COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD

COVID-19 & Grippe A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD

REF MD04851, 96 Reaktionen

***Nur für den professionellen* In vitro *diagnostischen Gebrauch*.**

CE IVD

DE

Instructions for Use (IFU) / Gebrauchsanweisung

IM-003de

VERSION 01/2022, Dezember 2021

NZYTech Genes & Enzymes
Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lissabon, Portugal
Tel.:+351 213643514 Fax: +351 217151168
www.nzytech.com

Inhalt

1. Einführung 3
2. Verwendungszweck 3
3. Prinzipien des Tests 3
4. Zusammensetzung des Kits 5
5. Bedingungen für Lagerung, Stabilität und Handhabung 5
6. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Instrumente 5
7. Probenentnahme und -vorbereitung 6
8. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise 6
   8.1. Sicherheitshinweise 6
   8.2. Anforderungen für die Handhabung und das Verfahren 6
9. Prüfverfahren 7
   9.1. Reaktionseinrichtung 8
   9.2. Programmierung des Echtzeit-PCR-Instruments 8
10. Datenanalyse 9
   10.1. Kriterien für die Laufvalidierung 9
   10.2. Interpretation der Testergebnisse 10
11. Bewertung der Performance 12
   11.1. Erwartete Ergebnisse 12
   11.2. Nachweisgrenze (LoD) - Analytische Sensitivität 12
   11.3. Analytische Reaktivität (Inklusivität) und analytische Spezifität 14
   11.4. Präzision 15
   11.5. Klinische Bewertung: 17
12. Qualitätskontrolle 17
13. Technischer Support 18
14. Warenzeichen und Haftungsausschlüsse 18
15. Erläuterung der Symbole 18
16. Konformitätserklärung 19
17. Referenzen 20

1. Einführung

Die derzeitige Pandemie der Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19), die zuerst in China entdeckt wurde und sich rasch in den meisten Ländern ausbreitet, hat weltweit Morbidität und Mortalität in einem noch nie dagewesenen Ausmaß verursacht, was zu einer globalen Gesundheitskrise und einer Überlastung der Gesundheitsressourcen geführt hat. Das Schwere Akute Respiratorische Syndrom Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), ist ein neuartiges *Betacoronavirus* mit phylogenetischer Ähnlichkeit zu SARS-CoV. Die saisonale Grippe, auch saisonale Influenza genannt, ist eine ansteckende Virusinfektion der Atemwege, die weltweit eine der Hauptursachen für Morbidität, Mortalität und die Belastung des Gesundheitswesens darstellt. Die Sterblichkeitsrate ist jedoch viel niedriger als bei COVID-19. Die Influenzavirustypen A und B sind die vorherrschenden Typen zirkulierender Influenzaviren, und die meisten Influenzaepidemien gehen auf Typ A zurück. Sowohl Coronaviren als auch Influenzaviren sind hoch ansteckende Atemwegserkrankungen, die durch Kontakt, Tröpfcheninfektion (Husten und Niesen) und kontaminierte Oberflächen übertragen werden. COVID-19 kann klinisch mit einer durch Influenzaviren verursachten Lungenentzündung verwechselt werden, und bei einer Koinfektion gibt es bisher nur schlechte Prognosen. Die Überschneidung der Grippesaison mit der COVID-19-Pandemie erschwert das klinische Management von Patienten mit Atemwegssymptomen. Die frühzeitige Erkennung von SARS-CoV-2 und Influenza-Viren A/B ist entscheidend für die rasche Behandlung infizierter Patienten mit Atemwegserkrankungen und damit für die Eindämmung der Ausbreitung von Infektionen. Kombinationstests sowohl für COVID-19 als auch für Influenza werden von Vorteil sein, da eine einzige Probe zur Unterscheidung der beiden Infektionen bei Patienten mit ähnlichen Symptomen verwendet werden könnte.

2. Verwendungszweck

Das von NZYTech entwickelte COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) ist ein molekularer Test für den schnellen qualitativen Nachweis der Erreger von COVID-19 und Influenza (Grippe A und Grippe B) in humanen biologischen Proben. Dieses Kit unterscheidet jedoch nicht zwischen den Influenza-Typen A und B, da beide im selben Fluoreszenzkanal für FAM nachgewiesen werden. Darüber hinaus werden andere Beta-Coronaviren oder Influenza-Viren, z. B. Influenza C, mit diesem Kit nicht nachgewiesen. Dieser Test ist als Hilfsmittel für die Diagnose von SARS-CoV-2 und Grippe in Kombination mit klinischen und epidemiologischen Risikofaktoren vorgesehen. Ein positives Ergebnis weist auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2- und / oder Influenz-RNA hin, obwohl eine klinische Korrelation mit der Patientengeschichte und anderen diagnostischen Informationen notwendig ist, um den Infektionsstatus des Patienten zu bestimmen. Negative Ergebnisse schließen eine Infektion nicht aus, so dass das Ergebnis des Tests nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen über die Behandlung des Patienten verwendet werden sollte. Dieses Set ist für die Verwendung durch im Labor geschultes Personal vorgesehen, das speziell in Echtzeit-PCR-Techniken und in der In-vitro-Diagnostik unterwiesen wurde.

3. Prinzipien des Tests

Das COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) von NZYTech bietet den kompletten Satz an Reagenzien und Testern für den qualitativen Nachweis der SARS-CoV-2- und/oder Influenza-Genome mittels gängiger Echtzeit-PCR-Plattformen (siehe erforderliche

