

SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD

Viral RNA dependent RNA polymerase (RdRp) and Nucleocapsid phosphoprotein (N) genes

SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, гени на цели RdRp и N, IVD

Вирусна РНК-зависима РНК полимераза (RdRp) и гени за нуклеокапсидната фосфопротеин (N)

REF MD04831, 96 реакции
MD04832, 4 x 96 реакции

Само за професионална употреба за ин витро диагностика.



Инструкции за употреба

MD0483_IM_en

ВЕРСИЯ 2401, Януари 2024



индекс

1.	Въведение	3
2.	Предназначение	3
3.	Принципи на анализа	3
4.	Състав на кита	4
5.	Условия за съхранение, стабилност и обработка	4
6.	Материали и оборудване, необходими, но не предоставени	4
7.	Събиране и подготовка на проби.....	4
8.	Предпазни мерки и предупреждения	4
8.1.	Информация за безопасността	5
8.2.	Изисквания за обработка и процедурите	5
9.	Процедура за тестване	5
9.1.	Настройка на реакцията	5
9.2.	Програмиране на реалния PCR инструмент	6
10.	Анализ на данните	6
10.1.	Критерии за валидиране на изпълнението	6
10.2.	Интерпретация на резултатите от теста	7
11.	Оценка на Производителността.....	7
11.1.	Очаквани Резултати	7
11.2.	Граница на откриване (LoD) - Аналитична чувствителност	8
11.3.	Инклузивност, кръстосана реактивност и смущаващи вещества	8
11.4.	Прецизност.....	9
11.4.1.	Повторяемост.....	9
11.4.2.	Дневна репродуцируемост	9
11.4.3.	Репродуцируемост между партии	9
11.4.4.	Репродуцируемост между оператори	10
11.4.5.	Междуинструментална репродуцируемост.....	10
11.5.	Клинична оценка	10
12.	Контрол на качеството	10
13.	Техническа поддръжка	10
14.	Търговски марки и Откази	10
15.	Обяснение на символите.....	11
16.	Декларация за съответствие	12
17.	Референции	13

1. Въведение

През декември 2019 г. се докладва за нова остра респираторна болест, наречена Коронавирусна болест 2019 (COVID-19), в Китай, която бързо се разпространява по целия свят. Причинителният агент е определен като Тежък остро респираторен синдромен коронавирус 2 (SARS-CoV-2). Вирусът (предишно наречен 2019-nCoV), подобно на тясно свързания вирус на САРС коронавирус (SARS-CoV), принадлежи към род Betacoronavirus в семейството на коронавирусите. Коронавирусите са обвивкови, положителни, единично нишкови големи РНК вируси, които инфектират хората, но също и широка гама от животни. Смята се, че SARS-CoV-2 е от зоонотичен произход и вероятно се е разпространил от големи пазари на морски дарове и животни чрез контакт между хора и животни в град Ухан. Новият коронавирус е много заразен и се предава предимно чрез респираторни капки (кашлица и кихане). Ранното откриване на SARS-CoV-2 е от съществено значение за предоставянето на бързо лечение на инфектираните пациенти и, следователно, за намаляване на разпространението на инфекциите. Най-честите клинични прояви на COVID-19 включват умора, треска и долни респираторни симптоми, като сухо кашляне и диспнея. Загубата на обоняние и вкус също може да се случи. В най-критичните случаи инфекцията прогресира до тежка пневмония с животозастрашаващи усложнения като остро респираторно заболяване, органична дисфункция и смърт. Според настоящите познания значителна част от инфекциите са леки или асимптоматични. Процентът на населението, което е по-уязвимо за тежката форма на болестта, включва по-възрастните (на 60 и повече години), пушачите и хора с хронични заболявания като сърдечно или белодробно заболяване, рак, диабет и пациенти със ослабена имунна система. В момента не съществува конкретно лечение или ваксина срещу инфекцията с SARS-CoV-2.

2. Предназначение

NZYtech SARS-CoV-2 един стъпка RT-PCR кит, с целеви гени RdRp и N, IVD е молекулярен тест, предназначен за бързото качествено откриване на нуклеиновите киселини на Тежък остро респираторен синдромен коронавирус 2 (SARS-CoV-2) в проби от назофарингеални или орофарингеални отливки, взети от пациенти. Положителният резултат указва наличието на РНК на SARS-CoV-2, но е необходимо клинично съпоставяне с анамнезата на пациента и друга диагностична информация, за да се определи статусът на инфекцията на пациента. Отрицателните резултати не изключват инфекция с SARS-CoV-2 и не трябва да се използват като единствено основание за вземане на решения за управление на пациента. Този кит е предназначен за употреба от персонал, обучен в лабораторията, специално инструктиран по техниките на реалното време на PCR и ин витро диагностика.

3. Принципи на анализа

NZYtech SARS-CoV-2 един стъпка RT-PCR кит, с целеви гени RdRp и N, IVD осигурява пълния комплект от реагенти и проби за качествено откриване на генома на SARS-CoV-2, чрез обичайни платформи за реално време PCR (вижте изискванията за инструментите в раздел 6). РНК зависимата от РНК полимераза (RdRp) на вируса и гените за нуклеокапсидна фосфопротейн (N) предварително са били идентифицирани като високоспецифични маркери за SARS-CoV-2. Този кит на NZYtech цели специфични региони в гените RdRp и N на генома на SARS-CoV-2, за да осигури най-голямата чувствителност на откриване. Примерите и пробите на кита SARS-CoV-2 имат 100% хомология с >95% от >5M геномни последователности, налични в базата данни GISAID, към ноември 2021 г., включително пълна идентичност с делта (B.1.617.2) и омикрон (B.1.1.529) вариантите. Освен това, примерите и пробите, насочени към SARS-CoV-2, не показват значителна хомология с неродните геноми, което прави този тест високоспецифичен, тъй като няма кръстосана реактивност с нуклеиновите киселини от други респираторни вирусни и бактериални организми. Включен е вътрешен контрол, за да се потвърди ефективното изолиране на РНК от хуманни биологични проби, както и отсъствието на инхибитори на PCR, сред другото. Освен това, тестът използва външни контроли (положителен контрол с ниска титрова стойност, предоставен с кита и отрицателен контрол), както е описано по-долу. Положителният контрол се състои от фрагменти на нуклеиновите киселини, съдържащи трите целеви последователности, открити от кита (гените на SARS-CoV-2, RdRp и N и гена за човешкия RP). Естествената еволюция на SARS-CoV-2 подразбира, че след първоначалното проектиране на този кит ще стане налична нова информация за последователността, която отразява стратегиите за адаптация на SARS-CoV-2. Затова, NZYtech периодично преразглежда геномните цели на SARS-CoV-2 и, ако е необходимо, ще пусне нови версии на този кит.

