SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD

SARS-CoV-2 enstegs RT-qPCR Kit II, RdRp och N gener, IVD

Viralt RNA-beroende RNA-polymeras (RdRp) och nukleokapsid fosfoprotein (N) gener

REF MD04871, 96 reaktioner
MD04872, 4 x 96 reaktioner

Endast för professionell* in vitro-*diagnostik

CE IVD

SE

Bruksanvisning

MD0487_IM_se

VERSION 2401, januari 2024

NZYtech genes & enzymes
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

Innehållsförteckning

1. Inledning ... 3
2. Avsedd användning ... 3
3. Analysens principer ... 3
4. Beståndsdelar i satsen ... 3
5. Förvaring, stabilitet och hanteringsförhållanden ... 4
6. Material och instrument som krävs men tillhandahålls inte ... 4
7. Provtagning och förberedelse ... 4
8. Försiktighetsåtgärder och varningar ... 4
   8.1 Säkerhetsinformation ... 4
   8.2 Hantering och procedurkrav ... 4
9. Testningsprocedur ... 5
   9.1 Reaktionsuppställning ... 5
   9.2 Programmering av realtids-PCR-instrumentet ... 5
10. Dataanalys ... 6
   10.1 Kriterier för validering av testkörningen ... 6
   10.2 Tolkning av testresultat ... 6
11. Prestationsutvärdering ... 7
   11.1 Förväntade resultat ... 7
   11.2 Detektionsgräns (LoD) - Analytisk känslighet ... 7
   11.3 nklusivitet, korsreaktivitet och störande ämnen ... 7
   11.4 Precision ... 8
   11.4.1 Upprepningsbarhet ... 8
   11.4.2 Daglig reproducerbarhet ... 8
   11.4.3 Reproducerbarhet mellan satser ... 8
   11.4.4 Operatörsreproducerbarhet ... 9
   11.4.5 Reproducerbarhet mellan instrument ... 9
11.5 Klinisk utvärdering ... 9
12. Kvalitetskontroll ... 9
13. Tekniskt stöd ... 9
14. Varumärken och ansvarsfriskrivningar ... 9
15. Förklaring av symboler ... 10
16. Försäkran om överensstämmelse ... 11
17. Referenser ... 12

1. Inledning

Svårt akut respiratoriskt syndrom CoronaVirus 2 (SARS-CoV-2), som tidigare hette 2019-nCoV, är orsaken till Coronavirus-sjukdom 2019 (COVID-19) och tillhör liksom det närbesläktade SARS-koronaviruset släktet *Betacoronavirus* inom familjen coronavirus. Coronavirus är hölje, positiva, enkelsträngade stora RNA-virus som infekterar människor, men också ett brett spektrum av djur. SARS-CoV-2, som tros vara av zoonotiskt ursprung, är mycket smittsam och överförs främst via andningsdroppar (hosta och nysningar). Tidig upptäckt av SARS-CoV-2 är avgörande för att ge snabb behandling till infekterade patienter och därmed för att minska spridningen av infektioner. De vanligaste kliniska manifestationerna av covid-19 inkluderar trötthet, feber och symtom i nedre luftvägarna, såsom torrhosta och dyspné. Förlust av lukt och smak kan också förekomma. I de mest kritiska situationerna fortskrider infektionen till svår lunginflammation med livshotande komplikationer som akut respiratorisk sjukdomssyndrom, organdysfunktion och död. Baserat på nuvarande kunskap är en betydande andel av infektionerna milda eller asymtomatiska. En andel av befolkningen är mer sårbara för den svåra sjukdomsformen, inklusive äldre vuxna (60 år och äldre), rökare och personer med kroniska sjukdomar som hjärt- eller lungsjukdomar, cancer, diabetes och patienter med nedsatt immunförsvar. Även om det för närvarande redan finns vacciner för att kontrollera COVID-19 förhindrar de inte infektion i vaccinerade populationer.

2. Avsedd användning

NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, är ett molekylärt realtidstest för omvänd transkriptionspolymeraskedjereaktion (RT-qPCR) avsett för snabb kvalitativ detektering av SARS-CoV- 2 nukleinsyror i nasofaryngeala eller orofaryngeala pinnprover insamlade från individer som misstänks för COVID-19. Ett positivt resultat indikerar närvaron av SARS-CoV-2 RNA men klinisk korrelation med patienthistorik och annan diagnostisk information är nödvändig för att fastställa patientens infektionsstatus. Negativa resultat utesluter inte SARS-CoV-2-infektion och bör inte användas som den enda grunden för patienthanteringsbeslut. This Detta kit är avsett för användning av laboratorieutbildad personal, specifikt instruerad i realtids-PCR-tekniker och *in vitro*-diagnostik.

