



# AZURESEQ CE qPCR KIT SARS- CoV-2 FOR 200 REACTIONS

## HASZNÁLATI ÚTMUTATÓ

In Vitro Diagnosztikai alkalmazásra

PROTOKOLL VERZIÓ V1.0

DOKUMENTUM VERZIÓ 02

2020/10/22

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. MINTAVÉTEL, SZÁLLÍTÁS ÉS TÁROLÁS .....</b>                                   | <b>6</b>  |
| 5.1 MINTAVÉTEL .....   | 6         |
| 5.2 SZÁLLÍTÁS .....  | 6         |
| 5.3 MINTAKEZELÉS .....   | 7         |
| 5.4 TÁROLÁS .....  | 7         |
| <b>6. SZÜKSÉGES, DE NEM BIZTOSÍTOTT ANYAGOK ÉS ESZKÖZÖK .....</b>                  | <b>8</b>  |
| 6.1. MŰSZEREK .....  | 8         |
| 6.2. REAGENSEK .....   | 8         |
| 6.3. FOGYÓESZKÖZÖK .....   | 8         |
| <b>7. FIGYELMEZTETÉSEK ÉS ÓVINTÉZKEDÉSEK .....</b>                                 | <b>9</b>  |
| <b>8. PROCEDÚRA .....</b>  | <b>10</b> |
| 8.1. INSTRUKCIÓK A TESZT ÖSSZEÁLLÍTÁSÁHOZ .....                                    | 10        |
| 8.1.1. <i>Munkafolyamat</i> .....  | 10        |
| 8.2 QPCR KÉSZÜLÉK BEÁLLÍTÁSA .....   | 12        |
| 8.2.1 <i>QuantStudio 3, 5, 7 Pro</i> .....   | 12        |
| 8.2.2 <i>Roche LightCycler 480</i> .....   | 14        |
| 8.2.3 <i>BioRAD CFX96 Touch</i> .....  | 14        |
| <b>9. EREDMÉNYEK INTERPRETÁCIÓJA .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>10. AZ TESZT LIMITÁCIÓI .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>11. PROBLÉMAMEGOLDÁS .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>12. MINŐSÉG ELLENŐRZÉS .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>13. TELJESÍTMÉNY JELLEMZŐK .....</b>  | <b>19</b> |
| 13.1. ANALÍTIKAI SZENZITIVITÁS – DETEKCIÓS LIMIT (LOD) TANULMÁNYOK .....           | 19        |
| 13.1.1. <i>BioRad CFX96 Touch</i> .....  | 19        |
| 13.1.2. <i>Applied Biosystems QuantStudio 3/5/7 Pro Real-time PCR System</i> ..... | 19        |
| 13.1.3. <i>Roche LightCycler® 480 System</i> .....                                 | 20        |
| 13.2. INKLUZIVITÁS TESZT - ANALITIKAI SPECIFITÁS .....                             | 21        |
| 13.3. KERESZTREAKTIVITÁS - ANALITIKAI SPECIFITÁS .....                             | 21        |
| 13.4. MIKROBIOLÓGIAI INTERFERENCIA VIZSGÁLATOK .....                               | 23        |
| 13.5. ROBUSTUSSÁG TESZT .....  | 23        |
| 13.6. MEGISMÉTELHETŐSÉG ÉS REPRODUKÁLHATÓSÁG .....                                 | 24        |
| 13.7. KLINIKAI TELJESÍTMÉNY .....  | 25        |
| <b>14. REFERENCIÁK .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>15. CÍMKÉN MEGJELENŐ SZIMBÓLUMOK .....</b>                                      | <b>27</b> |
| <b>16. KAPCSOLAT .....</b>   | <b>27</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                | v2                | 2020/10/22 | Noémi Petrovicz | Mintavétel, kezelés és szállítás (5. fejezet), illetve qPCR beállítás (8.2 fejezet) hozzáadva, gépelési hibák javítása | 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 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   | 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 lejáratási idő 12 hónap. Ne használja a terméket a határidő lejárta után. Ne használjon sérült terméket.

A termék tartalmának ismételt fagyasztás/olvasztása elkerülendő, mert az a reagensek degradációjához, ezáltal a szenzitivitás csökkenéséhez vezethet.

A használt reagenseket és hulladékot a helyi szabályozásoknak megfelelően kezelje.

## 5. Mintavétel, szállítás és tárolás

A nem megfelelő mintavétel, szállítás és tárolás növelheti az álnegatív eredmények valószínűségét.

