

## НАУЧЕН ОБЗОР

### Молекулярни методи за диагностика на SARS-CoV-2

Матералът е подготвен на база участие в следните уебинари:

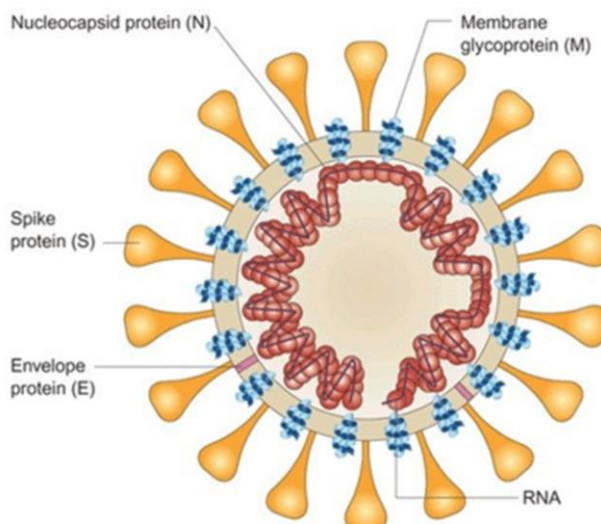
На Европейската комисия: COVID-19, European Coordinated Response to the pandemic, Brussel

На ThermoFisher Scientific: Coronavirus Research Using Next-Generation Sequencing (NGS)

На Европейската комисия: Opportunities to tackle the COVID-19 Crisis through Innovation Procurement – a legal and economic perspective

Коронавирусите (CoV) са идентифицирани като човешки патогени от 60-те години на миналия век и инвазират хора и много видове гръбначни животни. Инфекциите с коронавирус при хората са предимно свързани с респираторни или стомашно-чревни симптоми, но симптомите могат да варират от обикновена настинка до по-тежки инфекции на долните дихателни пътища, като пневмонии.

Коронавирусите са РНК-ови вируси от разред *Nidovirales*, семейство *Coronaviridae*, подсемейство *Orthocoronavirinae*. С характерната си повърхностна протеинова обвивка вирионите имат вид на корона под електронна микроскопия, от където идва и името им – лат. “*corona*”, което означава „корона“ или „ореол“.



Схематичен изглед на структурата на SARS-CoV-2

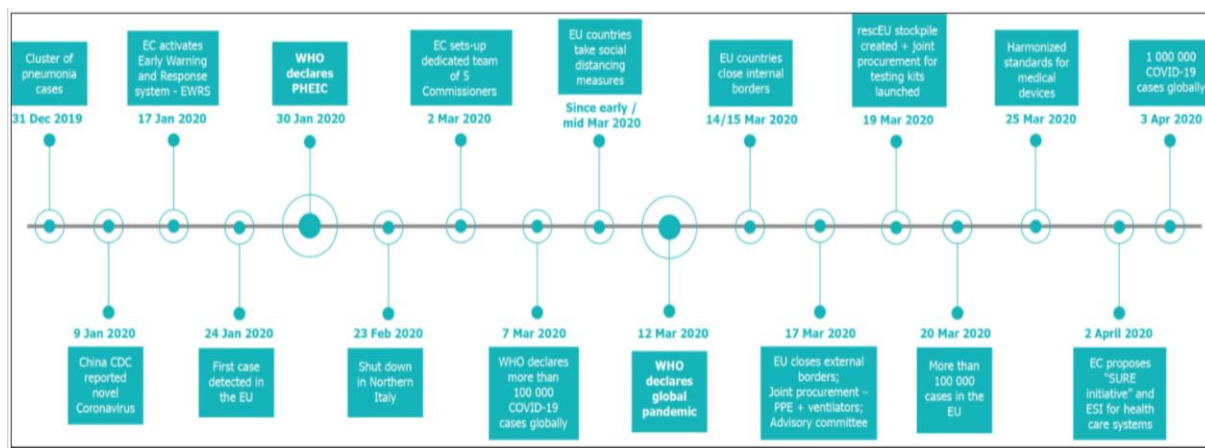
През последните години се появяват зоонотични коронавируси, които причиняват инфекции при хората, като Тежкия остър респираторен синдром (SARS,

причинен от вируса SARS-CoV) през 2003 г. и Блискоизточният респираторен синдром (MERS) от 2012 г.

Към днешна дата е показано, че седем щамове коронавируса инвазират човешката популация. Тези коронавирусни щамове принадлежат към род *Betacoronavirus* – HCoV-OC43 и HCoV-NKU1, както и към род *Alphacoronavirus* – HCoV-229E.

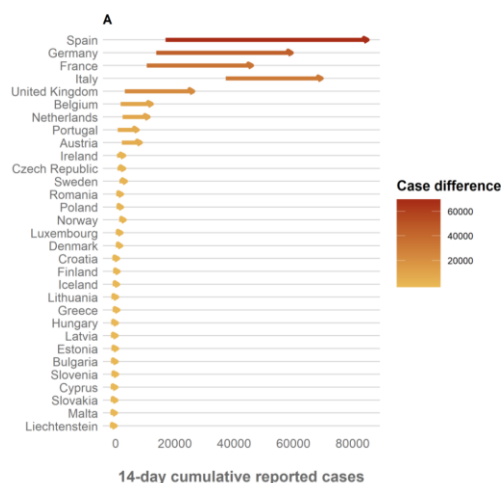
В края на 2019 г. е идентифициран нов коронавирус (**SARS-CoV-2**), свързан с клъстер от случаи на пневмония в Ухан, Китай. SARS-CoV-2 е тясно свързан със SARS-CoV и се групира в генетичен клъстер в подрод *Sarbecovirus*.

### Хронология на събитията:



До момента по данни на ECDC положителните случаи за периода 23.03. – 03.04.2020г. на заболели от новият коронавирус са представени на графиката, разпределени по държави и общ брой:

### Increased reported COVID-19 cases and incidence in the EU/EEA and the UK, 23 March-3 April



In the last 2 weeks  
+ 296 000 cases  
+ 24 000 deaths

### Клинични особености и последствия:

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056



Инфекциите при хората с обикновени коронавируси са предимно леки и безсимптомно протичащи, но са наблюдавани и тежки (двустранна пневмония) и фатални инфекции. SARS-CoV предизвика големи огнища през 2002 – 2003 г.; вирусът засегна 8 096 души, причинявайки тежки белодробни инфекции в различни страни в световен мащаб. Вирусът MERS-CoV бе идентифициран през 2012 г. в Саудитска Арабия. Клиничното представяне след инфекция с MERS-CoV може да варира от безсимптомно до симптоматично. Симптомите могат да включват висока температура, кашлица и задух, като пневмонията е често срещана клинична диагноза. Симптомите могат да прогресират в тежки случаи до синдром на остър респираторен дистрес (ARDS), септичен шок и многоорганна недостатъчност, което води до смърт. В допълнение, стомашно-чревни симптоми, като диария, също могат да се проявят. Клиничното протичане е по-тежко при имунокомпрометирани пациенти.

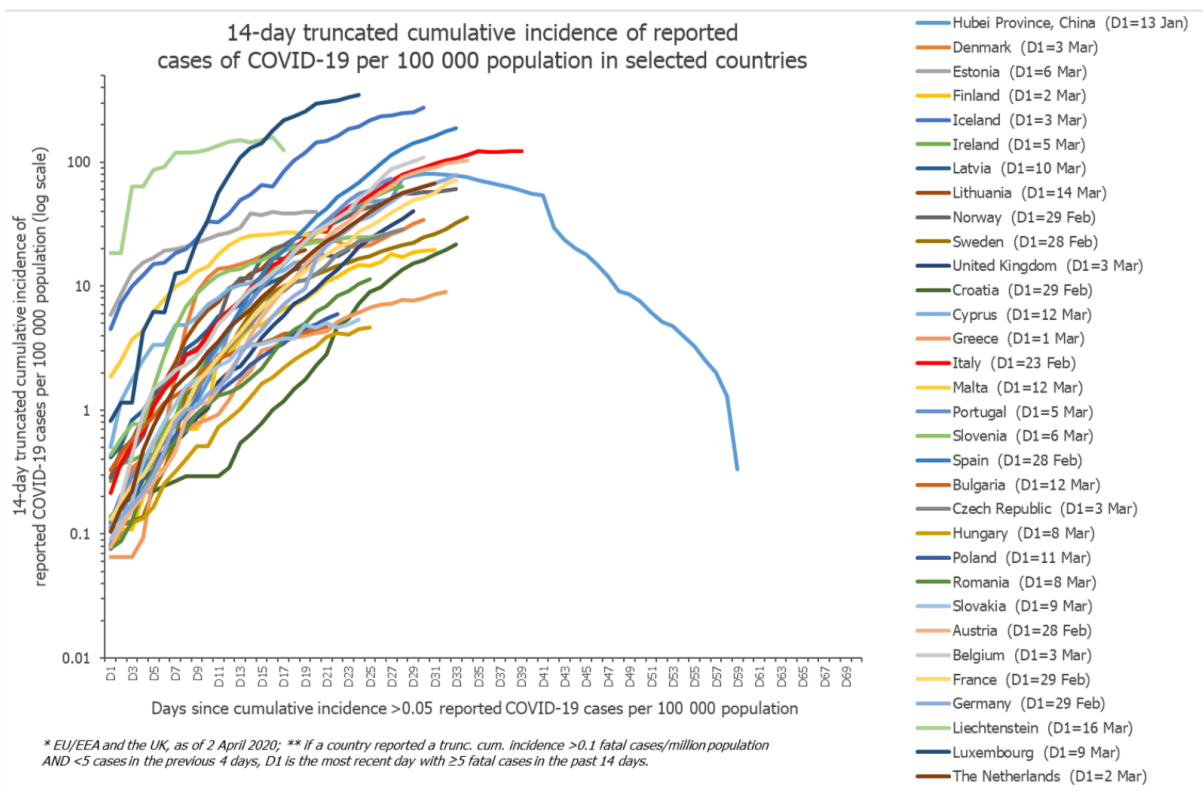
Що се отнася до SARS-CoV-2, все още се оформя епидемиологичната картина и се събира информация, относно този щам. Симптомите, докладвани до този момент при пациенти, заразени със SARS-CoV-2, включват главно температура и затруднено дишане, с рентгенови находки на пневмония. Съобщават се обаче и тежки и дори в критично състояние пациенти с ARDS.

За SARS-CoV-2 първият отчетен клъстер от хоспитализирани пациенти с пневмония е докладван на 31 декември 2019 г. в Ухан, Китай. Впоследствие съобщенията за случаите рязко се увеличават, главно в Китай, както и съобщенията за случаи, свързани с пътувания, с посещение на Ухан.

Посредством симулационни модели е доказано, според ECDC, че ако не се предприемат действия, се очаква целия ЕС/ЕИП<sup>1</sup> и Обединеното кралство да достигнат пик на нови инфекции, подобни на пика, преживян в провинция Хубей, Китай до началото на април, а някои държави от ЕС/ЕИП са преминали вече този сценарий.

---

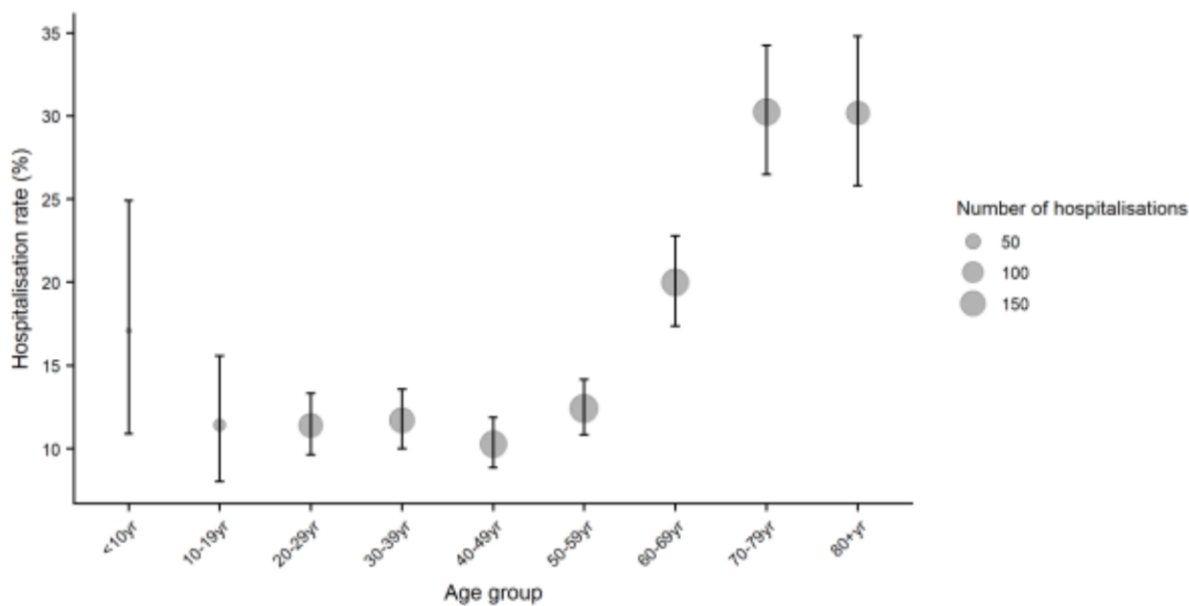
<sup>1</sup> Европейски съюз/Европейско икономическо пространство



Инкубационният период на коронавируса варира от 2 до 14 дни, като по последни данни този “скрит” период може да продължи и до 27 - 30 дни. За сравнение SARS-CoV има инкубационен период между 3 - 10 дни, а MERS-CoV до 14 дни.