Gerätespezifikationen in **Abschnitt 6**). SARS-CoV-2 wird durch den Nachweis von RT-qPCR Targets in den RdRp- und N-Genen identifiziert. Im Gegensatz dazu werden Influenza-A- und Influenza-B-Viren durch die Amplifikation von Targets in den M1- bzw. NS2-Genen nachgewiesen. Das COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) von NZYTech ist so aufgebaut, dass es ein möglichst breites Nachweisprofil aufweist und gleichzeitig spezifisch für die Genome von SARS-CoV-2 und Influenza Typ A und B ist. Es enthält den kompletten Satz an Reagenzien und Sonden zum Nachweis der drei viralen Genome, einschließlich einer wirksamen internen Kontrolle zur Bestätigung einer effizienten RNA- Proben-Extraktion und der Abwesenheit von PCR-Inhibitoren, um nur einige zu nennen. Dieses Kit zielt auf hochkonservierte Regionen des SARS-CoV-2 (einschließlich Delta (B.1.617.2) und Omicron (B.1.1.529) - und des Influenza A- und B-Genoms ab durch ein hochoptimiertes Primer - / Sonden-Set. Die Primer und Tester haben eine 100%-ige Homologie mit >95% von >10000 Genomsequenzen, die seit dem Februar 2021 in der GISAID-Datenbank verfügbar sind, Stand November 2022. Darüber hinaus weisen die Primer und Tester keine signifikante Homologie mit nicht verwandten Genomen auf, was diesen Test hochspezifisch macht. Die natürliche Evolution der Viren, die mit diesem Kit nachgewiesen werden, impliziert, dass täglich neue Sequenzinformationen verfügbar werden, was die bekannten viralen Anpassungsstrategien widerspiegelt. Daher überprüft NZYTech regelmäßig virale genomische Targets und wird, falls erforderlich, neue Versionen dieses Kits herausgeben. Die einstufige Echtzeit-RT-qPCR ist die schnellste und zuverlässigste Methode zum genauen Nachweis von SARS-CoV-2 und Influenza A- und B-Virus-RNAs. Das von NZYTech entwickelte COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) ist ein Multiplex Assay zum Nachweis von SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B und humanen Nukleinsäuren (als interne Positivkontrolle). Extrahierte und gereinigte RNA wird in cDNA transkribiert und anschließend in einer einzigen Reaktion mit fünf hochspezifischen Primer- / Test-Sets amplifiziert, und zwar für den Nachweis der SARS-CoV-2 RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) und der Nukleokapsid-Phosphoprotein (N)-Gene, der Influenza A- und B-Matrix (M1)- und Nonstructural 2 (NS2)-spezifischen Gene sowie des menschlichen Ribonuklease P (RNase P, RP)-Gens. Das Kit nutzt das sogenannte TaqMan® Prinzip. Dabei lagern sich die Proben spezifisch an ihre Zielgene an und werden bei der DNA-Amplifikation durch zwei flankierende Primer abgebaut, was zur Trennung des Reporterfarbstoffs vom Quencher und damit zu einem Anstieg der Fluoreszenz führt. Der Nachweis der internen Kontrolle (des humanen RNase P-Gens) bestätigt die Wirksamkeit des Extraktionsverfahrens sowie das Fehlen von PCR-Inhibitoren, die möglicherweise in den humanen biologischen Proben vorhanden sind. Um die Amplifikation der fünf spezifischen Targets in einer einzigen Reaktion identifizieren zu können, sind die SARS-CoV-2-, Influenza A/B- und humanen RNase P-spezifischen Proben unterschiedlich markiert, nämlich mit Texas Red®, FAM™ und HEX™ Reporterfarbstoffen. Beachten Sie, dass dieses Panel einen Duplex Assay in den Kanälen Texas Red® (SARS-CoV-2 RdRp- und N-spezifische Zielgene) und FAM™ (Influenza A- und Influenza B-spezifische Zielgene) enthält. Dies ermöglicht die Meldung einer additiven Leistung der Assays für den SARS-CoV-2-Nachweis, schließt jedoch eine Unterscheidung zwischen Influenza A/B-Infektionen aus. Darüber hinaus werden die fünf Primer / Test-Sets in optimierten Konzentrationen bereitgestellt, die gewährleisten, dass die Amplifikation von weniger häufig vorkommenden Nukleinsäuren nicht beeinträchtigt wird, wenn andere virale Targets in höheren Konzentrationen vorhanden sind.

4. Zusammensetzung des Kits

Das COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) von NZYTech bietet ein umfassendes Set an Reagenzien, die ausreichen, um 96 RT-qPCR-Reaktionen in einem einzigen Schritt durchzuführen.

Bestandteile des Kits		**Anzahl der Fläschchen**	**Volumen (pro Fläschchen)**
COVID-19/Flu MMix	NZYMultiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)	1	1050 µL
COVID-19/Flu Primer Mix	COVID-19 & Flu A/B Primer Mix (20x)	1	103 µL
COVID-19/Flu Probe Mix	COVID-19 & Flu A/B Probe Mix (20x)	1	103 µL
COVID-19/Flu Pos 1	COVID-19 & Flu A/B Positive Control 1 (SARS-CoV-2 ORF1ab, Influenza B NS2 und humane RP-Gene)	1	105 µL
COVID-19/Flu Pos 2	COVID-19 & Flu A/B Positive Control 2 (SARS-CoV-2 N, Influenza A M1 und humane RP-Gene)	1	105 µL
COVID/Flu Neg (NTC)	RNase/DNase-freies Wasser	1	105 µL

5. Bedingungen für Lagerung, Stabilität und Handhabung

Das COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) wird gekühlt versandt. Alle Komponenten sollten sofort nach Ankunft bei -80°C bis -15°C gelagert werden. Bei Verwendung sollten die Kit-Komponenten sofort nach Gebrauch in den Gefrierschrank zurückgelegt werden, um die Zeit in Raumtemperatur-Umgebung zu minimieren.

- Minimieren Sie die Anzahl der Einfrier-Auftauzyklen durch Lagerung in Arbeitsaliquoten. Gegebenenfalls können die Kit-Komponenten nach dem Auftauen in kleinere Volumen aliquotiert werden.
- Der COVID-19 & Flu A/B Probe Mix (20x) sollte vor Licht geschützt gelagert werden. Insbesondere darf der NZYMultiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix nach der Kombination mit Primern / Test-Mix nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden.
- Wenn das Paket, das den Satz schützt, beschädigt angekommen ist, wenden Sie sich bitte an NZYTech.
- Achten Sie auf das auf der Verpackung angegebene Verfallsdatum. NZYTech rät davon ab, das Kit nach dem Verfallsdatum zu verwenden. An diesem Datum muss das Kit gemäß den Entsorgungsanweisungen in **Abschnitt 8.2** entsorgt werden.

6. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Instrumente

- Echtzeit-PCR-Instrument, das die Fluoreszenzkanäle Texas Red®, FAM™ und HEX™ detektiert (bei Emissionswellenlängen von respektive 615, 520 und 556 nm). Siehe in **Abschnitt 11** die Gerätemodelle, für die das Kit validiert wurde.
- Geräte und Verbrauchsmaterialien zur Isolierung viraler RNA aus respiratorischen Proben.

- RNase/DNase-freie qPCR-Plastikgeräte: PCR-Gefäße, Streifen, Kappen, 96-Well-Platten, Klebefilme.
- Pipettierer und Filterspitzen (RNase/DNase frei).
- Einweghandschuhe.
- Vortex und Zentrifuge.

7. Probenentnahme und -vorbereitung

Verschiedene Faktoren, wie z. B. das Protokoll für die Probenentnahme aus humanen Atemwegsbereichen (nasopharyngeale oder oropharyngeale Abstriche, nasopharyngeale Spülungen / Aspirate, nasale Aspirate, Sputa, Rachenspülflüssigkeit und BAL), der Probentransport, die Lagerung und die Verarbeitungszeit sind entscheidend, um optimale Ergebnisse zu erzielen. Die gesammelten Proben sollten so bald wie möglich getestet werden. Die Proben sind bei niedrigen Temperaturen gemäß den Vorschriften zur biologischen Sicherheit zu transportieren und zu lagern. RNA oder Gesamtnukleinsäuren, die nach einem CE IVD-Protokoll extrahiert wurden, sind das Ausgangsmaterial für das NZYTech COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD). Bitte stellen Sie sicher, dass die RNA-Proben in Bezug auf Reinheit, Konzentration und Nukleinsäureintegrität geeignet sind. Ein $A_{260/280}$ Verhältnis von ~2 wird im Allgemeinen für reine RNA akzeptiert. Da Ethanol ein starker PCR-Inhibitor ist, muss er vor der Elution der Nukleinsäure während der Extraktion vollständig eliminiert werden. Das NZYTech-Kit integriert eine interne RNA-Extraktionskontrollreaktion, die auf humane RNA abzielt, die zusammen mit viraler RNA gereinigt wird. Humane RNA wird mit dem RNase P (RP) Primer/Sonden-Set amplifiziert. Dies ist nützlich, um die Effizienz der RNA-Isolierung und/oder das Vorhandensein von Inhibitoren während der Probenverarbeitung zu überprüfen.

8. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Wie bei jedem analytischen Testverfahren ist eine gute Laborpraxis unerlässlich. Befolgen Sie sorgfältig die in diesem Handbuch angegebenen Verfahren und Richtlinien, um sicherzustellen, dass der Test korrekt durchgeführt wird. Jede Abweichung davon kann zum Versagen des Tests führen oder fehlerhafte Ergebnisse verursachen. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Kits muss besonders darauf geachtet werden, Reagenzien und PCR Amplifikationsmischungen frei von Kontaminationen zu halten.

8.1. Sicherheitshinweise

Bevor Sie das Kit verwenden, lesen Sie bitte das Sicherheitsdatenblatt (SDB), das auf NZYTechs Website verfügbar ist (**www.nzytech.com**). Der Nachweis mit diesem Kit sollte nur von Personal durchgeführt werden, das in den entsprechenden technischen und sicherheitstechnischen Verfahren in entsprechend ausgestatteten Labors geschult ist. Internationale und nationale Richtlinien zur biologischen Sicherheit von Laboratorien sollten unter allen Umständen befolgt werden.

8.2. Anforderungen für die Handhabung und das Verfahren

- Nur für den professionellen in-vitro-diagnostischen Gebrauch.
- Dieses Kit nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwenden.

- Verwenden Sie die Testkomponenten nicht, wenn die Versiegelung des Kits beschädigt ist.
- Tauschen Sie keine Reagenzien verschiedener Produktionschargen aus.
- Es dürfen keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit Reagenzien dieses Testkits verwendet werden.
- Bei allen Verfahren sollten DNase/RNase-freie Einweg-Plastikbehälter und Pipetten verwendet werden.
- Verwenden Sie während des gesamten Protokolls DNase/RNase-freie Filterspitzen, um eine Kontamination mit Aerosolen und Flüssigkeiten zu verhindern.
- Probenvorbereitung, Reaktionsaufbau und Amplifikation sollten in verschiedenen Arbeitsbereichen durchgeführt werden.
- Eine Positivkontrolle enthält eine hohe Vervielfältigungszahl. Sie sollte geöffnet und außerhalb der Testproben und Kit-Komponenten verarbeitet werden, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie immer das im Kit enthaltene Wasser (COVID/Flu Neg / DNase-freies Wasser).
- Reinigen Sie Arbeitsflächen und Ausrüstung am Ende jedes Tests mit einem DNA/RNA-Entferner.
- Behandeln Sie die Post-Amplifikationsplatten mit Sorgfalt und entsorgen Sie sie unmittelbar nach Abschluss des Tests. Platten sollten nach Gebrauch stets in einen geeigneten Behälter für biologische Gefahrenstoffe entsorgt werden.
- Biologische Proben müssen unter Beachtung der entsprechenden Biosicherheitsvorkehrungen so behandelt werden, als ob sie infektiös wären.
- Rückstände von Chemikalien und Präparaten werden im Allgemeinen als gefährlicher Abfall betrachtet. Die Entsorgung dieser Art von Abfall wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt.
- Alle Ergebnisse sollten von einem Angehörigen eines Gesundheitsberufs im Zusammenhang mit der Krankengeschichte und den klinischen Symptomen des Patienten interpretiert werden.
- Ein negatives Ergebnis für einen PCR-Test schließt die Möglichkeit einer Infektion nicht endgültig aus.
- Befolgen Sie die guten Laborpraktiken, tragen Sie Schutzkleidung, tragen Sie ständig puderfreie Einweghandschuhe, tragen Sie Schutzbrille und Maske. Essen, trinken oder rauchen Sie nicht im Arbeitsbereich.

