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

REF MD04901, 96 Reaktionen
MD04902, 4 x 96 Reaktionen
MD04903, 2 x 8-Well-Streifen, High Profile

Nur für den professionellen* In-vitro-*Diagnostischen Gebrauch.

IVD

DE

Gebrauchsanweisung

MD0490_IM_de

VERSION 2302, Oktober 2023

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 4
3. Prinzipien des Tests 4
4. Zusammensetzung des Kits 5
5. Bedingungen für Lagerung, Stabilität und Handhabung 6
6. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Instrumente 6
7. Probenentnahme und -vorbereitung 7
8. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise 7
8.1. Sicherheitshinweise 7
8.2. Anforderungen für die Handhabung und das Verfahren 8
9. Prüfverfahren 8
9.1. Reaktionsaufbau 9
9.2. Programmierung des Echtzeit-PCR-Instruments 10
10. Datenanalyse 11
10.1. Kriterien für die Laufvalidierung 11
10.2. Interpretation der Testergebnisse 12
11. Bewertung der Performance 14
11.1. Erwartete Ergebnisse 14
11.2. Nachweisgrenze (LoD) - Analytische Sensitivität 14
11.3. Analytische Reaktivität (Inklusivität) und analytische Spezifität 16
11.4. Präzision 17
11.4.1. Wiederholpräzision 17
11.4.2. Tägliche Reproduzierbarkeit 17
11.4.3. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge 17
11.4.4. Operator-Reproduzierbarkeit 17
11.4.5. Reproduzierbarkeit zwischen Instrumenten 17
11.5. Klinische Bewertung 20
12. Qualitätskontrolle 20
13. Technischer Support 20
14. Warenzeichen und Haftungsausschlüsse 20
15. Erläuterung der Symbole 21
16. Konformitätserklärung 22
17. Referenzen 23

1. Einführung

Die derzeitige Pandemie der Coronavirus-Krankheit 2019 (COVID-19), die zuerst in China entdeckt wurde und sich rasch in den meisten Ländern ausbreitete, hat weltweit Morbidität und Mortalität in einem noch nie dagewesenen Ausmaß verursacht, was zu einer globalen Gesundheitskrise und einer Überlastung der Gesundheitsressourcen geführt hat. Der Erreger, 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 Influenza- (Grippe-) Typen A und B sind die vorherrschenden Typen zirkulierender Influenzaviren, und die meisten Influenzaepidemien stehen im Zusammenhang mit Typ A. Die zoonotische Übertragung der Vogel- oder Schweineinfluenza direkt auf den Menschen sowie die Übertragung reassortierter Viren hat in den letzten Jahrzehnten zu bemerkenswerten, zeitweise auftretenden Pandemien beim Menschen geführt. Infektionen mit dem Influenza-B Virus (Grippe B) sind im Allgemeinen auf den Menschen beschränkt und verursachen seltener Epidemien. Das humane Respiratorische Synzytialvirus (RSV) ist weltweit der wichtigste virale Erreger der Atemwege bei Kindern. RSV gehört zur Gattung der Pneumoviren aus der Familie der Paramyxoviren. Dieser ubiquitäre hochinfektiöse Erreger tritt jedes Jahr in saisonalen Epidemien auf, und fast jeder Mensch infiziert sich mindestens einmal in den ersten zwei Lebensjahren. Die RSV Erkrankung ist für eine erhebliche Morbidität und Mortalität verantwortlich, und es gibt weder einen zugelassenen Impfstoff noch eine hochwirksame antivirale Therapie. Eine rasche Diagnose und Isolierung sind erforderlich, um eine nosokomiale Übertragung zu vermeiden und eine angemessene Behandlung einzuleiten.

Atemwegsinfektionen können "synergistisch“ wirken, d. h. mögliche Wechselwirkungen zwischen SARS-CoV-2 und anderen Atemwegsviren könnten den Schweregrad der Erkrankung erhöhen. Alle diese Viren sind hoch ansteckend und werden durch Kontakt, Tröpfcheninfektion (Husten und Niesen) und kontaminierte Oberflächen übertragen. COVID-19 kann klinisch mit einer durch RSV oder Influenzaviren verursachten Lungenentzündung verwechselt werden, und bei einer Koinfektion gibt es bisher nur schlechte Prognosen. Darüber hinaus wird die weitere Verbreitung anderer Atemwegsviren einen Selektionsdruck auf SARS-CoV-2 ausüben und könnte zum Auftreten neuer bedenklicher Varianten führen. Daher ist eine entscheidende Maßnahme erforderlich, um eine "tödliche Dreifachmischung" aus COVID-19, Grippe und RSV zu verhindern. COVID-19-, Grippe- und RSV-Infektionen sind anhand der Symptome allein oft schwer zu unterscheiden, und jedes der Viren ist hoch ansteckend. Zu Beginn der Grippesaison ist es daher sinnvoll, neben COVID-19 auch auf häufige Atemwegserkrankungen zu testen.

Die frühzeitige Erkennung von SARS-CoV-2, RSV und Influenza Viren vom Typ A und 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 RSV und Influenza werden von Vorteil sein, da eine einzige Probe zur Unterscheidung der drei Infektionen bei Patienten mit ähnlichen Symptomen verwendet werden kann, was eine Lösung für das Management von Patienten mit grippeähnlichen Erkrankungen darstellt.

