Primerdesign™ Ltd

Zestaw genesig® real-time PCR do detekcji koronawirusa (COVID-19)

Instrukcja użytkowania

Wydanie 2.0

GENESIG
Kits by Primerdesign

Zestaw genesig®
do detekcji koronawirusa (COVID-19)
w real-time PCR

Test diagnostyczny real-time PCR *in vitro* do detekcji koronawirusa (COVID-19)

Do stosowania z:

Rodzaje próbek:	Platformy ekstrakcji	Platforma PCR
Wymazy z jamy nosowo-gardłowej	System ekstrakcji CE IVD, odpowiedni dla typów próbek	Applied Biosystem® 7500 Real-Time PCR System
Wymazy z jamy ustno-gardłowej		Bio-Rad CFX96
Plwocina		Roche® LightCycler 480 II

Σ 96 testów

CE IVD

REF Z-Path-COVID-19-CE

Primerdesign Ltd, School Lane, Chandler's Ford, UK, SO53 4DG
Bezpłatny numer: +44 (0) 800 0156 494

Spis treści

1. Przeznaczenie zestawu 4
2. Elementy zestawu 4
3. Warunki przechowywania i stosowania 4
4. Określenie wymaganych, ale niewchodzących w skład zestawu materiałów i urządzeń 6
5. Informacje ogólne 6
6. Opis produktu 7
7. Ostrzeżenia i środki ostrożności 8
8. Ograniczenia użytkowania 10
9. Procedura 11
10. Ocena działania testu 15
11. Kontrola jakości 18
12. Wsparcie techniczne 18
13. Znaki towarowe i wyłączenie odpowiedzialności 18
14. Objaśnienie symboli 19

1. Przeznaczenie zestawu

Test genesig PCR real-time do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD jest przeznaczony do jakościowego wykrywania wirusowego RNA COVID-19 ekstrahowanego z wymazów z jamy nosowo-gardłowej, ustno-gardłowej i plwociny pacjentów w połączeniu z systemem ekstrakcji CE IVD i specjalnymi platformami PCR wymienionymi powyżej. Zestaw jest przeznaczony do użytku przez przeszkolony personel laboratoryjny.

2. Elementy zestawu

Element zestawu	Liczba fiolek	Objętość (µl na fiolkę)	Kolor wieczka	Zawieszone w?
oasig® - liofilizowana mieszanka qPCR OneStep Master Mix	2	525*	Czerwony	Bufor do zawieszania Master Mix (Master Mix Resuspension Buffer)
Mieszanka primera i sondy COVID-19	2	110*	Pomarańczowy (amber - bursztynowy)	Bufor do zawieszania (Kit Resuspension Buffer)
Bufor do zawieszania Master Mix	2	600	Niebieski	Nie dotyczy
Bufor do zawieszania	2	1500	Żółty	
Woda bez RNazy / DNazy	1	500	Biały	
Matryca kontroli pozytywnej COVID-19	1	600*	Czerwony, fiolka przechowywana w srebrnej folii	Bufor do zawieszania (Kit Resuspension Buffer)
Wewnętrzna kontrola ekstrakcji RNA	2	1000*	Niebieski, fiolka przechowywana w złotej folii	

* Prognozowana objętość po zawieszeniu

3. Warunki przechowywania i stosowania

Test genesig PCR real-time do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD jest transportowany w temperaturze pokojowej, a po odbiorze należy go przechowywać w temperaturze -20°C. Jeśli przy odbiorze zostanie stwierdzone uszkodzenie opakowania ochronnego zestawu, należy skontaktować się z Primerdesign w celu uzyskania instrukcji. Należy zwrócić uwagę na datę przydatności do użycia określoną na etykiecie opakowania i etykietach poszczególnych probówek. Po upływie tego terminu zestaw należy poddać utylizacji zgodnie z instrukcjami zawartymi w **rozdziale 8**.

3.1. Stabilność w okresie użytkowania

Test genesig PCR do detekcji koronawirusa (COVID-19) real-time CE IVD powinien być przechowywany w oryginalnym opakowaniu i jest stabilny do 1 miesiąca po utworzeniu zawiesiny, jeśli jest przechowywany w temperaturze -20°C, ale nie powinien być używany po dacie przydatności określonej na etykiecie opakowania i etykietach poszczególnych probówek. Podczas użytkowania należy zminimalizować czas pozostawania elementów zestawu w temperaturze pokojowej i umieszczać je w lodówce niezwłocznie po użyciu. Rozmrażanie i zamrażanie należy ograniczyć do minimum i nie powinno ono przekraczać 5 cykli zamrażania

i rozmrażania. W razie potrzeby składniki można podzielić na mniejsze objętości po utworzeniu zawiesiny.

