



# AZURESEQ - 200 CE

## INSTRUCȚIUNI DE UTILIZARE

Pentru utilizare in vitro

VERSIUNEA PROTOCOLULUI V1.0  
VERSIUNEA DOCUMENTULUI 02  
22/10/2020

CE



## Cuprins

<b>1. Domeniul de utilizare .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Principiul metodei.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Conținutul kitului .....</b>	<b>6</b>
<b>4. Transport și depozitare.....</b>	<b>6</b>
<b>5. Recoltarea, transportul și stocarea specimenelor .....</b>	<b>6</b>
5.1. Recoltarea.....	7
5.2. Transportul.....	7
5.3. Manipularea .....	8
5.4. Stocarea .....	8
<b>6. Materiale și echipamente necesare, dar nefurnizate .....</b>	<b>8</b>
6.1.Echipament.....	8
6.2.Reactivi .....	9
6.3.Materiale .....	9
<b>7.Atenționări și precauții.....</b>	<b>10</b>
<b>8.Procedură .....</b>	<b>11</b>
8.1.Instrucțiuni pentru configurarea reacțiilor .....	11
<b>8.2 . Setări qPCR.....</b>	<b>13</b>
<b>8.2.1 QuantStudio 3, 5, 7 Pro .....</b>	<b>13</b>
8.2.2.Roche LightCycler 480 System .....	16
8.2.3.BioRAD CFX96 Touch.....	16
<b>9.Interpretarea rezultatelor .....</b>	<b>18</b>
<b>10.Limitările procedurii .....</b>	<b>20</b>

<b>11.Eliminarea problemelor.....</b>	<b>21</b>
<b>12.Controlul Calității.....</b>	<b>22</b>
<b>13.Indicatori de performanță .....</b>	<b>22</b>
13.1.Sensibilitate analitică - Studii privind limita de detecție (LoD).....	22
13.1.1. BioRad CFX96 Touch.....	22
13.1.2.Applied Biosystems QuantStudio 3/5/7 Pro Real-time PCR System .....	22
13.1.3. Roche LightCycler® 480 System.....	23
13.2. Specificitate analitică – Testare de inclusivitate .....	24
13.3.Specificitate Analitică – Reactivitate încrucișată.....	25
13.4. Studii de Interferență Microbiană .....	28
13.5. Teste de robustețe.....	28
13.6. Repetabilitate și reproductibilitate .....	29
13.7. Performanțe clinice.....	30
<b>14. Bibliografie .....</b>	<b>31</b>

## Istoricul documentelor - Note importante și actualizări

Versiune Protocol	Versiune Document	Data	Autor	Rezumatul modificărilor	Autorizat de
1	v1	01/10/2020	Noémi Petrovicz	Prima versiune	Gergely Tölgyesi
1	v2	22/10/2020	Noémi Petrovicz	Colectarea, manipularea probelor și stocare (secțiunea 5), qPCR. Configurare (secțiunea 8.2) și referințe (secțiunea 14) au a fost adăugat. Tipurile au fost corectat.	Gergely Tögyesi
1	v2	02/06/2021	Czekes Zsolt, Fleșar Andreea	Traducere în limba română	Molnár Szabolcs

## 1. Domeniul de utilizare

Kitul AzureSeq qPCR SARS-CoV-2 pentru 200 de reacții este un test RT-qPCR destinat detectării calitative a acidului nucleic a virusului 2019-nCoV din tampoane nazofaringiene (NP) și orofaringiene (OP) de la persoane cu semne și simptome de infecție cu suspiciune de COVID-19.

Rezultatele sunt pentru identificarea ARN 2019-nCoV. ARN-2019-nCoV este în general detectabil din tampoane nazofaringiene și orofaringiene în timpul fazei acute a infecției. Rezultatele pozitive sunt indicative ale infecției active.

Rezultatele negative nu exclud infecția 2019-nCoV și nu ar trebui să fie folosite ca bază unică pentru deciziile de gestionare a pacienților. Rezultatele negative trebuie combinate cu observații clinice, istoricul pacientului și informații epidemiologice.

Kit-ul AzureSeq CE qPCR SARS-CoV-2 pentru 200 de reacții este destinat utilizării de către personal calificat, din laborator clinic, special instruit în tehnicile PCR în timp real și a procedurilor de diagnostic in vitro.

## 2. Principiul metodei

Testul este un test de reacție în lanță a polimerazei cu transcripție inversă în timp real (rRT-PCR) care este conceput pentru a detecta ARN din două regiuni diferite ale genei nucleocapsidei SARS-CoV-2 în tampoane nazofaringiene (NP) și orofaringiene (OP) de la pacienți cu semne și simptome de infecție suspectate de COVID-19. Setul de primeri și sondă detectează, de asemenea, RNaza P umană (RP) într-o probă clinică ca și control intern.

Secvențele țintă de acid nucleic din genomul SARS-CoV-2 sunt aceleași secvențe utilizate de CDC pentru Panoul de diagnosticare RT-PCR în timp real al Coronavirusului (2019-nCoV) din 2019. Aceste secvențe sunt conținute în 2 regiuni diferite (N1 și N2) ale genei nucleocapsidei virale (N). Acizii nucleici sunt izolați și purificați din tampoane nazofaringiene și orofaringiene utilizând sisteme de extracție a acidului nucleic. Volumul de intrare și eluție al eșantionului depinde de sistem. Probele recoltate în mediu de transport viral specific care au fost supuși unei incubării termice pot fi, de asemenea, utilizate ca elemente de intrare la etapele ulterioare.

Acidul nucleic purificat sau eșantionul extras termic este transcris invers în ADNc prin combinarea acidului nucleic cu master mixul AzureSeq CE qPCR Kit SARS-CoV-2 pentru 200 de reacții (denumit în continuare AzureSeq - 200 CE) care este apoi amplificat în instrumentul real-time PCR. În acest proces, sonda se aliniază la o secvență țintă specifică situată între primerii forward și revers. În timpul fazei de extensie a ciclului PCR, activitatea de nuclează 5'a polimerazei Taq degradează sonda, determinând separarea colorantului raportor de colorantul de stingere, generând un semnal fluorescent. Cu fiecare ciclu, molecule de colorant raportor suplimentare sunt scindate din sondele respective, crescând intensitatea fluorescenței. Intensitatea fluorescenței este monitorizată la fiecare ciclu PCR de instrumentul real-time PCR.

### 3. Conținutul kitului

Cod produs	Denumire produs	Număr tuburi	Volum (^ L)
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. Transport și depozitare

Kitul AzureSeq - 200 CE este livrat pe gheață uscată. Componentele kitului ar trebui să ajungă înghețate. Vă rugăm să contactați [azureseq.support@omixon.com](mailto:azureseq.support@omixon.com) dacă componentele nu sunt înghețate la primire sau sunt compromise în timpul expedierii.