2. Verwendungszweck

Das von NZYtech entwickelte COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, ist ein molekularer Test für den schnellen qualitativen Nachweis der Erreger von COVID-19, RSV (Subtypen A und B) 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 primäres Screening-Mittel für die Diagnose von SARS-CoV-2, Grippe und RSV in Kombination mit klinischen und epidemiologischen Risikofaktoren vorgesehen. Ein positives Ergebnis weist auf das Vorhandensein von viraler RNA von SARS-CoV-2- und / oder Influenza A/B und / oder RSV 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, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, von NZYtech bietet den kompletten Satz an Reagenzien und Sonden für den qualitativen Nachweis der SARS-CoV-2- und/oder Influenza- und/oder RSV-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, während RSV (Subtypen A und B) durch den Nachweis von Targets im L-Gen identifiziert wird. 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, RSV 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, RSV, Influenza Typen A und B ist. Es enthält den kompletten Satz an Reagenzien und Sonden zum Nachweis der vier viralen Genome, einschließlich einer wirksamen internen Kontrolle zur Bestätigung einer effizienten Proben-RNA- -Extraktion und der Abwesenheit von PCR-Inhibitoren, um nur einige zu nennen. Dieses Kit zielt durch ein hochoptimiertes Primer- / Sonden-Set auf hochkonservierte Regionen des SARS-CoV-2-, RSV- (Subtypen A und B) und Influenza- Typ A und B Genoms ab. Darüber hinaus weisen Primer und Sonden keine signifikante Homologie mit nicht verwandten Genomen auf, was diesen Test hochspezifisch macht, und es wird keine Kreuzreaktivität mit Organismen beobachtet, die in den Atemwegen vorkommen können. 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 viraler RNAs von SARS-CoV-2, Influenza A und B und RSV. Das von NZYtech entwickelte COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, ist ein Multiplex-Assay zum Nachweis von SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B RSV und humanen Nukleinsäuren (als interne

Positivkontrolle). Extrahierte und gereinigte RNA wird in cDNA transkribiert und anschließend in einer einzigen Reaktion mit fünf hochspezifischen Primer- / Sonden-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 RSV L Gens und 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 sechs spezifischen Targets in einer einzigen Reaktion identifizieren zu können, sind die SARS-CoV-2-, Influenza A/B, RSV- und humanen RNase P-spezifischen Proben unterschiedlich markiert, nämlich mit Texas Red™, FAM™, HEX™ und Cy5™ 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. Außerdem ist dieser Test nicht dazu bestimmt, die Subtypen des Influenza A Virus, die Influenza B Virus-Linien oder die RSV-Untergruppen zu unterscheiden. Wenn die Differenzierung spezifischer Influenzavirusstämme und RSV-Subtypen erforderlich ist, sind zusätzliche Tests erforderlich. Darüber hinaus werden die sechs Primer- / Sonden-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, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD von NZYtech bietet einen umfassenden Satz an Reagenzien, die ausreichen, um RT-qPCR-Reaktionen in einem einzigen Schritt durchzuführen. Das Kit ist im Röhrchenformat erhältlich: Referenz MD04901 für 96 Reaktionen und Referenz MD04902 für 4 x 96 Reaktionen.

BESTANDTEILE DES KITS		**VOLUMEN** (PRO FLÄSCHCHEN)	**ANZAHL DER RÖHRCHEN**		**DECKEL-FARBE**
			MD04901	**MD04902**	
COVID-19, Flu A/B, RSV MMix	NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix (2x)	1050 µL	1	4	Neutral
COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix	COVID-19, Flu A/B, RSV Primer & Probe Mix (10x)	205 µL	1	4	Braun
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1	COVID-19, Flu A/B, RSV Positive Control 1	105 µL	1	4	Rot
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2	COVID-19, Flu A/B, RSV Positive Control 2	105 µL	1	4	Rot
NTC	No-template Control (RNase-/DNase-freies Wasser)	105 µL	1	4	Neutral

Alternativ ist das COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD von NZYtech im 8-Well-Streifenformat mit einem vorgemischten Mastermix und einem Primer-Sonden-Mix für die Durchführung von 16 RT-qPCR-Reaktionen erhältlich (2 x 8-Well-Streifen, High Profile), was den Testprozess vereinfacht und rationalisiert.

BESTANDTEILE DES KITS		**VOLUMEN** (PRO FLÄSCHCHEN)	**ANZAHL DER RÖHRCHEN/ STREIFEN**	**DECKEL -FARBE**
			MD04903	
COVID-19, FLU A/B, RSV MIX	Gebrauchsfertige Mischung des NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Master Mixes und Primer & Probe Mixes	8-Well-Streifen x 12 µL pro Well	2	Neutral
COVID-19, FLU A/B, RSV POS 1	COVID-19, Flu A/B, RSV Positive Control 1	20 µL	1	Rot
COVID-19, FLU A/B, RSV POS 2	COVID-19, Flu A/B, RSV Positive Control 2	20 µL	1	Rot
NTC	No-template Control (RNase-/DNase-freies Wasser)	20 µL	1	Neutral
8-WELL STRIP CAPS	-	-	2	Neutral

