 a RNase P) musí mať vlastnú NTC. Obdobne je nutné zahrnúť minimálne 1 pozitívnu kontrolu na overenie správneho priebehu analýzy a funkčnosti zložiek kitu, kde ako pozitívna kontrola slúži reakcia obsahujúca kontrolný materiál PC SARS-CoV-2 BMC5.

Prípravte požadovaný počet čistých PCR skúmaviek, PCR stripov, PCR platničiek alebo iných vhodných reakčných nádob a vložte ich do vychladeného chladiaceho stojana, ak je k dispozícii. Pripravenú reakčnú zmes dôkladne, ale zároveň jemne, premiešajte niekoľkonásobným otočením skúmavky alebo krátkym pulzným vortexovaním. Následne ju krátko scentrifugujte, aby sa odstránili kvapky zvnútra viečka a celý obsah bol na dne skúmavky. Pipetujte pripravenú reakčnú zmes do jednotlivých reakčných nádob podľa požadovaného počtu reakcií a pozícií vzoriek.

Tabuľka 3. Prídavanie vzoriek

Typ vzorky	Testovaná vzorka		Pozitívna kontrola		NTC	
	SARS-CoV-2	RNáza P	SARS-CoV-2	RNáza P	SARS-CoV-2	RNáza P
Supernatant inaktivovanej vzorky	8 µl	4 µl	-	-	-	-
PC SARS-CoV-2 BMC5	-	-	8 µl	4 µl	-	-
PCR Water	-	-	-	-	8 µl	4 µl

Po použití vráťte všetky zložky kitu do mrazničky (na teplotu -20 °C). Vyhnite sa opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu zložiek kitu. V prípade plánovaného opätovného použitia v priebehu časového rozpätia kratšieho ako 2 hodiny, uskladnite zložky kitu pri teplote +4 °C.

#### PRIPOMENKY!

- Namiešaná reakčná zmes má limitovanú stabilitu, použite ju v čo možno najkratšom čase po príprave. Ak nie je možné namiešať reakčnú zmes použiť ihneď, skladujte ju v chladničke pri teplote +4 °C.
- Pri príprave viacerých reakcií sa odporúča pripraviť aspoň o 5 % viac reakčnej zmesi, aby sa zohľadnili chyby pri pipetovaní (odporúčame 5 % extra zaokrúhlene smerom hore k najbližšiemu celému počtu reakcií).

#### 7.4. Konečná príprava reakcie a kontrol

K pripravenej reakčnej zmesi pridajte vzorky podľa tabuľky nižšie. Výsledný celkový objem reakcie je pre test na SARS-CoV-2 50 µl a pre test na RNázu P je 25 µl.

#### PRIPOMENKY!

- Použitie inej ako odporúčaného objemu vzorky môže viesť k zníženiu výkonnosti testu.
- Ak na uskutočnenie reakcií používate suchý termoblok, uistite sa, že je predhriaty na prevádzkovú teplotu 65 °C.
- Suchý termoblok by mal byť špecifický pre vybrané reakčné nádoby, aby sa zabezpečil dobrý kontakt medzi nádobami a suchým termoblokom.

Premiestnite reakčné nádoby s napipetovanou reakčnou zmesou z čistej zóny (najlepšie laminárny box) do zóny vyhradenej na manipuláciu s pozitívnymi kontrolami a vzorkami pacientov (napríklad PCR box). Pridajte vzorky a reakčné nádoby pevne utesnite (viečka alebo optická fólia). Zmes v reakčných nádobách premiešajte a krátko odstredte, aby bola všetka tekutina na dne skúmaviek/jamiek, a vložte ich do vopred pripraveného ohrevného zariadenia.

#### 7.5. Parametre RT-LAMP reakcie

Nasledujte nižšie uvedené pokyny ako nastaviť podmienky testu ako reakčná teplota, čas trvania reakcie a ukončenie reakcie.

