

## **COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD**

**Komplet za RT-qPCR multipleks testiranje na COVID-19, Influenza A/B, RSV u jednome koraku, za in vitro dijagnostiku (IVD)**

<b>REF</b>	MD04901, 96 reakcija
	MD04902, 4 x 96 reakcija
	MD04903, stripovi 2 x 8-jažica, visokog profila

*Samo za profesionalnu in vitro dijagnostiku*



**Upute za uporabu**

**MD0490\_IM\_hr**

VERZIJA 2401, siječnja 2024



## Sadržaj

1. Uvod .....	3
2. Namjena .....	3
3. Načela ispitivanja .....	3
4. Sadržaj kompleta.....	4
5. Uvjeti čuvanja, održavanja stabilnosti i rukovanja.....	4
6. Potrebni materijali i uređaji koji nisu dio kompleta.....	4
7. Uzimanje i priprema uzoraka .....	4
8. Mjere opreza i upozorenja.....	5
8.1 Sigurnosne informacije .....	5
8.2 Uvjeti rukovanja i postupaka .....	5
9. Postupak testiranja .....	5
9.1 Priprema reakcije .....	5
9.2 Programiranje PCR uređaja u realnom vremenu .....	6
10. Analiza podataka.....	6
10.1 Kriterij za validaciju provedbe testa.....	6
10.2 Interpretacija rezultata testiranja .....	7
11. Ocjena uspješnosti .....	8
11.1 Očekivani rezultati .....	8
11.2 Limiti detekcije (LoD) – Analitička osjetljivosti .....	8
11.3 Analitička reaktivnost (inkluzivnost) i analitička specifičnost.....	9
11.4 Preciznost.....	9
11.4.1 Ponovljivost.....	9
11.4.2 Dnevna reproducibilnost.....	9
11.4.3 Reproducibilnost prema proizvodnim serijama "eng. Lot – to – lot" .....	10
11.4.4 Reproducibilnost po operatoru.....	10
11.4.5 Reproducibilnost među uređajima .....	10
11.5 Klinička evaluacija .....	11
12. Kontrole kvalitete.....	11
13. Tehnička podrška .....	12
14. Robne marke i izjave o odricanju od odgovornosti.....	12
15. Objašnjenje simbola.....	12
16. Izjava o sukladnosti .....	13
17. Literatura.....	14

## 1. Uvod

I dalje prisutna pandemija Koronavirusne bolesti 2019 (COVID-19), prvo identificirana u Kini i koja se vrlo brzo raširila u većini zemalja, uzrokovala je do sada neviđenu stopu morbiditeta i smrtnosti u cijelome svijetu, što je rezultiralo globalnom krizom zdravstvene skrbi i preopterećenošću zdravstvenih resursa. Njezin uzročnik, (eng. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), novi je *Betacoronavirus* slične filogenetike onaj SARS-CoV. Sezonska influenza, također poznata kao sezonska gripa, zarazna je virusna infekcija dišnog sustava s visokom stopom morbiditeta, smrtnosti i opterećenja usluga zdravstvene skrbi. Međutim, smrtni su ishodi mnogo rjeđi nego kod bolesti uzrokovane COVID-19. Virus influenza (gripe) tipa A i B dominantni su cirkulirajući virusi influenza, te se najviše epidemija influenza povezuje sa tipom A. Zoonotski prijenos ptičje ili svinjske gripe direktno na ljude kao i transmisija virusa uzrokovala je naizmjenične pandemije kod ljudi u posljednjih nekoliko desetljeća. Infekcije sa influencom B (Gripa B) virusa generalno su ograničene na ljudsku populaciju te rjeđe uzrokuju epidemije. Ljudski respiratorni sincicijski virus (RSV) je najvažniji pedijatrijski virusni respiratorni patogen širom svijeta. RSV je član roda pneumovirus paramyxovirus obitelji. Ovaj svekoliko prisutni visoko infektivni uzročnik uzrokuje sezonske epidemije svake godine te je gotovo svaka osoba inficirana u najmanjem slučaju jednom unutar prve 2 godine života. RSV bolest odgovorna je za značajnu stopu morbiditeta i smrtnosti u nedostatku odobrenih cijepljenja ili visoko učinkovite antiviralne terapije. Brza dijagnostika i izolacija potrebne su radi sprječavanja transmisije te radi uspostavljanja učinkovitog tretmana.

Respiratorne infekcije mogu djelovati "sinergistički," što znači potencijalnu interakciju SARS-CoV-2 i ostalih respiratornih virusa što može uzrokovati ozbiljnost bolesti. Svi navedeni virusi su visoko zarazni te se prenose putem kontakta, respiratornih kapljica (kašljanje ili kihanje) i preko kontaminiranih površina. COVID-19 se može klinički pomiješati sa upalom pluća uzrokovanom RSV ili Influenca virusima i ko-infekcije što uzrokuje lošu prognozu ishoda. Nadalje, širok protok ostalih respiratornih virusa će uzrokovati veću usmjerenost na SARS-CoV-2 što može dovesti do pojave novih varijanti koje mogu zabrinjavati. Stoga je od izuzetne važnosti zaustaviti "smrtonosnu mješavinu tri uzročnika" COVID-19, gripe, i RSV. COVID-19, gripa, i RSV infekcije teško se mogu diferencirati i raščlaniti samo na osnovu simptoma te je svaki od virusa visoko zarazan. Kako ulazimo u sezonu pojave gripe, dobro je testirati i ostale respiratorne uzročnike uz COVID-19.

Rana detekcija SARS-CoV-2, RSV i Influenca tipova A i B od velike je važnosti u osiguravanju brzog tretmana inficiranih pacijenata sa respiratornim bolestima te posljedično reducirati širenje infekcije. Kombinirano testiranje COVID-19, RSV i gripe vrlo je učinkovito, jer se u jednome uzorku mogu razlikovati tri infekcije u pacijentima koji izražavaju slične simptome, osiguravajući rješenje za pomoć pacijentima koji izražavaju simptome slične gripi.

## 2. Namjena

NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD molekularni je test namijenjen kvalitativnome otkrivanju uzročnika COVID-19, RSV (podtipova A i B) i Influenca (Gripa A i Gripa B) u uzorcima biološkog materijala kod ljudi. Međutim, ovaj komplet ne razlikuje tipove Influenca tipa A i tipa B jer se oba detektiraju na istome fluorescentnom FAM kanalu. Osim toga, ostali betakoronavirusi ili Influenca virusi, npr., Influenca C, ovim se kompletom ne mogu otkriti. Ovaj test je namijenjen u primarnome screeningu u dijagnostici SARS-CoV-2, Gripa A/B i RSV u kombinaciji sa kliničkim i epidemiološkim faktorima rizika. Pozitivan rezultat upućuje na prisutnost SARS-CoV-2 i/ili Influenze A/B i/ili RSV viralne RNA, iako je za utvrđivanje infekcije kod bolesnika potrebno uzeti anamnezu i druge informacije za postavljanje dijagnoze. Negativan rezultat ne isključuje infekciju i ne bi ga trebalo koristiti kao jedinu osnovu za donošenje odluke o postupanju s bolesnikom. Komplet je namijenjen laboratorijskom osoblju, stručno osposobljenom za primjenu tehnika PCR testiranja u realnom vremenu i za *in vitro* dijagnostiku.

