

COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD

Komplet za RT-qPCR multipleks testiranje na bolest COVID-19 i gripu A /B u jednom koraku, za *in vitro* dijagnostiku, IVD

REF MD04851, 96 reakcija

Samo za profesionalnu in vitro dijagnostiku



HR

Upute za uporabu

MD0485_IM_hr

VERZIJA 2401, siječnja 2024



Sadržaj

1. Uvod	3
2. Namjena	3
3. Načela ispitivanja	3
4. Sadržaj kompleta	3
5. Uvjeti čuvanja, održavanja stabilnosti i rukovanja	4
6. Potrebni materijali i instrumenti koji nisu dio kompleta	4
7. Uzimanje i priprema uzoraka	4
8. Mjere opreza i upozorenja	4
8.1 Sigurnosne informacije	4
8.2 Uvjeti rukovanja i postupka	4
9. Postupak testiranja	5
9.1 Određivanje reakcije	5
9.2 Programiranje PCR instrumenta u realnom vremenu	5
10. Analiza podataka	6
10.1 Provedba kriterija za odobravanje	6
10.2 Interpretacija rezultata testiranja	6
11. Ocjena uspješnosti	7
11.1 Očekivani rezultati	7
11.2 Ograničenje detekcije (LoD) - Analitička osjetljivost	7
11.3 Analitička reaktivnost (inkluzivnost) i analitička specifičnost	8
11.4 Preciznost	8
11.4.1 Ponovljivost	8
11.4.2 Dnevna reproducibilnost	8
11.4.3 Reproducibilnost „Lot-to-lot”	9
11.4.4 Reproducibilnost po voditelju	9
11.4.5 Reproducibilnost među instrumentima	10
11.5 Klinička evaluacija	10
12. Kontrola kvalitete	10
13. Tehnička podrška	10
14. Robne marke i izjave o odricanju od odgovornosti	10
15. Objašnjenje simbola	11
16. Izjava o sukladnosti	12
17. Literatura	13

1. Uvod

Aktualna pandemija koronavirusne bolesti 2019. (COVID-19), prvo identificirana u Kini i koja se jako brzo širi u većinu zemalja, uzrokovala je dosad neviđenu stopu morbiditeta i smrtnosti u cijelom svijetu, što je rezultiralo globalnom krizom zdravstvene skrbi i preopterećenošću zdravstvenih resursa. Njen uzročnik, koronavirus SARS-CoV-2 (engl. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2), nov je *Betacoronavirus* čija je patogenost slična onoj virusa SARS-CoV. Sezonska gripa, poznata kao sezonska gripa, zarazna je virusna infekcija dišnog sustava s visokom stopom morbiditeta, smrtnosti i opterećenja usluga zdravstvene skrbi. Međutim njeni su smrtni ishodi mnogo rjeđi nego kod bolesti COVID-19. Virusi influence tipa A i B dominantni su cirkulirajući virusi influence, a najviše epidemija influence povezuje se s virusom A. Koronavirusi i virusi influence uzročnici su vrlo zaraznih bolesti dišnog sustava koje se prenose kontaktom, kapljičnim putem (kašljanjem i kihanjem) i preko kontaminiranih površina. Bolest COVID-19 klinički se može pobrkati s upalom pluća uzrokovanom virusom influence čija dodatna infekcija ima vrlo lošu prognozu. Preklapanje sezone gripe s pandemijom bolesti COVID-19 komplicira kliničko postupanje s bolesnicima sa simptomima bolesti dišnog sustava. Rano otkrivanje virusa SARS-CoV-2 i virusa influence A /B ključno je za brzo davanje terapije oboljelima od bolesti dišnog sustava, čime se smanjuje širenje infekcija. Kombinirano testiranje na COVID-19 i influencu imaće prednosti jer se jedan uzorak može koristiti za razlikovanje dviju infekcija u bolesnika koji pokazuju slične simptome.

2. Namjena

NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD molekularni je test namijenjen brzom i kvalitetnom otkrivanju uzročnika bolesti COVID-19 i influence (gripe A i gripe B) u uzorcima biološkog materijala ljudi. Međutim, ovaj komplet ne razlikuje tipove influence A i B jer se oba detektiraju u istom fluorescentnom kanalu za FAM. Osim toga, drugi betakoronavirusi ili virusi influence, *na pr.*, influence C, ovim se kompletom ne mogu otkriti. Ovaj je test namijenjen namijenjen kao pomoć u dijagnostici virusa SARS-CoV-2 i gripe, u kombinaciji s kliničkim i epidemiološkim faktorima rizičnosti. Pozitivan nalaz upućuje na prisutnost RNK virusa SARS-CoV-2 i/ili gripe, iako je za utvrđivanje infekcije kod bolesnika potrebno uzeti anamnezu i druge informacije za postavljanje dijagnoze. Negativan nalaz ne isključuje infekciju i ne bi ga trebalo koristiti kao jedinu osnovu za donošenje odluke o postupanju s bolesnikom. Komplet je namijenjen laboratorijskom osoblju, stručno osposobljenom za primjenu tehnika PCR testiranja u realnom vremenu i za *in vitro* dijagnostiku.

