ΠΛΑΙΣΙΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗΣ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΤΕΣΤ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΟΥ ΙΟΥ SARS-CoV-2 (COVID-19)

Επεξηγήσεις σχετικά με την εφαρμογή των Κατευθυντηρίων Οδηγιών και των Κανονισμών Διαπίστευσης του Ε.ΣΥ.Δ.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το παρόν έγγραφο εκδόθηκε, υπό την ευθύνη της Υπηρεσίας του Ε.ΣΥ.Δ. (Διεύθυνση Διαπίστευσης Εργαστηρίων) και αρμόδιων αξιολογητών/εμπειρογνωμόνων, προκειμένου να διευκρινισθεί η εφαρμογή των ισχυόντων Κανονισμών Διαπίστευσης και Κατευθυντήριων Οδηγιών για τα Κλινικά Εργαστήρια και τις μοριακές δοκιμές και αποτελεί αναθεώρηση του εγγράφου έκδοσης στις 15.04.2020. Σημειώνεται ότι υπέχει τη θέση ενημερωτικού εγγράφου σχετικά με τις απαιτήσεις ελεγχόμενων εγγράφων του Ε.ΣΥ.Δ..

ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Κάθε διαγνωστική εξέταση για την ταυτοποίηση παρουσίας του ιού SARS-CoV-2 σε κλινικά δείγματα, θα πρέπει να εκτελείται από κατάλληλα εξοπλισμένα εργαστήρια και από άρτια εκπαιδευμένο προσωπικό στα τεχνικά θέματα και στις διαδικασίες ασφαλείας. Εθνικές οδηγίες για τα θέματα βιοασφάλειας θα πρέπει να ακολουθούνται σε κάθε περίπτωση. Επιπλέον, θα πρέπει να εφαρμόζονται και οι κύριες απαιτήσεις Βιοασφάλειας και Ορθής Μικροβιολογικής Πρακτικής (Good Microbiological Practice and Procedure), όπως αυτές περιγράφονται στην Κατευθυντήρια Οδηγία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), **"Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19)"**. Σχετικά με τις απαιτήσεις των εργαστηριακών δοκιμών για τη μοριακή ανίχνευση του ιού SARS-CoV-2, τα εργαστήρια οφείλουν να ακολουθούν την Κατευθυντήρια Οδηγία του WHO "**Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases**".

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΙΝΔΥΝΩΝ

Το εργαστήριο, όπως απαιτείται και από το πρότυπο ΕΛΟΤ ΕΝ ISO 15189:2012 παρ. 4.14.6, θα πρέπει να διεξάγει μια αξιολόγηση κινδύνων για όλα τα στάδια της ανάλυσης (από τη συλλογή του δείγματος, εάν πραγματοποιείται η λήψη στις εγκαταστάσεις του εργαστηρίου, έως και την εκτέλεση της μοριακής δοκιμής), προκειμένου να διασφαλιστεί ότι είναι κατάλληλο για την ασφαλή εκτέλεση των προβλεπόμενων δοκιμών και ότι εφαρμόζει κατάλληλα μέτρα ελέγχου πιθανών κινδύνων, σύμφωνα με την Κατευθυντήρια Οδηγία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO), **"Laboratory biosafety guidance related to coronavirus disease 2019 (COVID-19)"**.

ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΟΛΗ

Η συλλογή των δειγμάτων θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με συγκεκριμένη διαδικασία και από προσωπικό εκπαιδευμένο για την ορθή συλλογή, αποθήκευση, συσκευασία και μεταφορά των δειγμάτων.

Η μεταφορά των δειγμάτων εντός των εθνικών συνόρων πρέπει να συμμορφώνεται με τους εθνικούς κανονισμούς σχετικούς με τη μεταφορά μολυσματικών δειγμάτων. Για την διασυνοριακή μεταφορά των δειγμάτων θα πρέπει να ακολουθούνται οι κανονισμοί των Ηνωμένων Εθνών. Πιο συγκεκριμένα, δείγματα ασθενών ύποπτων ή επιβεβαιωμένων για την παρουσία του ιού θα πρέπει να μεταφέρονται ως UN3373, Βιολογική ουσία Κατηγορίας Β (βλέπετε οδηγία του CDC **"Interim Laboratory Biosafety Guidelines for Handling and Processing Specimens Associated with Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)"**).

