



Komplet za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD)

Virusni geni RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i fosfoprotein nukleokapside (N)

REF

MD04831, 96 reakcija

MD04832, 4 x 96 reakcija

Samo za profesionalnu in-vitro dijagnostiku



Upute za uporabu

IM-002hr

VERZIJA 13/2021, prosinac 2021.



NZYTech genes & enzymes

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisabon, Portugal

Tel.: +351.213643514 Faks: +351.217151168

www.nzytech.com

Sadržaj

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

1. Uvod

U prosincu 2019. u Kini je prijavljena nova akutna bolest dišnih putova pod nazivom koronavirusna bolest 2019 (COVID-19, od engl. Coronavirus Disease 2019) koja se ubrzo proširila po cijelom svijetu. Utvrđeno je da je njen uzročnik koronavirus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2). Virus (prvotno nazvan 2019-nCoV), kao i njemu blizak SARS koronavirus (SARS-CoV), pripada soju *Betacoronavirus* iz obitelji koronavirusa. Koronavirusi su jednolančani pozitivno usmjereni RNK virusi s ovojnicom kojima se inficiraju ljudi, ali i mnoge životinje. Smatra se je virus SARS-CoV-2 zoonotskog porijekla i vjerojatno se sa velikih tržnica morskih plodova i životinja proširio kontaktom ljudi sa životinjama u gradu Wuhanu. Novi koronavirus vrlo je zarazan i prvenstveno se prenosi kapljičnim putem (kašljanjem i kihanjem). Rano otkrivanje virusa SARS-CoV-2 ključno je za brzo davanje terapije oboljelima, čime se smanjuje širenje infekcije. Najčešće kliničke manifestacije bolesti COVID-19 uključuju umor, povisenu temperaturu i simptome bolesti donjeg dijela dišnog sustava, poput kašja i otežanog disanja. Može se javiti i gubitak mirisa i okusa. U najkritičnijim stanjima infekcija se razvija u teški oblik upale pluća s komplikacijama koje mogu ugroziti život, poput akutnog respiratornog sindroma, disfunkcije organa i smrti. Na temelju postojećih saznanja, veliki dio infekcija ima blagi ili asimptomatični oblik. Određeni postotak populacije osjetljiviji je na teške oblike bolesti, a to su starije osobe (iznad 60 godina), pušači i osobe s kroničnim bolestima kao što su bolesti srca i pluća, rak, dijabetes i osobe s oslabljenim imunosnim sustavom. Trenutačno nije dostupna posebna terapija ili cjepivo protiv infekcije virusom SARS-CoV-2.

2. Namjena

NZYTech komplet za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za *in vitro* dijagnostiku (IVD) je molekularni test namijenjen brzoj i kvalitetnoj detekciji nukleinskih kiselina koronavirusa SARS-CoV-2 u uzorcima brisa nazofarinkska i orofarinkska uzetima od bolesnika. Pozitivan nalaz upućuje na prisutnost RNK virusa SARS-CoV-2 ali je za utvrđivanje infekcije kod bolesnika potrebno uzeti anamnezu i druge informacije za postavljanje dijagnoze. Negativan nalaz ne isključuje infekciju virusom SARS-CoV-2 i ne bi ga trebalo koristiti kao jedinu osnovu za donošenje odluke o postupanju s bolesnikom. Komplet je namijenjen laboratorijskom osoblju, stručno ospozobljenom za primjenu tehnika PCR testiranja u realnom vremenu i za *in vitro* dijagnostiku.