Pentru a preveni degradarea reactivilor, toate componentele trebuie depozitate imediat la - 20 ° C.

Se recomandă să aveți un generator de rezervă pentru congelator, precum și un jurnal de date de temperatură pentru a vă asigura că componentele kitului AzureSeq - 200 CE vor rămâne congelate la -20 ° C dacă lucrați într-o zonă predispusă la întreruperi de curent.

Expiră la 12 luni de la data fabricației. Nu utilizați după data expirării.

Nu utilizați kitul dacă este defect.

Aruncați reactivii neutilizați și deșeurile conform reglementărilor din țară.

### 5. Recoltarea, transportul și stocarea specimenelor

Recoltarea, transportul și stocarea inadecvată sau necorespunzătoare pot mări probabilitatea unui rezultat fals negativ.

## 5.1. Recoltarea

Accesați site-ul CDC pentru a vizualiza ghidul Interim pentru Recoltarea, Manipularea și Testarea Specimenelor Clinice ale Pacienților Sub Observație (PSO) pentru Noul Coronavirus (2019-nCoV).

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

Folosiți doar tampoane din fibră sintetică, cu tijă de plastic. Nu utilizați tampoane cu alginat de calciu sau tijă din lemn, deoarece acestea pot conține substanțe care pot inactiva unele virusuri sau inhiba testarea PCR.

Respectați instrucțiunile producătorilor dispozitivelor de recoltare privind metodele de recoltare corespunzătoare. .

### **Recoltarea orofaringiană**

Utilizând un tampon steril, ștergeți partea posterioară a faringelui, evitând limba. Puneți imediat tamponul în tubul steril etichetat, conținând mediu de transport viral. Rupeți tija aplicatorului cât mai aproape de vârf sau tăiați cu o foarfecă sterilă, pentru a permite strângerea capacului. Transportați proba imediat la rece.

### **Recoltarea nazofaringiană**

Introduceți tamponul în cavitatea nazală (nară) paralel cu palatul (cerul gurii). Tamponul trebuie să ajungă la o adâncime egală cu distanța dintre cavitatea nazală și partea exterioară a deschiderii urechii. Țineți tamponul timp de câteva secunde pentru a absorbi secrețiile. Retrageți ușor tamponul, rotindu-l. Puneți imediat tamponul în tubul steril etichetat, conținând mediu de transport viral. Rupeți tija aplicatorului cât mai aproape de vârf sau tăiați cu o foarfecă sterilă, pentru a permite strângerea capacului. Transportați proba imediat la rece.

## 5.2. Transportul

Toate specițiile trebuie transportate pe gheață/cutie cu ice-gel/gheață carbonică, sigilate și manipulate în siguranță.

Transportul probelor clinice trebuie să respecte reglementările locale. Reglementările locale pentru biosecuritate referitoare la SARS-CoV-2 trebuie respectate.

### 5.3. Manipularea

În timpul manipulării specimenelor potențial infecțioase, personalul de laborator trebuie să poarte echipament adecvat, care include mănuși de unică folosință, halat și ochelari de protecție.

Instrucțiunile specifice privind manipularea specimenelor clinice de coronavirus 2019, pot fi vizualizate pe pagina web a CDC mai sus menționată.

### 5.4. Stocarea

Specimenele pot fi stocate la 2-8<sup>0</sup>C până la 48 de ore de la recoltare. În cazul stocării pentru mai mult de 2 zile, speci­menele trebuie congelate la -70<sup>0</sup>C.

Dacă proba este stocată mai multe de 48 de ore, este necesară extracția de ARN utilizând un sistem de izolare validat.

Dacă proba nu este congelată și a fost stocată pentru mai puțin de 48 de ore, poate fi utilizată o abordare directă de lucru.

Congelarea/decongelarea repetată a specimenului trebuie evitată. Dacă este necesară retestarea, speci­menul trebuie alicotat în tuburi diferite pentru a evita congelarea/decongelarea repetată.

În funcție de tipul de specimen și mediul de transport folosit, pot fi necesare metode speciale de stocare, iar pentru izolarea ARN, pre-tratarea probei. Vă rugăm respectați instrucțiunile furnizate de producător.

## 6. Materiale și echipamente necesare, dar nefurnizate

### 6.1. Echipament

- Thermocycler real-time PCR capabil să detecteze canale FAM, HEX sau ROX (sau echivalent)
- Termobloc (potrivit pentru tuburi de microcentrifugă de 1,5 ml, capabile să se încălzească la 95 ° C)
- micropipete de 100 μL și 1000 μL
- Pipetă multicanal de 10 μL aL și 100 μL
- mixer Vortex
- Centrifugă



## 6.2.Reactivi

Kit de extracție ARN viral / ARN total

- Mediu de transport viral (Clinichem, Copan, Puritan, CDC VTM, mwe Medical Wire)
- Control negativ CoVi (Cat # OA-CVNC-150)
- Control pozitiv CoVi (Cat # OA-CVPC-150)

## 6.3.Materiale

- Plăci optice cu 96 de godeuri sau tuburi optice de 0,2 ml
- Etanșare optică compatibilă cu instrumentul qPCR
- Vârfuri de unică folosință pentru pipete fără DNasă / RNasă cu filtre (10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L și 200  $\mu$ L)
- Tuburi de 1,5 ml fără DNază / RNază
- Mănuși de unică folosință fără pulbere
- Produse de decontaminare de suprafață, cum ar fi „RNase away”
- Material necesar extracției acidului nucleic

## 7. Atenționări și precauții

Bunele practici de laborator sunt esențiale pentru efectuarea corectă a acestui test. Datorită sensibilității ridicate a testului, trebuie să aveți grijă la manipularea probelor și a materialelor în timp ce efectuați testul pentru a menține reactivii și amestecurile de amplificare libere de contaminare.