## 3. Načela ispitivanja

NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, sadrži set svih reagensa i proba za kvalitativnu detekciju SARS-CoV-2 i/ili Influenca i/ili RSV genoma, na uobičajenim platformama za PCR testiranje (specifikacije potrebnih uređaja pogledajte u Poglavlju 6). SARS-CoV-2 se identificira detekcijom RT-qPCR ciljeva koji se nalaze u RdRp i N genu, te RSV (podtipovi A i B) su identificirani detekcijom ciljeva lociranih u L genu. Nasuprot tome, Influenca A i Influenca B virusi su detektirani kroz amplifikaciju ciljanih gena lociranih u M1 i NS2 genima.

NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD proizveden je za najširi mogući profil detekcije, ali specifičan za genome virusa SARS-CoV-2, RSV, Influenca tipove A i B. Sadrži cijeli set reagensa i proba za otkrivanje četiri virusna genoma, uključujući učinkovitu internu kontrolu radi potvrde uspješne RNA ekstrakcije i izostanka PCR inhibitora, između ostalog. Ovaj komplet ciljano ispituje regije genoma virusa SARS-CoV-2, RSV (podtipova A i B) i Influenca A i B, s pomoću visoko optimiziranog kompleta početnica/proba. Dodatno, početnice i probe ne pokazuju značajnu homologiju s nevezanim genomima, što ovaj test čini vrlo specifičnim, te ne postoji ukrížena reaktivnost sa organizmima koji se mogu pronaći u dišnome sustavu. Prirodna evolucija virusa otkrivenih ovim kompletom podrazumijeva da će nove informacije o sekvencama postajati dostupnije iz dana u dan, što je odraz dobro poznatih strategija prilagodbe virusa. Stoga NZYtech redovito provjerava genomske ciljeve virusa te će, ako to bude potrebno, izdati nove verzije ovog kompleta. RT-qPCR test u jednom koraku u realnom vremenu najbrža je i najpouzdanija metoda točnog otkrivanja SARS-CoV-2, Influenca A i B, i RSV virusne RNA. NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD je multipleks test za utvrđivanje i detekciju SARS-CoV-2, Influenca A, Influenca B, RSV i ljudskih nukleinskih kiselina (djelujući kao interna pozitivna kontrola). Ekstrahirana i pročišćena RNK transkribira se u cDNA i potom pojačava jednom reakcijom s pomoću šest visoko specifičnih kompleta početnica/proba točnije onih koji detektiraju SARS-CoV-2 RNA ovisnu RNA polimerazu (RdRp) i Nukleokapsidni fosfoprotein (N) gene, Influenca A i B Matriks (M1) i Nestrukturalne 2 (NS2) specifične gene, i RSV L gene te ljudsku ribonukleazu P (RNase P, RP) gene. Komplet primjenjuje tzv. načelo TaqMan®. Kako bi se omogućilo identificiranje amplifikacije šest specifičnih ciljeva jednom reakcijom, SARS-CoV-2, Influenca A/B, RSV i ljudske RNase P, specifične probe su različito označene, i to Texas Red®, FAM™, HEX™ i Cy5™. Važno je primjetiti kako ovaj panel sadržava duplex esej u Texas Red® (SARS-CoV-2 RdRp i N specifični ciljani geni) i FAM™ (Influenca A Influenca B specifični ciljani geni) kanalima. Ovo omogućava prijavu dodatnog izvršenja testiranja za SARS-CoV-2 detekciju ali isključuje diferenciranje između Influenca A/B infekcije. Također, ovaj test nije namijenjen za diferenciranje Influenca A virusnih podtipova, niti podtipova influenza B virusa ili podrijetla RSV podgrupa. Ukoliko je potrebna diferencijacija specifičnih sojeva Influenca virusa i podtipova RSV, potrebna su dodatna testiranja. Nadalje, šest kompleta početnica/proba sadrži optimizirane koncentracije koje jamče da amplifikacija niže zastupljenih nukleinskih kiselina neće biti kompromitirana kad ostali virusni ciljevi budu prisutni u višim koncentracijama.

#### 4. Sadržaj kompleta

NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD sadržava sveobuhvatan komplet reagensa dovoljnih za obavljanje RT-qPCR reakcija u jednome koraku. Ovaj komplet je dostupan u obliku tubica: kataloški broj MD04901 za 96 reakcija i kataloški MD04902 za 4x 96 reakcija.

SADRŽAJ KOMPLETA		VOLUMEN (PO BOČICI)	BROJ TUBICA		BOJA ČEPA
			MD04901	MD04902	
COVID-19, Flu A/B, RSV MMix	NZYSupreme Multiplex RT-qPCR u jednome koraku master mješavina (2x)	1050 µL	1	4	Neutralna
COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix	COVID-19, Flu A/B, RSV mješavina proba i početnica (10x)	205 µL	1	4	Smeđa
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1	COVID-19, Flu A/B, RSV Pozitivna Kontrola 1	105 µL	1	4	Crvena
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2	COVID-19, Flu A/B, RSV Pozitivna Kontrola 2	105 µL	1	4	Crvena
NTC	Kontrola – bez uzorka (Voda bez RNase/DNase)	105 µL	1	4	Neutralna

Alternativno NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD je dostupan u obliku stripa sa 8-jažica, zajedno sa otopinama koje su spremne za upotrebu, a iste uključuju master mix plus početnice-probe mješavinu, za izvođenje 16 RT-qPCR reakcija (2 x 8-jažica u obliku stripa, visokog profila), što olakšava i racionalizira process testiranja.

SADRŽAJ KOMPLETA		VOLUMEN (PO BOČICI)	BROJ TUBICA/STRIPOVA	BOJA ČEPA
			MD04903	
COVID-19, Flu A/B, RSV Mix	Mješavina reagensa spremnih za upotrebu NZYSupreme Multiplex RT-qPCR u jednome koraku master mješavina	Strip 8-jažica x 12 µL po jažici	2	Neutralna
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1	COVID-19, Flu A/B, RSV Pozitivna Kontrola 1	20 µL	1	Crvena
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2	COVID-19, Flu A/B, RSV Pozitivna Kontrola 2	20 µL	1	Crvena
NTC	Kontrola – bez uzorka (Voda bez RNase/DNase)	20 µL	1	Neutralna
ČEPOVI ZA STRIP OD 8-JAŽICA	-	-	2	Neutralna

#### 5. Uvjeti čuvanja, održavanja stabilnosti i rukovanja

NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD isporučuje se u hladnome. Sve komponente moraju se odmah po dolasku spremati na -85 °C do -15 °C. Komponente kompleta treba odmah nakon korištenja vratiti u zamrzivač kako bi vrijeme koje provode na sobnoj temperaturi bilo što je moguće kraće.

- Čuvanjem u radnim alikvotima broj ciklusa zamrzavanja i odmrzavanja smanjite koliko je to najviše moguće. Prema potrebi komponente se nakon odmrzavanja mogu odvojiti u alikvote manjih volumena.
- COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix ) treba čuvati zaštićenu od svjetla. Posebno pripazite da COVID-19, Flu A/B, RSV MMix ne izlažete direktnoj sunčevoj svjetlosti nakon kombiniranja sa COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix. COVID-19, Flu A/B, RSV Mix koji obuhvaća strip sa 8 jažica (kataloški broj MD04903), također mora biti skladišten podalje od sunčevog svjetla.
- Ako je pakiranje kojim je komplet zaštićen pri dolasku oštećeno, kontaktirajte NZYtech.
- Vodite računa o roku valjanosti navedenom na pakiranju. NZYtech ne preporučuje da se komplet koristi nakon isteka roka valjanosti. Tog datuma komplet se mora baciti u skladu s uputama o zbrinjavanju navedenima u **Poglavlju 8.2**.