Качественото откриване на РНК се базира на технологията на реалното време RT-PCR на една стъпка, тъй като това остава най-чувствителният метод за извършване на точно откриване на SARS-CoV-2. Чрез използването на NZYtech SARS-CoV-2 един стъпка RT-PCR кит, с целеви гени RdRp и N, РНК, изолиран и очистен с изолационна система (IVD), се ретротранскрибира (RT) към cDNA и след това се усилва с PCR, в една реакция, използвайки три високоспецифични комплекти за примери/проби, експлоатиращи така наречения принцип на TaqMan®. Алтернативно, пробите, събирани в специфична среда за транспорт (вижте събирането и подготовката на пробите в раздел 7.), могат да бъдат директно използвани в реакцията на RT-PCR след топлотна обработка. При наличието на вирусна РНК, пробите на Taqman® специфично анелират към две консервирани региона от генома на SARS-CoV-2, а именно RdRp (в рамките на гена за полипротеин Orf1ab) и N гени, които са заобиколени от двойни чифтове примери също високоспецифични. Третият комплект от примери/проби действа като ендегенен вътрешен контрол, за да се открият нуклеиновите киселини на човешката рибонуклеаза Р [ген за рибонуклеаза Р (RP)], оценявайки качеството на пробата. Освен това, този вътрешен контрол демонстрира, че не е възникнало никакво инхибиране на реакцията от инхибиторите на PCR, които потенциално се срещат в клиничните/околните проби. За да се позволи идентифицирането на усилването на трите специфични цели в една реакция, пробите на SARS-CoV-2 и човешката рибонуклеаза Р се маркират по различен начин, с репортерни бои FAM™ и JOE™, съответно. Обърнете внимание, че този панел съдържа дуплексен анализ в същия оптичен канал FAM, за да се докладва за адитивното представяне на двата PCR анализа за откриване на SARS-CoV-2. Освен това, те се предоставят в оптимизирани концентрации, за да се осигури усилването на хуманната мРНК, дори когато тя е присъствала в много високи концентрации, което не ограничава ефективността на примерите/пробите на SARS-CoV-2.

4. Състав на кита

Китът SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR, с целеви гени RdRp и N, IVD на NZYtech предоставя обширен комплект от реагенти, достатъчен за извършване на 96 RT-PCR реакции в една стъпка.

СЪСТАВ НА КИТА		ОБЕМ (НА ФЛАКОН)	БРОЙ НА ТЮБИТЕ	
			MD04831	MD04832
SARS-CoV-2 MMix (RdRp & N)	NZYSupreme Един стъпка RT-qPCR Master Mix	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix (RdRp & N)	SARS-CoV-2 (гените RdRp & N)/RP пример/пробен микс	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 Pos (RdRp & N)	SARS-CoV-2 (гените RdRp & N)/RP положителен контрол	105 µL	1	4
NTC	Контрол без шаблон	105 µL	1	4

5. Условия за съхранение, стабилност и обработка

Китът за едностъпкова RT-PCR детекция на SARS-CoV-2, с целеви гени RdRp и N, IVD се изпраща рефрижериран. Всички компоненти трябва незабавно да бъдат съхранявани при температура от -85 °C до -15 °C след пристигането. При употреба компонентите на кита трябва бързо да се връщат във фризера след употребата, за да се намали времето на стайна температура. Освен това:

- Минимизирайте броя на циклите замразяване-размразяване, като съхранявате в работни аликвоти. При необходимост компонентите на кита могат да бъдат разделени на по-малки обеми след размразяване.
- Примесете пробните/пробни миксове (RdRp & N гените)/RP и съхранявайте защитени от светлина. В частност, не излагайте NZYSupreme Един стъпка RT-qPCR Master Mix на директна слънчева светлина след смесване с примесите/пробите.
- Ако опаковката, която защитава кита, пристигне повредена, моля, свържете се с NZYtech.
- Обърнете внимание на датата на изтичане, посочена на опаковката. NZYtech не препоръчва използването на кита след изтичането на срока на годност. На тази дата китът трябва да бъде унищожен, следвайки инструкциите за изхвърляне в **Раздел 8.2**.

6. Материали и оборудване, необходими, но не предоставени

- Реално време PCR инструмент, който открива флуоресцентните бои FAM™ и JOE™ (на дължини на емисия на 520 и 555 nm съответно). Вижте в Раздел 11. моделите на инструментите, за които китът е валидиран.
- Оборудване и консумативи за изолиране на вирусна РНК от респираторни специмени.
- RNase/DNase свободна qPCR пластмасова посуда: PCR тюбчета, ленти, капачета, 96-портови плочи, адхезивни фолия.
- Пипети и филтърни накрайници (RNase/DNase свободни).
- Еднократни ръкавици.
- Вортекс и центрифуга.
- DEPC третирана вода (моля, свържете се с NZYtech, за да поръчате този специфичен продукт, справка MB43701).

