

SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 и RNase P Multiplex

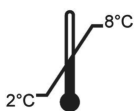
REF 400-058-E-HMP

 24/48 Реакции

Инструкции за употреба

За диагностична употреба *in vitro*

За използване с реагенти за отворена система BD MAX™ на система BD MAX™ Система, Bio-Rad CFX96 Touch™ и приложими биосистеми QuantStudio™ 5



BioGX BV
Science Park 408, 1098 XH, Amsterdam,
Нидерландия
Телефон: +31.20.893.4261
Факс: +31.20.240.9149



Straker Translations
Level 2, 49 Parkway drive, Rosedale
Auckland, 0632
Нова Зеландия
Телефон: +64 9 801 0648

СОБСТВЕНО ИМЕ

BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 и RNase P Multiplex

ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 и RNase P Multiplex е анализ за обратна транскриптаза, полимеразна верижна реакция (PCR) в реално време за използване на платформи BD MAXTM, Bio-Rad CFX96 TouchTM и Applied Biosystems QuantStudioTM 5 за качествено откриване на наличието на РНК от нуклеокапсиден фосфопротеинов ген (N ген) на коронавируса SARS-CoV-2 и човешки RNase P ген. Комплектите праймер и сонда се основават на анализ на Центровете за контрол и превенция на заболяванията на САЩ (US CDC) за специфично откриване на SARS-CoV-2 чрез амплифициране на два уникални региона на N гена (т.е. N1 и N2)^{1,2,3}. Откриването на човешкия RNase P ген служи като ендегенен контрол за обработка на проби (SPC). Потвърдени са следните видове проби:

- Вземане на назофарингеален тампон
 - Физиологичен разтвор (0,85% NaCl), универсална транспортна медия Соран (UTM[®]) и BD универсален вирусен транспорт (UVT)
- Вземане на орофарингеален тампон
 - Физиологичен разтвор (0,85% NaCl), универсална транспортна медия Соран (UTM[®]) и BD универсален вирусен транспорт (UVT)

Анализът може да се извърши на BD MAXTM автоматизирано извличане на нуклеинова киселина и инструмент за PCR в реално време при използване на лента за извличане TNA-s BD MAXTM ExKTM TNA-3 и придружаващия я BioGX UDP файл. А PCR анализът в реално време може да се извърши и на Bio-Rad CFX96 TouchTM и Applied Biosystems QuantStudioTM 5 с помощта на пречистена вирусна РНК, екстрактирана и пречистена с помощта на валидирани магнитни зърна или колона със силициев диоксид при използване на метод за екстракция на нуклеинова киселина.

Реагентът BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex специфично се насочва към човешкия RNase P ген, за да служи като ендегенна РНК за контрол на обработката на проби (SPC). Тази SPC служи като контрола за извличане на нуклеинови киселини от пробата и като вътрешна контрола за усилването. Не се изисква външно добавяне на SPC от потребителя.

Мултиплексният PCR анализ се предоставя в BioGX Sample-Ready™ лиофилизиран формат в епруветка с винтова капачка от 2 ml. Всяка епруветка съдържа всички PCR компоненти, като праймери, сонди, ензими, dNTPs, MgCl₂ и буфери, необходими за базирано на PCR тестване в реално време на 24 BD MAX™ проби или 48 проби, анализирани на Bio-Rad CFX96 Touch™ или Applied Biosystems QuantStudio™ 5.

Търговската марка BD MAX е собственост на Becton Dickinson и компания

Търговската марка Bio-Rad CFX96 Touch™ е собственост на Bio-Rad Laboratories

Търговската марка Applied Biosystems QuantStudio 5 е собственост на ThermoFisher Scientific

ОБОБЩЕНИЕ И ОБЯСНЕНИЕ

Тежък остър респираторен синдром 2 (SARS-CoV-2) е новият бетакоронавирус, който причинява респираторното заболяване COVID-19. Респираторното заболяване COVID-19 се предава сред заразените хора в популациите чрез респираторни капчици при говорене, кашляне и кихане^{4,5}. Симптомите на COVID-19 варират от леко заболяване (суха кашлица, умора, треска и задух) до тежко заболяване и смърт⁴.

COVID-19 беше идентифициран за първи път на 31 декември 2019 г. сред пациенти, страдащи от пневмония в Ухан, Китай^{4,5}. SARS-CoV-2 е седмият коронавирус, идентифициран като човешки патоген, който вероятно е еволюирал в животински гостоприемник или в хора след зоонозно предаване⁶.

Към 11 април 2020 г. WHO е потвърдила 1 610 909 инфекции със SARS-CoV-2 и 99 960 смъртни случая на SARS-CoV-2 в световен мащаб⁵. Доказано е, че възрастните хора, имунокомпрометираните и тези със сърдечно-съдови заболявания, диабет и хронични респираторни заболявания са изложени на по-висок риск от тежко заболяване^{4,5}. Преди глобалните усилия за ваксиниране, тестването на пациенти и мерките за социално дистанциране, наложени от световните правителства, се оказаха единственият начин за спиране на скоростта на предаване.

ПРИНЦИПИ НА ПРОЦЕДУРАТА

BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex трябва да се използва с някоя от следните платформи:

1. Отворената система BD MAXTM за автоматизирана обработка на проби от пациенти и молекулярен анализ. Системата BD MAXTM използва комбинация от литични и екстракционни реагенти за извършване на клетъчен лизис и екстракция на нуклеинова киселина. След ензимен клетъчен лизис при повишена температура, освободените нуклеинови киселини се улавят от зърна с магнитен афинитет. За да се контролира ефективността на екстракцията, реагентите BioGX усилват и откриват човешкия RNase P ген във всяка правилно събрана проба от пациент. Зърната със свързани нуклеинови киселини се промиват и нуклеиновите киселини се промиват чрез нагряване в промиващ буфер. След това елуираната нуклеинова киселина се смесва с рехидратираната основна смес. След това реагентът Master Mix и нуклеиновата киселина се разпределят автоматично в BD MAXTM PCR касета. Микроклапаните в PCR касетата BD MAXTM се запечатват от системата преди започване на PCR, за да се предотврати изпаряване и замърсяване с ампликони.