3. Načela ispitivanja

Komplet za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za *in vitro* dijagnostiku (IVD) sadrži set svih reagensa i proba za kvalitetno detektiranje genoma virusa SARS-CoV-2, na uobičajenim platformama za PCR testiranje (specifikacije potrebnih instrumenata pogledajte u **Poglavlju 6**). Virusni geni RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i fosfoprotein nukleokapside (N) ranije su identificirani kao vrlo specifični biljezi virusa SARS-CoV-2. Ovaj NZYTech komplet cilja specifične regije gena RdRp i N genoma virusa SARS-CoV-2, kako bi osigurao najvišu osjetljivost detekcije—Početnice i probe kompleta za virus SARS-CoV-2 imaju 100 %-tnu homologiju s >95 % sekvenci od >5M sekvenci genoma dostupnih u bazi podataka GISAID, od studenog 2021., uključujući potpuni identitet varijanti virusa Delta (B.1.617.2) i Omicron (B.1.1.529). Osim toga, početnice i probe usmjerene na virus SARS-CoV-2 ne prikazuju značajnu homologiju s nepovezanim genomima, što ovaj test

čini iznimno specifičnim jer ne postoji unakrsna reakcija s nukleinskim kiselinama drugih virusnih i bakterijskih organizama u dišnom sustavu. Uključena je i interna kontrola za potvrdu učinkovite ekstrakcije RNK iz ljudskog biološkog uzorka i, među ostalim, odsutnost inhibitora PCR reakcije. Uz to, test koristi vanjske kontrole (pozitivnu kontrolu niskog titra koja je dio kompleta i negativnu kontrolu), kako je opisano u nastavku. Pozitivnu kontrolu čine fragmenti nukleinske kiseline koji sadrže tri ciljane sekvene koje komplet detektira (SARS-CoV-2, gen RdRp i gen N te ljudski RP gen). Prirodna evolucija virusa SARS-CoV-2 podrazumijeva da će nakon početnog osmišljavanja ovog kompleta biti dostupne i informacije o novim sekvenama, koje odražavaju načine prilagođavanja virusa SARS-CoV-2. Stoga NZYTech redovito provjerava genomske ciljeve virusa SARS-CoV-2 te će, ako to bude potrebno, izdati nove verzije ovog kompleta.

Kvalitativna detekcija RNK temelji se na tehnologiji RT-PCR testiranja u jednom koraku u realnom vremenu, jer je to i dalje najosjetljivija metoda učinkovitog otkrivanja virusa SARS-CoV-2. Korištenjem kompleta za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD) RNK koja je izolirana i pročišćena sustavom za ekstrakciju CE IVD retrotranskribira se u cDNA i potom pojačava s pomoću PCR-a, jednom reakcijom, s pomoću tri vrlo specifična kompleta početnice/probe primjenom tzv. TaqMan® načela. Tijekom ovog procesa, probe se posebno vežu na početnice dviju regija genoma virusa SARS-CoV-2, i to gen RdRp (unutar poliproteina Orf1ab) i gen N, ako je uzorak uzet od zaraženog bolesnika. Dodatan komplet početnica/proba djeluje kao endogena interna kontrola za otkrivanje nukleinskih kiselina ljudske ribonukleaze P [RNase P gen (RP)], kojom se ocjenjuje kvaliteta uzorka. Uz to, interna kontrola pokazuje da nije nastupila nikakva inhibicija reakcije inhibitorima PCR koji mogu biti prisutni u kliničkim/okolišnim uzorcima. Kako bi se omogućilo identificiranje amplifikacije triju specifičnih ciljeva jednom reakcijom, probe su različito označene, i to bojom FAM™ specifičnom za virus SARS-CoV-2 i JOE™ specifičnom za ljudski RNase P. Napominjemo da ova ploča sadrži dvostruko ispitivanje u istom optičkom FAM kanalu, kako bi se prijavio i dodatni uspješan rezultat dva PCR testiranja za otkrivanje virusa SARS-CoV-2. Uz to, komplet sadrži i optimizirane koncentracije kako bi se osiguralo da amplifikacija ljudske mRNA, čak i kad je prisutna u vrlo visokim koncentracijama, ne ograničava učinkovitost kompleta početnica/proba za SARS-CoV-2.

4. Sadržaj kompleta

Komplet za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD) sadrži sveobuhvatan komplet reagenasa dovoljan za obavljanje 96 RT-PCR reakcija u jednom koraku.

