



# AZURESEQ – 200 CE

## HASZNÁLATI ÚTMUTATÓ

In Vitro Diagnosztikai alkalmazásra

PROTOKOLL VERZIÓ V1.0

DOKUMENTUM VERZIÓ 01

2020/10/01

CE



# Tartalomjegyzék

<b>1. RENDELTETÉSSZERŰ HASZNÁLAT .....</b>	<b>4</b>
<b>2. MÓDSZER ELVE .....</b>	<b>4</b>
<b>3. TERMÉK TARTALMA.....</b>	<b>5</b>
<b>4. SZÁLLÍTÁS ÉS TÁROLÁS .....</b>	<b>5</b>
<b>5. SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK .....</b>	<b>6</b>
5.1. MŰSZEREK .....	6
5.2. REAGENSEK .....	6
5.3. FOGYÓESZKÖZÖK .....	6
<b>6. FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK .....</b>	<b>7</b>
<b>7. PROCEDÚRA .....</b>	<b>8</b>
7.1. INSTRUKCIÓK A TESZT ÖSSZEÁLLÍTÁSÁHOZ .....	8
7.1.1. <i>Munkafolyamat</i> .....	8
<b>8. EREDMÉNYEK INTERPRETÁCIÓJA .....</b>	<b>10</b>
<b>9. AZ TESZT LIMITÁCIÓI.....</b>	<b>12</b>
<b>10. PROBLÉMAMEGOLDÁS .....</b>	<b>13</b>
<b>11. MINŐSÉG ELLENŐRZÉS.....</b>	<b>14</b>
<b>12. TELJESÍTMÉNY JELLEMZŐK .....</b>	<b>14</b>
12.1. ANALITIKAI SZENZITIVITÁS – DETEKCIÓS LIMIT (LOD) TANULMÁNYOK.....	14
12.1.1. <i>BioRad CFX96 Touch</i> .....	14
12.1.2. <i>Applied Biosystems QuantStudio 3/5/7 Pro Real-time PCR System</i> .....	14
12.1.3. <i>Roche LightCycler® 480 System</i> .....	15
12.2. INKLUZIVITÁS TESZT - ANALITIKAI SPECIFICITÁS .....	16
Eredmények - A primer és próba szekvenciák in silico analízise .....	16
12.3. KERESZTREAKTIVITÁS - ANALITIKAI SPECIFITÁS .....	16
Eredmények Specificitás/Exkluzivitás teszt: in silico elemzés .....	17
12.4. MIKROBIOLÓGIAI INTERFERENCIA VIZSGÁLATOK .....	18
12.5. ROBUSTUSSÁG TESZT .....	18
12.6. MEGISMÉTELHETŐSÉG ÉS REPRODUKÁLHATÓSÁG .....	19
12.7. KLINIKAI TELJESÍTMÉNY .....	20
<b>13. CÍMKÉN MEGJELENŐ SZIMBÓLUMOK.....</b>	<b>21</b>
<b>14. KAPCSOLAT.....</b>	<b>21</b>

## Dokumentum történet– Jegyzetek és frissítések

Protokoll verzió	Dokumentum verzió	Dátum	Szerző	Változások összefoglalása	Engedélyezve
1	v1	2020/10/01	Noémi Petrovicz	Első verzió	Gergely Tölgyesi

## 1. Rendeltetészerű használat

Az AzureSeq CE qPCR Kit SARS-CoV-2 for 200 Reactions egy RT-qPCR alapú teszt, mely COVID-19 fertőzés tüneteit mutató egyének orr-garati, és száj-garati nyálkahártyából származó mintában kimutatható 2019-nCoV nukleinsav mennyiségi detektálására alkalmas.

Az eredmények a 2019-nCoV RNS azonosítására alkalmasak. A 2019-nCoV RNS általában kimutatható orrgarati és szájgarati nyálkahártyából származó mintákban a fertőzés akut fázisában. A pozitív eredmények az aktív fertőzésre utalnak.

A negatív eredmények nem zárják ki a 2019-nCoV fertőzést, és önmagukban nem használhatók a betegkezelési döntésekhez. A negatív eredményeket kombinálni kell a klinikai megfigyelésekkel, a beteg kórtörténetével és az epidemiológiai adatokkal.

Az AzureSeq CE qPCR Kit SARS-CoV-2 for 200 Reactions olyan klinikai laboratóriumi személyzet általi alkalmazásra készült, akiket kifejezetten a valós idejű PCR és in vitro diagnosztikai eljárások technikájára oktattak és képezték.

## 2. Módszer elve

A teszt egy valós idejű reverz transzkripció polimeráz láncreakció (rRT-PCR) teszt. A termék komponensei kompatibilisek a CDC 2019-nCoV primereivel és próbáival, amelyek a COVID-19 fertőzés tüneteit mutató egyének orr-garati, és száj-garati nyálkahártyából származó mintákban kimutatható 2019-nCoV nukleokapszin gén két régiójának detektálására alkalmas. A termék kompatibilis továbbá azzal a CDC primerrel és próbával is, melyet klinikai mintákban humán Rnáz P (RP) detektálására alkalmaznak.