3. Načela ispitivanja

COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD sadrži set svih reagensa i proba za kvalitetno detektiranje genoma virusa SARS-CoV-2 i/ili influence, na uobičajenim platformama za PCR testiranje (specifikacije potrebnih instrumenata pogledajte u **Poglavlju 6**). Virus SARS-CoV-2 identificira se detekcijom ciljeva testa RT-qPCR koji se nalaze u genu RdRp i N. Za razliku od toga, virusi influence A i B detektiraju se amplifikacijom ciljeva koji se nalaze u genima M1 odnosno NS2. NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD proizveden je za najširi mogući profil detekcije, ali specifičan za genome virusa SARS-CoV-2 i influence tipa A i B. Sadrži cijeli set reagensa i proba za otkrivanje tri virusna genoma, uključujući, među ostalim i učinkovitu internu kontrolu za potvrdu uspješne ekstrakcije RNK i izostanak inhibitora PCR. Ovaj komplet ciljano ispituje visoko očuvane regije genoma virusa SARS-CoV-2 (uključujući potpunu identifikaciju Delta (B.1.617.2) i Omicron (B.1.1.529) varijanti) i Influence A i B genoma, s pomoću visoko otpimiziranog kompleta početnica/proba. Početnice i probe imaju 100%-tnu homologiju s >95% sekvenci >10,000 genoma dostupnih u bazi podataka GISAID od studenog 2022. Uz to, početnice i probe ne pokazuju značajnu homologiju s nevezanim genomima, što ovaj test čini vrlo specifičnim. Prirodna evolucija virusa otkrivenih ovim kompletom podrazumijeva da će nove informacije o sekvencama postajati dostupne iz dana u dan, što je odraz dobro poznatih strategija prilagodbe virusa. Stoga NZYtech redovito provjerava genomske ciljeve virusa te će, ako to bude potrebno, izdati nove verzije ovog kompleta. RT-qPCR test u jednom koraku u realnom vremenu najbrža je i najpouzdanija metoda točnog otkrivanja virusnih RNK virusa SARS-CoV-2 i influence A i B. NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD je multipleks testiranje za otkrivanje nukleinske kiseline virusa SARS-CoV-2, influence A, influence B i ljudi (djelujući kao interna pozitivna kontrola). Ekstrahirana i pročišćena RNK transkribira se u cDNA i potom pojačava jednom reakcijom s pomoću pet visoko specifičnih kompleta početnica/proba, onih kojima se otkrivaju geni RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i fosfoprotein nukleokapside (N) ovisni o virusu SARS-CoV-2, geni matriksa virusa gripe tipa A i B (M1) i specifični geni cilja gen za nestrukturirani protein 2 (NS2) te ljudski gen ribonukleaze P (RNase P, RP). Komplet primjenjuje tzv. načelo TaqMan®. U toku postupka, probe se posebno vežu na ciljne gene i nakon amplifikacije DNK, kroz dvije početnice koje omeđuju, degradiraju, što dovodi do razdvajanja pripadajuće boje od utišivačke molekule (eng. Quencher) i jačanja fluorescencije. Detekcijom interne kontrole (ljudski gen RNase P) potvrđuje se uspješnost procesa ekstrakcije i izostanak inhibitora PCR potencijalno prisutnog u uzorcima biološkog materijala ljudi. Kako bi se omogućilo identificiranje amplifikacije pet specifičnih ciljeva jednom reakcijom, probe su različito označene, i to bojom Texas Red® specifičnom za virus SARS-CoV-2, FAM™ specifičnom za virus influencu A/B i JOE™ specifičnom za ljudski gen RNase P. Napominjemo da ova pločica sadrži dvostruko ispitivanje u kanalima Texas Red (specifični ciljni geni RdRp i N za SARS-CoV-2) i FAM (specifični ciljni geni za influenza A i B). Ovo omogućuje prijavu dodatnih testiranja za otkrivanje virusa SARS-CoV-2 ali ne omogućuje razlikovanje infekcija influencom A i B. Nadalje, pet kompleta početnica/proba sadrži optimizirane koncentracije koje jamče da amplifikacija niže zastupljenih nukleinskih kiselina neće biti kompromitirana kad ostali virusni ciljevi budu prisutni u višim koncentracijama.

4. Sadržaj kompleta

NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD psadrži sveobuhvatan komplet reagenasa dovoljan za obavljanje 96 RT-qPCR reakcija u jednom koraku.

KOMPONENTA		BROJ TUBICA	VOLUMEN (PO TUBICI)
COVID-19/Flu MMix	NZYMultiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)	1	1050 µL
COVID-19/Flu Primer Mix	COVID-19 & Flu A/B Primer Mix (20x)	1	103 µL
COVID-19/Flu Probe Mix	COVID-19 & Flu A/B Probe Mix (20x)	1	103 µL
COVID-19/Flu Pos 1	COVID-19 & Flu A/B Positive Control 1 (SARS-CoV-2 ORF1ab, influenza B NS2 i ljudski geni RP)	1	105 µL
COVID-19/Flu Pos 2	COVID-19 & Flu A/B Positive Control 2 (SARS-CoV-2 N, influenza A M1 i ljudski geni RP)	1	105 µL
NTC	Kontrola bez predloška	1	105 µL

5. Uvjeti čuvanja, održavanja stabilnosti i rukovanja

COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD isporučuje se u hladnome. Sve komponente moraju se odmah po dolasku spremati na -85 °C do -15 °C. Kad se koriste komponente kompleta treba odmah nakon korištenja vratiti u zamrzivač kako bi vrijeme koje provode na sobnoj temperaturi bilo što je moguće kraće.

- Čuvanjem u radnim alikvotima broj ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja smanjite koliko je to najviše moguće. Prema potrebi komponente se nakon odmrzavanja mogu odvojiti u alikvote manjih volumena.
- Mješavinu COVID-19 & Flu A/B Probe Mix (20x) treba čuvati zaštićenu od svjetla. Posebno pripazite da NZYMultiplex One-step RT-qPCR Master mješavinu nakon kombiniranja s mješavinom početnice ne izlažete izravnoj sunčevoj svjetlosti.
- Ako je pakiranje kojim je komplet zaštićen pri dolasku oštećeno, kontaktirajte NZYtech.
- Vodite računa o roku valjanosti navedenom na pakiranju. NZYtech ne preporučuje da se komplet koristi nakon isteka roka valjanosti. Tog datuma komplet se mora baciti u skladu s uputama o zbrinjavanju navedenima u **Poglavlju 8.2**.