Komponenta		Volumen (po bočici)	Broj tubica	
			MD04831	MD04832
SARS-CoV-2 MMix (RdRp i N)	NZYSupreme One-step RT-qPCR Master Mix (mješavina Master)	1050 µl	1	4
SARS-CoV-2 PPMix (RdRp & N)	SARS-CoV-2(geni RdRp i N)/RP mješavina početnice/probe (oznake FAM™ i JOE™)	205 µl	1	4
SARS-CoV-2 Pos (RdRp & N)	SARS-CoV-2(geni RdRp i N)/RP pozitivna kontrola (1×10^4 kom/µL)	105 µl	1	4
NTC	No-template Control	105 µl	1	4

5. Uvjeti čuvanja, održavanja stabilnosti i rukovanja

Komplet za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD) isporučuje se ohlađen. Sve komponente moraju se odmah po dolasku spremiti na -30°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.
- SARS-CoV-2(geni RdRp i N)/RP mješavinu početnice/probe treba čuvati zaštićenu od svjetla. Posebno pripazite da mješavinu NZYSupreme One-step RT-qPCR Master nakon kombiniranja s mješavinom početnica/probe 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 fluorescentne boje FAM™ i JOE™/VIC®/HEX™ (pri emisiji pripadajućih valnih dužina od 520 odnosno 555/554/556 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 uzorka

Za postizanje optimalnih rezultata ključni su različiti faktori, poput protokola za uzimanje uzorka iz ljudskog dišnog sustava (brisevi nazofarinks i orofarinks), prijevoz uzorka te čuvanje i trajanje obrade. 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 komplet za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (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 u realnom vremenu, 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 uzorka.

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 ovome 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 nekontaminiranim.

8.1 Sigurnosne informacije

Prije uporabe kompleta proučite Sigurnosno-tehnički list dostupan na mrežnoj stranici NZYTech-a (www.nzytech.com). Otkrivanje virusa SARS-CoV-2 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 filterom bez DNase/RNase kako biste sprječili kontaminiranje aerosola i tekućine.
- Pripremu uzoraka, utvrđivanje reakcije i amplifikaciju treba obavljati u različitim radnim prostorima.
- Positivna kontrola sadrži veliki broj kopija predloška; nju treba otvoriti i obraditi podalje od testnih uzoraka i komponenti kompleta, kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija.
- Uvijek koristite NTC tubice iz kita.
- 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.
- Ovim testom ne mogu se isključiti bolesti koje uzrokuju drugi patogeni organizmi.
- 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, pitи 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 ledu. Čim je pločica popunjena odmah započnite protokol RT-PCR u jednom koraku. Produljenom inkubacijom mješavina za reakciju na sobnoj temperaturi mogu nastati artefakti PRC-a koji smanjuju osjetljivost detekcije. Prije početka eksperimenta, počnите 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 SARS-CoV-2(gena RdRp i N)/RP pozitivne kontrole obavite na kraju, kako bi se izbjegla unakrsna kontaminacija.**

9.1 Određivanje reakcije

1. Pripremite dovoljno mješavine RT-PCR za broj testiranja SARS-CoV-2/RNase P 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)
SARS-CoV-2 MMix	10	$n \times 10,5$
SARS-CoV-2 PPMix	2	$n \times 2,1$
Konačan volumen	12	$n \times 12,6$

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

2. 12 μL mješavine za RT-PCR 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. Konačan volumen treba biti 20 μL .
4. Za biološke uzorke, 8 μL svakog uzorka RNK dodajte u jažice SARS-CoV-2/RNase P, prema pripremljenoj pločici za testiranje. Konačan volumen u svakoj jažici treba biti 20 μL .
5. Za pozitivnu kontrolu, umjesto RNK predloška u jažicu za pozitivnu kontrolu dodajte 8 μL SARS-CoV-2 Neg (RdRp & N). Konačan volumen treba biti 20 μL .
6. Prije nastavka RT-PCR 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-PCR provedite u skladu s uputama u sljedećem poglavljju.

