

Návod na použitie

Ver. 1.0 (sk), 05/2022



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 rTEST COVID-19 qPCR SuperRapid 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 nevylučuje infikovanosť testovanej osoby, hlavne v prípade prezentácie symptómov konzistentných s ochorením COVID-19. Výsledky by mal vždy interpretovať školený zdravotnícky personál. V prípade akýchkoľvek nezrovnalostí medzi výsledkom testu a ostatnými klinicky relevantnými informáciami nasledujte príslušné postupy zdravotnej agentúry vo vašej jurisdikcii.

1. Vysvetlivky a skratky

Baseline: základná fluorescencia pozadia alebo tzv. "šum"

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

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

Ct: prahový cyklus, cyklus v ktorom fluorescenčný signál reakcie prekročí nastavenú prahovú hodnotu fluorescencie

Cy5: fluorescenčná cyanínová farbička

DNA: deoxyribonukleová kyselina

FAM: fluorescenčná farbička 6-karboxyfluoresceín

gén E: gén kódujúci malý membránový obalový proteín vírusu SARS-CoV-2 (označenie E pochádza zo skratky z angl. envelope)

gén RdRP: gén kódujúci RNA dependentnú RNA polymerázu vírusu SARS-CoV-2

gén RNase P: gén kódujúci ľudskú jadrovú ribonukleázu P

HEX: fluorescenčná farbička hexachloro-fluoresceín

LoD: detekčný limit reakcie (skratka z anglického Limit of Detection)

NTC: kontrola bez templátu (skratka z angl. No Template Control)

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

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

RFU: jednotka relatívnej fluorescencie

RNA: ribonukleová kyselina

RT-qPCR: kvantitatívna PCR s reverznou transkripciou SARS-CoV-2: koronavírus 2 ťažkého akútneho respiračného syndrómu (skratka z angl. Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus)

threshold: prahová hodnota fluorescencie

YY: fluorescenčná farbička Yakima Yellow®, vyvinutá firmou Epoch Biosciences

2. Účel použitia

Diagnostický kit rTEST COVID-19 qPCR SuperRapid kit je kvalitatívny *in vitro* test určený na detekciu prítomnosti genetického materiálu koronavírusu SARS-CoV-2 vo vzorkách získaných kľoktaním bez predchádzajúcej izolácie RNA. Kit je určený výhradne na použitie v diagnostickom laboratóriu so zodpovedajúcim vybavením, bezpečnostným štandardom a náležite vyškoleným personálom.

3. Princíp testu

rTEST COVID-19 qPCR SuperRapid kit je diagnostický kit určený na detekciu genomického RNA vírusu SARS-CoV-2 zo vzoriek získaných kľoktaním bez predchádzajúcej extrakcie RNA. Kit je možné skladovať pri izbovej teplote po dobu dvoch týždňov, čo umožňuje prepravu kitu bez nutnosti použitia suchého ľadu a ľahšiu manipuláciu po jeho príchode. Stabilitu pri izbovej teplote umožňujú lyofilizované zmesi primerov/sond špecifických pre SARS-CoV-2, interná pozitívna kontrola (úplná genomická RNA vírusu SARS-CoV-2 obohatená ľudskou RNA) a reagencie pre jedнокrokovú RT-qPCR od spoločnosti Solis Biodyne, ktoré sú tiež stabilné pri izbovej teplote. Diagnostický kit rTEST COVID-19 qPCR SuperRapid je vylepšená a prepracovaná verzia Charité, Berlín diagnostického protokolu, odporúčaného WHO pre detekciu vírusu SARS-CoV-2. Kit obsahuje tri sady primerov a hydrolyzačných sond (TaqMan®) pre multiplexnú detekciu SARS-CoV-2 špecifického E génu a RdRP génu, spolu s ľudskou RNázou P. TaqMan® sondy pre E gén sú konjugované s fluorofórom YY, TaqMan® sondy pre RdRP gén sú konjugované s fluorofórom FAM a TaqMan® sonda pre RNázu P je konjugovaná s fluorofórom Cy5. Takéto značenie umožňuje multiplexnú detekciu SARS-CoV-2 a ľudskej RNázy P, ktorá slúži ako interná kontrola na overenie správneho odberu vzoriek a vykonania testu. Na detekciu SARS-CoV-2 E génu a RdRP génu sme vyvinuli patentované duálne TaqMan® sondy, ktorých použitie zvyšuje citlivosť a špecifickosť našej 1-krokovej RT-qPCR. Kompletná genomická RNA vírusu SARS-CoV-2 obohatená ľudskou RNA poskytnutá Biomedicinským centrom Slovenskej akadémie vied je zahrnutá ako vnútorná pozitívna kontrola. rTEST COVID-19 qPCR SuperRapid test prebieha jedнокrokovým zahŕňajúc RT a qPCR v jednej reakcii.