2. Bio-Rad CFX96 TouchTM поддържа молекулярен анализ на нуклеинова киселина, извлечена от валидиран метод за екстракция на нуклеинова киселина с магнитни зърна или силициева колона.

3. Applied Biosystems QuantStudioTM 5 поддържа молекулярен анализ на нуклеинова киселина, извлечена по одобрен от Applied Biosystems метод за екстракция на нуклеинова киселина с магнитни зърна или силициева колона.

Екстрактираната матрична РНК се транскрибира обратно в cДНК и целевите последователности се усилват чрез PCR. Усилените ДНК цели се откриват с помощта на хидролизни сонди, белязани в единия край с флуоресцентно отчетно багрило (флуорофор), а в другия край с гасителна част. Пробите, белязани с различни флуорофори, се използват за откриване на специфични ампликони, произхождащи от SARS-CoV-2 нуклеокапсиден фосфопротеинов ген (N1), SARS-CoV-2 нуклеокапсид фосфопротеинов ген (N2) и човешки RNase P ген (ендогенен контрол за обработка на проби) в следното три различни оптични канала:

- Откриване на нуклеокапсидния фосфопротеинов ген (N2):
 - FAM еквивалентен канал (495 nm / 520 nm)
- Откриване на нуклеокапсидния фосфопротеинов ген (N1):
 - Еквивалентен канал на Texas Red (590 nm / 610 nm)
- RNase P ендогенно (SPC) откриване:
 - Cy 5.5 еквивалентен канал (690 nm / 705 nm)

Когато сондите са в естественото си състояние, флуоресценцията на флуорофора се потушава поради близостта му до гасителя. Въпреки това, в присъствието на тяхната специфична целева сДНК, пробите се хибридизират с техните комплементарни последователности и се хидролизират от 5'-3' екзонуклеазната активност на ДНК полимеразата, докато тя синтезира зараждащата се верига по протежение на ДНК матрицата. В резултат на това флуорофорите се отделят от техните гасителни молекули и се излъчва флуоресценция. Количеството флуоресценция, открита в петте оптични канала, използвани за BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 и RNase P Multiplex, е право пропорционална на количеството на съответната проба, която е хидролизирана, и следователно пропорционална на количеството на синтезираната цел. Системата BD MAX™, Bio-Rad CFX96 Touch™ и Applied Biosystems QuantStudio™ 5 измерва тези сигнали в края на всеки цикъл на усилване в реално време и интерпретира данните, за да осигури качествен резултат за всяка от горните цели. Положителен резултат за откриване на целевата РНК се показва от наличието на PCR крива на растеж в реално време и свързана стойност Ct (Праг на цикъла).

РЕАГЕНТИ

Кол	РЕФ	Съдържание	Тестове
1	400-058-E-HMP	BioGX SARS-CoV-2 HMP N1, N2 & RNase P Multiplex Sample-Ready™ лиофилизиран PCR Master Mix, съдържащ полимераза, обратна транскриптаза, нуклеотиди, специфични молекулни праймери и сонди и PCR буфери.	24/48 туби в торбичка
1	800-031-E	BioGX рехидратиращ буфер Е* Епруветка с реагент, съдържаща BioGX Rehydration Buffer BioGX за използване при рехидратация на лиофилизирана PCR Master Mix.	24/48 туби в торбичка

*BioGX Rehydration Buffer E е само за използване с платформа BD MAX. За Bio-Rad CFX96 Touch™ и Applied Biosystems QuantStudio™ 5, лиофилизираните реагенти се рехидратират с вода с молекулен клас.

ЗАБЕЛЕЖКА: Информационните листове за безопасност (SDS) са достъпни на www.biogx.com или по заявка.

НЕОБХОДИМО ОБОРУДВАНЕ И МАТЕРИАЛИ, КОИТО НЕ СЕ ПРЕДОСТАВЯТ

- BD MAX™ автоматизирана екстракция на нуклеинова киселина и PCR инструмент в реално време, Applied Biosystems Quantstudio™ 5 или Bio-Rad CFX96 Touch™ PCR инструмент в реално време
- BD MAX™ExK™ ДНК-1 (BD каталожен номер 442818).
Комплектите за екстракция включват епруветки с буфер за проби (SBT), преградни капачки, епруветки за екстракция и унифицирани реактивни ленти, достатъчни за 24 теста.
- BD MAX™ PCR касети (BD каталожен номер 437519).
- BioGX Synthetic RNA Control Template Kit (BioGX каталожен номер 720-0678):
 - Nucleocapsid phosphoprotein gene region (N1) (BioGX каталожен номер 720-0206).
 - Nucleocapsid phosphoprotein gene region(N2) (BioGX каталожен номер 720-0207).
 - Човешки RNase P ген (BioGX каталожен номер 720-0208).
- Устройство за стерилно събиране на тампони, подходящо за вземане на назофарингеални/орофарингеални тампони и съхранение в универсална транспортна среда Soran (UTM®), BD универсален вирусен транспорт (UVT) или физиологичен разтвор (0,85%).

- Ленти с 8 епруветки Thermo Fisher (каталожен номер 4316567).
- Оптични капачки за лента с 8 епруветки Thermo Fisher (каталожен номер AB-0866).
- Thermo Fisher 96-ямкови плаки Thermo Fisher (каталожен номер A36924).
- Уплътнения за 96-ямкови плаки Thermo Fisher (каталожен номер AB-1170).
- Ленти с 8 епруветки Bio-Rad (каталожен номер TLS0851).
- Оптични капачки за ленти с 8 епруветки Bio-Rad (каталожен номер Ленти TCS0803).
- 96-ямкови плаки Bio-Rad (каталожен номер HSP9655).
- Уплътнения за 96-ямкови плаки Bio-Rad (каталожен номер MSB1001).
- Vortex Genie 2 Vortexer (VWR каталожен номер 58815-234) или еквивалент.
- Еднократни нитрилови ръкавици.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ



- BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex може да се извърши на BD MAX™ автоматизирана екстракция на нуклеинова киселина и PCR инструмент в реално време с помощта на BD MAX™ ExK™ TNA-3 лента за извличане и придружаващия BioGX UDP файл или на Applied Biosystems Quantstudio™ 5 или Bio-Rad CFX96 Touch™
- Третирайте всички биологични проби, включително използваните комплекти за екстракция и PCR касети, като че ли са способни да предават инфекциозни агенти в съответствие с лабораторните процедури за безопасност, като описаните в документа M296 на CLSI и във връзка с биологичната безопасност в микробиологични и биомедицински лаборатории^{7,8}.
- Характеристиките на ефективността на този тест са установени само с типовите образци, изброени в раздела "Предвидена употреба". Ефективността на този анализ с други типове образци или проби не е оценена.
- Не използвайте реагентите, ако защитните торбички са отворени или скъсани при получаването.