9.2 Programiranje PCR instrumenta u realnom vremenu

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

Predložene postavke za provođenje RT-qPCR testa

Ciklusi	Temperatura	Vrijeme	Korak
1	50 °C	20 min	Reverzna transkripcija
1	95 °C	2 min	Aktivacija polimeraze
40	95 °C	5 sek	Denaturacija
	60 °C	30 sek	sljepljivanje početnica/elongacija*

*ovisno o opremi koja se koristi odaberite odgovarajući kanal detekcije. Signali sakupljanja (FAM i JOE/VIC/HEX).

Fluorescentne boje i kanali detekcije

Ciljevi	Fluorescentna boja	Kanali detekcije
SARS-CoV-2	FAM™	FAM
RNase P	JOE™	JOE, VIC ili HEX

Komplet za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD) odobren je za sljedeće sustave za PCR testiranje u realnom vremenu: Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® StepOnePlus, Roche Life Science LightCycler® 480 II, Applied Biosystem® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q 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

Otkrivanje RNK virusa SARS-CoV-2 obavlja se detekcijom dviju regija ciljnih genoma, koje se obje detektiraju istim fluorescentnim kanalom (FAM™). Analizu podataka obavlja računalni program instrumenta. Uzimajući u obzir razlike različitih instrumenata za PCR testiranje u realnom vremenu, računalni program prag za dva fluorescentna signala (FAM™ i JOE™) utvrđuje automatski, uz mogućnost ručnog podešavanja ako je to potrebno. Prije analize rezultata uzorka, 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:

Pozitivna kontrola: krivulje amplifikacije za FAM™ (SARS-CoV-2, gene RdRp i N) i JOE™ (RP) su pozitivne. Očekuje se da se pozitivne kontrole amplificiraju pri Ct<30, kako u FAM tako i u JOE/VIC/HEX kanalima. Neispunjavanje ovog kriterija kontrole kvalitete bitan je pokazatelj da je eksperiment kompromitiran.

Negativna kontrola (nema reakcije na predlošku): nije otkrivena amplifikacija. Ako amplifikacija negativne kontrole ima jednu ili više sigmoidalnih krivulja (FAM i/ili JOE/VIC/HEX kanali), postoji mogućnost da je došlo do kontaminacije uzorka. Ponovite testiranje u skladu s dobrom praksom RT-PCR testiranja.

Ako su kontrole u skladu s očekivanima, 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 **nevažećim**.

Ponovite testiranje

Ako se problem ponavlja obratite se proizvođaču

10.2 Interpretacija rezultata testiranja

Virus SARS-CoV-2 otkriven je ako amplifikacija FAM™ ima sigmoidalnu krivulju i Ct≤35, neovisno o rezultatu dobivenom RP (JOE™) ispitivanjem.

SARS-CoV-2 nije otkriven ako krivulja FAM™ nije pozitivna (Ct>35), a RP (JOE™) prikazuje pozitivnu sigmoidalnu krivulju (Ct<40).

Test nije važeći ako su i SARS-CoV-2 i RP ispitivanja 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 SARS-CoV-2, Ct (FAM™)	rezultat RP RP, Ct (JOE™)	Interpretacija rezultata
+ (Ct≤35)	+ (Ct<40)	SARS-CoV-2 otkriven → POZITIVAN
+ (Ct≤35)	- (Ct>40)	SARS-CoV-2 otkriven → POZITIVAN
- (Ct>35)	+ (Ct<40)	SARS-CoV-2 nije otkriven → NEGATIVAN
- (Ct>35)	- (Ct>40)	Test nije valjan, ponovite ekstrakciju i ponovite 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 virusa SARS-CoV-2.
- nepravilnog rukovanja pozitivnom kontrolom SARS-CoV-2 Pos (RdRp i N).
- nepravilnog rukovanja amplificiranim proizvodom (postamplifikacijska pločica).