5. Bedingungen für Lagerung, Stabilität und Handhabung

Das COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD von NZYtech wird gekühlt versandt. Alle Komponenten sollten sofort nach Ankunft bei -85 °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-Auftau-Zyklen durch Lagerung in Arbeitsaliquoten. Gegebenenfalls können die Kit-Komponenten nach dem Auftauen in kleinere Volumen aliquotiert werden.
- Der COVID-19, Flu A/B, RSV Primer & Probe Mix (10x) sollte vor Licht geschützt gelagert werden. Insbesondere darf der NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Probe Master Mix nach der Kombination mit dem Primer- / Sonden-Mix nicht direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden. Auch der COVID-19, Flu A/B, RSV-Mix im vorgemischten 8-Well-Streifenformat sollte lichtgeschützt gelagert werden.
- Wenn das Paket, welches das Kit 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, HEX/VIC und Cy5 detektiert (bei Emissionswellenlängen von respektiven 615, 520, 556 und 670 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, Klebefilm (nur erforderlich für die Kit-Referenzen MD04901 und MD04902).
- Pipettierer und Filterspitzen (RNase-/DNase-frei).
- Einweghandschuhe.
- Vortex und Zentrifuge.

7. Probenentnahme und -vorbereitung

Das COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, von NZYtech wurde für oro-nasopharyngeale Abstrichproben validiert. Um optimale Ergebnisse zu erzielen, sind verschiedene Faktoren wie das Protokoll für die Probenentnahme aus menschlichen Atemwegsproben (oronasopharyngeale Abstriche), der Probentransport, die Lagerung und die Verarbeitungszeit von entscheidender Bedeutung. Die gesammelten Proben sollten so bald wie möglich getestet werden. Die Proben sollten bei niedrigen Temperaturen gemäß den Vorschriften zur biologischen Sicherheit transportiert und gelagert werden. RNA oder Gesamtnukleinsäuren, die nach einem CE IVD-Protokoll extrahiert wurden, sind das Ausgangsmaterial für das NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV 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 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 NZYtech 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 außerhalb der Testproben und Kit-Komponenten geöffnet und verarbeitet werden, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie immer das im Kit enthaltene Wasser (NTC - No-Template Control/DNase free water).
- 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 einer medizinischen Fachkraft 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 Kühlern 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, RSV Positivkontrollen 1 und 2 zuletzt zu pipettieren, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.**

9.1. Reaktionsaufbau

Für Kit-Referenzen MD04901 und MD04902 – Röhrchen

1. Bereiten Sie einen ausreichenden RT-qPCR-Mix für die Anzahl der durchzuführenden Tests mit einem zusätzlichen Volumen von 5 % für Pipettierverluste vor. Gehen Sie gemäß der folgenden Tabelle vor, in der die Volumina für 1 und n Tests angegeben sind (wobei n der Gesamtzahl der Reaktionen entspricht). Lagern Sie die restlichen Mengen gemäß **Abschnitt 5**.

KOMPONENTE	**1 TEST VOLUMEN (µL)**	***n* TESTS * VOLUMEN + 5% (µL)**
COVID-19, FLU A/B, RSV MMIX **	10	*n* x 10,5
COVID-19, FLU A/B, RSV PPMIX	2	*n* x 2,1
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. Fahren Sie mit Schritt 8 fort, um mit dem Setup der Kontrollen und Proben fortzufahren.

Für Kit-Referenz MD04903 – 8-Well-Streifen

4. Bestimmen Sie die Anzahl der für den Test erforderlichen Reaktionen, zählen Sie die Anzahl der Proben und fügen Sie drei weitere Reaktionen hinzu: eine für die Negativkontrolle und die beiden Positivkontrollen. Verpacken Sie alle unbenutzten 8-Well-Streifen wieder, schützen Sie sie vor Licht und bewahren Sie sie gemäß **Abschnitt 5** für die zukünftige Verwendung auf.
5. Stellen Sie sicher, dass die 8-Well-Streifen vollständig aufgetaut sind.
6. Zentrifugieren Sie die 8-Well-Streifen kurz, um die Homogenität sicherzustellen. Jede einzelne Vertiefung enthält bereits 12 µl COVID-19, Flu A/B, RSV Mix, eine gebrauchsfertige Mischung bestehend aus NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Master Mix und Primer & Probe Mix, um einheitliche Anteile zu gewährleisten.
7. Fahren Sie mit **Schritt 8** fort, um mit dem Setup der Kontrollen und Proben fortzufahren.

Kontrollen und Proben

8. Geben Sie für die Negativkontrolle 8 µl NTC anstelle der RNA-Probe in die Vertiefung der Negativkontrolle. Das Endvolumen sollte 20 µL betragen.
9. Geben Sie für die biologischen Proben 8 µl jeder RNA-Probe in die Probenvertiefungen, entsprechend Ihrer Versuchsplatten-/8-Well-Streifenanordnung. Das Endvolumen in jeder Vertiefung sollte 20 µL betragen.
10. Für die beiden Positivkontrollen sollten Sie 8 µl COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1 (erkennt SARS-CoV-2 ORF1ab, Influenza B NS2, RSV L und menschliche RP-Gene) und 8 µl COVID- 19, Flu A/B, RSV POS 2 (SARS-CoV-2 N, Influenza A M1, RSV L und menschliche RP-Gene) anstelle der RNA-Probe in die Positivkontrollvertiefungen einfüllen. Das Endvolumen sollte 20 µL betragen.
11. Bei den Kit-Referenzen MD04901 und MD04902 sollten die Platte mit einer geeigneten optischen Klebefolie oder Kappen abgedeckt und versiegelt werden. Für die Kit-Referenz MD04903 decken Sie die 8-Well-Streifen mit den zusätzlichen 8-Well-Streifenkappen ab, die im Kit enthalten sind.
12. Platzieren Sie die Reaktionsplatte/8-Well-Streifen[¥] im Real-Time-PCR-Gerät und führen Sie das RT-qPCR-Protokoll gemäß dem folgenden Abschnitt aus.