6. Potrebni materijali i instrumenti koji nisu dio kompleta

- Instrument za PCR testiranje u realnom vremenu kojim se detektiraju fluorescentni boje Texas Red®, FAM™ and JOE™ (pri emisiji pripadajućih valnih dužina od 615, 520 odnosno 556 nm). U **Poglavlju 11** pogledajte modele instrumenata za koje je ovaj komplet odobren.
- Oprema i potrošni materijal za izoliranje virusne RNK u uzorcima iz dišnog sustava.
- Plastična oprema za qPCR bez RNase/DNase: epruvete za PCR, trake, čepovi, pločice s 96 jažica, ljepljive folije.
- pipetori i nastavci s filterom (bez RNase/DNase).
- jednokratne rukavice.
- tresilice i centrifuge.

7. Uzimanje i priprema uzoraka

Za postizanje optimalnih rezultata ključni su različiti faktori, poput protokola za uzimanje uzoraka iz ljudskog dišnog sustava (nazofaringealni ili orofaringealni brisevi, nazofaringealni ispirak/aspirat, nazalni ispirak, sputum, tekućina za ispiranje grla i BAL (bronhoalveolarni lavat). Uzeti uzorci trebaju se testirati što je prije moguće. Uzorke treba prevoziti i čuvati na niskim temperaturama u skladu s propisima o biološkoj sigurnosti. RNK ili ukupne nukleinske kiseline ekstrahirane u skladu s protokolom CE IVD početni su materijal za NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD. Pobrinite se da uzorci RNK budu odgovarajući što se tiče čistoće, koncentracije i integriteta nukleinske kiseline. Omjer $260/280$ od ~ 2 općenito je prihvatljiv za čistu RNK. Budući da je etanol snažan inhibitor PCR-a, on se prije eluiranja nukleinske kiseline tijekom ekstrakcije mora u potpunosti eliminirati. Komplet NZYtech sadrži i internu kontrolnu reakciju ekstrakcije RNA koja cilja ljudsku RNK, koja je dodatno pročišćena virusnom RNK. Ljudska RNK amplificira se s pomoću kompleta početnica/proba RNase P (RP). To je korisno za provjeru učinkovitosti izoliranja RNK i/ili prisutnosti inhibitora tijekom obrade uzoraka.

8. Mjere opreza i upozorenja

Kao i u svakom drugom postupku analitičkog ispitivanja, dobra laboratorijska praksa je ključna. Pažljivo slijedite postupke i smjernice sadržane u ovom priručniku, kako biste osigurali ispravno provođenje testiranja. Bilo kakvo odstupanje može za posljedicu imati neuspjelo ispitivanje ili netočan nalaz. Zbog visoke osjetljivosti kompleta, posebnu pozornost valja obratiti na održavanje reagensa i mješavina za amplifikaciju PCR-a nekontaminiranima.

8.1 Sigurnosne informacije

Prije uporabe kompleta proučite Sigurnosno-tehnički list dostupan na mrežnoj stranici NZYtech-a (www.nzytech.com). Otkrivanje virusa ovim kompletom treba obavljati samo stručno osoblje, relevantnim tehničkim i sigurnosnim postupcima u odgovarajuće opremljenim laboratorijima. U svim uvjetima potrebno se pridržavati međunarodnih i nacionalnih smjernica o biološkoj sigurnosti laboratorija.

8.2 Uvjeti rukovanja i postupka

- Samo za profesionalnu *in-vitro* dijagnostiku.
- Nemojte koristiti komplet kojemu je istekao rok valjanosti.
- Nemojte koristiti komponente, ako je hermetičko zatvaranje oštećeno.
- Nemojte međusobno mijenjati reagense različitih serija proizvodnje.
- S reagensima iz ovog kompleta ne smiju se koristiti reagensi drugih proizvođača.
- U svim postupcima treba koristiti jednokratnu plastičnu opremu i nastavke bez DNase/RNase.

- Tijekom protokola koristite nastavke s filterima bez DNase/RNase kako biste spriječili kontaminiranje aerosola i tekućine.
- Pripremu uzoraka, utvrđivanje reakcije i amplifikaciju treba obavljati u različitim radnim prostorima.
- Pozitivne kontrole sadrže veliki broj kopija predloška; treba ih otvoriti i obraditi podalje od testnih uzoraka i komponenti kompleta, kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija.
- Uvijek koristite vodu iz kompleta (COVID/Flu Neg /voda bez RNase/DNase).
- Na kraju svakog testiranja radne površine i opremu očistite sredstvom za uklanjanje DNK/RNK.
- Pločicama koje se koriste nakon amplifikacije rukujte pažljivo i bacite ih odmah nakon završenog testiranja; pločice treba nakon korištenja uvijek odlagati u spremnik za biološki opasan otpad.
- Biološkim uzorcima treba rukovati kao da su zaraženi, u skladu s mjerama opreza propisanim za biološku sigurnost.
- Ostaci kemikalija i pripravaka općenito se smatraju opasnim otpadom. Odlaganje ovakve vrste otpada propisano je nacionalnim i regionalnim zakonima i propisima.
- Sve nalaze trebaju interpretirati zdravstveni stručnjaci u kontekstu anamneze bolesnika i kliničkih simptoma.
- Negativan nalaz bilo kojeg PCR testa ne isključuje u potpunosti mogućnost infekcije.
- Slijedite dobru laboratorijsku praksu, nosite zaštitnu odjeću, uvijek nosite jednokratne rukavice bez pudera, zaštitne naočale i masku. U radnom prostoru nemojte jesti, piti niti pušiti

9. Postupak testiranja

Prije obavljanja ispitivanja pažljivo pročitajte upute. Ne zaboravite da se svi koraci pipetiranja i pripreme eksperimentalne pločice moraju obavljati na stolnom hladnjaku ili ledu. Čim je pločica popunjena odmah započnite protokol RT-qPCR koraku. Produljenom inkubacijom mješavina za reakciju na sobnoj temperaturi mogu nastati artefakti PRC-a koji smanjuju osjetljivost detekcije. Prije početka eksperimenta, počnite lagano miješati epruvete za reakciju iz kompleta, centrifugirajte ih 5 sekundi kako biste pokupili sadržaj na dnu epruvete i epruvete stavite na led. **Svakako preporučujemo da pipetiranje pozitivne kontrole 1 i 2 za COVID-19 i gripu obavite na kraju, kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija.**