4. Określenie wymaganych, ale niewchodzących w skład zestawu materiałów i urządzeń

4.1. Odczynniki

- Odpowiedni system i/ lub zestaw do ekstrakcji kwasów nukleinowych (patrz **punkt 9.1** 'Procedura przygotowania próbki').

4.2. Wyposażenie

- Laminar do PCR
- Wirówka stołowa
- Wytrząsarka (vortex)
- White Roche® LightCycler 480 Multiwell plate 96
- White Bio-Rad® CFX96 Multiwell plate 96
- Transparent Applied Biosystems® 7500 real-time PCR System Multiwell Plate 96
- Regulowane pipety
- Końcówki do pipet z filtrami
- Rękawiczki jednorazowe
- Probówki do wirówki (do ekstrakcji) 1,5 ml

4.3. Urządzenie do real-time PCR

- Odpowiednie urządzenie do real-time PCR (patrz **punkt 6.3**).

4.4. Pomieszczenia/ wymagane szkolenie

- Próbki należy analizować w placówce z poziomu 2 bezpieczeństwa biologicznego, przestrzegając tymczasowych wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia dotyczących bezpieczeństwa biologicznego w laboratorium z 12 lutego 2020 r. Badania na obecność COVID-19 powinny być przeprowadzane w odpowiednio wyposażonym laboratorium przez personel przeszkolony w zakresie odpowiednich procedur technicznych i bezpieczeństwa.

5. Informacje ogólne

Ważne jest przeprowadzenie badań przesiewowych pod kątem występowania u pacjentów objawów koronawirusa. Wiarygodna i regularna detekcja koronawirusa pomoże ograniczyć rozprzestrzenianie się infekcji, a także szybko wyleczyć zakażonych pacjentów.

COVID-19 to zaraźliwa, nowa odmiana koronawirusa, która pojawiła się w Wuhan w Chinach w grudniu 2019 r. Uważa się, że wirus jest pochodzenia odzwierzęcego i prawdopodobnie rozprzestrzenił się w mieście Wuhan. Wirus powoduje infekcję dróg oddechowych z takimi objawami jak zmęczenie, gorączka, duszność, niewydolność oddechowa, niewydolność nerek i śmierć. W momencie opracowywania niniejszej instrukcji, w lutym 2020 r., globalnie potwierdzonych jest ponad 60 000 przypadków zakażeń.

Pacjenci mogą zarazić się COVID-19 przez kontakt człowiek-człowiek (kontakt z zanieczyszczonym środowiskiem lub osobą). Osoby młodsze i starsze (oraz inne osoby z obniżoną odpornością) są najbardziej narażone na poważne powikłania, a u około 20% zakażonych może wystąpić stan krytyczny.

6. Opis produktu

Test genesig PCR real-time do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD jest testem diagnostycznym *in vitro*, opartym na technologii real-time PCR (PCR w czasie rzeczywistym), przeznaczonym do wykrywania specyficznego wirusowego RNA SARS-CoV-2. System sond oparty jest na standardowym systemie hydrolizy sondy TaqMan®. Sonda specyficzna dla COVID-19 jest znakowana fluoroforem FAM, a kontrola wewnętrzna jest znakowana fluoroforem HEX.

Zestaw zawiera kontrolę wewnętrzną w celu zidentyfikowania możliwego inhibowania reakcji PCR, pomiaru czystości ekstrakcji i potwierdzenia prawidłowego przebiegu reakcji PCR.

Technologia real-time PCR wykorzystuje reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) do amplifikacji określonych sekwencji docelowych i specyficznych sond docelowych do wykrywania zamplifikowanego RNA. Sondy są znakowane fluorescencyjnymi barwnikami reporterowymi i wygaszającymi.

6.1. Kontrola pozytywna

Matryca kontroli pozytywnej (PCT – positive control template) zawiera standaryzowane stężenia sekwencji RNA SARS-CoV-2 (koronawirus COVID-19) w stężeniu 1,67 x 10^5 kopii na µl. Wartość Cq ≤22 dla PCT przy odczycie w kanale FAM świadczy o prawidłowym przebiegu reakcji Real Time PCR.