- Затваряйте незабавно защитните торбички с реагентите с ципа след всяка употреба. Отстранете излишния въздух в торбичките преди запечатване и съхранявайте при 2-8°C.
- Не отстранявайте подсушителя от торбичките с PCR Master Mix .
- Не използвайте Master Mix, ако десикантът не присъства или е счупен вътре в торбичките Master Mix.
- Не използвайте епруветки с реагенти, ако уплътнението на фолиото е отворено или повредено.
- Не смесвайте реагенти от различни торбички и/или комплекти и/или партии.
- Не използвайте реактиви и/или материали с изтекъл срок на годност.



- Всяка епруетка с главна смес и буфер за рехидратация Each Master Mix and BioGX се използва за обработка на една проба. Не използвайте повторно епруветки с Master Mix or BioGX Rehydration Buffer



- Вижте BD MAX™ ExK™, Инструкции за комплекта за извличане на DNA-1 за информация относно правилно боравене, предпазните мерки и правилното изхвърляне на отпадъци.
- Не смесвайте преградните капачки между буферните епруветки за проби и не ги използвайте повторно, тъй като може да възникне замърсяване и компрометиране на резултатите от теста.
- Проверете използваните ленти с реагент BD за правилно пълнене с течност (уверете се, че течностите са на дъното на епруветките).
- Не използвайте устата си като пипета.

- Не пушете, не пийте и не яжте в зони, където се обработват проби или комплекти.
- Изхвърлете неизползваните реактиви и отпадъци в съответствие с държавните, федералните, провинциалните, щатските и местните разпоредби.
- Използвайте чисти ръкавици, когато боравите с компонентите на комплекта за екстракция и PCR реагентите и буферните епруветки.

СЪХРАНЕНИЕ И СТАБИЛНОСТ



- BioGX препоръчва дългосрочно съхранение на неотворените торбички при температура 2-8°C. Вижте етикета на опаковката на продукта за срока на годност.
- Реагентите са стабилни в температурен диапазон от 2-30°C по време на транспортиране в продължение на 5 дни.



- Реагентите са тествани и показват оптимална ефективност, когато се съхраняват правилно и се консумират до изтичане на срока на годност. Проучванията за дългосрочна стабилност продължават и датата на изтичане ще бъде променена при наличие на допълнителни данни.



- Избягвайте излагането на реагентите (лиофилизирани или рехидратирани) на пряка слънчева светлина или дългосрочно околно осветяване.
- Затворете плътно торбичката с неизползвани реакции и незабавно я съхранете на сухо място след отварянето.



- Ако торбичката е отворена от потребителя, но лиофилизиращият реагент не е рехидратиран, избягвайте излагането на лиофилизиращия реагент на влага и използвайте цялото съдържание на отворената торбичка в рамките на 2 месеца, когато се съхранява при 2-8°C.

ИНСТРУКЦИИ ЗА УПОТРЕБА

BD MAX™

(Операционен софтуер BD MAX™ за Windows V4.70A или по-нова версия)

Инсталиране на BioGX Electronic User Defined Protocol на BD MAX™

Ще бъде необходимо да импортирате електронен потребителски протокол (eUDP) на BD MAX™. Най-актуалният eUDP е достъпен за изтегляне на адрес www.biogx.com като използвате падащото меню в горния десен ъгъл на началната страница. Изберете „Education Center“, след което изберете „Int. Product Documents“. Изберете съответния номер на продукта под „Instructions for Use Manual & Product Inserts“ и изтеглете eUDP. Вижте BD MAX™, Ръководство за употреба¹⁰ за инструкции за качване.

Bio-Rad CFX96 Touch™

(Операционен софтуер Bio-Rad CFX Maestro 1.1 или по-нова версия)

Инсталирайте протокола BioGX на Bio-Rad CFX96 Touch™

Ще бъде необходимо да импортирате Bio-Rad CFX96 Touch™ файл с протокол и пластина. Най-актуалният eUDP е достъпен за изтегляне на адрес www.biogx.com като използвате падащото меню в горния десен ъгъл на началната страница. Изберете „Education Center“, след което изберете „Int. Product Documents“. Изберете съответния номер на продукта под „Instructions for Use Manual & Product Inserts“ и изтеглете eUDP. Вижте Bio-Rad CFX96 Touch™, Ръководство за употреба¹¹, за инструкции за качване.

Applied Biosystems QuantStudio™ 5

(Операционен софтуер QuantStudio Design & Analysis v1.5.0 или по-нова версия)

Инсталирайте протокола BioGX на Applied Biosystems QuantStudio™ 5

Ще бъде необходимо да импортирате шаблона на Applied Biosystems QuantStudio™ 5. Най-актуалният eUDP е достъпен за изтегляне на адрес www.biogx.com като използвате падащото меню в горния десен ъгъл на началната страница. Изберете „Education Center“, след което изберете „Int. Product Documents“. Изберете съответния номер на продукта под „Instructions for Use Manual & Product Inserts“ и изтеглете eUDP. Вижте Applied Biosystems QuantStudio™ 5 ръководство за потребителя¹² за инструкции за качване.

Вземане/Транспортиране на проби

Назофарингеалните и орофарингеалните тампони трябва да се събират, транспортират и съхраняват в съответствие с препоръките на производителя и стандартите на институциите и лабораториите за работни процедури.

Подготовка на образеца

Назофарингеален/орофарингеален тампон в Sorap UTM[®] или BD[™] UVT устройства за събиране и транспортиране (3 mL обем за събиране)

BD MAX[™]

Пробата се разбърква старателно на вортекс преди добавяне към SBT. Пипетирайте 500 µL от пробата в епруветката с буфер за проби (SBT), асептично поставете преградна капачка на всеки BD[™] SBT. Приложете импулсен вортекс за SBT за 1-3 секунди и заредете SBT в таблата за екстракция.