3. Analysens principer

NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, tillhandahåller den kompletta uppsättningen av reagenser och sonder för att kvalitativt detektera SARS-CoV-2-genomet, genom vanliga PCR-plattformar i realtid (se erforderliga instrumentspecifikationer i **avsnitt 6**). Det virus-RNA-beroende RNA-polymeraset (RdRp) och nukleokapsidfosfoproteinet (N)-gener har tidigare identifierats som mycket specifika markörer för SARS-CoV-2. Detta NZYtech-kit riktar sig mot specifika regioner i RdRp- och N-generna av SARS-CoV-2-genomet för att ge högsta detektionskänslighet. SARS-CoV-2-kitprimrar och prober har 100% homologi med >95% av >5M genomsekvenser tillgängliga i GISAID-databasen, från och med november 2021, inklusive fullständig identitet med Delta (B.1.617.2) och Omicron (B.1.1.529) varianter. Dessutom uppvisar primrar och prober som riktar sig mot SARS-CoV-2 ingen signifikant homologi med icke-relaterade genom, vilket gör detta test mycket specifikt eftersom det inte finns någon korsreaktivitet med nukleinsyror från andra respiratoriska virala och bakteriella organismer. En intern kontroll ingår för att bekräfta effektiv RNA-extraktion från humana biologiska prover, samt frånvaro av bland annat PCR-hämmare. Dessutom använder testet externa kontroller (positiv lågtiterkontroll som medföljer satsen och negativ kontroll), som beskrivs nedan. Den positiva kontrollen består av nukleinsyrafragment som innehåller de tre målsekvenserna som detekteras av kitet (SARS-CoV-2 RdRp- och N-gener, och humant RNas P (RP)). Den naturliga utvecklingen av SARS-CoV-2 innebär att ny sekvensinformation kommer att bli tillgänglig efter den första designen av detta kit, vilket återspeglar SARS-CoV-2-anpassningsstrategier. Således återbesöker NZYtech med jämna mellanrum SARS-CoV-2 genomiska mål och, om så krävs, kommer att släppa nya versioner av detta kit.

Enstegs RT-qPCR förblir den mest tillförlitliga och känsliga metoden för att utföra en exakt detektering av SARS-CoV-2 RNA, vilket tyder på en mänsklig infektion. Viralt RNA isolerat och renat från infekterade prover retrotranskriberas till cDNA och amplifieras därefter i en enda reaktion med användning av två mycket specifika primers/probuppsättningar som utnyttjar den så kallade TaqMan®-principen. Under denna process hybridiserar proberna specifikt till två regioner av SARS-CoV-2-genomet, nämligen RdRp (inom Orf1ab-polyproteingenen) och N-gener. En ytterligare primers/probuppsättning fungerar som en endogen intern kontroll för att detektera nukleinsyror från den humana RP-genen, utvärdera provets kvalitet. För att möjliggöra identifiering av amplifiering av de tre specifika målen i en enda reaktion, är SARS-CoV-2 RdRp- och N-gener och humana RP-specifika prober olika märkta, med HEX™, FAM™ och Cy5™ reporterfärgämnen, respektive. Observera att denna panel innehåller en duplexanalys i två distinkta optiska kanaler, HEX (alternativt VIC eller JOE) och FAM, för att rapportera prestandan för de två SARS-CoV-2-förstärkningarna. In addition, primers and Dessutom tillhandahålls primrar och prober i optimerade koncentrationer för att säkerställa att amplifiering av humant mRNA, även när det finns i mycket höga koncentrationer, inte begränsar effektiviteten hos SARS-CoV-2-primrar/probuppsättningar.

4. Beståndsdelar i satsen

NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, tillhandahåller en omfattande uppsättning reagenser och kontroller för kvalitativ detektion av SARS-CoV-2 i ett enda steg.

BESTÅNDSDEL I SATSEN		**VOLYM (PER FLASKA)**	**ANTAL FLASKOR**	
			MD04871	**MD04872**
SARS-CoV-2 MMix II, ROX (RdRp & N)*	NZYSupreme enstegs RT-qPCR Master Mix, ROX*	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N)	SARS-CoV-2/RP-primers/prob Mix II	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 POS (RdRp & N)	SARS-CoV-2 (RdRp- och N-gener)/RP positiv kontroll (1 x 104 kopior/µL)	105 µL	1	4
NTC	Kontroll utan mall	105 µL	1	4

**Trots att de flesta realtids-PCR-instrument som läser ROX-färgämne tillåter användare att köra experiment och analysera data utan ROX, förhindrar inkluderingen av denna interna passiva referensfärg att data misstolkas och gör det möjligt att upptäcka och diagnostisera fel.*

5. Förvaring, stabilitet och hanteringsförhållanden

NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, skickas i kyl. Alla komponenter ska omedelbart förvaras vid -85 °C till -15 °C vid ankomst. När de används ska satskomponenterna lämnas tillbaka till frysen omedelbart efter användning för att minimera tiden i rumstemperatur. Fortsätt även med följande indikationer:

- Minimera antalet frys-upptiningscykler genom att lagra i arbetsalikvoter. Om så är lämpligt kan satskomponenter delas upp i mindre volymer efter upptining.
- SARS-CoV-2/RP-primers/prob Mix II ska förvaras skyddat från ljus. Utsätt särskilt inte SARS-CoV-2 MMix II ROX (RdRp & N) för direkt solljus efter att ha kombinerats med primers/probmix.
- Om paketet som skyddar satsen anlände skadat, kontakta NZYtech.
- Se upp för det utgångsdatum som anges på förpackningen. NZYtech rekommenderar inte att kitet används efter utgångsdatumet. Vid detta datum måste kitet kasseras enligt anvisningarna för kassering i **avsnitt 8.2**.

