SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD

Kit RT-PCR One-Step per SARS-COV-2, geni RdRp e N, IVD

RNA polimerasi dipendente da RNA virale (RdRp) e geni di fosfoproteina del nucleocapside (N)

REF MD04831, 96 reazioni
MD04832, 4 × 96 reazioni

***Solo per uso diagnostico professionale* in vitro**

IVD

IT

Istruzioni per l'uso

MD0483_IM_it

VERSIONE 2401, Gennaio 2024

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

Contenuti

1. Introduzione ... 3
2. Uso previsto ... 3
3. Principi del Saggio ... 3
4. Composizione del kit ... 3
5. Condizioni di conservazione, stabilità e manipolazione ... 4
6. Materiali e strumentazione necessari ma non forniti ... 4
7. Raccolta e preparazione dei campioni ... 4
8. Precauzioni e Avvertenze ... 4
   8.1. Informazioni sulla sicurezza ... 5
   8.2. Requisiti di manipolazione e procedura ... 5
9. Procedura di test ... 5
   9.1. Impostazione della reazione ... 5
   9.2. Programmazione dello strumento per PCR in tempo reale ... 6
10. Analisi dei dati ... 6
   10.1. Criteri di convalida esecuzione ... 6
   10.2. Interpretazione dei risultati di test ... 6
11. Valutazione di performance ... 7
   11.1. Risultati previsti ... 7
   11.2. Limite di rilevazione (LoD) - Sensibilità analitica ... 7
   11.3. Reattività analitica (Inclusività) e Specificità analitica ... 8
   11.4. Precisione ... 9
   11.4.1. Ripetibilità ... 9
   11.4.2. Riproducibilità giornaliera ... 9
   11.4.3. Riproducibilità da lotto a lotto ... 9
   11.4.4. Riproducibilità dell'operatore ... 9
   11.4.5. Riproducibilità tra strumenti ... 9
   11.5. Valutazione clinica ... 10
12. Controllo di Qualità ... 10
13. Supporto Tecnico ... 10
14. Marchi di fabbrica e Disclaimer ... 10
15. Spiegazione dei simboli ... 10
16. Dichiarazione di conformità ... 11
17. Bibliografia ... 12

1. Introduzione

Nel dicembre 2019 è stata segnalata in Cina una nuova malattia respiratoria acuta, denominata Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), che si è diffusa rapidamente in tutto il mondo. L'agente eziologico è stato identificato come Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2 (SARS-CoV-2) [coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave]. Il virus (precedentemente denominato 2019-nCoV), come il molto affine coronavirus della SARS (SARS-CoV), appartiene al genere *Betacoronavirus*, nell'ambito della famiglia dei coronavirus. I coronavirus sono grandi virus a RNA a singolo filamento positivo, dotati di pericapside, che infettano gli esseri umani, ma anche un'ampia varietà di animali. Si ritiene che SARS-CoV-2 sia di origine zoonotica, e che la sua diffusione abbia avuto inizio da grandi mercati del pesce e di animali vivi a causa del contatto uomo-animale nella città di Wuhan. Il nuovo coronavirus è altamente contagioso e si trasmette principalmente per mezzo di goccioline respiratorie (tosse e starnuti). La diagnosi precoce di SARS-COV-2 è di vitale importanza per trattare tempestivamente i pazienti infetti e, pertanto, per ridurre la diffusione delle infezioni. Le manifestazioni cliniche più comuni di COVID-19 includono affaticamento, febbre e sintomi del tratto respiratorio inferiore, come tosse secca e dispnea. Può verificarsi anche perdita del gusto e dell'olfatto. Nelle situazioni più critiche, l'infezione evolve verso una polmonite severa con complicanze potenzialmente letali come la sindrome da malattia respiratoria acuta, la disfunzione d'organo e la morte. In base alle attuali conoscenze, una percentuale significativa è rappresentata da infezioni lievi o asintomatiche. Una certa percentuale della popolazione è più vulnerabile alla forma grave della malattia, compresi gli anziani (over 60), i fumatori e le persone con malattie croniche quali malattie cardiache o polmonari, cancro, diabete, e i pazienti con sistema immunitario indebolito. Attualmente, non vi è alcun trattamento specifico o vaccino disponibile contro l'infezione da SARS-CoV-2.