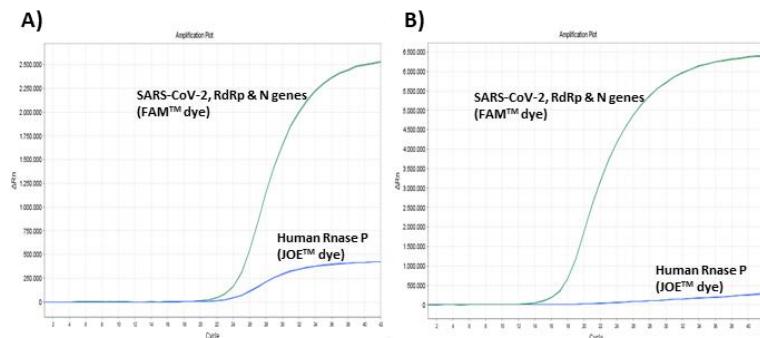
Negativan nalaz ne isključuje infekciju virusom SARS-CoV-2 i ne bi ga trebalo koristiti kao jedinu osnovu za donošenje odluke o liječenju ili drugom obliku postupanja s bolesnikom. Nadalje, ovim se testom ne mogu isključiti bolesti koje uzrokuju drugi bakterijski ili virusni patogeni organizmi.

11. Ocjena uspješnosti

Ocjena uspješnosti kompleta za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD) provedena je na Applied Biosystem® 7500 FAST, Roche Life Science LightCycler 480 instrument II, Applied Biosystem® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q i Bio-Rad® CFX96™ sustavima za PCR testiranje u realnom vremenu uz dodatno testiranje na sustavu za PCR testiranje u realnom vremenu Applied Biosystem® StepOnePlus. Ako se koristi neka druga oprema, komplet treba odobriti korisnik korištenjem prethodnih karakteriziranih uzoraka (pozitivnih i negativnih).

11.1 Očekivani rezultati

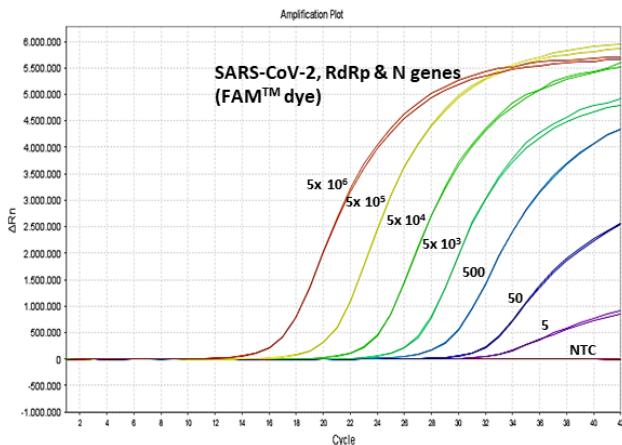
Tipični dijagrami amplifikacije za klinički uzorak koji sadrži nukleinske kiseline virusa SARS-CoV-2 prikazani su na slici 2. Dva slučaja predstavljaju primjere kliničkih uzoraka sa srednjim (A) i visokim (B) opterećenjem virusom SARS-CoV-2. U slučaju vrlo visokih opterećenja virusom SARS-CoV-2 (slika 1B) krivulja kanala JOE™, koji odgovara ljudskom genu RNase P, može izostati ili se prikazati u netipičnom obliku.



Slika 1. Simultano otkrivanje ciljeva SARS-CoV-2 (geni RdRp i N) i ljudskog RNase-P iz pozitivnih kliničkih uzoraka sa srednjim (A) i visokim (B) opterećenjem virusom SARS-CoV-2. Zelene krivulje (A i B): detekcija ciljeva virusne RNK virusa SARS-CoV-2 (geni RdRp i N) kanalom FAM; plave krivulje (A i B): detekcija ljudskog gene RNase P kanalom JOE™. (* VIC/HEX alternativa)