Utilizatorii trebuie să fie atenți la următoarele:

- Citiți cu atenție Instrucțiunile de utilizare înainte de prelucrarea probelor. Orice abatere de la procedurile scrise aici poate afecta performanța optimă.
- Utilizați dezinfectant pentru a curăța și dezinfecta zona din jurul probei
- Decontaminați și aruncați toate probele, reactivii și alte materiale potențial contaminate în conformitate cu reglementările locale
- Utilizați măsuri de precauție universale atunci când efectuați testul. Manipulați probele ca și cum ar fi capabile să transmită infecția.
- Purtați echipament de protecție individuală pe tot parcursul procedurii de testare.
- Spălați bine mâinile după îndepărtarea mănușilor și aruncați mănușile ca deșeuri periculoase
- Nu reconstituiți sau diluați reactivii în alte volume decât cele descrise în acest prospect. Nu utilizați un volum mai mic de reactivi decât cel specificat în acest prospect. Aceste activități pot duce la erori de performanță.
- Omixon nu poate oferi suport pentru problemele care rezultă din nerespectarea pașilor de protocol descriși în acest prospect .
- Nu utilizați produsul în caz de deteriorare detectabilă a componentelor (flacoane rupte, placă, capace desigilate etc.).
- Nu utilizați reactivi după data de expirare.
- Nu înlocuiți și nu amestecați reactivii kitului AzureSeq - 200 CE cu reactivi de la alți producători.
- Toate instrumentele trebuie întreținute și operate conform instrucțiunilor producătorului.
- Fiecare loc de muncă trebuie să fie echipat cu propriul set de pipete cu volum variabil, materiale și echipamente auxiliare necesare.
- Nu amestecați reactivi din loturi diferite sau din flacoane diferite din același lot.
- Nu fumați, nu beți, nu mâncați și nu aplicați produse cosmetice în zonele în care sunt manipulate speciemenle sau componentele trusei.

## 8.Procedură

Kitul AzureSeq conține un test de control care vizează RNazaP. Acesta este un control intern necesar confirmării prezenței acidului nucleic în fiecare probă cu testul AzureSeq și este utilizat în general pentru a confirma funcționalitatea componentelor kitului de testare.

În afară de aceasta, nu există controale externe furnizate împreună cu kitul de testare AzureSeq - 200 CE. Se așteaptă ca utilizatorii să furnizeze controale pozitive și negative disponibile în comerț de la Omixon ca produs separat (numerele de catalog sunt listate în secțiunea 5) sau le pot folosi pe cele preparate în laboratorul propriu.

### 8.1.Instrucțiuni pentru configurarea reacțiilor

În caz de abordare directă fără extracție separată de ARN (tratament termic), vă rugăm să urmați instrucțiunile de la pasul 1. În cazul în care începeți cu ARN purificat cu truse de extracție ARN uzuale, validate, săriți peste pașii 1-4 și începeți cu pasul 5.

#### 8.1.1.Instrucțiuni

Recomandat pentru utilizare numai cu tampoane OP sau NP în mediu de transport viral (VTM) de la următorii producători: Clinichem, Copan, Puritan, CDC VTM, mwe Medical Wire

Proba în VTM poate fi stocată până la 48 de ore la 4 ° C.

1. Obțineți material recoltat OP / NP în VTM.
2. Transferați 100-200 µL de material recoltat t OP / NP VTM în tuburi compatibile fără DNază / RNază.
3. Se încălzește proba timp de 5 minute la 95 ° C.
4. După incubare, centrifugați proba încălzită la ~ 1500x rpm timp de 30 de secunde pentru a colecta materialul la baza tubului. Depozitați pe gheață. Proba este acum gata să fie adăugată la reacția RT-qPCR (vezi pașii următori).
5. Dezghețați complet amestecul CoVi Primer / Probe 3 (tub/ capac maro) punându-l pe gheață timp de ~ 30 de minute. Odată dezghețat, centrifugați scurt pentru a colecta în partea de jos a tubului, apoi adăugați 384 µL de apă fără nuclează în tub. Marcați tubul cu apă adăugată
6. Vortexați i tubul la viteza maximă timp de 10 secunde pentru a amesteca, apoi centrifugați scurt pentru a colecta în partea de jos a tubului.

7. Continuați cu prepararea master mixului prezentată mai jos, într-o cameră curată sau o zonă desemnată.

Prepararea reactivilor pentru volumul de reacție de 20  $\mu$ L Tabelul 1:

Component	Volum/ reacție (pL)	Volum/100 reacții (pL)	Final concentration
2x InhibiTaq 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. Se omogenizează master mixul pipetând în sus și în jos în mod repetat cu pipeta setată la volumul dublu al amestecului adăugat sau prin vortexarea scurtă a tubului închis urmat de o centrifugare scurtă pentru a colecta amestecul la fundul tubului.

9. Distribuți 15  $\mu$ l de master mix în toate godeurile unei plăci care va fi folosită. folosind o pipetă adecvată

10. Adăugați 5  $\mu$ l de probă, control pozitiv sau control negativ în godeurile corespunzătoare.

11. Sigilați placa, vortexați scurt sau loviți ușor pentru a amesteca; centrifugați pentru a colecta probele amestecate.

12. Așezați placa în aparatul qPCR desemnat și rulați următorul program.

Condiții recomandate:

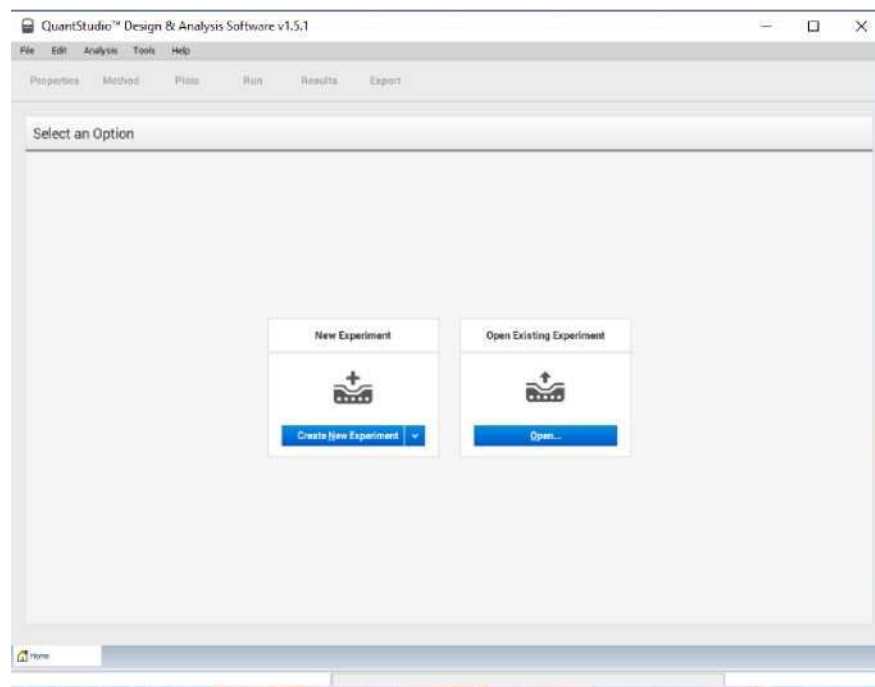
ciclu	etapă	Nr. De cicluri	Temperatură (°C)	Timp
Incubare	1	1	50	15 min.
Activare enzimă	2	1	95	2 min.
Amplificare	3	45	95	3 sec.
			60**	30 sec.