6. Material och instrument som krävs men tillhandahålls inte

- Realtids-PCR-instrument som detekterar FAM™, HEX™/JOE™/VIC™ och Cy5™ fluorescerande färgämnen (vid emissionsvåglängder på 520, 556/555/554 respektive 670 nm). Se i avsnitt 11 de instrumentmodeller som satsen validerades för.
- Utrustning och förbrukningsmaterial för att isolera viralt RNA från andningsprover.
- RNase/DNase-fria qPCR-plastartiklar: PCR-rör, remsor, lock, 96-brunnars plattor, självhäftande filmer.
- Pipetter och filterspetsar (RNase/DNase-fria).
- Engångshandskar.
- Vortex- och centrifugeringsapparater

7. Provtagning och förberedelse

Olika faktorer, såsom protokoll för provtagning från mänskliga andningsprover (nasofaryngeala eller orofaryngeala pinnprover), provtransport, förvaring och bearbetningstid, är avgörande för att uppnå optimala resultat. De insamlade proverna bör testas så snart som möjligt. Prover bör transporteras och förvaras vid låga temperaturer i enlighet med biosäkerhetsbestämmelser. RNA eller totala nukleinsyror extraherade enligt ett IVD-protokoll är utgångsmaterialet för NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD. Se till att RNA-prover är lämpliga när det gäller renhet, koncentration och nukleinsyraintegritet. Ett $A_{260/280}$-förhållande på ~2 är allmänt accepterat för rent RNA. Eftersom etanol är en stark realtids-PCR-hämmare är det nödvändigt att eliminera den före elueringen av nukleinsyran under extraktion. NZYtech- sats integrerar en intern RNA-extraktionskontrollreaktion som är inriktad på humant RNA, som samrenas med viralt RNA. Humant RNA amplifieras med RP-primrarna/probuppsättningen. Detta är användbart för att kontrollera effektiviteten av RNA-isolering och/eller förekomsten av inhibitorer under provbearbetning.

8. Försiktighetsåtgärder och varningar

Som i alla analytiska testförfaranden är god laboratoriepraxis avgörande. Följ noggrant procedurerna och riktlinjerna i denna handbok för att säkerställa att testet utförs korrekt. Varje avvikelse från dem kan resultera i analysfel eller orsaka felaktiga resultat. På grund av satsens höga känslighet måste särskild försiktighet iakttas för att hålla reagenser och PCR-amplifieringsblandningar fria från kontaminering.

8.1 Säkerhetsinformation

Innan du använder satsen vänligen konsultera säkerhetsdatabladet (SDB) som finns tillgängligt på NZYtech webbplats (www.nzytech.com). Detektering av SARS-CoV-2-virus bör endast utföras av personal som är utbildad i relevanta tekniska och säkerhetsprocedurer i lämpligt utrustade laboratorier. Internationella och nationella riktlinjer för biosäkerhet i laboratorier bör följas under alla omständigheter.

8.2 Hantering och procedurkrav

- Endast för professionell *in vitro*-diagnostik.
- Använd inte denna sats efter utgångsdatumet.
- Använd inte testkomponenterna om satsens tätning är skadad.
- Byt inte ut reagenser från olika produktionspartier.
- Inga reagens från andra tillverkare bör användas tillsammans med reagens från denna testsats.
- DNase/RNase-fria engångsplastartiklar och pipetter bör användas i alla procedurer.
- Använd DNase/RNase-fria filterspetsar genom hela protokollet för att förhindra kontaminering av aerosol och vätska.
- Provberedning, reaktionsuppsättning och amplifiering bör utföras inom olika arbetsområden.
- Positiv kontroll innehåller ett stort antal kopior av mallar; den bör öppnas och behandlas bort från testprover och kitkomponenter för att undvika korskontaminering.
- Använd alltid rör NTC för att förbereda reaktionen utan mallkontroll.
- I slutet av varje testning, rengör arbetsytor och utrustning med en DNA/RNA-borttagare.
- Hantera efterförstärkningsplattor varsamt och kassera dem omedelbart efter testets slut; Plattorna ska alltid slängas i en lämplig behållare för biologiska risker efter användning.
- Biologiska prover måste hanteras som om de är smittsamma enligt lämpliga biosäkerhetsåtgärder.
- Rester av kemikalier och preparat betraktas generellt som farligt avfall. Omhändertagandet av denna typ av avfall regleras genom nationella och regionala lagar och förordningar.
- Alla resultat ska tolkas av en sjukvårdspersonal mot bakgrund av patientens medicinska historia och kliniska symtom.
- Detta test kan inte utesluta sjukdomar orsakade av andra patogener.
- Ett negativt resultat för något PCR-test utesluter inte entydigt risken för infektion.
- Följ god laboratoriepraxis, bär skyddskläder, bär permanent puderfria engångshandskar, använd skyddsglasögon och mask. Ät, drick eller rök inte i arbetsområdet.