#### Reakčné parametre:

- Reakčná teplota: 65 °C
- Reakčný objem: 50/25 µl
- Trvanie reakcie: 40 minút štandardne, 50 minút pre nejednoznačné vzorky (viď časť 8. Interpretácia výsledkov)
- Ukončenie reakcie (voliteľné): 1 minúta pri 95 °C alebo rýchle ochladenie reakčných nádob pod 40 °C

#### PRIPOMENKA!

- Aj keď to nie je potrebné, odporúčame tepelné ukončenie reakcie, najmä ak sa výsledky nevyhodnotia do niekoľkých minút od dokončenia amplifikácie. Najskôr však skontrolujte prítomnosť možných nejednoznačných vzoriek a až potom pokračujte krokom ukončenia reakcie.

#### UPOZORNENIE!

S amplifikačnými produktami zaobchádzajte mimoriadne opatrne, aby ste zabránili rozptýleniu do laboratória a novej kontaminácii nových testovaných vzoriek. Používajte pipety určené výhradne na manipuláciu s amplifikačnými produktmi a používajte jednorazové filtračné špičky, ktoré sú certifikované ako sterilné a neobsahujú DNA, RNA, DNázy a RNázy.

Po ukončení LAMP amplifikácie v žiadnom prípade neotvárajte reakčné nádoby. LAMP amplifikácia produkuje o niekoľko rádov viac amplikónov ako PCR. Aj nízke úrovne kontaminácie LAMP amplikónom môžu viesť k falošne pozitívnym výsledkom. Aj keď tento diagnostický kit využíva dUTP a termolabilnú uracil-DNA glykozyλάzu na zníženie dopadu novej kontaminácie, tento prístup nemusí postačovať na zabránenie výskytu falošne pozitívnych výsledkov v zónach silne kontaminovaných amplikónmi. Ak je známe, že došlo k náhodnému otvoreniu reakčných nádob, čo najskôr vykonajte dekontamináciu na odstránenie amplikónov.

#### 7.6. Analýza získaných údajov

Na analýzu vizuálnej zmeny budete potrebovať RT-LAMP farebnú stupnicu, ktorú nájdete v časti 8. Interpretácia výsledkov.

#### Interpretácia farebnej zmeny:

- Reakcia je považovaná za **pozitívnu**, ak podľa úsudku operátora testu konečná farba reakcie **NEzodpovedá skupinám 0 až 1** (ľubovoľná farba žltšia než skupina 1) v RT-LAMP kľúčí farieb.
- Reakcia je považovaná za **negatívnu**, ak podľa úsudku operátora testu konečná farba reakcie **NEzodpovedá skupinám 1 až 3** (ľubovoľná farba purpurovejšia/ružovšia než skupina 1) v RT-LAMP kľúčí farieb.
- Reakcia je považovaná za **nejednoznačnú**, ak podľa úsudku operátora testu konečná farba reakcie **zodpovedá skupine 1** v RT-LAMP kľúčí farieb.

#### PRIPOMIENKY!

Kolorimetrické zmeny vyhodnocujte vždy v dobre osvetlenej miestnosti a najlepšie s bielym pozadím!

Ak sa interpretácia farebnej zmeny nevykoná do hodiny od ukončenia reakcie, uchovajte reaktívne nádoby v tme. Reakčná zmes je citlivá na svetlo a na svetle jej farba pomaly slabne (je možné pozorovať výraznú mieru straty farby po 2 dňoch vystavenia svetlu).

RT-LAMP namiesto RNA. NTC reakcie pre všetky sady primerov by nemali vykazovať žiadnu viditeľnú farebnú zmenu (reakčný mix ostane purpurový/ružový). Ak ktorákoľvek z reakcií NTC vykazuje farebnú zmenu, môže ísť o prípadnú kontamináciu vzorky. Zastavte test a opätovne ho opakujte s prísnyim dodržaním pracovného postupu opísaného v manuáli.