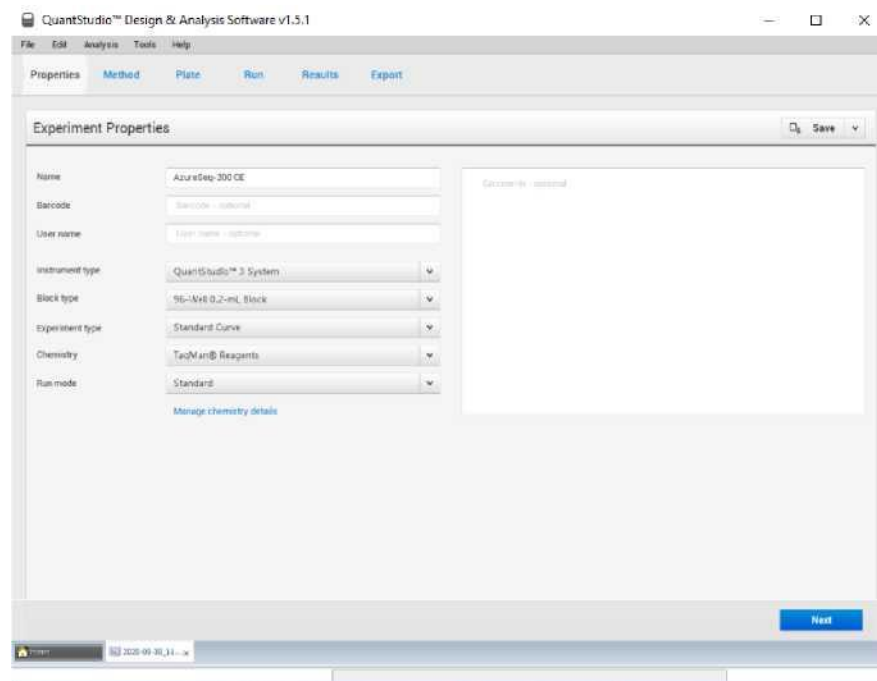
\*\* Colectați fluorescența în timpul fazei de recoacere / extensie (60 ° C) pe canalele FAM, HEX și ROX (sau canale echivalente)

## 8.2. Setări qPCR

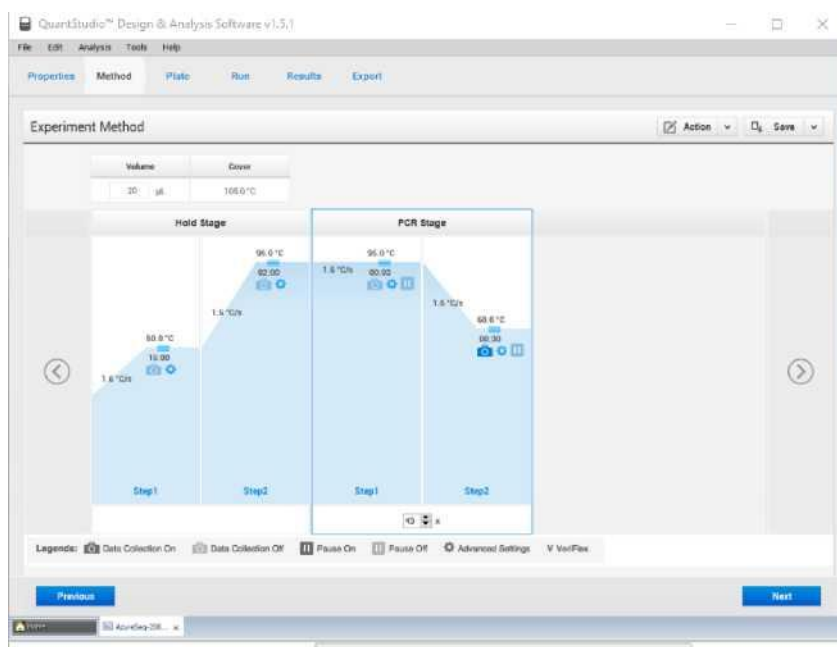
### 8.2.1 QuantStudio 3, 5, 7 Pro

1 - Creați un experiment nou și configurați Proprietățile (Tip instrument, Tip bloc, Tip experiment, Chimie, modul Run) conform imaginii de mai jos.

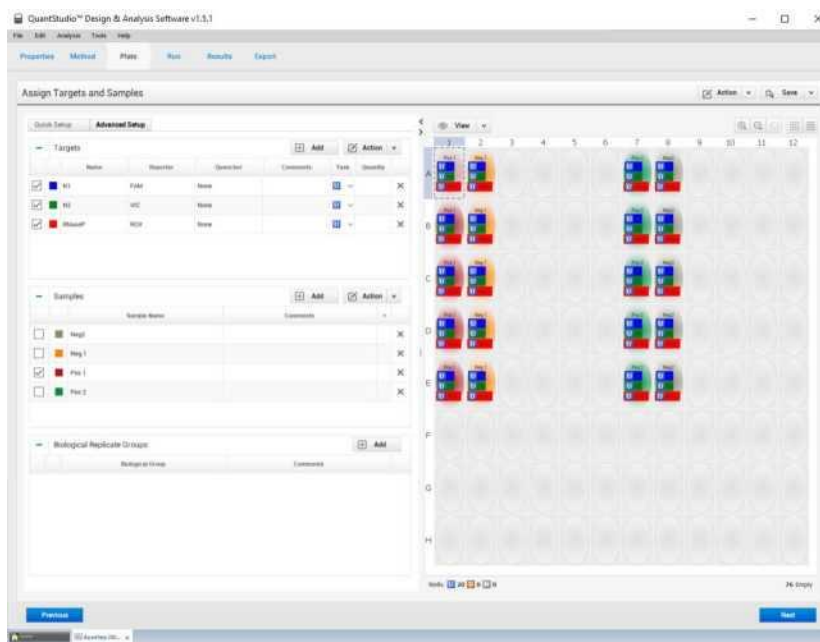




2 - Setăți metoda conform programului PCR detaliat mai sus



3 - Setăți țintele și mostrele din fila Plate și atribuiți canalele.



4 - Exportați protocolul pe o unitate USB.

5 - Încărcați Experimentul de pe unitatea USB de pe instrumentul qPCR, introduceți



placa și porniți Run.

## 8.2.2. Roche LightCycler 480 System

Vă rugăm consultați manualul operatorului instrumentului LightCycler 480 pentru informații suplimentare despre utilizarea instrumentului.