9. Prüfverfahren

Bitte lesen Sie die Gebrauchsanweisung vor der Durchführung des Tests sorgfältig durch. Denken Sie daran, dass alle Pipettierschritte und der Versuchsplattenaufbau auf stationären Coolern oder Eis durchgeführt werden sollten. Nachdem die Platte gegossen ist, beginnen Sie sofort mit dem One-step RT-qPCR-Protokoll. Längere Inkubation von Reaktionsgemischen bei Raumtemperatur kann zu PCR-Artefakten führen, die die Nachweisempfindlichkeit verringern. Beginnen Sie vor dem Experiment, die mitgelieferten Reaktionsgefäße vorsichtig zu mischen, zentrifugieren Sie 5 Sekunden lang, um den Inhalt am Boden des Gefäßes zu sammeln, und stellen Sie die Gefäße auf Eis. **Wir empfehlen dringend, COVID-19 & Flu A/B Positivkontrollen 1 und 2 zuletzt zu pipettieren, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.**

9.1. Reaktionseinrichtung

1. Bereiten Sie eine RT-qPCR-Mischung vor, die für die Anzahl der Tests ausreicht, mit einem zusätzlichen Volumen von 5% für Pipettierungsverluste. Gehen Sie nach der folgenden Tabelle vor, in der die Volumina für 1 und n Tests angegeben sind (wobei n der Gesamtzahl der Reaktionen entspricht):

Komponente	**1 Test Volumen (µL)**	**n Prüfungen (*) Volumen + 5% (µL)**
COVID-19/Flu MMix (2x)(**)	10	*n* x 10,5
COVID-19/Flu Primer Mix (20x)	1	*n* x 1,05
COVID-19/Flu Probe Mix (20x)	1	*n* x 1,05
Finales Volumen	**12**	***n* x 12,6**

(*) Um die Gesamtzahl der für jeden Test erforderlichen Reaktionen zu berechnen, zählen Sie die Anzahl der Proben und fügen Sie drei weitere für die Negativ- und die zwei Positivkontrollen hinzu.
(**) Bitte beachten Sie, dass insbesondere nach mehreren Gefrier- / Auftauzyklen ein Präzipitat am Boden des Mastermix-Röhrchens beobachtet werden kann. Um eine optimale Leistung zu gewährleisten, stellen Sie bitte sicher, dass alle Komponenten vor der Verwendung aufgetaut und resuspendiert werden. In diesem Fall darf der Mastermix vor dem Pipettieren nicht zentrifugiert werden.

2. Pipettieren Sie 12 µL des RT-qPCR-Mixes in die einzelnen Vertiefungen entsprechend Ihrem Real-Time PCR-Experimentierplatten-Setup.
3. Geben Sie für die Negativkontrolle 8 µL COVID-19/Flu Neg (NTC) anstelle des RNA-Templates in die Negativkontrollvertiefung. Das Endvolumen sollte 20 µL betragen.
4. Für die biologischen Proben geben Sie 8 µL jeder RNA-Probe in die COVID-19/Flu -Vertiefungen entsprechend Ihrer experimentellen Plattenanordnung. Das Endvolumen sollte je 20 µL betragen.
5. Geben Sie für die beiden Positivkontrollen 8 µL COVID-19/Flu Pos 1 (detektiert SARS-CoV-2 ORF1ab, Influenza B NS2 und humane RP-Gene) und 8 µL COVID-19/Flu Pos 2 (SARS-CoV-2 N, Influenza A M1 und humane RP-Gene) anstelle der RNA-Vorlage in die Vertiefungen der Positivkontrollen. Das Endvolumen sollte 20 µL betragen.
6. Bedecken und versiegeln Sie die Platte mit einem geeigneten optischen Klebefilm, bevor Sie mit den Schritten RT-qPCR und Detektion fortfahren.
7. Platzieren Sie die Reaktionsplatte in das Real-Time PCR-Gerät und führen Sie das RT-qPCR-Protokoll wie im folgenden Abschnitt beschrieben aus.

9.2. Programmierung des Echtzeit-PCR-Instruments

Die untenstehende Tabelle zeigt ein Standardprotokoll, das für eine Reihe von Plattformen optimiert wurde. Diese Bedingungen können jedoch angepasst und validiert werden, um verschiedenen maschinenspezifischen Protokollen gerecht zu werden.

Vorgeschlagene RT-PCR-Lauf-Einstellungen

Zyklen	Temperatur	Zeit	Schritt
1	50 °C	20 min	Umgekehrte Transkription
1	95 °C	3 min	Polymerase-Aktivierung
40	95 °C	5 s	Denaturierung
	60 °C	1 min	Glühen/Erweiterung

**Fluorogene Daten sollten während dieses Schritts über die Kanäle Texas Red® & FAM™ & HEX™/VIC® erfasst werden.*

Fluoreszierende Farbstoffe und Detektionskanäle

Zielgene	Fluoreszierende Farbstoffe
RdRp & N (SARS-CoV-2)	Texas Red®
Flu A M1 (Influenza A)	FAM™
Flu B NS2 (Influenza B)	FAM™
RNase P	HEX™/VIC®
COVID-19/Flu Pos 1	Texas Red® & FAM™ & HEX™/VIC®
COVID-19/Flu Pos 2	Texas Red® & FAM™ & HEX™/VIC®

Das COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) von NZYTech wurde für die folgenden Real Time PCR Systeme validiert: Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5 und Bio-Rad® CFX96™. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte das Kit durch den Anwender unter Verwendung vorher charakterisierter Proben (sowohl positiv als auch negativ) validiert werden.

10. Datenanalyse

10.1. Kriterien für die Laufvalidierung

Die Datenanalyse wird durch die Software des Gerätes durchgeführt. Unter Berücksichtigung von Leistungsunterschieden in verschiedenen Echtzeit-PCR-Geräten werden die Schwellenwerte für die drei Fluoreszenzsignale (Texas Red, FAM und HEX/VIC) automatisch von der Software bestimmt, wobei manuelle Anpassungen vorgenommen werden, falls dies erforderlich ist. Wir empfehlen, vor der Analyse der Probenergebnisse zu überprüfen, ob der Echtzeit-PCR-Test gültig ist. Bitte bestätigen Sie daher für jede Platte, ob die Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen erwartungsgemäß in Übereinstimmung mit den folgenden Kriterien durchgeführt wurden:

Positivkontrollen: Die Amplifikation von FAM (Influenza B in Kontrolle 1 und Influenza A in Kontrolle 2), Texas Red (SARS-CoV-2 ORF1ab-Gen in Kontrolle 1 und N-Gen in Kontrolle 2) und HEX/VIC (RNase P) Kurven sind positiv. Von den Positivkontrollen wird erwartet, dass sie bei

Ct<32 in den drei Kanälen amplifizieren. Die Nichterfüllung dieses Qualitätskontrollkriteriums ist ein starker Hinweis darauf, dass das Experiment beeinträchtigt wurde.