Σε περίπτωση παραπομπής δειγμάτων σε άλλα εθνικά, περιφερειακά ή διεθνή εργαστήρια με δυνατότητα ανίχνευσης COVID-19, θα πρέπει να καλύπτονται όλες οι σχετικές απαιτήσεις βιοασφάλειας για τη μεταφορά των δειγμάτων.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΜΕΘΟΔΩΝ - ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ – ΕΠΑΛΗΘΕΥΣΗ

Βλέπετε επίσης ΕΣΥΔ ΚΟ ΚΛΙΝΕΡΓ παρ.3.1, 3.2, 3.3

Για *ποιοτικές μεθόδους*:

Στην περίπτωση χρήσης CE-IVD τεστ ή επίσημης εγκεκριμένης μεθόδου, το εργαστήριο απαιτείται να διενεργήσει επαλήθευση της μεθόδου, με έλεγχο της ορθότητας, της επαναληψιμότητας/αναπαραγωγιμότητας και του ορίου ανίχνευσης.

Για εσωτερικές μεθόδους (in-house methods) ή μεθόδους για ερευνητική χρήση μόνο (Research Use Only), απαιτείται, εκτός του ελέγχου των ανωτέρω παραμέτρων που αφορούν τις CE-IVD μεθόδους, να διενεργηθεί επιπλέον Κλινική επαλήθευση της μεθόδου (Clinical Evaluation), συμπεριλαμβανομένης της διαγνωστικής ευαισθησίας (diagnostic sensitivity) και ειδικότητας (diagnostic specificity), έλεγχος πολλαπλών γονιδιωματικών περιοχών SARS-CoV-2 (Inclusivity) και έλεγχος Διασταυρούμενης Αντίδρασης (Cross-Reactivity). Η επικύρωση συστήνεται να διενεργηθεί σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA **"Molecular-based Laboratory Developed Tests for Detection of Nucleic Acid from SARS-CoV-2 (Molecular LDT COVID-19)"** και **"Policy for Diagnostic Tests for Coronavirus Disease-2019 during the Public Health Emergency"**, ή ισοδύναμων εγκεκριμένων οδηγιών.

Για *ποσοτικές μεθόδους*, επιπλέον των ανωτέρω, το εργαστήριο απαιτείται να εφαρμόζει και τα απαιτούμενα της **ΕΣΥΔ ΚΟ-ΚΛΙΝΕΡΓ** 01/02/30-01-2014, σχετικά με την «Επαλήθευση CE-IVD ποσοτικών μοριακών δοκιμών» και την «Επικύρωση εσωτερικών (in-house) ποσοτικών μοριακών δοκιμών».

Για την διεξαγωγή των ανωτέρω ελέγχων απαιτείται η χρήση εμπορικά διαθέσιμου δείγματος ελέγχου, ανεξάρτητου του χρησιμοποιούμενου κιτ.

ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

Βλέπετε επίσης ΚΟ ΚΛΙΝΕΡΓ παρ.3.5

Κατά τον *εσωτερικό έλεγχο ποιότητας* απαιτείται η ανάλυση θετικών και αρνητικών δειγμάτων ελέγχου για κάθε ένα από τα γονίδια-δείκτες που εξετάζονται, και για την απόδειξη επαρκούς απόδοσης των διαδικασιών της απομόνωσης και πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού του ιού.

Κατά τη χρήση **CE-IVD** τεστ το εργαστήριο απαιτείται να εφαρμόζει τα προβλεπόμενα από τον κατασκευαστή του τεστ.