4. Zloženie kitu

- 1x zmes lyofilizovaných primerov a sond označená E gene/RdRP gene/RNase P Mix
- 1x lyofilizovaná pozitívna kontrola označená PC BMC5
- 2x 800 µl 5X One-step Probe Direct Mix 3
- 1x 300 µl 26.7X One-step RT Direct Mix 2
- 1x lyofilizovaný 10X Rapid Lysis Buffer A
- 1x 4.4 ml 10X Rapid Lysis Buffer B
- 1x 2.2 ml 4X Rapid Enhancer Solution
- 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 reagenciami si vždy dôkladne umyte ruky.

Všetky zložky kitu sa môžu prepravovať a skladovať pri izbovej teplote (15-25 °C) po dobu 2 týždňov. Bežne sa kit skladuje pri -20 °C. Doba použiteľnosti kitu je maximálne 12 mesiacov od dátumu výroby. Presná doba expirácie kitu je uvedená na vonkajšom obale. Presná doba expirácie jednotlivých zložiek kitu je uvedená na vnútorných obaloch.

Užívateľom, ktorí uskutočňujú menší počet reakcií v rámci jedného pracovného cyklu, odporúčame všetky zložky kitu rozalokvotovať 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 opakovanému 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 (5X One-step Probe Direct Mix 3, 26.7X One-step RT Direct Mix 2) 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

- Real-time PCR zariadenie - kit rTEST COVID-19 qPCR SuperRapid bol overený a testovaný na nasledujúcich zariadeniach: Agilent - Mx3005P® a AriaMx®; Thermo Fisher Scientific - QuantStudio™ 5; BioRad - CFX96™; Analytik Jena - qTOWER3™
- Box s laminárnym prúdením vzduchu
- Vortex
- Mini centrifúga
- Centrifúga s rotorom na platničky
- Odberové sady na kľoktanie
- Ochranné pracovné pomôcky: jednorazové laboratórne rukavice bez púder, 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

- Autoklávodateľné nastaviteľné mikropipety
- Nádoba na biologický odpad
- Autoklávodateľné stojany na skúmavky
- Chladiace stojany na reagenčné nádoby

7. Pracovný postup

UPOZORNENIE!

Prácu s kitom musí vykonávať kvalifikovaný personál.

PRIPOMIENKY!

- Pracovné priestory musia byť zabezpečené tak, aby existovali oddelené miestnosti (zóny) určené na inaktiváciu vzoriek, na prípravu amplifikačných reakcií a na samotnú amplifikáciu/detekciu amplifikačných produktov. Produkty amplifikácie sa nikdy nesmú dostať do miestnosti (zóny) určenej na inaktiváciu vzoriek alebo na prípravu amplifikačných zmesí.
- Udržiavajte samostatné špecializované laboratórne vybavenie, spotrebný materiál a osobné ochranné pomôcky pre každý krok v pracovnom postupe: inaktivácia vzoriek, príprava amplifikačných reakcií alebo amplifikácia a detekcia amplifikačných produktov.
- So všetkými biologickými vzorkami manipulujte vždy ako s potenciálne infekčným materiálom.

Vyhýbajte sa priamemu kontaktu s biologickým materiálom. Zabráňte rozliatiu vzoriek, reagensov a tvorbe aerosólov.

7.1. Príprava reagensov

UPOZORNENIA!

- Ak je to možné, použite cyklus UV dekontaminácie pred a po dôkladnej manuálnej dekontaminácii pracovného priestoru.
- Reagensie na amplifikáciu pripravujte vždy osobitne a pripravujte ich výlučne na jednu analýzu.
- Pelety lyofilizovaných reagensov sa môžu počas prepravy uvoľniť, preto je nevyhnutné každú skúmavku pred otvorením krátko scentrifugovať. Vynechanie tohto kroku môže mať za následok stratu materiálu zo skúmavky, čo môže ovplyvniť funkčné vlastnosti kitu.

PRIPOMIENKY!