9.1 Određivanje reakcije

1. Pripremite dovoljno mješavine RT-qPCR za broj testiranja koja treba obaviti, i dodajte još 5% za gubitke tijekom pipetiranja. Nastavite u skladu s tabelom u nastavku u kojoj su specificirani volumeni za 1 i n testova (pri čemu n odgovara ukupnom broju reakcija):

SASTOJAK	1 TEST VOLUMEN (μL)	n TESTOVA (*) VOLUMEN + 5% (μL)
COVID-19/Flu MMix (2x)(**)	10	$n \times 10,5$
COVID-19/Flu Primer Mix (20x)	1	$n \times 1,05$
COVID-19/Flu Probe Mix (20x)	1	$n \times 1,05$
KONAČAN VOLUMEN	12	$n \times 12,6$

(*) Kako biste izračunali ukupan broj reakcija potrebnih za svako ispitivanje, izbrojite broj uzoraka i dodajte još tri, jedan za negativnu i dva za pozitivnu kontrolu.

(**) Napominjemo da se na dnu epruvete s mješavinom Master može uočiti talog, naročito nakon više ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. Kako bi se osigurala optimalna uspješnost, uvjerite se da su prije početka upotrebe sve komponente odmrznute i reuspendirane. U tom slučaju mješavinu Master nemojte centrifugirati prije pipetiranja.

2. 12 μL mješavine za RT-qPCR pipetirajte u pojedinačne jažice prema pripremljenoj pločici za testiranje u realnom vremenu.
3. Za negativnu kontrolu, umjesto RNK predloška u jažicu za negativnu kontrolu dodajte 8 μL NTC-a. Konačan volumen treba biti 20 μL.
4. Za biološke uzorke, 8 μL svakog uzorka RNK dodajte u jažice SARS-CoV-2/Flu, prema pripremljenoj pločici za testiranje. Konačan volumen u svakoj jažici treba biti 20 μL.
5. Za dvije pozitivne kontrole, 8 μL COVID-19/Flu Pos 1 (kojima se otkrivaju geni virusa SARS-CoV-2 ORF1ab, influence B NS2 i ljudski geni RP) i 8 μL COVID-19/Flu Pos 2 (geni virusa SARS-CoV-2 N, influence A M1 i ljudski geni RP) dodajte u jažice pozitivne kontrole umjesto predloška za RNK. Konačan volumen treba biti 20 μL.
6. Prije nastavka RT-qPCR testa i sljedećeg koraka detekcije poklopite pločicu i hermetički ju zatvorite prikladnom ljepljivom folijom.
7. Reakcijsku pločicu stavite u instrument za PCR testiranje u realnom vremenu i protokol RT-qPCR provedite u skladu s uputama u sljedećem poglavlju.

9.2 Programiranje PCR instrumenta u realnom vremenu

Tabela u nastavku prikazuje standardni protokol optimiziran na više platformi. Međutim, ovi se uvjeti mogu prilagođavati i odobravati kako bi odgovarali različitim protokolima specifičnima uza pojedini stroj.

Predložene postavke za provođenje RT-PCR testa

CIKLUSI	TEMPERATURA	VRIJEME	KORAK
1	50 °C	20 min	Reverzna transkripcija
1	95 °C	3 min	Aktivacija polimeraze
40	95 °C	5 sek	Denaturacija
	60 °C	1 min	Sljepljivanje početnica/elongacija*

*Ovisno o opremi koja se koristi odaberite ispravni detekcijski kanal.

Fluorescentne boje & Detekcijski kanali

CILJANO	FLUORESCENTNA BOJA	KANALI DETEKCIJE
RdRp & N cilj (SARS-CoV-2)	Texas Red®	Texas Red
Flu A M1 cilj (Influenza A)	FAM™	FAM
Flu B NS2 cilj (Influenza B)	FAM™	FAM
RNase P	JOE™	Joe ili HEX/VIC
COVID-19/Flu Pos 1	Texas Red® & FAM™ & JOE™	Texas Red & FAM & JOE/HEX/VIC
COVID-19/Flu Pos 2	Texas Red® & FAM™ & JOE™	Texas Red & FAM & JOE/HEX/VIC

NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD odobren je za sljedeće sustave za PCR testiranje u realnom vremenu: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, i Bio-Rad® CFX96™. Ako se koristi neka druga oprema, komplet treba odobriti korisnik korištenjem prethodnih karakteriziranih uzoraka (pozitivnih i negativnih).

10. Analiza podataka

10.1 Provedba kriterija za odobravanje

Analizu podataka obavlja računalni program instrumenta. Uzimajući u obzir razlike različitih instrumenata za PCR testiranje u realnom vremenu, računalni program prag za tri fluorescentna signala (Texas Red, FAM i JOE) utvrđuje automatski, uz mogućnost ručnog podešavanja ako je to potrebno. Prije analize rezultata uzoraka, preporučujemo da provjerite je li PCR testiranje u realnom vremenu valjano. Tako za svaku pločicu potvrdite jesu li rezultati za pozitivnu i negativnu kontrolu provedeni prema očekivanju, u skladu sa sljedećim kriterijima:

Pozitivne kontrole: amplifikacije krivulja za FAM (influenza B u kontroli 1 i influenza A u kontroli 2), Texas Red (gen za SARS-CoV-2 ORF1ab u kontroli 1 i gen N u kontroli 2) i JOE (RNase P) su pozitivne. Amplifikacija pozitivnih kontrola očekuje se pri $Ct < 32$, u tri kanala. Neispunjavanje ovog kriterija kontrole kvalitete bitan je pokazatelj da je eksperiment kompromitiran.