Negativkontrolle (keine Template-Reaktion): Es wird keine Amplifikation festgestellt. Wenn die Negativkontrolle Amplifikationskurven (Texas Red, FAM und HEX/VIC) mit einer sigmoidalen Form aufweist, kann eine Probenkontamination stattgefunden haben. Wiederholen Sie den Test nach guter RT-qPCR-Praxis.

Wenn die Kontrollen den Erwartungen entsprechen, ist der Test **gültig**. Bitte fahren Sie mit der Interpretation der Ergebnisse für die getesteten Proben fort.

Wenn eine der Kontrollen nicht die erwartete Performance zeigt, wurde der Test beeinträchtigt oder unsachgemäß durchgeführt und sollte als ungültig betrachtet werden.
Bitte wiederholen Sie den Test.
Wenn das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den Hersteller

10.2. Interpretation der Testergebnisse

SARS-CoV-2 gilt als nachgewiesen, wenn die Verstärkungskurve von Texas Red eine sigmoidale Form mit einem Ct≤35 aufweist, unabhängig davon, welches Ergebnis für den RNase P (HEX/VIC) erzielt wird.

Influenza A und/oder Influenza B wird nachgewiesen, wenn die FAM Amplifikationskurve eine sigmoidale Form mit einem Ct≤35 aufweist, unabhängig davon, welches Ergebnis für den RNase P (HEX/VIC) Test erzielt wird.

SARS-CoV-2 und Influenza A und/oder Influenza B werden nicht nachgewiesen, wenn die Texas Red und FAM Kurven nicht oder bei Ct>35 amplifizieren, während der RNase P (HEX/VIC) Assay eine positive Sigmoidalkurve (Ct≤40) anzeigt.

Der Test ist ungültig, wenn die Assays für SARS-CoV-2, Influenza A/B und RNase P negativ sind. Der Test sollte mit wieder gereinigter Nukleinsäure aus der Probe wiederholt werden.

Die folgende Tabelle fasst die Interpretation der wichtigsten Ergebnisse zusammen (bewerten Sie die Gesamtform der Amplifikationskurven; **nur sigmoidale Amplifikationskurven sind indikativ für eine echte Amplifikation**).

SARS-CoV-2 Ergebnis (Texas Red)	Influenza A/B Ergebnis (FAM)	RNase P Ergebnis (HEX)	Interpretation der Ergebnisse
+ (Ct≤35)	**- (Ct>35)**	**+ (Ct≤40)**	**SARS-CoV-2 erkannt → POSITIV**
+ (Ct≤35)	**- (Ct>35)**	**- (Ct>40)**	**SARS-CoV-2 erkannt → POSITIV**
- (Ct>35)	**+ (Ct≤35)**	**+ (Ct≤40)**	**Influenza A/B erkannt → POSITIV**
- (Ct>35)	**+ (Ct≤35)**	**- (Ct>40)**	**Influenza A/B erkannt → POSITIV**
+ (Ct≤35)	**+ (Ct≤35)**	**+ (Ct≤40)**	**SARS-CoV-2 und Influenza A/B nachgewiesen → POSITIV**
+ (Ct≤35)	**+ (Ct≤35)**	**- (Ct>40)**	**SARS-CoV-2 und Influenza A/B nachgewiesen → POSITIV**
- (Ct>35)	**- (Ct>35)**	**+ (Ct≤40)**	**SARS-CoV-2 und Influenza A/B nicht nachgewiesen → NEGATIV**
- (Ct>35)	**- (Ct>35)**	**- (Ct>40)**	**Ungültiger Test, Extraktion und Test wiederholen**

Hinweis 1: NZYTech empfiehlt eine Wiederholung der Analyse für alle Proben, die eine mehrdeutige oder atypische Kurve aufweisen, die keine eindeutige Interpretation zulässt.

Hinweis 2: Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Möglichkeit falsch negativer und falsch positiver Ergebnisse berücksichtigt werden.

• Obwohl das Risiko falsch negativer Ergebnisse aufgrund des dualen Zieldesigns des vorliegenden Tests gemildert wird, können falsch negative Ergebnisse verursacht werden durch:

- Ungeeignete Entnahme, Handhabung und/oder Lagerung von Proben.
- Probe außerhalb der virämischen Phase.
- Nichtbeachtung der Verfahren in diesem Handbuch.
- Verwendung eines nicht zugelassenen Extraktions-Kits oder Echtzeit-PCR-Plattform.

• Falsch positive Ergebnisse können verursacht werden durch:

- Ungeeignete Handhabung von Proben, die eine hohe Konzentration an viraler RNA enthalten.
- Ungeeignete Handhabung der Positivkontrollen.
- Ungeeignete Handhabung des amplifizierten Produkts (Post-Amplifikations-Platte).

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Behandlungen oder andere Entscheidungen des Patientenmanagements verwendet werden. Darüber hinaus kann dieser Test Krankheiten, die durch andere bakterielle oder virale Krankheitserreger verursacht werden, nicht ausschließen.

11. Bewertung der Performance

Die Leistung dieses Kits wurde für die in Abschnitt 9.2 (siehe oben) genannten Instrumente validiert. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte das Kit durch den Anwender unter Verwendung vorher charakterisierter Proben (sowohl positiv als auch negativ) validiert werden.

11.1. Erwartete Ergebnisse

In Abbildung 1 sind typische Amplifikationsdiagramme dargestellt, die für klinisch negative Proben (Abbildung 1A) oder für Proben von Patienten, die mit SARS-CoV-2 (Abbildung 1B), Influenza A und/oder Influenza B (Abbildung 1C) oder beidem (Abbildung 1D) infiziert waren, beobachtet wurden.