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

Niektoré reagensie sú kvôli zvýšeniu stability dodávané v lyofilizovanej podobe. Pri prvom použití kitu je preto nutné ich rozpustiť vo vhodnom rozpúšťadle. Lyofilizované reagensie rozpustite nasledovne:

- Následne je pacient požiadany, aby aspoň 3-krát vykoktal poskytnutý soľný roztok po dobu 5 sekúnd, pričom si treba dávať pozor, aby nedošlo k prehltnutiu roztoku. Celkové trvanie odberu je do 1 minúty.
 - Pacient potom pomaly a opatrne vyplňuje 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, prípadne podľa odporúčaní z aktuálnej literatúry.
- Nespracované vzorky získané kloktaním nezamrazujte.**

Spracovanie vzorky:

- Vzorku získanú kloktaním opatrne ale dobre premiešajte, aby sa resuspendoval všetok usadený materiál. Agresívne vortexovanie môže viesť k peneniu a špliechaniu, ktoré v tomto bode nesie významné biologické riziko, pretože vzorka ešte nebola inaktivovaná.
- V skúmavke s minimálnym celkovým objemom 200 µl zmiešajte:
90 µl vzorka získaná kloktaním
+ 10 µl 10X Rapid Lysis Buffer A
- Zatvorte skúmavku a obsah premiešajte. Nechajte inkubovať pri izbovej teplote 3 minúty.
- Vzorku zahrievajte 7 minút na 95 °C. Tento krok tepelne inaktivuje vírusové častice a uvoľní vírusovú RNA do roztoku.
- Vzorku krátko (1 minúta) scentrifugujte na stolnej mini centrifúge. Supernatant sa použije ako vstupný materiál pre RT-qPCR.
- Inaktivované vzorky získané kloktaním by sa mali 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.

Tabuľka 1. Rozpúšťanie lyofilizovaných reagensov

Zložka kitu	Rozpúšťadlo		Použitelné reakcie
	PCR voda	10X Rapid Lysis Buffer B	
E gene/RdRP gene/RNase P Mix	800 µl	-	400
PC BMC5	320 µl	-	40
10X Rapid Lysis Buffer A	-	4180 µl	400

7.2. Odber a spracovanie vzorky

UPOZORNENIE!

Tento kit je navrhnutý na použitie iba so vzorkami získanými kloktaním. Nedodržanie pokynov popísaných nižšie môže viesť k zhoršeniu funkčných charakteristík testu!

PRIPOMIENKY!

- 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 doposiaľ 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 vzorky:

- Pacientovi sa podá vhodná nádoba (napríklad polypropylénová 50 ml skúmavka) obsahujúca 5 ml izotonického soľného roztoku (hmotnostných 0,9 % NaCl vo vode).

7.3. Príprava pracovného priestoru

Odporúčaný celkový objem jednej reakcie je 20 µl. Pre prípravu reakčnej zmesi napipetujte jednotlivé zložky kitu v nasledujúcej postupnosti a pomere:

Tabuľka 2. Príprava reakčnej zmesi

Zložka kitu	Objem zložky kitu na reakciu
4X Rapid Enhancer Solution	5 µl
5X One-step Probe Direct Mix 3	4 µl
26.7X One-step RT Direct Mix 2	0.75 µl
PCR voda	0.25 µl
E gene/RdRP gene/RNase P Mix	2 µl
Celkový objem	12 µl

Prípravte si potrebný počet čistých PCR skúmaviek, PCR stripov alebo PCR platničiek a vložte ich do vychladeného chladiaceho stojana. Pripravenú reakčnú zmes dôkladne ale zároveň jemne premiešajte mnohonásobným otočením skúmavky, pulzným vortexovaním, prípadne krátkym vortexovaním. Následne ju krátko scentrifugujte, aby sa odstránil

kvapky zvnútra viečka a všetka tekutina bola na dne skúmavky. Z pripravenej reakčnej zmesi rozpipetujte po 12 µl do jednotlivých PCR skúmaviek alebo jamiek PCR platničky v súlade s potrebným počtom a pozíciami uskutočnených reakcií.

PRIPOMIENKY!

- 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).
- Namiešaná reakčná zmes má limitovanú stabilitu, použite ju v čo možno najkratšom čase po príprave. Ak nie je možné namiešanú reakčnú zmes použiť ihneď, skladujte ju v chladničke pri teplote +4 °C dobu nie dlhšiu ako 2 hodiny.
- Vyhnite sa opakovanému rozmrazovaniu a zmrazovaniu zložiek kitu.