7. Събиране и подготовка на проби

Различни фактори, като протокол за събиране на проби от хуманни респираторни специмени (назофарингеални или орофарингеални тампони), транспортиране на пробите, съхранение и време за обработка, са от съществено значение за постигане на оптимални резултати. Събраните проби трябва да бъдат тествани възможно най-скоро. Пробите, които не се тестват в рамките на 24 часа, трябва да бъдат съхранявани при температура от -85°C до -15°C. Освен това пробите трябва да бъдат транспортирани и съхранявани при ниски температури в съответствие с биосигурностните разпоредби.

- **Биологичните проби, подложени на екстракция на нуклеинови киселини:** РНК или общи нуклеинови киселини, екстрахираны по IVD протокол, са началният материал за NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp и N целевите гени, IVD. Моля, уверете се, че РНК пробите са подходящи по отношение на чистота, концентрация и цялост на нуклеиновите киселини. A260/280 съотношението от ~2 е обикновено прието за чиста РНК. Тъй като етанолът е силен инхибитор на реалното време PCR, е необходимо да се елиминира напълно преди елюирането на нуклеиновите киселини по време на екстракцията. NZYtech китът интегрира вътрешен контрол на екстракцията на РНК, който цели хуманна РНК, която е съекстрактирана с вирусната РНК. Хуманната РНК се усилва с примерите/пробите на RNase P (RP). Това е полезно за проверка на ефективността на изолацията на РНК и/или наличието на инхибитори по време на обработката на пробите.
- **Биологичните проби, използвани директно в протокола за RT-PCR:** назофарингеалните специмени трябва да бъдат събирани с помощта на тампони на Greiner Bio-One (справка CM-FS913) и поставени директно в тръби за стабилизация на вируса, VACUETTE® на Greiner Bio-One (справка 456161). Пипетирайте аликвоти от 50 µL от всяка проба и прехвърлете в 96-портови PCR плочи, които трябва да бъдат запечатани и незабавно подложени на стъпка за топло обработване при 95°C, за 5 минути, използвайки термоцикълер с нагривач капак. По алтернативен начин, пипетирайте аликвоти от 200 µL и ги инактивирайте в 1,5 mL eppendorf тръби, използвайки топлоблок.

8. Предпазни мерки и предупреждения

Както при всяка аналитична процедура за тестване, добрите лабораторни практики са от съществено значение. Внимателно следвайте процедурите и насоките, предоставени в това ръководство, за да се осигури правилното изпълнение на теста. Всяко отклонение от тях може да доведе до неуспех на анализа или да причини грешни резултати. Поради високата чувствителност на кита, е необходимо да се вземат специални мерки, за да се запазят реагентите и сместовите за PCR усилване без замърсяване.

Протоколът за директен RT-PCR е ексклузивно валидиран за назофарингеални проби, транспортирани и съхранявани в тръби за стабилизация на вируса, VACUETTE® на Greiner Bio-One (справка 456161). Така че, протоколът за директен RT-PCR на кита SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp и N целевите гени, IVD, не е бил валидиран в проби, транспортирани и съхранявани в медии за събиране от тип "VTM/UTM", които включват гуанидин тиоцианат като инактивиращ агент. Поради това препоръчваме да използвате само посочените по-горе средства за транспортиране и съхранение. Използването на други средства може да доведе до лъжливо отрицателни резултати. За различни средства за събиране, китът трябва да бъде валидиран от потребителя, използвайки предварително характеризирани проби (положителни и отрицателни).

8.1. Информация за безопасността

Преди да използвате комплекта, моля консултирайте Листа с данни за безопасност (SDS), който е достъпен на уебсайта на NZYtech (www.nzytech.com). Откриването на вируса SARS-CoV-2 следва да се извършва само от персонал, обучен в съответните технически и безопасностни процедури в подходящо оборудвани лаборатории. Всички международни и национални насоки за биозащита в лабораторията следва да се спазват във всички обстоятелства.

8.2. Изисквания за обработка и процедурите

- Само за професионално ин витро диагностично използване.
- Не използвайте този комплект след изтичането на срока на годност.
- Не използвайте компонентите на теста, ако уплътнението на комплекта е повредено.
- Не разменяйте реагентите от различни серии на производство.
- Не трябва да се използват реагенти на други производители заедно с реагентите на този тестов комплект.
- За всички процедури следва да се използват еднократно употребими пластмасови съдове и пипети, без присъствие на DNase/RNase.
- През целия протокол следва да се използват еднократно употребими филтърни накрайници без DNase/RNase, за да се предотврати замърсяване с аерозоли и течности.
- Подготовката на пробите, настройката на реакцията и усилването следва да се извършват в различни работни зони.
- Позитивният контрол съдържа голям брой копия на шаблоните; трябва да бъде отворен и обработван далече от пробите за тест и компонентите на комплекта, за да се избегне кръстосано замърсяване.
- Винаги използвайте NTC, предоставен с комплекта.
- Ако използвате директния протокол, се препоръчва извършването на втори отрицателен контрол, използвайки вода, обработена с DEPC (NZYtech, справка MB43701), която ще бъде добавена към пробите, които ще бъдат тествани с директен RT-PCR.
- В края на всяко тестване почиствайте работните повърхности и оборудването с препарат за премахване на ДНК/РНК.
- Разглеждайте пост-усилвателните плочи внимателно и ги изхвърляйте веднага след като завършите тестването; плочите винаги следва да се изхвърлят в подходящ контейнер за биологични отпадъци след употреба.
- Биологичните проби трябва да се обработват като заразни, като се спазват подходящите мерки за биозащита.
- Остатъците от химикали и препарати обикновено се считат за опасни отпадъци. Обезпечаването на изхвърлянето на този тип отпадъци се регулира чрез национални и регионални закони и разпоредби.
- Всички резултати следва.