### 5.1 Mintavétel

Az alábbi szekció a CDC weboldalán található 'Interim Guidelines for Collecting, Handling and Testing Clinical Specimens from Patients Under Investigation (OUIs) for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV)' ajánlásokat tartalmazza.

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

Csak műanyag szárú műszálas mintavételi pálcát használjon. Ne használjon kalcium-alginátos, vagy fanyelű eszközt, mivel ezek olyan anyagokat tartalmazhatnak, amelyek inaktíválják a vírust és gátolják a PCR-tesztet.

Kövesse a mintavételi eszközök gyártójának utasításait a megfelelő mintavételhez.

#### **Oropharyngealis mintavétel**

Steril mintavételi pálcával készítsen törletet a hátsó garatról (elkerülve a nyelvet). Helyezze a törletet azonnal címkézett, Vírus Transzfer Médiumot tartalmazó steril csövekbe. Törje el a pálcákat a jelzésnél, vagy a törlet közelében, vagy vágja le steril ollóval. A mintát jégen tartva, azonnal szállítsa.

#### **Nasopharyngealis mintavétel**

Helyezzen egy steril mintavételi pálcát az orrlyukba a szájpaddal párhuzamosan. A pálcával olyan mélységet kell elérni, ami megegyezik az orrlyukak és a fül külső nyílása közötti távolsággal. Hagyja bent a pálcát néhány másodpercig, hogy felszívja a váladékot. Lassan forgatva távolítsa el a pálcát. Helyezze a törletet azonnal címkézett, Vírus Transzfer Médiumot tartalmazó steril csövekbe. Törje el a pálcákat a jelzésnél, vagy a törlet közelében, vagy vágja le steril ollóval. A mintát jégen tartva, azonnal szállítsa.

### 5.2 Szállítás

A mintákat hűtött (jégakku/szárzajég) állapotban kell szállítani, biztonságosan lezárva és kezelve. A klinikai minták a helyi előírásokat és a SARS-CoV-2 biológiai biztonsági előírásait betartva szállítandók.

## 5.3 Mintakezelés

A potenciálisan fertőző minták kezelése során a laboratóriumi dolgozóknak megfelelő egyéni védőfelszerelést kell viselniük, ideértve az eldobható kesztyűt, a laboratóriumi köpenyt / ruhát és a szemvédelmet.

A 2019-es koronavírusos klinikai minták kezelésével kapcsolatos konkrét utasítások megtalálhatók a CDC fent említett weboldalán is.

## 5.4 Tárolás

A minták mintavételtől számítva 48 óráig tárolhatók 2-8 °C-on. 2 napnál hosszabb tárolás esetén a mintákat -70 °C-on kell tartani.

Amennyiben a mintát 48 óránál tovább tárolják, a munkafolyamat elvégzéséhez az RNS validált RNS-izolációs rendszerrel történő kivonására van szükség.

A munkafolyamat direkt módszerrel történő megközelítése alkalmazható, amennyiben a mintát nem fagyasztják és a mintavételtől számított 48 óránál rövidebb ideig tárolják.

Kerülni kell a minta ismételt fagyasztását/felolvasztását. Ha egy mintát újratestelés céljából megtartanak, javasolt azok fagyasztás előtti aliquotolása.

A minta típusától és a felhasznált Transzpot Médiumtól függően speciális tárolási módra, illetve - az RNS izolálásához - a minta előkezelésére is szükség lehet. Kérjük, kövesse a gyártó utasításait.

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

### 6.1. 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

### 6.2. Reagensek

- Virális/teljes RNS extrakciós rendszer
- Vírus Transzport Médium (Clinichem, Copan, Puritan, CDC VTM, mwe Medical Wire)
- CoVi Negatív Kontroll (Cat# OA-CVNC-150)
- CoVi Pozitív Kontroll (Cat# OA-CVPC-150)

### 6.3. 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



## 7. 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 elkezdje 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 ellátva).
- Ne dohányozzon, ne igyon, ne egyen és ne használjon kozmetikumokat olyan területeken, ahol a mintákat vagy a termék komponenseit kezelik.

## 8. Procedúra

Az AzureSeq-200 CE termék tartalmaz egy kontroll vizsgálatot, amely az RNázP 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, katalóguszszám Id. 5. szekció), egyéb esetben a saját, laboratóriumban megtalálható kontrollok használhatók.