6.2. Zestawy/ urządzenia do ekstrakcji

Test genesig real-time PCR do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD jest przeznaczony do użytku w połączeniu z systemem ekstrakcji zwalidowanym jako urządzenie CE IVD do ekstrakcji RNA (samo RNA lub w połączeniu z DNA) z próbek pochodzących od pacjentów, w tym wymazów z jamy nosowo-gardłowej, ustno-gardłowej i plwociny.

Walidację zestawu przeprowadzono na zautomatyzowanym systemie ekstrakcji GenoXtract® firmy HAIN Lifescience GmbH (Brucker) przy użyciu zestawu do ekstrakcji DNA / RNA GXT (CE IVD).

6.3. Urządzenia do real-time PCR

Test genesig PCR real-time do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD został opracowany i zwalidowany do użytku z następującymi urządzeniami do real-time PCR.

- **Applied Biosystem® 7500 Real-Time PCR System (wersja oprogramowania 2.3)**
- **Roche® LightCycler 480 II (wersja oprogramowania 1.5)**
- **Bio-Rad CFX Maestro (wersja oprogramowania 1.1)**

Uwaga: *należy upewnić się, że wszystkie używane urządzenia zostały zainstalowane, skalibrowane i poddane konserwacji zgodnie z instrukcjami i zaleceniami producenta.*

7. Ostrzeżenia i środki ostrożności

7.1. Informacje dotyczące bezpieczeństwa

7.1.1. Próbki

Badania na obecność COVID-19 powinny być przeprowadzane w odpowiednio wyposażonym laboratorium przez personel przeszkolony w zakresie odpowiednich procedur technicznych i bezpieczeństwa. Należy bezwzględnie przestrzegać krajowych wytycznych dotyczących bezpieczeństwa biologicznego w laboratorium:

7.1.2. Test genesig PCR real-time do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD

Przed użyciem tego zestawu należy zapoznać się z kartą charakterystyki produktu (MSDS). Jest ona dostępna na życzenie.

- Element zestawu genesig PCR real-time do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD „Bufor do zawieszania" zawiera EGTA. Z elementem tym należy postępować zgodnie ze wskazówkami zawartymi w karcie charakterystyki. Jeśli zostanie stwierdzone uszkodzenie opakowania ochronnego zestawu, należy skontaktować się z Primerdesign w celu uzyskania instrukcji.

7.1.3. Zestaw do ekstrakcji RNA (CE IVD) - ostrzeżenia

Przed użyciem wybranego zestawu do ekstrakcji CE IVD należy zapoznać się z odpowiednią kartą charakterystyki, dostępną u dostawcy.

7.2. Wymagania dotyczące obsługi i procedur

7.2.1. Informacje ogólne

- Podczas kontaktu z elementami zestawu należy zawsze stosować rękawiczki jednorazowe.
- Używać oddzielnych obszarów roboczych do przygotowywania próbek, reakcji i amplifikacji.
- Materiały eksploatacyjne i sprzęt powinny być oddzielone w każdym obszarze roboczym i nie mogą być przenoszone między nimi.
- Podczas mieszania odczynników przez pipetowanie w górę i w dół należy to robić przy objętości z grubsza równej 50% całkowitej objętości składnika.
- Należy upewnić się, że woda nie zostanie użyta do ponownego zawieszenia elementów zestawu.

7.2.2. Zapobieganie zanieczyszczeniu matrycy

- Matryca kontroli pozytywnej znajduje się w zapieczętowanej kopercie foliowej i zawiera dużą liczbę kopii matryc. Należy go otwierać i przetwarzać z dala od próbek testowych i elementów zestawu, aby uniknąć kontaminacji krzyżowej.
- Po ustawieniu i wykonaniu każdej reakcji wyczyść powierzchnie robocze i sprzęt za pomocą środka do usuwania DNA / RNA.
- Z płytkami po amplifikacji należy obchodzić się ostrożnie i upewnić się, że pieczęć nie jest zerwana. W celu uzyskania dalszych instrukcji dotyczących utylizacji patrz **punkt 8** Instrukcje utylizacji.

7.2.3. Zapobieganie kontaminacją DNazą

- Należy używać jednorazowych naczyń plastikowych i pipet zarezerwowanych do pracy z DNA / RNA, aby zapobiec skażeniu krzyżowemu DNazami / RNazami ze wspólnego sprzętu.

- Podczas całej procedury należy używać końcówek z filtrem wolnych od DNaz/ RNaz, aby zapobiec skażeniu aerozolu i cieczy.