- Creați un „Format de detecție” pentru a configura țintele (N1, N2, RNase P) și canalele (FAM, HEX, ROX - sau echivalent).
- Reporniți un software pentru a accesa noul Format de Detectare creat.
- Selectați culoarea plăcii și creați un Experiment Nou.
- Alegeți noul Format de Detecție din lista derulantă.
- Setări Dimensiunea Blocului la 96 și Volumul de Reacție la 20  $\mu$ L.
- Introduceți programul PCR detaliat la pasul 8.1.1.
- Setări modul de analiză „None” pentru incubația RT și activarea enzimei și „ Quantification” pentru pasul de Amplificare.
- Setări rampa la 4.4 pentru etapa 1, 2 și primul pas din etapa 3 și la 2.2 pentru al doilea pas din etapa 3.
- Încărcați placa și începeți procedura.

## 8.2.3. BioRAD CFX96 Touch

Vă rugăm să consultați Manualul de Instrucțiuni CFX96™ Touch pentru informații suplimentare despre utilizarea instrumentului.

- Rulați software-ul CFX Manager pe computerul conectat la CFX96.





- Creați un Protocol Nou selectând tipul de rulare „Definit de utilizator”.
- Faceți clic pe „ Edit Selected” în fila „Protocol” pentru a face modificări la protocol. Setări parametrilor programului PCR detaliați în secțiunea 8.1.1.
- Faceți clic pe „ Edit Selected” în fila „Plate” pentru a configura placa.
- Faceți clic pe „ Select Fluorophores”, verificați căderboxul fluoroforilor (FAM, HEX, ROX - sau echivalent).
- Specificați godeul pentru controlul pozitiv, setați tipul de probă la „Positive Control” și setați fluorescențele de detecție (țintă N1 - FAM, țintă N2 - HEX, Rnase P - ROX).
- Specificați godeul pentru controlul negativ, setați tipul de probă la „ Negative Control” și setați fluorescențele de detecție (țintă N1 - FAM, țintă N2 - HEX, Rnase P - ROX).
- Godeurile cu eșantioane clinice trebuie specificate ca Necunoscut, setați fluorescențele de detecție (țintă N1 - FAM, țintă N2 - HEX, Rnase P - ROX).
- În meniul Setare, setați tipul plăcii pe alb BR.
- Accesați Start Run, selectați Block Name (instrumentul PCR) de utilizat, închideți capacul și începeți rularea.

## 9. Interpretarea rezultatelor

Toate controalele testelor trebuie verificate înainte de interpretarea rezultatelor pacientului. Dacă controalele nu sunt valide, rezultatele pacientului nu pot fi interpretate. Colectați fluorescența în timpul fazei de aliniere/extensie (60 ° C) pe canalele FAM, HEX și ROX (sau canale echivalente). Valorile Ct <40 sunt interpretate ca pozitive de către utilizator pentru BioRad CFX96, Roche Lightcycler 480 System și QuantStudio 3, 5 și 7 Pro.

SARS-CoV-2 N1 (FAM)	SARS-CoV-2 N2 (HEX)	RNase P (Texas Red)	Interpretarea rezultatelor	Mod de acționare
+	+	+/-	SARS- CoV-2 Pozitiv	Raportați rezultatele furnizorului de asistență medicală și agențiilor de sănătate publice corespunzătoare.
Dacă doar una dintre cele două ținte este pozitivă		+/-	Neconcludent	Repețiți testul
-	-	+	SARS-CoV-2 Nedetectat	Raportați rezultatele furnizorului de asistență medicală
-	-	-	Invalid	Repețiți testul. Dacă este încă invalid, colectați un alt specimen. Dacă un alt specimen nu este disponibil, raportați-l la furnizorul de asistență medicală.

Utilizați tabelul de mai sus ca ghid general pentru interpretarea rezultatelor.

Pentru a raporta un rezultat al testului pacientului, toate controalele din cadrul aceleiași rulări trebuie să fie valide și să prezinte rezultatele așteptate. Dacă oricare dintre controale sau ambele sunt considerate nevalide sau prezintă rezultate neașteptate, rezultatele pacienților din aceea rulare nu trebuie raportate.

### RNase P (controlul extracției)

Toate probele clinice trebuie să prezinte curbe de creștere a fluorescenței în reacția RNase P care trec linia de prag în 40,00 cicluri (<40,00 Ct), indicând astfel prezența genei RNase P umane. Nedetectarea RNazei P în oricare eșantion clinic poate indica:

- Extracția necorespunzătoare a acidului nucleic / extracția termică necorespunzătoare din materialele clinice rezultând în pierderea ARN și / sau degradarea ARN.

- Material celular uman insuficient datorat recoltării necorespunzătoare sau a pierderii integrității probelor.

- Configurarea și executarea necorespunzătoare a testului.
- Deteriorarea reactivului sau a echipamentului.

Dacă testul RP nu produce un rezultat pozitiv pentru eșantioanele clinice umane, interpretați după cum urmează:

- Dacă 2019-nCoV N1 și N2 sunt pozitive chiar și în absența unui PR pozitiv, rezultatul trebuie considerat valid. Este posibil ca unele eșantioane să nu prezinte curbe de creștere RNase P din cauza numărului scăzut de celule din eșantionul clinic original. Un semnal RP negativ nu exclude prezența ARN-ului virusului 2019-nCoV într-un specimen clinic.
- Dacă toți markerii 2019-nCoV și RNase P sunt negative pentru specimen, rezultatul trebuie considerat invalid pentru specimen. Dacă este disponibil un specimen rezidual, repetați procedura de extracție și repetați testul. Dacă toți markerii rămân negativi după retestare, raportați rezultatele ca invalide și, dacă este posibil, trebuie recoltat un nou specimen.

#### **Markeri 2019-nCoV (N1 și N2)**

- Când toate controalele prezintă performanța așteptată, un specimen este considerat negativ dacă nici o curbă de creștere a pragului ciclului marker 2019-nCoV (N1, N2) NU traversează linia de prag în termen de 40,00 cicluri (<40,00 Ct) și curba de creștere a RNazei P TRVERSEAZĂ linia de prag în termen de 40,00 cicluri (<40,00 Ct).
- Când toate controalele prezintă performanța așteptată, un specimen este considerat pozitiv pentru 2019-nCoV dacă toate curbele de creștere ale pragului ciclului markerului 2019-nCoV (N1, N2) trec linia de prag în termen de 40,00 cicluri (<40,00 Ct). RNaza P poate fi sau nu pozitivă așa cum este descris mai sus, dar rezultatul 2019-nCoV este totuși valid.
- Când toate controalele prezintă performanța așteptată și curbele de creștere pentru markerii 2019-nCoV (N1, N2) și markerul RNazei P NU traversează curba de creștere a pragului ciclului în 40,00 cicluri (<40,00 Ct), rezultatul este invalid. ARN-ul extras (obținut prin metodă directă sau cu izolare obișnuită) din specimen trebuie retestat. Dacă ARN-ul rezidual nu este disponibil, extrageți din nou ARN din specimenul rezidual și retestați. Dacă proba retestată este negativă pentru toți markerii și RNazaP, rezultatul este invalid și trebuie luată în considerare recoltarea unui nou specimen de la pacient.
- Când toate controalele prezintă performanța așteptată și curba de creștere a pragului ciclului pentru un singur marker (N1 sau N2, dar nu ambii markeri) traversează linia de prag în termen de 40,00 cicluri (<40,00 Ct), rezultatul este neconcludent. ARN-ul extras trebuie retestat. Dacă ARN rezidual nu este disponibil, extrageți din nou ARN din specimenul rezidual și retestați.