A SARS-CoV-2 genomjának target szekvenciái ugyanazok, amelyeket a CDC is vizsgál a 2019-nCoV valós idejű RT-PCR diagnosztikai paneljében. Ezek a szekvenciák a vírus nukleokapszid (N) génjének 2 különböző régiójában (N1 és N2) találhatóak. Kontrollként használt gén az RNaseP.

A nukleinsavak izolálása és tisztítása az orrgarati és szájgarati nyálkahártya mintavételből származó mintákból egy jól megalapozott nukleinsav-extrakciós rendszerrel történik. A vizsgálathoz szükséges minta kezdeti mennyisége és elúciós térfogata rendszerfüggő. A termék Vírus Transzport Médiumban oldott, hőkezelt minták felhasználását is lehetővé teszi.

A megtisztított nukleinsav az AzureSeq CE qPCR Kit SARS-CoV-2 for 200 Reactions (a továbbiakban AzureSeq – 200 CE) master mix-ben reverz transzkripcióval cDNS-sé alakul. A folyamat során a próba egy speciális célszekvenciához köt, amely a forward és a reverz primerek között helyezkedik el. A PCR-ciklus extenzió fázisa során a Taq-polimeráz 5' nukleáz aktivitása lebontja a próbát, aminek következtében a riporterfesték már nem kötődik a kioltófestékhez, és képessé válik a fluoreszcens jelet generálására. Minden ciklus során további riporter festékmolekulák hasítódnak le a próbákról, növelve ezzel a fluoreszcencia intenzitását. A PCR reakció során ciklusonként történik a fluoreszcencia intenzitás monitorozása.

### 3. Termék tartalma

Termék kód	Termék neve	Csövek száma	Mennyiség (μL)
OA-ITMP-MM-100	2X InhibiTag 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	Nuclease Free Water	2	350

### 4. Szállítás és tárolás

Az AzureSeq - 200 CE termék szállítása száraz jégen történik. A komponensek fagyott állapotban érkeznek. Kérjük lépjen kapcsolatba az ügyfélszolgálatunkkal ([azureseq.support@omixon.com](mailto:azureseq.support@omixon.com)), amennyiben bármelyik komponens nem az előírásoknak megfelelően érkezik.

A reagensek degradációját elkerülendő, érkezés után a komponensek -20°C-on tárolandók. Amennyiben áramkimaradásra hajlamos területen dolgozik, javasolt egy tartalék generátor és egy hőmérsékleti adatnapló használata a komponensek megfelelő hűtésének biztosítására. A gyártó által biztosított lejárati idő 12 hónap. Ne használja a terméket a határidő lejárta után. Ne használjon sérült terméket.

A használt reagenseket és hulladékot a helyi szabályozásoknak megfelelően kezelje.

## 5. Szükséges, de nem biztosított anyagok és eszközök

### 5.1. Műszerek

- Valós-idejű PCR készülék, mely a FAM, HEX, vagy ROX (vagy ezekkel ekvivalens) csatornákkal való detektálásra alkalmas
- Fűthető blokk (kompatibilis a teszt során használt 1.5 mL mikrocentrifuga csüvekkel, 95°C-on történő inkubálásra alkalmas)
- 100 µL és 1000 µL mennyiségek kezelésére alkalmas mikropipetta
- 10 µL és 100 µL mennyiségek kezelésére alkalmas többcsatornás pipetta
- Vortex mixer
- Centrifuga

### 5.2. Reagensek

- Virális/teljes RNS extrakciós rendszer
- CoVi Negatív Kontroll (Cat# OA-CVNC-150)
- CoVi Pozitív Kontroll (Cat# OA-CVPC-150)

### 5.3. Fogyóeszközök

- Optikai plate, mely kompatibilis a használt qPCR készülékkel
- Optikai fólia, mely kompatibilis a használt qPCR készülékkel
- Eldobható DNáz/RNáz mentes steril pipetta hegyek (10 µL, 100 µL, and 1000 µL)
- DNáz/RNáz mentes 1.5 ml mikrocentrifuga cső
- Eldobható gumikesztyű
- Felületfertőtlenítő szer
- RNS izoláláshoz szükséges eszközök

## 6. Figyelmeztetések és Óvintézkedések

A helyes laboratóriumi munkafolyamatok („Good laboratory practices”, azaz GLP) elengedhetetlenek a teszt megfelelő kivitelezéséhez. A termék magasfokú érzékenysége miatt a minták és anyagok kezelése során ügyelni kell arra, hogy a reagensek és az amplifikációs keverékek ne legyenek szennyezettek.

A felhasználónak figyelni kell az alábbi pontok betartására:

- Olvassa el a használati útmutatót mielőtt elkezdi a minták feldolgozását. A leírtaktól való eltérés befolyásolhatja az optimális performanciát.
- Használjon fertőtlenítő szert a minták feldolgozása során használt területek tisztításához, fertőtlenítéséhez.
- A felhasznált mintákat, reagenseket és egyéb potenciálisan szennyezett anyagot fertőtlenítsen és a helyi előírásoknak megfelelően kezelje.
- A vizsgálat végrehajtása során alkalmazzon általános óvintézkedéseket. Kezelje a mintákat potenciálisan fertőzőként.
- Viseljen védőfelszerelést a laborfolyamatok kivitelezésekor.
- Mosson kezet alaposan a kesztyű eltávolítása után, dobja a kesztyűt a veszélyes hulladékgyűjtőbe.
- A reagenseket kizárólag az itt (Használati Útmutató) leírtak alapján oldja, hígítsa. A Használati Útmutatóban meghatározottaktól eltérő mennyiségű reagenseket ne használjon. Ezek a téves gyakorlatok hibákhoz vezethetnek.
- A Használati Útmutatóban leírt protokoll lépések be nem tartásából eredő hibák esetén a forgalmazó (Omixon) nem vállal felelősséget az eredmények hitelességéért.
- Ne használja a terméket, amennyiben azon bármilyen sérülés jelenlétét tapasztalja. (pl. törött komponensek, laza kupakok)
- Ne használja a terméket a lejárat dátum után.
- Ne helyettesítse, vagy vegyítse az AzureSeq reagenseket egyéb gyártó termékeivel.
- Minden műszert a gyártó utasításainak megfelelően kell működtetni és karbantartani.
- Minden munkahelyet fel kell szerelni saját, változó térfogatú pipettákkal, illetve a szükséges segédanyagokkal és felszerelésekkel.
- Ne vegyítse ugyanazon terméket, komponenst különböző gyártásból (különböző LOT számmal elláva).
- Ne dohányozzon, ne igyon, ne egyen és ne használjon kozmetikumokat olyan területeken, ahol a mintákat vagy a termék komponenseit kezelik.

## 7. Procedúra

Az AzureSeq-200 CE termék tartalmaz egy kontroll vizsgálatot, amely az RNaseP RNS-t vizsgálja. Belső kontroll, mely minden vizsgált minta esetében alátámasztja a nukleinsav jelenlétét a rendszerben, biztosítva ezzel a termék komponenseinek funkcionalitását.

Külső kontroll nem biztosított az AzureSeq – 200 CE termékhez. A vizsgálathoz szükséges pozitív, illetve negatív kontroll a felhasználó számára külön termékként elérhető (Omixon Biocomputing Kft, katalóguszám Id. 5. szekció), egyéb esetben a saját, laboratóriumban megtalálható kontrollok használhatók.

### 7.1. Instrukciók a teszt összeállításához

Direkt módszerrel történő (RNS izolálás nélküli) munkafolyamat esetén kövesse az alábbi protokollt az 1. lépéstől.

Hagyományos, validált izoláló rendszerrel kivont RNS feldolgozása esetén hagyja ki az 1-4. pontokat és kezdje a munkafolyamatot a protokoll 5. pontjánál.

#### 7.1.1. Munkafolyamat

Csak Vírus Transzfer Médiumban oldott orrgarati és szájgarati nyálkahártyából származó minták feldolgozása esetén javasolt. Javasolt VTM-ek: Clinichem, Copan, Puritan, CDC VTM, mwe Medical Wire

A minták maximum 48 órán át tárolhatók 4°C-on Virális Transzport Médiumban.

1. Oldja le a mintát a mintavételi pálcáról Vírus Transzfer Médiumban.
2. Pipettázzon 100-200  $\mu\text{L}$ -t Vírus Transzfer Médiumban oldott mintát egy új DNáz/RNáz mentes csőbe.
3. Inkubálja a mintákat 5 percig 95°C-on.
4. 30 másodpercig centrifugálja le a csövet  $\sim 1500 \times g$  sebességgel, majd a következő lépésig tárolja jégen!
5. Helyezze jégre a CoVi Primer / Probe mix 3 jelzésű csövet (barna cső/tető), majd hagyja felolvadni körülbelül 30 percig. Miután felolvadt, néhány másodpercig centrifugálja a csövet, hogy tartalma annak aljára kerüljön. Ezután adjon hozzá **384  $\mu\text{L}$**  nukleázmentes vizet. Jelölje meg a vizet tartalmazó csövet.
6. Vortexelje a csövet maximális sebességgel 10 másodpercig, majd rövid ideig centrifugálja, hogy tartalma annak aljára kerüljön.
7. Folytassa a master mix összeállítást az alábbiak szerint egy tiszta helyiségben, vagy egy erre kijelölt területen:



Reakció összeállítása 20  $\mu$ L végtérfogatra – 1. táblázat:

Komponens	Térfogat/reakció ( $\mu$ L)	Térfogat/100 reakció ( $\mu$ L)	Végkoncentráció
2x InhibiTag Multiplex qPCR MasterMix	10	1000	1x
RTScript Reverse Transcriptase, 200U/ $\mu$ L	0.5	50	5U/ $\mu$ L
Diluted Primer/Probe Mix (step #5)	4.5	450	1x

8. A pipettát a hozzáadott 2x Master Mix mennyiségének megfelelő térfogatra állítva szuszpendálja össze a mastermixet, vagy vortexelje rövid ideig, majd néhány másodperfig centrifugálja, hogy a tartalma a cső aljára kerüljön.
9. Mérjen **15 $\mu$ L** master mix-et a megfelelő plate pozíciókba.
10. Mérjen **5  $\mu$ L** mintát, pozitív és negatív kontrollt a megfelelő pozíciókba.
11. A plate fóliával történő lezárása után vortexelje néhány másodpercig, végül néhány másodpercig centrifugálással a plate-et.
12. Helyezze a plate-et a kijelölt qPCR gépbe és indítsa el az alábbi programot:

Javasolt PCR kondíciók:

Folyamatrész megnevezése	Stádium	Ciklusszám	Hőmérséklet ( $^{\circ}$ C)	Time
RT inkubáció	1	1	50	15 perc
Enzim aktiváció	2	1	95	2 perc
Amplifikáció	3	45	95	3 másodperc
			60**	30 másodperc

\*\*A fluoreszcencia anneálás/extenzió fázisában (60 $^{\circ}$ C) történő monitorozásához használja a FAM, HEX és ROS (vagy azokkal ekvivalens) csatornákat.