¥ Bitte beachten Sie, ***dass 8-Well-Streifen mit hohem Profil ausschließlich mit 0,2-ml-Block-Thermocyclern kompatibel sind****.*

9.2. Programmierung des Echtzeit-PCR-Instruments

Die folgende 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-qPCR-Lauf-Einstellungen

ZYKLEN	TEMPERATUR	ZEIT	SCHRITT
1	50 °C	10 min	Umgekehrte Transkription
1	95 °C	3 min	Polymerase-Aktivierung
40	95 °C	5 s	Denaturierung
	60 °C	30 s	Annealing/Erweiterung [*]

[*]*Fluorogene Daten sollten während dieses Schritts über die Kanäle Texas Red, FAM, VIC/HEX und Cy5 erfasst werden*.

Fluoreszenzfarbstoffe und Detektionskanäle

ZIELE	FLUORESZIERENDER FARBSTOFF	ERKENNUNGSKANAL
COVID-19 (SARS-CoV-2)	Texas Red™	Texas Red/JUN
Flu A/B (Influenza A/Influenza B)	FAM™	FAM
RSV	HEX™	VIC/HEX oder JOE
RNase P	Cy5™	Cy5

NZYtechs COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD-Referenzen MD04901 und MD04902 wurde für die folgenden Echtzeit-PCR-Systeme validiert: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche Life Science LightCycler® 96-System und Bio-Rad® CFX Opus. COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD-Referenz MD04903 wurde für die folgenden Echtzeit-PCR-Systeme validiert: Applied Biosystems® 7500 und Bioer LineGene Mini S. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte das Kit vom Benutzer mit anhand zuvor charakterisierter Proben (sowohl positiver als auch negativer Art) 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 vier Fluoreszenzsignale (Texas Red, FAM, VIC/HEX und Cy5) automatisch von der Software bestimmt, wobei manuelle Anpassungen vorgenommen werden können, 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 Negativ-Kontrollen erwartungsgemäß in Übereinstimmung mit den folgenden Kriterien durchgeführt wurden:

Positivkontrollen: Die Amplifikationskurven 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), VIC/HEX (RSV L-Gen) und Cy5 (RP-Gen) sind positiv. Von den Positivkontrollen wird erwartet, dass sie bei Cts < 32 in den vier 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; VIC/HEX und Cy5) 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

Das COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD von NZYtech verwendet die folgenden Ct-Cutoff-Werte für Assay-Targets zur Interpretation der Ergebnisse:

CT WERT	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE
Amplifikation Ct ≤35	Erkannt (+) → POSITIV
Keine Amplifikation Ct>35	Nicht erkannt (-) → NEGATIV

SARS-CoV-2 gilt als nachgewiesen, wenn die Texas Red Amplifikationskurve eine sigmoidale Form mit einem Ct ≤ 35 aufweist, unabhängig davon, welches Ergebnis für den RNase P (Cy5) erzielt wird.

Influenza A und/oder Influenza B gilt als nachgewiesen, wenn die FAM Amplifikationskurve eine sigmoidale Form mit einem Ct < 35 aufweist, unabhängig davon, welches Ergebnis für den RNase P (Cy5) -Test erzielt wird.

RSV gilt als nachgewiesen, wenn die Verstärkungskurve von VIC/HEX eine sigmoidale Form mit einem Ct ≤ 35 aufweist, unabhängig davon, welches Ergebnis für den RNase P (Cy5) erzielt wird.

SARS-CoV-2 und Influenza A und/oder Influenza B, RSV werden nicht nachgewiesen, wenn die Texas Red- , FAM- und VIC/HEX-Kurven nicht oder bei Ct > 35 amplifizieren, während der RNase P (Cy5) Assay eine positive Sigmoidalkurve (Ct ≤ 40) anzeigt.

Der Test ist ungültig, wenn die Assays für SARS-CoV-2, Influenza A/B, RSV und RNase P negativ sind. Der Test sollte mit nochmals 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 (TEXAS RED)	**INFLUENZA A/B** (FAM)	**RSV** (VIC/HEX)	**RP** (CY5)	**INTERPRETATION DER ERGEBNISSE**
+	-	-	+/-*	SARS-CoV-2 nachgewiesen → POSITIV
-	+	-	+/-*	Influenza A/B nachgewiesen → POSITIV
-	-	+	+/-*	RSV → POSITIV
+	+	-	+/-*	SARS-CoV-2 und Influenza A/B nachgewiesen → POSITIV
+	-	+	+/-*	SARS-CoV-2 und RSV nachgewiesen → POSITIV
-	+	+	+/-*	Influenza A/B und RSV nachgewiesen → POSITIV
+	+	+	+/-*	SARS-CoV-2, Influenza A/B, RSV nachgewiesen → POSITIV
-	-	-	+	SARS-CoV-2, Influenza A/B und RSV nicht nachgewiesen → NEGATIV
-	-	-	-	Ungültiger Test, Extraktion wiederholen