9. Процедура за тестване

Моля, прочетете внимателно инструкциите за употреба преди да извършите анализа. Обърнете внимание, че всички стъпки за преливане и настройка на експерименталната плоча трябва да се извършват на лед. След като плочата е налята, започнете незабавно с протокола за едностъпкова RT-PCR. Продължителното инкубиране на реакционните смеси при стайна температура може да доведе до ПЦР артефакти, които намаляват чувствителността на откриване. Преди експеримента започнете да размазвате внимателно предоставените кювети за реакция, центрифугирайте за 5 секунди, за да съберете съдържанието в дъното на кюветата и поставете кюветите на лед. **Силно препоръчваме преливането на Позитивния контрол на SARS-CoV-2 (RdRp & N гени)/RP последно, за да се избегнат кръстосани замърсявания.**

9.1. Настройка на реакцията

1. Подгответе смес за RT-PCR достатъчна за броя тестове на SARS-CoV-2/RNase P, които ще се извършат, с допълнителен обем от 5% за загуби при преливане. Продължете съгласно таблицата по-долу, която определя обемите за 1 и n тестове (където n съответства на общия брой реакции):

КОМПОНЕНТ	1 ТЕСТ ОБЕМ μL	n ТЕСТОВЕ (*) ОБЕМ + 5% (μL)
SARS-CoV-2 MMix	10	$n \times 10.5$
SARS-CoV-2 PPMix	2	$n \times 2.1$
КРАЕН ОБЕМ	12	$n \times 12.6$

(*) За да изчислите общия брой реакции, необходими за всеки анализ, пребройте броя на пробите и добавете още две за Негативния и Позитивния контрол, съответно.

2. Прелийте 12 μL от сместа за RT-PCR в отделни кювети в зависимост от настройката на експерименталната ви плоча за реално време PCR.

3. За негативния контрол добавете 8 μL от NTC вместо РНК шаблон в кювета за негативен контрол. Крайният обем трябва да е 20 μL . Когато използвате директния RT-PCR протокол, следва да бъде включен и втори негативен контрол, като се добавят 8 μL DEPC третирана вода (NZYtech, референция MB43701) вместо директни неизолирани биологични проби.

4. а. За изолирани биологични проби добавете по 8 µL от всяка РНК проба в кюветите за SARS-CoV-2/RNase P, съгласно настройката на експерименталната ви плоча. Крайният обем във всяка кювета трябва да е 20 µL.

б. За неизолирани биологични проби след стъпката за топло третиране при 95°C за 5 минути, добавете по 4 µL от всяка проба в крайната qPCR плоча. Към всяка проба добавете 4 µL DEPC третирана вода (NZYtech, референция MB43701). Крайният обем във всяка кювета трябва да е 20 µL. Не добавяйте повече от 4 µL проба.

5. За позитивния контрол добавете 8 µL SARS-CoV-2 Pos (RdRp & N) вместо РНК шаблон в кювета за позитивен контрол. Крайният обем трябва да е 20 µL.

6. Покрийте и затворете плочата с подходящо оптично лепило, преди да продължите с протокола за RT-PCR и стъпките за откриване.

7. Поставете реакционната плоча в реалния PCR инструмент и стартирайте протокола за RT-PCR според раздела по-долу.

9.2. Програмиране на реалния PCR инструмент

Таблицата по-долу показва стандартен протокол, оптимизиран за няколко платформи. Въпреки това, тези условия могат да бъдат адаптирани и валидирани, за да отговарят на различни протоколи, специфични за конкретни машини.

Препоръчителни Настройки за RT-PCR Протокола

ЦИКЛИ	ТЕМПЕРАТУРА	ВРЕМЕ	ЕТАП
1	50 °C	20 мин	Обратна транскрипция
1	95 °C	2 мин	Активация на полимеразата
40	95 °C	5 сек	Денатурация
	60 °C	30 сек	Сплитане/Удължаване (*)

(*) В зависимост от използвания оборудване изберете подходящия канал за откриване.

Флуоресцентни Бои и Канали за Откриване

ЦЕЛИ	ФЛУОРЕСЦЕНТЕН ОЦВЕТИТЕЛ	КАНАЛИ ЗА ДЕТЕКЦИЯ
SARS-CoV-2	FAM™	FAM
RNase P	JOE™	JOE, VIC или HEX

NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp и N гени, IVD бе валидиран за следните системи за реално време PCR: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® StepOnePlus, Roche Life Science LightCycler® 480 II, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q и Bio-Rad® CFX96™. Ако се използва друго оборудване, комплектът трябва да бъде валидиран от потребителя чрез използване на предварително характеризирани проби (както положителни, така и отрицателни).

10. Анализ на данните

10.1. Критерии за валидиране на изпълнението

Откриването на SARS-CoV-2 РНК се извършва чрез откриване на две геномни области, които се детектират в същия канал за флуоресценция (FAM). Анализът на данните се извършва от софтуера на инструмента. С оглед на разликите в работата на различните реални времеви ПЦР инструменти, праговете за двата сигнала за флуоресценция (FAM и JOE) се определят автоматично от софтуера, с ръчни корекции в случай на необходимост. Преди да се анализират резултатите от пробите, препоръчваме да се потвърди валидността на реалното време ПЦР теста. За всяка плоча, моля, потвърдете дали резултатите за Позитивния и Негативния контрол са в очакваните граници, съгласно следните критерии:

Позитивен контрол: кривите на усилване на FAM (SARS-CoV-2, RdRp & N гени) и JOE (RP) са положителни. Очаква се позитивният контрол да се усилва при $C_t < 30$, както в канала FAM, така и в канала JOE. Неспазването на този критерий за контрол на качеството е ясен индикатор, че експериментът е компрометиран.