## 10.Limitările procedurii

- Utilizatorii trebuie să fie instruiți cu această tehnologie înainte de utilizarea acestui dispozitiv.
- Orice rezultate de diagnosticare generate trebuie interpretate împreună cu alte rezultate clinice sau de laborator.
- Este responsabilitatea utilizatorului să valideze performanța sistemului pentru orice proceduri utilizate în laboratorul lor care nu sunt acoperite de studiile de performanță ale Omixon Biocomputing Ltd.
- Utilizați acest produs numai cu următoarele probe biologice umane: tamponare nazofaringiene (NP) și orofaringiene (OP)
- Eficiența abordării directe (fără extracție ARN; tratament termic) depinde în mare măsură de mediul VTM utilizat în timpul procesului de recoltare a probelor. Se recomandă utilizarea VTM de la următorii producători: Clinichem, Copan, Puritan, CDC VTM. VTM-ul altor producători trebuie validat de laboratorul utilizatorului.
- Un rezultat negativ nu exclude posibilitatea infecției, deoarece rezultatele depind de recoltarea adecvată a probelor și de absența inhibitorilor. Prezența inhibitorilor PCR poate provoca rezultate invalide sau neconcludente care necesită repetare.
- Rezultatele falspozitive pot apărea din multiple motive, cele mai frecvente fiind contaminarea cu ARN în timpul manipulării și preparării eșantionului.

## 11. Eliminarea problemelor

Probleme	Posibile cauze principale	Recomandare
Intensitatea fluorescență este slabă sau nu apare în controlul pozitiv	Degradarea sondei	Utilizați un nou alicot al sondei sau repetați testul cu un kit cu LOT nou
Inconsistență ridicată în semnalele de fluorescență din probe	Pipetare incorectă	Utilizați pipete calibrate, asigurați-vă că se adaugă un volum egal de reactivi în fiecare godeu / tub
Semnalul fluorescent este detectat în reacția de control negativ	Contaminare carry over	Schimbați întotdeauna varfurile între probe. Aveți grijă când pipetați probele, controalele negative și controalele pozitive
	Contaminarea master mixului de amplificare	Utilizați un nou alicot al mixului de amplificare
	Contaminarea zonei de extracție / preparare	Utilizați dezinfectant pentru a curăța și dezinfecta zonele
Nu se detectează semnal fluorescent în toate probele, inclusiv controlul pozitiv	Degradarea sondei	Utilizați un nou alicot al sondei
	Eroare la setarea instrumentului PCR	Verificați setarea corectă a programului instrumentului real-time PCR
	Master mix preparat greșit, posibilă omitere a unui component	Verificați fiecare component și repetați prepararea master mixului PCR
Rezultate fals negative	Prezența inhibitorilor RT-PCR	Validați trusa de extracție ARN înainte de utilizare. Utilizați VTM de la producătorii recomandați enumerați în acest prospect
	Recoltare incorectă a probelor	Urmați metoda validată de recoltare a probelor
	Nerespectarea instrucțiunilor de utilizare	Citiți cu atenție Instrucțiunile de utilizare înainte de prelucrarea probelor. Orice abatere de la procedurile scrise aici poate afecta performanța optimă.
	Utilizarea reactivilor neautorizați	Nu înlocuiți și nu amestecați reactivii kitului AzureSeq cu reactivi de la alți producători.
Reacție fals pozitivă	Contaminarea încrucișată între probe	Aveți grijă deosebită când manipulați probele pacientului, utilizați procese de trasabilitate exacte și validate, în laborator
	Amestecarea probelor	

## 12. Controlul Calității

Se recomandă validarea întregii proceduri de testare (directă sau incluzând o extracție separată de ARN) și sesiunea de amplificare prin prelucrarea unei probe testate negativ și a unei probe testate pozitiv sau a unui material de referință calibrat.

## 13. Indicatori de performanță

### 13.1. Sensibilitate analitică - Studii privind limita de detecție (LoD)

Studiul LoD a stabilit cea mai scăzută concentrație de SARS-CoV-2 (copii genom-echivalente (cp) / reacție) care poate fi detectată prin testele N1 și N2 în cel puțin 95% din timp utilizând reactivii AzureSeq - 200 CE. Studiile LoD au fost efectuate pe mai multe instrumente real-time PCR .

#### 13.1.1. BioRad CFX96 Touch

LoD pentru AzureSeq - 200 reactivi CE pentru ARN genomic pe sistemul de detecție în timp real BioRad CFX96 Touch a fost stabilit ca fiind de 5 copii pe reacție de 20  $\mu$ L (sau 0,25 copii /  $\mu$ L) pentru N1 și 10 copii pe 20- $\mu$ L reacție (sau 0,5 copii /  $\mu$ L) pentru N2. ARN-ul genomic a fost introdus direct în reacțiile PCR și apoi analizat pe sistemul BioRad CFX96 Touch.

*ARN genomic pe sistemul BioRAD CFX96*

Ținta	N1			N2		
Conc. ARN (copii/ $\mu$ L)	0.05 (.2x)	0.25 (1x)	0.5 (2x)	0.05 (.1x)	0.5 (1x)	1 (2x)
Pozitive/Total	10/20	20/20	20/20	1/20	20/20	20/20
Ct mediu (pozitive)	N/A	37.05	36.25	N/A	37.01	35.91
Deviație St. Ct	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

LoD pentru AzureSeq - 200 reactivi CE pentru ARN genomic pe sistemul Applied Biosystems QuantStudio 3 a fost stabilit ca fiind de 10 copii pe reacție de 20  $\mu$ L (sau 0,5 copii /  $\mu$ L) atât pentru țintele N1, cât și pentru N2. ARN genomic a fost introdus direct în reacțiile PCR și apoi analizat pe sistemul de real-time PCR Quant-Studio.