#### 6. Potrebni materijali i uređaji koji nisu dio kompleta

- Instrument za PCR u stvarnom vremenu koji detektira Texas Red®, FAM™, HEX™/VIC™ i Cy5™ (pri emisiji valnih dužina od 615, 520, 556 i 670 nm). U **Poglavlju 11** pogledajte modele uređaja za koje je ovaj komplet odobren.
- Oprema i potrošni materijal za izoliranje virusne RNK u uzorcima iz dišnog sustava.
- Plastična oprema za RNase/DNase slobodna qPCR: PCR epruvete, stripovi, čepovi, pločice sa 96 jažica, ljepljive folije (potrebno samo za kataloške brojeve MD04901 i MD04902).
- Pipetori i nastavci s filterom (bez RNase/DNase).
- Jednokratne rukavice
- Vrtložnice i centrifuge.

#### 7. Uzimanje i priprema uzoraka

NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD validiran je za oro-nazofaringealne briseve kao tip uzorka. Različiti faktori, kao što je protokol uzimanja uzorka iz dišnog sustava (oro-nazofaringealni brisevi), prijenos uzorka, pohrana i vrijeme izvođenja testa, ključni su čimbenici za postizanje optimalnih rezultata. Uzeti uzorci trebaju se testirati što je prije moguće. Uzorke treba prevoziti i čuvati na niskim temperaturama u skladu s propisima o biološkoj sigurnosti. RNK ili ukupne nukleinske kiseline su ekstrahirane u skladu s protokolom za NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD. Pobrinite se da uzorci RNK budu odgovarajući što se tiče čistoće, koncentracije i

integriteta nukleinske kiseline. Omjer  $_{260/280}$  od  $\sim 2$  općenito je prihvatljiv za čistu RNK. Budući da je etanol snažan inhibitor PCR-a, on se prije eluiranja nukleinske kiseline tijekom ekstrakcije mora u potpunosti eliminirati. Komplet NZYtech sadrži i internu kontrolnu reakciju ekstrakcije RNA koja cilja ljudsku RNK, koja je dodatno pročišćena virusnom RNK. Ljudska RNK amplificira se s pomoću kompleta početnica/proba RNase P (RP). To je korisno za provjeru učinkovitosti izoliranja RNK i/ili prisutnosti inhibitora tijekom obrade uzoraka.

## 8. Mjere opreza i upozorenja

Kao i u svakom drugom postupku analitičkog ispitivanja, dobra laboratorijska praksa je ključna. Pažljivo slijedite postupke i smjernice sadržane u ovom priručniku, kako biste osigurali ispravno provođenje testiranja. Bilo kakvo odstupanje može za posljedicu imati neuspjelo ispitivanje ili netočan nalaz. Zbog visoke osjetljivosti kompleta, posebnu pozornost valja obratiti na održavanje reagensa i mješavina za amplifikaciju PCR-a nekontaminiranima.

### 8.1 Sigurnosne informacije

Prije uporabe kompleta proučite Sigurnosno-tehnički list dostupan na mrežnoj stranici NZYtech-a ([www.nzytech.com](http://www.nzytech.com)). Otkrivanje virusa ovim kompletom treba obavljati samo stručno osoblje, relevantnim tehničkim i sigurnosnim postupcima u odgovarajuće opremljenim laboratorijima. U svim uvjetima potrebno se pridržavati međunarodnih i nacionalnih smjernica o biološkoj sigurnosti laboratorija.

### 8.2 Uvjeti rukovanja i postupaka

- Samo za profesionalnu *in vitro* dijagnostiku
- Nemojte koristiti komplet kojemu je istekao rok valjanosti.
- Nemojte koristiti komponente, ako je hermetičko zatvaranje oštećeno.
- Nemojte međusobno mijenjati reagense različitih serija proizvođača.
- S reagensima iz ovog kompleta ne smiju se koristiti reagensi drugih proizvođača.
- U svim postupcima treba koristiti jednokratnu plastičnu opremu i nastavke bez DNase/RNase.
- Tijekom protokola koristite nastavke s filterima bez DNase/RNase kako biste spriječili kontaminiranje aerosola i tekućine.
- Pripremu uzoraka, utvrđivanje reakcije i amplifikaciju treba obavljati u različitim radnim prostorima.
- Pozitivne kontrole sadrže veliki broj kopija predloška; treba ih otvoriti i obraditi podalje od testnih uzoraka i komponenti kompleta, kako bi se izbjegla ukrižena kontaminacija
- Uvijek koristite vodu iz kompleta (NTC – Kontrola – bez uzorka /Voda slobodna od DNase).
- Na kraju svakog testiranja radne površine i opremu očistite sredstvom za uklanjanje DNK/RNK.
- Pločicama koje se koriste nakon amplifikacije rukujte pažljivo i bacite ih odmah nakon završenog testiranja; pločice treba nakon korištenja uvijek odlagati u spremnik za biološki opasan otpad.
- Biološkim uzorcima treba rukovati kao da su zaraženi, u skladu s mjerama opreza propisanim za biološku sigurnost
- Ostaci kemikalija i pripravaka općenito se smatraju opasnim otpadom. Odlaganje ovakve vrste otpada propisano je nacionalnim i regionalnim zakonima i propisima.
- Sve nalaze trebaju interpretirati zdravstveni stručnjaci u kontekstu anamneze bolesnika i kliničkih simptoma
- Negativan nalaz bilo kojeg PCR testa ne isključuje u potpunosti mogućnost infekcije.
- Slijedite dobru laboratorijsku praksu, nosite zaštitnu odjeću, uvijek nosite jednokratne rukavice bez pudera, zaštitne naočale i masku. U radnom prostoru nemojte jesti, piti niti pušiti

## 9. Postupak testiranja

Prije izvođenja testiranja pažljivo pročitajte upute. Ne zaboravite da se svi koraci pipetiranja i pripreme eksperimentalne ploče moraju obavljati u stolnom hladnjaku ili na ledu. Čim je ploča popunjena odmah započnite protokol RT-qPCR. Produljenom inkubacijom mješavina za reakciju na sobnoj temperaturi mogu nastati artefakti PCR-a koji smanjuju osjetljivost detekcije. Prije početka eksperimenta, počnite lagano miješati epruvete za reakciju iz kompleta, centrifugirajte ih 5 sekundi kako biste pokupili sadržaj na dnu epruvete i epruvete stavite na led. **Svakako preporučujemo da pipetiranje COVID-19, Flu A/B, RSV Pozitivne Kontrole 1 i 2 obavite na kraju, kako bi se izbjegla ukrižena kontaminacija.**

### 9.1 Priprema reakcije

Za komplete kataloški broj MD04901 i MD04902 - tubice

1. Pripremite dovoljno mješavine RT-qPCR za broj testiranja koja treba obaviti, i dodajte još 5 % za gubitke tijekom pipetiranja. Nastavite u skladu s tabelom u nastavku u kojoj su specificirani volumeni za 1 i  $n$  testova (pri čemu  $n$  odgovara ukupnom broju reakcija). Pohranite ostatak volumena kako je opisano u **Poglavlju 5**.