- Ak je test na SARS-CoV-2 **negatívny**, výsledok pre vzorku by sa mal považovať za neplatný. Ak je k dispozícii pôvodná vzorka, test zopakujte. Ak obidva testy sú po opätovnom testovaní opäť negatívne, oznámte výsledky ako neplatné a pokiaľ je to možné, odoberte novú vzorku.

## 8. Interpretácia výsledkov

### 8.1. Interpretácia výsledkov – kontroly

#### UPOZORNENIE!

Odchýlka od očakávaného profilu kontrol naznačuje, že by mohlo dôjsť k nesprávnemu nastaveniu a/alebo vykonaniu testu alebo k zlyhaniu/nesprávnej činnosti reagensii a/alebo vybavenia. Zastavte pokus a opätovne ho zopakujte.

#### Kontrola bez templátu (NTC)

NTC pozostáva z použitia PCR vody pri reakciách

#### Positívna kontrola (PC SARS-CoV-2 BMC5)

PC SARS-CoV-2 BMC5 pozostáva z lyofilizovanej izolovanej genómovej RNA vírusu SARS-CoV-2 obohatenej ľudskou RNA a koprecipitantom. PC SARS-CoV-2 BMC5 poskytuje pozitívny výsledok so všetkými sadami primerov (SARS-CoV-2 a RNáza P). Medzi indikácie chyby alebo zlyhania v pracovnom postupe patrí nejednoznačná zmena alebo úplná absencia zmeny farby. V prípade negatívneho výsledku v pozitívnej kontrole nie je možné jednoznačne určiť správnosť ostatných pozitívnych/negatívnych výsledkov získaných v danej analýze a rozlišovať medzi negatívnymi a falošne negatívnymi výsledkami. Výstup takejto analýzy nie je možné vyhodnotiť.

#### Test na SARS-CoV-2

- Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný profil, považuje sa vzorka za **negatívnu**, keď:
  - SARS-CoV-2 test je **negatívny** a ľudská RNáza P je **pozitívna**.

- Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný profil, považuje sa vzorka za **pozitívnu**, keď:
  - SARS-CoV-2 test je pozitívny a ľudská RNáza P je **pozitívna**, nejednoznačná, alebo negatívna. Avšak za určitých podmienok môže kombinácia pozitívneho SARS-CoV-2 testu s negatívnym výsledkom testu RNázy P naznačovať, že došlo ku kontaminácii, pozri sekcie Test na RNázu P (kontrola odberu vzorky) a Sprievodca interpretáciou výsledkov diagnostického testu **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** vyššie, respektíve nižšie.

- Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný profil, považuje sa vzorka za **nejednoznačnú**, keď:
  - SARS-CoV-2 test je **nejednoznačný** a ľudská RNáza P je **pozitívna**, **nejednoznačná** alebo **negatívna**. Alternatívne SARS-CoV-2 test je **negatívny** a ľudská RNáza P je **nejednoznačná**.

- Nejednoznačné vzorky by sa mali označiť a inkubovať ďalších **10 minút** pri teplote 65 °C. Potom by sa operátor mal znova pokúsiť klasifikovať farebnú zmenu predtým než jednoznačných vzoriek podľa RT-LAMP farebnej stupnice. Ak je zmena farby stále považovaná za nejednoznačnú, označte výsledok testu za neplatný a vykonajte nový test. Ak sú vzorky testované vo viacvzorkovom formáte (stripy, platničky atď.), neberte ohľad na žiadne negatívne vzorky, ktoré sa počas tejto predĺženej inkubačnej doby stanú pozitívnymi/nejednoznačnými. Aby sa minimalizovali chyby operátora, dôrazne odporúčame dokumentovať farbu výslednej reakčnej zmesi pred a po predĺženej inkubácii.

- Ak všetky kontroly vykazujú očakávaný profil, považuje sa vzorka za **neplatnú**, keď:
  - SARS-CoV-2 test je **negatívny** a ľudská RNáza P je **negatívna**.
  - Ak je to možné, vzorka by mala byť opakovane otestovaná. Ak to nie je možné, odoberte novú vzorku.