11.2 Ograničenje detekcije (LoD) - Analitička osjetljivost

Analitička osjetljivost definirana je kao najniža koncentracija analita koja se može pouzdano detektirati s pouzdanošću od 95 %. Ocjenjivana je ispitivanjem nukleinskih kiselina virusa SARS-CoV-2 s različitim brojem kopija, pojedinačno ili uz dodani standard (engl. *spiked*) u RNK ekstrahiranu iz negativnog uzorka orofarinks, 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 virusa SARS-CoV-2. Sakupljeni podaci otkrili su da komplet za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD) otkriva 0,5 kopija/ μ L virusne RNK virusa SARS-CoV-2 pouzdanošću od $\geq 95\%$. Tako je utvrđeno da pokusno ograničenje detekcije (LoD) iznosi 0,15 kopija/ μ L ili 150 kopija/mL. Pokusno ograničenje detekcije potvrdila su dva različita voditelja koji su koristili tri serije kompleta u jednom eksperimentu od ukupno 48 replikata matrice negativnog brisa orofarinks kojima su standardi dodavani (engl. *spiked*) neovisno jedan o drugome. Sposobnost kompleta za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD) za otkrivanje virusa pri različitim opterećenjima (od 5×10^6 do 5 kopija po reakciji) prikazana je na slici 2.



Slika 2. Osjetljivost kompleta za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD) Dijagram amplifikacije (broj ciklusa *naspram* fluorescenciji - ΔRn) za 1:10 serijskih razrjeđivanja SARS-CoV-2 vRNA, od 5×10^6 kopija do 5 kopija po reakciji kroz kanal FAM™. NTC, od eng. No Template Control, bez kontrole predloška (negativna kontrola)

11.3 Inkluzivnost, unakrsna reaktivnost i interferirajuće tvari

Inkluzivnost i unakrsna reaktivnost procijenjene su *in silico* analizom oligonukleotidnih sondi i početnica protiv patogena povezanih sa SARS-CoV-2 i uobičajenih patogena koji uzrokuju infekciju sa sličnim simptomima. Nakon analize *in silico*, utvrđeno je da dizajn testa otkriva sve sojeve virusa SARS-CoV-2 i ne pokazuje reaktivnost s vrstama koje nisu SARS-CoV-2.

Provedena je *in vitro* analiza za unakrsnu reaktivnost (ekskluzivnost) kako bi se potvrdilo da NZYTech SARS-CoV-2 RT-PCR kit u jednom koraku, RdRp i N geni (IVD) (MD0483) ne reagira s drugim organizmima ljudskog mikrobioma i uobičajenim patogenim organizmima koji se mogu

susresti u kliničkim uzorcima. Ova studija je provedena korištenjem tri komercijalna panela respiratornih patogena dobivenih iz ZeptoMetrix multi markerskih kontrola (#MDZ001), NATtrol™ Respiratory Pathogen Panel-1 (#NATRPP-1) i NATtrol™ RP Controls, (#NATRPC-NNS). Ovi paneli se sastoje od uzoraka i predstavljaju prave kliničke ljudske uzorce, uključujući gripu tipa A H3N2 (Brisbane/10/07), gripu tipa A H1N1 (NY02/2009), rinovirus tipa 1A, adenovirus tipa 3; parainfluenca tipa 1, parainfluenca tipa 2, parainfluenca tipa 3, parainfluenca tip 4, Metapneumovirus (Peru 6-2003), *Chlamydophila pneumoniae* (CWL-029), *Mycoplasma pneumoniae* (M-129), Influenza Avirus (TN1211) A/New Cal/20/99), Influenca tipa A H1N1 (A/Singapur/63/04), Influenca tipa B (B/Florida/02/06), respiratori sincicijski virus A, respiratori sincicijski virus B (CH93 (18)- 18), koronavirus (HKU-1 rekombinantni), koronavirus (OC43), koronavirus (NL63), koronavirus (229E), *Bordetella pertussis* (A639), *Bordetella pertussis* (A747), *Bordetella holmesii* (F061), *Legionella pneumophila* (Philadelphia) i humani bocavirus. Osim tog testirani su i drugi uobičajeni mikroorganizmi oralnog i respiratornog trakta, uključujući *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* i *Streptomyces albidoflavus*. Nijedan od testiranih organizama nije ometao izvedbene karakteristike NZYTech SARS-CoV-2 RT-PCR kompleta u jednom koraku, RdRp i N gena (IVD) u pogledu generiranja lažno pozitivnih rezultata ili nespecifičnih signala.