Bio-Rad CFX96/Applied Biosystems QuantStudio[™] 5

Пипетирайте 500 µL от пробата в подходящата епруветка/плака за екстракция на проба и продължете с екстракцията на нуклеинова киселина, като използвате валидиран метод или платформа за екстракция с магнитни перли или силициева колона, съгласно инструкциите за употреба на съответните производители.

Назофарингеален/орофарингеален тампон в Sorap UTM[®] или BD[™] UVT устройства за събиране и транспортиране (1 ml обем за събиране)

BD MAX[™]

Пипетирайте 150 µL проба и 350 µL вода с молекулярно качество в епруветката с буфер за проби (SBT) и асептично поставете BD[™] преградна капачка на SBT. Приложете импулсен вортекс за SBT за 1-3 секунди и заредете SBT в таблата за екстракция.

Bio-Rad CFX96/Applied Biosystems QuantStudio[™] 5

Пипетирайте 150 µL проба и 350 µL вода с молекулярно качество в подходящата епруветка/плака за екстракция на пробата и продължете с екстракцията на нуклеинова киселина, като използвате валидиран метод или платформа за екстракция с магнитни зърна или силициева колона, съгласно инструкциите за употреба на съответните производители .

Назофарингеален/орофарингеален тампон в 0,85% физиологичен разтвор (3 mL събираем обем)

BD MAX™

Пробата се разбърква старателно на вортекс преди добавяне към SBT. Пипетирайте 500 µL от пробата в епруветката с буфер за проби (SBT), асептично поставете преградна капачка на всеки BD™ SBT. Приложете импулсен вортекс за SBT за 1-3 секунди и заредете SBT в таблата за екстракция.

Bio-Rad CFX96/Applied Biosystems QuantStudio™ 5

Пипетирайте 500 µL от пробата в подходящата епруветка/плака за екстракция на проба и продължете с екстракцията на нуклеинова киселина, като използвате валидиран метод или платформа за екстракция с магнитни перли или силициева колона, съгласно инструкциите за употреба на съответните производители.

Назофарингеален/орофарингеален тампон в 0,85% физиологичен разтвор (1 ml обем за събиране)

BD MAX™

Пипетирайте 150 µL проба и 350 µL вода с молекулярно качество в епруветката с буфер за проби (SBT) и асептично поставете BD™ преградна капачка на SBT. Приложете импулсен вортекс за SBT за 1-3 секунди и заредете SBT в таблата за екстракция.

Bio-Rad CFX96/Applied Biosystems QuantStudio™ 5

Пипетирайте 150 µL проба и 350 µL вода с молекулярно качество в подходящата епруветка/плака за екстракция на пробата и продължете с екстракцията на нуклеинова киселина, като използвате валидиран метод или платформа за екстракция с магнитни зърна или силициева колона, съгласно инструкциите за употреба на съответните производители .

Други типове проби

Този анализ е оптимизиран за използване с типовете и обемите на пробите, описани по-горе. Използването на какъвто и да е друг вид проба, метод за събиране или обеми на пробата може да потисне PCR или да наруши екстракцията без подходящо настройка на инструмента Guardrail и регулиране на обема на обработка. BioGX не предявява претенции за методи на обработка или видове проби, различни от описаните в тази продуктова листовка.



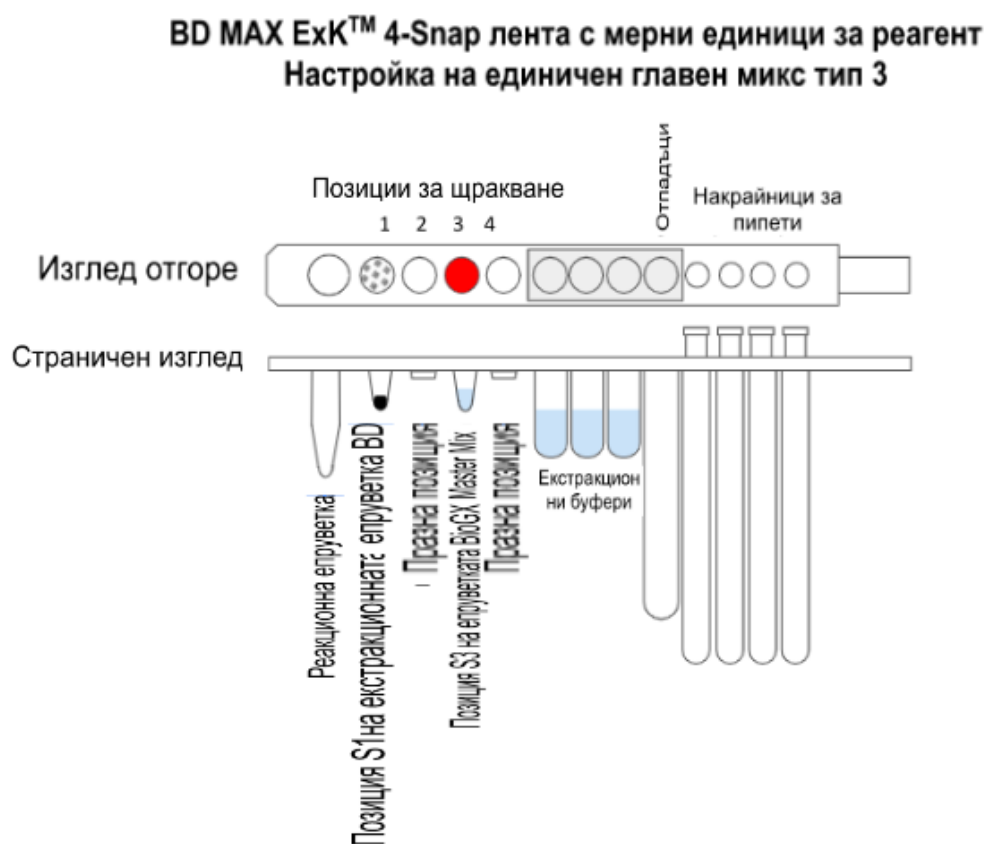
Настройване на унифицираната лента за реагент на BD MAX™

1. Носете нитрилови ръкавици, когато работите със Sample-Ready™ лиофилизирани реагенти за намаляване на генерирането на статични заряди. НЕ използвайте латексови ръкавици.