8. Ograniczenia użytkowania

- Test genesig PCR real-time do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD został zwalidowany do użytku z wymazami ze plwociny, jamy nosowo-gardłowej, ustno-gardłowej i systemem Roche® LightCycler 480 II Real-Time PCR, Bio-Rad CFX96 i Applied Biosystem® 7500 Real-Time PCR.
- Należy postępować zgodnie z procedurami opisanymi w niniejszej instrukcji. Wszelkie odchylenia mogą prowadzić do uszkodzenia testu lub uzyskania błędnego wyniku.
- Wymagana jest dobra praktyka laboratoryjna w celu zapewnienia prawidłowego działania zestawu oraz zachowanie ostrożności, aby zapobiec skażeniu elementów zestawu. Elementy należy monitorować pod kątem skażenia, a wszelkie elementy, które mogły ulec skażeniu należy zutylizować jako standardowe odpady laboratoryjne w zamkniętym woreczku lub plastikowej torebce z zamkiem błyskawicznym.
- Wszystkie próbki należy traktować tak, jakby zawierały materiał zakaźny, stosując odpowiednie środki bezpieczeństwa biologicznego.
- Interpretacja wyników musi uwzględniać możliwość uzyskania wyników fałszywie ujemnych i fałszywie dodatnich.
- Fałszywie negatywne wyniki mogą być spowodowane przez:
    - Niewłaściwe pobieranie, przenoszenie i/ lub przechowywanie próbek.
    - Próbka poza fazą wiremiczną.
    - Nieprzestrzeganie procedur opisanych w niniejszej instrukcji.
    - Korzystanie z nieautoryzowanego zestawu do ekstrakcji lub platformy PCR.
- Fałszywie pozytywne wyniki mogą być spowodowane przez:
    - Niewłaściwe przenoszenie próbek zawierających wysokie stężenie wirusowego RNA COVID-19 lub matrycy kontroli pozytywnej.
    - Niewłaściwe przenoszenie produktu po amplifikacji.
- Wszystkie wyniki powinny być interpretowane przez pracownika służby zdrowia w kontekście historii choroby pacjenta i objawów klinicznych.
- Test nie może wykluczyć chorób spowodowanych przez inne patogeny.
- Wynik ujemny dla dowolnego testu PCR nie wyklucza jednoznacznie możliwości zakażenia.

9. Procedura

9.1. Procedura przygotowania próbki

Przygotować co najmniej 1 negatywną kontrolę ekstrakcji (NEC – negative extraction control) za każdym razem, gdy przeprowadzana jest ekstrakcja (tj. ekstrakcja bez dodanej próbki). NEC będzie służyć jako kontrola negatywna dla całego systemu testowego.

	Wymazy z jamy nosowo-gardłowej	Wymazy z jamy ustno-gardłowej	Plwocina
Pobieranie	Powlekane dacronem lub poliestrem waciki w wirusowym nośniku transportowym	Powlekane dacronem lub poliestrem waciki w wirusowym nośniku transportowym	Sterylny pojemnik**
Temperatura transportu*	4°C	4°C	4°C
Przechowywanie krótkoterminowe (poprzedzające izolację)*	4°C przez ≤ 5 dni	4°C przez ≤ 5 dni	4°C przez ≤ 48 godzin
Przechowywanie długoterminowe (poprzedzające izolację)*	-70°C przez dłuższy czas	-70°C przez dłuższy czas	-70°C przez dłuższy czas
System ekstrakcji	System ekstrakcji CE IVD przeznaczony do izolacji RNA	System ekstrakcji CE IVD przeznaczony do izolacji RNA	System ekstrakcji CE IVD przeznaczony do izolacji RNA
Objętości próbki ekstrakcji	700 µl***	700 µl***	700 µl
Objętość elucji w ekstrakcji	85 µl	85 µl	85 µl

* Są to zalecenia Światowej Organizacji Zdrowia (WHO). Pierwszeństwo mają lokalne przepisy dotyczące pracy z próbkami.
** Plwocina musi pochodzić z dolnych dróg oddechowych
*** Próbka odnosi się do wirusowego medium transportowego znajdującego się w pojemniku na próbki służącym jako repozytorium wacika.

9.1.1. Ekstrakcja RNA

Przed użyciem wybranego zestawu do ekstrakcji CE IVD należy zapoznać się z instrukcją użytkowania.