Un studiu de concordanță care a comparat platformele QuantStudio 3, 5 și 7 Pro a fost realizat folosind 20 de probe clinice, identificate anterior ca pozitive (n = 11) și negative (n = 9) pentru SARS-CoV-2. Cts-urile medii au fost calculate pentru N1, N2 și RNaseP pentru fiecare instrument cu eșantioanele pozitive, în timp ce Ct-ul mediu pentru RNaseP a fost calculat pentru toate eșantioanele negative. Aceste date au demonstrat că nu există nicio diferență așteptată în rezultatele clinice pe aceste platforme.

<i>ARN genomic pe ThermoFisher QuantStudio 3 Real-Time PCR System</i>								
<b>Ținta</b>	<b>N1</b>				<b>N2</b>			
Conc. ARN (copii/μL)	0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2
Pozitive/Total	16/20	20/20	20/20	20/20	15/20	19/20	20/20	20/20
Ct mediu (pozitive)	32.04	31.12	30.45	29.04	38.67	37.02	36.47	34.35
Deviație St. Ct	7.89	3.58	4.10	4.09	2.57	4.78	2.61	3.14

### 13.1.3. Roche LightCycler® 480 System

LoD pentru AzureSeq - 200 reactivi CE pentru ARN genomic pe sistemul real-time PCR Roche LightCycler® 480 a fost stabilit ca fiind 10 copii pe reacție de 20 μL (sau 0,5 copii / μL) atât pentru țintele N1 cât și pentru N2. ARN genomic a fost introdus direct în reacțiile PCR și apoi analizat pe sistemul de PCR în timp real Quant-Studio.

<i>Genomic RNA on Roche LightCycler® 480 System</i>						
<b>Ținta</b>	<b>N1</b>			<b>N2</b>		
Conc. ARN (copii/μL)	0,5	1	2	0,5	1	2
Pozitive/Total	22/23	23/23	23/23	23/23	23/23	23/23
Ct mediu (pozitive)	37,63	36,76	35,78	36,37	35,55	34,61
Deviație St. Ct	0,9062	0,5680	0,1956	1,795	0,4712	0,4441

## 13.2. Specificitate analitică – Testare de inclusivitate

Sistemul AzureSeq utilizează setul de primeri/sonda pentru markerii N1 și N2 ai SARS-CoV-2 dezvoltate de către CDC, care a condus o analiză in-silico pe o secvență cunoscută de SARS-CoV-2. Rezultatele acestor analize sunt disponibile în FDA EUA EUA200001 “CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostics Panel”.

### Rezultate – analiza in silico a secvențelor primerilor și a sondei:

Secvențele primerilor și sondelor de oligonucleotide ale Panelului de Diagnostic CDC 2019 nCoV Real-Time RT-PCR au fost evaluate comparându-le cu cele 31632 de secvențe disponibile în baza de date a Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID, <http://www.gisaid.org>) disponibilă din 20 Iunie 2020, pentru a demonstra inclusivitatea prezisă a Panelului de Diagnostic 2019-nCoV Real-Time RT-PCR. Nepotrivirea nucleotidelor în regiunea de primer/sondă cu o frecvență mai mare de 0,1% este prezentată mai jos. Cu excepția unei singure nepotriviri de nucleotide cu o frecvență mai mare de 1% (2,00%) în a 3-a poziție a probei N1, toate nepotrivirile au avut o frecvență mai mică de 0,1%, indicând faptul că nepotrivirile au fost sporadice. Doar o singură secvență (0,0032%) a prezentat 2 nepotriviri de nucleotide în proba N1, și doar o altă secvență dintr-un izolat diferit (0,0032%) a prezentat 2 nepotriviri de nucleotide în primerul revers N1. Nicio altă secvență nu a avut mai mult de o singură nepotrivire în regiunea N2 a primerului/sondei. Riscul ca aceste nepotriviri să rezulte într-o scădere semnificativă a reactivității, fapt care duce la obținerea unui rezultat fals negativ, este extrem de mic, datorită designului primerilor și a sondelor, aceștia având temperatura de topire >60° C și o temperatură de aliniere la 55° C care pot tolera până la 2 nepotriviri.

*Analiza de Inclusivitate In Silico a Panelului de Diagnostic a CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR comparativ cu 31623 Secvențe de Genom Disponibile pe GISAID din 20 Iunie 2020*

Primer/Sondă	Sonda N1	N1 revers	Sonda N2	
Locație (5'>3')	3	15	21	13
Nuclotide Nepotrivite	C>T	G>T	T>C	C>T
Nr. de Nepotriviri	632	34	71	46
Frecvența Nepotrivirilor (%)	2,00	0,11	0,22	0,15



### 13.3. Specificitate Analitică – Reactivitate încrucișată

Kitul AzureSeq utilizează setul de primeri/sonde pentru markerii N1 și N2 ai SARS-CoV-2 dezvoltat de către CDC care a condus o testare *in silico* de reactivitate încrucișată. CDC a condus testare umedă pentru reactivitate încrucișată utilizând Lista Recomandată de Organisme a FDA. Rezultatele obținute în urma acestor analize sunt disponibile în FDA EUA EUA200001 “CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostics Panel

#### **Rezultate – testare de specificitate/exclusivitate: analiza in silico**

Interogările de analiză BLASTn ale primerilor și sondelor 2019-nCoV rRT-PCR au fost efectuate comparându-le cu secvențe de nucleotide din domeniul public. Parametrii căutați în baza de date au fost: 1) Colecția de nucleotide constă în GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+RefSeq, dar exclude EST, STS, GSS, WGS, TSA, secvențele patentate precum și fazele 0, 1 și 2 ale secvențelor HTGS și secvențele mai lungi de 100Mb; 2) Baza de date este non-redundantă. Secvențele indentice au fost comasate, păstrând informațiile despre accesare, GI, titlu și taxonomie ale fiecăreia; 3) Baza de date a fost actualizată în 10/03/2019; 4) Parametrii de căutare se ajustează automat pentru secvențe scurte de input, iar pragul de așteptare este de 1000; 5) Scorul de potrivire și nepotrivire este de 1, respectiv -3; 6) Penalitățile pentru crearea și extinderea unei lacune într-o aliniere este de 5, respectiv 2.

#### **Testarea N1 2019-nCoV**

Secvența sondei testului N1 al 2019-nCoV rRT-PCR a prezentat un nivel ridicat de omologie secvențială cu coronavirusul SARS și genomul coronavirusului de liliac SARS-like. Totuși, primerii forward și revers nu au prezentat omologie de secvență cu coronavirusul SARS și genomul coronavirusului de liliac SARS-like. Combinând primerii și sondele, nu s-a demonstrat o omologie semnificativă cu genomul uman, alte coronavirusuri sau microflora umană care ar putea prezice eventuale rezultate rRT-PCR fals pozitive.