2. Използвайте само BD MAX™ ExK™, комплекти за извличане на TNA-3 с BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex.
3. Заредете по една екстракционна касета в екстракционната табла за всяка тестова проба.
4. Поставете по една екстракционна таблетка BD MAX™ на позиция 1 (Snap-1) на всяка от лентите с мерни единици за реагенти (Фигура 1).
5. Поставете по една празна конична епруветка BD MAX™ от 0,3 ml на позиция 3 (Snap-3) от всяка лента с мерни единици за реагенти (Вижте Фигура 1). Забележка: всеки BD MAX™ ExK™, комплектът за екстракция на TNA-3 съдържа 24 празни конични епруветки от 0,3 ml.
6. Продължете с генерирането на работен списък и зареждането на проби според работната инструкция на BD MAX™. Изберете подходящия потребителски дефиниран протокол (eUDP), предоставен от BioGX.
7. С помощта на 1000 µL накрайник за пипета прехвърлете **360 µL BioGX рехидратиращ буфер Е** към една епруветка с лиофилизирани реагенти BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 и RNase P Multiplex.

8. Смесете, като леко пипетирате нагоре и надолу с накрайника за пипета от 1000 µL. (**ВАЖНО:** Съхранявайте рехидратирания Master Mix в студен блок или върху лед, докато се разпредели в коничната епруветка 3-Snap BD MAX. Рехидратирана основна смес, която не се използва веднага, може да се съхранява до 24 часа при 2-8°C, защитена от светлина.)
9. Прехвърлете **15 µL** от рехидратирана основна смес на дъното на всяка празна конична епруветка от 0,3 ml на позиция 3 (Snap-3) от всяка лента с мерни единици за реагент (Фигура 1).



Фигура 1 . Диаграма на BD MAX™ ExK™ TNA-3 лента с мерни единици за реагент с 4 гнезда.

10. Повдигнете таблата и прегледайте за кратко дъното на всяка лента за реагенти с мерни единици, за да се уверите, че всички реагенти са на дъното на всяка от епруветките.

11. Заредете таблата за екстракция и, ако е необходимо, нова PCR карта в инструмента, затворете вратичката и щракнете върху „Стартиране на работата“. Избягвайте ненужното забавяне, след като стелажите са заредени.

Настройване на ленти с 8 епруветки или плаки с 96 ямки за Bio-Rad CFX96 Touch™ или Applied Biosystems QuantStudio™ 5



1. Носете нитрилови ръкавици, когато работите със Sample-Ready™ лиофилизирани реагенти за намаляване на генерирането на статични заряди. НЕ използвайте латексови ръкавици.
2. Пригответе подходящия брой ленти с 8 епруветки или 96-ямкови плаки.
3. С помощта на накрайник за пипета от 1000 µL прехвърлете 500 µL вода с молекулен клас (не е включена) към една епруветка лиофилизиран BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 & RNase P Multiplex реагенти.
4. Смесете, като леко пипетирате нагоре и надолу с накрайника за пипета от 1000 µL. (**ВАЖНО** : Съхранявайте рехидратирания Master Mix в студен блок или върху лед, докато се разпредели в епруветката/плаките. Рехидратирана основна смес, която не се използва веднага, може да се съхранява до 24 часа при 2-8°C, защитена от светлина.)
5. Прехвърлете **10 µL** от рехидратирана основна смес на дъното на всяка празна епруветка (ленти с 8 епруветки) или празна (96-ямкова плака).
6. Във всяка ямка, съдържаща 10 µL рехидратирана основна смес, добавете **5 µL** от екстрахирана нуклеинова киселина от пациентска проба.
7. Поставете подходящите оптични капачки или уплътнения на оптични плаки.
8. Приложете импулсно въртене, за да стигне течността до дъното.
9. Заредете ленти с 8 епруветки и/или плаки с 96 ямки в PCR платформата в реално време и стартирайте. Избягвайте ненужното забавяне, след като стелажите са заредени.

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

КОНТРОЛ

Калибриране на BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 и RNase P Multiplex не е задължително. Всеки BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 и RNase P Multiplex включва молекулярни праймери и сонди, специфични за откриването на човешкия RNase P ген, за да служи като ендегенна РНК контролна обработка на проби (SPC), присъстваща в правилно събрана проба от пациент. Не е необходимо външно добавяне на SPC. SPC служи както за контрол за екстракцията на пробата, така и за PCR вътрешен контрол на усилването (IAC).

Лабораториите трябва да установят броя, вида и честотата на тестване на контролните материали в съответствие с насоките или изискванията на местните, провинциалните, щатските и федералните и/или национални разпоредби или организации за акредитация, за да наблюдават ефективността на целия процес на анализа. За общи насоки за контрол на качеството, потребителят може да види CLSI, MM3 и EP12^{7,9}.

Външните контроли, които се предлагат от BioGX (каталожен номер 720-0678), се третират като проби от пациенти. (Направете справка с таблица 1 в раздела за тълкуване на резултатите за тълкуването на резултатите от анализа на външната контрола.)

Препоръчва се една (1) външна положителна контрола и една (1) външна отрицателна контрола да се провеждат поне всеки ден, докато се постигне адекватно валидиране на процеса на системата BD MAXTM Система всяка лабораторна среда. Намалената честота на контролните тестове трябва да бъде в съответствие с приложимите разпоредби.

Външната положителна контрола е предназначена за наблюдение за значителна повреда на реагента. Външната отрицателна контрола е предназначена за откриване на реактив или замърсяване от околната среда (или пренасяне) от целевите нуклеинови киселини.

Препоръчват се различни видове външни контроли, за да се позволи на потребителя да избере най-подходящия за своята лабораторна програма за контрол на качеството.

Външен контрол на отрицателните: Характеризирана преди това проба, за която е известно, че е отрицателна или SBT с добавени 500 µL вода. BioGX препоръчва също така външната отрицателна контрола да се подготви преди външната положителна контрола, за да се намали потенциалът за кръстосано замърсяване по време на подготовката на контролата.