SADRŽAJ	1 TEST VOLUMEN (μL)	$n$ TESTOVA* VOLUMEN + 5% (μL)
COVID-19, FLU A/B, RSV MMIX**	10	$n \times 10.5$
COVID-19, FLU A/B, RSV PPMIX	2	$n \times 2.1$
<b>KONAČNI VOLUMEN</b>	<b>12</b>	<b><math>n \times 12.6</math></b>

\* Kako biste izračunali ukupan broj reakcija potrebnih za svako ispitivanje, izbrojite broj uzoraka i dodajte još tri, jedan za negativnu i dva za pozitivnu kontrolu.

\*\* Napominjemo da se na dnu epruvete s master mješavinom može uočiti talog, naročito nakon više ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja. Kako bi se osigurala optimalna uspješnost, uvjerite se da su prije početka upotrebe sve komponente odmrznute i reususpendirane. U tom slučaju master mješavinu nemojte centrifugirati prije pipetiranja.

2. Pipetirajte 12 μL RT-qPCR mix u pojedinačne jažice prema pripremljenoj pločici za testiranje u realnom vremenu.

3. Prijedite na korak 8. za pripremu kontrola i biološkog materijala.

## Za komplet kataloški broj MD04903 – strip sa 8 jažica

4. Odredite broj reakcija koje su potrebne za testiranje, izbrojite broj uzoraka i dodajte tri dodatne reakcije: jedna za negativnu i dvije za pozitivnu kontrolu. Neiskorišteni strip sa 8 jažica ponovno skladištite, zaštitite od svjetlosti, te ga za buduće korištenje pohranite kako je upisano u **Poglavlju 5**.
5. Pobrinite se da je strip sa 8 jažica u potpunosti odmrznut.
6. **Kratko centrifugirajte strip sa 8 jažica kako biste osigurali homogenost.** Svaka zasebna jažica već sadrži 12 µL **COVID-19, Flu A/B, RSV Mix**, mješavinu koja je spremna za upotrebu NZYSupreme Multiplex RT-qPCR u jednome koraku master mješavina
7. Prijedite na korak **8.** za pripremu kontrola i biološkog materijala.

### Kontrole i uzorci

8. Za **negativnu kontrolu**, umjesto RNK predloška u jažicu za negativnu kontrolu dodajte 8 µL NTC-a. Konačan volumen treba biti 20 µL.
9. Za **biološke uzorke**, 8 µL svakog uzorka RNK dodajte u jažice prema pripremljenoj pločici za testiranje. Konačan volumen u svakoj jažici treba biti 20 µL.
10. Za dvije **pozitivne kontrole**, dodajte 8 µL COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1 (detektira SARS-CoV-2 ORF1ab, Influenza B NS2, RSV L i ljudske RP gene) te 8 µL COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2 (SARS-CoV-2 N, Influenza A M1, RSV L i ljudske RP gene) umjesto predloška za RNK. Konačan volumen treba biti 20 µL.
11. Komplete kataloških brojeva MD04901 i MD04902, prekrijte i zatvorite ploču sa prikladnim optičkim adhezivnim folijama ili čepovima. Za komplet katloškog broja MD04903, prekrijte strip sa 8 jažica sa dodatnim čepovima koji se nalaze u kompletu.
12. Reakcijsku pločicu/ strip sa 8 jažica stavite u instrument za PCR testiranje u realnom vremenu i protokol RT-qPCR provedite u skladu s uputama u sljedećem poglavljju.

‡ *Obratite pozornost kako strip sa 8 jažica visokog profila je izričita kompatibilan sa 0.2 mL termalnim uređajima..*

### 9.2 Programiranje PCR uređaja u realnom vremenu

Tabela u nastavku prikazuje standardni protokol optimiziran na više platformi. Međutim, ovi se uvjeti mogu prilagođavati i odobravati kako bi odgovarali različitim protokolima specifičnima uza pojedini stroj.

#### Predložene postavke za provođenje RT-PCR testa

CIKLUSI	TEMPERATURA	VRIJEME	KORAK
1	50 °C	10 min	Reverzna transkripcija
1	95 °C	3 min	Aktivacija polimeraze
40	95 °C	5 s	Denaturacija
	60 °C	30 s	Spajanje početnica/elongacija

\* Podatci o fluorescenciji u ovome koraku trebaju biti prikupljeni kroz kanale Texas Red, FAM, VIC/HEX and Cy5.

#### Fluorescentne boje & Detekcijski kanali

CILJEVI	FLUORESCENTNA BOJA	DETEKCIJSKI KANAL
COVID-19 (SARS-CoV-2)	Texas Red®	Texas Red/JUN
Flu A/B (Influenza A/Influenza B)	FAM™	FAM
RSV	HEX™	VIC/HEX or JOE
RNase P	Cy5™	Cy5

NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD kataloški broj MD04901 i MD04902 validirani su na sljedećim Real Time PCR sustavima: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche Life Science LightCycler® 96 System i Bio-Rad® CFX Opus. NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD kataloški broj MD04903 je validiran na sljedećim Real Time PCR sustavima: Applied Biosystems® 7500 i Bioer LineGene Mini S. Ako se koristi neka druga oprema, komplet treba odobriti korisnik korištenjem prethodnih karakteriziranih uzoraka (pozitivnih i negativnih).

## 10. Analiza podataka

### 10.1 Kriterij za validaciju provedbe testa

Analizu podataka obavlja računalni program uređaja. Uzimajući u obzir razlike različitih uređaja za PCR testiranje u realnom vremenu, računalni program prag za četiri fluorescentna signala (Texas Red, FAM, VIC/HEX i Cy5) utvrđuje automatski, uz mogućnost ručnog podešavanja ako je to potrebno. Prije analize rezultata uzoraka, preporučujemo da provjerite je li PCR testiranje u realnom vremenu valjano. Tako za svaku ploču potvrdite jesu li rezultati za pozitivnu i negativnu kontrolu provedeni prema očekivanju, u skladu sa sljedećim kriterijima:

**Pozitivna kontrola:** amplifikacijske krivulje FAM (Influenza B u Kontrolni 1 i Influenza A u Kontrolni 2), Texas Red (SARS-CoV-2 ORF1ab gene u Kontrolni 1 i N gene u Kontrolni 2), VIC/HEX (RSV L gene) i Cy5 (RP gene) su pozitivne. Amplifikacija pozitivnih kontrola očekuje se pri Cts < 32, u četiri kanala. Neispunjavanje ovog kriterija kontrole kvalitete bitan je pokazatelj da je eksperiment kompromitiran.

**Negativna kontrola (nema reakcije na predlošku):** nije utvrđena amplifikacija. Ako su krivulje negativne kontrole (Texas Red, FAM; VIC/HEX i Cy5) sigmoidalne, postoji mogućnost da je došlo do kontaminacije uzorka. Ponovite testiranje u skladu s dobrom praksom RT-qPCR testiranja

Ako su kontrole u skladu s očekivanjima, testiranje je **valjano**. Nastavite s interpretacijom rezultata testiranih uzoraka. Ako neka od kontrola nije dala očekivane rezultate ispitivanje je kompromitirano ili je nepravilno izvedeno i treba ga smatrati **nevažecim**.