Негативен контрол (реакция без шаблон): не се открива усилване. Ако негативният контрол има една или две криви на усилване (в каналите FAM и/или JOE) със сигмоидна форма, може да се е стигнало до замърсяване на пробата. Препоръчва се извършване на редовна дезинфекция на работните площи в лабораторията, материалите и оборудването. Повторете теста, следвайки добрите практики при ПЦР, започвайки от запечатан пакет.

Ако контролите са съгласувани с очакваните, тестът е валиден. Моля, продължете с интерпретацията на резултатите за тестваните проби.

Ако някой от контролите не проявява очакваната производителност, тестът е компрометиран или е изпълнен неправилно и трябва да се счита за невалиден.

Моля, повторете теста.

Ако проблемът продължава, свържете се с производителя.

10.2. Интерпретация на резултатите от теста

SARS-CoV-2 се открива, ако кривата на усилване на FAM показва сигмоидна форма с $Ct \leq 35$, независимо от получения резултат за RP (JOE™) теста.

SARS-CoV-2 не се открива, ако кривата на FAM не е положителна ($Ct > 35$), докато RP (JOE) показва положителна сигмоидна крива ($Ct < 40$).

Тестът е невалиден, ако тестовете за SARS-CoV-2 и RP са отрицателни. Тестът трябва да бъде повторен с нуклеиновата киселина, репурифицирана от пробата.

Следната таблица обобщава интерпретацията на основните резултати (оценете общата форма на кривите на усилване; само сигмоидните криви на усилване са показателни за истинско усилване).

РЕЗУЛТАТ ЗА SARS-COV-2 SARS-CoV-2, CT (FAM™)	РЕЗУЛТАТ ЗА RP RP, CT (JOE™)	ИТЕРПРЕТАЦИЯ НА РЕЗУЛТАТИТЕ
+ ($Ct \leq 35$)	+ ($Ct < 40$)	SARS-CoV-2 открито → ПОЛОЖИТЕЛН
+ ($Ct \leq 35$)	- ($Ct > 40$)	SARS-CoV-2 открито → ПОЛОЖИТЕЛН
- ($Ct > 35$)	+ ($Ct < 40$)	SARS-CoV-2 не е открит → ОТРИЦАТЕЛЕН
- ($Ct > 35$)	- ($Ct > 40$)	Невалиден тест, повторно извличане и повторен тест

Забележка 1: NZYtech препоръчва повторното извършване на анализа за всички проби, които показват двусмислени или атипични криви, които не позволяват ясна интерпретация.

Забележка 2: Интерпретацията на резултатите трябва да вземе предвид възможността за фалшиви отрицателни и фалшиви положителни резултати.

- Въпреки че риска от фалшиви отрицателни резултати е намален поради двойния дизайн на теста, такива резултати могат да бъдат причинени от:
 - Неподходящо вземане, обработка и/или съхранение на пробите.
 - Проба извън виремичната фаза.
 - Неспазване на процедурите в настоящия ръководство.
 - Използване на неупълномоощен комплект за екстракция или платформа за реално време на PCR.
- Фалшиви положителни резултати могат да бъдат причинени от:
 - Неподходяща обработка на проби, съдържащи висока концентрация на вирусната РНК на SARS-CoV-2.
 - Неподходяща обработка на положителния контрол SARS-CoV-2 Pos (RdRp & N).
 - Неподходяща обработка на усиления продукт (после-усилени плочи).

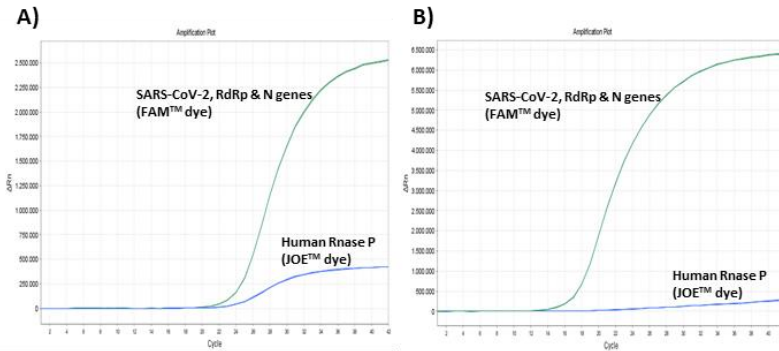
Отрицателните резултати не изключват заразяването с SARS-CoV-2 и не следва да се използват като единствена основа за лечение или други решения за управление на пациента. Освен това, този тест не може да изключи заболявания, причинени от други бактериални или вирусни патогени.

11. Оценка на Производителността

Оценката на производителността на NZYtech SARS-CoV-2 едностъпковия RT-PCR комплект, RdRp и N целевите гени, IVD, беше извършена на системите за реално време на PCR Applied Biosystems® 7500 FAST, Roche Life Science LightCycler 480 II, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q и Bio-Rad® CFX96™, с допълнителни тестове на системата за реално време на PCR Applied Biosystems® StepOnePlus. Ако се използва друго оборудване, комплектът трябва да бъде валидиран от потребителя чрез използване на предварително характеризирани проби (както позитивни, така и отрицателни).