** Der Nachweis der internen Kontrolle auf dem Cy5-Kanal ist für positive Ergebnisse auf den Texas Red-, FAM- oder HEX-Detektionskanälen nicht erforderlich. ***** Eine hohe Konzentration/Belastung an nachweisbarer viraler RNA in der Probe kann zu reduziertem oder fehlendem internen Kontrollzeichen führen.*

Hinweis: 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.
  - Die Probe wurde außerhalb der virämischen/symptomatischen Phase entnommen.
  - Verschlechterung / Zersetzung der Probe.
  - Vorhandensein von RT-qPCR-Inhibitoren.
  - Mutationen im Genom der Viren.
  - Nichtbeachtung der Verfahren in diesem Handbuch.
  - Verwendung von nicht validierten Empfangskits oder Echtzeit-PCR-Plattformen.

- Falsch positive Ergebnisse können verursacht werden durch:
  - Ungeeignete Handhabung von Proben, die eine hohe Konzentration an viraler RNA enthalten. Die hohe Anfälligkeit der RT-qPCR-Methode für Kreuzkontaminationen erfordert besondere Sorgfalt bei der RNA-Isolierung.
  - 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

Typische Amplifikationsdiagramme für klinisch negative Proben (Abbildung 1A) oder Proben von Patienten, die mit SARS-CoV-2 (Abbildung 1B), einer Koinfektion mit SARS-CoV-2 und Influenza A/B (C) und einer Koinfektion mit SARS-CoV-2, Influenza A/B und RSV (D) infiziert waren, sind in Abbildung 1 dargestellt.

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 das Testen von SARS-CoV-2-, RSV-, Influenza-A- und Influenza-B-Nukleinsäuren mit unterschiedlichen Kopienzahlen beurteilt, die mit RNA versetzt wurden, die aus negativen oronasopharyngealen Abstrichproben extrahiert wurde, wobei 3 verschiedene Kit-Chargen unter typischen Testreaktionsbedingungen verwendet wurden. 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, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, von NZYtech 0,25 Kopien/µL SARS-CoV-2, 0,375 Kopien/µL Influenza A, 0,375 Kopien/µL Influenza B und 0,375 Kopien/µL RSV mit einer Sicherheit von ≥ 95% nachweist.

Somit wurde die vorläufige Nachweisgrenze (LoD) auf 0,25 Kopien/µL oder 250 Kopien/mL für SARS-CoV-2, 0,375 Kopien/µL oder 375 Kopien/mL für RSV, 0,375 Kopien/µL oder 375 Kopien/mL für Influenza A und 0,375 Kopien/µL oder 375 Kopien/mL für Influenza B festgelegt. Die vorläufige LoD wurde von zwei verschiedenen Anwendern unter Verwendung von drei Kit-Chargen in einem Experiment mit insgesamt 48 Wiederholungen von gepoolten, künstlich negativ gemachten oronasopharyngealen Abstrichen (OPS/NPS) bestätigt, die mit verschiedenen Konzentrationen von (inaktivierten) Viren von SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV A oder RSV B versetzt wurden. Entweder NPs oder gepoolte OPS-Proben wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Viren der folgenden Stämme versetzt: SARS-CoV-2-Virus (Isolat der Omicron-Variante), Influenza-A-Virus: Stamm A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09), Stamm A/Singapur/ INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), Influenza-B-Virus Stamm B/Colorado/06/2017 (Vitoria-Stamm) und Stamm B/Phuket/3073/2013 (Yamagata-Stamm), RSV A und RSV B (Stamm CH93 (18)-18), in verschiedenen Konzentrationen und verarbeitet mit dem COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD. Die Kit-LoD wurde für die Kit-Referenz MD04903 von zwei verschiedenen Bedienern unter Verwendung von drei Kit-Chargen

bestätigt. Dieses Experiment umfasste insgesamt 48 Replikate gepoolter künstlich negativer OPS/NPS-Proben, versetzt mit verschiedenen Viruskonzentrationen von SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV A oder RSV B.

Die analytische Sensitivität des COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, von NZYtech im Kontext eines Koinfektionsszenarios (kompetitive Interferenz) wurde durch die Durchführung einer Reihe von seriellen Verdünnungsexperimenten unter Verwendung von Schein-Koinfektionsproben für jedes der viralen Ziele bewertet. Zur Erstellung der Schein-Koinfektionsproben wurden genau 10^3 Kopien von RSV, 10^3 Kopien von Influenza-A- und 10^3 Kopien von Influenza-B-Nukleinsäuren zur SARS-CoV-2-Standardkurve hinzugefügt. Im Gegensatz dazu wurden 10^3 Kopien von SARS-CoV-2 und 10^3 Kopien von RSV und zu den einzelnen Standardkurven von Influenza A und Influenza B hinzugefügt. Schließlich wurden 10^3 Kopien von SARS-CoV-2, 10^3 Kopien von Influenza-A- und 10^3 Kopien von Influenza-B-Nukleinsäuren zu der RSV-Standardkurve hinzugefügt. Vierfache Proben von drei Kit-Chargen (insgesamt 12 Replikate pro Verdünnung) wurden mit dem COVID-19, Flu A/B, RSV 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 im Falle einer Koinfektion nicht veränderte. Allerdings änderte sich der LoD von RSV auf 0,75 Kopien/µL bzw. 750 Kopien/mL und von Influenza B auf 1,25 Kopien/µL bzw. 1250 Kopien/mL im Falle einer Koinfektion. Für Influenza A änderte sich die LoD auf 2,5 Kopien/µL bzw. 2500 Kopien/mL im Falle einer Koinfektion.