**Ponovite testiranje**

*Ako se problem ponavlja, obratite se proizvođaču*

**10.2 Interpretacija rezultata testiranja**

NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD koristi sljedeće Ct cutoff vrijednosti za interpretaciju rezultata:

CT VRIJEDNOST	INTERPRETACIJA REZULTATA
Amplifikacija Ct ≤35	Utvrđeno (+) → POZITIVNO
Nema amplifikacije Ct>35	Nije utvrđeno (-) → NEGATIVNO

**SARS-CoV-2 je utvrđen** ako Texas Red amplifikacijska krivulja pokazuje sigmoidalni oblik sa Ct≤35, neovisno o dobivenome rezultatu P (Cy5) u ispitivanju.

**Influenza A i/ili Influenza B je utvrđena** ako FAM amplifikacijska krivulja pokazuje sigmoidalni oblik sa Ct≤35, neovisno o dobivenome rezultatu P (Cy5) u ispitivanju.

**RSV je utvrđen** ako VIC/HEX amplifikacijska krivulja pokazuje sigmoidalni oblik sa Ct≤35, neovisno o dobivenome rezultatu P (Cy5) u ispitivanju.

**SARS-CoV-2, Influenza A i/ili Influenza B, RSV nisu utvrđeni** ako Texas Red, FAM i VIC/HEX nisu amplificirane ili se amplificiraju sa Ct>35, dok RNase P (Cy5) testiranje pokazuje pozitivnu sigmoidalnu krivulju Ct≤40).

**Test nije važeci** ako su ispitivanja na SARS-CoV-2, Influenza A/B, RSV i RNase P negativna. Testiranje treba ponoviti s nukleinskom kiselinom ponovno pročišćenom iz uzorka.

Tabela u nastavku sažeto prikazuje interpretaciju glavnih rezultata (ocjenu ukupnog oblika krivulja amplifikacije; **na pravu amplifikaciju upućuju samo sigmoidalne krivulje**

SARS-CoV-2 (TEXAS RED)	INFLUENZA A/B (FAM)	RSV (VIC/HEX)	RP (CY5)	INTERPRETACIJA REZULTATA
+	-	-	+/-*	SARS-CoV-2 utvrđen → POZITIVNO
-	+	-	+/-*	Influenza A/B utvrđena → POZITIVNO
-	-	+	+/-*	RSV → POZITIVNO
+	+	-	+/-*	SARS-CoV-2 i Influenza A/B utvrđeni → POZITIVNO
+	-	+	+/-*	SARS-CoV-2 i RSV utvrđeni → POZITIVNO
-	+	+	+/-*	Influenza A/B i RSV utvrđeno → POZITIVNO
+	+	+	+/-*	SARS-CoV-2, Influenza A/B, RSV utvrđeno → POZITIVNO
-	-	-	+	SARS-CoV-2, Influenza A/B i RSV nisu utvrđeni → NEGATIVNO
-	-	-	-	Testiranje nije valjano, ponovite ekstrakciju

\* Detekcija Unutarnje kontrole na Cy5 kanalu nije potrebna za pozitivne rezultate na Texas Red, FAM, or VIC/HEX detekcijskim kanalima. Visoka koncentracija/velika prisutnost virusne RNA u uzorku može dovesti od odsutnog ili inducirano signala..

**Napomena:** Interpretacijom rezultata mora se razjasniti mogućnost lažno negativnih ili lažno pozitivnih rezultata.

- Iako je rizik od lažno negativnih rezultata manji jer je ovaj test osmišljen s dvojnim ciljem, lažno negativni rezultati mogu biti posljedica:
  - nepravilnog uzimanja uzorka, rukovanja i/ili čuvanja uzoraka.
  - Uzorka prikupljenog izvan virulentne/simptomatske faze.
  - Degradacije uzorka.
  - Prisutnosti RT-qPCR inhibitora.
  - Mutacije u genomu virusa.
  - nepridržavanja postupaka navedenih u ovom priručniku.
  - korištenja neodobrenog kompleta za ekstrakciju ili platforme za PCR u realnom vremenu.
- Lažno pozitivni rezultati mogu biti posljedica:
  - nepravilnog rukovanja uzorcima koji sadrže visoku koncentraciju virusne RNK. Visoka mogućnost detekcija RT-qPCR metode za ukriženu kontaminaciju mora se uzeti u obzir tijekom RNK ekstrakcije.
  - nepravilnog rukovanja pozitivnim kontrolama.
  - nepravilnog rukovanja amplificiranim proizvodom (postamplifikacijska ploča).



Negativan nalaz ne isključuje infekciju i ne bi ga trebalo koristiti kao jedinu osnovu za donošenje odluke o liječenju ili drugom obliku postupanja s bolesnikom. Nadalje, ovim se testom ne mogu isključiti bolesti koje uzrokuju drugi bakterijski ili virusni patogeni organizmi.

## 11. Ocjena uspješnosti

Uspješnost ovog kompleta provjerena je za instrumente navedene u poglavlju 9.2 (pogledajte ranije navedeno poglavlje) Ako se koristi neka druga oprema, komplet treba odobriti korisnik korištenjem prethodnih karakteriziranih uzoraka (pozitivnih i negativnih).

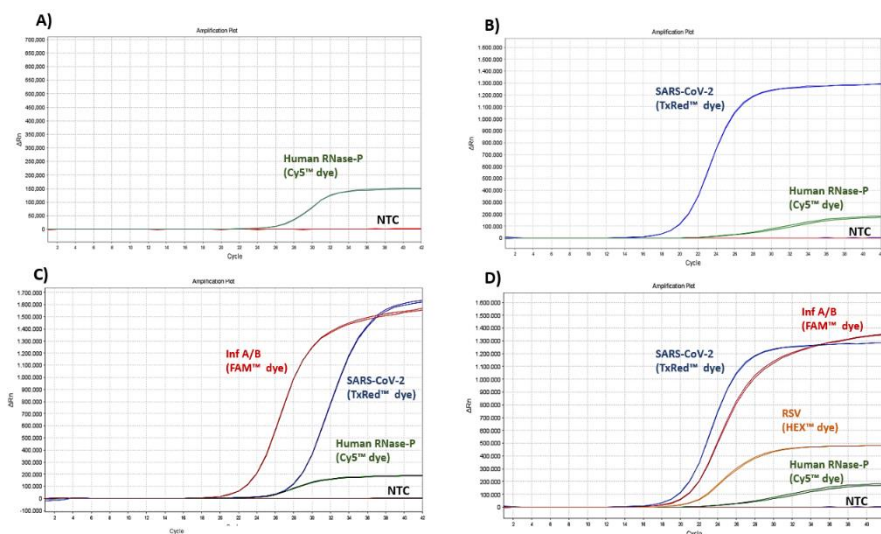
### 11.1 Očekivani rezultati

Tipični dijagrami amplifikacije za negativne kliničke uzorke (slika 1A) ili uzorke uzete od bolesnika inficiranih virusom SARS-CoV-2 (Slika 1B), ko-infekcije sa SARS-CoV-2 i Influenza A/B (C) i ko-infekcije sa SARS-CoV-2, Influenza A/B, i RSV (D), prikazani su na Slici 1.