11.2. Nachweisgrenze (LoD) - Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wurde als die niedrigste Konzentration des Analyten definiert, die mit 95%iger Sicherheit zuverlässig nachgewiesen werden konnte. Dies wurde durch Testen von SARS-CoV-2-, Influenza A und Influenza B- Nukleinsäuren bei verschiedenen Kopienzahlen, einzeln oder spiked in RNA aus negativen Oropharynx-Proben, unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen nach typischen Testreaktionsbedingungen bewertet. Die Tests wurden 4 Tage lang wiederholt, wobei für jede getestete Konzentration 48 Replikate erzeugt wurden. Zusammengenommen zeigen die Daten, dass das COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) von NZYTech 0,25 Kopien/µl SARS-CoV-2, 0,75 Kopien/µl Influenza A und 1,25 Kopien/µl Influenza B RNA mit einer Sicherheit von 95 % nachweist. Somit wurde die vorläufige Nachweisgrenze (LoD) für SARS-CoV-2 auf 0,25 Kopien/µL bzw. 250 Kopien/mL, für Influenza A auf 0,75 Kopien/µL bzw. 750 Kopien/mL und für Influenza B auf 1,25 Kopien/µL bzw. 1250 Kopien/mL festgelegt. Die vorläufige LoD wurde von zwei verschiedenen Anwendern unter Verwendung von drei Kit-Chargen in einem Experiment mit insgesamt 48 unabhängig voneinander aufgestockten Replikaten negativer oropharyngealer Abstrichmatrix bestätigt. Die Fähigkeit des COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kits (IVD) von NZYTech, das Virus bei unterschiedlichen Belastungen nachzuweisen, ist in Abbildung 2 dargestellt.

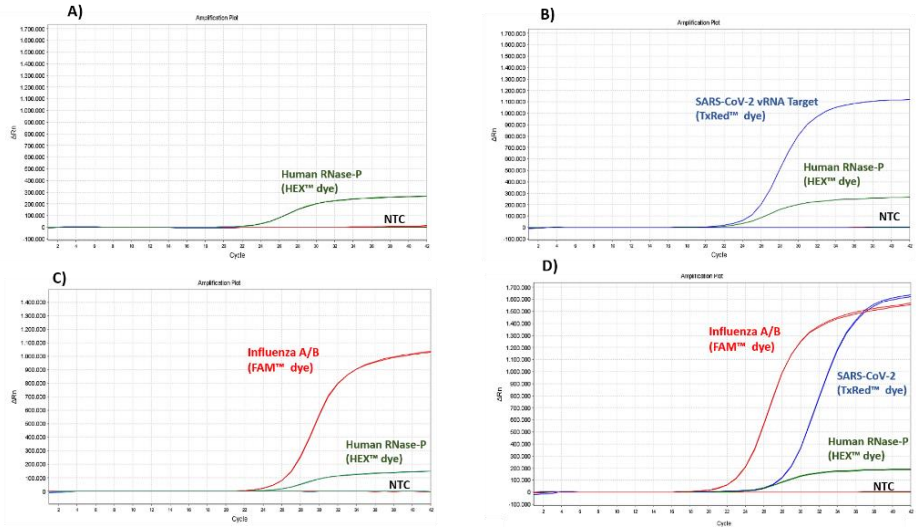

Abbildung 1. Nachweis von SARS-CoV-2, Influenza A/B und humanen RNase-P-Targets aus negativen klinischen Proben (A) oder klinischen Proben, die mit SARS-CoV-2 (B), Influenza A und/oder Influenza B (C) oder sowohl SARS-CoV-2 als auch Influenza A/B (D) infiziert sind. Blaue Kurve, Nachweis der SARS-CoV-2 vRNA-Targets über den Texas Red® Kanal. Rote Kurve, Nachweis von Influenza-A- und / oder Influenza-B-Targets über den FAM™ Kanal. Grüne Kurve, Nachweis des humanen RNase-P-Gens durch den HEX™ Kanal.

Die analytische Sensitivität des COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kits (IVD) im Kontext eines Koinfektionsszenarios wurde durch die Durchführung einer Reihe von seriellen Verdünnungsexperimenten unter Verwendung von Schein-Koinfektionsproben für jedes der beiden viralen Ziele bewertet. Zur Erstellung der Schein-Koinfektionsproben wurden genau 10^4 Kopien von Influenza-A- und 10^4 Kopien von Influenza-B-Nukleinsäuren zur SARS-CoV-2-Standardkurve hinzugefügt. Im Gegensatz dazu wurden 10^4 Kopien von SARS-CoV-2 zu den Standardkurven von Influenza A und Influenza B hinzugefügt. Vierfache Proben von drei Kit-Chargen (insgesamt 12 Replikate pro Verdünnung) wurden mit dem COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) getestet, um die Sensitivität des Assays zu bestimmen, wenn mehrere virale Targets in einer Probe vorhanden sind. Die Daten zeigten, dass sich die LoD von SARS-CoV-2 und Influenza A im Falle einer Koinfektion nicht veränderte. Die LoD von Influenza B änderte sich jedoch im Falle einer Koinfektion auf 1,75 Kopien/µl bzw. 1750 Kopien/ml.