Wewnętrzną kontrolę ekstrakcji należy zawiesić w 1000 µl buforu do przygotowania matrycy. Należy ją włączyć do ekstrakcji zgodnie z instrukcją użytkowania zestawu przeznaczonego do izolacji. Primerdesign zaleca dodanie 20 µl na próbkę. **Wewnętrznej kontroli ekstrakcji nie należy dodawać bezpośrednio do surowej próbki (tj. przed zmieszaniem próbki z buforem do lizy). Może to zakłócić działanie testu.**

W przypadku, gdy instrukcja użytkowania nie zawiera konkretnych wytycznych dotyczących stosowania wewnętrznej kontroli ekstrakcji lub gdy zautomatyzowany system nie obsługuje dodawania 20 µl, należy skontaktować się z Primerdesign w celu uzyskania wskazówek.

Zestaw do ekstrakcji DNA/ RNA GXT VER 2.0 (instrukcja stosowania 120102-10)

Podczas badań walidacyjnych do przeprowadzenia ekstrakcji zastosowano zestaw do ekstrakcji DNA/ RNA GXT VER 2.0 dla zautomatyzowanego systemu ekstrakcji GenoXtract® (zgodnie z instrukcją stosowania 120102-10). Wewnętrzną kontrolę ekstrakcji (20 µl) nałożono bezpośrednio do studzienki 12 (bufor do lizy) wkładu zestawu do ekstrakcji GXT DNA/ RNA przed przejściem do dalszej części protokołu.

9.2. Sporządzanie mieszaniny Master Mix

a) Zawiesić primer/ sondę koronawirusa (COVID-19) CE IVD w buforze do zawieszania w proporcji 110 µl buforu na probówkę; wymieszać w wytrząsarce (vortex).

b) Zawiesić liofilizowaną mieszankę qPCR Master Mix w 525 µl buforu do zawieszania oasig; delikatnie wymieszać.

9.3. Nastawianie reakcji

a) Przygotować mieszankę z następujących odczynników:

Element	1 x wymagana objętość (µl)*
oasig qPCR OneStep Master Mix	10*
Koronawirus (COVID-19) Primer/ sonda CE IVD	2*

* Pomnożyć wszystkie liczby zgodnie z wymaganiami eksperymentalnymi

b) Dodać 12 µl do liczby studzienek wymaganych do testu na odpowiedniej 96-studzienkowej płytce dla wybranej platformy PCR, 1 studzienkę przeznaczyć na PCT i 1 na NEC (w razie potrzeby można przygotować dodatkową studzienkę na NTC - kontrola bez matrycy (no template control))

c) Dodać 8 µl następujących składników do odpowiednich studzienek zgodnie z konfiguracją płytki:
   i. Próbki
   ii. PCT; zawieszone w 600 µl buforu do zawieszania (wymieszać w wytrząsarce vortex)
   iii. NEC
   iv. NTC (opcjonalnie)

d) Zakleić płytkę odpowiednią folią i umieścić w instrumencie.

9.4. Programowanie urządzenia do real-time PCR

Dodatkowe informacje na temat korzystania z urządzenia znajdują się w jednej z następujących instrukcji:

- Applied Biosystem® real-time PCR 7500 - względna krzywa standardowa i porównawcze eksperymenty CT (© Copyright 2007, 2010 Applied Biosystem, wszelkie prawa zastrzeżone).
- Instrukcja obsługi LightCycler 480 (lipiec 2016, dodatek 4, wersja oprogramowania 1.5)
- Instrukcja obsługi CFX96™ Touch (© 2013, Bio-Rad Laboratories Inc.)

a) Podać następujący program amplifikacji:

Etapy	Czas	Temperatura	Cykle	Format detekcji
Odwrotna transkrypcja	10 min	55°C	1	COVID-19 = FAM (465-510) Wewnętrzna kontrola ekstrakcji (IEC) = VIC / HEX / Yellow555 (533-580)
Wstępna denaturacja (aktywacja Taq)	2 min	95°C	1	
Denaturacja	10 sek.	95°C	45	
Hybrydyzacja i elongacja	60 sek.	60°C*		