### 11.2 Limiti detekcije (LoD) – Analitička osjetljivosti

Analitička osjetljivost definirana je kao najniža koncentracija analita koja se može pouzdano detektirati s pouzdanošću od 95 %. Ocjenjivana je ispitivanjem nukleinskih kiselina SARS-CoV-2, RSV, Influenza A i Influenza B s različitim brojem kopija pojedinačno ili uz dodani standard (engl. spiked) u RNK ekstrahiranu iz negativnog uzorka oro- nazofarinksa, s pomoću tri različite serije kompleta uz praćenje standardnih uvjeta reakcije na testiranje. Testiranja su se ponavljala kroz četiri dana, izrađeno je 48 replikata svake ispitane koncentracije. Zajedno, ovi podatci su otkrili kako NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD otkriva 0.25 kopija/ $\mu$ L SARS-CoV-2, 0.375 kopija/ $\mu$ L Influenza A, 0.375 kopija/ $\mu$ L Influenza B i 0.375 kopija/ $\mu$ L RSV s pouzdanošću od  $\geq$ 95%.

Tako je utvrđeno kako pokusni limit detekcije (LoD) iznosi 0.25 kopija/ $\mu$ L ili 250 kopija/mL SARS-CoV-2, 0.375 kopija/ $\mu$ L ili 375 kopija/mL za RSV, 0.375 kopija/ $\mu$ L ili 375 kopija/mL za Influenza A te 0.375 kopija/ $\mu$ L ili 375 kopija/mL za Influenza B. Pokusni LoD je potvrđen za MD04901 i MD04902 od strane dva različita operatora korištenjem triju kit u jednom eksperimentu od ukupno 48 replikata matrice negativnog brisa oro- nazofarinksa (OPS/NPS) kao uzorka, kojima su dodavani (eng. Spiked) različitim koncentracijama virusa (inaktiviranih) i to SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV A ili RSV B. Bilo NPs ili OPS uzorcima dodavane su različite koncentracije virusa sljedećih sojeva: SARS-CoV-2 (Omicron varijanta izolat) virus, Influenza A virus: soj A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09, soj A/Singapore/ INFIH-16-0019/2016 (H3N2), Influenza B virus soj B/Colorado/06/2017 (Victoria lineage) i soj B/Phuket/3073/2013 (Yamagata loza), RSV A i RSV B (soj CH93 (18)-18), u nekoliko koncentracija te se pristupilo testiranju sa NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD. LoD kompleta je potvrđen za komplet kataloškog broja MD04903 od strane dva različita operatora, pritom koristeći tri serijska broja kompleta. Ovaj je eksperiment obuhvatio ukupno 48 replikata negativnih OPS/NPS uzoraka, kojima su dodane različite koncentracije virusa SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV A ili RSV B.



**Slika 1. Otkrivanje ciljeva virusa SARS-CoV-2, influence A/B i ljudskog gena RNase-P iz negativnih kliničkih uzoraka (A) ili kliničkih uzoraka zaraženih virusom SARS-CoV-2 (B), virusom influence A i/ili Influence B (C) ili i virusom SARS-CoV-2 and Influenza A/B (C) i ko-infekcije sa SARS-CoV-2, Influenza A/B, i RSV (D).** Plava krivulja, otkrivanje ciljeva SARS-CoV-2 vRNA kroz kanal Texas Red/JUN . Crvena krivulja, detekcija ciljeva virusa influence A i/ii influence B kroz kanal FAM™ . Narančasta krivulja, detekcija RSV L gene kroz VIC/HEX kanal. Zelena krivulja, detekcija ljudskog gena RNase P gena kroz Cy5 kanal.

Analitička osjetljivost NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD u kontekstu ko-infekcije (kompetitivna interferencija) kao scenarija ocjenjivana je provedbom niza serijskih eksperimenata razrjeđivanja korištenjem lažnih uzoraka koinfekcije za svaki od dva virusna cilja. Za stvaranje lažnih uzoraka koinfekcije, točno  $10^3$  kopija RSV,  $10^3$  kopija Influenza A i  $10^3$  kopija Influenza B nukleinskih kiselina dodano je standardnoj krivulji za SARS-CoV-2. Nasuprot tome,  $10^3$  kopija SARS-CoV-2 i  $10^3$  kopija RSV dodano je standardnoj krivulji zasebno za Influenza A i Influenza B. Naposljetku  $10^3$  kopija SARS-CoV-2,  $10^3$  kopija Influenza A te  $10^3$  kopija Influenza B nukleinskih kiselina dodani su RSV standardnoj krivulji. Četverostruki uzorci triju serija kompleta (što ukupno čini 12 replikata po jednom razrjeđivanju) ispitano je kompletno za RT-qPCR multiplex testiranje COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD kako bi se odredila osjetljivost ispitivanja kad je u uzorku prisutno više virusnih ciljeva. Podatci su utvrdili kako je LoD SARS-CoV-2 ostao nepromijenjen u slučaju ko-infekcije. Međutim, LoD RSV se promijenio u 0.75 kopija/ $\mu$ L ili 750 kopija/mL te Influenza B se promijenila 1.25 kopija/ $\mu$ L ili 1250 kopija/mL u slučaju koinfekcije. Za Influenza A LoD se promijenio u 2.5 kopija/ $\mu$ L ili 2500 kopija/mL u slučaju ko-infekcije.



### 11.3 Analitička reaktivnost (inkluzivnost) i analitička specifičnost

Inkluzivnost i unakrsna reaktivnost ocjenjivani su *in silico* analizom oligonukleotidnih proba i početnica na patogene organizme povezane sa virusom SARS-CoV-2, Influenza A i Influenza B, RSV odnosno normalne patogene organizme koji uzrokuju infekciju sa sličnim simptomima. Nakon provedene *in silico* analize, uočeno je da se ovakvim detektiranjem otkrivaju svi SARS-CoV-2, Influenza A i Influenza B, i RSV virusni sojevine prikazuje nikakva reaktivnost s virusima koji nisu s njima povezani. Osim *in silico* analize, testiranje, COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, obavljeno je na nukleinskim kiselinama uobičajenih mikroba oralnog i dišnog sustava koje je obuhvatilo *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Dickeya dadantii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia nova*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces albidoflavus*. Nijedan od patogena testiran NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD nije generirao signal amplifikacije koji bi se mogao detektirati.

Učinak 17 potencijalnih interferirajućih tvari je uvršteno u testiranje koje se sastojalo od negativnog nasofaringealnog uzorka kojem je dodan SARS-CoV-2 pozitivan primjerak na ~3x LoD. Potencijalno interferirajuće tvari su dodane uzorcima u koncentracijama koje se mogu naći u maksimalnim razinama unutar uzorcima respiratornog sustava kod ljudi koji su opisani u literaturi. Svi testovi su provedeni u triplikatu koristeći tri proizvodne serije, te su rezultati uspoređeni sa testom koji je predstavljao kontrolni test i nije sadržavao interferirajuće tvari. Nakon testiranja, rezultati su pokazali kako niti jedna molekula nije uzorkovala promjenu u osjetljivosti testa. Tablica ispod prikazuje rezultate testiranja. Svi eksperimenti su se odvijali na Applied Biosystems™ 7500 FAST Real-time PCR uređaju (koristeći 7500 software v2.3).