Външен положителен контрол: Може да се използва наличен в търговската мрежа контролен материал от BioGX или друг разрешен контролен материал.

За приготвянето на суспензии за външна контрола BioGX се препоръчва суспензиите на РНК да се приготвят в епруветката с буфер за проби (SBT). Вижте BioGX SARS-CoV-2 и RNase P шаблони за контрол на синтетична РНК (каталожен номер 720-0678) Вижте инструкциите за употреба на BioGX, достъпни за изтегляне от www.biogx.com като щракнете върху „Int. Product Documents а" под „ Education Center" и изберете подходящия продукт под „Template Controls".

Всички външни контроли трябва да дават очакваните резултати (положителен за външен положителен контрол, отрицателен за външен отрицателен контрол).

Външна отрицателна контрола, която дава положителен резултат, е показателна за работа с пробата и/или замърсяване. Външна положителна контрола, която дава отрицателен резултат, е показателна за проблем с обработката на пробата или подготовката на реагента. Прегледайте техниката за обработка/приготвяне на пробата.

Външна контрола, който дава неразрешен, неопределен или непълен резултат от теста, е показателна за неуспешна работа на реагента или системата BD MAX™. Проверявайте системния монитор на BD MAX™ за всякакви съобщения за грешка. Вижте раздела „Обобщение на системните грешки“ на „BD MAX™, Ръководство за потребителя на системата¹⁰ за тълкуване на кодове за предупреждение и грешка. Ако проблемът не бъде отстранен, използвайте реагенти от неотворена торбичка или нов комплект за анализ.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

BD MAX™

Резултатите се показват в раздела *Резултати* на прозореца *Резултати* на системния монитор на BD MAX™. Системният софтуер на BD MAX™ автоматично интерпретира резултата от теста, когато се използва BioGX eUDP. Наличието на една или повече от целите е възможно и ще доведе до едновременно положителен резултат за няколко проби. Вижте раздела „Обобщение на системните грешки" на „BD MAX™, Ръководство за потребителя на системата⁹ за тълкуване на кодове за предупреждение и грешка.

Applied Biosystems QuantStudio™ 5

Резултатите са налични в раздела „Резултати“ на софтуера QuantStudio™ 5 за проектиране и анализ. За да изтегли данните, потребителят може да отиде до раздела „Експортиране“ и да експортира данните в различни формати (*.xls, *.xlsx и *.txt). Като алтернатива, потребителят може да отвори „Отпечатване на отчет“ в раздела „Файл“, за да визуализира и запише отчета във формат *.PDF. Вижте ръководството за употреба на QuantStudio™ 5 за допълнителни инструкции¹².

Bio-Rad CFX96 Touch™

Резултатите са достъпни за преглед и изтегляне в pdf формат, когато отворите раздела „Инструменти“ и изберете опцията „Отчет“ на Bio-Rad CFX Maestro™ /Софтуер за управление в режим на анализ на данни. Като алтернатива, потребителят може да отвори раздела „Експортиране“ и да експортира всички необработени листове с данни в различни формати (CSV, тест, Excel, XML). Вижте Bio-Rad CFX96 Touch™, Ръководство за употреба¹¹, за инструкции за качване.

Външни отрицателни и положителни контроли

Ако положителната или отрицателната контрола не покаже очакваното поведение, както е описано в Таблица 1, анализът е възможно да не е настроен/или изпълнен неправилно или да е възникнала неизправност в реагента или оборудването. В този случай анулирайте цикъла и тествайте отново всички проби в този цикъл.

Генът RNase P служи както за контрол на екстракцията на пробата, така и за контрол на вътрешното усилване. В случай, че и двата резултата за региони N1 и N2 са отрицателни, резултатът от RNase P трябва да бъде положителен, за да бъде резултатът валиден отрицателен резултат. Когато целевият резултат N1 или N2 е положителен, резултатът от RNase P се игнорира. Ако положителната или отрицателната контрола не покаже очакваното поведение, както е описано в Таблица 1, анализът е възможно да не е настроен/или изпълнен неправилно или да е възникнала неизправност в реагента или оборудването. Анулирайте изпълнението и повторете теста.

Таблица 1. Интерпретация на външни контроли на BioGX.

Тип контрол	Приложимост за мониторинг	Очаквани резултати		
		N1	N2	RNase P
Отрицателен контрол с добавяне на 500 µL вода	Реагент и/или замърсяване на околната среда	-	-	-
Отрицателен контрол - известна отрицателна проба		-	-	+
Контрол на екстракцията и положителен контрол за RNase P	Значителна повреда на реагента, включително целостта на праймера и сондата	-	-	+
N1 и N2 положителен контрол	Значителна повреда на реагента, включително целостта на праймера и сондата	+	+	-

Изследване и тълкуване на резултатите от проби от пациенти

Оценката на резултатите от теста на клиничните проби трябва да се извърши, след като външните положителни и отрицателни контроли са били изследвани и определени като валидни и приемливи. Ако контролите не са валидни, резултатите от пациента не могат да бъдат интерпретирани. Списъкът с очакваните резултати е посочен в Таблица 3. Ако се получат резултати, които не отговарят на тези указания, извечете повторно и тествайте отново пробата. Ако повторното изследване даде подобни резултати, вземете нова проба от пациента за изследване.

Таблица 2. Интерпретация на резултатите от проби от пациенти.¹⁰

N1 генна област	N2 генна област	RNase P	Тълкуване на SARS-CoV-2	Препоръчително действие
+	+	+/-	ПОЛОЖИТЕЛЕН	Докладвай като ПОЛОЖИТЕЛЕН
+	-	+/-	ПРЕДПОЛАГАЕМО ПОЛОЖИТЕЛЕН	ако е положителен при повторение, отчетете като ПОЛОЖИТЕЛЕН ^a
-	+	+/-	ПРЕДПОЛАГАЕМО ПОЛОЖИТЕЛЕН	ако е положителен при повторение, отчетете като ПОЛОЖИТЕЛЕН ^a
-	-	+	ОТРИЦАТЕЛЕН	Докладвай като ОТРИЦАТЕЛЕН
-	-	-	НЕРЕШЕН ^a	Повторете теста ^a

^a Повторете теста, като подгответе нова екстракция и PCR от останалата колекция от проби на пациента, за да потвърдите ПОЛОЖИТЕЛЕН резултат (т.е. потвърждение на положителен резултат с повторен тест, откриващ N1 и/или N2). Обратно, повторно тестване, което не дава откриване нито на N1, нито на N2, потвърждава ОТРИЦАТЕЛЕН резултат.

ПОВТОРЕТЕ ТЕСТОВАТА ПРОЦЕДУРА

В случай на повреда на инструмента, може да се извърши повторно тестване, като се създаде нов цикъл и се използва оригиналната проба/образец и нов SBT, както е описано по-горе в раздела „Подготовка на образца“.

ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОЦЕДУРАТА

- Това устройство не е проектирано като единствено средство за диагностика на инфекциозни заболявания. Поради присъщия характер на технологията, използвана за извличане и откриване на нуклеинова киселина, нуклеиновата киселина може да бъде открита от мъртви организми. Предвидената употреба е ограничена до откриване на наличието на сигнатура на нуклеинова киселина на организъм, а не до диагностика на заболяване или болестно състояние.
- Този продукт е предназначен за използване с проби, събрани с помощта на устройствата за събиране и транспортиране на проби, изброени в раздела „Необходими, но непредоставени оборудване и материали“.
- Този продукт трябва да се използва само с реагенти за отворена система BD MAX™ на система BD MAX™, Bio-Rad CFX96 Touch, Applied Biosystems QuantStudio 5.
- Неправилни резултати от теста могат да възникнат поради неправилно събиране, боравене или съхранение на проба, техническа грешка, объркване на пробата или защото броят на организмите в пробата е под аналитичната чувствителност на теста. Внимателно спазване на инструкциите на опаковката и наръчниците за потребителя за BD MAX™ System, Bio-Rad CFX96 Touch и Applied Biosystems QuantStudio 5 са необходими, за да се избегнат грешни резултати.
- Добрата лабораторна техника е от съществено значение за правилното изпълнение на анализа. Поради високата аналитична чувствителност на този тест, трябва да се внимава изключително много, за да се запази чистотата на всички материали и реагенти.
- Положителен резултат от теста не означава непременно наличието на жизнеспособни инфекциозни организми. Положителният резултат е показателен за наличието на целева нуклеинова киселина. Отрицателният резултат от теста не изключва наличието на инфекциозни организми и не трябва да се използва като единствена основа за лечение или други решения за насочване на пациента.
- Както при всички базирани на PCR *invitro* диагностични тестове, могат да бъдат открити изключително ниски нива на целевия организъм под границата на откриване на анализа, но резултатите може да не са възпроизводими.
- Фалшиви отрицателни резултати могат да възникнат поради загуба на нуклеинова киселина от неадекватно събиране, транспортиране или съхранение на проби или поради неадекватно лизиране и/или екстракция на клетки. Контролът за обработка на проби е добавен към теста, за да помогне при идентифицирането на проби, които съдържат инхибитори на PCR

усиляването и като контрола за целостта на реагента и на системата за анализ като цяло.

- Резултатите от EBV – OSR за BD MAX™ понякога могат да бъдат неразрешени поради невалидна контрола за обработка на пробата или неопределени или непълни поради повреда на инструмента и да изискват повторно тестване, което може да доведе до забавяне на получаването на крайните резултати.
- Мутациите или полиморфизмите в участъците за свързване на праймер или сонда могат да повлияят на откриването на нови или неизвестни варианти на SARS-CoV-2, което води до фалшиво отрицателен резултат с BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 и RNase P Multiplex.
- BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 и RNase P Multiplex изискват използването на три (3) оптични канала на BD MAX™ System, Bio-Rad CFX96 Touch и Applied Biosystem Quantstudio 5 за откриване на флуорофори в каналите FAM, Texas Red и Cy 5.5.

ХАРАКТЕРИСТИКИ НА РАБОТАТА

Аналитична и диагностична специфичност

Специфичността се определя чрез анализиране на матрица на отрицателна проба (Coproan UTM назофарингеални проби), обогатена с шаблони за положителна контрола. BioGX SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 и RNase P Multiplex е положителен за всички съответни цели.

Аналитична и диагностична чувствителност

Аналитичната чувствителност за SARS-CoV-2 HMP - N1, N2 и RNase P Multiplex е определена, както следва: За платформата BD MAX™, генерират се фиктивни проби (n=20) чрез добавяне на известен брой копия на положителна контрола за N1 PHK регион за синтетичен SARS-CoV-2 N1 и N2 регион PHK регион за SARS-CoV-2 в отрицателни Coproan UTM колекции от назофарингеални тампони. За платформите Bio-Rad CFX96 Touch и Applied Biosystems QuantStudio 5 се добива директно серия от разреждания на положителни синтетични PHK проби за N1 и N2 към рехидратирана основна смес (n=20). Аналитичната чувствителност (Граница на откриване, LoD) се определя като най-ниската концентрация, при която 95% от всички повторения са тествани за положителни. Потвърдено е, че LoD е равен или по-добър с титрувана геномна вирусна PHK (номер на частта на Vircell MBC137-R).

Таблица 3. Обобщение на LoD за BD MAX™

Цел	LoD/mL (500 µL входяща проба)	LoD/SBT (PHK копия на BD MAX SBT)	LoD/реакция (PHK копия на RT-PCR реакция)	Очакван праг на цикъла (Ct)
N1 регион	~1000	508	30	32-34
N2 регион	~1000	508	30	32-34

Таблица 4. Обобщение на LoD за CFX96 Touch и QuantStudio 5

Цел	LoD/mL (500 µL входяща проба) ^b	LoD/реакция (PHK копия на RT-PCR реакция)	Очакван праг на цикъла (Ct)
N1 регион	600	30	33-35
N2 регион	600	30	33-35

^b Граница на откриване въз основа на 500 µL екстракция на проба с елуиране в 50 µL.