9. Testningsprocedur

Läs bruksanvisningen noggrant innan du utför analysen. Var uppmärksam på att alla pipetteringssteg och experimentplattuppsättning bör utföras på is. Efter att plattan har hällts, börja omedelbart med ettstegs RT-qPCR-protokollet. Långvarig inkubation av reaktionsblandningar vid rumstemperatur kan leda till PCR-artefakter som minskar detektionskänsligheten. Före experimentet, börja försiktigt blanda de medföljande reaktionsrören, centrifugera i 5 sekunder för att samla upp innehållet i botten av röret och placera rören på is. **Vi rekommenderar starkt att pipettera SARS-CoV-2 POS (RdRp & N) sist för att undvika korskontaminering.**

9.1 Reaktionsuppställning

1. Förbered en RT-qPCR-blandning tillräckligt för att antalet SARS-CoV-2/RP-tester ska utföras med ytterligare 5% volym för pipettering. Fortsätt enligt tabellen nedan som anger volymerna för 1 och *n* test (där *n* motsvarar det totala antalet reaktioner):

KOMPONENT	1 TEST VOLYM (µL)	*n* TEST (*) VOLYM + 5% (µL)
SARS-CoV-2 MMix II, ROX (RdRp & N)(**)	10	*n* x 10.5
SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N)	2	*n* x 2.1
SLUTLIG VOLYM	**12**	***n* x 12.6**

(*) För att beräkna det totala antalet reaktioner som krävs för varje analys, räkna antalet prover och lägg till ytterligare två för kontrollen utan mall och den positiva kontrollen.

(**) Observera att en fällning kan förekomma i botten av mastermixröret. Efter att mastermixen tinats, återsuspenderas den före användning. I det här fallet, snurra inte mastermixen före pipettering.

2. Pipettera 12 µL av RT-PCR-blandningen i individuella brunnar enligt din realtids-PCR-experimentplattuppsättning.
3. För kontrollen utan mall, tillsätt 8 µL NTC istället för RNA-mall i kontrollbrunnen utan mall. Den slutliga volymen bör vara 20 µL.
4. För de biologiska proverna, tillsätt 8 µL av varje RNA-prov i SARS-CoV-2/RNase P-brunnarna, enligt din experimentplattas uppsättning. Den slutliga volymen i varje brunn bör vara 20 µL.
5. För den positiva kontrollen, tillsätt 8 µL SARS-CoV-2 POS (RdRp & N) istället för RNA-mall i den positiva kontrollbrunnen. Den slutliga volymen bör vara 20 µL.
6. Täck och försegla plattan med en lämplig optisk självhäftande film innan du fortsätter med RT-PCR och detektionsstegen.
7. Placera reaktionsplattan i realtids-PCR-instrumentet och kör RT-PCR-protokollet enligt avsnittet nedan.

9.2 Programmering av realtids-PCR-instrumentet

Tabellerna nedan visar två optimerade termiska protokoll (standard och snabb) för att utföra SARS-CoV-2/RP-tester med NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, på plattformarna som hänvisas till nedan.

- **Standardprotokoll**

CYKLAR	TEMPERATUR	TID	STEG
1	50 °C	20 min	Omvänd transkription
1	95 °C	2 min	Polymerasaktivering
40	95 °C	5 s	Denaturering
	60 °C	30 s	Sammansmältning / Förlängning *

**Välj rätt detekteringskanal beroende på vilken utrustning som används.*

Standardprotokollet för NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, validerades för följande realtids-PCR-system: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro och Bio-Rad® CFX96™. Om annan utrustning används ska satsen valideras av användaren genom att använda tidigare karakteriserade prover (både positiva och negativa).

- **Snabbprotokoll**

CYKLAR	TEMPERATUR	TID	STEG
1	50 °C	10 min	Omvänd transkription
1	95 °C	1 min	Polymerasaktivering
40	95 °C	5 s	Denaturering
	60 °C	20 s	Sammansmältning / Förlängning *

**Välj rätt detekteringskanal beroende på vilken utrustning som används.*

Det snabba protokollet för NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, validerades för följande realtids-PCR-system: Applied Biosystems® QuantStudio 5 och Bio-Rad® CFX96™. Om annan utrustning används ska satsen valideras av användaren genom att använda tidigare karakteriserade prover (både positiva och negativa).