* Pomiar musi zostać przeprowadzony na końcu tego etapu
** W przypadku korzystania z Roche® LightCycler 480 II wybrać następujący format detekcji - dwukolorowa sonda hydrolizy/ sonda UPL

b) Upewnić się, że studzienka wypełniona PCT jest oznaczona jako „Rodzaj próbki - standard" i posiada odpowiednie stężenie (patrz **punkt 6.1**)

c) Należy upewnić się, że studzienki wypełnione próbką (-ami) są oznaczone jako „Rodzaj próbki - nieznany"; oprogramowanie automatycznie obliczy ilości dla tych studzienek, jeśli nastąpi amplifikacja

9.5. Analiza danych

Przed interpretacją wyników próbek należy zweryfikować prawidłowość przebiegu testu. Jeśli poniższe kryteria nie są spełnione, należy powtórzyć test:

a) NEC jest pozbawiona amplifikacji w kanale FAM (465-510)
b) NEC daje Cq < 30 przy odczycie w kanale VIC / HEX / Yellow555 (533-580)
c) PCT daje Cq 14-22 przy odczycie w kanale FAM (465-510)

Wskazówki dotyczące prawidłowego przypisywania wartości Cq dla danego urządzenia znajdują się poniżej.

9.5.1. Roche® LightCycler 480 II

- Wybrać opcję „Abs Quant/2nd Derivative Max”
- Włączyć funkcję automatycznej kompensacji kolorów; „Universal CC FAM (510) - VIC (580)”, dostęp do niej można uzyskać za pomocą rozwijanego przycisku „Color Comp” na ekranie analizy

9.5.2. Bio-Rad® CFX96

- Ustawić tryb „Cq Determination Mode” na regresję. Dostęp do tej opcji można uzyskać z paska menu pod „Widok”.

9.5.3. Applied Biosystem® 7500 Real-Time PCR System

- Wybrać liniowy typ wykresu „Graph Type: Linear”
- Wybrać cel „Target: FAM”
- Odznaczyć pole automatycznego progu „Threshold: Auto”
- Zaznaczyć pole wyświetlania progu „Show: Threshold”
- Ręcznie ustawić linię progową na 1/10 wartości końcowej wartości fluorescencji dla PCT
- Wybrać kanał VIC/HEX
- Ręcznie ustawić linię progową na 1/10 średniej fluorescencji w punkcie końcowym krzywych amplifikacji VIC/ HEX.

9.6. Interpretacja wyników

Jeśli wszystkie kryteria analizy danych są spełnione, każdą próbkę można ocenić za pomocą następujących wskaźników:

		FAM (465-510)	
		Cq pozytywna	Cq negatywna
VIC / HEX / Yellow555 (533-580)	Cq ≤ (NEC Cq + 6)	Wykryto COVID-19*	Nie wykryto COVID-19
	Cq > (NEC Cq + 6)	Wykryto COVID-19*	Błąd
	Cq negatywna	Wykryto COVID-19*	Błąd

* Należy ręcznie sprawdzić krzywe amplifikacji dla wszystkich próbek, którym przypisano wartość Cq, aby zweryfikować pozytywną amplifikację

10. Ocena działania testu

Wyniki oceny działania zestawu do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD zostały uzyskane przy użyciu systemu Applied Biosystem® 7500 Real-Time PCR poprzez dodatkowe testy przeprowadzone na urządzeniach Roche® LightCycler 480 II i Bio-Rad CFX 96 pod kątem określenia czułości analitycznej (LoD).

10.1. Czułość analityczna

Czułość analityczna została zdefiniowana jako najniższe stężenie substancji analizowanej, które można było wiarygodnie wykryć z 95% pewnością. Określono to poprzez dodanie do 3 ujemnych próbek wymazu z jamy ustno-gardłowej matrycy o znanej liczbie kopii. Eluaty następnie seryjnie rozcieńczono, uzyskując 11 poziomów, które badano przez 3 dni, wytwarzając co najmniej 36 replikacji dla każdego badanego stężenia.

10.1.1. Wyniki badania czułości analitycznej

Dane te wskazują, że zestaw genesig® do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD wykrywa 0,58 kopii/µl wirusowego RNA COVID-19 przy poziomie ufności ≥95%. Stężenie to służy jako granica detekcji zestawu.