7.4. Konečná príprava reakcie a kontrol

K pripravenej reakčnej zmesi pridajte vzorky podľa tabuľky nižšie.

Tabuľka 3. Pridávanie templátu

Typ templátu	Testovaná vzorka	Pozitívna kontrola	NTC
Supernatant inaktivovanej vzorky	8 µl	-	-
PC BMC5	-	8 µl	-
PCR Water	-	-	8 µl

Do každej analýzy je nutné zahrnúť minimálne 1 negatívnu kontrolu (NTC) a 1 pozitívnu kontrolu pre overenie správnosti funkčnosti kitu a absencie kontaminácie pracovných priestorov.

PRIPOMIENKA!

Použitie iného ako odporúčaného objemu vzorky môže viesť k zníženiu výkonnosti testu.

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 odstred'te, aby bola všetka tekutina na dne skúmaviek/jamiek.

7.5. Nastavenie real-time PCR zariadenia

Pre nastavenie podmienok analýzy, ktoré sa týkajú objemu reakcie, teplotných podmienok reakcie a použitých optických kanálov postupujte v zmysle nasledujúcich pokynov.

Objem reakcie:

- 20 µl

Teplotné podmienky pre prácu s kitom:

- Reverzná transkripcia: 50 °C, 5 min
- Prvotná denaturácia: 95 °C, 10 min
- Cyklovanie, 40 cyklov:
 - » Denaturácia: 90 °C, 1 s
 - » Anelácia/extenzia: 65 °C, 4 s

Tabuľka 4. Cieľové fluorofóry a optické kanály

Cieľ	Farbivo	Optický kanál	Excitačné maximum	Emisné maximum
RdRP gén	FAM	FAM, SYBR	495 nm	520 nm
E gén	YY	HEX, JOE, VIC	525 nm	550 nm
RNÁza P	Cy5	Cy5	650 nm	670 nm

UPOZORNENIE!

S amplifikačnými produktami zaobchádzajte mimoriadne opatrne, aby ste zabránili rozptýleniu do laboratória a možnej 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.

7.6. Analýza získaných údajov

Pri nastavení baseline a thresholdu pre jednotlivé reakcie postupujte v zmysle manuálu výrobcu real-time PCR zariadenia a v súlade s vašimi interne zaužívanými postupmi pre tento typ testov.

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 reagentov a/alebo vybavenia. Zastavte pokus a opätovne ho zopakujte.

Tabuľka 5. Očakávaný profil kontrol

Typ kontroly	Templát	Očakávaný výsledok			Možné príčiny neočakávaného výsledku
		SARS-CoV-2 E gén	SARS-CoV-2 RdRP gén	Ľudská RNÁza P	
Pozitívna	PC BMC5	Ct ≤ 35	Ct ≤ 35	Ct ≤ 35	Zlyhanie reagentov vrátane integrity primerov a sond alebo degradácia pozitívnej kontroly
Negatívna (NTC)	PCR Water	Nedetegované	Nedetegované	Nedetegované	Kontaminácia reagentov a/alebo prostredia

Pozitívna kontrola (PC BMC5)

PC BMC5 pozostáva z lyofilizovanej izolovanej genómovej RNA vírusu SARS-CoV-2 obohatenej ľudskou RNA a koprecipitantom. PC BMC5 poskytuje pozitívny výsledok so všetkými sadami primerov a sond. Medzi indikácie chyby alebo zlyhania v pracovnom postupe alebo analýze experimentu patrí: úplná neprítomnosť signálu, prítomnosť amplifikovaného signálu ale s vyššími hodnotami Ct, ako je obvyklé pre daný kontrolný materiál, alebo prítomnosť nízkeho signálu. 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.

Negatívna kontrola (NTC)

NTC pozostáva z použitia PCR vody namiesto RNA. NTC reakcie pre všetky sady primerov a sond by nemali vykazovať žiadnu amplifikáciu. Ak ktorákoľvek

z reakcií NTC je pozitívna, môže to naznačovať prítomnosť kontaminácie vzoriek. Zastavte test a opätovne ho opakujte s prísnyim dodržaním pracovného postupu.