Fluorescerande färgämnen som används i detta kit och respektive detektionskanaler är:

MÅL	FLUORESCERANDE FÄRGÄMNE**	DETEKTIONSKANALER
SARS-CoV-2, RdRp-gen	HEX™	JOE, VIC eller HEX
SARS-CoV-2, N-gen	FAM™	FAM
RNase P	Cy5™	Cy5

***Om du öppnar ROX-kanalen kan du använda denna interna passiva referensfärg för att förhindra datafeltolkning och efterföljande fel.*

10. Dataanalys

10.1 Kriterier för validering av testkörningen

Detekteringen av SARS-CoV-2 RNA utförs genom att detektera två virala genomregioner, som detekteras i olika fluorescenskanaler (FAM och HEX), och den mänskliga RP-kontrollen i en tredje kanal (Cy5). Dataanalys utförs av instrumentets programvara. Med tanke på prestandaskillnader i olika realtids-PCR-instrument, bestäms tröskelvärdena för de tre fluorescenssignalerna (FAM™, HEX™ och Cy5™) automatiskt av programvaran med manuella justeringar om detta skulle behövas. Innan du analyserar provresultat rekommenderar vi att du kontrollerar om realtids-PCR-testet är giltigt. Bekräfta därför för varje platta om resultaten för positiva och negativa kontroller fungerade som förväntat, enligt följande kriterier:

Positiv kontroll: amplifieringskurvorna för JOE (för SARS-CoV-2 RdRp-genen), FAM (för SARS-CoV-2 N-genen) och Cy5 (för RP-genen) är positiva. Positiv kontroll förväntas förstärkas vid en Ct<30, både i FAM-, JOE- och Cy5-kanalerna. Att inte uppfylla detta kvalitetskontrollkriterium är en stark indikation på att experimentet har äventyrats.

Negativ kontroll (NTC): ingen amplifiering detekteras. Om den negativa kontrollen har en, två eller tre amplifieringskurvor (JOE, FAM och/eller Cy5) med en sigmoidal form, kan provkontamination ha inträffat. Upprepa testet enligt god RT-PCR-praxis.

Om kontrollerna är enligt förväntade, är testet **giltigt**. Fortsätt med tolkningen av resultaten för de testade proverna.

Om någon av kontrollerna inte ger den förväntade prestandan har analysen äventyrats eller utförts felaktigt och bör anses **ogiltig**.
Snälla, upprepa testet.
Kontakta tillverkaren om problemet kvarstår<

10.2 Tolkning av testresultat

- **SARS-CoV-2 upptäckts** om både JOE och FAM amplifieringskurvor visar en sigmoidal form med en Ct≤36, oavsett resultatet som erhållits för RP (Cy5)-analysen.
- **SARS-CoV-2 upptäckts inte** om både JOE och FAM amplifieringskurvorna inte är positiva (Ct>36) medan RP (Cy5) visar en positiv sigmoidal kurva (Ct<40).
- **Testet är osäkert för SARS-CoV-2** om antingen JOE- eller FAM-förstärkningskurvorna inte visar en sigmoidal form med en Ct≤36 medan det andra SARS-CoV-2-målet är positivt, oavsett resultatet som erhållits för RP (Cy5) analys. Testet ska upprepas med nukleinsyra som renats om från provet.
- **Testet är ogiltigt** om SARS-CoV-2- och RP-analyserna alla är negativa.

Följande tabell sammanfattar tolkningen av huvudresultaten (utvärdera den övergripande formen på amplifieringskurvorna; **endast sigmoidala amplifieringskurvor indikerar sann amplifiering).**

SARS-CoV-2 RESULTAT SARS-CoV-2 RDRP-GEN, CT (JOE)	**SARS-CoV-2 RESULTAT** SARS-CoV-2 N-GEN, CT (FAM)	**RP RESULTAT** RP-GEN, CT (CY5)	**RESULTATTOLKNING**
+ (Ct≤36)	+ (Ct≤36)	+/-	SARS-CoV-2 upptäckt → POSITIV
+ (Ct≤36)	- (Ct>36)	+/-	SARS-CoV-2 upptäcktes endast för ett mål → INTE ÖVERTYGANDE
- (Ct>36)	+ (Ct≤36)	+/-	SARS-CoV-2 upptäcktes endast för ett mål → INTE ÖVERTYGANDE
- (Ct>36)	- (Ct>36)	+ (Ct<40)	SARS-CoV-2 inte upptäckt → NEGATIV
- (Ct>36)	- (Ct>36)	- (Ct>40)	Ogiltigt test, upprepa extraheringen och testa igen

Anmärkning 1: *NZYtech rekommenderar att analysen upprepas för alla prover som visar en tvetydig eller atypisk kurva som inte tillåter en tydlig tolkning.*

Anmärkning 2: *Tolkning av resultat måste ta hänsyn till möjligheten för falsknegativa och falskt positiva resultat.*

- Även om risken för falsknegativa resultat minskas på grund av den dubbla måldesignen i det aktuella testet, kan falsknegativa resultat orsakas av:
  - Olämplig insamling, hantering och/eller förvaring av prover.
  - Prov utanför viremisk fas.
  - Underlåtenhet att följa procedurerna i denna handbok.
  - Användning av obehörig extraktionssats eller realtids-PCR-plattform.

- Falskt positiva resultat kan orsakas av:
  - Olämplig hantering av prover som innehåller hög koncentration av SARS-CoV-2 viralt RNA.
  - Olämplig hantering av den positiva kontrollen SARS-CoV-2 POS (RdRp & N).
  - Olämplig hantering av förstärkt produkt (efterförstärkningsplatta).