11.1. Очаквани Резултати

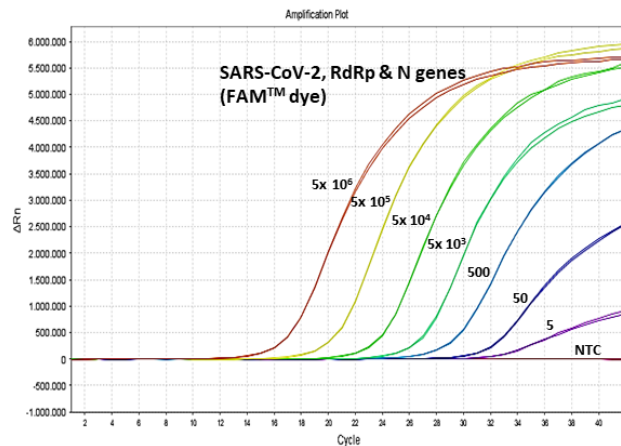
Типичните графики за усилване, наблюдавани за клинични проби, съдържащи нуклеинови киселини на SARS-CoV-2, се представят на Фигура 1. Двете случая представляват примери за клинични проби, представящи средно (А) и високо (В) натоварване с SARS-CoV-2. В случаите на много високи натоварвания с SARS-CoV-2 (вижте Фигура 1В), кривата на канала JOE, съответстваща на човешкия ген за RNase P, може да липсва или да показва атипична форма.



Фигура 1. Едновременно откриване на SARS-CoV-2 (гените RdRp и N) и човешки цели за RNase-P от положителни клинични проби със средно (A) и високо (B) натоварване с SARS-CoV-2. Зелените криви (A и B): откриване на вирусните РНК цели на SARS-CoV-2 (гените RdRp и N) чрез канала FAM; Сините криви (A и B): откриване на човешкия ген за RNase P чрез канала JOE.

11.2. Граница на откриване (LoD) - Аналитична чувствителност

Аналитичната чувствителност е дефинирана като най-ниската концентрация на анализа, която може да бъде надеждно открита с 95% увереност. Това беше оценено чрез тестване на нуклеинови киселини на SARS-CoV-2 на различни копия, индивидуално или добавени към РНК, изолирана от отрицателни орофарингеални проби, използвайки 3 различни серии на комплекта, следвайки типични условия за тестване на реакцията. Тестовите бяха повтаряни през 4 дни, като бяха произведени 48 реплики за всяка тествана концентрация на SARS-CoV-2. Обобщените данни показаха, че NZYtech SARS-CoV-2 едностъпковият RT-PCR комплект, RdRp и N целевите гени, IVD открива 0.15 копия/μL вирусна РНК на SARS-CoV-2 с увереност ≥95%. Така че, предварително беше определена Границата на откриване (LoD) като 0.15 копия/μL или 150 копия/mL. Предварително определената LoD беше потвърдена от двама различни оператори, използвайки три серии на комплекта в експеримент с общо 48 реплики на негативна матрица от орофарингеални мазнини, които бяха независимо замърсени. Капацитетът на NZYtech SARS-CoV-2 едностъпковия RT-PCR комплект, RdRp и N целевите гени, IVD да открива вируса при различни натоварвания (от 5 x 10⁶ до 5 копия на реакция) е представен на Фигура 2.



Фигура 2. Чувствителност на SARS-CoV-2 едностъпковия RT-PCR комплект, с целеви гени RdRp и N, IVD. График на усилване (цикъл номер срещу флуоресценция - ΔRFn) на 1:10 последователни разреждания на SARS-CoV-2 вирусна РНК, от 5 x 10⁶ копия до 5 копия на реакция чрез канала FAM. NTC, контрол без шаблон (отрицателен контрол).

За пробите, които не са били подложени на протокол за извличане на нуклеинови киселини и които се възстановяват във съдържателя се в събирането среда, спомената по-горе, аналитичната чувствителност първоначално беше оценена чрез сравняване на Ct стойностите на клиничните проби, подложени и не подложени на процеса на извличане. Така, бяха избрани 50 клинични проби, предварително класифицирани като положителни. Анализът на RT-PCR теста сравни резултатите за откриване на SARS-CoV-2, получени за извлечените проби от РНК и за съответните проби, които не са били извлечени. За 50-те положителни клинични проби, тествани (подложени на извличане плюс RT-PCR или с протокола за директно RT-PCR), най-малката Ct стойност, наблюдавана, беше 16.1, а максималната Ct стойност беше 34.9. Резултатите показаха, че за откриване на SARS-CoV-2, средната разлика в Ct между двата процеса беше 0.1. Този резултат предполага, че Границата на откриване (LoD) не се променя, независимо от това дали пробата е подложена или не на преходен стъпков процес на извличане на РНК. Така, Границата на откриване на комплекта беше повторно оценена и потвърдена от двама различни оператори, за общо 48 реплики. Резултатите потвърдиха, че при използване на директния формат на теста, комплектът открива 0.15 копия/μL вирусна РНК на SARS-CoV-2 с увереност ≥95%.

11.3. Инклузивност, кръстосана реактивност и смущаващи вещества

Инклузивността и кръстосаната реактивност бяха оценени чрез ин силико анализ на олигонуклеотидни зонди и праймери срещу патогени, свързани с SARS-CoV-2, и нормални патогени, които предизвикват инфекции със сходни симптоми, съответно. При ин силико анализа се установи, че дизайнът на анализа може да открие всички штамове на вируса SARS-CoV-2 и не показва реактивност с не-SARS-CoV-2 видове.

Ин витро анализ за кръстосана реактивност (ексклузивност) беше извършен, за да се потвърди, че NZYtech SARS-CoV-2 едностъпковият RT-PCR комплект, с целеви гени RdRp и N, IVD (MD0483) не реагира с други човешки флора организми и патогенни организми, които е вероятно да бъдат срещнати в клиничната проба. Тази студия беше извършена чрез използване на три комерсиални панели с респираторни патогени, доставени от ZeptoMetrix Multimarker Controls (#MDZ001), NATrol™ Respiratory Pathogen Panel-1 (#NATRPP-1) и