### 8.1. 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.

#### 8.1.1. 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 µL-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 ~1500 x rpm 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 µL** 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:

| 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 másodpercig 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:

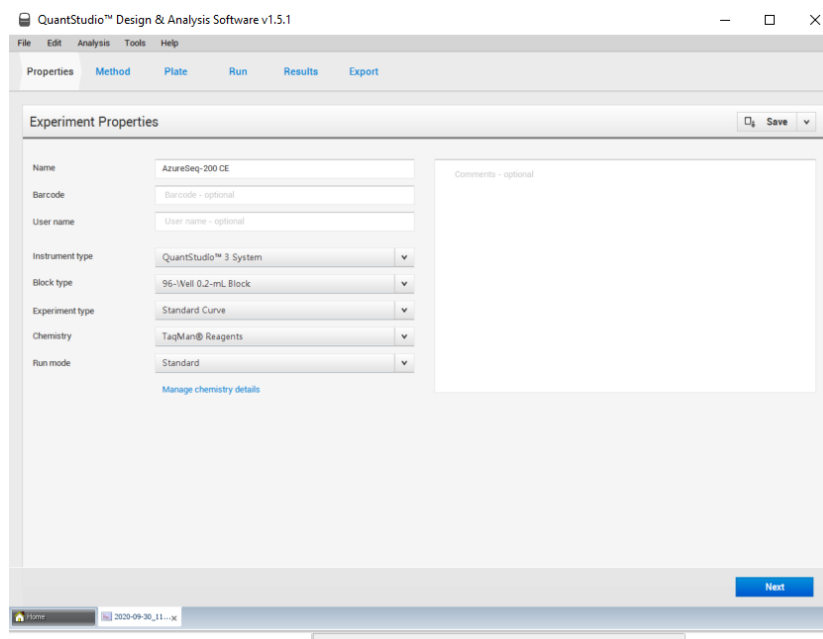
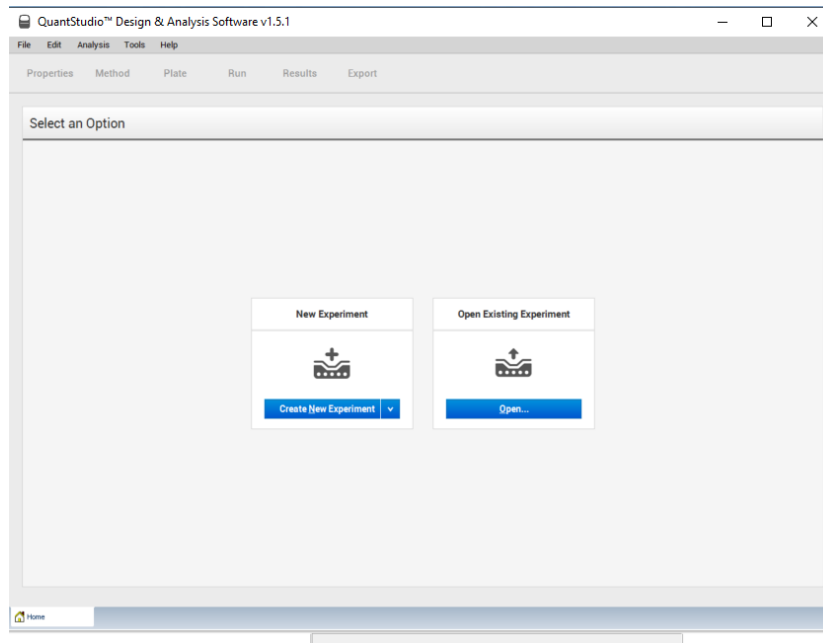
| Folyamatrész megnevezése | Stádium | Ciklusszám | Hőmérséklet ( $^{\circ}$ C) | Time         |
|--------------------------|---------|------------|-----------------------------|--------------|
| RT inkubáció             | 1       | 1          | 50                          | 15 perc      |
| Enzim aktiváció          | 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.