Κατά τη χρήση **εσωτερικής μεθόδου** ή **μεθόδου για ερευνητική χρήση μόνο (Research Use Only)**, το εργαστήριο συστήνεται, σύμφωνα με τις οδηγίες του FDA "**Molecular-based Laboratory Developed Tests for Detection of Nucleic Acid from SARS-CoV-2 (Molecular LDT COVID-19)**", να χρησιμοποιεί συνδυασμό από τα παρακάτω υλικά/δείγματα ελέγχου, προκειμένου να εξασφαλίζεται ότι η μέθοδος είναι έγκυρη:

• *Internal Process Control (IPC)* - Έλεγχος Εσωτερικής Διαδικασίας. Διενεργείται για κάθε εξεταζόμενο κλινικό δείγμα και αφορά την ποιότητα της εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων. Παραδείγματα ενδογενούς εσωτερικού ελέγχου περιλαμβάνουν την ενίσχυση του ανθρώπινου γονιδίου RNaseP.

• *Extraction Control (EC)* - Έλεγχος εκχύλισης. Χρησιμεύει είτε ως αρνητικός μάρτυρας της διαδικασίας εκχύλισης για τον εντοπισμό οποιασδήποτε διασταυρούμενης μόλυνσης που μπορεί να συμβεί κατά τη διαδικασία εκχύλισης (για παράδειγμα χαρακτηρισμένο αρνητικό για την παρουσία του ιού δείγμα ασθενούς), είτε ως θετικός μάρτυρας που αξιολογεί την επάρκεια των αντιδραστηρίων για την επιτυχή εκχύλιση RNA (για παράδειγμα αρνητικό δείγμα εμβολιασμένο με επαρκή ποσότητα ετερόλογου (μη-ειδικού στόχου), το οποίο υφίσταται τη συνολική διαδικασία του πρωτοκόλλου εκχύλισης νουκλεϊκών οξέων.

• *External Positive Control or Positive Template Control (PTC)* - Έλεγχος εξωτερικού θετικού ελέγχου ή θετικού προτύπου. Αποδεικνύει αν πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο η βέλτιστη χρήση των αντιδραστηρίων και των συνθηκών της μοριακής δοκιμής. Παραδείγματα περιλαμβάνουν συνθετικά τμήματα RNA που περιέχουν γονιδιωματικές περιοχές SARS-CoV-2 ως στόχους επιλεκτικού πολλαπλασιασμού (in-vitro transcribed RNA) ή ιικό RNA απομονωθέν από αναπνευστικό δείγμα COVID-19 ασθενούς.

• *No Template Control* - Αρνητικός μάρτυρας ελέγχου (για παράδειγμα απεσταγμένο νερό) για τον εντοπισμό μη ειδικής ενίσχυσης ή διασταυρούμενης μόλυνσης κατά τη διάρκεια της προετοιμασίας της μοριακής δοκιμής (μόλυνση αντιδραστηρίων από νουκλεϊκό οξύ - στόχο).

Για τον *εξωτερικό έλεγχο ποιότητας* απαιτείται η συμμετοχή του εργαστηρίου σε οργανωμένα σχήματα διεργαστηριακών δοκιμών ικανότητας (PT schemes) για κάθε ένα από τα γονίδια-δείκτες που εξετάζονται. Το εργαστήριο, κατά την αξιολόγηση, θα πρέπει να έχει διαθέσιμα και τα αποτελέσματα από τη συμμετοχή του στα εν λόγω σχήματα.

ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗ ΕΞΕΤΑΣΕΩΝ COVID-19 ΜΕ ΔΕΞΑΜΕΝΟΠΟΙΗΣΗ (POOLING) ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ένα εργαστήριο μπορεί να διαπιστευθεί για τον μοριακό έλεγχο του ιού SARS-CoV-2 με την εφαρμογή δεξαμενοποίησης (pooling) των τεστ, στις παρακάτω περιπτώσεις:

1) η διαδικασία δεξαμενοποίησης (pooling) των τεστ περιλαμβάνεται ήδη στις προδιαγραφές και στη σκοπούμενη χρήση των επικυρωμένων μεθόδων/κιτ και, επιπλέον, το εργαστήριο εφαρμόζει τη μέθοδο με τους προβλεπόμενους περιορισμούς (όπως ορίζονται από WHO και ECDC), που περιλαμβάνουν πεδίο εφαρμογής, αξιολόγηση αποτελεσμάτων και περαιτέρω διερεύνηση, καθώς και συγκεκριμένες πληροφορίες που πρέπει να αναφέρονται στο απαντητικό της εξέτασης (περιορισμοί εξέτασης, ευαισθησία μεθόδου, κλπ.).