NATrol™ RP Controls (#NATRPC-NNS). Тези панели, които включват избрани проби, са представителни за истинските клинични човешки проби, включително грип А H3N2 (Brisbane/10/07), грип А H1N1 (NY02/2009), риновирус тип 1А, аденовирус тип 3; параинфлуенца тип 1, параинфлуенца тип 2, параинфлуенца тип 3, параинфлуенца тип 4, метапневмовирус (Перу 6-2003), Chlamydomphila pneumoniae (CWL-029), Mycoplasma pneumoniae (M-129), Coxsackievirus (тип А1), грип А H1N1 (A/New Cal/20/99), грип А H1N1 (A/Singapore/63/04), грип В (В/Florida/02/06), респираторен синцитиален вирус А, респираторен синцитиален вирус В (CH93 (18)-18), коронавирус (HKU-1 рекомбинант), коронавирус (OC43), коронавирус (NL63), коронавирус (229E), Bordetella. pertussis (A639), Bordetella pertussis (A747), Bordetella holmesii (F061), Legionella pneumophila (Philadelphia) и Human Bocavirus. Допълнително бяха тествани и други обичайни устни и дихателни микроби, включително Bacteroides ovatus, Bacteroides thetaiotaomicron, Burkholderia vietnamiensis, Dickeya dadantii, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium mageritense, Mycobacterium smegmatis, Nocardia nova, Pseudomonas mendocina, Streptococcus mutans, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Streptomyces avermitilis, Streptomyces albidoflavus. Нито един от тестваните организми не се интерферира със изпълнението на NZYtech SARS-CoV-2 едностъпковия RT-PCR комплект, с целеви гени RdRp и N, IVD чрез генериране на фалшив положителен резултат или неспецифичен сигнал.

Въздействието на 17 потенциални смущаващи вещества беше оценено в тестове, състоящи се от отрицателни назофарингеални проби, смесени с положителни проби за SARS-CoV-2 на ~3x LoD. Потенциалните смущаващи вещества бяха добавени към фалшифицираните проби на концентрации, представляващи най-високите нива, очаквани в човешки респираторни проби, базирани на данни от литературата. Всички тестове бяха извършени петкратно, а резултатите бяха сравнени с данните, получени с контролен тест, който не съдържа смущаващи вещества. На концентрациите, тествани в резултатите, се показва, че нито една от молекулите под тест не засяга чувствителността на откриването. Данните, събрани под тези експерименти, се обобщават в таблицата по-долу. Всички експерименти бяха изпълнени на Инструмента за реално време PCR Applied Biosystems® 7500 FAST.

ПОТЕНЦИАЛНО СМУЩАВАЩО ВЕЩЕСТВО	АКТИВНО ВЕЩЕСТВО	КОНЦЕНТРАЦИЯ В ПРОБАТА	СМУЩЕНИЕ ДА (Д) НЕ (Н)
Изотонична морска вода (Rhinomer)	NaCl	15% об./об.	Н
Спрей за гърло, устни аналгетик и аналгетик (Streptfen)	Флурбипрофен	5% об./об.	Н
Разтвор за измиване на носа (Алергийна спрей - Vibrocil)	Флутиказон пропионат	5% об./об.	Н
Спрей за назален кортикостероид (Nasomet)	Мометазон фураат	5% об./об.	Н
Спрей за назален кортикостероид (Pulmicort)	Будесонид	5% об./об.	Н
Антимикробен, системен (Trobex)	Тробамицин	10 µg/мл	Н
Аналгетик за уста, противовъзпалителен и антисептичен (Pyralvex)	Екстракт от ревен, Салицилова киселина	5% об./об.	Н
Антимикотичен и антибактериален орофарингеален препарат (Daktarin)	Миконазол	5 мг/мл	Н
Разтвор за устна хигиена (Eludril Gé)	Хлоргексидин глюконат, Хлоробутанол хемихидрат	5% об./об.	Н
Противокашлица, сироп (Codipront)	Кодеин, Фенилтолоксамин цитрат	5% об./об.	Н
Цяла кръв (човешка)	-	4% об./об.	Н
Противовирусен лекарствен препарат (Тамифлу)	Озелтамивир	7.5 мг/мл	Н
Муколитичен (Mucosolvan)	Амброксол хидрохлорид	5% об./об.	Н
Разтвор за назални капки (Nasorox)	Оксиметазолин Хлорид	10% об./об.	Н
Антибиотик, назална маз (Vactroban)	Мупироцин	5 мг/мл	Н
Слюнка (човешка)	-	25% об./об.	Н
Абсолютен етанол	Алкохол	5% об./об.	Н

11.4. Прецизност

Прецизността на анализа за NZYtech SARS-CoV-2 един стъпка RT-PCR Комплект, RdRp и N целеви гени, IVD бе определена чрез повторно тестване на нуклеиновите киселини на SARS-CoV-2, представящи два нива на вирусно натоварване, 5 (1.67 пъти ЛПД) и 150 (50 пъти ЛПД) копия на реакция (0.25 и 7.50 копия/µL), индивидуално или при добавяне в екстрахирана от отрицателни орофарингеални проби РНК, използвайки 3 различни партии комплекти и следвайки типични условия за тестване. Прецизността беше оценена чрез измерване на средната Cq стойност, коефициента на вариация на Cq и % откриване на репликатите, както е описано по-долу за всеки случай. Данните са обобщени в таблицата, показана на следващата страница.

11.4.1. Повторяемост

Повторяемостта беше оценена от един оператор чрез анализ на 36 реплики на всяка проба (5 и 150 копия на реакция), като се вземе предвид крайният брой от 72 изпълнени теста.

11.4.2. Дневна репродуцируемост

Дневната репродуцируемост беше оценена от един оператор чрез анализ на 72 реплики на всяка проба (5 и 150 копия на реакция), в продължение на 4 дни с 18 реплики от всяка концентрация на ден (общо изпълнени 144 теста).

11.4.3. Репродуцируемост между партии

Репродуцируемостта между партидите беше оценена от един оператор чрез анализ на 144 реплики на всяка проба (5 и 150 копия на реакция), използвайки 3 различни партии на комплекти с по 48 реплики на партида.