## 8. Eredmények interpretációja

A betegek eredményének értelmezése előtt szükséges a teszt kontrollok vizsgálata. Érvénytelen kontrollok esetén a betegek eredménye és értelmezhetetlen. Rögzítse a FAM, HEX és ROX (vagy ezzel egyenértékű) csatornákon mért fluoreszcencia értékét az annexiós/extenziós fázisban (60°C). A 40 alatti Ct értékek pozitívként interpretálhatók a BioRad CFX96, a Roche Lightcycler 480 System és a QuantStudio 3, 5 és 7Pro műszerek esetén.

SARS-CoV-2 N1	SARS-CoV-2 N2	RNáz P	Eredmények Interpretációja	Teendő
+	+	+/-	Pozitív SARS-CoV-2	Jelentse az eredményt az egészségügyi szervnek és a közegészségügyi hatóságnak.
A két célgénből csak az egyik pozitív.		+/-	Bizonytalan	A teszt ismétlése szükséges.
-	-	+	SARS-CoV-2 Nem detektálható	Jelentse az eredményt az egészségügyi szervnek.
-	-	-	Érvénytelen	A teszt ismétlése szükséges. Ha még mindig érvénytelen, új mintavétel javasolt. Ha új mintavétel nem lehetséges, jelentse az eredményt az egészségügyi szervnek és a közegészségügyi hatóságnak.

Használja a fenti táblázatot általános útmutatóként az eredmények interpretációjához.

A betegek eredménye csak abban az esetben értelmezhető, amennyiben az azonos futásban vizsgált minden kontrollnak érvényesnek tekinthető. Ha a kontrollok egyike, vagy esetleg mindkettő érvénytelen, vagy váratlan eredményt mutat, az adott futtatás betegeredményei nem használhatók.

### RNáz P (Extrakciós kontroll)

Az RNáz P reakcióban minden klinikai mintának olyan fluoreszcencia növekedési görbét kell mutatnia, amely 40 cikluson belül átlépi a küszöbértéket (40 Ct), ezzel igazolva a humán RNáz P gén jelenlétét. Az RNáz P detektálási elégtelensége bármely mintában jelezheti:

- Nem megfelelő nukleinsav izolálás / hőkezelés következtében fellépő RNS vesztés / degradáció.
- Nincs elegendő sejtszám a gyenge gyűjtés, vagy a minta integritásvesztése miatt.
- A teszt nem megfelelő összeállítása, kivitelezése.
- Reagens, készülék hibák.

Ha az Rnáz P vizsgálat nem mutat pozitív eredményt a humán klinikai minták esetén, az alábbiak szerinti értelmezése javasolt:

- Ha a 2019-nCoV N1 és N2 pozitív, az eredményt pozitív Rnáz P hiányában is érvényesnek kell tekinteni. Lehetséges, hogy egyes minták az eredeti klinikai mintában lévő alacsony sejtszámok miatt nem mutatnak RNáz P növekedési görbét. A negatív RNáz P jel nem zárja ki a 2019-nCoV vírus RNS jelenlétét egy klinikai mintában.
- Ha egy mintára az összes 2019-nCoV marker és az RNáz P is negatív, az eredményt érvénytelennek kell tekinteni. Ha rendelkezésre áll másik minta, ismételjük meg az extrakciós eljárást és a vizsgálatot. Ha az újvizsgálat után minden marker negatív marad, az eredményeket érvénytelennek kell minősíteni, és lehetőség szerint új mintát kell gyűjteni.

### **2019-nCoV Markers (N1 and N2)**

- Ha minden kontroll a várt eredményt mutatja, akkor a minta abban az esetben tekinthető negatívnak, ha a 2019-nCoV markerek (N1, N2) növekedési görbéi nem ( $> 40$  Ct), az RNáz P görbéje viszont átlépi a küszöbértéket 40 cikluson belül ( $< 40$  Ct).
- Ha minden kontroll a várt teljesítményt mutatja, akkor a minta pozitívnak tekinthető a 2019-nCoV-ra, ha az összes 2019-nCoV marker (N1, N2) növekedési görbéi 40 cikluson belül átlélik a küszöbértéket ( $< 40$  Ct). Az eredmények az RNáz P-től függetlenül továbbra is.
- Ha minden kontroll a várt eredményt mutatja, illetve a 2019-nCoV markerek (N1, N2) és az RNase P marker növekedési görbéi nem lépik át a küszöbértéket 40 cikluson belül ( $< 40.00$  Ct), az eredmény érvénytelen. A mintából kivont RNS (közvetlen módszerrel vagy szokásos izolálási folyamattal) vizsgálatát ismételni kell. Ha nem áll rendelkezésre további RNS, akkor újra kell izolálni az RNS-t a maradék mintából, majd meg kell ismételni a tesztet. Ha az újvizsgált minta negatív minden markerre, továbbá az RNáz P-re, az eredmény érvénytelen, és új mintavétel megfontolása javasolt.
- Ha az összes kontroll várható eredményt mutat és a növekedési görbe az egyik marker (vagy N1, vagy N2) esetén átlépi a küszöböt 40 cikluson belül ( $< 40,00$  Ct) az eredmény nem meggyőző, a tesztet ismételni kell. Ha nem áll rendelkezésre maradék RNS, akkor újra kell izolálni RNS-t a maradék mintából, és ismételni a vizsgálatot.