Utjecaj 17 potencijalnih interferenčnih tvari procijenjen je u testovima koji su se sastojali od negativnih uzoraka nazofarinks s dodanim SARS-CoV-2 pozitivnim uzorcima pri konc. od $\sim 3x$ LoD. Potencijalne interferirajuće tvari dodane su u testne uzorce u koncentracijama koje predstavljaju najviše očekivane razine u respiratornim uzorcima pacijenata na temelju literaturnih podataka. Svi testovi izvedeni su u pet ponavljanja i rezultati su uspoređeni s podacima dobivenim kontrolnim testom koji nije sadržavao interferentne tvari. Na testiranim koncentracijama rezultati su pokazali da niti jedna od testiranih tvari nije utjecala na osjetljivost detekcije. Tablica u nastavku prikazuje podatke prikupljene u okviru ovih eksperimenata. Svi eksperimenti su izvedeni na 7500 FAST Real-time PCR instrumentu.

Potencijalni interferenti	Aktivna tvar	Konačna koncentracija u uzorku	Interferencija Da (D) ili Ne (N)
Izotonična otopina (Rhinomer)	NaCl	15% v/v	N
Sprej za grlo, orlni anestetik i analgetik (Strepfen)	Flurbiprofen	5% v/v	N
Otopina za ispiranje nosa (Vibrocil)	flutikazon propionat	5% v/v	N
Sprej za nos s kortikosteroidima (Nasomet)	mometazonfuroat	5% v/v	N
Sprej za nos s kortikosteroidima (Pulmicort)	Budesonid	5% v/v	N
Trobex	trombamicin	10 µg/ml	N
Analgetik za usta, protuupalno i antiseptično (Pyralvex)	ekstrakt rabarbare, salicilna kiselina	5% v/v	N
Antifungalna i antibakterijska krema (Daktarin)	Mikonazol	5 mg/ml	N
Antiseptik otopina za ispiranje usta (Eludril Gé)	klorheksidin glukonat, klorbutanol hemihidrat	5% v/v	N
Antitusik, sirup (Codipront)	kodein, fenitoloksamini citrat	5% v/v	N
Puna krv (ljudska)	-	4% v/v	N
Antivirusni lijekovi (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/ml	N
Mukolitici (Mucolosvan)	ambroksol hidroklorid	5% v/v	N
Kapi za nos (Nasarox)	oksimetazolin klorhidrat	10% v/v	N
Antibiotik, nasal ointment (Bactroban)	muropicin	5 mg/ml	N
Slina (ljudska)	-	25% v/v	N
Apsolutni etanol	alkohol	5% v/v	N

11.4 Preciznost

Preciznost ispitivanja kompleta za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD) utvrđena je ponovljenim testiranjem nukleinskih kiselina virusa SARS-CoV-2 koje predstavlja dvije virusne razine 5 (1,67x LoD) i 150 (50x LoD) kopija po reakciji (0,25 i 7,50 kopija/ μ L), ili uz dodani standard (engl. spiked) u RNK ekstrahiranu iz negativnih uzoraka orofarinks, s pomoću tri različite serije kompleta uz praćenje standardnih uvjeta reakcije na testiranje.. Preciznost se ocjenjivala mjerjenjem prosjeka Cq, Cq koeficijenta varijacije i postotka detekcije replikata, kako je u nastavku opisano za svaki pojedini slučaj. Podaci su sažeto prikazani u tabeli na sljedećoj stranici.

11.4.1. Ponovljivost

Ponovljivost je ocjenjivao jedan voditelj analizom 36 replikata istog uzorka (5 i 150 kopija po reakciji), što ukupno čini 72 provedena testiranja.