Negativna kontrola (nema reakcije na predlošku): nije otkrivena amplifikacija. Ako su krivulje negativne kontrole (Texas Red/JUN, FAM i JOE) sigmoidalne, postoji mogućnost da je došlo do kontaminacije uzorka. Ponovite testiranje u skladu s dobrom praksom RT-qPCR testiranja.

Ako su kontrole u skladu s očekivanjima, testiranje je **valjano**. Nastavite s interpretacijom rezultata testiranih uzoraka. Ako neka od kontrola nije dala očekivane rezultate ispitivanje je kompromitirano ili je nepravilno izvedeno i treba ga smatrati **nevažnim**.

Ponovite testiranje

Ako se problem ponavlja, obratite se proizvođaču

10.2 Interpretacija rezultata testiranja

Virus SARS-CoV-2 otkriven je ako amplifikacija Texas Red ima sigmoidalnu krivulju i $Ct < 35$, neovisno o rezultatu dobivenom RNase P (JOE) ispitivanjem.

Influenca tipa A i/ili influenza tipa B otkrivena je ako amplifikacija FAM ima sigmoidalnu krivulju i $Ct < 35$, neovisno o rezultatu dobivenom RNase P (JOE) ispitivanjem.

Virusi za SARS-CoV-2 i influencu A i/ili influencu B nisu otkriveni ako se krivulje Texas Red i FAM ne amplificiraju ili se amplificiraju pri $Ct > 35$, a ispitivanje RNase P (JOE) prikazuje pozitivnu sigmoidalnu krivulju ($Ct < 40$).

Test nije važeći ako su ispitivanja na SARS-CoV-2, influencu A/B, i RNase P negativni. Testiranje treba ponoviti s nukleinskom kiselinom ponovno pročišćenom iz uzorka.

Tabela u nastavku sažeto prikazuje interpretaciju glavnih rezultata (ocjenu ukupnog oblika krivulja amplifikacije; **na pravu amplifikaciju upućuju samo sigmoidalne krivulje**).

REZULTAT SARS-CoV-2 (TEXAS RED)	REZULTAT INFLUENCA A/B (FAM)	REZULTAT RNASE P (JOE)	INTERPRETACIJA REZULTATA
+ ($Ct < 35$)	- ($Ct > 35$)	+ ($Ct < 40$)	SARS-CoV-2 otkriven → POZITIVAN
+ ($Ct < 35$)	- ($Ct > 35$)	- ($Ct > 40$)	SARS-CoV-2 otkriven → POZITIVAN
- ($Ct > 35$)	+ ($Ct < 35$)	+ ($Ct < 40$)	Influenca A/B otkrivena → POZITIVAN
- ($Ct > 35$)	+ ($Ct < 35$)	- ($Ct > 40$)	Influenca A/B otkrivena → POZITIVAN
+ ($Ct < 35$)	+ ($Ct < 35$)	+ ($Ct < 40$)	SARS-CoV-2 i influenza A/B otkriveni → POZITIVAN
+ ($Ct < 35$)	+ ($Ct < 35$)	- ($Ct > 40$)	SARS-CoV-2 i influenza A/B otkriveni → POZITIVAN
- ($Ct > 35$)	- ($Ct > 35$)	+ ($Ct < 40$)	SARS-CoV-2 i influenza A/B nisu otkriveni → NEGATIVAN
- ($Ct > 35$)	- ($Ct > 35$)	- ($Ct > 40$)	Testiranje nije valjano, ponovite ekstrakciju i testiranje

Napomena 1: NZYtech preporučuje ponavljanje analize oba uzorka koji pokazuju dvojbenu ili netipičnu krivulju koja ne omogućuje jasnu interpretaciju.

Napomena 2: Interpretacijom rezultata mora se razjasniti mogućnost lažno negativnih ili lažno pozitivnih rezultata.

- Iako je rizik od lažno negativnih rezultata manji jer je ovaj test osmišljen s dvojnim ciljem, lažno negativni rezultati mogu biti posljedica:
 - nepravilnog uzimanja uzorka, rukovanja i/ili čuvanja uzoraka.
 - uzorka koji nije u viremičnoj fazi.
 - nepridržavanja postupaka navedenih u ovom priručniku.
 - korištenja neodobrenog kompleta za ekstrakciju ili platforme za PCR u realnom vremenu.
- Lažno pozitivni rezultati mogu biti posljedica:
 - nepravilnog rukovanja uzorcima koji sadrže visoku koncentraciju virusne RNK.
 - nepravilnog rukovanja pozitivnim kontrolama.
 - nepravilnog rukovanja amplificiranim proizvodom (postamplifikacijska pločica).

Negativan nalaz ne isključuje infekciju i ne bi ga trebalo koristiti kao jedinu osnovu za donošenje odluke o liječenju ili drugom obliku postupanja s bolesnikom. Nadalje, ovim se testom ne mogu isključiti bolesti koje uzrokuju drugi bakterijski ili virusni patogeni organizmi.