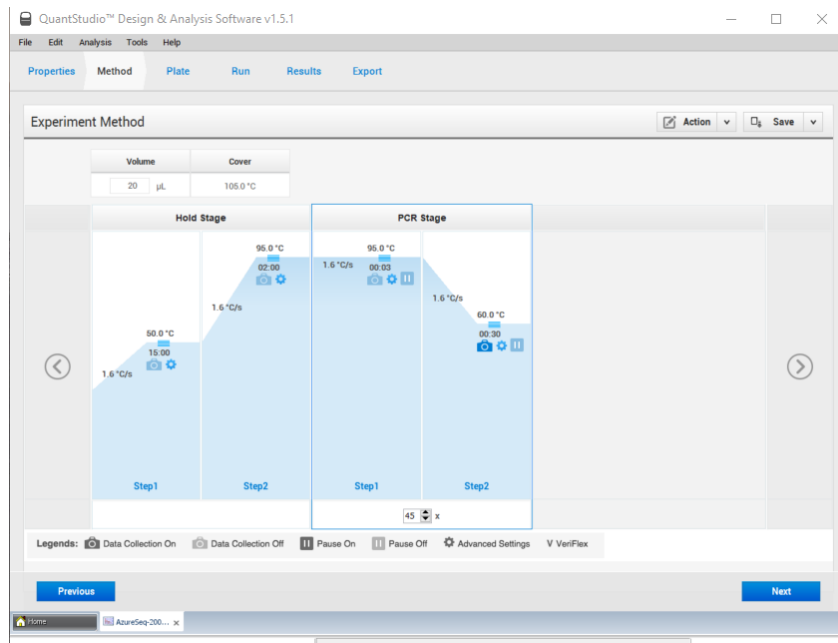
## 8.2 qPCR készülék beállítása

### 8.2.1 QuantStudio 3, 5, 7 Pro

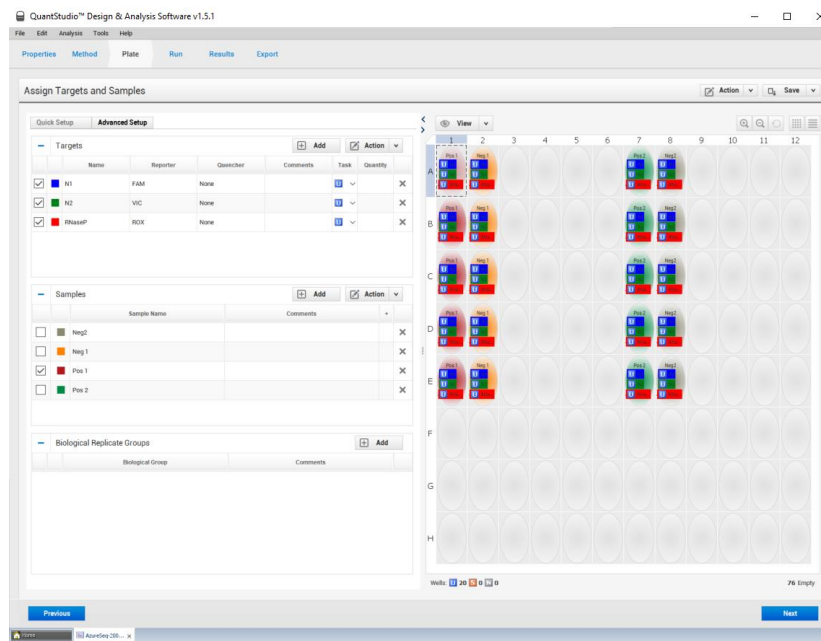
1 – Hozzon létre egy új kísérletet a 'Create New Experiment' gombra kattintva, majd állítsa be a készülék, blokk és a kísérlet típusát, a teszt során használt kémiát, illetve a futás módját az alábbi képek alapján.



2 – Állítsa be a PCR program paramétereit a 8.1.1. szekcióban leírtak alapján.



3 – Állítsa be a célgéneket és a mintákat a 'Plate' menüben, kapcsolja hozzájuk a használni kívánt csatornákat. Állítsa 'None'-ra a Quenchert minden csatorna esetében.



4 – Exportálja a protokolt egy USB eszközre.

5 – Töltse be a protokolt az USB-ről a qPCR készüléken, helyezze be a plate-et, majd indítsa el a futást.

## 8.2.2 Roche LightCycler 480

Kérjük olvassa el a készülék használati utasítását a műszerrel kapcsolatos egyéb információkért.

- Hozzon létre új formátumot ('Detection Format') a célgénnek (N1, N2, RNáz P) és csatornák beállításához (FAM, HEX, ROX – vagy az előbbiekkal ekvivalens csatornák).
- Az új formátum alkalmazásához indítsa újra a szoftvert.
- Válassza ki a vizsgálni kívánt plate fajtáját (színét), majd hozzon létre egy új kísérletet ('New Experiment')
- Válassza ki a listából a korábban létrehozott detektálási beállítást ('Detection Format')
- Állítsa be a blokk típusát (96) és a reakció térfogatát (20 µL).
- Állítsa be a PCR program paramétereit a 8.1.1. szekcióban leírtak alapján
- Az analízis módját állítsa 'None'-ra az RT inkubáció és Enzim aktiváció, 'Quantification'-re pedig az Amplifikáció esetén.
- A 'Ramp' értékét állítsa be 4.4-re az RT inkubáció, Enzim aktiváció, és a Denaturáció, 2.2-re pedig az Anneláció/Elongáció esetén.
- Helyezze be a plate-et és indítsa el a futást.