## 9. Az teszt limitációi

- A termék használata előtt a laboratóriumi személyzetet ki kell képezni ezen technológia alkalmazására.
- A kapott diagnosztikai eredményeket más klinikai, laboratóriumi leletekkel együtt kell értelmezni, önmagában nem használható.
- A rendszer validálása minden futás előtt a felhasználó feladata, azt az Omixon Biocomputing Kft. teljesítmény tanulmányai nem tartalmazzák.
- A termék csak orrgarati és szájgarati mintavételből származó mintákon alkalmazható.
- A direct módszer (RNS kivonás, hőkezelés nélkül) hatékonysága nagymértékben függ a mintagyűjtési folyamat során használt Virális Transzport Médiumtól (VTM). A következő gyártók Virális Transzport Médiumának használata erősen ajánlott: Clinichem, Copan, Puritan, CDC VTM. Egyéb gyártók Médiumát a felhasználói laboratóriumnak kell hitelesítenie.
- A negatív eredmény nem zárja ki a fertőzés lehetőségét, az eredmények függenek a megfelelő mintagyűjtéstől és az inhibitorok hiányától. A PCR-inhibitorok jelenléte érvénytelen, vagy nem meggyőző eredményeket okozhatnak. Ezen esetek ismétlést igényelnek.
- Álpozitív eredmények több okból is bekövetkezhetnek, amelyek többnyire az RNS minta kezelése és előkészítése során bekövetkező szennyeződéséhez kapcsolódnak.

## 10. Problémamegoldás

Probléma	Lehetséges ok	Megoldási javaslat
Gyenge, vagy hiányzó a pozitív kontroll esetén	Próba degradáció	Használjon új próba aliquotot, vagy ismétlje meg a tesztet egy új, másik LOT-tal rendelkező termékből.
Nagy mértékű fluoreszcencia intenzitásbeli inkonzisztencia az azonos minták esetében	Pontatlan pipettázás	Használjon kalibrált pipettákat, bizonyosodjon meg arról, hogy minden wellbe/csőbe azonos reagens mennyiség jutott.
Fluoreszcencia detektálás a negatív kontrollban	Kontamináció, korábbi lépésből átvitt szennyeződés	Minden minta után cseréjen pipetta hegyet. Vigyázzon a minták, negatív, illetve pozitív kontroll kiosztásánál.
	Amplifikációs master mix kontaminációja	Használja az amplifikációs master mix új aliquotját.
	Az izoláló/előkészítő terület kontaminációja	Használjon fertőtlenítő szert a felületek tisztítására fertőtlenítésére.
Fluoreszcens jel hiánya mind a minták, mind pedig a pozitív kontroll esetében.	Degradált próba	Használjon új aliquotot a próbából.
	Hibás PCR beállítás	Ellenőrizze a helyes beállításokat a qPCR készüléken.
	Rosszul előkészített master mix, vélhetően kihagyott reagens	Ellenőrizze a komponenseket és ismétlje meg a PCR master mix előkészítését.
Álnegatív eredmény	RT-PCR inhibitorok jelenléte	Használat előtt validálja azRNS izoláló terméket. Használja az IFU-ban listázott gyártók Vírus Transzfer Médiumát.
	Nem megfelelő mintavételezés	Kövesse a validált mintavételezési módszert.
	A használati útmutató utasításainak be nem tartása	Olvassa el a Használati Útmutatót a vizsgálat elvégzése előtt. A leírtaktól való eltérés befolyásolhatja a termék optimális működését.
	Engedély nélküli reagensek használata	Ne cserélje ki, vagy keverje össze az AzureSeq készlet reagenseket más gyártók reagenseivel.
Álpozitív eredmény	Minták közti kontamináció, mintacsere	Fordítson kiemelkedő figyelmet a betegek mintakezelésére, használjon egyértelmű és validált nyomkövetési folyamatokat a laboratóriumban.

## 11. Minőség ellenőrzés

Javasolt a teljes procedúra (direkt, vagy RNS izolálást tartalmazó) és az amplifikáció negatív, illetve pozitív kontrollokkal, vagy kalibrált referencia felhasználásával történő validálása.

## 12. Teljesítmény jellemzők

### 12.1. Analitikai szenzitivitás – Detekciós limit (LoD) tanulmányok

A LoD tanulmány meghatározza azt a legalacsonyabb SARS-CoV-2 koncentrációt (kópia (cp) / reakció), ami az N1 és N2 vizsgálatok legalább 95%-ában detektálható az AzureSeq – 200 CE termékkel. A vizsgálatok több qPCR készüléken kerültek kivitelezésre.