Приобщаване (*in silico*)

Праймерите и сондите BioGX SARS-CoV-2 N1 и N2 са идентични по последователност с тези, докладвани в диагностичния панел CDC 2019-Нов коронавирус (2019-nCoV) в реално време RT-PCR. CDC съобщи за *in silico* анализ на последователности на праймер и проба в рамките на техните IFU (CDC-006-0019, Rev 02).³ Беше извършено подравняване с последователностите на олигонуклеотидния праймер и пробата на диагностичния панел CDC 2019 nCoV в реално време RT-PCR с всички публично достъпни последователности на нуклеинова киселина за 2019-nCoV в GenBank към 1 февруари 2020 г., за да се демонстрира прогнозираната включеност на панел за диагностика в реално време CDC 2019 nCoV RT-PCR. Всички подравнявания показват 100% идентичност на CDC панела с наличните 2019-nCoV последователности с изключение на едно нуклеотидно несъответствие с предния праймер N1 в една депозирана последователност.

Кръстосана реактивност (*in silico*)

Последователностите на сондата за N1 и N2, използвани в анализа на BioGX SARS-CoV-2, показват висока хомология на последователността с коронавирус SARS и геном на коронавирус, подобен на SARS при прилепи. Обаче правите и обратните праймери не показват хомология на последователността с коронавируса на SARS и генома на коронавирус, подобен на SARS при прилепи. Комбинирайки праймери и сонди, няма значителни хомологии с човешки геном, други коронавируси или човешка микрофлора, които биха предсказали потенциални фалшиво положителни rRT-PCR резултати.

Възпроизводимост

Проучването за възпроизводимост откри синтетична РНК матрица, анализирана независимо от трима различни техники, използващи два BD MAX™ инструменти, два инструмента Bio-Rad CFX96 Touch и един инструмент Applied Biosystem QuantStudio 5 за два отделни дни. Всички потребители са получили еквивалентни резултати и на двата инструмента и на двата дни.

Производствена възпроизводимост

Бяха произведени две независими партии и беше установено, че са еквивалентни въз основа на вътрешно установени процедури за приемане на QC.
















ЛИТЕРАТУРА

1. Американски центрове за контрол и превенция на заболяванията. 2020 г. 2019-Нов коронавирус (2019-nCoV) rRT-PCR панели праймери и сонди в реално време. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf>
2. Американски центрове за контрол и превенция на заболяванията. 2020 г. Ревизия на инструкциите за тестване CDC 2019 нов коронавирус (nCoV) с диагностичен панел в реално време RT-PCR (EUA200001). <https://www.afpl.org/Materials/Signed CDC Letter to PHIs-N3 Removal Instructions 26Feb2020.pdf>
3. Американски центрове за контрол и превенция на заболяванията. 2020 г. 2019-Нов коронавирус (2019-nCoV) rRT-PCR, праймери и сонди на панели в реално време. CDC-006-00019, редакция: 02. <https://www.fda.gov/media/134922/download>
4. Болест, причинявана от коронавирус 2019г.: Основни положения при COVID-19. 2020 г. Достъп: 11 април 2020 г. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/cases-updates/summary.html>
5. Болест, причинена от коронавирус, пандемия 2019г. : Текущи актуализации относно коронавирусната болест (COVID-19). 2020 г. Достъп: 11 април 2020 г. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
6. Andersen, KG, Rambaut, A., Lipkin, WI *et al.* 2020 г. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat Med*(2020 г.). <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
7. Институт за клинични и лабораторни стандарти. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Одобрени напътствия Документ M29 (Вижте последното издание).
8. Центрове за контрол и превенция на заболяванията и Национални здравни институти. Биобезопасност в микробиологични и биомедицински лаборатории. Choosewood L.C. and Wilson D.E. (eds) (2009). Публикация на NHS № (CDC) 21-1112.
9. BD MAX™, Ръководство за потребителя на системата (вижте последната редакция) BD Life Sciences, Sparks, Maryland 21152, САЩ.
10. Администрацията по храните и лекарствата на САЩ актуализира ръководство за употреба на *наединична* вирусна цел като приемлива за откриване на SARS-CoV-2. Често задавани въпроси относно тестването за SARS-CoV-2. (2020 г.). Достъп: 25 юни 2020 г. <https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/faqs-testing-sars-cov-2>
11. CFX96 Touch™, CFX96 Touch™ Deep Well, CFX Connect и CFX384 Touch™, Системно ръководство с инструкции (вижте най-новата версия), Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, САЩ (вижте най-новата версия).
12. QuantStudio™, Ръководство за потребителя на софтуер за проектиране и анализ, ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusets, САЩ (Вижте най-новата версия).

ХРОНОЛОГИЯ НА РЕДАКЦИИТЕ

Редакция	Дата	Описание на промяната
03	25 септември 2023	Изясняване на условията за дългосрочно съхранение и уточняване на съхранение в отворена торбичка при 2-8°C на реагентите.
02	07 април 2023	Корекция на техническа грешка за обработка на проби от назофарингеален и орофарингеален тампон в 3 ml транспортна среда или физиологичен разтвор на BD MAX. Ред.01 на инструкциите за употреба посочват да се прехвърлят 100 µl във флакона SBT, правилният обем е 500 µl, който е коригиран в Ред.02. Корекция на обемите на настройките на главния микс за Bio-Rad FX96 Touch и ABI Quantstudio 5. Ред 01 на инструкциите за употреба да се добавят 360 µl буфер за рехидратиране Е за рехидратиране на лиофилизирани реагенти. Правилното твърдение е да се добавят 500 µl вода с молекулен клас към лиофилизираните реагенти, което е коригирано в Ред.02.
01	02 декември 2022	Първоначално издание.

СИМВОЛИ

Символ	Значение	Символ	Значение
	Каталожен номер		Съдържа достатъчно за <n> теста
	СЕ маркировка за съответствие		Инвазивно диагностично медицинско устройство
	Не използвайте повторно		Ограничение на температурата
	Код на партидата		Да се пази сухо
	Внимание		Пазете от слънчева светлина
	Вижте инструкциите за употреба		Срок на годност
	Производител		Биологични рискове
	Контрол		Превод



BioGX

Science Park 408, 1098 XH, Amsterdam, Нидерландия
Телефон: +31.20.893.4261 Факс: +31.20.240.9149