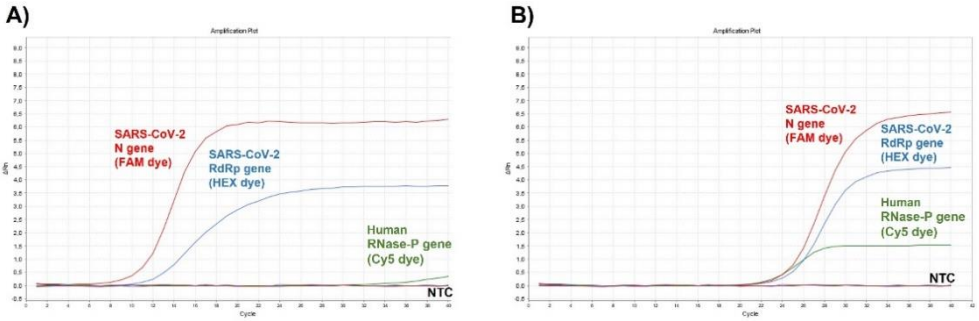
Negativa resultat utesluter inte SARS-CoV-2-infektion och bör inte användas som den enda grunden för behandling eller andra beslut om patienthantering. Dessutom kan detta test inte utesluta sjukdomar orsakade av andra bakteriella eller virala patogener.

11. Prestationsutvärdering

Utvärdering av NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, prestanda utfördes på Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro och Bio- Rad® CFX96™ realtids-PCR-system som använder standardprotokollet som beskrivs ovan. Om annan utrustning används ska satsen valideras av användaren genom att använda tidigare karakteriserade prover (både positiva och negativa).

11.1 Förväntade resultat

Typiska amplifieringsdiagram som observerats för kliniska prover innehållande SARS-CoV-2-nukleinsyror presenteras i figur 1. Fallen representerar exempel på kliniska prover som uppvisar höga (panel A) eller medelhög (panel B) SARS-CoV-2-belastningar. Observera att i fall av mycket höga SARS-CoV-2-belastningar kan kurvan för HEX™-kanalen, motsvarande den humana RNase P-genen, vara frånvarande eller uppvisa en atypisk form (Figur 1A).



Figur 1. Samtidig detektering av SARS-CoV-2 (RdRp- och N-gener) och humant RNase-P-mål från positiva kliniska prover med en hög (A) och medium (B) SARS-CoV-2-belastning. Röd kurva: detektion av SARS-CoV-2 vRNA-målet (N-genen) genom FAM-kanalen; **Blå kurva**: detektion av SARS-CoV-2 vRNA-målet (RdRp-genen) genom HEX-kanalen *(VIC/JOE-alternativ)*; **Grön kurva**: detektion av den humana RNase P-genen genom Cy5-kanalen.

11.2 Detektionsgräns (LoD) - Analytisk känslighet

Den analytiska känsligheten definierades som den lägsta koncentrationen av analyt som kunde detekteras tillförlitligt med 95% konfidens. Detta utvärderades genom att testa SARS-CoV-2-nukleinsyror vid olika antal kopior, spetsade till RNA extraherat från negativa orofaryngeala prover, med hjälp av 3 olika satser av kit, efter typiska testreaktionsförhållanden. Testerna upprepades under 3 dagar, vilket gav 96 replikat för varje testad SARS-CoV-2-koncentration. Tillsammans avslöjade data att NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD detekterar 0,25 kopior/µL eller 250 kopior/mL SARS-CoV-2 viralt RNA med en konfidens ≥95%, när standardprotokollet användes. Den preliminära LoD bekräftades av två olika operatörer som använde tre kitsatser i ett experiment med totalt 48 replikat av negativ orofaryngeal pinnmatris spikad oberoende av varandra. Samma LoD bekräftades för det snabba protokollet.

11.3 Inklusivitet, korsreaktivitet och störande ämnen

Inklusivitet och korsreaktivitet utvärderades genom *in silico* analys av oligonukleotidsonder och primrar mot patogener, nukleinsyror relaterade till SARS-CoV-2 respektive normala patogener som orsakar infektion med liknande symtom. Vid *in silico* analys visade sig analysdesignen detektera alla SARS-CoV-2-virusstammar och uppvisade ingen reaktivitet med icke-SARS-CoV-2-arter.