11. Ocjena uspješnosti

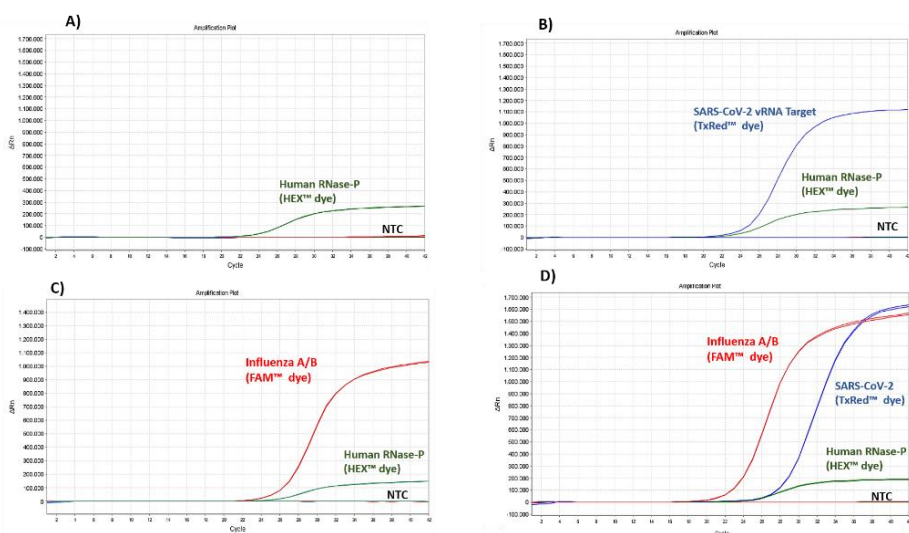
Uspješnost ovog kompleta provjerena je za instrumente navedene u poglavlju 9.2 (pogledajte ranije navedeno poglavlje) Ako se koristi neka druga oprema, komplet treba odobriti korisnik korištenjem prethodnih karakteriziranih uzoraka (pozitivnih i negativnih).

11.1 Očekivani rezultati

Tipični dijagrami amplifikacije za negativne kliničke uzorke (slika 1A) ili uzorke uzete od bolesnika inficiranih virusom SARS-CoV-2 (slika 1B), influence A i/ili influence B (slika 1C), ili objema (slika 1D) prikazani su na slici 1.

11.2 Ograničenje detekcije (LoD) - Analitička osjetljivost

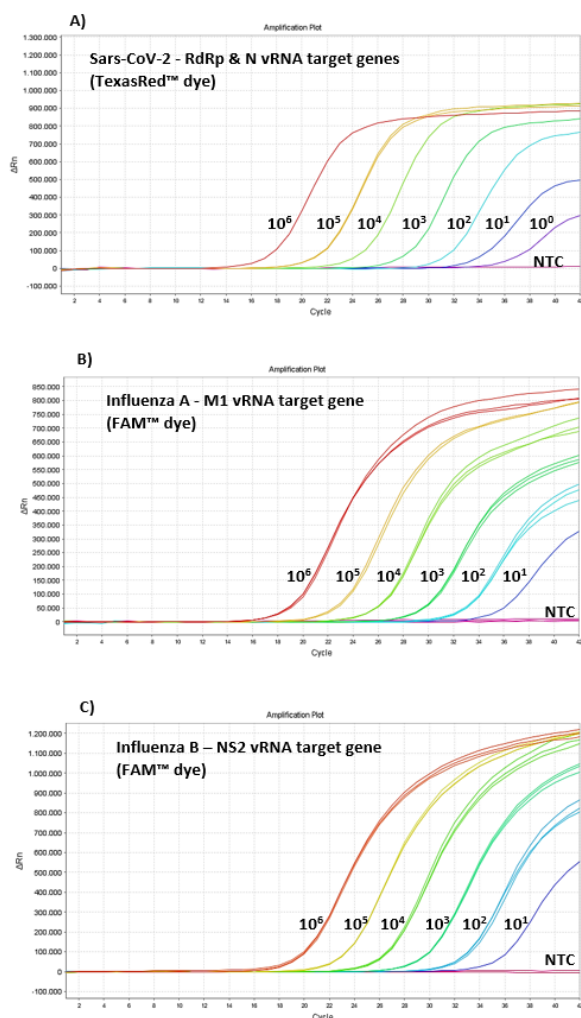
Analitička osjetljivost definirana je kao najniža koncentracija analita koja se može pouzdano detektirati s pouzdanosti od 95%. Ocjenjivana je ispitivanjem nukleinskih kiselina virusa SARS-CoV-2, influence A i influence B, s različitim brojem kopija, pojedinačno ili uz dodani standard (engl. spiked) u RNK ekstrahiranu iz negativnog uzorka orofarinksa, s pomoću tri različite serije kompleta uz praćenje standardnih uvjeta reakcije na testiranje. Testiranja su se ponavljala kroz četiri dana, izrađeno je 48 replikata svake ispitane koncentracije. Zajedno ovi su podaci otkrili da NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD otkriva 0,25 kopija/μL RNK virusa SARS-CoV-2 te 0,75 kopija/μL virusa influence A i 1,25 kopija/μL influence B, s pouzdanosti od ≥95%. Tako je utvrđeno da pokusno ograničenje detekcije (LoD) iznosi 0,25 kopija/μL ili 250 kopija/mL za SARS-CoV-2 te 0,75 kopija/μL ili 750 kopija/mL za influencu A i 1,25 kopija/μL ili 1250 kopija/mL za influencu B. Pokusno ograničenje detekcije (LoD) potvrdila su dva različita voditelja korištenjem triju serija kompleta u jednom eksperimentu od ukupno 48 replikata matrice negativnog brisa orofarinksa kojima su standardi dodavani (engl. spiked) neovisno jedan o drugome. Sposobnost NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD za otkrivanje virusa pri različitim opterećenjima prikazana je na slici 2.



Slika 1. Otkrivanje ciljeva virusa SARS-CoV-2, influence A/B i ljudskog gena RNase-P iz negativnih kliničkih uzoraka (A) ili kliničkih uzoraka zaraženih virusom SARS-CoV-2 (B), virusom influence A i/ili influence B (C) ili i virusom SARS-CoV-2 i influence A/B (D). Plava krivulja, otkrivanje ciljeva SARS-CoV-2 vRNA kroz kanal Texas Red. Crvena krivulja, detekcija ciljeva virusa influence A i/ili influence B kroz kanal FAM. Zelena krivulja, detekcija ljudskog gena RNase P kroz kanal JOE.