	ABI 7500			
Poziom	**Całkowite średnie stężenie (kopie/µl)**	**% detekcji replikatów**	**Średnia wartość Cq**	**Odchylenie standardowe Cq**
1	$2,28 \times 10^3$	100	26,77	1,577
2	$1,34 \times 10^3$	100	27,71	1,386
3	$4,09 \times 10^2$	100	29,50	1,404
4	$2,36 \times 10^2$	100	30,36	1,373
5	$3,55 \times 10^1$	100	32,92	1,373
6	$2,53 \times 10^1$	100	33,98	1,353
7	0,8	100	36,25	1,447
8	0,58	100	38,33	1,125
9	1,4	97,2	38,41	2,564
10	0,90	72,2	39,30	2,077
11	0,14	19,4	40,53	0,790

10.1.2. Testowanie alternatywnymi urządzeniami

Urządzenia CFX 96 (Bio-Rad®) i LightCycler 480 II (Roche®) qPCR zostały wykorzystane do weryfikacji czułości analitycznej i wartości 0,58 kopii/µl. Na każdym urządzeniu przetestowano 36 replik matrycy kontroli pozytywnej, w stężeniu reprezentującym czułość analityczną.

	Lightcycler 480 II			Bio-Rad CFX96		
Całkowite średnie stężenie (kopie/µl)	**% detekcji replikatów**	**Średnia wartość Cq**	**Odchylenie standardowe Cq**	**% detekcji replikatów**	**Średnia wartość Cq**	**Odchylenie standardowe Cq**
$1,25 \times 10^5$	100	15,49	0,061	100	14,87	0,030
$1,25 \times 10^3$	100	22,54	0,061	100	21,93	0,071
1,25 x 10	100	29,56	0,078	100	28,75	0,119
6,25	100	30,44	0,266	100	29,71	0,015
1,25	100	33,88	0,304	100	33,07	0,366
0,58	100	33,92	0,329	100	32,84	0,251

10.2. Specyficzność analityczna

Test genesig real-time PCR do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD został zaprojektowany do wykrywania wszystkich publicznie dostępnych sekwencji RNA wirusa COVID-19. Zostało to potwierdzone na drodze analiz porównawczych sekwencji *in silico* oraz testów próbek *in vitro*. Na podstawie analizy *in silico* stwierdzono, że test genesig real-time PCR do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD wykrywa wszystkie szczepy wirusa COVID-19 i nie wykazuje reaktywności krzyżowej ze szczepami nienależącymi do COVID-19.

Do testów *in vitro* wykorzystano dwa panele Qnostics: panel oceny układu oddechowego i panel historii QCMD z programu Coronavirus EQA. Wyniki badań próbek *in vitro* przedstawiono poniżej

Organizm	Interpretacja wyniku
Grypa A H1N1	Nie wykryto COVID-19
Grypa A H3N2	Nie wykryto COVID-19
Grypa B Victoria	Nie wykryto COVID-19
Grypa B Yamagata	Nie wykryto COVID-19
RSV A	Nie wykryto COVID-19
RSV B	Nie wykryto COVID-19
Koronawirus NL63	Nie wykryto COVID-19
Koronawirus 229E	Nie wykryto COVID-19
Koronawirus HKU	Nie wykryto COVID-19
Koronawirus OC43	Nie wykryto COVID-19

* Wyniki zostały zinterpretowanie zgodnie z **Punktem 9.6**.

10.3. Precyzja

Precyzja testu genesig real-time PCR do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD została określona na drodze powtarzalnego testowania próbek klinicznych reprezentujących 3 poziomy obciążenia wirusem:

- 120 kopii/reakcję (15 kopii/µl)
- 100 kopii/reakcję (12,5 kopii/µl)
- 80 kopii/reakcję (10 kopii/µl)

Precyzja została wyrażona jako odchylenie standardowe Cq i współczynnik zmienności.

10.3.1. Powtarzalność

Powtarzalność została określona na drodze analizy 10 replik każdej próbki na jednej płytce:

	COVID-19 (FAM)			IEC (HEX/VIC/Yellow555)		
Stężenie próbki (kopie/µl)	**Średnia wartość Cq**	**% detekcji replikatów**	**Współczynnik zmienności (%)**	**Średnia wartość Cq**	**% detekcji replikatów**	**Współczynnik zmienności (%)**
15	31,48	100	0,31	19,77	100	0,72
12,5	31,83	100	0,45	19,37	100	0,33
10	32,19	100	0,36	19,84	100	0,91

10.3.2. Powtarzalność między urządzeniami

Powtarzalność między urządzeniami została określona na drodze badania 10 replik każdej próbki na 2 urządzeniach qPCR.