8.2. Interpretácia výsledkov – testové reakcie

Odporúčaná interpretácia výsledkov reakcií:

- SARS-CoV-2 E gén, RdRP gén:
 - Ct ≤ 37 = pozitívny (+)
 - Ct > 37 = nejednoznačný (?)
 - Žiaden signál = negatívny (-)
- Ľudská RNÁza P:
 - Ct ≤ 37 = pozitívny (+)
 - Ct > 37 ALEBO žiaden signál = negatívny (-)

V nasledujúcej tabuľke sú uvedené očakávané výsledky pre diagnostický kit rTEST COVID-19 qPCR SuperRapid. Ak laboratórium získa neočakávané, nejednoznačné alebo neplatné výsledky, ktoré sa nedajú vyriešiť odporúčaným opakovaným testovaním, obráťte sa na príslušný orgán verejného zdravotníctva.

Tabuľka 6. Interpretácia testu a zodpovedajúce postupy

SARS-CoV-2 E gén	SARS-CoV-2 RdRP gén	Ľudská RNÁza P	Interpretácia výsledkov	Správa	Postup
+	+	Akýkoľvek výsledok	SARS-CoV-2 detegovaný	SARS-CoV-2 pozitívny	Oznámte výsledky žiadateľovi ^a .
+	-/?	Akýkoľvek výsledok	Nejednoznačný výsledok	Nejednoznačný	Opakujte testovanie. Ak opakovaný výsledok zostane nejednoznačný, požiadajte príslušný orgán verejného zdravotníctva o ďalšie pokyny.
-/?	+	Akýkoľvek výsledok			
?	?	Akýkoľvek výsledok			
-	-	+	SARS-CoV-2 nedetegovaný	Nedetegovaný	Oznámte výsledky žiadateľovi ^a . Zvážte testovanie na iné respiračné vírusy ^b .
-	-	-	Neplatný výsledok	Neplatný	Opakujte testovanie. Ak opakovaný výsledok zostane neplatný, zvážte odber novej vzorky od pacienta.

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

^b Optimálne načasovanie odberu vzorky s maximálnymi hladinami vírusu počas infekcie spôsobenej 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.

Test na RNÁzu P (kontrola odberu)

Všetky SARS-CoV-2 negatívne klinické vzorky by mali vykazovať pozitívnu reakciu na ľudskú RNÁzu P. Neschopnosť detegovať RNÁzu P môže naznačovať:

- Absenciu dostatočného množstva ľudského bunkového materiálu v dôsledku nesprávnej techniky kľotania, zlého odobratia vzorky alebo straty integrity vzorky.
- Nesprávne zaobchádzanie/spracovanie/ skladovanie klinického materiálu s následnou stratou RNA a/alebo degradáciou RNA.
- Nesprávnu prípravu a vykonanie testu.
- Zlyhanie reagencií alebo zariadenia.

Negatívny signál RNÁzu P nevylučuje prítomnosť SARS-CoV-2 RNA v klinickej vzorke. Táto situácia môže byť spôsobená rozdielmi v stabilite ľudskej messengerovej RNA v porovnaní s vírusovou RNA v kľotadle a počas spracovania vzorky, čo môže byť navyše zvýraznené veľkým nadbytkom SARS-CoV-2 RNA v niektorých vzorkách.

Test na SARS-CoV-2

Všetky SARS-CoV-2 pozitívne klinické vzorky by mali vykazovať pozitívnu reakciu na E gén aj RdRP gén. Neschopnosť detegovať jeden z týchto cieľov môže naznačovať:

- Nesprávne zaobchádzanie/spracovanie/ skladovanie klinického materiálu s následnou stratou RNA a/alebo degradáciou RNA.
- Nesprávnu prípravu a vykonanie testu.
- Zlyhanie reagencií alebo zariadenia.
- Prítomnosť SARS-CoV-2 RNA vo vzorke pod limitom detekcie testu.
- Prítomnosť mutácie vo väzobných miestach pre primery a/alebo sondy.