#### 12.1.1. BioRad CFX96 Touch

A BioRad CFX96 Touch valós idejű detektáló rendszer esetén AzureSeq – 200 CE reagenseinek genomiális RNS-re vonatkozó LoD értéke az N1 target esetén 5 kópia/ 20 µL reakció (azaz 0,25 kópia/ µL), az N2 target esetén pedig 10 kópia / 20 µL reakció (vagy 0,5 kópia/ µL). A genomi RNS-t közvetlenül a PCR reakcióhoz adták, majd a BioRad CFX96 Touch valós idejű detektáló rendszeren elemezték.

<i>Genomiális RNS vizsgálat BioRAD CFX96 Touch Real-Time Detection System készüléken</i>						
Célgén	N1			N2		
RNS konc. (copies/µL)	0.05 (.2x)	0.25 (1x)	0.5 (2x)	0.05 (.1x)	0.5 (1x)	1 (2x)
Pozitív/Összes	10/20	20/20	20/20	1/20	20/20	20/20
Átlag Ct (pozitív esetek)	N/A	37.05	36.25	N/A	37.01	35.91
Ct szórás	N/A	0.68	0.55	N/A	0.5	0.33

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

Az Applied Biosystems QuantStudio 3 valós-idejű PCR készülék esetén AzureSeq – 200 CE reagenseinek genomiális RNS-re vonatkozó LoD értéke az N1 az N2 targetek esetén egyaránt 10 kópia/ 20 µL reakció (azaz 0,5 kópia/ µL). A genomi RNS-t közvetlenül a PCR reakcióhoz adták, majd a Quant-Studio valós-idejű PCR készülékkel elemezték.

A QuantStudio 3, 5 és 7 Pro platformokat összehasonlító konkordancia vizsgálatot 20 korábban SARS-CoV-2 pozitívnak (n = 11) és negatívnak (n = 9) azonosított klinikai minta felhasználásával végezték el. Az N1, N2 és az RNaseP átlagos Ct-értékét a pozitív minták esetében minden készüléken, míg az RNaseP átlagos Ct-értékét az összes negatív minta esetében kiszámítottuk. Ezen adatok megmutatták, hogy a három vizsgált platformokon a várható klinikai eredményeket tekintve nincs eltérés.

<i>Genomiális RNS a ThermoFisher QuantStudio 3 Real-Time PCR System készüléken</i>								
Célgén	N1				N2			
RNS konc. (copies/ $\mu$ L)	0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2
Pozitív/Összes	16/20	20/20	20/20	20/20	15/20	19/20	20/20	20/20
Átlag Ct (pozitív esetek)	32.04	31.12	30.45	29.04	38.67	37.02	36.47	34.35
Ct szórás	7.89	3.58	4.10	4.09	2.57	4.78	2.61	3.14

### 12.1.3. Roche LightCycler® 480 System

Megállapítást nyert, hogy a valós idejű PCR-rendszer RNS koncentrációja 10 kópia / 20  $\mu$ L reakció (azaz 0,5 kópia /  $\mu$ L) mind az N1, mind az N2 célpontok esetében. A genomi RNS-t közvetlenül a PCR reakciókba adták, majd a Quant-Studio Real-Time PCR rendszeren elemezték.

<i>Genomiális RNS a Roche LightCycler® 480 System készüléken</i>							
Célgén	N1			N2			
RNS konc. (copies/ $\mu$ L)	0,5	1	2	0,5	1	2	
Pozitív/Összes	22/23	23/23	23/23	23/23	23/23	23/23	
Átlag Ct (pozitív esetek)	37,63	36,76	35,78	36,37	35,55	34,61	
Ct szórás	0,91	0,57	0,20	1,80	0,47	0,44	

## 12.2. Inkluzivitás teszt - analitikai specificitás

Az AzureSeq – 200 CE olyan CDC által tervezett N1 és N2 SARS-CoV-2 markerekhez használt primert / próbát alkalmaz, melyeken *in-Silico* elemzést végeztek a SARSCoV-2 ismert szekvenciáival. Az elemzés adatai az FDA EUA EUA200001 „CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) valós idejű RT-PCR diagnosztikai paneljén érhetőek el.

### Eredmények - A primer és próba szekvenciák *in silico* analízise

A CDC 2019 nCoV Real-Time RT-PCR diagnosztikai panel oligonukleotid primer és próba szekvenciáit összehasonlították 31 623 a Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID, <https://www.gisaid.org>) adatbázisban 2020. június 20 óta elérhető szekvenciával. A cél a 2019-CoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel megjósolt inkluzivitásának bemutatása volt. Az primer / próba régióinak 0,1% -nál nagyobb frekvenciájú nukleotid-eltérései megtalálhatók alább. Leszámítva az N1 próba harmadik pozíciójában > 1%-ban (2,00%) előforduló nukleotid-eltérés, az összes gyakorisága <1% volt, jelezve, hogy az eltérések előfordulása sporadikus volt. Az N1 próba esetén csak egy szekvenciában (0,0032%) figyeltek meg két nukleotid eltérést. Az N1 reverz primer esetén egy másik izolátumból (0,0032%) származó szekvencia mutatott két nukleotid eltérést. Az N2 primer, illetve próba régió esetében nem találtak olyan szekvenciákat, amelyeknél egynél több eltérés figyelhető meg. A próbák és primerek tervezésének köszönhetően alacsony az eltéréseknek azon kockázata, miszerint a reaktivitás jelentős mértékű csökkenése álnegatív eredményhez vezet. A 60°C fölötti olvadási, illetve az 55 °C anneálási hőmérsékletnek köszönhetően két nukleotid eltérést jól tolerálnak.