Preciznost NZYTech kompleta za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD)

Testirana varijabla	SARS-CoV-2 (kopija/reakcija)	
	5	150
Ponovljivost		
n	36	36
Srednji Cq	31,72	26,30
Koeficijent varijacije (%)	1,94	1,60
% detekcije replikata	100	100
Dnevna reproducibilnost		
n	72	72
Srednji Cq	31,42	26,13
Koeficijent varijacije (%)	1,50	1,55
% detekcije replikata	100	100
Reproducibilnost „Lot-to-lot“		
n	144	144
Srednji Cq	31,49	26,24
Koeficijent varijacije (%)	1,61	1,46
% detekcije replikata	100	100
Reproducibilnost po voditelju		
n	72	72
Srednji Cq	31,45	26,21
Koeficijent varijacije (%)	1,41	1,61
% detekcije replikata	100	100
Reproducibilnost među instrumentima		
n	72	72
Srednji Cq	31,81	26,46
Koeficijent varijacije (%)	1,61	1,35
% detekcije replikata	100	100

11.4.2. Dnevna reproducibilnost

Dnevnu reproducibilnost (reproducibilnost unutar laboratorija) ocjenjivao je jedan voditelj analizom 72 replikata svakog uzorka (5 i 150 kopija po reakciji), tijekom četiri dana s 18 replikata svake koncentracije dnevno (ukupno je obavljeno 144 ispitivanja).

11.4.3. Reproducibilnost „Lot-to-lot“

Reproducibilnost među lotovima (engl. Lot-to -lot) ocjenjivao je jedan voditelj analizom 144 replikata svakog uzorka (5 i 150 kopija po reakciji) s pomoću tri različite serije kompleta s 48 replikata po seriji.

11.4.4. Reproducibilnost po voditelju

Reproducibilnost po voditelju ocjenjivali su testiranjem 72 replikata svakog uzorka (5 i 150 kopija po reakciji) četiri različita voditelja, po 36 replikata svaki.

11.4.5. Reproducibilnost među instrumentima

Reproducibilnost među instrumentima mjerio je jedan voditelj testiranjem 36 replikata svakog uzorka (5 i 150 kopija po reakciji), u dva različita qPCR instrumenta (Applied Biosystem® 7500, Applied Biosystem® StepOnePlus), s ukupno 72 testiranja po uzorku.

11.5 Klinička evaluacija

Uspješnost kompleta za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD), s uzetim uzorcima brisa nazofarinksa, ocjenjivala se u dva vanjska laboratoriјa. Ukupno je testirano 180 klinički negativnih i 180 klinički pozitivnih uzoraka. Podaci u utvrdili 100 %-tно poklapanje za sve pozitivne i negativne testirane uzorke.

12. Kontrola kvalitete

Sve komponente NZYTech Kompleta za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za in vitro dijagnostiku (IVD) ispituju se u skladu s ranije navedenim protokolima. Tripleks sustav za PCR testiranje u realnom vremenu omogućuje detekciju ciljeva navedenih za identifikaciju virusne RNK virusa SARS-CoV-2 (gena RdRp i gena N) i ljudskog mRNA (gena RNase P, RP). Pozitivne amplifikacije uočene su za ciljane gene, pozitivnu kontrolu i interne kontrole kroz kanale FAM i JOE/VIC/HEX, 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. Objasnjenje simbola

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

16. Izjava o sukladnosti

Naziv proizvoda: Komplet za RT-PCR testiranje u jednom koraku na SARS-CoV-2, gene RNK ovisne RNK polimeraze (RdRp) i nukleokapside (N), za *in vitro* dijagnostiku (IVD)

Kataloški broj: MD04831

Namjena: kvalitativna detekcija virusa SARS-CoV-2

Proizvođač: NZYTech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

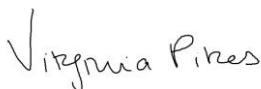
Edifício E, R/C,

1649-038, Lisbon

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, temeljem odredbi Direktive 98/79/EC o *in vitro* dijagnostičkim medicinskim uređajima 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 Lisbon, Portugal.



dr.sc. Virgínia Pires

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: Influenca 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>



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