In vitro-analys för korsreaktivitet (exklusivitet) utfördes för att bekräfta att NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, inte reagerar med andra humana koloniserande mikrober och patogener som vanligtvis förekommer i kliniska prover. Denna studie utfördes med hjälp av tre kommersiella luftvägspatogenpaneler från ZeptoMetrix, särskilt RP Flermarkörskontroller (#MDZ001), NATtrol™ Luftvägspatogenpanel-1 (#NATRPP-1) och NATtrol™ RP Kontroller, (#NATRPC-NNS). Dessa paneler omfattar provundersökningar som är representativa för verkliga kliniska humana prover, inklusive Influensa A H3N2 (Brisbane/10/07), Influensa A H1N1 (NY02/2009), Rhinovirus typ 1A, Adenovirus typ 3; Parainfluensa typ 1, Parainfluensa typ 2, Parainfluensa typ 3, Parainfluensa typ 4, Metapneumovirus (Peru 6-2003), *Chlamydophila pneumoniae* (CWL-029), *Mycoplasma pneumoniae* (M-129), Coxsackievirus (Type A1), Influensa A H1N1 (A/New Cal/20/99), Influensa A H1N1 (A/Singapore/63/04), Influensa B (B/Florida/02/06), Respiratoriskt synkytialt virus A, Respiratoriskt synkytialt virus B (CH93 (18)-18), Coronavirus (HKU-1 rekombinant), Coronavirus (OC43), Coronavirus (NL63), Coronavirus (229E), *Bordetella. pertussis* (A639), *Bordetella pertussis* (A747), *Bordetella holmesii* (F061), *Legionella pneumophila* (Philadelphia) och Humant Bocavirus. Alla tester kördes i triplikat. Dessutom finns andra vanliga mikrober i munhålan och luftvägarna, inklusive *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* och *Streptomyces albidoflavus* testades också. Data, som samlats in med tre olika kitsatser, bekräftade att ingen av de testade organismerna störde NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD prestanda genom att generera falskt positiva resultat eller en ospecifik signal.

Effekten av 17 potentiella störande substanser utvärderades i tester som bestod av negativa nasofaryngeala prover spikade med SARS-CoV-2-positiva prover vid ~3x LoD.. Potentiellt störande ämnen tillsattes till de konstruerade proverna i koncentrationer som representerade de högsta förväntade nivåerna i humana respiratoriska patientprover baserat på litteraturdata. Alla tester utfördes i pentaplikat och resultaten jämfördes med data erhållna med ett

kontrolltest som inte innehöll några störande ämnen. Vid de testade koncentrationerna avslöjade resultaten att ingen av molekylerna som testades påverkade detektionens känslighet. Tabellen nedan återupptar data som samlats in under dessa experiment. Alla experiment kördes på 7500 FAST Realtids PCR-instrument.

POTENTIELLT STÖRANDE ÄMNE	AKTIV BESTÅNDSDEL	SLUTKONCENTRATION I PROVET	STÖRNING JA (Y) ELLER NEJ (N)
Isotoniskt havsvatten (Rhinomer)	NaCl	15% v/v	N
Halsspray, oral anestesi och smärtstillande (Strepfen)	Flurbiprofen	5% v/v	N
Nästvättlösning (allergispray - Vibrocil)	Flutikasonpropionat	5% v/v	N
Nasala kortikosteroider spray (Nasomet)	Mometasone furoate	5% v/v	N
Nasal kortikosteroidspray (Pulmicort)	Budesonid	5% v/v	N
Antimikrobiell, systemisk (Trobex)	Tobramycin	600 pg/mL	N
Munsmärtande, antiinflammatorisk och antiseptisk (Pyralvex)	Rabarberextrakt, salicylsyra	5% v/v	N
Antifungal och antibakteriell, Orofaryngeal, Topisk användning (Daktarin)	Mikonazol	5 mg/mL	N
Antiseptisk munvattenlösning (Eludril Gé)	Klorhexidinglukonat, Klorbutanolhemihydrat	5% v/v	N
Hostdämpande, Sirap (Codipront)	Kodein, Fenyltoloxamincitrat	5% v/v	N
Helblod (människa)	-	4% v/v	N
Antiviralt läkemedel (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/mL	N
Mukolytisk (Mucolsovan)	Ambroxol hydrochloride	5% v/v	N
Näsdroppar lösning (Nasarox)	Oxymetazolin klorhydrat	10% v/v	N
Antibiotika, nasal salva (Bactroban)	Mupirocin	5 mg/mL	N
Saliv (människa)	-	25% v/v	N
Absolut etanol	Alkohol	5% v/v	N

11.4 Precision

Analysprecisionen för NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, bestämdes genom upprepad testning av SARS-CoV-2-nukleinsyror som representerar två virusbelastningsnivåer, 15 (3x LoD) och 150 (30x LoD) kopior per reaktion (0,75 och 7,50 kopior/µL), spetsade till RNA extraherat från negativa orofaryngeala prover, med hjälp av 3 olika kitsatser och efter typiska testreaktionsförhållanden. Precisionen utvärderades genom att mäta Cq-medelvärde, Cq-variationskoefficient och % av replikatdetektering, som beskrivs nedan för varje fall. Uppgifterna återupptas i tabellen nedan.

11.4.1 Upprepningsbarhet

Upprepningsbarheten bedömdes av en operatör genom att analysera 12 replikat av varje prov (15 och 150 kopior per reaktion), vilket motsvarar ett slutligt antal av 24 utförda tester.

11.4.2 Daglig reproducerbarhet

Daglig reproducerbarhet bedömdes av en operatör genom att analysera 48 replikat av varje prov (15 och 150 kopior per reaktion), under 4 dagar med 12 replikat av varje koncentration per dag (totalt 120 analyser utfördes).

11.4.3 Reproducerbarhet mellan satser

Reproducerbarhet mellan partier bedömdes av en operatör genom analys av 60 replikat av varje prov (15 och 150 kopior per reaktion) med användning av 3 olika kitsatser med 20 replikat per parti.

Precision för NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD.