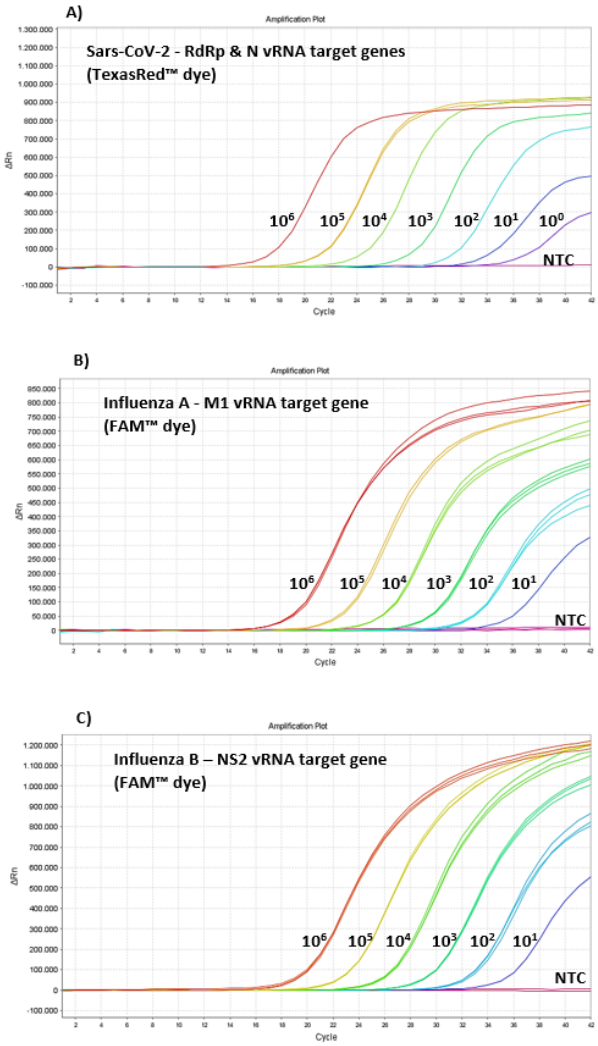

Abbildung 2. Sensitivität des COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kits (IVD). Amplifikationsplot (Zykluszahl gegen Fluoreszenz - ΔRN) von 1:10 serielle Verdünnungen der SARS-CoV-2 (A), Influenza A (B) und Influenza B (C) vRNA. NTC, keine Template-Kontrolle (Negativkontrolle).

11.3. Analytische Reaktivität (Inklusivität) und analytische Spezifität

Inklusivität und Kreuzreaktivität wurden durch *In silico* Analyse von Oligonukleotid-Sonden und Primern gegen Erreger, die mit SARS-CoV-2, Influenza A und Influenza B verwandt sind, bzw. gegen normale Erreger, die Infektionen mit ähnlichen Symptomen verursachen, bewertet. Nach einer *In silico* Analyse wurde festgestellt, dass das Testdesign alle SARS-CoV-2-, Influenza-A- und

Influenza-B-Virusstämme nachweist und keine Reaktivität mit nicht verwandten Arten zeigt. Zusätzlich zu der *In silico* Analyse wurde der COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Es wurde an Nukleinsäuren von üblichen Mund- und Atemwegsmikroben durchgeführt, einschließlich *Bacteroides ovatus, Bacteroides thetaiotaomicron, Burkholderia vietnamiensis, Dickeya dadantii, Enterobacter cloacae, Klebsiella pneumoniae, Mycobacterium intracellulare, Mycobacterium mageritense, Mycomaticus smeptoce, Streptomyces albidoflavus*. Keiner der mit dem COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) getesteten Erreger erzeugte ein nachweisbares Amplifikationssignal.

11.4. Präzision

Die Testpräzision für das COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kit (IVD) von NZYTech wurde durch wiederholtes Testen positiver Proben bestimmt, die zwei Viruslaststufen repräsentieren, 200 (niedrige Viruslast) und 2000 (mittlere Viruslast) Kopien pro Reaktion, die mit RNA aus negativen oropharyngealen Proben aufgestockt wurden, unter Verwendung von drei verschiedenen Kit-Chargen und unter typischen Testreaktionsbedingungen. Die Präzision wurde durch Messung des Cq-Mittelwerts, des Cq-Variationskoeffizienten und des prozentualen Wiederholungsnachweises, wie unten für jeden Fall beschrieben, bewertet. Die Daten werden in den drei nachstehenden Tabellen (eine für jedes Target) wiedergegeben.

11.4.1. Wiederholpräzision

Die Wiederholbarkeit wurde von einem Bediener durch die Analyse von 12 Replikaten jeder Probe (200 und 2000 Kopien pro Reaktion) bewertet, was einer endgültigen Anzahl von 24 durchgeführten Tests pro Target entspricht.

11.4.2. Tägliche Reproduzierbarkeit

Die tägliche Reproduzierbarkeit wurde von einem Bediener durch die Analyse von 48 Wiederholungen jeder Probe (200 und 2000 Kopien pro Reaktion) für 4 Tage mit 12 Wiederholungen jeder Konzentration pro Tag (insgesamt 96 Tests pro Target) bewertet.

11.4.3. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Chargen wurde von einem Bediener durch Analyse von 60 Wiederholungen jeder Probe (200 und 2000 Kopien pro Reaktion) unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen mit 20 Wiederholungen pro Charge bewertet.

11.4.4. Operator-Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit durch den Anwender wurde durch Testen von 24 Wiederholungen jeder Probe (200 und 2000 Kopien pro Reaktion) durch vier verschiedene Anwender mit 6 Wiederholungen pro Anwender und pro Viruslast bewertet, was insgesamt 36 Wiederholungen pro Anwender ergibt, einschließlich der drei Kit-Targets.

Präzision des COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kits (IVD) von NZYTech beim Nachweis des SARS-CoV-2-Targets.

Variabel		SARS-CoV-2 (Kopien/Reaktion)	
		200	**2000**
Wiederholpräzision	n	12	12
	Mittlerer Cq	28,87	26,35
	Variationskoeffizient (%)	0,95	1,92
	% Replikat-Erkennung	100	100
Tägliche Reproduzierbarkeit	n	12	12
	Mittlerer Cq	28,87	26,35
	Variationskoeffizient (%)	0,95	1,92
	% Replikat-Erkennung	100	100
Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge	n	60	60
	Mittlerer Cq	28,86	25,97
	Variationskoeffizient (%)	1,97	2,71
	% Replikat-Erkennung	100	100
Operator-Reproduzierbarkeit	n	24	24
	Mittlerer Cq	28,87	25,68
	Variationskoeffizient (%)	2,54	2,20
	% Replikat-Erkennung	100	100
Zwischen Instrumenten Reproduzierbarkeit	n	24	24
	Mittlerer Cq	29,83	26,89
	Variationskoeffizient (%)	3,29	2,46
	% Replikat-Erkennung	100	100

Präzision des COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kits (IVD) von NZYTech beim Nachweis des Influenza A Targets.