9. Funkčné charakteristiky kitu

9.1. Detekčný limit kitu

Hodnotenie analytickej citlivosti bolo uskutočnené pomocou kontrolného materiálu "SARS Related Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Stock" (ZeptoMetrix, <https://www.zeptometrix.com/products/nattrol-sars-related-coronavirus-2-sars-cov-2-stock>), ktorý v neriedenom stave obsahuje 1000 kópií templátu na 1 µl. Riedením tohto štandardu v negatívnej vzorke získanej kľotanim boli pripravené riedenia s koncentraciami 40 kópií/µl, 10 kópií/µl, 4 kópie/µl, 2 kópie/µl, 1 kópia/µl a 0.5 kópie/µl vzorky, ktoré boli

po inaktivácii použité v teste analytickej citlivosti. Test bol uskutočnený v 8 replikátoch pre každé pripravené riedenie. Test potvrdil vysokú citlivosť diagnostického kitu rTEST COVID-19 qPCR SuperRapid. Spoločná detekcia templátu pre stanovenie prítomnosti E génu a RdRP génu bola preukázaná do koncentrácie 1 kópia/µl vzorky, a následne bola potvrdená rozšíreným testom detekčného limitu, kde z 24 replikátov, bolo 24 pozitívnych pre E gén a 23 pre RdRP gén (viac ako 95 %-ná úspešnosť detekcie).

Tabuľka 7. Detekčný limit

Koncentrácia RNA	E gén/RdRP gén/L'udská RNÁza P		
	Celkový počet replikátov	Počet reakcií s pozitívnym výsledkom	Úspešnosť detekcie (%)
40 kópií/µl vzorky	8	8/8/8	100/100/100
10 kópií/µl vzorky	8	8/8/8	100/100/100
4 kópií/µl vzorky	8	8/8/8	100/100/100
2 kópie/µl vzorky	8	8/8/8	100/100/100
1 kópia/µl vzorky*	8	8/8/8	100/100/100
0.5 kópie/µl vzorky	8	8/7/8	100/87/100
1 kópia/µl vzorky#	24	24/23/24	100/96/100

* po zohľadnení absencie RNA extrakcie porovnateľná s rTEST COVID-19 qPCR Allplex

Rozšírené LoD

9.2. Špecifita

Hodnotenie špecifity (krížovej reaktivity na iné koronavírusy a respiračné vírusy) bolo uskutočnené pre E gén aj pre RdRP gén SARS-CoV-2. Test bol uskutočnený pomocou kontrolného materiálu „Coronavirus RNA specificity panel“ (EVAg, European Virus Archive - Global), ktorý obsahuje RNA vírusov HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, SARS-CoV HKU39849 a MERS-CoV, každú v samostatnej skúmavke. EDX SARS-CoV-2 Standard (Exact Diagnostics) slúžil ako referenčný materiál na stanovenie špecifity kitu. Na hodnotenie krížovej reaktivity na respiračné vírusy bol použitý súbor respiračných vírusov (Vircell microbiologistics), ktorý obsahuje RNA vírusov Influenza A H1N1, Novel Influenza A H1N1, Influenza A H3N2, Influenza A H5N1, Novel Influenza B, Human parainfluenza, Human rhinovirus a Respiratory syncytial vírus, každú v samostatnej skúmavke. Test bol uskutočnený v 3 replikátoch pre každý z uvedených vírusov. Test potvrdil vysokú špecifitu diagnostického kitu rTEST COVID-19 qPCR SuperRapid. Pozitívny výsledok bol zaznamenaný výlučne v reakciách obsahujúcich SARS-CoV-2 RNA.

9.3. Hodnotenie klinickej výkonnosti

Hodnotenie klinickej výkonnosti kitu rTEST COVID-19 qPCR SuperRapid bolo uskutočnené na vybranom súbore 46 pozitívnych a 46 negatívnych klinických vzoriek pacientov získaných kľotanim, ktoré boli potvrdené referenčnou metódou štandardne používanou na rutinné testovanie na území Slovenskej republiky. Pred spracovaním boli vzorky získané kľotanim jedenkrát rozmrazené. 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

Tabuľka 8. **Klinická validácia**

	Referenčná metóda			rTEST COVID-19 qPCR Rapid		
	E gén	RdRP gén	RNáza P gén	E gén	RdRP gén	RNáza P gén
Počet správne identifikovaných pozitívnych vzoriek	46	46	46	46	46	46
Počet falošne pozitívnych vzoriek	0	0	0	0	0	0
Počet správne identifikovaných negatívnych vzoriek	46	46	46	46	46	46
Počet falošne negatívnych vzoriek	0	0	0	0	0	0

10. Zaobchádzanie s odpadom

PRIPOMIENKY!

- 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 reagenty a materiál zlikvidujte v súlade s platnými bezpečnostnými predpismi.

11. Riešenie problémov

V prípade akýchkoľvek problémov kontaktujte:

MultiplexDX, s. r. o.
výrobca

Adresa: Ilkovičova 8
841 04 Bratislava

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: P1430A

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