7. Táblázat: A CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel *in silico* inkluzivitás vizsgálata a GISAID-ban 2020. június 20-a óta rendelkezésre álló 31.623 genomszekvencia között.

Primer/Próba	N1 próba	N1 reverz		N2 próba
Pozíció (5'>3')	3	15	21	13
Nukleotid eltérés	C>T	G>T	T>C	C>T
Eltérések száma	632	34	71	46
Eltérések gyakorisága (%)	2.00	0.11	0.22	0.15

## 12.3. Keresztreaktivitás - analitikai specificitás

Az AzureSeq – 200 CE olyan CDC által tervezett N1 és N2 SARS-CoV-2 markerekhez használt primert / próbát alkalmaz, melyeken *in silico* kereszt-reaktivitás tesztet végeztek. A CDC laboratóriumi tesztet is végzett kereszt-reaktivásra az FDA által ajánlott organizmus felhasználásával. Ezen elemzések adatai az FDA EUA EUA200001 „CDC 2019-újszerű koronavírus (2019- nCoV) valós idejű RT-PCR diagnosztikai paneljén” érhetőek el.



## Eredmények Specificitás/Exkluzivitás teszt: in silico elemzés

A 2019-nCoV rRT-PCR panel primereit és próbáit BLAST algoritmust alkalmazva nyilvánosan elérhető szekvenciákat hasonlították össze. Az alábbi adatbáziskeresési paramétereket használták:

1. A nukleotidok válogatásához a GenBank, EMBL, DDBJ, PDB, RefSeq szekvenciáit használták. Kizárták az EST, STS, GSS, WGS, TSA, szabadalmi, fázis 0, 1 és 2 HTGS, és 100 MB-nál hosszabb szekvenciákat.
2. Az adatbázis nem tartalmaz redundáns adatokat. Az azonos szekvenciákat egy egységbe osztották, megőrizve az egyes egységek hozzáférési adatait, címét, GI, rendszertani információit.
3. Az adatbázis 2019. október 3-én frissült.
4. A keresési paraméterek automatikusan rövid szekvenciákat keresnek, az elvárt határérték 1000.
5. Az egyezés pontszáma 1, míg az eltérése -3.
6. Az illesztés során nukleotidok közötti rés generálásáért 5, kiterjesztéséért pedig 2 büntetőpont kalkulálódott.

### 2019-nCoV\_N1 teszt:

Az N1 2019-nCoV rRT-PCR teszt próba szekvenciája nagyfokú homológiát mutatott a SARS koronavírus és a denevérek SARS-szerű koronavírus genomjával, míg a forward és reverz primerek nem. A primerek és a próbák kombinálása nem mutat szignifikáns homológiát a humán genommal, más koronavírusokkal, vagy humán mikroflórával, így nem vezet álpozitív rRT-PCR eredményekhez.

### 2019-nCoV\_N2 teszt:

Az N2 2019-nCoV rRT-PCR teszt forward primer szekvenciája nagyfokú homológiát mutatott a denevérek SARS-szerű koronavírus genomjával. A reverz primerek és a próbák esetében nem volt megfigyelhető homológia sem humán genommal, sem pedig egyéb koronavírusokkal, vagy humán mikroflórával. A primerek és a próbák kombinálása nem vezet álpozitív rRT-PCR eredményekhez.

Összegezvén, a 2019-nCoV specifikus detekciójához tervezett 2019-nCoV rRT-PCR N1 és N2 tesztek kombinálva nem mutattak homológiát humán genommal, egyéb koronavírusokkal, vagy humán mikroflórával, ezáltal nem vezetnek álpozitív rRT-PCR eredményhez.

A 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel analitikai specificitását és exkluzivitását számos organizmust tesztelésével is alátámasztották. A vizsgálatokat a QIAGEN EZ1 Advanced XL készülékkel és EZ1 DSP Virus Kit izoláló rendszerrel kivont nukleinsavakon végezték. A nukleinsavat magas titerű (jellemzően  $\geq 105$  PFU/mL, vagy  $\geq 106$  CFU/mL) preparátumokból vonták ki. A vizsgálatot ThermoFisher Scientific TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG felhasználásával, Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx Real-Time PCR készüléken végezték. Az adatok a CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel alkalmazásával minden organizmus esetében a várt eredményeket mutatják.

8. Táblázat: A CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel specificitása és exkluzivitása

Vírus	Törzs	Forrás	2019-nCoV N1	2019-nCoV N1	Eredmény
Humán koronavírus	229E	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Humán koronavírus	OC43	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Humán koronavírus	NL63	Klinikai minta	0/3	0/3	negatív
Humán koronavírus	HKU1	Klinikai minta	0/3	0/3	negatív
MERS-koronavírus	-	Izolátum	0/3	0/3	negatív
SARS-koronavírus	-	Izolátum	0/3	0/3	negatív
bocavírus	-	Klinikai minta	0/3	0/3	negatív
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Izolátum	0/3	0/3	negatív
<i>Streptococcus</i>	-	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Influenza A (H1N1)	-	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Influenza A (H3N2)	-	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Influenza B	-	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Humán adenovírus (1-es típus)	Ad71	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Humán metapneumovírus	-	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Respiratory Syncytial Virus	Long A	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Rhinovírus	-	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Parainfluenza 1	C35	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Parainfluenza 2	Greer	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Parainfluenza 3	C-43	Izolátum	0/3	0/3	negatív
Parainfluenza 4	M-25	Izolátum	0/3	0/3	negatív