2. Uso previsto

Il SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD di NZYtech è un test molecolare destinato alla rapida rilevazione qualitativa di acidi nucleici di Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2 (SARS-CoV-2) in tamponi nasofaringei o orofaringei prelevati da pazienti. Un risultato positivo indica la presenza di SARS-COV-2 RNA, ma è necessaria la correlazione clinica con l'anamnesi del paziente, oltre ad altre informazioni diagnostiche, per determinare lo stato di infezione del paziente. Risultati negativi non escludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per le decisioni di gestione dei pazienti. Questo kit è destinato all'uso da parte di personale di laboratorio debitamente qualificato, specificamente addestrato nelle tecniche di Real time PCR e nella diagnostica *in vitro*.

3. Principi del Saggio

Il SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD di NZYtech fornisce il set completo di reagenti e sonde per la rilevazione qualitativa del genoma di SARS-CoV-2, attraverso le comuni piattaforme PCR in tempo reale (si vedano le specifiche strumento richieste in **Sezione 6.**). I geni della RNA polimerasi dipendente da RNA del virus (RdRp) e della fosfoproteina del nucleocapside (N) sono stati precedentemente identificati come marcatori altamente specifici per SARS-COV-2. Questo kit NZYtech individua regioni specifiche nei geni RdRp e N del genoma di SARS-COV-2 per avere la massima sensibilità di rilevazione. I primer e le sonde del kit SARS-CoV-2 hanno 100% di omologia con >95% delle >5 millione di sequenze genomiche disponibile nel database GISAID al novembre 2021, incluse le varianti Delta (B.1.617.2) e Omicron (B.1.1.529). Inoltre, i primer e le sonde che identificano SARS-CoV-2 non mostrano omologia significativa con genomi non correlati, il che rende questo test altamente specifico in quanto non vi è reattività crociata con acidi nucleici provenienti da altri organismi virali e batterici del tratto respiratorio. È incluso un controllo interno per confermare l'efficiente estrazione di RNA da campioni biologici umani, nonché l'assenza di inibitori della PCR. Inoltre, il test utilizza controlli esterni (controllo positivo a basso titolo fornito con il kit e controllo negativo), come descritto di seguito. Il controllo positivo è costituito da frammenti di acido nucleico contenenti le tre sequenze target rilevate dal kit (geni SARS-COV-2, RdRp e N, e gene RP umano). La naturale evoluzione di SARS-COV-2 implica che nuove informazioni sulla sequenza saranno disponibili dopo la progettazione iniziale di questo kit, riflettendo le strategie di adattamento di SARS-COV-2. Pertanto, NZYtech rivisita periodicamente i target genomici di SARS-COV-2 e, se necessario, rilascerà nuove versioni di questo kit.

Il rilevamento quantitativo dell'RNA si basa sulla tecnologia RT-PCR one-step in tempo reale, dato che questo rimane il metodo più sensibile per eseguire una rilevazione precisa di SARS-COV-2. Utilizzando il SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD di NZYtech, l'RNA isolato e purificato con un sistema di estrazione (IVD) viene retrotrascritto (RT) a cDNA e successivamente amplificato mediante PCR, in una singola reazione, utilizzando tre set di primer/sonda altamente specifici sfruttando il cosiddetto principio TaqMan®. In alternativa, i campioni raccolti in un buffer di trasporto specifico (per la raccolta e la preparazione dei campioni consulte la **sezione 7.**) possono essere utilizzati direttamente nella reazione RT-PCR dopo un trattamento termico. In presenza di RNA virale, le sonde Taqman® si ricombinano in modo specifico con due regioni conservate del genoma di SARS-CoV-2 ovveroi geni RdRp (all'interno del gene di poliproteina Orf1ab) e N, che sono affiancati da due coppie di primer altamente specifici. Un set aggiuntivo di primer/sonda agisce come controllo interno endogeno per rilevare acidi nucleici della ribonucleasi P umana [gene RNasi P (RP)], valutando la qualità del campione.

Inoltre, questo controllo interno dimostra che non si è verificata alcuna inibizione di reazione da parte di inibitori della PCR potenzialmente presenti nei campioni clinici/ambientali. Per consentire l'identificazione dell'amplificazione dei tre target specifici in una singola reazione, le sonde specifiche di SARS-CoV-2 e RNasi P umana hanno diversi tag, rispettivamente con coloranti reporter FAM™ e JOE™. Si noti che questo pannello contiene un saggio duplex nello stesso canale ottico FAM per segnalare una performance aggiuntiva dei due saggi PCR per la rilevazione di SARS-CoV-2. Inoltre, questi set di oligonucleotidi/sonde sono forniti in concentrazioni ottimizzate per assicurare che l'amplificazione di mRNA umano, anche quando presente a concentrazioni molto elevate, non limiti l'efficienza dei set di primer/sonda di SARS-CoV-2.

