

【Nome del prodotto】

Kit di rilevamento per la malattia da coronavirus 2019 (COVID-19) (PCR sonda in fluorescenza)

【Fatturazione dell'imballaggio】

48 test/kit

【Inteso Use】

Questo kit viene utilizzato per determinare ulteriormente il ceppo di infezione specifico tra le persone a cui è stato diagnosticato COVID-19, i risultati dei test sono di riferimento per il clinico e non possono essere utilizzati da soli come base per confermare o escludere i casi.

Questo kit utilizza la tecnologia della PCR in fluorescenza in tempo reale per rilevare l'acido nucleico COVID-19 di pazienti con sintomi simili a convezione, pazienti con polmonite grave e pazienti con infezione asintomatica.

Gli operatori hanno una formazione professionale di amplificazione genica o di rilevamento di metodi biologici molecolari, hanno la pertinente qualifica di funzionamento sperimentale e il laboratorio dispone di ragionevoli strutture di prevenzione della sicurezza biologica e procedure di protezione.

【Principi di prova】

Questo kit si basa sulla tecnologia Real-Time PCR Fluorescenza. Primers specifici e corrispondenti sonde fluorescenti target alla regione conservata di COVID-19 genome, sono stati progettati per il rilevamento altamente specifico. Rilevando i cambiamenti dei segnali fluorescenti, l'acido nucleico COVID-19 dal campione di tampone o dal campione di secrezione rinofaringea può essere rilevato qualitativamente.

【Componenti principali】

Elementi	Nome	48 test/kit	Costituenti
Kit di amplificazione PCR	PCR Buffer	850µL ×1 tubo	Primers, Paccappatoios,dNTPs
	Poliasi Mix	150µL×1 tubo	DNA polimerasi, Reverse Transcriptase
	Positivo Control	400µL×1 Tubo	frammento di gene bersaglio
	Negative Control	400µL×1 Tubo	frammento di gene bersaglio

Note:

I componenti di lotti diversi non devono essere miscelati.

Materiali di consumo richiesti: tubo speciale fluorescente PCR a parete sottile, si consiglia di utilizzare i prodotti pertinenti di Axygen, selezionare i materiali di consumo corrispondenti in base all'uso dello strumento.

Il tubo PCR con una buona conduttività termica può ottenere migliori risultati sperimentali e persino ridurre il tempo di reazione a meno di 30minuti.

【Condizioni di conservazione e validità】

Il kit deve essere conservato alla temperatura di -20°C al buio ed evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti (se congelamento e scongelamento, non deve superare le 4 volte), con un periodo di validità di 12 mesi. Può essere conservato a 4°C dopo l'apertura del coperchio, con un periodo di validità di 30 giorni. Il kit deve essere trasportato in una ghiacciaia.

【Strumenti applicabili】

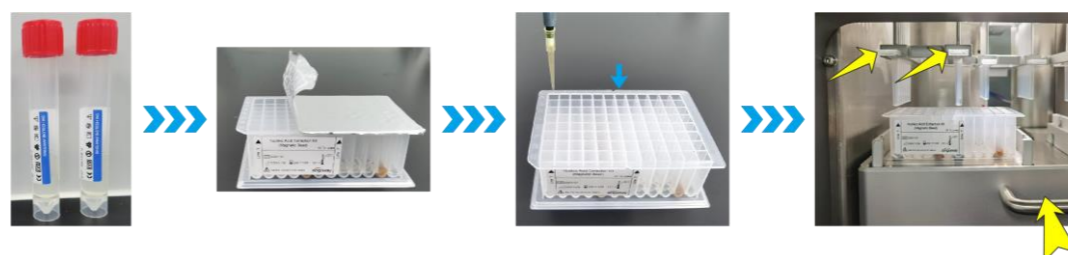
Lo strumento PCR fluorescente rapido, come Singuway Singu9600Pro, è consigliato e può completare l'esperimento in 30 minuti. Altri strumenti di amplificazione convenzionali con i tuoi strumenti a canale di fluorescenza come Singuway Singu9600 e BioRad CFX96 possono essere utilizzati in questo esperimento, ma ci vogliono circa 50 minuti.

【Esemplare Requirement】

- Tipo di campione applicabile: tampone faringeo (tampone orofaringeo/tampone nasale)
- Raccolta di campioni
 - Tempo del campione: Il reagente non è influenzato dai sintomi clinici specifici dei pazienti.
 - Le prestazioni del test del reagente non sono influenzate quando si utilizzano i farmaci descritti nella valutazione delle prestazioni dell'analisi e il campione può essere prelevato normalmente. È meglio prelevare campioni prima di utilizzare altri farmaci non verificati
 - Requisito del tampone faringeo: È meglio usare un tampone a manico lungo con testa in fibra di polipropilene o wabinlegno, selezionare la soluzione di conservazione adatta per cellule e virus. È meglio selezionare direttamente il tubo di campionamento del tampone faringeo commerciale.
- Metodo di campionamento:
 - Otampone rofaringeo: Pulire entrambe le tonsille e la parete faringea posteriore con un tampone con forza moderata per evitare di toccare il tongue.
 - Tampone nasale: utilizzare il tampone per penetrare nella cavità nasale per 2~3 cm e ruotarlo per 2~3 volte.
- Conservazione e consegna dei campioni
 - I campioni per la rivelazione devono essere conservati alle seguenti condizioni: meno di 24 ore a 2-8°C, meno di 1 mese a -20°C o un tempo più lungo a -70°C. Deve essere evitato un congelamento e uno scongelamento ripetuti (il congelamento e lo scongelamento non devono superare 3 volte).
 - Una scatola di trasferimento del ghiaccio è stata utilizzata per il trasporto di campioni.

【Metodo di prova】

- Estrazione di acidi nucleici (nell'area di elaborazione del campione del laboratorio)
 - Si consiglia di utilizzare il kit di estrazione dell'acido nucleico del virus, la colonna centrifuga o il metodo del tallone magnetico della Singuway Company. L'acido nucleico è stato estratto da circa 200µL di campione riferito alle istruzioni del kit di estrazione dell'acido nucleico.



- Il controllo positivo e il controllo negativo sono stati estratti contemporaneamente ai campioni da testare.

Commentato [MM1]:

1.3

Figura 1. Diagramma di flusso del funzionamento sperimentale.

- 1.4 Il controllo positivo e il controllo negativo sono stati estratti contemporaneamente ai campioni da testare.
- 1.5 Altro metodo: il virus eluito da una soluzione isotonica neutra (0,9% di NaCl) o il tampone di rilascio del singuway può essere utilizzato direttamente come RNA campione.
2. Preparazione del reagente PCR (nell'area di preparazione del reagente)
 - 2.1 Preparare la soluzione di reazione PCR secondo la seguente composizione ("n" è il numero di reazioni necessarie): aggiungere 1 tampone PCR da $7\mu\text{L} \times n$ e $3\mu\text{L} \times n$ miscela PCR in un nuovo tubo e mescolare bene. (Notes: assicurarsi che il buffer PCR sia completamente disciolto prima dell'uso, la miscela PCR deve essere centrifugata prima dell'uso per assicurarsi che tutto il liquido sia affondato verso il basso).
 - 2.2 Miscelare nuovamente la soluzione di reazione PCR preparata nella fase precedente e quindi imballare separatamente $20\mu\text{L}$ /tubo nel tubo di reazione PCR. Teseguire il trasferimento della provetta di reazione contenente la soluzione di reazione PCR all'area di elaborazione del campione (Figura 2).
 - 2.3 Aggiungere campioni (nell'area di elaborazione del campione) $5\mu\text{L}$ dei campioni trattati, il controllo negativo estratto e il controllo positivo sono stati aggiunti rispettivamente alla provetta di reazione PCR contenente la soluzione di reazione PCR. Coprire il tappo, mescolare bene ed eseguire una breve rotazione per consentire alla soluzione di reazione di affondare sul fondo del tubo (Figura 2).

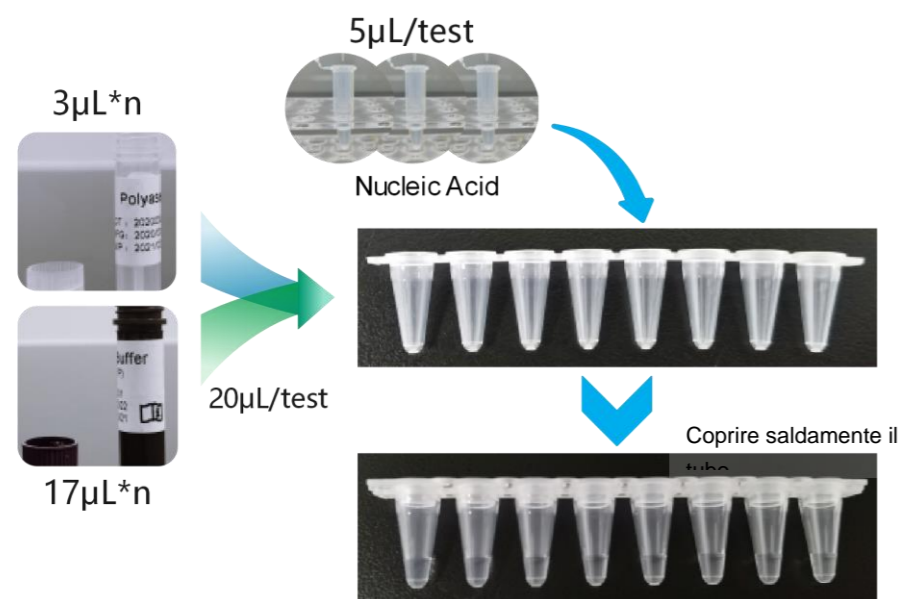


Figure 2. Schema schematico del funzionamento sperimentale.

3. Amplificazione PCR (Nell'area di test di amplificazione)

- 3.1 Caricare il tubo di reazione PCR nello strumento PCR in tempo reale per l'amplificazione.
- 3.2 Configurazione del programma di amplificazione (Figura 3):

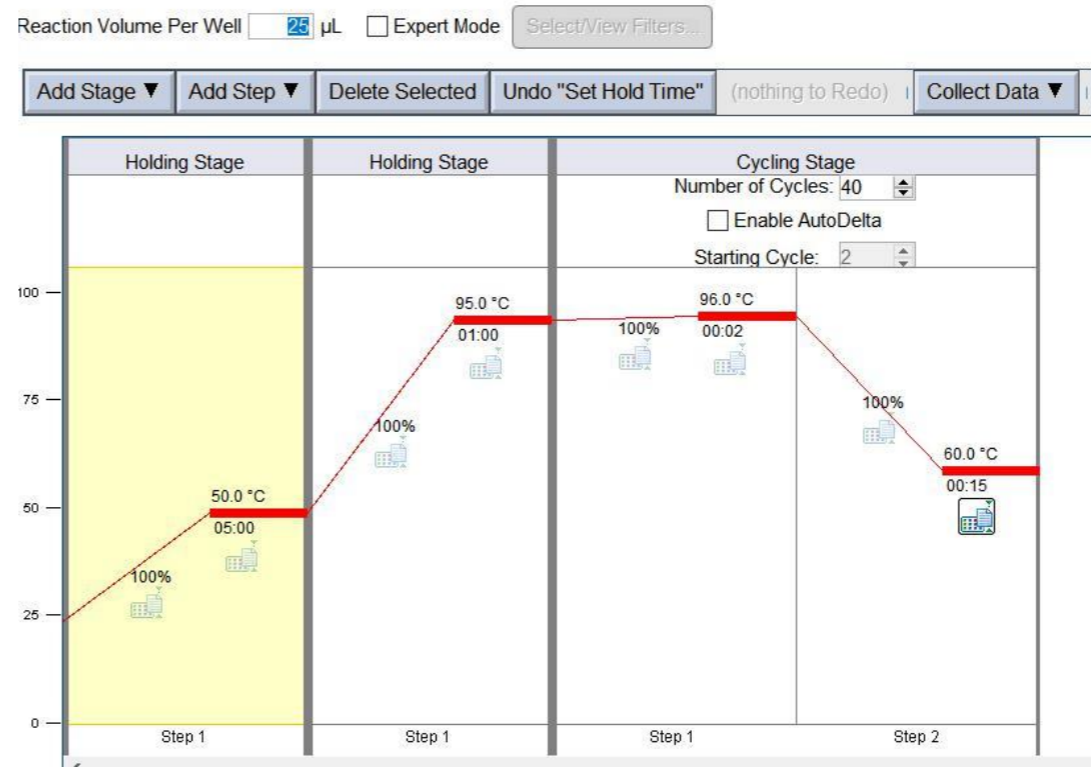


Figura 3. Configurazione del programma di amplificazione

Selezione del canale di rilevamento dello strumento: FAM è il segnale di amplificazione della regione ORF1a / b, HEX / VIC è il segnale di amplificazione della regione genica E, ROX è il segnale di amplificazione della regione genica N, CY5 è il segnale di amplificazione del controllo interno.

4. Qc standard

- 4.1 Controllo negativo: i risultati FAM / HEX / ROX sono negativi, CY5 è positivo e $16 < \text{Ct} < 32$.
- 4.2 Controllo Positivo: I risultati di FAM/HEX/ROX devono essere almeno 2 positivi e $24 < \text{Ct} < 30$.
- 4.3 Gli elementi di cui sopra devono essere soddisfatti contemporaneamente in un esperimento, altrimenti questo esperimento non è valido e l'esperimento deve essere ripetuto.
5. Analisi dei risultati
 - 5.1 Dopo l'esperimento, analizzare secondo il software degli strumenti correlati, regolare la tolleranza al rumore al di sopra del rumore di base.
 - 5.2 Il principio di impostazione della soglia è che la linea di soglia supera appena il punto più alto della normale curva di controllo negativa (linea di rumore irregolare), 6-15 aree di circolazione sono state generalmente selezionate per la linea di base.
 - 5.3 Registrare il valore Ct del campione calcolato mediante l'analisi automatica dello strumento.

【Giudizio di risultato】

1. Determinazione del risultato negativo:

Se la curva di amplificazione del canale FAM/VIC/ROX non ha una curva di crescita logaritmica significativa; allo stesso tempo, il canale CY5 ha una curva di crescita logaritmica e il valore Ct del risultato del controllo interno è inferiore a 36, il risultato è negativo. Se non vi è alcuna curva di crescita logaritmica significativa nel canale CY5, i campioni devono essere ricontrollati.
2. Determinazione dei risultati positivi:

Se il canale FAM/VIC/ROX ha una curva di crescita logaritmica e il valore Ct è ≤38, il risultato ha determinato che COVID-19 è positivo.

3. Area grigia sperimentale:

Se il canale FAM/VIC/ROX ha solo una curva di crescita logaritmica e un valore di $38 < Ct < 40$, il risultato viene giudicato come situato nell'area grigia sperimentale e il campione deve essere ricontrollato. Se c'è un'evidente curva di crescita logaritmica nel risultato del nuovo test, il risultato può essere giudicato positivo; se non c'è una curva di crescita logaritmica evidente, il risultato è negativo.

4. Le operazioni di "ricontrollo" menzionate nei passaggi 1 e 3 sono le seguenti:

Si raccomanda di concentrare il campione: prelevare 1mL di campione ben miscelato; centrifugare 12000rpm per 5min a 4°C; rimuovere con cura il surnatante e lasciare circa 200µL di strato inferiore come campione. Quindi eseguire l'estrazione e l'amplificazione come il campione generale.

Tabella 1. Il giudizio di risultati diversi.

Gene ORF(FAM)	Gene E(HEX/VIC)	Gene N(ROX)	Controllo interno(Cy5)	Controllo negativo	Controllo positivo	Interpretazione
+	+	+	+/-	-	+	SARS-COV-2 POSITIVO
-	-	-	+/-	-	+	SARS-COV-2 NEGATIVO
+	+	-	+/-	-	+	SARS-COV-2 POSITIVO
+	-	+	+/-	-	+	SARS-COV-2 POSITIVO
-	+	+	+/-	-	+	SARS-COV-2 POSITIVO
+	-	-	+/-	-	+	SARS-COV-2 POSITIVO
-	-	+	+/-	-	+	SARS-COV-2 POSITIVO
-	+	-	+/-	-	+	SARS-COV-2 Presumibilmente POSITIVO
+	+	+	+	+	+	NESSUN VALIDO
-	-	-	-	-	-	NESSUN VALIDO

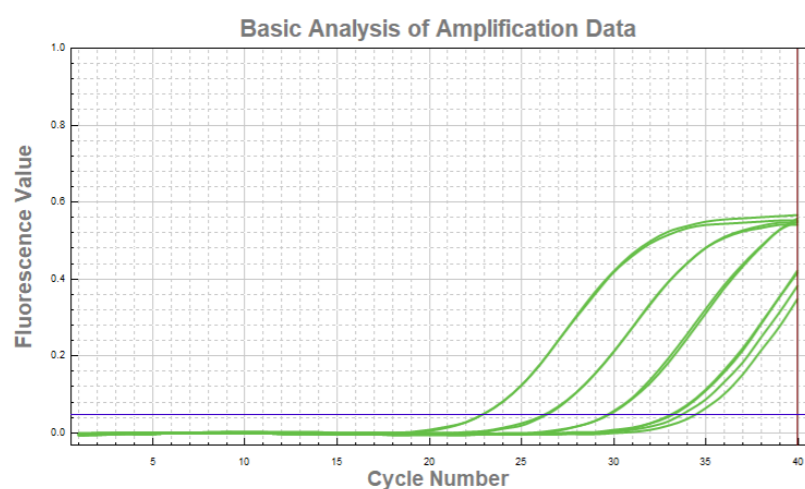


Figura 4. Esempio di amplificazione positiva.

【Valore di cut-off (CO) o intervallo di riferimento】

La soglia di riferimento Ct valore di questo kit è pari a 38.

【Limitazioni del metodo di prova】

- Possibilità di analisi dei risultati falsi negativi.
 - La raccolta, il trasporto e l'elaborazione impropri dei campioni o le goccioline di virus troppo basse nei campioni possono causare risultati falsi negativi.
 - I risultati falsi negativi possono essere causati da mutazioni della sequenza bersaglio di COVID-19.
 - Per il COVID-19, il tipo di campione più adatto e il miglior tempo di campionamento dopo l'infezione potrebbero non essere confermati. Pertanto, la possibilità di risultati falsi negativi sarà ridotta se i campioni vengono raccolti in più parti e volte nello stesso paziente (secondo il rapporto corrente, il tasso di rilevamento dei falsi negativi può essere efficacemente ridotto dopo che la miscela di tampone rinofaringeo e tampone orofaringeo è stata raccolta contemporaneamente).
 - Altri fattori non verificati.
- Se la contaminazione incrociata non è stata ben controllata durante la raccolta, il trasporto e la lavorazione dei campioni, possono verificarsi risultati falsi positivi.

【Prodotto Performance Index】

- Limite minimo di rilevamento (sensibilità di analisi):
La sensibilità al saggio di questo reagente era di 500 copie/ml.
- Test di riferimento aziendale
 - Sono stati testati dieci campioni di riferimento positivi e dieci campioni di riferimento negativi e il tasso di coincidenza è stato del 100%.
 - Un riferimento limitato è stato eseguito per 20 test, il risultato dovrebbe essere di almeno 17 test positivi.
 - Due riferimenti di precisione enterprise con 10000 copie/mL COVID-19 sono stati eseguiti rispettivamente per 10 test e il CV del valore Ct non era superiore al 5%.
- Specificità dell'analisi
 - Reazione incrociata:
I virus al di sotto delle seguenti concentrazioni non hanno ioni di reazione incrociata con questo kit.

Nome di esempio	Concentrazione	Nome di esempio	Concentrazione
Influenza A(H1N1)	1.1x10 ⁵ TCID50/mL	Un flusso (H3N2)	2x10 ⁶ TCID50/mL
Influenza B	3.2x10 ⁸ TCID50/mL	Virus respiratorio sinciziale di tipo B	8.9x10 ⁸ TCID50/mL
Adenovirus (Tipo 3)	3,2 x 10 ⁵ TCID50/mL	Rhinovirus Tipo 1A	3x10 ⁷ TCID50 /mL
Adenovirus (tipo 7)	1,1 x 10 ⁶ TCID50/mL	Chlamydia pneumoniae	6x10 ⁵ CFU/mL
Coronavirus umano HCOV-OC43	3.7x10 ⁷ TCID50/mL	Coronavirus umano HCOV-HKU1	3,8x10 ⁵ PFU/mL
Citomegalovirus	1,9x10 ⁶ PFU/mL	Mycoplasma pneumoniae	1.2x10 ⁵ CFU/mL
Enterovirus EV71	2.1x10 ⁵ PFU/mL	Mycobacterium tuberculosis	1x10 ⁸ CFU/mL
Virus della parainfluenza umana (tipo 1)	1,7 x 10 ⁷ TCID50/mL	Legionella pneumophila	3.3x10 ⁹ CFU/mL




3.2 Sostanze interferenti:

















Le sostanze interferenti endogene, come la secrezione di sangue e rinofaringeo, non interferiscono con il rilevamento di questo kit. Zanamivir, epinefrina, budesonide, zolfo, Jinying, mentolo, mupirocina e tobramicina, che sono farmaci terapeutici comuni, non interferiscono con i risultati del test di questo kit.

【Avviso】

1. Questo prodotto viene utilizzato solo per la diagnosi in vitro; si prega di leggere attentamente questo manuale prima dell'uso.
2. Al fine di evitare qualsiasi potenziale pericolo biologico nel campione, il campione di prova è considerato una sostanza infettiva per evitare il contatto con la pelle e le mucose; si raccomanda di utilizzare il campione nell'armadiodisicurezza biologico che può impedire il deflusso della nebbia d'aria e il funzionamento e il trattamento del campione devono soddisfare i requisiti delle leggi e dei regolamenti pertinenti.
3. La sostanza di controllo positiva del kit è l'acido nucleico sintetico artificiale che non ha potenziale infettività; Sebbene abbia superato i test di HBs-Ag, HIV1/2-Ab, HCV-Ab e altri articoli, fino ad ora, non esiste un test in grado di garantire la sicurezza assoluta, quindi i componenti di cui sopra devono essere trattati come sostanza infettiva durante il funzionamento.
4. Gli operatori sperimentali devono aver ricevuto la formazione professionale di amplificazione genica o di individuazione di metodi biologici molecolari e possedere la relativa qualifica di operazione sperimentale. Il laboratorio deve essere dotato di adeguati impianti di prevenzione della biosicurezza e procedure di protezione e la gestione del laboratorio deve essere effettuata in stretta conformità con le specifiche di gestione dei pertinenti laboratori nazionali di biologia molecolare e dei laboratori clinici di amplificazione genica. Il processo sperimentale deve essere effettuato in diversi settori quali l'area di preparazione dei reagenti, l'area di preparazione dei campioni, l'area di amplificazione e l'area di analisi del prodotto. In ogni fase dell'operazione sperimentale devono essere utilizzati strumenti e attrezzature speciali e le forniture in ciascuna fase di ciascuna zona non devono essere utilizzate in modo intercambiabile. Devono essere stabiliti requisiti rigorosi per il flusso di personale e il flusso d'aria in ciascuna sezione al fine di evitare la massima contaminazione incrociata. I materiali di consumo, come il tubo centrifugo, la testa di aspirazione, ecc. per l'esperimento devono essere adeguate procedure di pulizia e controllo della qualità per evitare la contaminazione da RNasi o l'amplificazione di inibitori reattivi con risultati falsi negativi.
5. Ogni componente del kit deve essere completamente sciolto e scosso prima dell'uso, ma devono essere evitati ripetuti congelamenti-scongelamenti (se congelamento e scongelamento, non devono superare le 4 volte). Il reagente nel tubo della centrifuga deve essere centrifugato per alcuni secondi prima dell'uso.
6. Dopo aver completato l'estrazione dell'acido nucleico del campione, si consiglia di condurre immediatamente l'esperimento successivo. In caso contrario, conservare il campione a -20°C e completare il test entro una settimana. I prodotti di pirolisi del campione conservati a -20°C devono essere scongelati a temperatura ambiente prima dell'aggiunta del campione e utilizzati dopo una breve centrifugazione.
7. Quando i reagenti sono confezionati separatamente, le bolle dovrebbero essere evitate il più possibile. Prima di caricare, si prega di prestare attenzione a verificare se il coperchio di ciascun tubo di reazione è stretto, in modo da evitare perdite di sostanze fluorescenti e contaminazione dello strumento.
8. Dopo l'esperimento, sono necessari 50ppm ~ 2000ppm ipoclorito di sodio o alcool al 75% e lampada a raggi ultravioletti per trattare il tavolo e la pipetta.
9. Secondo l'attuale esperienza dell'epidemia, il virus può sopravvivere a lungo nell'intestino. Si consiglia di misurare il tampone anale allo stesso tempo.
10. I rifiuti sanitari generati nel test devono essere trattati in conformità con le normative locali.

【Simboli】

Etichetta	Istruzione	Etichetta	Istruzione	Etichetta	Istruzione
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro		Cautela		Catalogue number

Etichetta	Istruzione	Etichetta	Istruzione	Etichetta	Istruzione
	Consultare le istruzioni per l'uso		Non riutilizzare		Codice lotto
	Rischi biologici		Keep secco		Data di fabbricazione
	Oggetti fragili, maneggiare con cura		Fabbricante		Data di scadenza
	Ascensionale		Marchio CE		Contiene sufficiente per <n>tests
	Non utilizzare se la confezione è danneggiata		Limite di temperatura		
	Limite di impilamento per numero		Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea		

【Informazioni di base】

Produttore: SINGUWAY BIOTECH INC.

Indirizzo: B1302, Life Science Park, Shen Cheng Tou Innovation Factory, Julongshan A Road, Xiuxin Community, Kengzi Street, Pingshan District, Shenzhen City, 518122, Guangdong, P.R. China.

Tel.: +86-755-23704711 Web: www.singuway.com

Rappresentante autorizzato: CMC MEDICAL DEVICES & DRUGS S.L.

C/Horacio Lengo N° 18, CP 29006, Malaga, Spagna

Telefono: +34951214054 Fax: +34952330100

【Data di approvazione e data di modifica dell'IFU】

Luglio 21, 2021

402-000122-00 V1. 0