Variabel		Influenza A (Kopien / Reaktion)	
		200	**2000**
Wiederholpräzision	n	12	12
	Mittlerer Cq	30,47	26,46
	Variationskoeffizient (%)	0,82	0,53
	% Replikat-Erkennung	100	100
Tägliche Reproduzierbarkeit	n	48	48
	Mittlerer Cq	30,75	26,51
	Variationskoeffizient (%)	1,39	1,13
	% Replikat-Erkennung	100	100
Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge	n	60	60
	Mittlerer Cq	30,69	26,61
	Variationskoeffizient (%)	1,35	1,13
	% Replikat-Erkennung	100	100
Operator-Reproduzierbarkeit	n	24	24
	Mittlerer Cq	30,79	26,61
	Variationskoeffizient (%)	1,55	1,06
	% Replikat-Erkennung	100	100
Zwischen Instrumenten Reproduzierbarkeit	n	24	24
	Mittlerer Cq	30,00	26,07
	Variationskoeffizient (%)	1,76	1,63
	% Replikat-Erkennung	100	100

Präzision des COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kits (IVD) von NZYTech beim Nachweis des Influenza B Targets.

Variabel		Influenza B (Kopien / Reaktion)	
		200	**2000**
Wiederholpräzision	n	12	12
	Mittlerer Cq	30,72	26,82
	Variationskoeffizient (%)	0,81	1,08
	% Replikat-Erkennung	100	100
Tägliche Reproduzierbarkeit	n	48	48
	Mittlerer Cq	30,78	26,82
	Variationskoeffizient (%)	1,14	3,05
	% Replikat-Erkennung	100	100
Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge	n	60	60
	Mittlerer Cq	30,76	26,82
	Variationskoeffizient (%)	1,08	2,77
	% Replikat-Erkennung	100	100
Operator-Reproduzierbarkeit	n	24	24
	Mittlerer Cq	30,87	26,71
	Variationskoeffizient (%)	1,11	0,73
	% Replikat-Erkennung	100	100
Zwischen Instrumenten Reproduzierbarkeit	n	24	24
	Mittlerer Cq	30,15	26,34
	Variationskoeffizient (%)	2,01	2,04
	% Replikat-Erkennung	100	100

11.4.5. Reproduzierbarkeit zwischen Instrumenten

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Instrumenten wurde von einem Bediener durch Testen von 36 Replikaten jeder Probe (200 und 2000 Kopien pro Reaktion) in zwei verschiedenen qPCR-Instrumenten (Applied Biosystem® 7500, Applied Biosystem® QuantStudio 5) gemessen, insgesamt 72 Tests pro Instrument.

11.5. Klinische Bewertung:

Die Leistung des COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kits (IVD) von NZYTech mit gesammelten klinischen Atemwegsproben wurde von einem externen Labor bewertet. Insgesamt wurden 250 klinische Proben getestet, 72 positive klinische Proben für Influenza-A-Virus (36 für AH1 und 36 für AH3); 58 positive klinische Proben für das Influenza-B-Virus; 60 positive klinische Proben für SARS-CoV-2 und 60 klinisch negative. Die Daten zeigten eine 100%ige Übereinstimmung für alle positiven und negativen getesteten Proben.

12. Qualitätskontrolle

Alle Komponenten des COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kits (IVD) von NZYTech werden nach den oben beschriebenen Protokollen getestet. Das Pentaplex-Echtzeit-PCR-System ermöglicht den Nachweis der für die Identifizierung der viralen RNA von SARS-CoV-2 (RdRp- und N-Gene), der viralen RNA von Influenza A/B (M1) bzw. der NS2-Gene) sowie der menschlichen

RNase P (RP-Gen) beschriebenen Targets. Positive Amplifikationen werden für die Zielgene, die Positivkontrolle und die internen Kontrollen über die Kanäle Texas Red®, FAM™ und HEX™/VIC® entsprechend den jeweiligen Primer/Probensatz-Reporterfarbstoffen beobachtet.

13. Technischer Support

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte telefonisch an unser engagiertes technisches Support-Team: +351 (0) 21 364 35 14 oder E-Mail: info@nzytech.com.

14. Warenzeichen und Haftungsausschlüsse

Alle in diesem Handbuch aufgeführten Marken sind Eigentum ihrer jeweiligen Inhaber.

15. Erläuterung der Symbole

IVD	In-vitro-diagnostisches medizinisches Gerät		Gebrauchsanweisung beachten
REF	Katalognummer		Hersteller
LOT	Chargen-Code		Verwendet von
	Temperaturgrenzen	Σ	Ausreichend für
CONTROL +	Positivkontrolle		Vor Sonnenlicht fernhalten (Primer/Sonden-Mix)
CONTROL –	Negativkontrolle		

16. Konformitätserklärung

Produktname: Sensitivität des COVID-19 & Flu A/B Multiplex One-Step RT-qPCR Kits (IVD).

Katalognummer: MD04851.

Verwendungszweck: Qualitativer Nachweis von SARS-CoV-2, Influenza A und Influenza B.

Hersteller: NZYTech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038 Lissabon

Portugal

Wir, NZYTech, Lda – Genes & Enzymes, erklären hiermit, dass dieses Produkt, auf das sich diese Konformitätserklärung bezieht, mit den folgenden Normen und anderen normativen Dokumenten ISO 9001:2015 und ISO 13485:2016 gemäß den Bestimmungen der Richtlinie 98/79/EG und der Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika, wie sie in nationales Recht der Mitgliedstaaten der Europäischen Union umgesetzt wurden.

Die technische Dokumentation wird gepflegt bei NZYTech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lissabon, Portugal.

Joana Brás, PhD
Technische Direktorin

17. Referenzen

WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. 13. März 2020 Online verfügbar unter https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf

WHO: Q&A: Influenza and COVID-19 - similarities and differences. 17. März 2020 Online verfügbar unter 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

Zhou, Peng; Yang, Xing-Lou; Wang, Xian-Guang; Hu, Ben; Zhang, Lei; Zhang, Wei et al. (2020): A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. In Nature 579 (7798), S. 270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.

Chhikara, B. S., Rathi, B., Singh, J., Poonam. (2020). Corona virus SARS-CoV-2 disease COVID-19: Infection, prevention and clinical advances of the prospective chemical drug therapeutics. Chem. Biol. 7(1) 63-72.

Gorbalenya, Alexander E.; Baker, Susan C.; Baric, Ralph S.; Groot, Raoul J. de; Drosten, Christian; Gulyaeva, Anastasia A. et al. (2020): Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom - Coronavirus: The species and its viruses - a statement of the Coronavirus Study Group (14). bioRxiv 2020.02.07.937862; doi: https://doi.org/10.1101/2020.02.07.937862