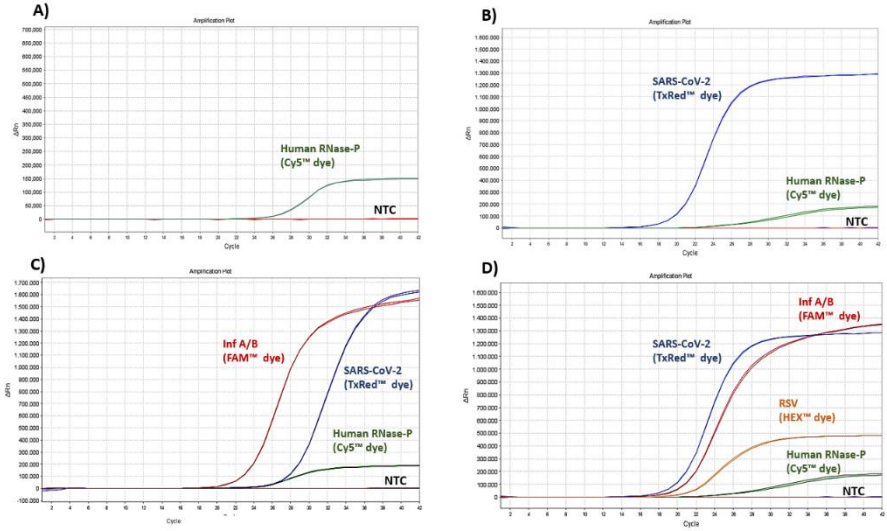

Abbildung 1. Nachweis von SARS-CoV-2, Influenza A/B, RSV und humanen RNase-P-Targets aus negativen klinischen Proben (A) oder klinischen Proben, die mit SARS-CoV-2 (B), einer Koinfektion mit SARS-CoV-2 und Influenza A/B (C) und einer Koinfektion mit SARS-CoV-2, Influenza A/B und RSV (D) infiziert sind. Blaue Kurve, Nachweis der SARS-CoV-2 vRNA-Targets über den Texas Red/JUN Kanal. Rote Kurve, Nachweis von Influenza-A- und / oder Influenza-B-Targets über den FAM Kanal. Orangene Kurve, Nachweis des RSV-L-Gens über den VIC/HEX/JOE Kanal. Grüne Kurve: Nachweis des humanen RNase-P-Gens durch den Cy5 Kanal.

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 sowie RSV 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-, Influenza-B- und RSV-Virusstämme nachweist und keine Reaktivität mit nicht verwandten Arten zeigt. Zusätzlich zu der *In silico* Analyse wurde der COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, 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, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, getesteten Erreger erzeugte ein nachweisbares Amplifikationssignal.

Die Auswirkungen von 17 potenziellen Störsubstanzen wurden in Tests bewertet, die aus negativen Nasopharyngealproben bestanden, die mit SARS-CoV-2 positiven Proben bei ~3x LoD aufgestockt wurden. Potenzielle Störsubstanzen wurden den künstlichen Proben in Konzentrationen zugesetzt, die den höchsten Konzentrationen entsprechen, die aufgrund von Literaturdaten in Proben von Patienten mit Atemwegserkrankungen zu erwarten sind. Alle Tests wurden in dreifacher Ausführung mit drei Kit-Chargen durchgeführt und die Ergebnisse mit den Daten eines Kontrolltests verglichen, der keine Störfaktoren enthielt. Bei den getesteten Konzentrationen zeigten die Ergebnisse, dass keines der getesteten Moleküle die Empfindlichkeit des Nachweises beeinträchtigte. Die nachstehende Tabelle fasst die im Rahmen dieser Experimente gesammelten Daten zusammen. Alle Experimente wurden mit dem Applied Biosystems™ 7500 FAST Real-time PCR Instrument (mit 7500 Software v2.3) durchgeführt.