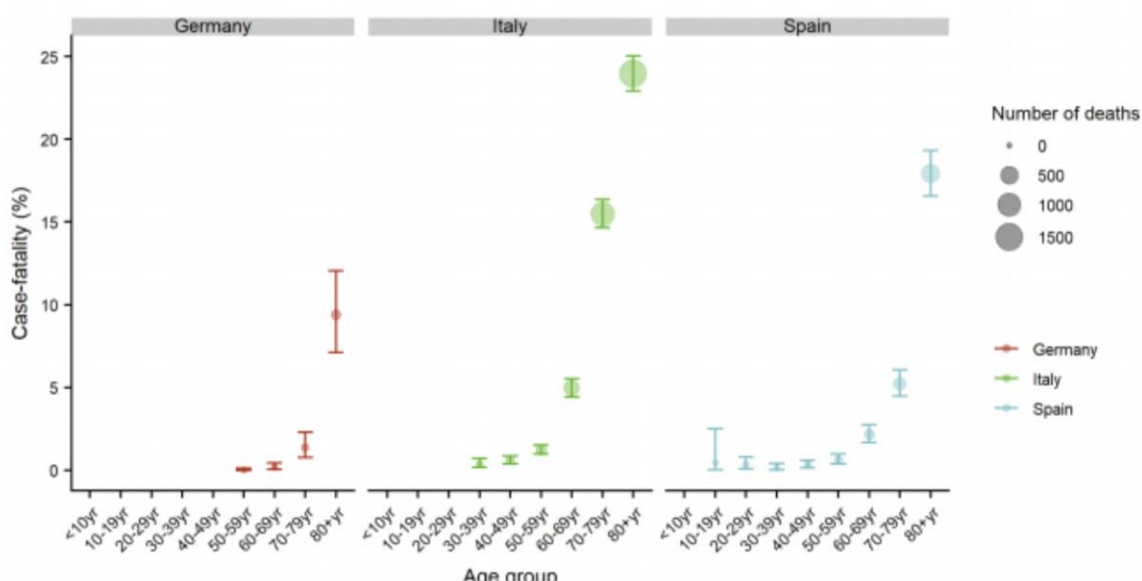
За SARS-CoV-2 източникът на инфекция и гостоприемниците на инфекцията понастоящем не са напълно изяснени и известни. Има много научни хипотези за възникването, разпространението, инвазивността и изменчивостта на този вирус.

По данни от платформата TESSy на ECDC 30% от случаите са хоспитализирани и са на възраст между 10 и 60 години. При едва 4% от случаите новият коронавирус протича със сериозни усложнения и основно засяга хора в рисковата възраст около и над 60 години и със съпътстващи хронични заболявания.

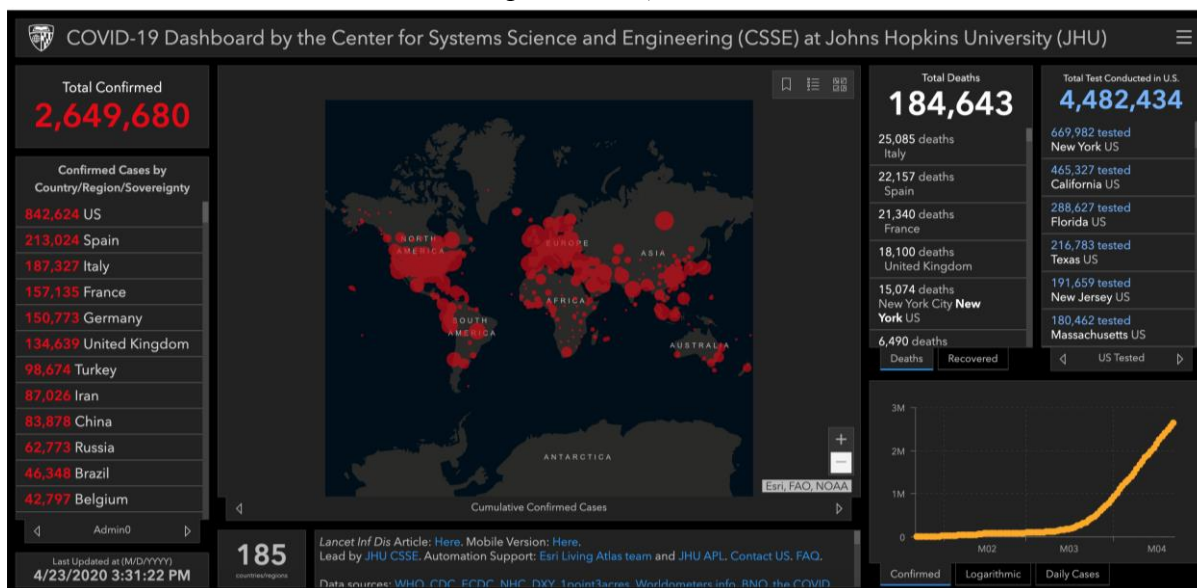


Като цяло 5.4% от докладваните в TESSy случаи са с фатален край.

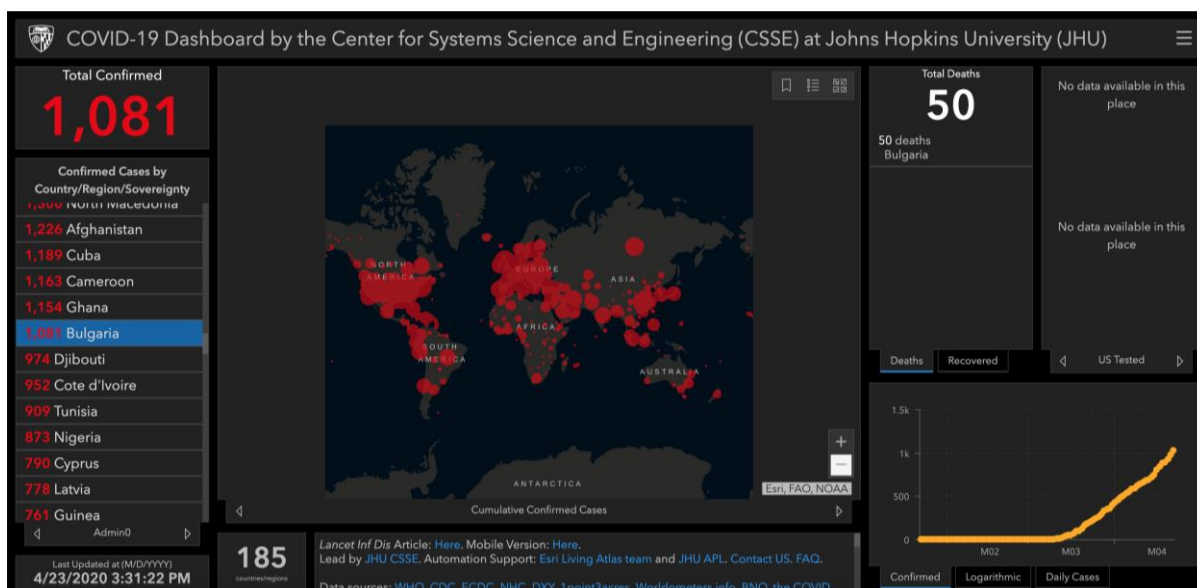
Данни за брой смъртни случаи в Италия, Испания и Германия:



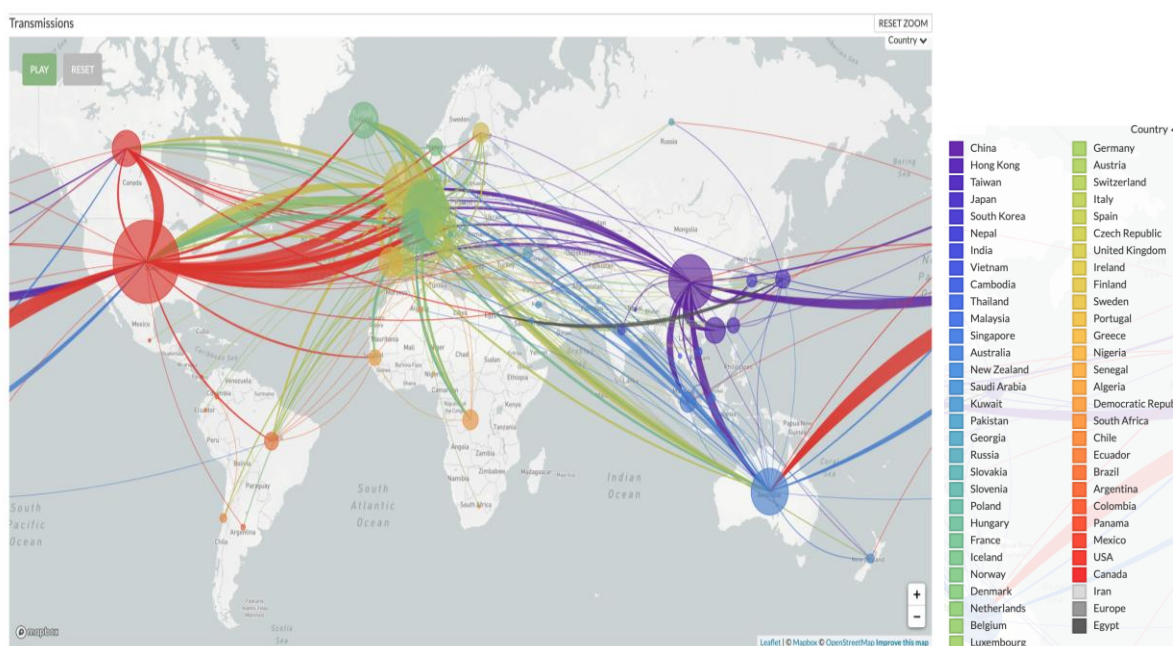
Карта и статистика на общия брой заболели, общия брой смъртни случаи и оздравели пациенти:



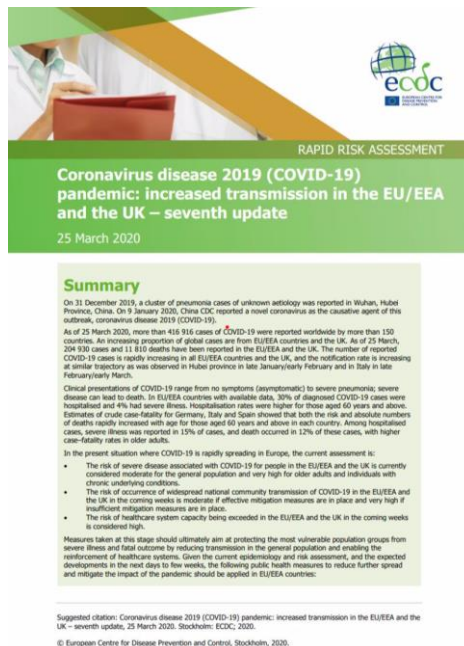
За България общият брой диагностицирани заболели към 23.04.2020 г. е 1018, като смъртните случаи са 50.



В обобщение, разпространението на инфекцията следва определен път на навлизане и разпространение, който много ясно е описан на картата:



До момента се отчита, че рискът от тежко заболяване, свързано с инфекция COVID-19 в ЕС/ЕИП и Великобритания е умерен за общата популация и много висок за възрастни хора и хора с хронични заболявания.



Предлагани са три основни групи мерки, препоръчани от СЗО и от Центъра по превенция и контрол на заболяванията на САЩ (CDC) за намаляване и за смекчаване на въздействието на пандемията от COVID-19:

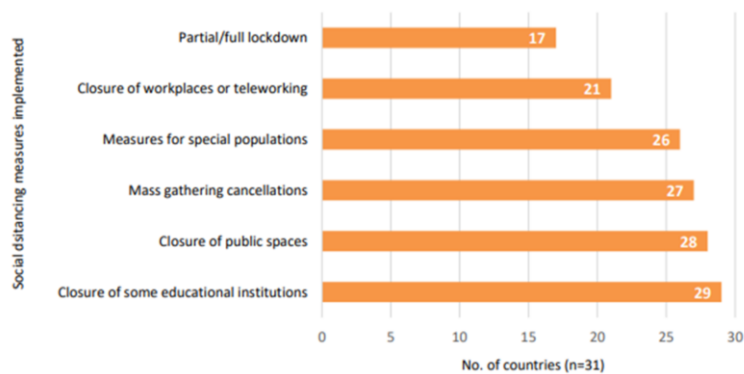
- Мерки в обществото и социално дистанциране:

## Community and social distancing measures



Nr of countries in the EU/EEA and the UK that have implemented social distancing measures (n=31), as of 24 March

- Community infection control (respiratory etiquette, hand hygiene, masks for infected individuals)
- Layered application of social distancing measures



- Строги мерки в здравните заведения:
  - Препоръчва се леките случаи да са подложени на домашна карантина;
  - Приемане на планове за преразпределяне на болнични и интензивни грижи;
  - IPC (core components of infection prevention and control (IPC)/основни компоненти за предотвратяване и контрол на инфекции) в болничните заведения за активно лечение;
  - Защита на здравните работници, лични предпазни средства (ЛПС);
  - Следене на хоспитализираните случаи;
  - Рационално използване на ЛПС в случай на недостиг;

- Утвърдени стратегии за тестване на населението посредством различни диагностични методи и мониторинг на заболяването:
  - Масово тестване и наблюдение за откриване на нови случаи и изясняване на моделите на предаване на инфекцията;
  - Лабораторното тестване на високо ниво и съобразно всички изисквания за биосигурност и биобезопасност;
  - В случай на недостиг на тестове или квалифициран и обучен персонал, приоритет на тестването са уязвимите възрастови групи пациенти, здравни работници и пациенти, които са хоспитализирани;
  - Валидиране и верифициране на избрани тестове за бърза диагностика или молекулярните тестове като PCR;
  - Вирусологичен надзор на ARI/ILI (acute respiratory infection/остра респираторна инфекция (ARI) и/или заболявания, наподобяващи инфлуенца симптоматика/influenza-like illness (ILI)), заедно с наблюдението на хоспитализираните случаи, могат да помогнат за определяне на тригери за ескалация/деескалация на мерките;
  - Проследяването на контактните лица трябва да продължи през всички етапи на епидемията, докато ресурсите позволяват.

#### Диагностика:

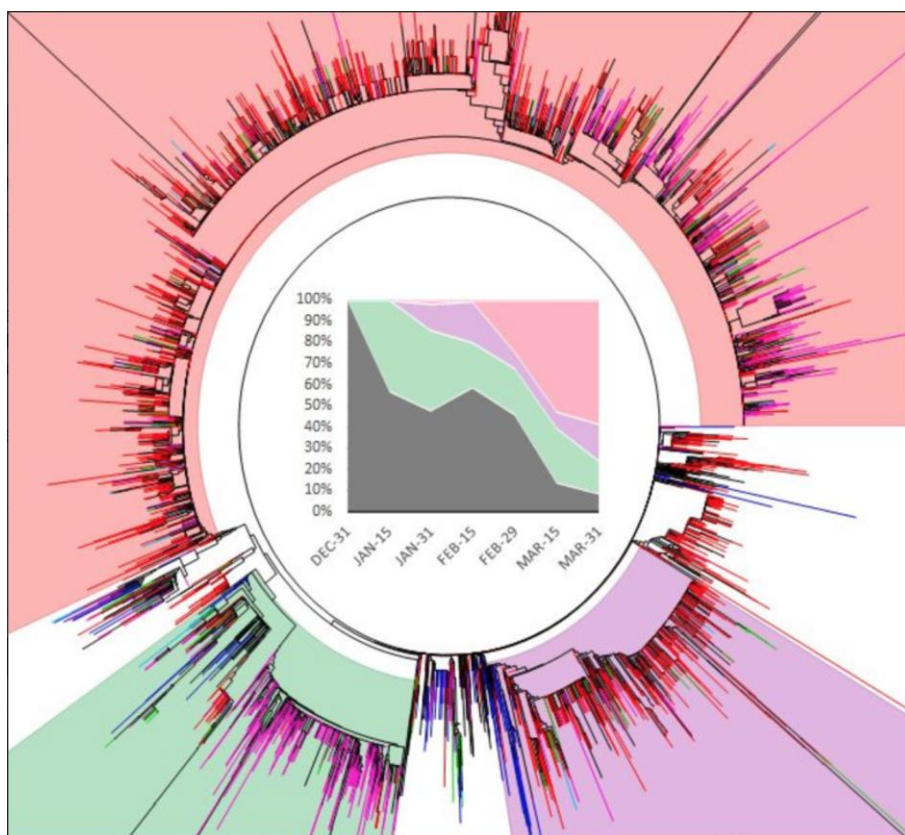
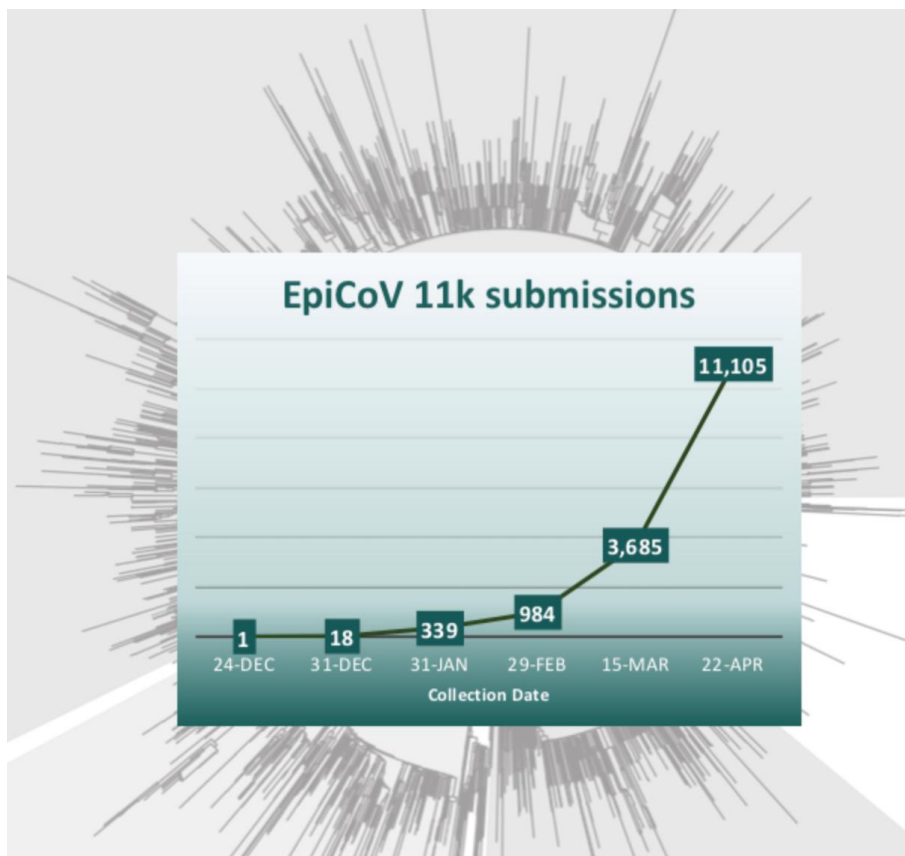
При хора MERS-CoV е открит в проби, взети от дихателните пътища (като храчка, назофарингеален тампон, ендотрахеален аспират), както и в урина, изпражнения и кръв. Вирусът се изолира в продължение на три седмици или повече след заразяването.

За новия коронавирус SARS-CoV-2, СЗО (WHO – Световна здравна организация) и ECDC (Европейски орган по превенция и контрол на заболяванията) разработиха междинни указания за лабораторни тестове в подкрепа на ДЧ (държави членки) на ЕС/ЕИП (Европейски съюз/Европейско икономическо пространство), тъй като е необходимо бързо потвърждаване на наличие/отсъствие на вирус, за да се гарантира бързо и ефективно проследяване на контактните лица, прилагане на мерки за предотвратяване на инфекцията и мерки за контрол съгласно националните препоръки и събиране на съответната епидемиологична и клинична информация.

За SARS-CoV-2 е важно да се отбележи, че един отрицателен резултат при пациент със силно епидемиологично или клинично подозрение за заболяване трябва да бъде потвърден с втори специфичен много по-точен RT-PCR (real time polymerase chain reaction) тест, насочен към определени генни локуси или разчитане на цялостния геном на изолирания вирус посредством пълен геномен секвентен анализ (WGS) и последващ биоинформатичен анализ на суровите данни.

До момента са секвенирани и публикувани, и са напълно публично достъпни 11000 геномни изолати на SARS-CoV-2 от цял свят:





**Лабораторни критерии за потвърждение наличие/отсъствие на SARS-CoV-2:**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056

Според СЗО и CDC поне един от следните три диагностични метода трябва да бъде използван:

- Култивиране на вируса в клетъчни култури от всеки клиничен изолат и идентифициране на SARS-CoV-2 чрез метод като RT-PCR;
- Детекция на SARS-CoV-2 нуклеинова киселина в поне една от следните три вида проби:
  - Най-малко два различни вида клинични проби (например назофарингеален тампон проба или купропроба - изпражнения),
  - Един и същ вид клинични проби, събрани от два или повече хоспитализирани пациенти (например последователни назофарингеални аспирати),
  - Два различни анализа или повторение на RT-PCR, използвайки нов РНК екстракт от първоначалната клинична проба.
- Специфичен за SARS-CoV-2 тест за антитела:
  - Сероконверсия чрез ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay (ензим свързан имуносорбентен анализ)) или IFA (Indirect Immunofluorescence Assay/индиректен имунофлуоресцентен метод) в серумни проби, взети в острата и възстановителната фаза, тествани паралелно,
  - Четирикратно или повече повишаване титъра на антителата между тестваните паралелно пациенти в остра и възстановителна фаза.

**Лабораторни критерии за заключение “положителен резултат/случай”** (поне едно от следните две се изисква):

- Положителен резултат от PCR за SARS-CoV-2 на единичен клиничен изолат и анализ,
- Единичен положителен тест за антитела срещу SARS-CoV-2.

**RT-PCR (real time polymerase chain reaction/полимеразно верижна реакция в реално време) тест:**

PCR тестването на асимптоматични или с лека симптоматика случаи е желателно при лица, които са имали контакт със заразени пациенти доказани с COVID-19. Дефинициите на положителните случаи се преразглеждат редовно и се актуализират, тъй като постоянно постъпва нова информация. Бързото събиране и тестване на подходящи проби от пациенти, които отговарят на определението на предполагаем положителен случай за COVID-19, е приоритетно за клиничното лечение и контрола на епидемията, и следва да се ръководи от обучен лабораторен експерт. Предполагаемите случаи трябва да бъдат изследвани за наличие на вирус посредством амплификация на РНК (NAAT) чрез RT-PCR. В случай, че диагностичните китове за COVID-19 все още не са налични на национално равнище, следва при докладване на данните от проведените изследвания (на национално ниво) да се посочат използваните на местно ниво китове и диагностикуми. С цел изключване на коинфекция, пациентите могат да бъдат изследвани и за други респираторни патогени, като се използват рутинни лабораторни процедури. Допълнителните изпитвания не трябва да забавят изпитването за COVID-19. Тъй като могат да възникнат коинфекции, всички пациенти,

които отговарят на определението на предполагаемия положителен случай, трябва да бъдат изследвани за SARS-CoV-2, независимо дали е открит друг респираторен патоген.

**NB!!** Обработката на проби за COVID-19 за молекулярно изпитване би изисквала минимум BSL-2 (biosafety level 2/ ниво на биосигурност 2) или еквивалент. При култивиране на вируса в клетъчни култури се изисква най-малко BSL-3 и стриктно спазване на всички изисквания по биосигурност и биобезопасност.

Важно е да се вземе предвид, че в области, където вирусът на COVID-19 е широко разпространен, може да бъде предприет по-прост алгоритъм на тестване, в който например скрининг чрез rRT-PCR на един целеви генен локус се счита за достатъчен. Също трябва да не се подценява, че един или повече отрицателни резултати не изключват възможността от наличие на COVID-19 вирусна инфекция. Редица фактори могат да доведат до отрицателен резултат при инфектирано лице, включително:

- технически причини, присъщи за конкретния лабораторен метод като инхибиране на PCR теста или пък вирусни мутации,
- лошо качество на взетата проба,
- проба, съдържаща малко биологичен материал от пациента,
- пробата е взета твърде късно или много рано след прекарана инфекция или респективно преди пика на инфекцията да се прояви в конкретния пациент,
- събраните проби не са взети по правилен начин или не са съхранявани в подходящи условия или транспортни среди, или се е случило нещо при транспорта на пробата до лабораторията (кросконтаминация или други причини).

Ако се получи отрицателен резултат от пациент с висок процент на подозрение за COVID-19 вирусна инфекция, особено когато са събрани само проби от горните дихателни пътища, следва да бъдат събрани и изследвани допълнителни проби, включително от долните дихателни пътища, ако е възможно.

Всяка процедура по NAAT следва да включва както външна, така и вътрешна положителна контрола, а лабораториите се насърчават да участват в междулабораторни тестове за пригодност, с цел оценка на качеството, когато станат налични. Също така се препоръчва на лабораториите, които използват собствено синтезирани праймери и сонди да извършват тестове за валидиране, тестове за специфичност и чувствителност, и тестове за чистота на синтезата.

**Праймери и сонди за детекция на SARS-CoV-2 посредством RT-PCR и целеви генни локуси:**

Institute	Gene targets
China CDC, China	ORF1ab and N
Institut Pasteur, Paris, France	Two targets in RdRP
US CDC, USA	Three targets in N gene
National Institute of Infectious Diseases, Japan	Pancorona and multiple targets, Spike protein
Charité, Germany	RdRP, E, N
HKU, Hong Kong SAR	ORF1b-nsp14, N
National Institute of Health, Thailand	N

**Протокол на CDC: Диагностичен кит/панел с наименование 2019-nCoV Real-Time RT-PCR (CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV)), съдържащ следните компоненти:**

- 2019-nCoV\_N1, 2019-nCoV\_N2 and 2019-nCoV\_N3 праймери и сонди, които хващат таргетните генни локуси, а именно - нуклеокапсидни гени (N) и са пригодени да детектират SARS-подобни коронавируси като 2019-nCoV;
- RP праймери и сонди, които целят хващането на човешкия RNase P ген;
- nCoVPC, 2019-nCoV позитивна контрола.



**Този диагностичен кит е пригоден единствено и само в критични случаи за крайна необходимост, а не за рутинна диагностика и включва 1000 дози!**

Диагностичният панел за реално време на CDC 2019-nCoV RT-PCR е молекулярен *in vitro* диагностичен тест, който подпомага откриването и диагностицирането на 2019-nCoV и се основава на широко използвана технология за амплификация на нуклеинови киселини. Продуктът съдържа олигонуклеотидни праймери и двойно белязани сонди (TaqMan®) и контроли, използвани в rRT-PCR за *in vitro* качествено откриване на 2019-nCoV РНК в проби от дихателната система.

**Принцип на процедурата:**

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0



Олигонуклеотидните праймери и сонди за откриване на 2019-nCoV са избрани за генни целеви локуси на вируса, кодиращи нуклеокапсидната обвивка (N). Панелът е проектиран за специфично откриване на 2019-nCoV (два комплекта праймери и сонда). В панела е включен и допълнителен комплект праймери и сонда, установен за откриване на човешки RNase P ген (RP) в контролни проби и клинични проби.

РНК, която е изолирана и пречистена от проби, взети от горни и долни дихателни пътища, се транскрибира обратно в кДНК и впоследствие се амплифицира посредством 7500 Fast Dx PCR термосайкълър в реално време със софтуера SDS версия 1.4. В процеса сондата се насочва към специфична целева последователност, разположена между правия и обратния праймер. По време на фазата на удължаване при PCR циклите, 5' нуклеазната активност на Taq полимеразата разгражда сондата, причинявайки репортерното багрило да се отдели, генерирайки флуоресцентен сигнал. С всеки цикъл, допълнителни молекули за репортерното багрило се разцепват от съответните им сонди, увеличавайки интензитета на флуоресценция. Интензитетът на флуоресценция се следи при всеки цикъл на PCR чрез Applied Biosystems 7500 Fast Dx PCR система в реално време със софтуер за версия SDS 1.4.

### 1. Детекция на нуклеинова киселина посредством real-time fluorescence RT-PCR:

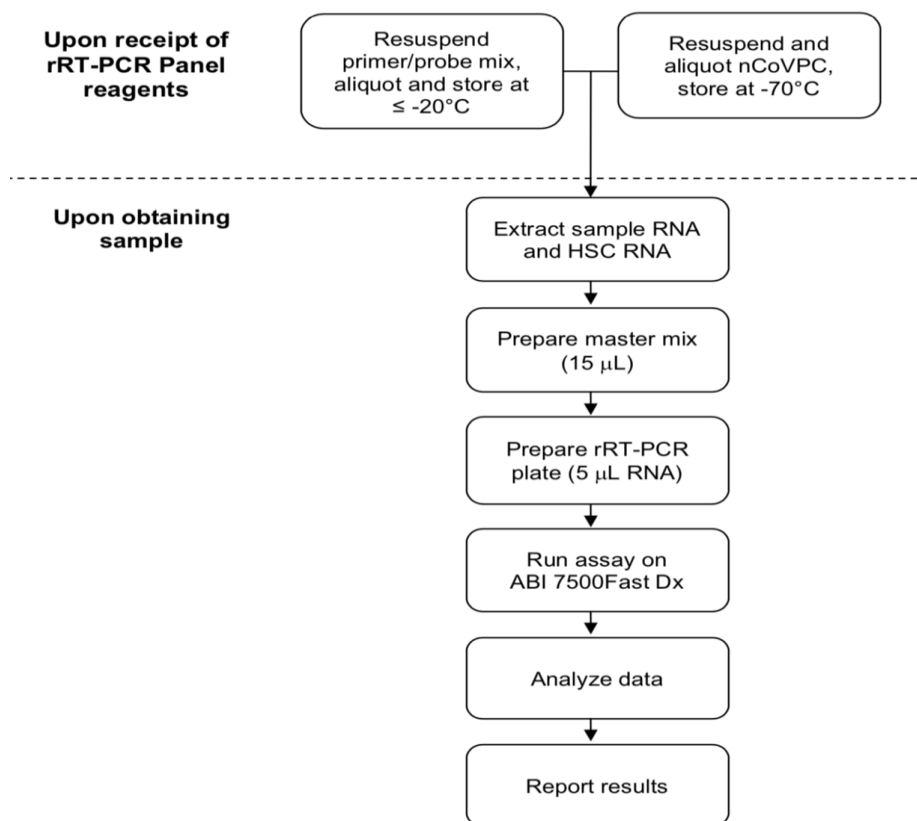
Препоръчително е да се използва отворена рамка на четене за целевия ген **ORF1ab** и за нуклопротеин генния регион (**N**).

- **Целеви ген 1 (ORF1ab) – използвани праймерни последователности:**
  - Прав праймер (F): CCCTGTGGGTTTTACACTTAA
  - Обратен праймер (R): ACGATTGTGCATCAGCTGA
  - Сонда (P): 5'-FAM-CCGTCTGCGGTATGTGGAAAGGTTATGG-BHQ1-3'
- **Целеви ген 2 (N) – използвани праймерни последователности:**
  - Прав праймер (F): GGGGAACCTTCTCCTGCTAGAAT
  - Обратен праймер (R): CAGACATTTTGCTCTCAAGCTG
  - Сонда (P): 5'-FAM-TTGCTGCTGCTTGACAGATT-TAMRA-3'

### 2. Интерпретация на резултатите от RT-PCR:

- Негативен резултат при Ct  $\geq$  40.
- Позитивен резултат: Ct < 37.
- Съмнителен резултат: Ct между 37 - 40. При такива резултати е желателно повторение на целия тест.
- При ясно изразени пикове, пробата се оценя като положителна, в противен случай е отрицателна.

Схематично представен целият протокол:



The following lots of N1, N2, and RP primers and probes have passed functional testing at CDC and may be used with the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel Instructions for Use under CDC's Emergency Use Authorization (EUA):

<https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorizations>

В таблицата са посочени всички **китове за екстракция**, които според CDC и СЗО са допустими за работа с 2019-nCoV и които са съвместими с диагностичния панел, създаден от CDC:

## RNA Extraction Options

For each of the kits listed below, CDC has confirmed that the external lysis buffer is effective for inactivation of SARS-CoV-2.

Instrument/Manufacturer	Extraction Kit	Catalog No.
QIAGEN	<sup>2</sup> QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit	50 extractions (61904)
	<sup>2</sup> QIAamp Viral RNA Mini Kit	50 extractions (52904) 250 extractions (52906)
QIAGEN EZ1 Advanced XL	<sup>2</sup> EZ1 DSP Virus Kit	48 extractions (62724) Buffer AVL (19073) EZ1 Advanced XL DSP Virus Card (9018703)
	<sup>2</sup> EZ1 Virus Mini Kit v2.0	48 extractions (955134) Buffer AVL (19073) EZ1 Advanced XL Virus Card v2.0 (9018708)
<sup>1</sup> Roche MagNA Pure LC	<sup>2</sup> Total Nucleic Acid Kit	192 extractions (03 038 505 001)
<sup>1</sup> Roche MagNA Pure Compact	<sup>2</sup> Nucleic Acid Isolation Kit I	32 extractions (03 730 964 001)
<sup>1</sup> Roche MagNA Pure 96	<sup>2</sup> DNA and Viral NA Small Volume Kit	576 extractions (06 543 588 001) External Lysis Buffer (06 374 913 001)
<sup>1</sup> QIAGEN QIAcube	<sup>2</sup> QIAamp DSP Viral RNA Mini Kit	50 extractions (61904)
	<sup>2</sup> QIAamp Viral RNA Mini Kit	50 extractions (52904) 250 extractions (52906)
<sup>1,3</sup> bioMérieux NucliSENS <sup>®</sup> easyMAG <sup>®</sup> and <sup>1,3</sup> bioMérieux EMAG <sup>®</sup> (Automated magnetic extraction reagents sold separately. Both instruments use the same reagents and disposables, with the exception of tips.)		EasyMAG <sup>®</sup> Magnetic Silica (280133) EasyMAG <sup>®</sup> Lysis Buffer (280134) EasyMAG <sup>®</sup> Lysis Buffer, 2 mL (200292) EasyMAG <sup>®</sup> Wash Buffers 1,2, and 3 (280130, 280131, 280132) EasyMAG <sup>®</sup> Disposables (280135) Biohit Pipette Tips (easyMAG <sup>®</sup> only) (280146) EMAG <sup>®</sup> 1000µL Tips (418922)

## Реакционен мастер микс за rRT-PCR:

**Забележка:** Негативна (NTC) и позитивна (nCoVPC) контроли винаги трябва да бъдат включени във всяко изпитване.

- 1) Разтваряне на 4X Reaction Mix преди употреба.
- 2) Смесване буфера, ензима, праймерите и сондите.
- 3) Центрофугиране в продължение на 5 секунди и след това поставяне на студено на готовия микс.
- 4) Отделни 1.5 mL микроцентрифужни епруветки се използват за всеки комплект праймери и сонди.
- 5) Определяне на броя на реакциите (N), за да се изчислят точните количества микс и респективно компоненти, т.е. за определяне на N:
  - Ако броят на пробите (n), включително контролите е равен на 1 до 14, тогава  $N = n + 1$
  - Ако броят на пробите (n), включително контролите, е 15 или по-голям, тогава  $N = n + 2$
- 6) Мастермикса (rRT-PCR буфер, ензим, праймери, сонди) винаги трябва да бъде приготвян върху лед или специален статив за охлаждане. След приготвяне на

реакционната смес (мастермикс) той трябва да бъде съхраняван на студено до момента, в който се добави екстрахираната вирусна РНК.

Точните количества за една реакция и крайният обем на микса са дадени в таблицата:

**TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix**

Step #	Reagent	Vol. of Reagent Added per Reaction
1	Nuclease-free Water	N x 8.5 µL
2	Combined Primer/Probe Mix	N x 1.5 µL
3	TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix (4x)	N x 5.0 µL
	<b>Total Volume</b>	<b>N x 15.0 µL</b>

7) Към мастермикса се добавя екстрахирана вирусна РНК 5µL като предварително нуклеиновите киселини се вортексират и центрофугират за кратко. Пробите (екстрахираните РНК) се позиционират върху стриповете или плаките по следният начин спрямо положителните и отрицателните контроли:

**Figure 2. 2019-nCoV rRT-PCR Diagnostic Panel: Example of Sample and Control Set-up**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11*	12
A	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
B	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
C	NTC	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	nCoV PC
D												
E												
F												
G												
H												

\*Replace the sample in this column with extracted HSC if necessary

Тази позиция на проби спрямо контроли се прави с цел избягване на кросконтаминация и пропадане на целият анализ.

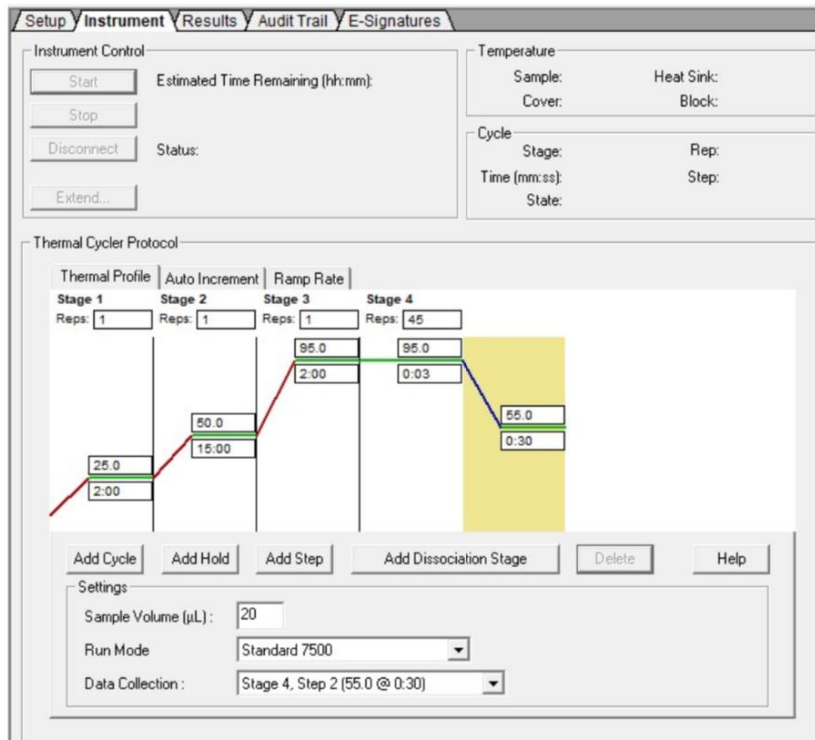
Температурният режим, при който протича анилинга и размножаването на вирусните генни участъци както и изглед от програмата на термосайкълъра е следният:

### TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG (ThermoFisher)

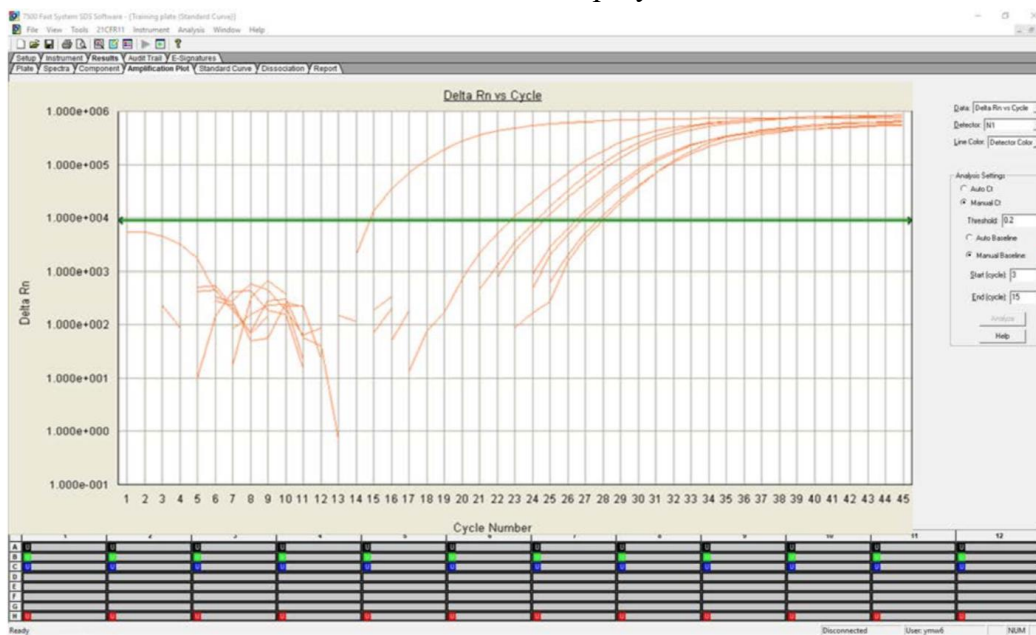
- Стъпка 1 – 2 минути на 25°C , 1цикъл.
- Стъпка 2 - 15 минути на 50°C; 1 цикъл.
- Стъпка 3 – 2 минути на 95°C; 1цикъл.
- Стъпка 4.1 – 3 секунди на 95°C.
- Стъпка 4.2 - 30 секунди на 55.0°C.
- Стъпка 4 се повтаря 45 цикъла.

Работният обем трябва да бъде зададен на 20 µL.

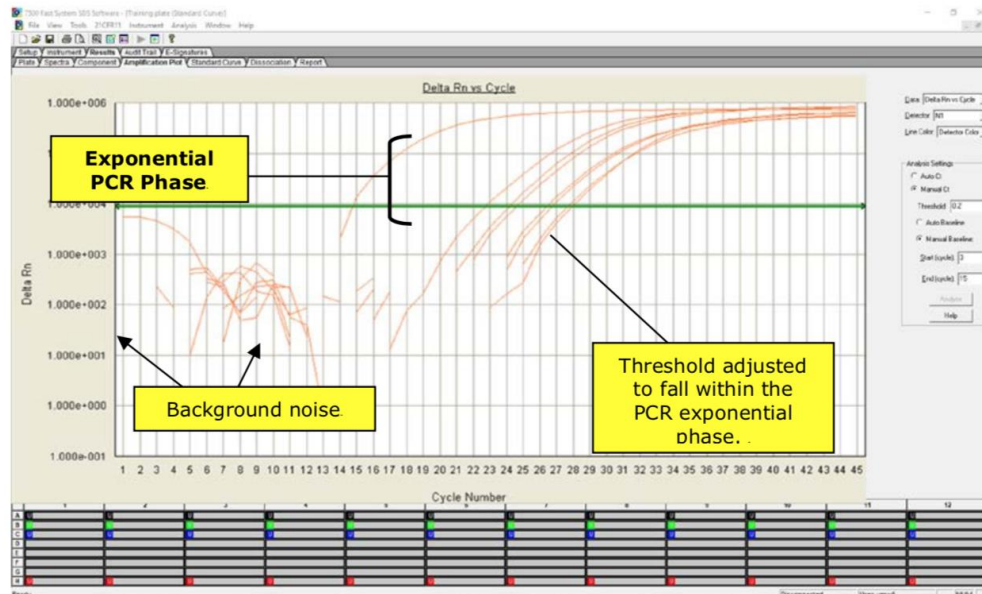




В този вид изглеждат резултатите:



## Amplification Plot



### Интерпретация на резултатите:

#### Резултати за екстракцията и позитивната контрола и тълкуване на резултатите:

**Отрицателната контрола (NTC)** обикновено е вода без ДНК-ази РНК-ази. NTC ямките не трябва да показват флуоресцентен сигнал и респективно крива с нито една двойка праймери и сонда, които пресичат праговата линия. Ако някоя от NTC реакциите показва експоненциална крива, която пресича threshold прага, е възможна кросконтaminaция или замърсяване на пробата. В такива случаи целият анализ започва отново от екстракцията до полимерзновеижната реакция и анализ на резултата.

**2019-nCoV позитивна контрола (nCoVPC)** - NCoVPC се състои от *in vitro* транскрибирана РНК. NCoVPC ще даде положителен резултат със следните комплекти праймери и сонда: N1, N2 и RP.

**Контрола на човешките проби (HSC) (Контрола на екстракцията)** - HSC контролата се състои от материал от неинфекциозни култивирани човешки клетки (A549). Пречистената нуклеинова киселина от HSC трябва да даде положителен резултат с RP набор праймери и сонда и отрицателни резултати с всички 2019-nCoV маркери.

Фигура, посочваща циклите/Ct стойностите, при които се наблюдава положителната или отрицателната контроли или контролата на екстракция:

Expected Performance of Controls Included in the CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel

Control Type	External Control Name	Used to Monitor	2019 nCoV_N1	2019 nCoV_N2	RP	Expected Ct Values
Positive	nCoVPC	Substantial reagent failure including primer and probe integrity	+	+	+	< 40.00 Ct
Negative	NTC	Reagent and/or environmental contamination	-	-	-	None detected
Extraction	HSC	Failure in lysis and extraction procedure, potential contamination during extraction	-	-	+	< 40.00 Ct

### **RNase P (контрола на екстракция)**

Всички клинични проби трябва да показват експоненциални флуоресцентни криви в реакцията на RNase P, които преминават праговата линия в рамките на 40 цикъла (<40.00 Ct), като по този начин показват наличието на човешкия RNКаза P ген. Неуспехът да се открие RNase P в нито една клинична проба може да показва:

- Неправилно извличане на нуклеинова киселина от биологичен материал, което води до загуба на РНК и/или РНК разграждане,
- Липса на достатъчно биологичен материал,
- Неправилно изпълнение на протокола,
- технически проблем.

Ако RP анализът не даде положителен резултат за човешки клинични проби, резултатите се интерпретират, както следва:

- Ако 2019-nCoV N1 и N2 са положителни дори при липса на положителен RP, резултатът трябва да се счита за валиден. Възможно е някои проби да не покажат криви на растеж на RNase P поради малкия брой вирусни частици в клиничната проба. Отрицателният RP сигнал не изключва наличието на РНК на вирус 2019-nCoV в клиничен образец.

- Ако всички маркери 2019-nCoV и RNase P са отрицателни за пробата, резултатът трябва да се счита за невалиден. Необходимо е повторение на процедурата за екстракция и повторение на теста.

2019-nCoV маркери (N1 и N2)

- Когато всички контроли показват очакваният резултат, пробата се счита за отрицателна, ако всички експоненциални криви не преминат прага на маркер 2019-nCoV (N1, N2) в рамките на 40 цикъла (<40.00 Ct) и експоненциалната крива на RNase P пресече праговата линия в рамките на 40 цикъла (<40.00 Ct).

- Когато всички контроли показват очакваните резултати, пробата се счита за положителна за 2019-nCoV, ако всички експоненциални криви на маркер 2019-nCoV (N1, N2) преминават праговата линия в рамките на 40.00 цикъла (<40.00 Ct). RNase P може или не може да бъде положителен, както е описано по-горе, но резултатът 2019-nCoV все още е валиден.

Когато всички контроли показват очакваният резултат и експоненциалните криви за 2019-nCoV маркерите (N1, N2) и RNaseP маркер не пресичат прага в рамките на 40 цикъла (<40,00 Ct), резултатът е невалиден. Екстрахираната РНК от пробата трябва да бъде повторно тествана. Ако остатъчната РНК не е налична, е необходима нова екстракция и повторно тестване. Ако повторно тестваната проба е отрицателна за всички маркери и RNase P, резултатът е невалиден и трябва да се предприеме ново пробовземане от пациента.

- Когато всички контроли показват очакваният резултат и експоненциалните криви за всеки един маркер (N1 или N2, но не и двата маркера) пресичат праговата линия в рамките на 40 цикъла (<40.00 Ct), резултатът е неубедителен. Извлечената РНК трябва да бъде повторно изпитана. При повторен резултат, който е същият, трябва пробата да се изпрати в CDC за допълнителен анализ.
- Ако HSC е положителен за N1 или N2, тогава по време на екстракция или обработка на пробата се е получило замърсяване. Необходимо е повтаряне на целия тест.

*Таблицата показва очакваните резултати за 2019-nCoV rRT-PCR диагностичен панел:*

2019 nCoV_N1	2019 nCoV_N2	RP	Result Interpretation <sup>a</sup>	Report	Actions
+	+	±	2019-nCoV detected	Positive 2019-nCoV	Report results to CDC and sender.
If only one of the two targets is positive		±	Inconclusive Result	Inconclusive	Repeat testing of nucleic acid and/or re-extract and repeat rRT-PCR. If the repeated result remains inconclusive, contact your State Public Health Laboratory or CDC for instructions for transfer of the specimen or further guidance.
-	-	+	2019-nCoV not detected	Not Detected	Report results to sender. Consider testing for other respiratory viruses. <sup>b</sup>
-	-	-	Invalid Result	Invalid	Repeat extraction and rRT-PCR. If the repeated result remains invalid, consider collecting a new specimen from the patient.

<sup>a</sup>Laboratories should report their diagnostic result as appropriate and in compliance with their specific reporting system.

<sup>b</sup>Optimum specimen types and timing for peak viral levels during infections caused by 2019-nCoV have not been determined. Collection of multiple specimens from the same patient may be necessary to detect the virus. The possibility of a false negative result should especially be considered if the patient's recent exposures or clinical presentation suggest that 2019-nCoV infection is possible, and diagnostic tests for other causes of illness (e.g., other respiratory illness) are negative. If 2019-nCoV infection is still suspected, re-testing should be considered in consultation with public health authorities.

### Ограничения на този диагностичен подход:

- Ефективността на диагностичния панел за RT PCR в реално време на CDC 2019-nCoV е установена само в проби от горни и долни дихателни пътища (като назофарингеални или орофарингеални тампони, хрочки, аспирати на долните

дихателни пътища, бронхоалвеоларни промивки и промивка/аспирация на носоглътката или назален аспират).

- Отрицателните резултати не изключват заразяване с 2019-nCoV и не трябва да се използват като единствена основа за предприемане на лечение на пациента. Оптималните типове проби и оптималното време за пробовземане в пика на вирусната инфекция, причинена от 2019-nCoV, не са определени. За откриване на вируса може да е необходимо събирането на множество проби (различни видове и в различен времеви интервал) от един и същ пациент .
- Може да възникне фалшив отрицателен резултат, ако пробата е неправилно събрана, транспортирана или обработена. Фалшиво отрицателни резултати могат да възникнат и ако в пробата присъстват инхибитори на реакцията или ако в пробата присъстват недостатъчен брой вирусни частици.
- Положителните и отрицателните прогнозни стойности силно зависят от разпространението. Фалшиво отрицателните резултати от теста са по-вероятни, когато разпространението на заболяването е голямо. Фалшиво положителните резултати от теста са по-вероятни, когато разпространението е умерено до ниско.
- Ако вирусът 2019-nCoV мутира, при rRT-PCR целевия генен регион, може да не бъде открит. Инхибиторите или други видове смущения могат да доведат до фалшиво отрицателен резултат.
- Ефективността на теста може да се повлияе, тъй като епидемиологията и клиничният спектър на инфекция, причинена от 2019-nCoV, не са напълно известни. Например, клиницистите и лабораториите може да не знаят оптималните видове проби за събиране и по време на инфекцията, когато тези образци най-вероятно съдържат нива на вирусна РНК, които могат лесно да бъдат открити.
- Откриването на вирусна РНК може да не показва наличието на вирус или че 2019-nCoV е причинителят на клиничните симптоми.
- Този тест не може да изключи заболявания, причинени от други бактериални или вирусни патогени.

**Друг протокол за RT-PCR в реално време е разработен от институт *Pasteur*, Париж за откриване на SARS-CoV-2.**

Този протокол описва процедурите за откриване на SARS-CoV-2 за два RdRp таргетни генни участъка (IP2 и IP4). Въз основа на първите секвентни последователности на SARS-CoV-2, предоставени в базата данни на GISAID на 11 януари 2020 г., праймерите и сондите (nCoV\_IP2 и nCoV\_IP4) са проектирани да откриват RdRp гена, обхващащ nt 12621-12727 и 14010-14116 (позиции според SARS-CoV, секвенция NC\_004718). Като потвърдително изследване използват анализ на гена E от протокола Charité.

#### **Материали и китове:**

- *Kit Extraction NucleoSpin Dx Virus, Ref: Macherey Nagel 740895.50*

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
тел. 02/4273056

- *SuperScript™ III Platinum®* едностъпков количествен RT-PCR, Ref: *Invitrogen 1732-020*
- праймери и сонди:

Name	Sequences (5'-3')	Length (bases)	PCR product size	Ref.
<b>RdRp gene / nCoV_IP2</b>				
nCoV_IP2-12669Fw	ATGAGCTTAGTCCTGTTG	17	108 bp	1
nCoV_IP2-12759Rv	CTCCCTTGTGTGTTGT	18		
nCoV_IP2-12696bProbe(+)	AGATGTCTGTGCTGCCGGTA [5']Hex [3']BHQ-1	21		
<b>RdRp gene / nCoV_IP4</b>				
nCoV_IP4-14059Fw	GGTAACTGGTATGATTTCCG	19	107 bp	1
nCoV_IP4-14146Rv	CTGGTCAAGGTTAATATAGG	20		
nCoV_IP4-14084Probe(+)	TCATACAAACCACGCCAGG [5']Fam [3']BHQ-1	19		
<b>E gene / E_Sarbeco</b>				
E_Sarbeco_F1	ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	18	125 bp	2
E_Sarbeco_R2	ATATTGCAGCAGTACGCACACA	20		
E_Sarbeco_P1	ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG [5']Fam [3']BHQ-1	20		

1/ National Reference Center for Respiratory Viruses, Institut Pasteur, Paris.

2/ Corman et al. *Eurosurveillance*<sup>1</sup>

Праймерните сетове nCoV\_IP2 и nCoV\_IP4 могат да бъдат мултиплексирани. PCR амплификационни региони (позиции според SARS-CoV, NC\_004718): nCoV\_IP2 / позиция 12621-12727, E ген / позиция 26141-26253, nCoV\_IP4 / позиция 14010-14116.

За екстракция на вирусната нуклеинова киселина е използван *NucleoSpin Dx Virus* кит (*Macherey Nagel ref. 740895.50*). РНК се извлича от 100 µl изходен материал и се елуира в 100 µl елуиращ буфер, съгласно протокола, препоръчан от производителя.

RT-PCR Mix китът е на фирма *Invitrogen* и е с наименование *Superscript™ III Platinum® One-Step qRT-PCR* кит (ref: 11732—088). Последователностите на праймерите и сондата, както и оптимизираните концентрации са показани в таблицата по-долу. Крайният обем на реакцията е 25µl, съдържаща 5µl РНК.

Simplex Mix	Vol (µl)	[final]
H <sub>2</sub> O PPI	3.60	
Reaction mix 2X	12.50	3 mM Mg
MgSO <sub>4</sub> (50mM)	0.40	0.8 mM Mg
Forward Primer (10µM)	1.00	0.4 µM
Reverse Primer (10µM)	1.00	0.4 µM
Probe (10µM)	0.50	0.2 µM
SuperscriptIII RT/Platinum Taq Mix	1.00	
<b>Final Volume</b>	<b>20.00</b>	

Multiplex Mix (nCoV_IP2&IP4)	Vol (µl)	[final]
H2O PPI	1.3	
Reaction mix 2X	12.50	3 mM Mg
MgSO4 (50mM)	0.40	0.8 mM Mg
Forward Primer (10µM)	1.00	0.4 µM
Reverse Primer (10µM)	1.00	0.4 µM
Forward Primer (10µM)	1.00	0.4 µM
Reverse Primer (10µM)	1.00	0.4 µM
Probe (10µM)	0.4	0.16 µM
Probe (10µM)	0.4	0.16 µM
SuperscriptIII RT/Platinum Taq Mix	1.00	
<b>Final Volume</b>	<b>20.00</b>	

Всеки RT-PCR в реално време включва в допълнение на тестваните проби:

- Две отрицателни контроли, негативни контроли (контроли на екстракцията),
- Положителни контроли (двукратно накапана); При използване на *in vitro* синтезирани транскрипти като положителни контроли, те трябва да включват пет количествено положителни контроли (дублирани), включително  $10^5$ ,  $10^4$  и  $10^3$  копия, еквивалентни на *in vitro* синтезираните РНК транскрипти,
- Една отрицателна контрола на амплификацията.

Температурните режими, които се задават на термосайкълъра са следните:

Обратна транскрипция	55 °C	20 мин.	x1 бр. цикли
Денатурация	95 °C	3 мин.	x1 бр. цикли
Амплификация	95 °C	15 секунди	x50 бр. цикли
	58 °C	30 секунди	
Охлаждане	40 °C	30 секунди	x1 бр. цикли

### nCoV\_IP и E\_Sarbeco RT-PCR в реално време:

Чувствителността е от 95% и е около 100 копия на РНК-овия геномен еквивалент за реакция (това количество целева последователност винаги се открива), вероятността за откриване на по-ниски количества вирус намалява, но проби, съдържащи 10 копия, могат да бъдат открити с мултиплексен PCR.

RNA copies Of transcript	Multiplex (Ct values)		Simplex (Ct values)
	nCoV_IP2	nCoV_IP4	E_Sarbeco
1,00E+07	21,67	21,97	24,72
1,00E+06	24,97	25,12	28,19
1,00E+05	28,00	27,88	30,96
1,00E+04	31,84	30,51	33,33

*Ct* стойностите могат да варират в зависимост от апарата до 2 цикъла, докато интервалът между два етапа на разреждане е постоянен (act).

Специфичността на теста също е изследвана. Кръстосаната реактивност с други респираторни вируси е изследвана с проби, за които е известно, че са положителни за панел от респираторни вируси (*influenza A(H1N1)pdm09*, *A(H3N2)*, *B-Victoria*, *B-Yamagata*; *influenza C*; *RSV A, B*; *hBoV*; *hPIV*; *hMPV*; *HRV/enterovirus*; *adenovirus*; *hCoV (HKU1, OC43, 229E and NL63)*; *MERS-CoV*. Нито един от изследваните вируси не показва реакция с PCR2 и PCR4.

Положителната контрола за SARS-CoV-2 от RT-PCR в реално време е *in vitro* транскрибирана РНК, получена от щам BetaCoV\_Wuhan\_WIV04\_2019 (EPI\_ISL\_402124). Транскриптът съдържа амплифицирани региони на RdRp и E гена като положителна контрола. Всяка виалка съдържа  $10^{11}$  копия на целевата последователност и е в лиофилизирано състояние. За възстановяване на положителната контрола се добавят 100  $\mu$ l RNase/DNase-free H<sub>2</sub>O и така концентрацията става  $10^9$  копия/ $\mu$ l (Съхранява се при -80 °C.). Работната концентрация, която е необходима за реакцията е  $2 \times 10^6$  копия/ $\mu$ l (може дълго да се съхранява при -80 °C.) и  $2 \times 10^4$  копия/ $\mu$ l работен разтвор (за работа в момента или употреба до една седмица, съхраняван при 20°C).

## 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel

### Primers and Probes

Division of Viral Diseases

2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel Primers and Probes				
Name	Description	Oligonucleotide Sequence (5'>3')	Label <sup>1</sup>	Working Conc.
2019-nCoV_N1-F	2019-nCoV_N1 Forward Primer	5'-GAC CCC AAA ATC AGC GAA AT-3'	None	20 $\mu$ M
2019-nCoV_N1-R	2019-nCoV_N1 Reverse Primer	5'-TCT GGT TAC TGC CAG TTG AAT CTG-3'	None	20 $\mu$ M
2019-nCoV_N1-P	2019-nCoV_N1 Probe	5'-FAM-ACC CCG CAT TAC GTT TGG TGG ACC-BHQ1-3'	FAM, BHQ-1	5 $\mu$ M
2019-nCoV_N2-F	2019-nCoV_N2 Forward Primer	5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3'	None	20 $\mu$ M
2019-nCoV_N2-R	2019-nCoV_N2 Reverse Primer	5'-GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3'	None	20 $\mu$ M
2019-nCoV_N2-P	2019-nCoV_N2 Probe	5'-FAM-ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AG-BHQ1-3'	FAM, BHQ-1	5 $\mu$ M
2019-nCoV_N3-F	2019-nCoV_N3 Forward Primer	5'-GGG AGC CTT GAA TAC ACC AAA A-3'	None	20 $\mu$ M
2019-nCoV_N3-R	2019-nCoV_N3 Reverse Primer	5'-TGT AGC ACG ATT GCA GCA TTG-3'	None	20 $\mu$ M
2019-nCoV_N3-P	2019-nCoV_N3 Probe	5'-FAM-AYC ACA TTG GCA CCC GCA ATC CTG-BHQ1-3'	FAM, BHQ-1	5 $\mu$ M
RP-F	RNAse P Forward Primer	5'-AGA TTT GGA CCT GCG AGC G-3'	None	20 $\mu$ M
RP-R	RNAse P Reverse Primer	5'-GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT-3'	None	20 $\mu$ M
RP-P	RNAse P Probe	5'-FAM – TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG – BHQ-1-3'	FAM, BHQ-1	5 $\mu$ M

<sup>1</sup>TaqMan® probes are labeled at the 5'-end with the reporter molecule 6-carboxyfluorescein (FAM) and with the quencher, Black Hole Quencher 1 (BHQ-1) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA) at the 3'-end.

Note: Oligonucleotide sequences are subject to future changes as the 2019-Novel Coronavirus evolves.



В обобщение, има много протоколи, които се разработиха от повечето държави за RT-PCR, както и праймери и сонди специфични за SARS CoV-2. Повечето от тях се основават на утвърдени стандартни оперативни процедури, които бяха описани по-горе в изложението. Повече за генните локуси, които се изледват и специфичните праймери, които се използват, може да бъде намерено на специалното приложение, създадено от ECDC на следният линк:

<https://primerscan.ecdc.europa.eu/?assay=Overview>

До момента известните протоколи за RT-PCR са публикувани, обобщени по производител, дата на публикуване и наименование, на сайта на FDA:

<https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorizations>

Date EUA Issued	Manufacturer	Diagnostic (Letter of Authorization)	Technology	Authorized Setting(s) <sup>1</sup>	Authorization Documents <sup>2</sup>	Other Documents
04/23/2020	SD Biosensor, Inc.	STANDARD M nCoV Real-Time Detection Kit	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
04/22/2020	altona Diagnostics GmbH	RealStar SARS-CoV02 RT-PCR Kits U.S.	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
04/21/2020	Seegene, Inc.	Allplex 2019-nCoV Assay	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
04/20/2020	Trax Management Services Inc.	PhoenixDx 2019-CoV	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
04/18/2020	OSANG Healthcare	GeneFinder COVID-19 Plus RealAmp Kit	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
04/17/2020	Fosun Pharma USA Inc.	Fosun COVID-19 RT-PCR Detection Kit	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
04/16/2020	KorvaLabs Inc.	Curative-Korva SARS-Cov-2 Assay	Molecular	H	HCP, Patients, EUA Summary	None
04/16/2020	GenoSensor, LLC	GS™ COVID-19 RT-PCR KIT	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
4/15/2020	Maccura Biotechnology (USA) LLC	SARS-CoV-2 Fluorescent PCR Kit	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
4/15/2020	Mount Sinai Laboratory	COVID-19 ELISA IgG Antibody Test	Serology IgG	H	HCP, Patients, EUA Summary	None
4/14/2020	Chembio Diagnostic System, Inc.	DPP COVID-19 IgM/IgG System	Serology IgM and IgG	H, M	HCP, Patients, IFU	None
4/14/2020	Ortho Clinical Diagnostics, Inc.	VITROS Immunodiagnostic Products Anti-SARS-CoV-2 Total Reagent Pack	Serology Total Antibody	H, M	HCP, Patients, IFU	None
04/10/2020	Atila BioSystems, Inc.	iAMP COVID-19 Detection Kit	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
04/08/2020	DiaCarta, Inc.	Quantivirus SARS-CoV-2 Test kit	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
04/08/2020	Becton, Dickinson & Company	BD SARS-CoV-2Reagents for BD MAX System	Molecular	H, M	HCP, Patients, IFU	None
04/07/2020	InBios International, Inc.	Smart Detect SARS-CoV-2 rRT-PCR Kit	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
04/06/2020	Gnomegen LLC	Gnomegen COVID-19 RT-Digital PCR Detection Kit	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
04/03/2020	Co-Diagnostics, Inc.	Logix Smart Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Kit	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None

04/03/2020	ScienCell Research Laboratories	ScienCell SARS-CoV-2 Coronavirus Real-time RT-PCR (RT-qPCR) Detection Kit	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
04/03/2020	Luminex Corporation	ARIES SARS-CoV-2 Assay	Molecular	H, M	HCP, Patients, IFU	None
04/02/2020	Becton, Dickinson & Company (BD)	BioGX SARS-CoV-2 Reagents for BD MAX System	Molecular	H, M	HCP, Patients, IFU	None
04/01/2020	Ipsium Diagnostics, LLC	COV-19 IDx assay	Molecular	H	HCP, Patients, EUA Summary	None
04/01/2020	Cellex Inc.	qSARS-CoV-2 IgG/IgM Rapid Test	Serology IgM and IgG	H, M	HCP, Patients, IFU	None
03/30/2020	QIAGEN GmbH	QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 Panel	Molecular	H, M	HCP, Patients, IFU	None
03/30/2020	NeuMoDx Molecular, Inc.	NeuMoDx SARS-CoV-2 Assay	Molecular	H, M	HCP, Patients, IFU	None
03/27/2020	Luminex Molecular Diagnostics, Inc.	NxTAG CoV Extended Panel Assay	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
03/27/2020	Abbott Diagnostics Scarborough, Inc.	ID NOW COVID-19	Molecular	H, M, W	HCP, Patients, IFU	Letter Granting EUA Amendment(s) (April 21, 2020)
03/26/2020	BGI Genomics Co. Ltd	Real-Time Fluorescent RT-PCR Kit for Detecting SARS-2019-nCoV	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
03/25/2020	Avellino Lab USA, Inc.	AvellinoCoV2 test	Molecular	H	HCP, Patients, EUA Summary	None
03/24/2020	PerkinElmer, Inc.	PerkinElmer New Coronavirus Nucleic Acid Detection Kit	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	Letter Granting EUA Amendment(s) (April 1, 2020)
03/23/2020	Mesa Biotech Inc.	Accula SARS-Cov-2 Test	Molecular	H, M, W	HCP, Patients, IFU	None
03/23/2020	BioFire Defense, LLC	BioFire COVID-19 Test	Molecular	H, M	HCP, Patients, IFU	None
03/20/2020	Cepheid	Xpert Xpress SARS-CoV-2 test	Molecular	H, M, W	HCP, Patients, IFU for Labs, IFU for Point-of-Care	Letter Granting EUA Amendment(s) (April 10, 2020)
03/20/2020	Primerdesign Ltd.	Primerdesign Ltd COVID-19 genesig Real-Time PCR assay	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	Letter Granting EUA Amendment(s) (April 8, 2020)
03/19/2020	GenMark Diagnostics, Inc.	ePlex SARS-CoV-2 Test	Molecular	H, M	HCP, Patients, IFU	None
03/19/2020	DiaSorin Molecular LLC	Simplexa COVID-19 Direct assay	Molecular	H, M	HCP, Patients, IFU	• Letter Granting EUA
03/19/2020	DiaSorin Molecular LLC	Simplexa COVID-19 Direct assay	Molecular	H, M	HCP, Patients, IFU	• Letter Granting EUA Amendment(s) (March 26, 2020) • Letter Granting EUA Amendment(s) (April 13, 2020)
03/18/2020	Abbott Molecular	Abbott RealTime SARS-CoV-2 assay	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	Letter Granting EUA Amendment(s) (April 1, 2020)
03/17/2020	Quest Diagnostics Infectious Disease, Inc.	Quest SARS-CoV-2 rRT-PCR	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	Letter Granting EUA Amendment(s) (March 26, 2020)
03/17/2020	Quidel Corporation	Lyra SARS-CoV-2 Assay	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	Letter Granting EUA Amendment(s) (April 8, 2020)
03/16/2020	Laboratory Corporation of America (LabCorp)	COVID-19 RT-PCR Test	Molecular	H	HCP Patients, EUA Summary, IFU-Home Collect	Letter Granting EUA Amendment(s) (April 14, 2020)
03/16/2020	Hologic, Inc.	Panther Fusion SARS-CoV-2	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	None
03/13/2020	Thermo Fisher Scientific, Inc.	TaqPath COVID-19 Combo Kit	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	Letter Granting EUA Amendment(s) (March 24, 2020) Letter Granting EUA Amendment(s) (April 20, 2020)
03/12/2020	Roche Molecular Systems, Inc. (RMS)	cobas SARS-CoV-2	Molecular	H, M	HCP, Patients, IFU	Letter Granting EUA Amendment(s) (March 31, 2020)
02/29/2020	Wadsworth Center, New York State Department of Public Health's (CDC)	New York SARS-CoV-2 Real-time Reverse Transcriptase (RT)-PCR Diagnostic Panel	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	Letter Granting EUA Amendment(s) (March 15, 2020)
02/04/2020	Centers for Disease Control and Prevention's (CDC)	CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel (CDC)	Molecular	H	HCP, Patients, IFU	Letter Granting EUA Amendment(s) (March 30, 2020)

## Серологично изпитване:

Серологичните проучвания могат да подпомогнат разследването на текущо огнище и ретроспективна оценка на степента на инвазия или големината на огнището. В случаите, когато анализите на NAAT са отрицателни и има силна епидемиологична връзка с COVID-19 инфекцията, валидирани серологични тестове на двойните серумни проби (в острата и оздравителната фаза) могат да подкрепят диагнозата. За тези цели могат да се съхраняват серумни проби от пациентите. Кръстосаната реактивност на

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136  
<http://corhv.government.bg>, [corhv@mzh.government.bg](mailto:corhv@mzh.government.bg)  
 тел. 02/4273056

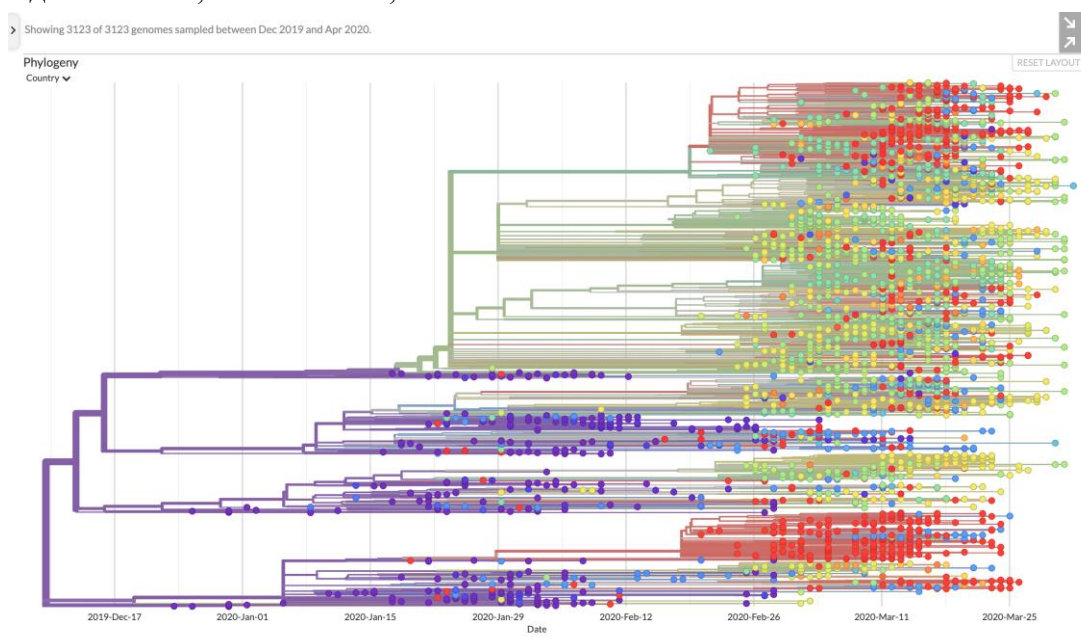
Ф-НК-7.6-5/0



други коронавируси може да бъде предизвикателство, но в момента се разработват търговски и валидирани серологични тестове.

### Вирусно геномно секвениране:

В допълнение към потвърждаването на наличието на вируса, редовното секвениране на процент от пробите от клиничните случаи може да бъде полезно за проследяване на мутации на вирусния геном, които биха могли да повлияят на изпълнението на медицинските контрамерки, включително чувствителността и специфичността на диагностичните тестове, както и да проследят изменчивостта на вируса. Цялото геномно секвениране на вируса може да даде пълна информация за молекулярната епидемиология. Съществуват много бази данни за публичен достъп за публикуване на данни за генетични секвенции или пък цялостна геномна последователност, като GISAID, NCBI.



Това филогенетично дърво, на база пълно геномно секвениране, показва еволюционните връзки на hCoV-19 (или SARS-CoV-2) вирусните изолати от продължаващата пандемия с COVID-19. Тази филогения показва първоначална поява в *Wuhan*, Китай, ноември/декември 2019, последвано от продължително предаване от човек на човек, което води до разпространяване на заболяването в цял свят. Въпреки че генетичните връзки между изследваните вирусни геноми и групирането им в клъстери са ясно различни от графиката, съществува значителна несигурност около оценките на специфичните дати и периоди на предаване на инфекцията и в етапите на географско разпространение.

Има хиляди пълни геномни секвенции на SARS-CoV-2 на разположение (около 11000) и този брой се увеличава със стотици всеки ден. Тази графика показва само около ~3000 генома в един изглед от гледна точка на четливостта.

Номерирането на конкретните локуси, дистанциите, позициите в генома и структурата на генома е съобразно **Wuhan-Hu-1/2019** секвенираният геном на **вируса** като референция. Пълна информация за биоинформатичната обработка на суровите данни от пълното геномно секвениране може да бъде намерена на следният линк: [http://data.nextstrain.org/ncov\\_global.json](http://data.nextstrain.org/ncov_global.json) или на официалният сайт на *Nextstrain*: <https://nextstrain.org/ncov/global> или на официалният сайт на *GISAID*: <https://www.gisaid.org/epiflu-applications/next-hcov-19-app/>.

Самата **процедура по секвениране** не се различава особено от стандартната такава за други патогени. Първоначално се подготвя ДНК библиотека и след това се пристъпва към същинската реакция на секвениране. Един от водещите протоколи, използвани за секвентният анализ на SARS-CoV-2 е този: ***Illumina Nextera XT DNA library prep kit***.

1. Смесват се 5 µl Tagment DNA Buffer (TD) и 2.5 µl от разредените и полирани ампликони (0.2 ng/µl) от всяка проба върху PCR плака или стрип. Миксира се добре посредством пипетиране.
2. Добавят се 2.5 µl Amplicon Tagment Mix (ATM) към всяка ямка на плаката/стрипа към микса TD/DNA. Отново се миксира чрез пипетиране и последващо кратко центрофугиране.
3. Инкубиране на реакционния микс при следните условия:

STEP	TEMP (°C)	TIME (mm:ss)
Tagmentation	55	05:00
Hold	10	∞

4. След тагментация, незабавно се отстранява реакционната плака/стрип от термосайкълъра и се добавят 2.5 µl неутрализиращ Тагмент Буфер (NT), за да бъде стопирана реакцията. Следва мискиране и центрофугиране.
5. Инкубиране на стайна температура за 5 мин.
6. Добавяне на Nextera PCR Master Mix (NPM) към неутрализираната реакционна смес за всяка проба, както следва:

REAGENT	VOLUME (µl)
Neutralised tagmentation reaction	12.5
i7 adapter	2.5
i5 adapter	2.5
Nextera PCR Master Mix	7.5
<b>TOTAL</b>	<b>25</b>

7. Инкубиране както следва:

STEP	TEMP (°C)	TIME (mm:ss)	CYCLES
Hot start	72	03:00	1X
Initial denature	95	00:30	1X
Denaturation	95	00:10	12X
Annealing	55	00:30	
Extension	72	00:30	
Final extension	72	05:00	1X
Hold	10	∞	

8. Добавяне на 15 µl AMPure XP перли (0, 6X съотношение перли) към 25 µl амплифицираните библиотеки. Пипетиране и кратко центрофугиране.
9. Инкубиране на стайна температура за 10 мин.
10. Плаката/стрипове се поставят върху магнитна бъркалка за най-малко 2 минути.
11. Отстраняване на супернатантата от всяка ямка чрез пипетиране.
12. Добавяне на 200 µl прясно приготвен 80 % EtOH към всяка ямка.
13. Инкубиране при стайна температура за 30 секунди и последващо отстраняване на супернатантата от всяка ямка.
14. Повторяне на стъпки 12 и 13 за общо две промивания с EtOH.
15. Изсъхване на магнитните перли 5 до 15 мин.
16. Изваждане на плаката от магнитната стойка.
17. Ресуспендиране на перлите с 22, 5 µl EB буфер. Пипетиране и миксиране за кратко.
18. Плаката върху магнитната стойка се поставят на стайна температура в продължение на най-малко 2 минути, докато разтворът стане бистър.
19. Прехвърляне на 20 µl от супернатантата, съдържаща пречистената ДНК, в подходяща плака, стрип или епендорфка. Да се използва незабавно или да се съхранява замразено при -20 °C.
20. Количествено определяне на всички пречистени ДНК, като се използва *Qubit dsDNA high sensitivity assay*.
21. Групиране на отделните библиотеки еднакво по размер на ДНК ампликона въз основа на стойностите от Qubit. Предполага се, че библиотеките ще имат подобни дължини и разпределение.
22. Количествено определяне на крайния набор от библиотеки, като се използва *Qubit dsDNA high sensitivity assay*.
23. Анализирание на 2 µl от крайния микс от библиотеки с *Agilent High Sensitivity D5000 ScreenTape*.
24. Разреждане на последните събрани библиотеки до 1 nM (поне 50 µl) с EB буфер, и ако е необходимо, добавяне на PhiX секвенционна контрола.
25. Смесване на 20 µl от 1 nM библиотека и 80 µl EB буфер, за да се разрези крайния пуул от библиотеки до 0.2 nM.
26. Зареждане на 20 µl от библиотеките в размразения картридж Illumina ISEQ с флоу клетката, и последователност с поне 75nt сдвоени крайни секвенции. Въпреки полирането на библиотеките, всеки цикъл може спокойно да включва 12—18 геномни библиотеки SARS-CoV-2 с покритие >1000x за консенсусни последователности.

Повече за този протокол може да се намери на следният линк:

<https://s3.amazonaws.com/protocols-files/public/d7bff273652b8cc9ac7f2e38c7b3a58b48eebbe7c081ec84ae718cdcdce03ced/b38b9nan.pdf>

### Култивиране на вируса в клетъчни култури:

Изолирането и култивирането на вируса в клетъчни култури не се препоръчва като рутинна диагностична процедура.

На 4 февруари 2020 г. CDC успя да култивира SARS-CoV-2 в клетъчни култури и тези вирусни изолати ще бъдат използвани за научни изследвания като разработване на антивирусни препарати и изследване на патогенезата и устойчивостта на вируса. SARS-CoV-2 е изпратен от CDC в хранилището на ресурсите на BEI. Ресурсът на BEI е свързан с Националните здравни институти (NIH). Това е централно хранилище, което доставя микроорганизми и реагенти на широката общност от изследователи на микробиологията и инфекциозните болести.

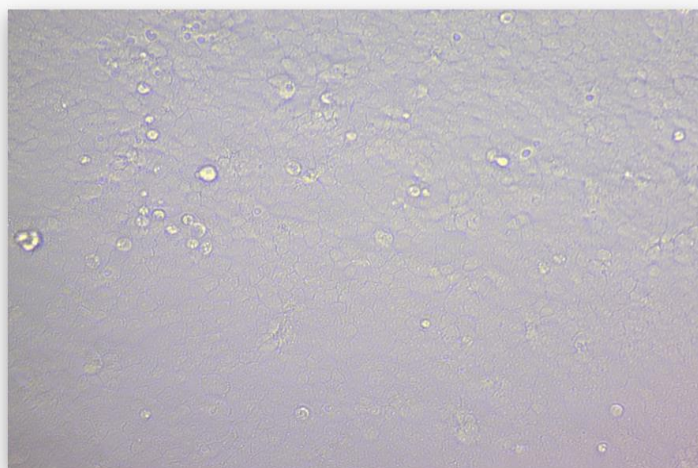
- **Антивирусни изследвания:** Това включва изследвания, насочени към тестване на способността на съществуващи или експериментални антивирусни лекарства за лечение или предотвратяване на инфекция със SARS-CoV-2.
- **Изследване на патогенезата:** Това включва изследвания за определяне на различните начини, по които вирусът може да бъде предаден на гостоприемник, тежестта на заболяването, което причинява в гостоприемника, колко вирус се произвежда в тялото и до какви органи може да се разпространи вирусът в тялото.
- **Изследване за устойчивост на вируса:** Това е изследване, което показва колко дълго вирусът може да оцелее при определени условия, например колко дълго вирусът може да остане жизнеспособен и заразен на повърхности, както и температурите, при които може да оцелее.

Повече информация за култивиране на вируса върху клетъчни култури може да бъде достъпена на следният линк:

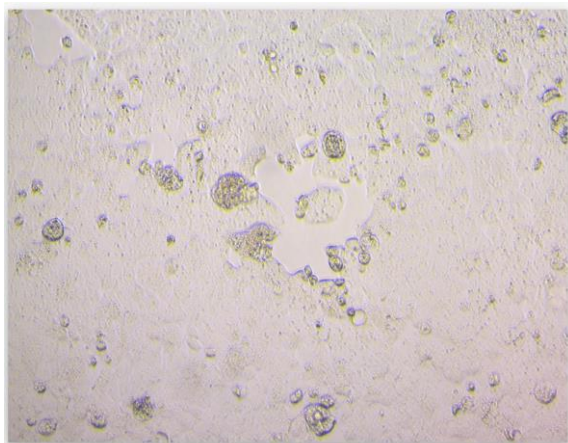
[https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/grows-virus-cell-culture.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fabout%2Fgrows-virus-cell-culture.html](https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/php/grows-virus-cell-culture.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fcoronavirus%2F2019-ncov%2Fabout%2Fgrows-virus-cell-culture.html)

Има различни научни източници, които посочват, че клетъчните линии, които използват за култивиране на SARS CoV-2 са VERO E6. На снимките са показани израснат клетъчен монослой VERO E6 и ЦПЕ (цитопатичен ефект) след заразяване с SARS CoV-2:

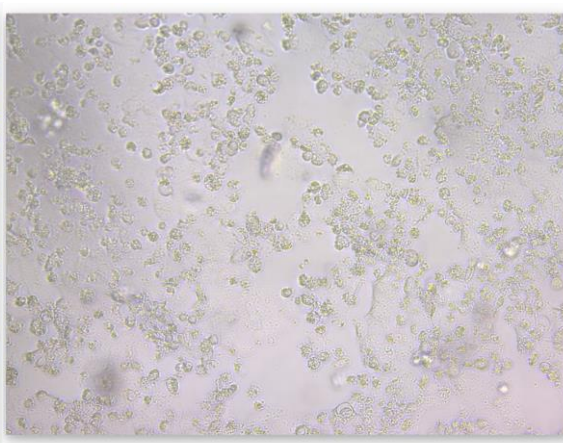
Growth medium from previously prepared Vero E6 tubes was discarded to waste.



A confluent, uninfected monolayer culture of Vero E6 cells in Opti-MEM (no FBS).  
Source: Dr. Alyssa Pyke, Public Health Virology Laboratory,  
Forensic and Scientific Services, Queensland.  
08FEB2020



An example of a SARS-CoV-2-infected monolayer culture of Vero E6 cells demonstrating focal CPE.  
Source: Dr. Alyssa Pyke, Public Health Virology Laboratory,  
Forensic and Scientific Services, Queensland,  
08FEB2020



An example of much more advanced CPE in a SARS-CoV-2-infected monolayer culture of Vero E6 cells demonstrating widespread CPE.  
Source: Dr. Alyssa Pyke, Public Health Virology Laboratory,  
Forensic and Scientific Services, Queensland,  
08FEB2020

Повече информация за конкретния протокол по култивиране на вируса върху клетъчни култури може да бъде достъпен на следният линк:

<https://www.protocols.io/view/culture-of-the-severe-acute-respiratory-syndrome-c-bfrujm6w>

Други клетъчни линии и такива, които не са подходящи за култивиране на SARS-CoV-2 може да бъдат намерени на следният линк:

<https://web.expasy.org/cellosaurus/sars-cov-2.html>

Лабораториите следва да спазват националните изисквания за докладване на всички изследвания, положителни или отрицателни резултати, и следва тези данни своевременно да се докладват на националните органи и съответно на СЗО.

За момента не са разработени по-добри, точни, информативни и надеждни тестове за откриване на SARS-CoV-2. Много аспекти от вирусната етиология и заболяването, което предизвиква този вирус все още не са открити. Ще е необходимо по-обстойно анализиране, тестване и разбиране, за да се създадат лекарства или ваксини или друг начин за превенция и борба с това пандемично заболяване, и съответно по-добри диагностични методи и по-адекватни превантивни мерки. Необходимо е да: се изучи динамиката на вируса; изменчивостта му; инвазивността му; динамиката на имунологичния отговор; връзката между вирусната концентрация и тежестта на заболяването; тежестта на заболяването в различните популации и в различните климатични пояси, и съобразно климатичните промени; трябва да се направят сравнения между наличните молекулярни и серологични тестове, с цел подбор на най-подходящите; трябва да се определи оптималното време за пробовземане и най-подходящият биологичен материал за изпитване; трябва да се определи и оптималният процент проби, които да бъдат геномно секвенирани с цел проследяване на евентуални мутации и др. СЗО и CDC препоръчват и насърчават посредством много инициативи и програми обмена на данни от изпитвания, както и секвенции или данни от пълно геномно секвениране, като по този начин се спомага “контрола” на пандемията от COVID-19, както и разработването на по-добри контрамерки за превенция и борба с това вирусно заболяване.

Повече информация и допълнителни научни материали относно COVID-19 могат да бъдат намерени на електронната страница на Център за оценка на риска по хранителната верига, на следният линк: <http://corhv.government.bg/?cat=28>



Изготвил:

Красимира Захариева,

Главен експерт в дирекция ОРХВ към ЦОРХВ

13.05.2020 г.

#### Използвана литература:

- <https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/>
- Sanger Sequencing Research Solutions for SARS-CoV-2 (the COVID-19 Virus) - <https://www.thermofisher.com/bg/en/home/clinical/clinical-genomics/pathogen-detection-solutions/coronavirus-2019-ncov/sanger-sequencing.html>
- <https://www.fda.gov/medical-devices/emergency-situations-medical-devices/emergency-use-authorizations>
- <https://www.protocols.io/view/sars-cov-2-genome-sequencing-using-long-pooled-amp-befyjbpw>
- <https://s3.amazonaws.com/protocols-files/public/d7bff273652b8cc9ac7f2e38c7b3a58b48eebbe7c081ec84ae718cdcdce03ced/b38b9nan.pdf>
- [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331509/WHO-COVID-19-lab\\_testing-2020.1-eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331509/WHO-COVID-19-lab_testing-2020.1-eng.pdf)
- [https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/publications-detail/laboratory-biosafety-guidance-related-to-coronavirus-disease-2019-(covid-19))
- <https://www.gisaid.org/epiflu-applications/next-hcov-19-app/>
- <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/coronavirus/threats-and-outbreaks/covid-19/laboratory-support/questions>
- SARS Molecular Detection External Quality Assurance - [Christian Drosten](#),\* [Hans Wilhelm Doerr](#),† [Wilina Lim](#),‡ [Klaus Stöhr](#),§ and [Matthias Niedrig](#)



- <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/COVID-19-surveillance-strategy-9-Apr-2020.pdf>
- <https://primerscan.ecdc.europa.eu/?assay=Overview>
- NIAID STRATEGIC PLAN FOR COVID-19 RESEARCH FY2020 – FY2024 April 22, 2020 - <https://www.niaid.nih.gov/sites/default/files/NIAID-COVID-19-Strategic-Plan-2020.pdf>
- <https://www.protocols.io/edit/culture-of-the-severe-acute-respiratory-syndrome-c-bfrujm6w>
- <https://web.expasy.org/cellosaurus/sars-cov-2.html>
- <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/testing.html>
- A COORDINATED GLOBAL RESEARCH ROADMAP: 2019 NOVEL CORONAVIRUS– WHO
- Coronavirus Research Using Next-Generation Sequencing (NGS)- <https://www.thermofisher.com/bg/en/home/life-science/sequencing/dna-sequencing/microbial-sequencing/microbial-identification-ion-torrent-next-generation-sequencing/viral-typing/coronavirus-research.html>
- <https://www.finddx.org/covid-19/pipeline/>
- ThermoFisher SCIENTIFIC Coronavirus (COVID-19) strategy
- WEBINAR Opportunities to tackle the COVID-19 Crisis through Innovation Procurement – a legal and economic perspective - 3 April 2020
- Emerging COVID-19 coronavirus: glycan shield and structure prediction of spike glycoprotein and its interaction with human CD26 - Naveen Vankadari & Jacqueline A. Wilce
- CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel - **For Emergency Use Only**-Instructions for Use
- CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel - Acceptable Alternative Primer and Probe Sets
- nCoV-2019 sequencing protocol (single sample) - Forked from nCoV-2019 sequencing protocol (single sample) - Josh Quick
- Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 isolate Wuhan-Hu-1, complete genome - GenBank: MN908947.3 - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947.3?report=genbank>