## 8.2.3 BioRAD CFX96 Touch

Kérjük olvassa el a készülék használati utasítását a műszerrel kapcsolatos egyéb információkért.

- Indítsa el a CFX96 készülékhez kapcsolódó CFX Manager szoftvert.
- Hozzon létre egy új protokolt a 'User-defined' futás típust kiválasztva.
- A 'Protocol' menüben válassza ki 'Edit Selected' opciót a PCR program szerkesztéséhez, majd állítsa be a paramétereiket a 8.1.1. szekcióban leírtak alapján.
- A 'Plate' menüben válassza ki 'Edit Selected' a minták és csatornák beállításaihoz.
- A 'Select Fluorophores' beállításban válassza ki a használni kívánt csatornákat (FAM, HEX, ROX – vagy az előbbiekkal ekvivalens csatornák).
- Specifikálja a pozitív kontrollt tartalmazó well-t a minta típusának 'Positive Control' beállításával, majd állítsa be a csatornákat (N1 célgén - FAM, N2 célgén - HEX, RNáz P - ROX).
- Specifikálja a negatív kontrollt tartalmazó well-t a minta típusának 'Negative Control' beállításával, majd állítsa be a csatornákat (N1 célgén - FAM, N2 célgén - HEX, RNáz P - ROX).
- A klinikai mintákat tartalmazó well-ek minta típusát állítsa ismeretlenre ('Unknown'), majd állítsa be a csatornákat (N1 célgén - FAM, N2 célgén - HEX, RNáz P - ROX).
- A beállítások menüpontban állítsa be a plate típusát.
- Lépjen tovább a 'Start Run'-ra kattintva, majd a készülék kiválasztása ('Block Name') után helyezze be a plate-et és indítsa el a futást.

## 9. Eredmények interpretációja

A betegek eredményének értelmezése előtt szükséges a teszt kontrollok vizsgálata. Érvénytelen kontrollok esetén a betegek eredménye is értelmezhetetlen. Rögzítse a FAM (N1 marker), HEX (N2 marker) és ROX (RNázP marker) (vagy ezzel egyenértékű) csatornákon mért fluoreszcencia értékét az annexációs/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 átlépi a küszöbértéket ( $< 40$  Ct). A 2019-nCoV markerek eredményei a pozitív, vagy negatív RNáz P-től függetlenül továbbra is érvényesnek tekinthetők.
- 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 (tehát  $Ct > 40$ ), 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 (tehát  $Ct < 40$ ) 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.



## 10. 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 direkt 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, mwe Medical Wire. 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.

## 11. Problémamegoldás

| Probléma  | Lehetséges ok  | Megoldási javaslat   |
|---|--|--|
| Gyenge, vagy hiányzó fluoreszcens jel a pozitív kontroll esetén                     | Próba degradáció   | Használjon új próba aliquotot, vagy ismétlje meg a tesztet egy új, másik LOT-tal rendelkező termékből.                                   |
| Nagymértékű 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 az RNS 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 reagensok használata                        | Ne cserélje ki, vagy keverje össze az AzureSeq készlet reagenseket más gyártók reagensivel.  |
| Álpozitív eredmény  | Minták közti kontamináció, mintacsere                        | Fordítson kiemelkedő figyelmet a betegek mintakezelésére, használjon egyértelmű és validált nyomkövetési folyamatokat a laboratóriumban. |

## 12. Minőség ellenőrzés

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

## 13. Teljesítmény jellemzők

### 13.1. 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.

#### 13.1.1. 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   |

#### 13.1.2. 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  |

### 13.1.3. 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 Roche LightCycler® 480 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  |  |

## 13.2. 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 annealási hőmérsékletnek köszönhetően két nukleotid eltérést jól tolerálnak.

*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 |

## 13.3. 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.

### 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  |

## 13.4. 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.

## 13.5. 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/<br>Összes  | 12/12           | 12/12   | 12/12                                     | 12/12           | 12/12   | 12/12                                     |
| Átlag Ct<br>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                                      |

### 13.6. 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                          |



## 13.7. 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              |

## 14. Referenciák

- 8/2003. (III.13.) ESzCsM rendelet az in-vitro diagnosztikai orvostechikai eszközökről
- 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. Címkén megjelenő szimbólumok

|   |  |
|---|--|
|                    | LOT szám / gyártási azonosító                                  |
|                    | Referencia / katalógus szám                                    |
| <br>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  |

## 16. 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

### Gyártói információk:

Omixon Biocomputing Kft.

Fehérvári út 50-52/6

Budapest

1117

Magyarország