Analitička osjetljivost COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD u kontekstu scenarija koinfekcije ocjenjivana je provedbom niza serijskih eksperimenata razrjeđivanja korištenjem lažnih uzoraka koinfekcije za svaki od dva virusna cilja. Za stvaranje lažnih uzoraka koinfekcije, točno 10^4 kopija nukleinskih kiselina influence A i 10^4 kopija influence nukleinske kiseline influence B dodano je standardnoj krivulji za SARS-CoV-2. Nasuprot tome, 10^4 kopija SARS-CoV-2 dodano je standardnim krivuljama influence A i influence B. Četverostruki uzorci triju serija kompleta (što ukupno čini 12 replikata po jednom razrjeđivanju) ispitano je COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, kako bi se odredila osjetljivost ispitivanja kad je u uzorku prisutno više virusnih ciljeva. Podaci su otkrili da su ograničenja detekcije (LoD) virusa SARS-CoV-2 i

influenca A ostala nepromijenjena u slučaju koinfekcije. Međutim, ograničenje detekcije (LoD) za influencu B promijenilo se na 1,75 kopija/μL ili 1750 kopija/mL u slučaju koinfekcije.



Slika 2. Osjetljivost COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD. Dijagram amplifikacije (broj ciklusa *naspram* fluorescenciji - ΔRn) za 1:10 serijskih razrjeđivanja SARS-CoV-2 (A), influencu A (B) i influencu B (C) vRNA. NTC, od eng. No Template Control, bez kontrole predložka (negativna kontrola).

11.3 Analitička reaktivnost (inkluzivnost) i analitička specifičnost

Inkluzivnost i unakrsna reaktivnost ocjenjivani su *in silico* analizom oligonukleotidnih proba i početnica na patogene organizme povezane sa virusom SARS-CoV-2, influencom A i influencom B odnosno normalne patogene organizme koji uzrokuju infekciju sa sličnim simptomima. Nakon provedene *in silico* analize, uočeno je da se ovakvim detektiranjem otkrivaju svi lanci virusa SARS-CoV-2, influenza A i influenza B i ne prikazuje nikakvu reaktivnost s virusima koji nisu s njima povezani. Osim *in silico* analize, testiranje COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR obavljeno je na nukleinskim kiselinama uobičajenih mikroba oralnog i dišnog sustava koje je obuhvatilo *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*. Nijedan od patogena testiran COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD nije generirao signal amplifikacije koji bi se mogao detektirati.

11.4 Preciznost

Preciznost ispitivanja NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD utvrđena je ponovljenim testiranjem pozitivnih uzoraka koji predstavljaju dvije razine virusnog opterećenja, 200 (nisko virusno opterećenje) i 2000 (srednje virusno opterećenje) kopija po reakciji, uz dodani standard (engl. spiked) u RNK ekstrahiranu iz negativnih uzoraka orofarinksa, s pomoću tri različite serije kompleta uz praćenje standardnih uvjeta reakcije na testiranje. Preciznost se ocjenjivala mjerenjem prosjeka Cq , Cq koeficijenta varijacije i postotka detekcije replikata, kako je u nastavku opisano za svaki pojedini slučaj. Podaci su sažeti u tri tabele (po jedna za svaki cilj) prikazane u nastavku.

11.4.1 Ponovljivost

Ponovljivost je ocjenjivao jedan voditelj analizom 12 replikata istog uzorka (200 i 2000 primjeraka po reakciji), što ukupno čini 24 provedena testiranja po cilju.

11.4.2 Dnevna reproducibilnost

Dnevnu reproducibilnost (reproducibilnost unutar laboratorija) ocjenjivao je jedan voditelj analizom 48 replikata svakog uzorka (200 i 2000 kopija po reakciji), tijekom četiri dana s 12 replikata svake koncentracije dnevno (ukupno je obavljeno 144 ispitivanja po cilju).

11.4.3 Reproducibilnost „Lot-to-lot“

Reproducibilnost među lotovima (engl. Lot-to -lot) ocjenjivao je jedan voditelj analizom 60 replikata svakog uzorka (200 i 2000 kopija po reakciji) s pomoću tri različite serije kompleta s 20 replikata po seriji.

11.4.4 Reproducibilnost po voditelju

Reproducibilnost po voditelju ocjenjivali su testiranjem 24 replikata svakog uzorka (200 i 2000 kopija po reakciji), četiri različita voditelja, po šest replikata svaki i po virusnom opterećenju, što ukupno čini 36 replikata po voditelju, uključujući 3 cilja kompleta.

Preciznost NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, kod otkrivanja cilja za SARS-CoV-2.

VARIJABLA		SARS-CoV-2 (KOPIJA/REAKCIJA)	
		200	2000
PONOVLJIVOST	n	12	12
	Srednji Cq	28,87	26,35
	Koeficijent varijacije (%)	0,95	1,92
	% detekcije replikata	100	100
DNEVNA REPRODUCIBILNOST	n	12	12
	Srednji Cq	28,87	26,35
	Koeficijent varijacije (%)	0,95	1,92
	% detekcije replikata	100	100
REPRODUCIBILNOST „LOT-TO-LOT“	n	60	60
	Srednji Cq	28,86	25,97
	Koeficijent varijacije (%)	1,97	2,71
	% detekcije replikata	100	100
REPRODUCIBILNOST PO VODITELJU	n	24	24
	Srednji Cq	28,87	25,68
	Koeficijent varijacije (%)	2,54	2,20
	% detekcije replikata	100	100
REPRODUCIBILNOST MEĐU INSTRUMENTIMA	n	24	24
	Srednji Cq	29,83	26,89
	Koeficijent varijacije (%)	3,29	2,46
	% detekcije replikata	100	100

Preciznost NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, kod otkrivanja cilja za influencu A.