POTENCIJALNA INTERFERIRAJUĆA TVAR	AKTIVNI SASTOJAK	KONCENTRACIJA U UZORKU	INTERFERIRA DA (D), NE (N)				
			SARS-CoV-2	FLU A	FLU B	RSV A	RSV B
Izotonična morska voda (Rhinomer)	NaCl	15% v/v	N	N	N	N	N
Sprej za grlo, oral anestetik, i analgesik (Strepfen)	Flurbiprofen	5% v/v	N	N	N	N	N
Otopina za nos (Sprej za alergije – Vibrocil)	Fluticasone propionate	5% v/v	N	N	N	N	N
Nazalni kortikosteriodni sprej (Nasomet)	Mometasone furoate	5% v/v	N	N	N	N	N
Nazalni kortikosteriodni sprej (Pulmicort)	Budesonide	5% v/v	N	N	N	N	N
Antimikrobna terapija, sistematska (Trobex)	Trobamycin	10 µg/mL	N	N	N	N	N
Analgetik za usta, protupalni (Pyralvex)	Rhubard extract, salicilna kiselina	5% v/v	N	N	N	N	N
Antifungalni I antibakterijski (Daktarin)	Miconazole	5 mg/mL	N	N	N	N	N
Antiseptici za ispiranje usta (Eludril Gé)	Chlorhexidine gluconate, Chlorobutanol hemihydrate	5% v/v	N	N	N	N	N
Sirupi za kašalj (Codipront)	Codeine, Phenyltoloxamine citrate	5% v/v	N	N	N	N	N
Puna krv (ljudska)	-	4% v/v	N	N	N	N	N
Antiviralni lijek (Tamiflu)	Oseltamivir	7.5 mg/mL	N	N	N	N	N
Mukolitik (Mucosolvan)	Ambroxol hydrochloride	5% v/v	N	N	N	N	N
Kapi za nos (Nasarox)	Oxymetazoline Chlorhydrate	10% v/v	N	N	N	N	N
Antibiotic, nazalna primjena (Bactroban)	Mupirocin	5 mg/mL	N	N	N	N	N
Slina (ljudska)	-	25% v/v	N	N	N	N	N
Etanol	Alkohol	5% v/v	N	N	N	N	N

### 11.4 Preciznost

Preciznost ispitivanja NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD utvrđena je ponovljenim testiranjem pozitivnih uzoraka koji predstavljaju dvije razine virusnog opterećenja, 3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji, uz dodatni standard (eng. spiked) u RNA ekstrahiranu iz negativnih orofaringealnih uzoraka, pri tome koristeći 3 različite proizvodne serije kompleta uz praćenje standardnih uvjeta reakcije na testiranje. Preciznost se ocjenjivala mjerenjem prosjeka Cq, Cq koeficijenta varijacije i postotka detekcije replikata, kako je u nastavku opisano za svaki pojedini slučaj. Podaci su sažeti u tri tabele (po jedna za svaki cilj) prikazane u nastavku.

#### 11.4.1 Ponovljivost

Ponovljivost je ocjenjivao jedan operator analizom 12 replikata istog uzorka sample (3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji), što ukupno čini 24 provedena testiranja po cilju.

#### 11.4.2 Dnevna reproducibilnost

Dnevnu reproducibilnost (reproducibilnost unutar laboratorija) ocjenjivao je jedan voditelj analizom 48 replikata svakog uzorka (3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji), tijekom 4 dana, s 12 replikata svake koncentracije po danu (ukupno je obavljeno 96 ispitivanja po cilju).

### 11.4.3 Reproducibilnost prema proizvodnim serijama "eng. Lot – to – lot"

Reproducibilnost među proizvodnim serijama ocjenjivao je jedan operator analizom 84 replikata svakog uzorka (3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji) koristeći 3 različite serije kompleta s 28 replikata po seriji.

### 11.4.4 Reproducibilnost po operatoru

Reproducibilnost po voditelju ocjenjivali su testiranjem 24 replikata svakog uzorka (3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji), i to četiri različita voditelja sa 6 replikata po operatoru te po virusnom opterećenju, što ukupno čini 36 replikata po voditelju, uključujući 3 cilja kompleta.

### 11.4.5 Reproducibilnost među uređajima

Reproducibilnost među uređajima pri čemu su se koristili kompleti kataloških brojeva MD04901 i MD04902 odredio je operator kroz testiranje 24 replikata svakog uzorka (3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji), koristeći dva različita qPCR uređaja (Applied Biosystems™ 7500 FAST, Applied Biosystems™ QuantStudio 5), u ukupno 48 testova po uzorku. Dodatno, reproducibilnost među uređajima koristeći komplet referentnog broja MD04903 također je odredio operator kroz testiranje 24 replikata svakog uzorka (3x LoD i 30x LoD kopija po reakciji), koristeći dva različita qPCR uređaja (Applied Biosystems™ 7500 i Bioer LineGene Mini S), u ukupno 48 testova po uzorku.

#### Preciznost NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, kod otkrivanja ciljeva SARS-CoV-2.

VARIJABLA		SARS-CoV-2 (KOPIJA/REAKCIJI)	
		3X LOD	30X LOD
PONOVLJIVOST	n	12	12
	Srednji Cq	33.84	30.75
	Koeficijent varijacije (%)	0.61	0.19
	% detekcije replikata	100	100
DNEVNA PONOVLJIVOST	n	48	48
	Srednji Cq	33.79	30.66
	Koeficijent varijacije (%)	2.02	1.62
	% detekcije replikata	100	100
PONOVLJIVOST PO SERIJAMA	n	84	84
	Srednji Cq	33.82	30.59
	Koeficijent varijacije (%)	1.96	1.60
	% detekcije replikata	100	100
PONOVLJIVOST PO OPERATORU	n	24	24
	Srednji Cq	33.86	30.73
	Koeficijent varijacije (%)	1.26	1.13
	% detekcije replikata	100	100
PONOVLJIVOST MEĐU UREĐAJIMA	n	48	48
	Srednji Cq	33,75	30.80
	Koeficijent varijacije (%)	2.25	2.62
	% detekcije replikata	100	100

#### Preciznost NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, kod otkrivanja ciljeva Influenza A.

VARIJABLA		INFLUENZA A (KOPIJA/REAKCIJI)	
		3X LOD	30X LOD
PONOVLJIVOST	n	12	12
	Srednji Cq	34.39	31.26
	Koeficijent varijacije (%)	3.31	1.05
	% detekcije replikata	100	100
DNEVNA PONOVLJIVOST	n	48	48
	Srednji Cq	34.30	30.92
	Koeficijent varijacije (%)	2.90	1.52
	% detekcije replikata	100	100
PONOVLJIVOST PO SERIJAMA	n	84	84
	Srednji Cq	34.28	30.76
	Koeficijent varijacije (%)	2.55	1.88
	% detekcije replikata	100	100
PONOVLJIVOST PO OPERATORU	n	24	24
	Srednji Cq	34.14	30.97
	Koeficijent varijacije (%)	1.43	0.57
	% detekcije replikata	100	100
PONOVLJIVOST MEĐU UREĐAJIMA	n	48	48
	Srednji Cq	33,82	30.28
	Koeficijent varijacije (%)	3.39	3.09
	% detekcije replikata	100	100

**Preciznost NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, kod otkrivanja ciljeva Influenza B.**

VARIJABLA		INFLUENZA B (KOPIJA/REAKCIJI)	
		3x LoD	30X LOD
<b>PONOVLJIVOST</b>	n	12	12
	Srednji Cq	33.87	30.63
	Koeficijent varijacije (%)	1.85	1.19
	% detekcije replikata	100	100
<b>DNEVNA PONOVLJIVOST</b>	n	48	48
	Srednji Cq	33.75	30.23
	Koeficijent varijacije (%)	2.10	2.56
	% detekcije replikata	100	100
<b>PONOVLJIVOST PO SERIJAMA</b>	n	84	84
	Srednji Cq	33.73	30.23
	Koeficijent varijacije (%)	1.99	2.00
	% detekcije replikata	100	100
<b>PONOVLJIVOST PO OPERATORU</b>	n	24	24
	Srednji Cq	33.70	30.34
	Koeficijent varijacije (%)	1.51	0.65
	% detekcije replikata	100	100
<b>PONOVLJIVOST MEĐU UREĐAJIMA</b>	n	48	48
	Srednji Cq	33.59	30.01
	Koeficijent varijacije (%)	2.86	2.46
	% detekcije replikata	100	100

**Preciznost NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD kod otkrivanja ciljeva RSV.**

VARIJABLA		RSV (KOPIJA/REAKCIJI)	
		3X LOD	30X LOD
<b>PONOVLJIVOST</b>	n	12	12
	Srednji Cq	33.66	30.126
	Koeficijent varijacije (%)	1.00	0.84
	% detekcije replikata	100	100
<b>DNEVNA PONOVLJIVOST</b>	n	48	48
	Srednji Cq	33.24	30.05
	Koeficijent varijacije (%)	2.55	0.84
	% detekcije replikata	100	100
<b>PONOVLJIVOST PO SERIJAMA</b>	n	84	84
	Srednji Cq	33.50	30.26
	Koeficijent varijacije (%)	2.16	1.23
	% detekcije replikata	100	100
<b>PONOVLJIVOST PO OPERATORU</b>	n	24	24
	Srednji Cq	33.32	30.18
	Koeficijent varijacije (%)	2.85	1.33
	% detekcije replikata	100	100
<b>PONOVLJIVOST MEĐU UREĐAJIMA</b>	n	48	48
	Srednji Cq	32,67	29.83
	Koeficijent varijacije (%)	2.97	2.14
	% detekcije replikata	100	100

**11.5 Klinička evaluacija**

Uspješnost izvođenja NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD procjenjena je na prikupljenim uzorcima oro – nazofaringealnim brisevima u laboratoriju za molekularnu dijagnostiku . Ukupno je testirano 1516 kliničkih uzoraka, od toga 850 negativnih uzoraka; 293 pozitivnih klinički uzoraka na SARS-CoV-2 (prikupljenih od Svibnja 2021 do Lipnja 2022, period koji pokriva pojavu različitih valova SARS-CoV-2); 123 pozitivnih kliničkih uzoraka na Influenza A (41 za AH1, 41 za AH1N1 pdm, 41 za AH3); 82 pozitivna klinička uzorka na Influenza B (41 za Vitoria lozu te 41 za Yamagata lozu); 168 pozitivna uzorka na RSV (88 za podtip A i 88 podtip B). Podatci su utvrdili 99%-tno poklapanje za sve pozitivne i negativne testirane uzorke. Nadalje, usporedba kliničke izvodljivosti NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD kataloški broj MD04901 i kataloški broj MD04903 također je izvedena. Podatci su utvrdili podudaranje 100% kliničke osjetljivosti (PPA) te 100% kliničke specifičnosti (NPA) za sve pozitivne i negativne testirane uzorke.

**12. Kontrole kvalitete**

Sve komponente NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD ispitane su u skladu s ranije opisanim protokolima. Heksaplex real-time PCR sustav omogućava detekciju ciljeva prethodno opisanih za identifikaciju SARS-CoV-2 viralne RNA (RdRp i N gena), Influenza A/B viralne RNA (M1 i NS2 gena), RSV viralne RNA (L gene), kao i ljudske RNase P (RP gena). Pozitivne amplifikacije uočene su za ciljane gene, pozitivnu kontrolu i interne kontrole kroz Texas Red, FAM, HEX/VIC te Cy5 kanale, prema njima pripadajućim bojama kompleta početnica/proba.












### 13. Tehnička podrška

Za tehničku podršku obratite se našem posebnom timu za tehničku podršku na broj telefona: +351 (0) 21 364 35 14 ili e-poštom na: info@nzytech.com.

### 14. Robne marke i izjave o odricanju od odgovornosti

Sve robne marke koje se pojavljuju u ovom priručniku vlasništvo su njihovih vlasnika..

### 15. Objašnjenje simbola

	<i>In vitro</i> dijagnostički medicinski proizvod		Pogledati Upute za uporabu
	Kataloški broj		Proizvođač
	Broj serije		Upotrijebiti do
	Ograničenje temperature		Dovoljno za
	Pozitivna kontrola		Držati podalje od sunčeve svjetlosti (mješavina početnica/proba)
	Negativna kontrola		

## 16. Izjava o sukladnosti

**Naziv proizvoda:** COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD

**Kataloški broj:** MD04901, MD04902 i MD04903

**Namjena:** SARS-CoV-2, Influenza A i Influenza B, te RSV kvalitativno utvrđivanje

**Klasifikacija:** Ostalo (nije pokriveno Annex II ili nije namjenjeno za samotestiranje) u skladu sa EC Direktivom 98/79/EC

**Proizvođač:** NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Društvo, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, ovime izjavljuje da je proizvod na koji se odnosi ova izjava o svojstvima, u skladu sa sljedećim normama i drugim normativnim ispravama ISO 9001:2015 i ISO 13485:2016, temeljem odredbi Direktive 98/79/EC o *in vitro* dijagnostičkim medicinskim uređajima i EU Regulative 2017/746 o *in vitro* dijagnostičkim medicinskim proizvodima kako je prenesena u nacionalna zakonodavstva država članica Europske unije.

Tehnička dokumentacija o proizvodu čuva se u NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisabon, Portugal.



Joana Brás, PhD

Tehnički direktor

## 17. Literatura

Swets MC, Russell CD, Harrison EM, Docherty AB, Lone N, Girvan M, Hardwick HE; ISARIC4C Investigators, Visser LG, Openshaw PJM, Groeneveld GH, Semple MG, Baillie JK (2022). Lancet 399(10334):1463-1464. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00383-X.

Gomez GB, Mahé C, Chaves SS (2021). Uncertain effects of the pandemic on respiratory viruses. Science 372:1043-1044.

Hansen CL, Chaves SS, Demont C, Viboud C.J (2022). Mortality Associated With Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the US, 1999-2018. AMA Netw Open. 5(2):e220527. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.0527.

Dhanasekaran, V., Sullivan, S., Edwards, K.M. et al. (2022). Human seasonal influenza under COVID-19 and the potential consequences of influenza lineage elimination. Nat Commun 13, 1721 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29402-5>.

Chotpitayasunondh T, Fischer TK, Heraud JM, Hurt AC, Monto AS, Osterhaus A, Shu Y, Tam J (2021). Influenza and COVID-19: what does co-existence mean? Influenza Other Respir Viruses. 15: 407-412

WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. 13 March 2020. Available online at <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf>

WHO: Q&A: Influenza and COVID-19 - similarities and differences. 30 September 2021. Available online at <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-a-similarities-and-differences-covid-19-and-influenza>.