Potenzielle Interferenzen	Wirkstoff	Endkonzentration in Probe	Interferenz Ja (J) oder Nein (N)				
			SARS-CoV-2	Flu A	Flu B	RSV A	RSV B
Isotonisches Meerwasser (Rhinomer)	NaCl	15% v/v	N	N	N	N	N
Rachenspray, orales Anästhetikum und Schmerzmittel (Strepfen)	Flurbiprofen	5% v/v	N	N	N	N	N
Nasenspüllösung (Allergiespray - Vibrocil)	Fluticasonpropionat	5% v/v	N	N	N	N	N
Nasenspray mit Kortikosteroiden (Nasomet)	Mometasonfuroat	5% v/v	N	N	N	N	N
Nasenspray mit Kortikosteroiden (Pulmicort)	Budesonid	5% v/v	N	N	N	N	N
Antimikrobiell, systemisch (Trobex)	Trobamycin	10 µg/mL	N	N	N	N	N
Mundschmerzmittel, entzündungshemmend und antiseptisch (Pyralvex)	Rhabard-Extrakt, Salicylsäure	5% v/v	N	N	N	N	N
Antimykotisches und antibakterielles oralpharyngeales Gel (Daktarin)	Miconazol	5 mg/mL	N	N	N	N	N
Mundspüllösung Antiseptika (Eludril Gé)	Chlorhexidingluconat, Chlorbutanol-Halbhydrat	5% v/v	N	N	N	N	N
Antitussivum, Sirup (Codipront)	Codein, Phenyltoloxamincitrat	5% v/v	N	N	N	N	N
Vollblut (Mensch)	-	4% v/v	N	N	N	N	N
Antivirales Medikament (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/mL	N	N	N	N	N
Mukolytisch (Mucolsovan)	Ambroxolhydrochlorid	5% v/v	N	N	N	N	N
Nasentropfenlösung (Nasarox)	Oxymetazolinchlorhydrat	10% v/v	N	N	N	N	N
Antibiotika, Nasensalbe (Bactroban)	Mupirocin	5 mg/mL	N	N	N	N	N
Speichel (Mensch)	-	25% v/v	N	N	N	N	N
Absolutes Ethanol	Alkohol	5% v/v	N	N	N	N	N

11.4. Präzision

Die Testpräzision für das COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, von NZYtech wurde durch wiederholtes Testen positiver Proben bestimmt, die zwei Viruslaststufen repräsentieren, 3x LoD und 30x LoD 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 (3x LoD und 30x LoD 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 (3x LoD und 30x LoD 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 84 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion) unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen mit 28 Wiederholungen pro Charge bewertet.

11.4.4. Operator-Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit durch den Anwender wurde durch Testen von 24 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD 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.

11.4.5. Reproduzierbarkeit zwischen Instrumenten

Die instrumentelle Reproduzierbarkeit der Kit-Referenzen MD04901 und MD04902 wurde von einem Bediener durch Testen von 24 Replikaten jeder Probe (3x LoD- und 30x LoD-Kopien pro Reaktion) in zwei verschiedenen qPCR-Instrumenten (Applied Biosystems™ 7500 FAST, Applied Biosystems™ QuantStudio 5) gemessen, in insgesamt 48 Tests pro Probe. Darüber hinaus wurde die Reproduzierbarkeit der Kit-Referenz MD04903 zwischen Instrumenten ebenfalls von einem Bediener bewertet, indem 24 Replikate jeder Probe (3x LoD- und 30x LoD-Kopien pro Reaktion) in zwei verschiedenen qPCR-Instrumenten (Applied Biosystems™ 7500 und Bioer LineGene Mini S) getestet wurden, in insgesamt 48 Tests pro Probe.

Präzision des NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, beim Nachweis der SARS-CoV-2-Targets.

VARIABEL		SARS-CoV-2 (KOPIEN/REAKTION)	
		3X LOD	30X LOD
WIEDERHOLPRÄZISION	n	12	12
	Mittlerer Cq	33,84	30,75
	Variationskoeffizient (%)	0,61	0,19
	% Replikat-Erkennung	100	100
TÄGLICHE REPRODUZIERBARKEIT	n	48	48
	Mittlerer Cq	33,79	30,66
	Variationskoeffizient (%)	2,02	1,62
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT VON CHARGE ZU CHARGE	n	84	84
	Mittlerer Cq	33,82	30,59
	Variationskoeffizient (%)	1,96	1,60
	% Replikat-Erkennung	100	100
BEDIENER-REPRODUZIERBARKEIT	n	24	24
	Mittlerer Cq	33,86	30,73
	Variationskoeffizient (%)	1,26	1,13
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN INSTRUMENTEN	n	48	48
	Mittlerer Cq	33,75	30,80
	Variationskoeffizient (%)	2,25	2,62
	% Replikat-Erkennung	100	100

Präzision des NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, beim Nachweis des Influenza A Targets.

VARIABEL		INFLUENZA A (KOPIEN / REAKTION)	
		3X LOD	30X LOD
WIEDERHOLPRÄZISION	n	12	12
	Mittlerer Cq	34,39	31,26
	Variationskoeffizient (%)	3,31	1,05
	% Replikat-Erkennung	100	100
TÄGLICHE REPRODUZIERBARKEIT	n	48	48
	Mittlerer Cq	34,30	30,92
	Variationskoeffizient (%)	2,90	1,52
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT VON CHARGE ZU CHARGE	n	84	84
	Mittlerer Cq	34,28	30,76
	Variationskoeffizient (%)	2,55	1,88
	% Replikat-Erkennung	100	100
BEDIENER-REPRODUZIERBARKEIT	n	24	24
	Mittlerer Cq	34,14	30,97
	Variationskoeffizient (%)	1,43	0,57
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN INSTRUMENTEN	n	48	48
	Mittlerer Cq	33,82	30,28
	Variationskoeffizient (%)	3,39	3,09
	% Replikat-Erkennung	100	100

Präzision des NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, beim Nachweis des Influenza B Targets.