2) εσωτερικά το εργαστήριο τροποποιεί το πρωτόκολλο επικυρωμένης μεθόδου/κιτ που δεν προβλέπει δεξαμενοποίηση και έχει διενεργήσει **πλήρη αναλυτική και κλινική επικύρωση**, όπως απαιτείται από το πρότυπο ΕΛΟΤ EN ISO 15189 §5.5.1.3 και όπως περιγράφεται παραπάνω στο κεφάλαιο περί επικύρωσης, καθώς και σε έγγραφα διεθνών οργανισμών (όπως π.χ. του FDA "Molecular Diagnostic Template for Laboratories"). Επιπλέον, το εργαστήριο και σε αυτή την περίπτωση, θα πρέπει να εφαρμόζει την συγκεκριμένη μέθοδο με τους προβλεπόμενους περιορισμούς όπως ορίζονται από WHO και ECDC.

Επισημαίνεται ότι, η χρήση Λογοτύπου του ΕΣΥΔ ή αναφοράς στη Διαπίστευση, σε απαντητικά που το αποτέλεσμα έχει προκύψει από ανάλυση μετά από δεξαμενοποίηση, επιτρέπεται **μόνο** για τα εργαστήρια που έχουν αξιολογηθεί και έχουν διαπιστευθεί για αυτό.

Σε κάθε άλλη περίπτωση και όπου το εργαστήριο χρησιμοποιεί αυτή την τεχνική εκτός Διαπίστευσης, θα πρέπει να δηλώνεται σαφώς στο Σύστημά του, ότι δεν θα γίνεται χρήση του Λογότυπου του ΕΣΥΔ ή αναφοράς στη Διαπίστευση για τα συγκεκριμένα δείγματα.

ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Η αρχική επεξεργασία (πριν από την απενεργοποίηση του ιού) όλων των δειγμάτων θα πρέπει να πραγματοποιείται σε επικυρωμένο Biological Safety Cabinet (BSC) (τουλάχιστον BSL-2) ή σε Primary Containment Device.

Οι διαδικασίες εξαγωγής RNA και ανάλυσης θα πρέπει να διεξάγονται σε εγκατάσταση/χώρο επιπέδου βιοασφάλειας 2 (BSL-2) ή ισοδύναμο, σύμφωνα με τις απαιτήσεις του **"WHO Laboratory biosafety manual"**.

ΠΡΟΣΩΠΙΚΟ

Οι απαιτήσεις του προσωπικού που διενεργούν τις αναλύσεις, αξιολογούν και υπογράφουν τα αποτελέσματα, και επικοινωνούν τα αποτελέσματα στις αρμόδιες κρατικές αρχές, πρέπει να καλύπτουν τις απαιτήσεις του προτύπου ΕΛΟΤ EN ISO 15189 παρ. 5.1 και σε σχέση με τις απαιτήσεις των συγκεκριμένων μοριακών τεχνικών που εκτελούνται στο εργαστήριο. Το εργαστήριο, θα πρέπει να τεκμηριώνει την επάρκεια του εμπλεκόμενου προσωπικού, συμπεριλαμβανομένης της απαιτούμενης εκπαίδευσης, καθώς και της σχετικής εμπειρίας του προσωπικού σε δοκιμές μοριακής ιολογίας, για διαγνωστική χρήση και της γνώσης των οδηγιών βιοασφάλειας.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΙΑΠΙΣΤΕΥΣΗΣ

Η αξιολόγηση των εργαστηρίων και, για όσο διάστημα απαιτηθεί, γίνεται σύμφωνα με τις ισχύουσες οδηγίες του ΕΣΥΔ (βλέπετε ΟΔΗΓΙΑ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ - ΔΙΑΔΙΑΚΑΣΙΑ ΕΞ ΑΠΟΣΤΑΣΕΩΣ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ).