



**AZURESEQ CE qPCR KIT SARS-
COV-2 für 200 Reaktionen,
AZURESEQ CE qPCR KIT SARS-
COV-2 für 400 Reaktionen
INSTRUCTIONS FOR USE**

zur in vitro diagnostischen Anwendung

PROTOKOLL VERSION V1.0

DOKUMENTREVISION 04

23.02.2022

CE



Inhaltsverzeichnis

1. VERWENDUNGSZWECK.....	4
2. PRINZIP DER METHODE.....	4
3. PRODUKTINHALT	5
4. VERSAND UND LAGERUNG.....	6
5. PROBENENTNAHME, -TRANSFER UND -LAGERUNG.....	6
6. BENÖTIGTE, ABER IM LIEFERUMFANG NICHT ENTHALTENE MATERIALIEN UND GERÄTE.	9
7. WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN	10
8. VERFAHREN	12
9. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE.....	19
10. EINSCHRÄNKUNGEN	22
11. PROBLEMLÖSUNGEN	23
12. QUALITÄTSKONTROLLE	24
13. LEISTUNGSMERKMALE	24
14. REFERENZ.....	33
15. SYMBOLERKLÄRUNG.....	34
16. KONTAKTINFORMATIONEN	34

Revisionshistorie

Revision	Datum	Zusammenfassung der Änderungen
1	1. Oktober 2020	Erste Version
2	22. Oktober 2020	Abschnitt zur Probenentnahme, -behandlung und -lagerung (5), Abschnitt zur qPCR Konfiguration (8.2) und Referenzabschnitt (14) hinzugefügt. Tippfehler korrigiert.
3	9. Februar 2022	Änderung der Herstelleradresse
4	18. Februar 2022	CE-Logo aktualisiert, Tabelle zur Revisionshistorie vereinfacht, Abschnitt zum Kit-Inhalt um die Kit-Konfiguration für 400 Proben erweitert, Textüberarbeitungen zur Anpassung des Protokolls an beide Produktkonfigurationen, Empfehlungen zur wiederholten Verwendung des Kits in Abschnitt 4 hinzugefügt, Abschnitt 10 um die Warnung vor falsch-negativen Ergebnissen bei der direkten Methode erweitert

Abkürzungen

In diesem Dokument bezeichnen wir die Produkte AzureSeq CE qPCR KIT SARS-COV-2 für 200 Reaktionen und AzureSeq CE qPCR KIT SARS-COV-2 für 400 Reaktionen zusammen als AzureSeq CE qPCR KIT SARS-COV-2 oder in Kurzform als AzureSeq CE.

1. Verwendungszweck

Der AzureSeq CE qPCR KIT SARS-COV-2 ist ein RT-qPCR-Test für den qualitativen Nachweis von Nukleinsäure des 2019-nCoV in nasopharyngealen (NP) und oropharyngealen (OP) Abstrichen von Personen mit Anzeichen und Symptomen einer Infektion, bei denen ein Verdacht auf COVID-19 besteht.

Die Ergebnisse eignen sich zur Identifikation der 2019-nCoV RNA. Die 2019-nCoV RNA lässt sich in der Regel in der akuten Phase der Infektion in Nasen-Rachen- und Mund-Rachen-Abstrichen nachweisen. Positive Ergebnisse weisen auf eine aktive Infektion hin.

Negative Ergebnisse schließen eine 2019-nCoV Infektion nicht aus und können alleine nicht zur therapeutischen Entscheidungsfindung genutzt werden. Negative Ergebnisse müssen mit der klinischen Observation, der Anamnese und den epidemiologischen Daten kombiniert werden.

Der AzureSeq CE qPCR KIT SARS-COV-2 ist für die Verwendung durch qualifiziertes, geschultes klinisches Laborpersonal bestimmt, das in den Techniken der Echtzeit-PCR und in vitro-diagnostischen Verfahren speziell unterwiesen und geschult wurde.

2. Prinzip der Methode

Bei dem Test handelt es sich um einen Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktionstest (rRT-PCR) in Echtzeit, mit dem RNA aus zwei verschiedenen Regionen des SARS-CoV-2-Nukleokapsid-Gens in nasopharyngealen (NP) und oropharyngealen (OP) Abstrichen von Patienten nachgewiesen werden kann, bei denen ein Verdacht auf COVID-19 besteht und die Anzeichen und Symptome einer Infektion aufweisen. Das Produkt ist des Weiteren auch kompatibel mit den CDC Primern und Proben, die in klinischen Proben dem Detektieren von humanen RNase P (RP) dienen.

Die Zielsequenzen des SARS-CoV-2 Genoms sind die gleichen, die auch die CDC in ihrem Echtzeit-RT-PCR-Diagnostik-Panel für das 2019-nCoV untersucht. Diese Sequenzen befinden sich in zwei unterschiedlichen Regionen (N1 und N2) des Nukleokapsid (N) Gens des Virus.

Als Kontrolle dient das Gen RNase P. Die Isolierung und Präparation der Nukleinsäuren aus Nasen-Rachen- und Mund-Rachen-Abstrichen erfolgt mit einem etablierten Nukleinsäure-Extraktions-System. Anfangsmenge und Elutionsvolumen der zur Untersuchung notwendigen Probe sind verfahrensabhängig. Das Produkt ermöglicht auch die Untersuchung von in Virensportmedien gelösten und wärmebehandelten Proben.

Die gereinigte Nukleinsäure oder die hitzeextrahierte Probe wird durch reverse Transkription zu cDNA, indem die Nukleinsäure mit dem AzureSeq CE qPCR KIT SARS-COV-2 (im Weiteren AzureSeq

CE) Mastermix kombiniert und anschließend im Echtzeit-PCR-Gerät amplifiziert wird. Während des Prozesses bindet sich die Sonde an eine spezielle Zielsequenz, die sich zwischen Vorwärts- und Rückwärtsprimer befindet. In der Extensionsphase des PCR-Zyklus spaltet die 5' Nuklease Aktivität der Taq-Polymerase die Sonde, wodurch sich der Reporter-Farbstoff vom dem Quencher-Farbstoff entfernt und ein Fluoreszenzsignal generieren kann. Bei jedem Zyklus spalten sich weitere Reporter-Farbstoffmoleküle von den Sonden ab, wodurch die Fluoreszenzintensität zunimmt. Bei der PCR-Reaktion wird die Fluoreszenzintensität pro Zyklus mit dem Echtzeit-PCR-Gerät überwacht.

3. Produktinhalt

AzureSeq CE qPCR KIT SARS-COV-2 für 200 Reaktionen

Produkttyp: AzureSeq-200 CE

Produktcode	Produktname	Anzahl der Röhren	Volumen/Röhren (µl)
OA-ITMP-MM-100	2X InhibiTaq Multiplex HotStart MasterMix	2	1000
OA-RT-200	RTScript Reverse Transcriptase, 200U/uL	1	100
OA-CPPM-100uL	CoVi Primer/Probe Mix 3	2	100
OA-NFW-350uL	Nukleasefreies Wasser	2	350

AzureSeq CE qPCR KIT SARS-COV-2 für 400 Reaktionen

Produkttyp: AzureSeq-400 CE

Produktcode	Produktname	Anzahl der Röhren	Volumen/Röhren (µl)
OA-ITMP-MM-100	2X InhibiTaq Multiplex HotStart MasterMix	4	1000
OA-RT-200	RTScript Reverse Transcriptase, 200U/uL	2	100
OA-CPPM-100uL	CoVi Primer/Probe Mix 3	4	100
OA-NFW-350uL	Nukleasefreies Wasser	4	350



Hinweis: Die positiven (Katalog-Nr. OA-CVPC-150) und negativen (Katalog-Nr. OA-CVNC-150) Kontrollen sind nicht im Kit enthalten und werden separat geliefert.

4. Versand und Lagerung

- Der Versand des AzureSeq CE-Kits erfolgt auf Trockeneis. Die Komponenten kommen in gefrorenem Zustand an. Kontaktieren Sie bitte unseren Kundendienst (azureseq.support@omixon.com), wenn eine der Komponenten nicht gefroren oder nicht vorschriftsmäßig ankommt.
- Um die Degradation der Reagenzien zu vermeiden, sind die Komponenten nach der Ankunft bei -20 °C zu lagern.
- Sofern Sie in einer Region mit häufigem Stromausfall arbeiten, ist die Aufstellung eines Ersatzgenerators und eines Temperaturadapters zur Sicherstellung der entsprechenden Kühlung der Komponenten des AzureSeq CE-Kits auf -20 °C zu empfehlen.
- Die vom Hersteller garantierte Haltbarkeitsdauer beträgt 12 Monate. Benutzen Sie das Produkt nicht nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Benutzen Sie kein beschädigtes Produkt.
- Die Komponenten dürfen nicht wieder eingefroren / aufgetaut werden, weil das zum Abbau des Reagenzes führen kann.
- Gebrauchte Reagenzien und Abfallprodukte sind den örtlichen Vorschriften gemäß zu entsorgen.

5. Probenentnahme, -transfer und -lagerung

Eine ungenügende oder unbrauchbare Probenentnahme, -transport und -lagerung kann die Wahrscheinlichkeit falsch-negativer Ergebnisse erhöhen.

5.1 Probenentnahme

Unter Bezugnahme auf die CDC Webseite: 'Interim Guidelines for Collecting, Handling and Testing Clinical Specimens from Patients Under Investigation (OUIs) for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV)'.

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>

Das zur Probenentnahme benutzende Wattestäbchen muss aus synthetischer Watte und einem Plastikstab bestehen. Stäbchen aus Calciumalginat oder Holz dürfen nicht verwendet werden, weil diese Materialien PCR Inhibitoren und Viren inaktivierende Substanzen enthalten können.

Befolgen Sie die Anweisungen des Herstellers der Probenentnahmegeräte, um die richtigen Methoden zur Entnahme zu verwenden.

Mund-Rachen-Abstriche

Wischen Sie den hinteren Rachen mit einem sterilen Wattestäbchen ab (dabei die Zunge nicht berühren). Legen Sie das Wattestäbchen sofort ins etikettierte sterile, Viren- Transportmedium enthaltende Röhrchen. Brechen Sie jeden Applikator an der Markierung oder in der Nähe der Watte ab oder schneiden Sie mit einer sterilen Schere ab. Proben müssen gleich abgekühlt und kühl transportiert werden.

Nasen-Rachen-Abstrichen

Führen Sie ein steriles Wattestäbchen parallel zum Gaumen in das Nasenloch ein. Das Wattestäbchen sollte eine Tiefe erreichen, die dem Abstand zwischen den Nasenlöchern und der äußeren Öffnung des Ohrs entspricht. Halten Sie das Wattestäbchen einige Sekunden lang an dieser Stelle, um Sekrete aufzunehmen. Entfernen Sie das Wattestäbchen langsam, während Sie es drehen. Legen Sie das Wattestäbchen sofort ins etikettierte sterile, Viren- Transportmedium enthaltende Röhrchen. Brechen Sie jeden Applikator an der Markierung oder in der Nähe der Watte ab oder schneiden Sie mit einer sterilen Schere ab. Proben müssen gleich abgekühlt und kühl transportiert werden.

5.2 Probentransport

Alle Proben müssen mit einer Eiskühl- / Eigelbox / Trockeneis transportiert und sicher verschlossen und behandelt werden.

Der Transport den klinischen Proben muss den örtlichen Vorschriften entsprechen. Die örtlichen Vorschriften zur biologischen Sicherheit für SARS-CoV-2 müssen befolgt werden.

5.3 Behandlung

Während der Handhabung potenziell infektiöser Proben sollten Laboranten geeignete persönliche Schutzausrüstung tragen, die Einweghandschuhe, Laborkittel und Augenschutz umfasst.

Spezifische Anweisungen zur Behandlung mit klinischen Proben für die Coronavirus-Krankheit 2019 finden Sie auch auf der oben genannten CDC-Webseite.

5.4 Lagerung

- Die Proben können nach der Entnahme bis zu 48 Stunden bei 2-8 ° C gelagert werden. Bei einer Lagerung von mehr als 2 Tagen sollten die Proben bei -70 ° C eingefroren werden.
- Wenn die Probe länger als 48 Stunden gelagert wird, ist eine Extraktion der RNA mit einem herkömmlichen, validierten System erforderlich.
- Wenn die Probe nicht gefroren ist und weniger als 48 Stunden gelagert wird, kann ein Arbeitsverlauf mit direkter Methode (ohne RNA Isolierung) erfolgen.
- Wiederholtes Einfrieren und Auftauen einer Probe sollte vermieden werden. Wenn eine Probe zum erneuten Testen aufbewahrt wird, sollte sie in verschiedenen Röhrcchen aliquotiert werden, um Einfrier- und Auftauzyklen zu vermeiden.
- Abhängig von der Art der Probe und dem verwendeten Transportmedium kann eine spezifische Lagerung und zur RNA-Isolierung eine Vorbehandlung der Probe erforderlich sein. Bitte beachten Sie die Anweisungen des Herstellers.

6. Benötigte, aber im Lieferumfang nicht enthaltene Materialien und Geräte.

6.1. Geräte

- Echtzeit-PCR-Gerät, das in FAM, HEX oder ROX (oder dazu äquivalenten) Kanälen detektieren kann.
- Heizblock (kompatibel mit den 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen des Testes, der Inkubation bei 95 °C dienend)
- Mikropipetten für 100 µl und 1000 µl
- Mehrkanalpipetten für 10 µl und 100 µl
- Vortex Mixer
- Zentrifuge

6.2. Reagenzien

- Viral/total RNA Extraktionssystem
- Viren Transportmedien (Clinichem, Copan, Puritan, CDC VTM, mwe Medical Wire)
- CoVi Negativkontrolle (Cat# OA-CVNC-150)
- CoVi Positivkontrolle (Cat# OA-CVPC-150)

6.3. Verbrauchsmaterial

- Optische 96-Well-Platten oder 0,2 ml optische Röhrchen
- Optische Folie, die mit dem benutzten qPCR-Gerät kompatibel ist
- DNase/RNase-freie sterile Einmal-Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl und 200 µl)
- DNase/RNase-freies 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen
- Einweghandschuhe
- Oberflächendesinfektionsmittel
- Material zur RNA-Isolierung

7. Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen



Zur angemessenen Ausführung des Testes ist eine gute Laborpraxis („Good laboratory practices“) unverzichtbar. Aufgrund der hohen Sensitivität des Produktes ist bei der Handhabung der Proben und Materialien darauf zu achten, dass keine Verunreinigungen der Reagenzien und Amplifikationsmischungen auftreten.

Es muss auf Einhaltung der folgenden Punkte geachtet werden.

- Lesen Sie die Gebrauchsanweisung, bevor Sie mit dem Verarbeiten der Proben beginnen. Ein Abweichen von den beschriebenen Schritten kann die optimale Leistung beeinflussen.
- Benutzen Sie ein Desinfektionsmittel zur Reinigung und Desinfizierung der bei der Probenverarbeitung benutzten Flächen.
- Desinfizieren Sie gebrauchte Proben, Reagenzien und andere potenziell verunreinigte Materialien und entsorgen Sie sie gemäß den örtlichen Vorschriften.
- Halten Sie sich bei der Durchführung der Untersuchung an die allgemeinen Schutzmaßnahmen. Behandeln Sie die Proben als potenziell infektiös.
- Tragen Sie bei der Ausführung der Laborprozesse eine Schutzbekleidung.
- Waschen Sie sich nach Ablegen der Handschuhe gründlich die Hände, entsorgen Sie die Handschuhe in Abfallbehältern für Gefahrgut.
- Lösen, verdünnen Sie die Reagenzien ausschließlich wie hier (Gebrauchsanweisung) beschrieben. Verwenden Sie nicht weniger Volumen der Reagenzien als in dieser IFU angegeben. Anderenfalls können Performance-Fehler die Folge sein.
- Omixon kann keine Unterstützung für Probleme bieten, die sich aus der Nichteinhaltung der in dieser IFU beschriebenen Protokollschritte ergeben.
- Verwenden Sie das Produkt nicht bei sichtbaren Schäden (z. B. zerbrochene Komponenten, lockere Verschlüsse).
- Verwenden Sie das Produkt nicht nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Ersetzen oder mischen Sie die Reagenzien des AzureSeq CE-Kits nicht mit Produkten anderer Hersteller.
- Alle Geräte müssen den Anweisungen des Herstellers gemäß betrieben und gewartet werden.
- Jeder Arbeitsplatz muss mit eigenen Pipetten unterschiedlichen Volumens bzw. den notwendigen Hilfsmaterialien und Ausrüstungen ausgestattet sein.
- Mischen Sie nicht gleiche Produkte, Komponenten unterschiedlicher Produktion (mit unterschiedlicher Chargennummer).
- Rauchen, trinken, essen Sie nicht und verwenden Sie keine Kosmetika in Bereichen, in denen Sie mit Proben und Produktkomponenten arbeiten.

8. Verfahren

Der AzureSeq CE-Kit enthält ein Kontrollassay zur Untersuchung der RNase P. Das ist eine interne Kontrolle, die in jeder untersuchten Probe die Anwesenheit von Nukleinsäure im System nachweist, womit die Funktionalität der Produktkomponenten sichergestellt ist.

Eine externe Kontrolle zum AzureSeq CE-Kit ist nicht enthalten. Die für den Test notwendige Positiv- bzw. Negativkontrolle ist für den Benutzer als separates Produkt erhältlich (Omixon Biocomputing Ltd, Katalognummer s. Sektion 3), ansonsten können eigene Kontrollen des Laboratoriums benutzt werden.

8.1. Instruktionen zur Zusammenstellung des Tests



Bei einem Arbeitsverlauf mit direkter RNA-Extraktion (Wärmebehandlung) folgen Sie dem unten aufgeführten Protokoll vom 1. Schritt an. Bei Verarbeitung von RNA, die mit herkömmlichen, validierten RNE-Extraktionskits extrahiert wurde, lassen Sie die Schritte 1-4 aus und beginnen Sie mit Schritt 5.

8.1.1. Arbeitsverlauf

Nur bei der Verarbeitung von in Virentransportmedien (VTM) gelösten Proben aus Nasen-Rachen- und Mund-Rachen-Abstrichen empfohlen. Empfohlene VTM: Clinichem, Copan, Puritan, CDC VTM, mwe Medical Wire.

Die Proben können maximal 48 Stunden bei 4 °C in dem Virentransportmedium aufbewahrt werden.

1. Probe im Virentransportmedium vom Abstrichstäbchen lösen.
2. 100-200 µl der im Virentransportmittel gelösten Probe in ein neues Dnase/RNase-freies Röhrchen pipettieren.
3. Proben 5 Minuten bei 95 °C inkubieren.
4. Nach der Inkubation zentrifugieren Sie die erhitzte Probe 30 Sekunden lang bei ca. 1500 U/min, um Material am Boden des Röhrchens zu sammeln. Lagern Sie es bis zur Verwendung auf Eis. Die Probe kann nun in die RT-qPCR-Reaktion gegeben werden (siehe folgende Schritte).
5. Röhrchen mit CoVi Primer/Probe Mix 3 (braunes Röhrchen/Deckel) auf Eis platzieren, dann ca. 30 Minuten vollständig auftauen lassen. Nach dem Auftauen kurz zentrifugieren, um Material am Boden des Röhrchens zu sammeln, und dann **384 µl** nukleasefreies Wasser in das Röhrchen geben. Wasserhaltiges Röhrchen markieren.

6. Rörchen bei maximaler Geschwindigkeit 10 Sekunden vortexen, dann kurz zentrifugieren, damit sich der Inhalt absetzt.
7. Mischen Sie 2x InhibiTaQ Multiplex qPCR MasterMix gründlich (Vortex bei maximaler Drehzahl, für 2-4 Sekunden Zentrifugieren bei 3200 U/min) und überprüfen Sie visuell, dass kein Pellet vorhanden ist.
8. Mastermix in einem sauberen Raum oder einem dafür bestimmten Bereich folgendermaßen zusammenstellen:

Zusammenstellen der Reaktion für 20 µl Reaktionsvolumen:

Komponente	Volumen/Reaktion (µl)	Volumen/100 Reaktionen (µl)	Endkonzentration
2x InhibiTaQ Multiplex qPCR MasterMix	10	1000	1x
RTScript Reverse Transcriptase, 200U/µl	0.5	50	5U/µl
Diluted Primer/Probe Mix (Schritt Nr. 5)	4.5	450	1x

9. Den Mastermix mit einer Pipette, eingestellt auf das Volumen der zuzugebenden 2x Mastermix Menge, suspendieren oder kurz vortexen, dann einige Sekunden zentrifugieren, damit sich der Inhalt absetzt.
10. **15 µl** Mastermix in die entsprechende Plattenpositionen verteilen.
11. **5 µl** Probe, Positiv- oder Negativkontrolle den entsprechenden Plattenpositionen hinzugeben.
12. Nach Abdecken der Platte mit Folie einige Sekunden vortexen, schließlich die Platte einige Sekunden zentrifugieren.
13. Platte in das qPCR Gerät einsetzen und folgendes Programm starten:

Empfohlene PCR-Konditionen:

Bezeichnung des Prozessteils	Stadium	Anzahl der Zyklen	Temperatur (°C)	Zeit
RT-Inkubation	1	1	50	15 Minuten
Enzymaktivierung	2	1	95	2 Minuten

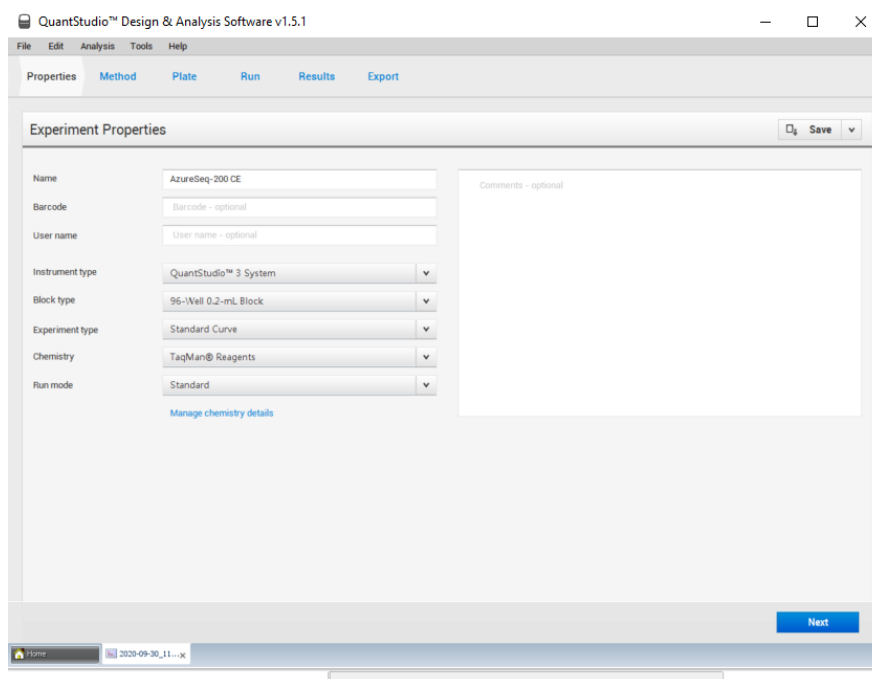
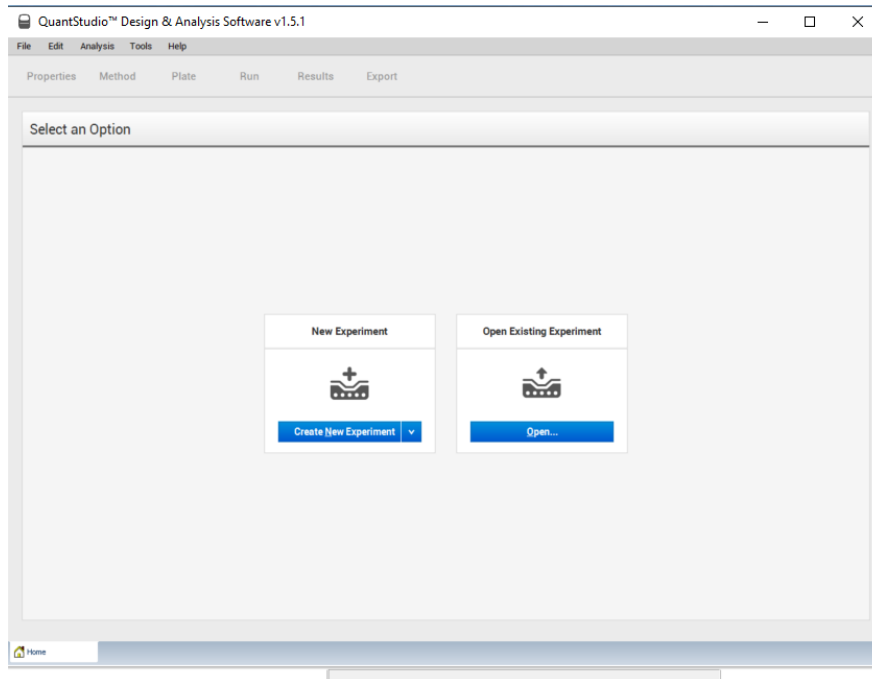
Amplifikation	3	45	95	3 Sekunden
			60**	30 Sekunden

** Für die Detektion der Fluoreszenz in der Hybridisierungs/Extensionsphase (60 °C) FAM, HEX und ROS (oder äquivalente) Kanäle benutzen.

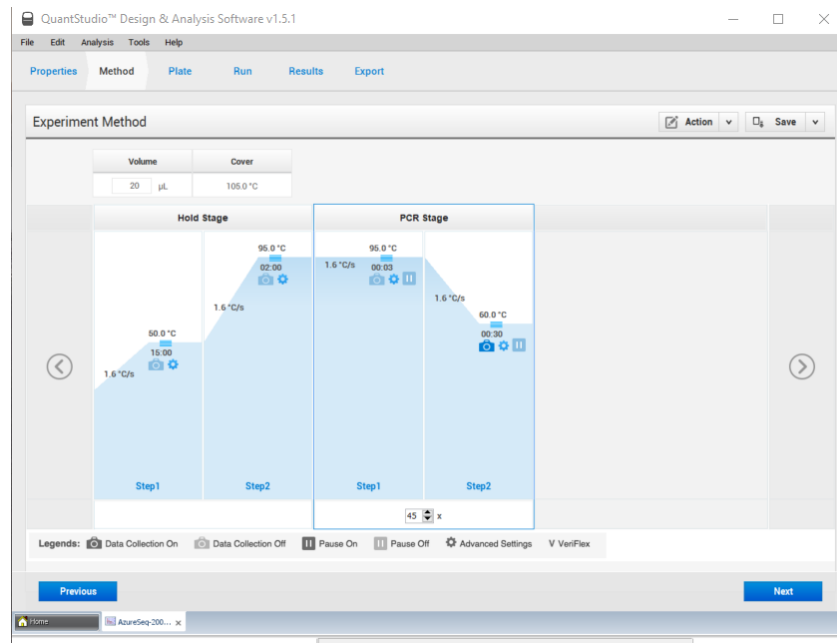
8.2 qPCR Konfiguration

8.2.1 QuantStudio 3, 5, 7 Pro

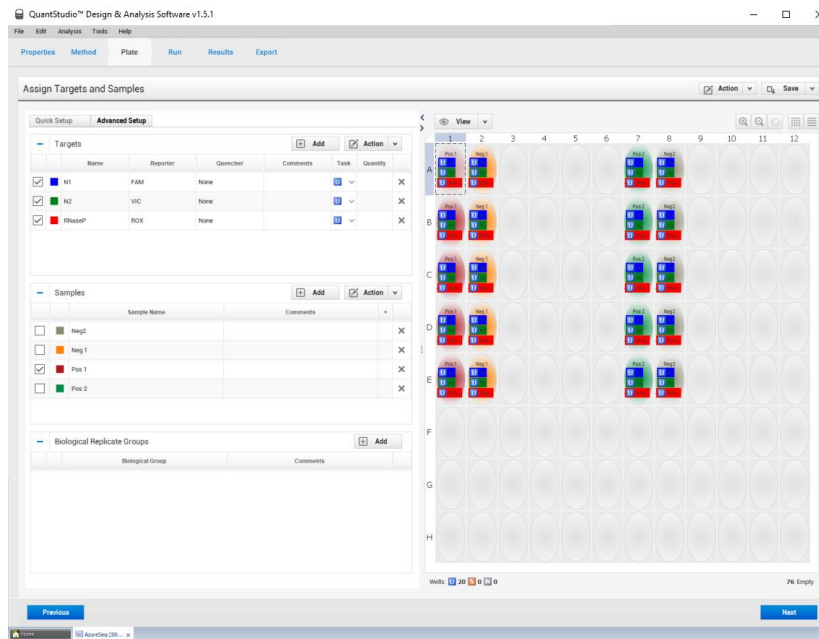
1 – Erstellen Sie ein neues Experiment und stellen Sie die Parameter (Instrumententyp, Blocktyp, Experimente Typ, Chemie, Laufmodus) gemäß der folgenden Abbildung ein.



2 – Stellen Sie die Methode gemäß dem oben beschriebenen PCR- Konditionen ein.



3 – Stellen Sie die Zielgene und Proben auf der Platte ein und weisen Sie die Kanäle zu.



4 – Exportieren Sie das Protokoll auf ein USB-Laufwerk.

5 – Importieren Sie das Experiment vom USB-Laufwerk des qPCR Instruments, setzen Sie die Platte ein und starten Sie den Lauf.

8.2.2 Roche LightCycler 480 Instrument

Weitere Informationen zur Verwendung des Instruments finden Sie in der Gebrauchsanleitung des LightCycler 480-Instruments.

- Erstellen Sie ein Detektions Format, um die Zielgene (N1, N2, RNase P) und die Kanäle (FAM, HEX, ROX - oder äquivalente) einzurichten.
- Starten Sie die Software neu, um auf das neu erstellte Detektions Format zuzugreifen.
- Wählen Sie den Platten Typ und erstellen Sie ein neues Experiment.
- Wählen Sie das neue Detektions Format aus der Dropdown-Liste.
- Stellen Sie die Blockgröße auf 96 und das Reaktionsvolumen auf 20 µl ein.
- Stellen Sie die in Schritt 8.1.1 beschriebenen PCR-Konditionen ein.
- Stellen Sie den Analysemodus 'None' für RT-Inkubation und Enzymaktivierung und "Quantification" für den Amplifikation ein.
- Stellen Sie die Ramp Geschwindigkeit für Stufe 1, 2 und den ersten Schritt von Stufe 3 auf 4,4 und für den zweiten Schritt von Stufe 3 auf 2,2 ein.
- Setzen Sie die Platte ein und starten Sie den Lauf.

8.2.3 Bio-RAD CFX96 Touch

Weitere Informationen zur Verwendung des Instruments finden Sie in der Gebrauchsanleitung des CFX96™ Touch Instruments.

- Führen Sie die CFX Manager-Software auf dem an den CFX96 angeschlossenen Computer aus.
- Erstellen Sie ein neues Protokoll, indem Sie den Lauftyp 'User-defined' auswählen.
- Klicken Sie im 'Protokol' Menü auf 'Edit Selected', um Änderungen am Protokoll vorzunehmen. Stellen Sie die Parameter der in Sektion 8.1.1 beschriebenen PCR-Konditionen ein.
- Klicken Sie im 'Plate' Menü auf 'Edit Selected', um die Platte einzustellen.
- Klicken Sie auf 'Select Fluorophores' und aktivieren Sie die Fluorophore (FAM, HEX, ROX - oder äquivalente).
- Geben Sie die Plattenpositionen der Positivkontrolle an, stellen Sie den Probenotyp auf 'Positivkontrolle' und stellen Sie die Fluoreszenzen ein (N1 Zielgen - FAM, N2 Zielgen - HEX, Rnase P - ROX).
- Geben Sie die Plattenpositionen der Negativkontrolle an, stellen Sie den Probenotyp auf 'Negativkontrolle' und stellen Sie die Fluoreszenzen ein (N1 Zielgen - FAM, N2 Zielgen - HEX, Rnase P - ROX).

- Kavitäten mit klinischen Proben sollten als Unbekannt angegeben werden, stellen Sie die Nachweisfluoreszenzen ein (N1 Zielgen - FAM, N2 Zielgen - HEX, Rnase P - ROX).
- Im Einstellungs-Menü stellen Sie den Plattentyp auf BR weiß ein.
- Gehen Sie zu Start, wählen Sie den Blocknamen (PCR-Instrument) und starten Sie den Lauf.

9. Interpretation der Ergebnisse

Vor der Interpretation der Patientenergebnisse ist die Untersuchung der Testkontrolle notwendig. Bei ungültiger Kontrolle ist auch das Patientenergebnis nicht auswertbar. Die Fluoreszenzwerte in FAM (N1 Marker), HEX (N2 Marker) und ROX (RNase P Marker) (oder adäquaten) Kanälen in der Hybridisierungs/Extensionsphase (60 °C) detektieren. Ct-Werte unter 40 können bei BioRad CFX96, Roche Lightcycler 480 System und QuantStudio 3, 5 und 7Pro Geräten als positiv interpretiert werden.

SARS-CoV-2 N1	SARS-CoV-2 N2	RNase P (Texas Red)	Interpretation der Ergebnisse	Maßnahmen
+	+	+/-	Positiv SARS-CoV-2	Melden Sie das Ergebnis dem Gesundheitsdienstleister und dem Gesundheitsamt.
Nur einer der zwei Zielbereiche ist positiv.		+/-	Unsicher	Eine Wiederholung des Tests ist notwendig.
-	-	+	SARS-CoV-2 ist nicht zu detektieren	Melden Sie das Ergebnis dem Gesundheitsdienstleister.
-	-	-	Ungültig	Eine Wiederholung des Tests ist notwendig. Ist er noch immer ungültig, so ist eine erneute Probenentnahme empfohlen. Ist eine erneute Probeentnahme nicht möglich, so melden Sie das Ergebnis dem Gesundheitsdienstleister und dem Gesundheitsamt.

Obige Tabelle als allgemeinen Leitfaden zur Interpretation der Ergebnisse nutzen.

Patientenergebnisse sind nur dann interpretierbar, wenn alle Kontrollen des gleichen Laufs als gültig angesehen werden können. Ist eine oder sind eventuell beide Kontrollen ungültig oder zeigen sie ein nicht erwartetes Ergebnis, so sind die Patientenergebnisse des gegebenen Laufs nicht zu gebrauchen.

RNase P (Extraktionskontrolle)

Bei der RNase P Reaktion soll jede klinische Probe eine Fluoreszenz Steigungskurve zeigen, die innerhalb von 40 Zyklen den Schwellenwert überschreitet (<40 Ct) und damit das Vorhandensein des humanen RNase P Gens nachweist. Wenn RNase P in einer Probe nicht detektiert wird, kann dies Folgendes bedeuten:

- RNA Verlust/Degradation infolge nicht adäquater Isolierung/Wärmebehandlung der Nukleinsäure.
- Keine ausreichende Zellzahl durch mangelhafte Probennahme oder Integritätsverlust der Probe.
- Der Test wurde nicht richtig zusammengestellt, ausgeführt.
- Reagenz-, Gerätefehler.

Zeigt der RNase P Assay bei humanen klinischen Proben kein positives Ergebnis, so ist die folgende Interpretation empfohlen:

- Ist 2019-nCoV N1 und N2 positiv, so ist das Ergebnis auch bei fehlender positiver RNase P als gültig anzusehen. Es ist möglich, dass einzelne Proben wegen der niedrigen Zellzahlen in der ursprünglichen klinischen Probe keine RNase P Steigungskurve zeigen. Das negative RNase P Signal schließt die Präsenz von 2019-nCoV Virus RNA in den klinischen Proben nicht aus.
- Sind in einer Probe alle 2019-nCoV Marker UND auch RNase P negativ, so ist das Ergebnis als ungültig zu betrachten. Steht noch ausreichend Probenmaterial zur Verfügung, so sind das Extraktionsverfahren und die Untersuchung zu wiederholen. Bleiben nach der erneuten Untersuchung alle Marker negativ, dann sind die Ergebnisse als ungültig zu qualifizieren und möglichst eine neue Probe entnommen werden.

2019-nCoV Markers (N1 und N2)

Zeigen alle Kontrollen das erwartete Ergebnis, dann ist die Probe als negativ zu betrachten, wenn die Steigungskurven der 2019-nCoV Marker (N1, N2) den Schwellenwert innerhalb von 40 Zyklen nicht überschreiten (> 40 Ct), die RNase P Kurve ihn dagegen überschreitet (< 40 Ct).

Zeigen alle Kontrollen das erwartete Ergebnis, dann ist die Probe als positiv auf 2019-nCoV zu betrachten, wenn alle Steigungskurven der 2019-nCoV Marker (N1, N2) den Schwellenwert innerhalb von 40 Zyklen überschreiten (< 40 Ct). Die Ergebnisse der 2019-nCoV Marker sind auch weiterhin als gültig anzusehen, unabhängig von der positiven oder negativen RNase P.

Zeigen alle Kontrollen das erwartete Ergebnis bzw. überschreiten die Steigungskurven der 2019-nCoV Markers (N1, N2) und der RNase P Marker den Schwellenwert innerhalb von 40 Zyklen nicht (also $Ct > 40$), so ist das Ergebnis ungültig. Die Untersuchung der aus der Probe (mit direkter Methode oder herkömmlichem Isolierungsprozess) extrahierten RNA ist zu wiederholen. Steht keine weitere RNA zur Verfügung, ist aus der verbliebenen Probe erneut RNA zu isolieren und der Test zu wiederholen. Sind in der erneut untersuchten Probe alle

Marker und RNase P negativ, so ist das Ergebnis ungültig und eine erneute Probenentnahme zu überlegen.

Zeigen alle Kontrollen das erwartete Ergebnis und überschreitet die Steigungskurve eines Markers (entweder N1 oder N2; aber nicht beide Marker) den Schwellenwert innerhalb von 40 Zyklen (also $Ct < 40$), dann ist das Ergebnis nicht überzeugend, der Test ist zu wiederholen. Die extrahierte RNA ist erneut zu testen. Steht keine weitere RNA zur Verfügung, ist aus der verbliebenen Probe erneut RNA zu isolieren und der Test zu wiederholen.

10. Einschränkungen

- Vor Einsatz des Produktes ist das Laborpersonal in der Anwendung dieser Technologie zu schulen.
- Die diagnostischen Ergebnisse sind zusammen mit anderen klinischen Symptomen, Laborbefunden zu interpretieren, alleine sind sie nicht zu verwenden.
- Die Validierung von Systemen oder Verfahren, die nicht in den Leistungsstudien der Omixon Biocomputing Ltd enthalten sind, sind Aufgabe des Benutzers.
- Das Produkt kann nur bei Proben aus Nasen-Rachen- und Mund-Rachen-Abstrichen angewandt werden.
- Die Wirksamkeit der direkten Methode (ohne RNA-Extraktion; Wärmebehandlung) hängt stark vom Virentransportmedium (VTM) während der Probenentnahme ab. Die Virentransportmedien folgender Hersteller sind besonders zu empfehlen: Clinichem, Copan, Puritan, CDC VTM. Die Medien anderer Hersteller, mwe Medical Wire , sind vom Labor des Anwenders zu validieren.
- Der direkte Ansatz kann zu einer Verschiebung des Ct-Wertes führen. Bei Verwendung der direkten Methode weisen die Proben etwas höhere Ct-Werte auf (typischerweise 1-2 Zyklen). In seltenen Fällen kann die Verschiebung zu höheren Ct-Werten bis zu 6 Zyklen ausmachen. Dies kann zu einem anderen positiven, nicht schlüssigen oder negativen Ergebnis führen, insbesondere bei Proben, die bereits im hohen Ct-Bereich liegen.
- Ein negatives Ergebnis schließt die Infektion nicht aus, die Ergebnisse hängen von der richtigen Probenentnahme und dem Abwesenheit von Inhibitoren ab. Die Anwesenheit von PCR Inhibitoren kann zu ungültigen oder nicht überzeugenden Ergebnissen führen. Diese Fälle erfordern eine Wiederholung.
- Falsch-positive Ergebnisse können aus mehreren Gründen auftreten, die meist in Verbindung mit Verunreinigungen während der Bearbeitung und Vorbereitung der RNA-Proben stehen.

11. Problemlösungen

Problem	Mögliche Ursache	Lösungsvorschlag
Schwache oder fehlende Fluoreszenzintensität der positiven Kontrolle	Degradation der Probe	Ein neues Probenaliquot benutzen oder den Test mit einem neuen Produkt mit anderer Chargennummer wiederholen.
Starke Inkonsistenz der Fluoreszenzintensität bei gleichen Proben	Ungenau pipettieren	Kalibrierte Pipetten benutzen, sich überzeugen, dass in alle Kavitäten/Röhrchen die gleiche Reagenzmenge eingebracht wurde.
Detektieren von Fluoreszenz in der negativen Kontrolle	Kontamination, Verunreinigungen aus vorherigen Schritten	Nach jeder Probe Pipettenspitze austauschen. Beim Austeilen der Proben, der negativen bzw. positiven Kontrollen sorgfältig arbeiten.
	Kontamination des Amplifikations-Mastermix	Ein neues Aliquot des Amplifikations-Mastermix benutzen.
	Kontamination des isolierenden/vorbereitenden Bereichs	Desinfektionsmittel zur Reinigung der Oberflächen benutzen.
Fehlendes Fluoreszenzsignal sowohl in den Proben als auch der positiven Kontrolle.	Degradation der Probe	Neues Aliquot der Probe benutzen.
	Falsche PCR Einstellung	Richtigkeit der Einstellungen am qPCR-Gerät kontrollieren.
	Schlecht zubereiteter Mastermix, wahrscheinlich ausgelassenes Reagenz	Komponenten kontrollieren und Vorbereitungen zum PCR-Mastermix wiederholen.
Falsch-negatives Ergebnis	Anwesenheit von RT-PCR-Inhibitoren	RNA-isolierendes Produkt vor Gebrauch validieren. Virentransportmittel der in der Gebrauchsanweisung aufgelisteten Hersteller benutzen.
	Unsachgemäße Probenentnahme	Der validierten Methode der Probenentnahme folgen.
	Nichteinhalten der Anweisungen in der Gebrauchsanweisung	Lesen Sie die Gebrauchsanweisung, bevor Sie mit dem Verarbeiten der Proben beginnen. Ein Abweichen von den beschriebenen Schritten kann die optimale Leistung beeinflussen.
	Benutzen von nicht erlaubtem Reagenz	Reagenzien des AzureSeq Kits nicht durch Reagenzien anderer Hersteller ersetzen oder mit ihnen mischen.
Falsch-positives Ergebnis	Kontamination, Vertauschen der Proben	Besonders sorgfältig bei der Verarbeitung der Patientenproben vorgehen, eindeutige und validierte

		Nachverfolgungsverfahren im Laboratorium benutzen.
	Verwechslung von Proben	Proben verwerfen und den Test mit neuen Proben wiederholen.

12. Qualitätskontrolle

Die Validierung des gesamten Verfahrens (direkt oder mit RNA-Isolierung) und der Amplifikation mit negativen bzw. positiven Kontrollen oder kalibrierter Referenz ist zu empfehlen.

13. Leistungsmerkmale

13.1. Analytische Sensitivität – Studien zur Nachweisgrenze (LoD)

Die LoD Studie bestimmt die niedrigste SARS-CoV-2 Konzentration (Kopien (cp)/Reaktion), die mit dem Produkt AzureSeq CE bei N1 und N2 Assays zu mindestens 95 % detektiert werden kann. Die Studie wurde an mehreren quantitativen PCR-Geräten durchgeführt.

13.1.1. BioRad CFX96 Touch

Bei dem BioRad CFX96 Touch Real-Time Detection System beträgt der LoD Wert der AzureSeq CE Reagenzien bezogen auf die genomische RNA beim N1 Target 5 Kopien/20 µL Reaktion (d.h. 0,25 Kopien/µL) und beim N2 Target 10 Kopien/20 µL Reaktion (d.h. 0,5 Kopien/µL). Die genomische RNA wurde der PCR Reaktion unmittelbar zugesetzt und am BioRAD CFX96 Touch Real-Time Detection System analysiert.

<i>Genomische RNA Untersuchung am BioRAD CFX96 Touch Real-Time Detection System Gerät</i>						
Zielgen	N1			N2		
RNA Konz. (Kopien/µl)	0.05 (.2x)	0.25 (1x)	0.5 (2x)	0.05 (.1x)	0.5 (1x)	1 (2x)
Positiv/Gesamtzahl	10/20	20/20	20/20	1/20	20/20	20/20
Mittlerer Ct-Wert (positive Fälle)	N/A	37.05	36.25	N/A	37.01	35.91
Ct-Streuung	N/A	0.68	0.55	N/A	0.5	0.33

13.1.2. Applied Biosystems QuantStudio 3/5/7 Pro Real-time PCR System

Beim Applied Biosystems QuantStudio 3 Echtzeit-PCR-Gerät beträgt der LoD Wert der AzureSeq CE Reagenzien bezogen auf die genomische RNA sowohl beim N1 Target als auch beim N2 Target 10 Kopien/20 µl Reaktion (d.h. 0,5 Kopien/ µl). Die genomische RNA wurde der PCR-Reaktion unmittelbar zugesetzt und am Applied Biosystems QuantStudio Echtzeit-PCR-Gerät analysiert. Die vergleichende Konkordanzstudie der QuantStudio 3, 5 und 7 Pro Plattformen wurde unter Verwendung von 20 zuvor als SARS-CoV-2 positiv (n = 11) und negativ (n = 9) identifizierten klinischen Proben durchgeführt. Bei den positiven Proben wurde der mittlere Ct-Wert für N1, N2 und RNase P an allen Geräten berechnet, während bei allen negativen Fällen der mittlere Ct-Wert für RNase P berechnet wurde. Diese Daten zeigen, dass es hinsichtlich der zu erwartenden klinischen Ergebnisse keine Unterschiede zwischen den drei untersuchten Plattformen gibt.

<i>Genomische RNA am ThermoFisher QuantStudio 3 Real-Time PCR System Gerät</i>								
Zielgen	N1				N2			
RNA Konz. (Kopien/µl)	0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2
Positiv/Gesamtzahl	16/20	20/20	20/20	20/20	15/20	19/20	20/20	20/20
Mittlerer Ct-Wert (positive Fälle)	32.04	31.12	30.45	29.04	38.67	37.02	36.47	34.35
Ct-Streuung	7.89	3.58	4.10	4.09	2.57	4.78	2.61	3.14

13.1.3. Roche LightCycler® 480 System

Der LoD für die AzureSeq CE Reagenzien für genomische RNA auf dem Roche LightCycler® 480 Echtzeit-PCR-System wurde auf 10 Kopien pro 20-µl-Reaktion (oder 0,5 Kopien/µl) für N1- und N2-Targets festgelegt. Die genomische RNA wurde der PCR Reaktion unmittelbar zugesetzt und am Roche LightCycler® 480 System analysiert.

<i>Genomische RNA am Roche LightCycler® 480 System</i>						
Zielgen	N1			N2		
RNA Konz. (Kopien/µl)	0.5	1	2	0.5	1	2
Positiv/Gesamtzahl	22/23	23/23	23/23	23/23	23/23	23/23
Mittlerer Ct-Wert (positive Fälle)	37.63	36.76	35.78	36.37	35.55	34.61
Ct-Streuung	0,9062	0,5680	0,1956	1,795	0,4712	0,4441

13.2. Inklusivitätstest – analytische Spezifität

AzureSeq CE verwendet von der CDC designte, als N1 und N2 SARS-CoV-2 Marker benutzte Primer/Sonden, an denen die in-silico-Analyse mit bekannten Sequenzen von SARS-CoV-2 durchgeführt wurde. Die Daten der Analyse sind bei der FDA unter EUA EUA200001 „CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostics Panel“ zur Verfügung gestellt.

Ergebnisse – *in-silico*-Analyse der Primer- und Sondensequenzen

Die Primer- und Sondensequenzen des CDC 2019 nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panels wurden mit den 31.623 Sequenzen in der seit 20. Juni 2020 verfügbaren Datenbank der Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID, <https://www.gisaid.org>) abgeglichen, um die vorhergesagte Inklusivität des CDC 2019 nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panels zu demonstrieren. Nukleotid-Fehlpaarungen der Primer/Sonderegionen mit Frequenzen von mehr als 0,1 % sind weiter unten dargestellt. Ausgenommen die in der dritten Position der N1 in > 1 % (2,00 %) vorkommenden Nukleotid-Fehlpaarungen, beträgt die Gesamthäufigkeit <1 %, was darauf hinweist, dass das Auftreten von Fehlpaarungen sporadisch war. Bei den N1-Proben wurden nur in einer Sequenz (0,0032 %) zwei Nukleotid-Fehlpaarungen gefunden. Bei N1-Rückwärtsprimern zeigten Sequenzen aus einem anderen Isolat (0,0032 %) zwei Nukleotid-Fehlpaarungen. Bei den N2-Primer- bzw. Sondenregionen wurden keine Sequenzen gefunden, bei denen mehr als eine Fehlpaarung zu beobachten war. Das Risiko von Fehlpaarungen, wobei die deutliche Abnahme der Reaktivität zu falsch-negativen Ergebnissen führt, ist aufgrund des Designs der Primer und Sonden gering. Aufgrund der Schmelztemperatur über 60 °C und der Hybridisierungstemperatur von 55 °C können zwei Nukleotid-Fehlpaarungen gut toleriert werden.

In silico Inklusivitätsanalyse des CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panels zwischen 31.623 Genomsequenzen, die seit 20. Juni 2020 bei GISAID verfügbar sind.

Primer/Probe	N1 Probe	N1 revers		N2 Probe
Position (5'>3')	3	15	21	13
Nukleotid-Fehlpaarung	C>T	G>T	T>C	C>T
Anzahl der Fehlpaarungen	632	34	71	46
Häufigkeit der Fehlpaarungen (%)	2.00	0.11	0.22	0.15

Neue SARS-CoV-2-Varianten

Gegen die derzeit bekannten Varianten des SARS-CoV-2-Virus: Original-Alpha-Stamm (WT), UK/SA (B.1.1.7), Delta (B.1.627.2) und Omicron-Variante (B.1.1.529), wurden *in-silico*-Analysen sowie RT-qPCR-Tests durchgeführt. Wie von der *in-silico*-Analyse vorhergesagt, amplifizieren die AzureSeq-Reagenzien erfolgreich N1- und N2-Targets gegen alle getesteten RNA-Varianten. Die Leistung von N1 gegenüber der Omicron-Vorlage, die eine einzige Nichtübereinstimmung in der N1-Sonde enthält, war nicht beeinträchtigt und entsprach der Leistung der anderen Varianten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die AzureSeq-Reagenzien gleichermaßen gegen alle Hauptstämme von SARS-CoV-2-RNA wirken, die bis zum Zeitpunkt der Herausgabe dieser IFU weltweit zirkulierten (WT, B.1.1.7 UK/SA, B.1.627.2 Delta, B.1.1.529 Omicron). Daher ist davon auszugehen, dass die AzureSeq-Reagenzien auch weiterhin die RNA der SARS-CoV-2 Omicron-

Variante von Personen, die nachweisbare Mengen von SARS-CoV-2 in entsprechend gesammelten Probentypen aufweisen, amplifizieren und nachweisen werden.

13.3. Kreuzreaktivität- analytische Spezifität

AzureSeq CE verwendet von der CDC designte, als N1 und N2 SARS-CoV-2 Marker benutzte Primer/Sonden, an denen ein *in-silico*-Test der Kreuzreaktivität durchgeführt wurde. Das CDC führte auch Labortests zur Kreuzreaktivität mit von der FDA empfohlenen Organismen durch. Die Daten dieser Analysen sind über FDA EUA EUA200001 „CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostics Panel“ verfügbar.

Testergebnisse zur Spezifität/Exklusivität: *in-silico*-Analyse

BLAST Algorithmen von 2019-nCoV rRT-PCR Assay Primern und Sonden wurden mit öffentlich zugänglichen Nukleotid Sequenzen verglichen. Folgende Datenbank-Suchparameter wurden dabei verwendet: Die Auswahl der Nukleotide enthielt GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, RefSeq Sequenzen. Ausgeschlossen waren EST, STS, GSS, WGS, TSA, patentierte, Phase 0, 1 und 2 HTGS Sequenzen und Sequenzen länger als 100 Mb. Die Datenbank enthält keine redundanten Daten. Gleiche Sequenzen wurden in eine Einheit eingeteilt, wobei die Zugangsdaten, Adressen, GI, taxonomischen Daten bewahrt wurden. Die Datenbank wurde am 3. Oktober 2019 aktualisiert. Die Suchparameter suchen automatisch kurze Sequenzen, der Grenzwert beträgt 1000. Die Punktzahl für die Übereinstimmung ist 1, für die Abweichung -3. Bei der Anpassung wurden für das Generieren eines Spalts zwischen den Nukleotiden 5 Strafpunkte, für die Extension 2 Strafpunkte kalkuliert.

2019-nCoV_N1 Assay:

Die Sondensequenz des N1 2019-nCoV rRT-PCR Testes zeigte eine hohe Homologie mit dem SARS Coronavirus und dem Genom des SARS-artigen Coronavirus von Fledermäusen, die Vorwärts- und Rückwärtsprimer zeigten diese jedoch nicht. Die Kombination von Primern und Sonde zeigt keine signifikante Homologie mit dem humanen Genom, anderen Coronaviren oder der humanen Mikroflora, so führt sie nicht zu falsch-positiven rRT-PCR Ergebnissen.

2019-nCoV_N2 Assay:

Die Sequenz der Vorwärtsprimer des N2 2019-nCoV rRT-PCR Tests zeigt eine hohe Homologie mit dem Genom des SARS-artigen Coronavirus von Fledermäusen. Bei dem Rückwärtsprimer und der Sonde konnte weder mit dem humanen Genom noch mit anderen Coronaviren oder humaner Mikroflora eine Homologie beobachtet werden. Die Kombination von Primern und Sonde führt nicht zu falsch-positiven rRT-PCR Ergebnissen.

Zusammenfassend zeigen die für die spezifische Detektion von 2019-nCoV designten 2019-nCoV rRT-PCR N1 und N2 Teste kombiniert keine Homologie mit dem humanen Genom, anderen Coronaviren oder humaner Mikroflora und führen dadurch nicht zu falsch-positiven Ergebnissen.

Zusätzlich zur *in-silico*-Analyse wurden mehrere Organismen extrahiert und mit dem CDC 2019-nCoV Echtzeit-RT-PCR Diagnostic Panel getestet, um die analytische Spezifität und Exklusivität zu demonstrieren. Die Studien wurden an Nukleinsäuren durchgeführt, die mit dem QIAGEN EZ1 Advanced XL Instrument und dem EZ1 DSP Virus Kit extrahiert wurden. Die Nukleinsäure wurden aus einem Präparat mit hohem Titer (typischerweise $\geq 10^5$ PFU/mL oder $\geq 10^6$ CFU/mL) extrahiert. Die Analyse erfolgte mit ThermoFisher Scientific TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG an einem Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument. Die Daten ergaben bei Testung mit dem CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel für alle Organismen die erwarteten Ergebnisse.

Die Spezifität und Exklusivität des CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel

Virus	Stamm	Quelle	2019-nCoV N1	2019-nCoV N1	Ergebnis
Humanes Coronavirus	229E	Isolat	0/3	0/3	negativ
Humanes Coronavirus	OC43	Isolat	0/3	0/3	negativ
Humanes Coronavirus	NL63	Klinische Probe	0/3	0/3	negativ
Humanes Coronavirus	HKU1	Klinische Probe	0/3	0/3	negativ
MERS-Coronavirus	-	Isolat	0/3	0/3	negativ
SARS-Coronavirus	-	Isolat	0/3	0/3	negativ
Bocavirus	-	Klinische Probe	0/3	0/3	negativ
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Isolat	0/3	0/3	negativ
<i>Streptococcus</i>	-	Isolat	0/3	0/3	negativ
Influenza A (H1N1)	-	Isolat	0/3	0/3	negativ
Influenza A (H3N2)	-	Isolat	0/3	0/3	negativ
Influenza B	-	Isolat	0/3	0/3	negativ
Humanes Adenovirus (Typ 1)	Ad71	Isolat	0/3	0/3	negativ
Humanes Metapneumovirus	-	Isolat	0/3	0/3	negativ
Respiratory Syncytial Virus	Long A	Isolat	0/3	0/3	negativ
Rhinovirus	-	Isolat	0/3	0/3	negativ
Parainfluenza 1	C35	Isolat	0/3	0/3	negativ
Parainfluenza 2	Greer	Isolat	0/3	0/3	negativ
Parainfluenza 3	C-43	Isolat	0/3	0/3	negativ
Parainfluenza 4	M-25	Isolat	0/3	0/3	negativ

13.4. Mikrobiologische Interferenzstudien

Mikrobiologische Interferenzstudien sind nicht notwendig, da die in silico Analyse der CDC (FDA EUA EUA200001 „CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostics Panel“) nicht die Kriterien erfüllte, die solche Studien erfordern würden.

13.5. Stabilitätstest

Der Stabilitätstest des Produktes wurde mit verschiedenen Enzym-Mastermixen durchgeführt.

Fünzig (50) Kopien genomischer RNA wurden im BioRad CFX96 Touch Detection System in 20 µL-Reaktionen eingegeben. Mit jedem Mastermix wurden 12 positive Proben getestet.

Getestete Enzym-Mastermixe:

- Thermo Fisher TaqPath 1-Step RT-qPCR System
- Promega GoTaq Probe-1 Step RT-qPCR System
- AzureSeq CE

<i>Vergleich der Reagenzien: Untersuchung in die PCR-Reaktion gespickter genomischer RNA in BioRad-Geräten</i>						
Zielgen	N1			N2		
Mastermix	AzureSeq CE	Thermo Fisher TaqPath 1-Step RT-qPCR Mastermix, CG	Promega GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System	AzureSeq CE	Thermo Fisher TaqPath 1-Step RT-qPCR Mastermix, CG	Promega GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System
Positiv/Gesamtzahl	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
Mittlerer Ct-Wert	34.78	33.12	33.97	35.89	35.38	35.87
Ct-Streuung	0.31	0.24	0.20	0.27	0.25	0.16

13.6. Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit

Mit der Zugabe von positiver und negativer Kontrolle zur PCR-Reaktion wurden – die Gebrauchsanweisung befolgend – positive und negative Proben hergestellt. Je 5 positive und negative Proben wurden im QuantStudio 3 (Applied Biosystems) Echtzeit-PCR-Gerät prozessiert. Mit Tests durch zwei Operatoren wurden Schätzungen der Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit, im Hinblick auf die Variabilität innerhalb des Laufs und zwischen den Operatoren, aufgestellt.

	Operator 1 – Ergebnisse				Operator 2 – Ergebnisse				Übereinstimmung der Operatoren (%)
	N1	N2	RNase P	Übereinstimmung der Replikate (%)	N1	N2	RNase P	Übereinstimmung der Replikate (%)	
Positive Proben	5/5	5/5	5/5	100	5/5	5/5	5/5	100	100
Negative Proben	5/5	5/5	5/5	100	5/5	5/5	5/5	100	100

13.7. Klinische Leistung

Die klinischen oropharyngealen (OP) Abstriche – die zuvor von BioRad CFX96 als positiv (11 Proben) oder negativ (6 Proben) für SARS-CoV-2 bewertet wurden – wurden im KingFisher Flex System isoliert. Von der eluierten Probe wurden fünf (5) Mikroliter zu den AzureSeq-200 CE Reagenziengabegeben, amplifiziert und mit dem BioRad CFX96 System detektiert. Alle positiven und negativen Proben zeigten 100 % Übereinstimmung mit der vorherigen Charakterisierung.

Die klinischen nasopharyngealen (NP) Proben (30 positive, 30 negative) wurden in das Virentransportmedium des Anbieters Clinichem Ltd. (Magyarország) eingebracht und nach Wärmebehandlung verarbeitet. Von der wärmebehandelten Probe wurden fünf (5) Mikroliter zu den AzureSeq-Reagenzien gegeben, amplifiziert und mit dem Roche LightCycler® 480 System Gerät detektiert. Alle positiven und negativen Proben zeigten 100 % Übereinstimmung mit der vorherigen Charakterisierung.

Plattform	Probentyp	Protokoll	Ergebnisse AzureSeq CE		Referenzergebnisse		Konkordanz (%)
			Positiv	Negativ	Positiv	Negativ	
BioRAD CFX96	Klinischer oropharyngealer (OP) Abstrich	mit RNA Isolierung	11	6	11	6	100
Roche LightCycler® 480	Klinischer nasopharyngealer (NP) Abstrich	ohne RNA Isolierung	30	30	30	30	100

14. Referenz

- 8/2003. (III.13.) ESzCsM rendelet az in-vitro diagnosztikai orvostechnikai eszközökről (ESzCsM-Verordnung über In-vitro-Diagnostika)
- AzureSeq Validation Kit Functional Assay 96 well plate 20ul
- COMMUNICATION FROM THE COMMISSION Guidelines on COVID-19 in vitro diagnostic tests and their performance, Brussels, 15.4.2020 C(2020) 2391 final
- DIRECTIVE 98/79/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices Working document of Commission services - Current performance of COVID-19 test methods and devices and proposed performance criteria 16 April 2020 (working document)
- ISO 13485:2016 - Medical devices - Quality management systems
- ISO 14971:2019 Medical devices — Application of risk management to medical devices
- Regulation (EC) No. 1907/2006 and Regulation (EC) No. 1272/2008
- BS EN ISO 23640:2015 In vitro diagnostic medical devices. Evaluation of stability of in vitro diagnostic reagents
- BS EN ISO 18113-1:2011 In vitro diagnostic medical devices. Information supplied by the manufacturer (labelling). Terms, definitions, and general requirements
- BS EN ISO 18113-2:2011 In vitro diagnostic medical Devices. Information supplied by the manufacturer (labelling). In vitro diagnostic reagents for professional use
- ISO 15223-1:2016 Medical devices — Symbols to be used with medical device labels, labelling and information to be supplied — Part 1: General requirements
- BS EN 13612:2002 Performance evaluation of in vitro diagnostic medical devices
- CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel, CDC-006-00019, Revision: 05, Effective: 07/13/2020
- ISO 20916:2019 In vitro diagnostic medical devices — Clinical performance studies using specimens from human subjects — Good study practice

15. Symbolerklärung



Losnummer, identifiziert die Reagenziencharge



Produktcode, identifiziert das IVD-Medizinprodukt



www.omixon.com

Gebrauchsanweisung in elektronischem Format beachten



Enthält ausreichend Reagenzien für <N> Tests. Die mit diesem Symbol versehene Zahl gibt die Gesamtzahl der Tests an, die mit dem IVD-Medizinprodukt durchgeführt werden können.



Hersteller, das mit diesem Symbol verbundene Datum bezieht sich auf das Herstellungsdatum



Lagertemperatur, gibt die Temperaturgrenzen an, denen das Medizinprodukt sicher ausgesetzt werden kann



Verfallsdatum



Medizinprodukt für die In-vitro-Diagnostik



Das European Conformity- (en) oder Conformité Européenne-Zeichen (fr) zeigt an, dass das Gerät der europäischen Richtlinie 98/79/EG über In-vitro-Diagnostika entspricht.

16. Kontaktinformationen

Wenden Sie sich für allgemeine Unterstützung zu diesem Protokoll an:

E-Mail-Support: azureseq.support@omixon.com

Telefonsupport: +36-70-672-7551

Hersteller Informationen:

Firmenname: Omixon Biocomputing Ltd.:

Kaposvár u. 14-18

Stadt: Budapest

Postleitzahl: H-1117

Land: Ungarn