4. Composizione del kit

Il SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD di NZYtech fornisce un set completo di reagenti sufficienti per eseguire 96 reazioni RT-PCR in un unico passaggio.

COMPONENTE DEL KIT		VOLUME (PER FIALA)	NUMERO DI VIALS	
			MD04831	MD04832
SARS-COV-2 MMix (RdRp & N)	Master mix RT-qPCR NZYSupreme One-step	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix (RdRp & N)	Mix primer/sonda SARS-COV-2 (geni RdRp & N)/RP	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 Pos (RdRp & N)	SARS-CoV-2 (geni RdRp e N)/RP Controllo Positivo (1×10^4 copie/µL)	105 µL	1	4
NTC	No-template Control	105 µL	1	4

5. Condizioni di conservazione, stabilità e manipolazione

Il SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD viene spedito refrigerato. All'arrivo, tutti i componenti devono essere immediatamente immagazzinati a una temperatura compresa tra -85 °C e -15 °C. Quando in uso, i componenti del kit devono essere riportati in congelatore immediatamente dopo l'uso per ridurre al minimo il tempo trascorso a temperatura ambiente. Inoltre:

- Ridurre al minimo il numero di cicli di congelamento-scongelamento conservando in aliquote di lavoro. Se necessario, i componenti del kit possono essere aliquotati in volumi più piccoli dopo lo scongelamento.
- Il mix primer/sonda SARS-CoV-2 (geni RdRp & N)/RP deve essere conservata al riparo dalla luce. In particolare, non esporre la master mix RT-qPCR NZYSupreme One-Step alla luce diretta del sole dopo avere risospeso con il primer/sonda mix.
- Se la confezione che protegge il kit arriva danneggiata, contattare NZYtech.
- Fare attenzione alla data di scadenza indicata sulla confezione. NZYtech sconsiglia di utilizzare il kit dopo la data di scadenza. Dopo questa data, il kit deve essere smaltito seguendo le istruzioni per lo smaltimento di cui in **Sezione 8.2**.

6. Materiali e strumentazione necessari ma non forniti

- Strumento Real Time PCR in gradi di rilevare coloranti fluorescenti quali FAM™ e JOE™ (a lunghezze d'onda di emissione di 520 e 555nm, rispettivamente). Si vedano nella **Sezione 11.** i modelli di strumento per i quali il kit è stato convalidato.
- Apparecchiature e materiali di consumo per l'isolamento di RNA virale da campioni respiratori.
- Contenitori in plastica per qPCR certificati RNase/DNase free: provette per PCR, strip, tappi, piastre a 96 pozzetti, pellicole adesive.
- Pipette e puntali con filtro (certificati RNase/DNase free).
- Guanti monouso.
- Vortex e centrifuga.
- Acqua trattata con DEPC (contattare NZYtech per ordinare questo prodotto specifico, di referenza MB43701).

7. Raccolta e preparazione dei campioni

Per ottenere risultati ottimali, sono fondamentali diversi fattori, come il protocollo per il prelievo di campioni dal tratto respiratorio umano (tamponi nasofaringei o orofaringei), il trasporto, la conservazione e il tempo di trattamento dei campioni. I campioni prelevati devono essere analizzati non appena possibile.

I campioni che non vengono testati entro 24 ore devono essere conservati a una temperatura compresa tra -85 °C e -15 °C. Inoltre, i campioni devono essere trasportati e conservati a basse temperature in conformità con le normative sulla biosicurezza.

- **Campioni biologici sottoposti ad estrazione di acido nucleico:** L'RNA o gli acidi nucleici totali estratti secondo un protocollo IVD sono il materiale di partenza per il SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD. Assicurarsi che i campioni di RNA siano adeguati in termini di purezza, concentrazione e integrità degli acidi nucleici. Un rapporto $A_{260/280}$ di ~2 è generalmente accettato per l'RNA purificato. Dato che l'etanolo è un forte inibitore di Real time PCR, è necessario eliminarlo completamente prima dell'eluizione dell'acido nucleico durante l'estrazione. Il kit NZYtech integra una reazione interna di controllo estrazione dell'RNA che ha come obiettivo RNA umano, il quale è co-purificato con RNA virale. L'RNA umano viene amplificato con il set di primer/sonda RNasi P (RP). Ciò è utile per controllare l'efficienza dell'isolamento dell'RNA e/o la presenza di inibitori durante l'elaborazione del campione.
- **Campioni biologici utilizzati direttamente nel protocollo RT-PCR**: i campioni nasofaringei devono essere raccolti utilizzando tamponi Greiner Bio-One (referenza CM-FS913) e collocati direttamente nella provetta di stabilizzazione dei virus VACUETTE®, Greiner Bio-One (riferenza 456161). Pipettare 50 µl di aliquote di ciascun campione e trasferirle su piastre PCR da 96 pozzetti che devono essere sigillate e sottoposte immediatamente a una fase di trattamento termico a 95 °C, per 5 minuti, utilizzando un termociclatore con coperchio riscaldato. In alternativa, pipettare aliquote da 200 µ l e inattivarle in provette eppendorf da 1,5 mL utilizzando un blocco termico.