	COVID-19 (FAM)			IEC (HEX/VIC/Yellow555)		
Stężenie próbki (kopie/µl)	**Średnia wartość Cq**	**% detekcji replikatów**	**Współczynnik zmienności (%)**	**Średnia wartość Cq**	**% detekcji replikatów**	**Współczynnik zmienności (%)**
15	31,39	100	2,99	19,83	100	6,98
12,5	31,77	100	3,41	19,45	100	7,01
10	32,04	100	3,02	19,86	100	8,2

10.3.3. Powtarzalność niezależnie od operatora

Trzech różnych operatorów przetestowało 10 replik każdej próbki przy użyciu testu genesig real-time PCR do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD, aby ocenić powtarzalność. Do każdego testu użyto tej samej partii i tego samego urządzenia.

	COVID-19 (FAM)			IEC (HEX/VIC/Yellow555)		
Stężenie próbki (kopie/µl)	**Średnia wartość Cq**	**% detekcji replikatów**	**Współczynnik zmienności (%)**	**Średnia wartość Cq**	**% detekcji replikatów**	**Współczynnik zmienności (%)**
15	31,47	100	3,44	19,96	100	8,53
12,5	31,73	100	3,20	19,33	100	7,39
10	32,12	100	3,35	19,91	100	8,14

10.3.4. Powtarzalność niezależnie od dnia

Powtarzalność niezależnie od dnia oceniono na drodze analizy 40 replik każdej próbki w ciągu 4 dni, 10 replik każdego stężenia dziennie. Do każdego testu użyto tej samej partii i tego samego urządzenia.

	COVID-19 (FAM)			IEC (HEX/VIC/Yellow555)		
Stężenie próbki (kopie/µl)	**Średnia wartość Cq**	**% detekcji replikatów**	**Współczynnik zmienności (%)**	**Średnia wartość Cq**	**% detekcji replikatów**	**Współczynnik zmienności (%)**
15	31,50	100	3,51	20,02	100	7,86
12,5	31,77	100	3,32	19,45	100	6,99
10	32,311	100	3,28	19,94	100	7,57

10.4. Trafność

Ocenę kliniczną testu genesig real-time PCR koronawirus (COVID-19) CE IVD przeprowadzono z wymazami z jamy ustno-gardłowej (50 pozytywnych i 50 negatywnych) w uniwersalnym medium transportowym Copan. Przygotowano 50 wymazów z matrycą kontroli pozytywnej i przetestowano w ślepej próbie w celu określenia pozytywnej zgodności procentowej (PPA), negatywnej zgodności procentowej (NPA) oraz ogólnej zgodności procentowej (OPA) jako miary trafności diagnostycznej:

Status przygotowanych próbek			
		Pozytywny	Negatywny
Test genesig real- time PCR do detekcji koronawirusa (COVID-19) CE IVD	Pozytywny	49	0
	Negatywny	1	50
		Pozytywna zgodność procentowa (PPA)	Negatywna zgodność procentowa (NPA)
		98%	100%
		Ogólna zgodność procentowa (OPA)	
		99%	

11. Kontrola jakości

Zgodnie z systemem zarządzania jakością Primerdesign Ltd certyfikowanym zgodnie z ISO 13485, każda partia zestawu genesig do detekcji koronawirusa real-time PCR (COVID-19) CE IVD jest testowana pod kątem ustalonych wcześniej specyfikacji, aby zapewnić stałą jakość produktu.

12. Wsparcie techniczne

Aby uzyskać wsparcie techniczne, prosimy o kontakt z zespołem wsparcia technicznego:

Tel.: +44 (0) 800 0156 494

E-mail: support@primerdesign.co.uk

13. Znaki towarowe i wyłączenie odpowiedzialności

Znaki towarowe: oasig®, genesig® i logo Primerdesign.

Wszystkie inne znaki towarowe, które pojawiają się w niniejszej instrukcji użytkowania, są własnością ich właścicieli.

14. Objaśnienie symboli

Symbol	Objaśnienie
IVD	Diagnoza in vitro
	Producent
REF	Numer katalogowy
Σ	Wystarcza do
	Termin przydatności
	Ograniczenie temperatury
	Patrz instrukcja użytkowania w formie elektronicznej
LOT	Kod partii
	Chronić przed słońcem (mieszanka primer/ sonda)
CONTROL +	Kontrola pozytywna

PRIMER DESIGN

Primerdesign Ltd
York House, School Lane, Chandlers Ford, SO53 4DG

Tel.: +44 (0) 800 0156 494

E-mail: enquires@Primerdesign.co.uk

Internet: www.primerdesign.co.uk

GENESIG
Kits by Primerdesign