

Ak sa interpretácia farebnej zmeny nevykoná do hodiny od ukončenia reakcie, uchovajte reakčné 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).

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

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
Negatíva	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 navyiac 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 kitu **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G**.

– 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.

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**.

– Najednoznačné 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 nejednoznačných 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 5. Interpretácia testu a zodpovedajúce postupy

SARS-CoV-2	RNáza P	Interpretácia výsledkov ^a	Správa	Postup
+	+	SARS-CoV-2 detegovaný	SARS-CoV-2 pozitívny	Finalizujte a oznámte výsledky ^a .
+	–/?	SARS-CoV-2 detegovaný	SARS-CoV-2 pozitívny	Po zvážení ^b finalizujte a oznámte výsledky ^a .
?	+/?–/?	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 ^{a, c} .
–	–	Neplatný výsledok	Neplatný	Testovanie opakujte. Ak je stále neplatné, odoberte novú vzorku.

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

^a Laboratória by mali hlásiť svoje diagnostické výsledky v súlade so svojím osobitným systémom podávania správ.

^b 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 znova otestovať.

^c 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 zvážiť 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 zvážiť opakované testovanie.

9. Funkčné charakteristiky kitu

9.1. Detekčný limit

Vyhodnotenie analytickej citlivosti (detekčný limit) bolo uskutočnené so sadou primerov 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 kópiá/µl a 0,67 kópie/µl, ktoré sa použili v teste analytickej citlivosti. Test bol uskutočnený v 8 replikátach 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**. Spoluhlivá 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	Pozitívne 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. Špecifická

Vyhodnotenie špecificity voči patogénom (krížová reaktivita s inými koronavírusmi a respiračnými vírusmi) sa uskutočnilo pomocou kontrolného materiálu „Coronavirus RNA špecificity 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 (Viricell) obsahujúca RNA chripky A H1N1, novej chripky A H1N1, chripky A H3N2, chripky A H5N1, novej chripky 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 replikátach pre každý z uvedených vírusov v množstve 6 µl pri EVAg štandardoch a 2000 kópií na reakciu pri Viricell 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 cieľeného 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	Pozitívne 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 112 pacientov. Všetky analyzované vzorky boli získané kľoktaním podľa pokynov v tomto dokumente. Zároveň bola vo vzorkách odobratých od pacientov zisťovaná prítomnosť vírusovej RNA vo vzorkách získaných kľoktaním 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. Data ukázali, že kit **Vivid COVID-19 LAMP Direct-G** v porovnaní s referenčnou metódou vykazuje **celkovú diagnostickú špecifickú 100 % a celkovú diagnostickú senzitivitu 92,1 %**. Senzitivita bola ale **100% pri vzorkách s Ct < 34** podľa referenčnej metódy. Výsledky jednoznačne potvrdzujú schopnosť kitu Vivid COVID-19 LAMP Direct-G detegovať genometickú RNA vírusu SARS-CoV-2 vo vzorkách získaných kľoktaním a to s minimálnym spracovaním bez extrakcie re koncentrovania RNA.

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

		Referenčná metóda (E gén)			Hodnoty Ct podľa referenčnej metódy	Senzitivita
		Pozitívny	Negatívny	Celkovo		
Vivid COVID-19 LAMP Direct-G	Pozitívny	58	0	58	Celá sada (Ct ≤ 40) (celkovo 63 pozitívnych vzoriek podľa RT-qPCR)	92,1 %
	Negatívny	5	49	54	Ct < 34 (celkovo 55 pozitívnych vzoriek podľa RT-qPCR)	100 %
	Celkovo	63	49		Ct < 28 (celkovo 32 pozitívnych vzoriek podľa RT-qPCR)	100 %
		Senzitivita: 92,1 %		Špecificita: 100 %		

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 autoklávuajte pri 121 °C minimálne 60 minút.
- Všetky použité pomôcky, špičky, skúmavky, pracovný materiál a ochranné odevy považujte za potenciálne kontaminované a zlikvidujte ich podľa platných predpisov pre likvidáciu infekčného odpadu.
- Zvyšné reagensie 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

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 in vitro
	Dátum výroby
	Diagnostické zdravotnícke pomôcky in vitro
	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



IFU(SK)-K7-0001
© 2021 MultiplexDX, s. r. o. Všetky práva vyhradené.
Všetky ostatné názvy produktov a ochranné značky sú majetkom ich právoplatných vlastníkov.