VARIABEL		INFLUENZA B (KOPIEN / REAKTION)	
		3X LOD	30X LOD
WIEDERHOLPRÄZISION	n	12	12
	Mittlerer Cq	33,87	30,63
	Variationskoeffizient (%)	1,85	1,19
	% Replikat-Erkennung	100	100
TÄGLICHE REPRODUZIERBARKEIT	n	48	48
	Mittlerer Cq	33,75	30,23
	Variationskoeffizient (%)	2,10	2,56
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT VON CHARGE ZU CHARGE	n	84	84
	Mittlerer Cq	33,73	30,23
	Variationskoeffizient (%)	1,99	2,00
	% Replikat-Erkennung	100	100
BEDIENER-REPRODUZIERBARKEIT	n	24	24
	Mittlerer Cq	33,70	30,34
	Variationskoeffizient (%)	1,51	0,65
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN INSTRUMENTEN	n	48	48
	Mittlerer Cq	33,59	30,01
	Variationskoeffizient (%)	2,86	2,46
	% Replikat-Erkennung	100	100

Präzision des NZYtech COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, von NZYtech beim Nachweis des RSV Targets.

VARIABEL		RSV (KOPIEN / REAKTION)	
		3X LOD	30X LOD
WIEDERHOLPRÄZISION	n	12	12
	Mittlerer Cq	33,66	30,126
	Variationskoeffizient (%)	1,00	0,84
	% Replikat-Erkennung	100	100
TÄGLICHE REPRODUZIERBARKEIT	n	48	48
	Mittlerer Cq	33,24	30,05
	Variationskoeffizient (%)	2,55	0,84
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT VON CHARGE ZU CHARGE	n	84	84
	Mittlerer Cq	33,50	30,26
	Variationskoeffizient (%)	2,16	1,23
	% Replikat-Erkennung	100	100
BEDIENER-REPRODUZIERBARKEIT	n	24	24
	Mittlerer Cq	33,32	30,18
	Variationskoeffizient (%)	2,85	1,33
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN INSTRUMENTEN	n	48	48
	Mittlerer Cq	32,67	29,83
	Variationskoeffizient (%)	2,97	2,14
	% Replikat-Erkennung	100	100

11.5. Klinische Bewertung

Die Leistung des COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, von NZYtech wurde von einem molekulardiagnostischen Labor anhand gesammelter oronasopharyngealer Abstrichproben bewertet. Insgesamt wurden 1516 klinische Proben getestet, nämlich 850 negative Proben; 293 positive klinische Proben für SARS-CoV-2 (von Mai 2021 bis Juni 2022, dieser Zeitraum umfasst verschiedene Wellen von SARS-CoV-2); 123 positive klinische Proben für Influenza A (41 für AH1, 41 für AH1N1 pdm, 41 für AH3); 82 positive klinische Proben für Influenza B (41 für die Vitoria-Linie und 41 für die Yamagata-Linie); 168 positive Proben für RSV (88 für Subtyp A und 88 für Subtyp B). Die Daten zeigten eine 99%ige Übereinstimmung für alle getesteten positiven und negativen Proben. Darüber hinaus wurde auch ein Vergleich der klinischen Leistung des COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD-Referenz MD04901 und Referenz MD04903 von NZYtech durchgeführt. Die Daten zeigten, dass für alle getesteten positiven und negativen Proben eine Übereinstimmung von 100 % der klinischen Sensitivität (PPA) und 100 % der klinischen Spezifität (NPA) erreicht wurde.

12. Qualitätskontrolle

Alle Komponenten des COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, von NZYtech werden nach den oben beschriebenen Protokollen getestet. Das Hexaplex -Echtzeit-PCR-System ermöglicht den Nachweis der für die Identifizierung beschriebenen Targets der viralen RNA von SARS-CoV-2 (RdRp- und N-Gene), der viralen RNA von Influenza A/B (M1) bzw. der NS2-Gene), der viralen RNA von RSV (L-Gen) sowie der menschlichen RNase P (RP-Gen). Positive Amplifikationen werden für Zielgene, Positivkontrollen und interne Kontrollen über die Kanäle Texas Red, FAM, HEX/VIC und Cy5 entsprechend den jeweiligen Primer-/Sonden-Sets-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		Verwenden bis
	Temperaturgrenzen		Ausreichend für
CONTROL +	Positiv-Kontrolle		Vor Sonnenlicht fernhalten (Primer-/Sonden-Mix)
CONTROL –	Negativ-Kontrolle		

16. Konformitätserklärung

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

Katalognummer: MD04901, MD04902 and MD04903

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

Einstufung: Andere (nicht abgedeckt durch Anhang II oder nicht zum Eigenanwendung bestimmt) laut der Richtlinie 98/79/EG.

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 wurde, konform ist.

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

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). SARS-CoV-2 co-infection with influenza viruses, respiratory syncytial virus, or adenoviruses. 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? Influ Other Respir Viruses. 15: 407-412

WHO: Klinisches Management der Severe Acute Respiratory Infection (SARI), wenn COVID-19 vermutet wird. 13. März 2020 Online verfügbar unter https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf

WER: Q&A: Influenza and COVID-19 - similarities and differences. 30, September 2021 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.

NZYtech
genes & enzymes

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal
Tel.:+351.213643514 Fax: +351,217151168
www.nzytech.com