VARIABELT TESTAD		RDRP-GEN (KOPIER/REAKTION)		N-GEN (KOPIER/REAKTION)	
		15	150	15	150
UPPREPNINGSBARHET	n	12	12	12	12
	Genomsnittligt Cq	31,67	28,46	31,59	28,36
	Variationskoefficient (%)	1,45	0,66	1,18	0,77
	% Replikatdetektering	100	100	100	100
DAGLIG REPRODUCERBARHET	n	48	48	48	48
	Genomsnittligt Cq	32,26	28,89	32,30	28,89
	Variationskoefficient (%)	1,73	1,23	1,73	1,33
	% Replikatdetektering	98	100	98	100

REPRODUCERBARHET MELLAN SATSER	n	60	60	60	60
	Genomsnittligt Cq	32,14	28,81	32,16	28,78
	Variationskoefficient (%)	1,83	1,29	1,87	1,44
	% Replikatdetektering	98	100	98	100
OPERATÖRS-REPRODUCERBARHET	n	36	36	36	36
	Genomsnittligt Cq	31,59	28,37	31,71	28,47
	Variationskoefficient (%)	1,92	0,74	1,82	0,84
	% Replikatdetektering	100	100	100	100
REPRODUCERBARHET MELLAN INSTRUMENT	n	36	36	36	36
	Genomsnittligt Cq	31,74	28,53	32,31	29,21
	Variationskoefficient (%)	1,67	1,22	2,02	2,12
	% Replikatdetektering	100	100	100	100

11.4.4 Operatörsreproducerbarhet

Operatörens reproducerbarhet bedömdes genom att testa 36 replikat av varje prov (15 och 150 kopior per reaktion), av tre olika operatörer, med 12 replikat per operatör.

11.4.5 Reproducerbarhet mellan instrument

Reproducerbarhet mellan instrument mättes av en operatör genom att testa 36 replikat av varje prov (15 och 150 kopior per reaktion), i tre olika qPCR-instrument (Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5 och Bio-Rad® CFX96™ Real -Time PCR Systems), i totalt 72 tester per prov.

11.5 Klinisk utvärdering

Prestandan hos NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, med användning av standardprotokollet, med insamlade nasofaryngeala pinnprover, utvärderades av två externa laboratorier. Totalt har 240 kliniskt negativa och 130 kliniskt positiva prover testats. Data visade att 100% överensstämmelse uppnåddes för alla testade positiva och negativa prover. Snabbprotokollet validerades också med nasofaryngeala positiva och negativa pinnprover. Data visade att 100% överensstämmelse uppnåddes för alla testade kliniska prover.

12. Kvalitetskontroll

Alla komponenter i NZYtech SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, testas enligt protokollen som beskrivs ovan. Triplex realtids-PCR-systemet tillåter detektion av mål som beskrivs för identifiering av SARS-CoV-2 viralt RNA (RdRp- och N-gener) och humant mRNA (RNase P-gen, RP). Positiva amplifieringar observeras för målgener, positiv kontroll och interna kontroller genom FAM-, HEX/JOE/VIC- och Cy5-kanaler, enligt respektive primers/probset reporterfärgämnen.

13. Tekniskt stöd

För tekniskt stöd, vänligen kontakta vårt dedikerade tekniska supportteam via telefon: +351 (0) 21 364 35 14 eller e-post: info@nzytech.com.

14. Varumärken och ansvarsfriskrivningar

Alla varumärken som förekommer i den här bruksanvisningen tillhör sina respektive ägare.

15. Förklaring av symboler

IVD	Medicinsk utrustning för *in vitro*-diagnostik		Se bruksanvisningen
REF	Katalognummer		Tillverkare
LOT	Satskod		Senast använda datum
	Temperaturbegränsning		Tillräckligt för
CONTROL +	Positiv kontroll		Håll borta från solljus (primer/sondmix)
CONTROL –	Negativ kontroll		

16. Försäkran om överensstämmelse

Produktnamn: SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD

Katalognummer: MD04871 och MD04872

Avsedd användning: SARS-CoV-2 kvalitativ detektion

Klassificering: Andra (inte omfattas av bilaga II eller inte avsett självtestning) Enligt Rådets Direktiv 98/79/EG

Tillverkare: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Vi, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, förklarar härmed att denna produkt, som denna försäkran om överensstämmelse avser, överensstämmer med följande standarder och andra normativa dokument ISO 9001:2015 och ISO 13485:2016, enligt bestämmelserna i 98/79/EG-direktivet och av förordningen (EU) 2017/746 om medicintekniska produkter för *in vitro*-diagnostik som införlivats med den nationella lagstiftningen i Europeiska unionens medlemsstater.

Produktens tekniska fil bevaras på NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.

Joana Brás, PhD

Teknisk direktör

17. Referenser

WHO: Klinisk hantering av allvarlig akut luftvägsinfektion (SARI) vid misstanke om covid-19-sjukdom. 13 mars 2020. Tillgänglig online på https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf

WHO: Frågor och svar: Influensa och covid-19 - likheter och skillnader. 17 mars 2020. Tillgänglig online på 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). Coronavirus 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