#### **Testarea N2 2019-nCoV**

Secvența primerului forward a testului N2 al 2019-nCoV rRT-PCR a prezentat un nivel ridicat de omologie secvențială cu coronavirusurile de liliac SARS-like. Primerul revers și secvențele sondei nu au prezentat omologii semnificative cu genomul uman, alte coronavirusuri sau microflora umană. Combinând primerii și sonda nu există riscul unui rezultat rRT-PCR fals pozitiv.

În concluzie, testele N1 și N2 ale 2019-nCoV rRT-PCR, create special pentru detectarea nCoV-2019, nu au prezentat omologii semnificative combinate cu genomul uman, alte coronavirusuri sau microflora umană care ar putea prezice eventuale rezultate rRT-PCR fals pozitive.

Pe lângă analiza in silico, câteva organisme au fost extrase și testate cu Panelul de Diagnostic nCoV-2019 Real-Time RT-PCR al CDC pentru a demonstra specificitatea și exclusivitatea analitică. Studiile au fost efectuate cu acizii nucleici extrași folosind aparatul QIAGEN EZ1 Advanced XL și kitul virologic EZ1 DSP. Acizii nucleici au fost extrași din preparate cu titru înalt (de obicei  $\geq 105$  PFU/mL sau  $\geq 106$  PFU/mL). Testarea s-a efectuat utilizând Master Mixul ThermoFisher Scientific TaqPath™ 1-Step RT-qPCR, CG pe aparatul Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx Real-Time PCR. Datele demonstrează că rezultatele așteptate sunt obținute pentru fiecare organism care este testat cu Panelul de Diagnostic CDC 2019-nCov Real-Time RT-PCR.

Specificitatea/Exclusivitatea Panelului de Diagnostic CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR

Virus	Tulpină	Sursă	2019-nCoV N1	2019-nCoV N2	Rezultate
Coronavirus uman	229E	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Coronavirus uman	OC43	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Coronavirus uman	NL63	Specimen clinic	0/3	0/3	Negativ
Coronavirus uman	HKU1	Specimen clinic	0/3	0/3	Negativ
MERS-coronavirus	-	Izolată	0/3	0/3	Negativ
SARS-coronavirus	-	Izolată	0/3	0/3	Negativ
bocavirus	-	Specimen clinic	0/3	0/3	Negativ
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Izolată	0/3	0/3	Negativ
<i>Streptococcus</i>	-	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Influenza A (H1N1)	-	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Influenza A (H1N1)	-	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Influenza B	-	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Adenovirus uman (de tip1)	Ad71	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Metapneumovirus uman	-	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Virus Sinčial Respirator	Long A	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Rinovirus	-	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Parainfluenza 1	C35	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Parainfluenza 2	Greer	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Parainfluenza 3	C-43	Izolată	0/3	0/3	Negativ
Parainfluenza 4	M-25	Izolată	0/3	0/3	Negativ

## 13.4. Studii de Interferență Microbiană

Studiile de interferență microbiană nu sunt necesare, deoarece analiza *in-silico* condusă de CDC (FDA EUA EUA200001 “CDC 2019-Novel Coronavirus (2019- nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostics Panel”) nu a îndeplinit criteriile pentru a fi necesare studiile de interferență.

## 13.5. Teste de robustețe

Echivalența testelor a fost comparată cu diferite tipuri de master mixuri.

Cincizeci (50) de copii ale ARN-ului genomic sunt inserate în reacții de 20 uL pe BioRad CFX96 Touch Real-Time Detection System. 12 probe pozitive sunt testate cu fiecare master mix.

Master mixuri testate:

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

Comparație Reactivi: ARN genomic inserat în reacții PCR pe BioRad						
Țintă	N1			N2		
Master Mix	AzureSeq-200 CE	ThermoFisher TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	Promega GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System	AzureSeq-200 CE	ThermoFisher TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	Promega GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System
Pozitive/Total	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
Medie Ct	34,78	33,12	33,97	35,89	35,38	35,87
Deviație Standard Ct	0,31	0,24	0,20	0,27	0,25	0,16

### 13.6. Repetabilitate și reproductibilitate

Probele pozitive și negative au fost obținute adăugând control pozitiv și negativ reacțiilor PCR, conform Instrucțiunilor de Utilizare. 5 replicare ale probelor pozitive și negative au fost examinate pe aparatul real-time PCR QuantStudio 3 produs de Applied Biosystems, de către doi operatori pentru a stabili repetabilitatea și reproductibilitatea din timpul rulării și variabilitatea de la operator la operator.

	Rezultate Operator 1				Rezultate Operator 1				Concordanță între operatori (%)
	N1	N2	RNaza P	Concordanță între copii (%)	N1	N2	RNaza P	Concordanță între copii (%)	
Probe pozitive	5/5	5/5	5/5	100	5/5	5/5	5/5	100	100
Probe negative	5/5	5/5	5/5	100	5/5	5/5	5/5	100	100

### 13.7. Performanțe clinice

Specimenele recoltate pe tampon orofaringian determinate anterior pe BioRad CFX96 ca fiind pozitive (11 probe) și negative (6 probe) pentru SARS-CoV-2 au fost extrase pe Sistemul KingFisher Flex . Cinci (5) microlitri de probe eluate au fost adăugați reactivilor AzureSeq și amplificate și detectate pe sistemul BioRad CFX96. Toate probele pozitive și negative au prezentat o concordanță de 100% cu caracterizarea originală a comparatorului.

Specimenele nazofaringiene (30 pozitive și 30 negative) au fost recoltate pe VTM fabricate de Clinichem Ltd. (Ungaria) și procesate folosind extracție directă de ARN folosind tehnica de lucru de tratament termic a protocolului. Cinci (5) microlitri de probă tratată termic au fost adăugați reactivilor AzureSeq și amplificați și detectați pe sistemul Roche LightCycler®480. Toate probele pozitive și negative au prezentat o concordanță de 100% cu caracterizarea originală a comparatorului.

Platformă	Tip probă	Protocol	Rezultate AzureSeq-200 CE		Rezultate comparator		Concordanță (%)
			Pozitive	Negative	Pozitive	Negative	
BioRad CFX96	Probe orofaringiene	Cu izolare ARN	11	6	11	6	100
Roche LightCycler®480	Probe nazofaringiene	Fără izolare ARN	30	30	30	30	100

## 14. Bibliografie

- 8/2003. (III.13.) ESzCsM rendelet az in-vitro diagnosztikai orvostechnikai 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