#### Sprievodca interpretácie výsledkov diagnostického testu Vivid COVID-19 LAMP Direct-G

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené očakávané výsledky pre diagnostický kit Vivid COVID-19 LAMP Direct-G. Ak laboratórium získa neočakávané výsledky testovaných kontrol alebo ak sa získajú nejednoznačné alebo neplatné výsledky, ktoré sa nedajú vyriešiť odporúčaným opakovaným testovaním, obráťte sa na príslušný orgán verejného zdravotníctva.

Tabuľka 4. Očakávaný profil kontrol zahrnutých v diagnostickom kíte Vivid COVID-19 LAMP Direct-G

Typ kontroly	Externá kontrola	SARS-CoV-2	RNáza P	Očakávaná farebná zmena	Možné príčiny neočakávaného výsledku
Pozitívna	PC SARS-CoV-2 BMC5	+	+	Purpurová → žltá	Zlyhanie reagensii vrátane integrity primerov a pozitívnej kontroly
Negatívna	NTC	-	-	Bez farebnej zmeny (purpurová)	Kontaminácia reagensii a/alebo prostredia

### 8.2. Interpretácia výsledkov – testové reakcie

#### Test na RNázu P (kontrola odberu vzorky)

Všetky klinické vzorky by mali vykazovať pozitívnu reakciu so sadou primerov ľudskej RNázy P. Neschopnosť detegovať RNázu P v akýchkoľvek klinických vzorkách môže naznačovať:

- Absencia dostatočného množstva ľudskeho bunkového materiálu v dôsledku nesprávnej techniky kľoktania, zlého odobratia vzorky alebo straty integrity vzorky.
- Nesprávne zaobchádzanie/spracovanie/skladovanie klinického materiálu s následnou stratou RNA a/alebo degradáciou RNA.
- Nesprávna príprava a vykonanie testu.
- Zlyhanie reagensii alebo zariadenia.

Ak test na RNázu P je pre ľudskú klinickú vzorku **negatívny**, výsledok interpretujte nasledovne:

- Ak je test na SARS-CoV-2 **pozitívny** aj pri absencii pozitívnej RNázy P, mal by sa štandardne výsledok považovať za platný. Je možné, že niektoré vzorky nemusia vykazovať amplifikáciu RNázy P - negatívny signál RNázy P nevylučuje prítomnosť SARS-CoV-2 RNA v klinickej vzorke. Môže to byť spôsobené rozdielmi v stabilite ľudskej messengerovej RNA v porovnaní s vírusovou RNA v kľoktadle a počas spracovania vzorky, čo môže byť navyše zvýraznené vyššou citlivosťou testu na SARS-CoV-2 v porovnaní s RNázou P. Pozorovanie nejednoznačnej zmeny farby v teste na SARS-CoV-2 s negatívnou RNázou P naznačuje, že mohlo dôjsť ku kontaminácii vzorky. V takom prípade je odporúčané test opakovať, pokiaľ je to možné, pozri sekciu Sprievodca interpretácie výsledkov diagnostického kítu **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G**.

Tabuľka 6. Interpretácia testu a zodpovedajúce postupy

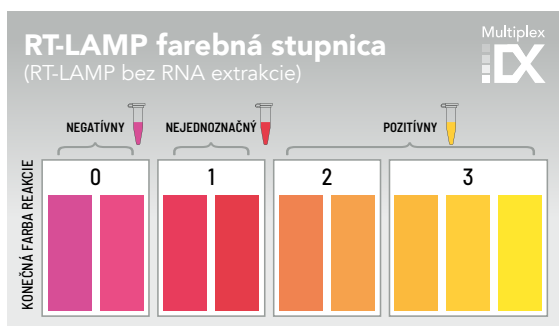
SARS-CoV-2	RNáza P	Interpretácia výsledkov <sup>a</sup>	Správa	Postup
+	+	SARS-CoV-2 detegovaný	SARS-CoV-2 pozitívny	Finalizujte a oznámte výsledky <sup>a</sup> .
+	-/?	SARS-CoV-2 detegovaný	SARS-CoV-2 pozitívny	Po zvážení <sup>b</sup> finalizujte a oznámte výsledky <sup>a</sup> .
?	+/-/?	Nejednoznačný výsledok	Nejednoznačný	Inkubujte nejednoznačné výsledky ďalších 10 minút pri 65 °C. Ak je test stále nejednoznačný, výsledok je neplatný, a opakované testovanie je nutné.
-	?			
-	+	SARS-CoV-2 nedetegovaný	Nedetegovaný	Finalizujte a oznámte výsledky <sup>a,c</sup> .
-	-	Neplatný výsledok	Neplatný	Testovanie opakujte. Ak je stále neplatný, odoberte novú vzorku.