VARIJABLA		INFLUENCA A (KOPIJA/REAKCIJA)	
		200	2000
PONOVLJIVOST	n	12	12
	Srednji Cq	30,47	26,46
	Koeficijent varijacije (%)	0,82	0,53
	% detekcije replikata	100	100
DNEVNA REPRODUCIBILNOST	n	48	48
	Srednji Cq	30,75	26,51
	Koeficijent varijacije (%)	1,39	1,13
	% detekcije replikata	100	100
REPRODUCIBILNOST „LOT-TO-LOT“	n	60	60
	Srednji Cq	30,69	26,61
	Koeficijent varijacije (%)	1,35	1,13
	% detekcije replikata	100	100
REPRODUCIBILNOST PO VODITELJU	n	24	24
	Srednji Cq	30,79	26,61
	Koeficijent varijacije (%)	1,55	1,06
	% detekcije replikata	100	100
Reproducibilnost među instrumentima	n	24	24
	Srednji Cq	30,00	26,07
	Koeficijent varijacije (%)	1,76	1,63
	% detekcije replikata	100	100

Preciznost NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, kod otkrivanja cilja za influencu B.

VARIJABLA		INFLUENCA B (KOPIJA/REAKCIJA)	
		200	2000
PONOVLJIVOST	n	12	12
	Srednji Cq	30,72	26,82
	Koeficijent varijacije (%)	0,81	1,08
	% detekcije replikata	100	100

DNEVNA REPRODUCIBILNOST	n	48	48
	Srednji Cq	30,78	26,82
	Koeficijent varijacije (%)	1,14	3,05
	% detekcije replikata	100	100
REPRODUCIBILNOST „LOT-TO-LOT“	n	60	60
	Srednji Cq	30,76	26,82
	Koeficijent varijacije (%)	1,08	2,77
	% detekcije replikata	100	100
REPRODUCIBILNOST PO VODITELJU	n	24	24
	Srednji Cq	30,87	26,71
	Koeficijent varijacije (%)	1,11	0,73
	% detekcije replikata	100	100
REPRODUCIBILNOST MEĐU INSTRUMENTIMA	n	24	24
	Srednji Cq	30,15	26,34
	Koeficijent varijacije (%)	2,01	2,04
	% detekcije replikata	100	100

11.4.5 Reproducibilnost među instrumentima

Reproducibilnost među instrumentima mjerio je jedan voditelj testiranjem 36 replikata svakog uzorka (200 i 2000 kopija po reakciji), u dva različita qPCR instrumenta (Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5), s ukupno 72 testiranja po uzorku.

11.5 Klinička evaluacija

Uspješnost NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, s uzetim uzorcima dišnog sustava ocjenjivao je jedan vanjski laboratorij. Ukupno je testirano 250 kliničkih uzoraka, i to 72 klinička uzorka pozitivna na virus influence A (36 za AH1 i 36 za AH3); 58 kliničkih uzoraka pozitivnih na virus influence B; 60 kliničkih uzoraka pozitivnih na virus SARS-CoV-2 i 60 negativnih. Podaci u utvrdili 100%-tno poklapanje za sve pozitivne i negativne testirane uzorke.

12. Kontrola kvalitete

Sve komponente NZYtech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD ispitane su u skladu s ranije opisanim protokolima. Pentapleks sustav za PCR testiranje u realnom vremenu omogućuje detekciju ciljeva navedenih za identifikaciju virusne RNK virusa SARS-CoV-2 (gena RdRp i N), influence A/B virusne RNK (M1) odnosno gena NS2) i ljudskog gena RNase P (RP). Pozitivne amplifikacije uočene su za ciljane gene, pozitivnu kontrolu i interne kontrole kroz kanale Texas Red, FAM i HEX/VIC/JOE, prema njima pripadajućim bojama kompleta početnica/proba.












13. Tehnička podrška

Za tehničku podršku obratite se našem posebnom timu za tehničku podršku na broj telefona: +351 (0) 21 364 35 14 ili e-poštom na: info@nzytech.com.

14. Robne marke i izjave o odricanju od odgovornosti

Sve robne marke koje se pojavljuju u ovom priručniku vlasništvo su njihovih vlasnika.

15. Objašnjenje simbola

	<i>In vitro</i> dijagnostički medicinski proizvod		Pogledati Upute za uporabu
	Kataloški broj		Proizvođač
	Broj serije		Najbolje upotrijebiti do
	Ograničenje temperature		Dovoljno za
	Pozitivna kontrola		Držati podalje od sunčeve svjetlosti (mješavina početnice/probe)
	Negativna kontrola		

16. Izjava o sukladnosti

Naziv proizvoda: COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD

Kataloški broj: MD04851

Namjena: Kvalitativno otkrivanje virusa SARS-CoV-2 i influence A/B

Razvrstavanje: Ostala (nisu obuhvaćeni prilog II ili nije namijenjeno samotestiranje) prema Direktiva 98/79/EZ

Proizvođač: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Društvo, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, ovime izjavljuje da je proizvod na koji se odnosi ova izjava o svojstvima, u skladu sa sljedećim normama i drugim normativnim ispravama ISO 9001:2015 i ISO 13485:2016, temeljem odredbi Direktive 98/79/EC o *in vitro* dijagnostičkim medicinskim uređajima i EU Regulative 2017/746 o *in vitro* dijagnostičkim medicinskim proizvodima kako je prenesena u nacionalna zakonodavstva država članica Europske unije.

Tehnička dokumentacija o proizvodu čuva se u NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.



dr.sc. Joana Brás
Tehnička direktorica

17. Literatura

SZO: Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. (Kliničko liječenje teške akutne respiratorne infekcije (SARI) kad se sumnja na bolest COVID-19) 13. ožujka 2020. Dostupno na <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf>

SZO: Pitanja i odgovori: Gripa i COVID-19 - sličnosti i razlike 17. ožujka 2020. Dostupno na <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.) Izbijanje upale pluća povezane s novim koronavirusom koji se vjerojatno prenio sa šišmiša. In *Nature* 579 (7798), str. 270–273. Oznaka 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. (Koronavirusna (SARS-CoV-2) bolest COVID-19: infekcija, prevencija i kliničko napredovanje potencijalnih kemijskih lijekova) *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) (Koronavirus povezan s teškim akutnim respiratornim sindromom: vrsta i njihovi virusi - izvješće studijske grupe za koronavirus (14)). *bioRxiv* 2020.02.07.937862; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862>