11.4.4. Репродуцируемост между оператори

Репродуцируемостта между операторите беше оценена чрез тестване на 72 реплики на всяка проба (5 и 150 копия на реакция) от четири различни оператора, с по 36 реплики на оператор.

11.4.5. Междуинструментална репродукцируемост

Междуинструменталната репродукцируемост беше измерена от един оператор чрез тестване на 36 реплики на всяка проба (5 и 150 копия на реакция) в два различни qPCR инструмента (Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® StepOnePlus), общо 72 теста на проба.

Прецизност на NZYtech SARS-CoV-2 един стъпка RT-PCR Комплект, RdRp и N целеви гени, IVD

ПРОМЕНЛИВА ТЕСТИРАНО		SARS-CoV-2 (Копия/Реакция)	
		5	150
ПОВТОВЯЕМОСТ	n	36	36
	Средно Cq	31.72	26.30
	Коефициент на вариация (%)	1.94	1.60
	% Реплициране Детекция	100	100
ДНЕВНА РЕПРОДУЦИРУЕМОСТ	n	72	72
	Средно Cq	31.42	26.13
	Коефициент на вариация (%)	1.50	1.55
	% Реплициране Детекция	100	100
ПАРТИЯ ДО ПАРТИЯ РЕПРОДУЦИРУЕМОСТ	n	144	144
	Средно Cq	31.49	26.24
	Коефициент на вариация (%)	1.61	1.46
	% Реплициране Детекция	100	100
ОПЕРАТОРСКА РЕПРОДУЦИРУЕМОСТ	n	72	72
	Средно Cq	31.45	26.21
	Коефициент на вариация (%)	1.41	1.61
	% Реплициране Детекция	100	100
МЕЖДУНАРОДНА РЕПРОДУЦИРУЕМОСТ НА ИНСТРУМЕНТА	n	72	72
	Средно Cq	31.81	26.46
	Коефициент на вариация (%)	1.61	1.35
	% Реплициране Детекция	100	100

11.5. Клинична оценка

Производителността на NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp и N целеви гени, IVD, със събрани проби от назофарингеални тампони беше оценена от три външни лаборатории. В общо, са тествани 340 клинични негативни и 386 клинични позитивни проби. Данните показват, че е постигнато 100% съгласие за всички тествани позитивни и отрицателни проби. Оценката на производителността на SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp и N целеви гени, IVD, също беше извършена с проби от назофарингеални тампони, които не са подлагани на предварителен протокол за екстракция на нуклеинови киселини. Общо са тествани 104 отрицателни клинични проби и 51 позитивни клинични проби. Резултатите показват 100% съгласие за анализиранияте позитивни и отрицателни проби.

12. Контрол на качеството

Всички компоненти на NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp и N целеви гени, IVD се тестват, следвайки описаните протоколи. Триплексната система за реално време PCR позволява откриването на целите, описани за идентификация на SARS-CoV-2 вирусна РНК (RdRp и N гени) и човешка мРНК (ген за RNase P, RP). Положителните амплификации се наблюдават за целевите гени, положителния контрол и вътрешните контроли чрез канали FAM и JOE/VIC/HEX, в съответствие със съответните олигонуклеотиди/проби.









13. Техническа поддръжка

За техническа поддръжка, моля, свържете се с нашия отделен екип за техническа поддръжка на телефон: +351 (0) 21 364 35 14 или на имейл: info@nzytech.com.

14. Търговски марки и Откази

Всички търговски марки, появяващи се в този ръководство, са собственост на съответните им собственици.

15. Обяснение на символите

	<i>In vitro</i> диагностично медицинско устройство		Консултирайте инструкциите за употреба
	Каталожен номер		Производител
	Партиен код		Използвайте до
	Ограничение на температурата		Достатъчно за
	Положителен контрол		Да се пази от слънчева светлина (смес праймер/проба)
	Отрицателен контрол		

16. Декларация за съответствие

Име на продукта: SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD

Каталожен номер: MD04831/MD04832

Предназначение: Качествено откриване на SARS-CoV-2.

Класификация: Други (не обхванати от Приложение II или не предназначени за самотестове) съгласно Директива 98/79/ЕО на ЕС.

Производител: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Ние, NZYtech, Lda - Гени и Ензими, тук декларираме, че този продукт, към който се отнася настоящата декларация за съответствие, отговаря на следните стандарти и други нормативни документи ISO 9001:2015 и ISO 13485:2016, следвайки разпоредбите на Директива 98/79/ЕО и на Регламент (ЕС) 2017/746 относно ин витро диагностичните медицински устройства, както са приведени в националното законодателство на държавите-членки на Европейския съюз.

Техническият файл на продукта се поддържа в NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.



Joana Brás, PhD

Технически директор

17. Референции

WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. 13 march 2020. Available online at <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf>

WHO: Q&A: Influenza and COVID-19 - similarities and differences. 17 March 2020. Available online at <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-a-similarities-and-differences-covid-19-and-influenza>

Zhou, Peng; Yang, Xing-Lou; Wang, Xian-Guang; Hu, Ben; Zhang, Lei; Zhang, Wei et al. (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. In *Nature* 579 (7798), pp. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.

Chhikara, B. S., Rathi, B., Singh, J., Poonam. (2020). Corona virus SARS-CoV-2 disease COVID-19: Infection, prevention and clinical advances of the prospective chemical drug therapeutics. *Chem. Biol.* 7(1) 63-72.

Gorbalenya, Alexander E.; Baker, Susan C.; Baric, Ralph S.; Groot, Raoul J. de; Drosten, Christian; Gulyaeva, Anastasia A. et al. (2020): Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: The species and its viruses – a statement of the Coronavirus Study Group (14). *bioRxiv* 2020.02.07.937862; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>



Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.: +351.213643514 Fax: +351.217151168
www.nzytech.com