+ = pozitívny výsledok | - = negatívny výsledok | ? = nejednoznačný výsledok (len pri kolorimetrickej detekcii)

<sup>a</sup> Laboratóriá by mali hlásiť svoje diagnostické výsledky v súlade so svojim osobitným systémom podávania správ.

<sup>b</sup> Pozorovanie nejednoznačnej farby v SARS-CoV-2 teste s negatívnym testom na RNázu P môže naznačovať, že došlo ku kontaminácii vzorky. V závislosti od okolností sa odporúča vzorku znovu otestovať.

<sup>c</sup> Optimálne načasovanie odberu vzorky s maximálnymi hladinami vírusu počas infekcii spôsobených SARS-CoV-2 nebolo stanovené. Na detekciu vírusu môže byť potrebné zhromaždiť viac vzoriek od toho istého pacienta. Možnosť falošne negatívnych výsledkov by sa mala zväzť najmä v prípade, že nedávne expozície alebo klinický obraz pacienta svedčia o chorobe COVID-19, zatiaľ čo diagnostické testy na iné ochorenia (napr. iné respiračné ochorenia) sú negatívne. Ak je stále prítomné podozrenie na infekciu SARS-CoV-2, malo by sa po konzultácii s príslušnými orgánmi verejného zdravotníctva zväziť opakované testovanie.



## 9. Funkčné charakteristiky kitu

### 9.1. Detekčný limit kitu

Vyhodnotenie analytickej citlivosti (detekčný limit) bolo uskutočnené so sadou prímerov na detekciu SARS-CoV-2. Test bol vykonaný s použitím pozitívnej kontroly „SARS-CoV-2 Standard“ (Exact Diagnostics), ktorá v nezriedenom stave obsahuje 200 kópií syntetického templátu na 1 µl.

Riedenia sa pripravovali sériovým riedením zásobného štandardu, výsledkom čoho boli vzorky s koncentráciou 16,67 kópií/µl, 8,33 kópií/µl, 5 kópií/µl, 3,33 kópií/µl, 1,67 kópií/µl, 1 kópia/µl a 0,67 kópie/µl, ktoré sa použili v teste analytickej citlivosti. Test bol uskutočnený v 8 replikátoch pre každé pripravené riedenie (8 µl nariadenej pozitívnej kontroly na reakciu zodpovedajúce odporúčaným 8 µl objemu vstupnej vzorky pre detekciu SARS-CoV-2).

Test potvrdil vysokú citlivosť diagnostického kitu **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G**. Spôľahlivá detekcia templátu testom na SARS-CoV-2 sa ukázala byť 1 kópia/µl vzorky, čo bolo aj potvrdené v rozšírenom LoD experimente, kde 23 z 24 replikátov bolo pozitívnych (viac ako 95 % úspešnosť detekcie).

Tabuľka 6. Limit detekcie testu na SARS-CoV-2

Kópie/µl vzorky	Celkový počet replikátov	Positívne replikáty	Nejednoznačné replikáty	Úspešnosť detekcie (%)
16,67	8	8/8	0/8	100%
8,33	8	8/8	0/8	100%
5,00	8	8/8	0/8	100%
3,33	8	8/8	0/8	100%
1,67	8	8/8	0/8	100%
1,00	8	7/8	0/8	87,5%
0,67	8	4/8	0/8	50%
1,00*	24	23/24	0/24	95,83%
0,67*	24	18/24	1/24	75%

\*Rozšírený LoD experiment pre 1,00 a 0,67 kópií/µl

### 9.2. Špecifickáita kitu

Vyhodnotenie špecificity voči patogénom (krížová reaktivita s inými koronavírusmi a respiračnými vírusmi) sa uskutočnilo pomocou kontrolného materiálu „Coronavirus RNA špecifický panel“ (EVAg, European Virus Archive - Global), ktorý obsahuje RNA vírusov HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, SARS-CoV HKU39849 a MERS-CoV, každý v samostatnej skúmavke. Sada respiračných vírusov (Vircell) obsahujúca RNA chrípky A H1N1, novej chrípky A H1N1, chrípky A H3N2, chrípky A H5N1, novej chrípky B, ľudskej parainfluenzy, respiračného syncytiálneho vírusu a ľudskeho rinovírusu, každá poskytnutá v samostatnej skúmavke, bola použitá na hodnotenie krížovej reaktivity s respiračnými vírusmi. Test bol vykonaný v 3 replikátoch pre každý z uvedených vírusov v množstve 3 µl pri EVAg štandardoch a 1000 kópií na reakciu pri Vircell štandardoch. Test potvrdil vysokú špecifickú diagnostického kitu **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G**.



\* Farba klasifikovaná operátorom ako príslušajúca skupine 1

Pozitívny výsledok bol zaznamenaný výlučne v reakciách obsahujúcich SARS-CoV-2 RNA v prítomnosti primerov pre SARS-CoV-2.

Metóda LAMP je náchylná na nešpecifickú amplifikáciu aj pri absencii cieľového templátu. Na demonštráciu toho, že diagnostický kit **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** pri použití podľa pokynov

neprodukuje falošné nešpecifické amplifikačné produkty, bolo uskutočnených 48 NTC reakcií so setmi primerov pre SARS-CoV-2 a RNÁzu P. Výsledky sú zhrnuté v nasledujúcej tabuľke a demonštrujú, že obe sady primerov, pre SARS-CoV-2 aj RNÁzu P, nevykazujú nešpecifickú amplifikáciu pri absencii templátu.

Tabuľka 7. Vyhodnotenie nešpecifickej LAMP amplifikácie

Set primerov	Celkový počet replikátov	Positívne replikáty	Miera nešpecifickej amplifikácie (%)
SARS-CoV-2	48	0/48	0%
RNÁza P	48	0/48	0%

### 9.3. Hodnotenie klinickej výkonnosti

Klinická výkonnosť diagnostického kitu **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** bola vykonaná na súbore 72 pacientov, ktorí v čase analýzy nemali potvrdený status nakazenia vírusom SARS-CoV-2. Všetky analyzované vzorky boli získané kloktaním podľa pokynov v tomto dokumente. Zároveň bola vo vzorkách odobratých od pacientov zisťovaná prítomnosť vírusovej RNA vo vzorkách získaných kloktaním referenčnou RT-qPCR metódou štandardne používanou na rutinné testovanie regionálnymi úradmi verejného zdravotníctva Slovenskej republiky. Hodnotenie **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** bolo založené na porovnaní konečných výsledkov testovanej metódy voči referenčnej metóde, pričom štandardná extrakcia RNA bola vykonaná iba pre referenčnú metódu, zatiaľ čo pre **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** boli vzorky spracované spôsobom, ktorý je odporúčaný v tomto dokumente. Výsledky jednotlivých testov (E gén a RNÁza P pre referenčnú metódu a SARS-CoV-2 a RNÁza P pre testovanú metódu) boli vyhodnocované podľa odporúčaných inštrukcií pre dané metódy.

Testovanie tohto vybraného súboru vzoriek bolo uskutočnené so zaslepenými vzorkami, v externom laboratóriu zapojenom do medzinárodných kruhových testov kontroly kvality (External Quality Assessment – EQA) organizovaných inštitúciami ako European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Institute of Virology, Charité (Berlín, Nemecko) a National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Bilthoven, Holandsko).

Výsledky hodnotenia klinickej výkonnosti sú zhrnuté nižšie. 8 vzoriek bolo z analýzy vylúčených kvôli nejednoznačným alebo neplatným výsledkom (5 pri referenčnej metóde, 3 pri testovanej metóde). Dáta ukázali, že kit **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** v porovnaní s referenčnou metódou vykazuje celkovú diagnostickú špecifickosť 100 % a celkovú diagnostickú senzitivitu 65,6 %. Senzitivita bola ale 100 % pri vzorkách s Ct < 32 podľa referenčnej metódy. Výsledky jednoznačne potvrdzujú schopnosť kitu **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** detegovať genomickú RNA vírusu SARS-CoV-2 vo vzorkách získaných kloktaním a to s minimálnym spracovaním bez extrakcie a koncentrovania RNA.

Tabuľka 8: Hodnotenie klinickej výkonnosti kitu **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G\***

		Referenčná metóda (E gén)			Hodnoty Ct podľa referenčnej metódy	Senzitivita
		Positívny	Negatívny	Celkovo		
Vivid COVID-19 LAMP Direct-G	Positívny	21	0	21	Celá sada (Ct ≤ 40) (celkovo 32 pozitívnych vzoriek podľa RT-qPCR)	65.6%
	Negatívny	11	32	43	Ct < 35 (celkovo 25 pozitívnych vzoriek podľa RT-qPCR)	80%
	Celkovo	32	32		Ct < 32 (celkovo 16 pozitívnych vzoriek podľa RT-qPCR)	100%
		<b>Senzitivita:</b> 65.6%	<b>Špecificita:</b> 100%		Ct < 28 (celkovo 7 pozitívnych vzoriek podľa RT-qPCR)	100%

\*Pri klinickej validácii bol použitý 20 µl formát reakcie.

## 10. Zaobchádzanie s odpadom

### PRIPOMENKY!

- Všetok materiál, ktorý sa dostal do kontaktu s biologickými vzorkami dekontaminujte pred likvidáciou 3 % chlórnanom sodným minimálne 30 minút alebo autoklávujte pri 121 °C minimálne 60 minút.
- Všetky použité pomôcky, špičky, skúmavky, pracovný materiál a ochranné odevy považujte za potencionálne kontaminované a zlikvidujte ich podľa platných predpisov pre likvidáciu infekčného odpadu.
- Zvyšné reagentie a materiál zlikvidujte v súlade s platnými bezpečnostnými predpismi.

## 11. Riešenie problémov

V prípade akýchkoľvek problémov kontaktujte:

Výrobca: **MultiplexDX, s. r. o.**

Adresa: Ilkovičova 8  
841 04 Bratislava, Slovenská republika

Tel.: +421 2 902 68 310

Email: [vigilance@multiplexdx.com](mailto:vigilance@multiplexdx.com)

## 12. Použité symboly a označenia

	Výrobca
	Číslo šarže
	Odporúčaná teplota skladovania
	Veľkosť balenia
	Tento výrobok spĺňa požiadavky európskej smernice 98/79/ES o diagnostických zdravotníckych pomôckach <i>in vitro</i>
	Dátum výroby
	Diagnostické zdravotnícke pomôcky <i>in vitro</i>
	Pozor, rešpektujte bezpečnostné pokyny v návode na použitie, ktoré ste dostali s týmto výrobkom

Registračný kód P 2138A

**MultiplexDX, s. r. o.**  
IČO: 50 111 965  
Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava  
Slovenská republika  
+421 2 902 68 310  
[info@multiplexdx.com](mailto:info@multiplexdx.com)



IFU(SK)-K7-0001

© 2021 MultiplexDX, s. r. o. Všetky práva vyhradené.

Všetky ostatné názvy produktov a ochranné značky sú majetkom ich právoplatných vlastníkov.