## 12.4. Mikrobiológiai interferencia vizsgálatok

Mikrobiológiai interferencia-vizsgálatokra nincs szükség, mert a CDC (FDA EUA EUA200001 „CDC 2019-Novel Coronavirus (2019- nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostics Panel”) in-silico elemzése nem felelt meg azoknak a kritériumoknak, amelyek ezen tanulmányok elvégzését igényelnék.

## 12.5. Robusztusság teszt

A termék ekvivalenciájának vizsgálata történt meg különböző enzim master mixekkel.

A genomiális RNS ötven (50) példányát 20 µL-es reakciókba osztották a BioRad CFX96 Touch valós idejű detektáló rendszeren. Minden master mix-szel 12 pozitív mintát teszteltek.

Tesztelt enzim master mix-ek:

- Thermo Fisher TaqPath 1-Step RT-qPCR System
- Promega GoTaq Probe-1 Step RT-qPCR System
- AzureSeq-200 CE

Reagens összehasonlítás: PCR reakcióba spikeolt genomiális RNS vizsgálata BioRad készüléken						
Célgén	N1			N2		
Master Mix	AzureSeq-200 CE	Thermo Fisher TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	Promega GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System	AzureSeq-200 CE	Thermo Fisher TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	Promega GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System
Pozitív/ Összes	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
Átlag Ct érték	34.78	33.12	33.97	35.89	35.38	35.87
Szórás - Ct	0.31	0.24	0.20	0.27	0.25	0.16

## 12.6. Megismételhetőség és reprodukálhatóság

Pozitív és negatív kontroll PCR-reakciókhoz adásával – követve a Használati Útmutató leírását - pozitív és negatív mintákat állítottunk elő. A pozitív és negatív minta 5-5 replikátumát dolgoztuk fel QuantStudio 3 (Applied Biosystems) valós-idejű PCR készüléken. Két operátor által végzett teszttel megismételhetőségi és reprodukálhatósági becsléseket állítottunk fel a futáson belüli, operátorok közötti variabilitás szempontjából.

	Operátor 1 - eredmények				Operátor 2 - eredmények				Operátorok közti egyezés (%)
	N1	N2	RNáz P	Replikátumok közti egyezés (%)	N1	N2	RNáz P	Replikátumok közti egyezés (%)	
Pozitív minták	5/5	5/5	5/5	100	5/5	5/5	5/5	100	100
Negatív minták	5/5	5/5	5/5	100	5/5	5/5	5/5	100	100






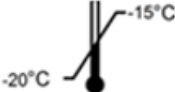



## 12.7. Klinikai teljesítmény

A klinikai oropharyngealis (OP) mintákat - amelyeket korábban a BioRad CFX96 pozitívnak (11 minta) vagy negatívnak (6 minta) nyilvánított - a KingFisher Flex rendszeren izoláltuk. Az eluált mintából öt (5) mikrolitert adunk az AzureSeq-200 CE reagensekhez, majd amplifikáljuk és detektáljuk a BioRad CFX96 rendszerrel. Valamennyi pozitív és negatív minta 100%-os egyezést mutatott a korábbi karakterizációval.

A klinikai oropharyngealis (OP) mintákat (30 pozitív, 30 negatív) a Clinichem Ltd. (Magyarország) által forgalmazott Vírus Transzfer Médiumban vették fel, majd hőkezelés után dolgozták fel. Az hőkezelt mintából öt (5) mikrolitert adunk az AzureSeq-200 CE reagensekhez, majd amplifikáljuk és detektáljuk a Roche LightCycler® 480 System készülékkel. Valamennyi pozitív és negatív minta 100%-os egyezést mutatott a korábbi karakterizációval.

Platform	Minta típusa	Protokol	AzureSeq-200 CE eredmények		Referencia eredmények		Konkordancia (%)
			Pozitív	Negatív	Pozitív	Negatív	
BioRAD CFX96	Klinikai oropharyngealis (OP) minta	RNS izolálással	11	6	11	6	100
Roche LightCycler® 480	Klinikai nasopharyngealis (NP) minta	RNS izolálás nélkül	30	30	30	30	100

## 13. Címkén megjelenő szimbólumok

	LOT szám / gyártási azonosító
	Referencia / katalógus szám
 www.omixon.com	Olvassa el a használati útmutatót
	A termék a megjelölt mintaszámhoz megfelelő reagenst tartalmaz
	Gyártó, az itt megjelölt dátum a gyártás idejére utal
	Javasolt tárolási hőmérséklet
	Lejáratási idő
	In Vitro Diagnosztikai Orvosi Eszköz
	Conformité Européenne

## 14. Kapcsolat

A használati útmutatóval kapcsolatos kérdésekkel kérjük forduljon az alábbi kontaktokhoz:

**E-mail**

[azureseq.support@omixon.com](mailto:azureseq.support@omixon.com)

**Telefon:**

+36-70-672-7551