8. Precauzioni e Avvertenze

Come in qualsiasi procedura di analisi, sono essenziali buone pratiche di laboratorio. Seguire attentamente le procedure e le linee guida fornite in questo manuale per assicurarsi che il test venga eseguito correttamente. Qualsiasi deviazione da esse può causare un fallimento del saggio o dare risultati errati. A causa dell'elevata sensibilità del kit, è necessario prestare particolare attenzione a mantenere i reagenti e le miscele di amplificazione PCR esenti da contaminazione.

Il protocollo diretto RT-PCR è stato convalidato esclusivamente per campioni nasofaringei trasportati e conservati nella provetta di stabilizzazione dei virus VACUETTE®, Greiner Bio-One (riferimento 456161). Pertanto, il protocollo diretto RT-PCR del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD non è stato convalidato nei campioni trasportati e conservati in buffer di raccolta di tipo "VTM/UTM", che includono guanidina tiocianato come agente inattivante. Si consiglia quindi di utilizzare solo il buffer di trasporto e stoccaggio menzionati. L'uso di altri buffer può causare risultati falsi negativi. Per diversi buffer di raccolta, il kit deve essere convalidato dall'utente utilizzando campioni precedentemente caratterizzati (positivo e negativo).

8.1. Informazioni sulla sicurezza

Prima di utilizzare il kit, consultare la scheda dati di sicurezza (SDS) disponibile sul sito web di NZYtech (www.nzytech.com). La rilevazione del virus SARS-CoV-2 deve essere effettuata solo da personale addestrato alle procedure tecniche e di sicurezza pertinenti, e in laboratori adeguatamente attrezzati. Le linee guida internazionali e nazionali sulla biosicurezza di laboratorio devono essere seguite in ogni circostanza.

8.2. Requisiti di manipolazione e procedura

- Solo per uso diagnostico professionale *in vitro*
- Non utilizzare questo kit dopo la data di scadenza.
- Non utilizzare i componenti di test se il kit non risulta ben sigillato.
- Non interscambiare reagenti provenienti da lotti di produzione diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme ai reagenti di questo kit.
- In tutte le procedure devono essere utilizzati contenitori in plastica e pipette certificate DNase/RNase free.
- Utilizzare puntali con filtro certificati DNase/RNase free in tutte le operazioni per prevenire la contaminazione da aerosol e liquidi.
- La preparazione del campione, l'impostazione della reazione e l'amplificazione devono essere eseguite in aree di lavoro diverse.
- Il controllo positivo contiene un elevato numero di copie; deve essere aperto ed elaborato lontano dai campioni da testare e dai componenti del kit per evitare contaminazione incrociata.
- Utilizzare sempre l'NTC fornito nel kit.
- Per protocollo diretto, si raccomanda di includere un secondo controllo negative usando acqua trattata con DEPC (prodotto NZYtech MB43701) da aggiungere ai campioni testati tramite RT-PCR diretta.
- Al termine di ogni test, pulire le superfici di lavoro e le apparecchiature con un prodotto per la rimozione di DNA/RNA.
- Maneggiare con cura le piastre di post-amplificazione e smaltirle subito dopo il termine del test; le piastre devono sempre essere gettate in un contenitore appropriato per materiali a rischio biologico dopo l'uso.
- I campioni biologici devono essere trattati come se fossero infetti, seguendo le opportune precauzioni di biosicurezza.
- I residui di composti chimici e preparazioni sono generalmente considerati rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è regolamentato da leggi e regolamenti nazionali e regionali.
- Tutti i risultati devono essere interpretati da un operatore sanitario nel contesto dell'anamnesi del paziente e dei sintomi clinici.
- Questo test non può escludere malattie causate da altri agenti patogeni.
- Un risultato negativo per qualsiasi test PCR non esclude in modo conclusivo la possibilità di infezione.
- Seguire le buone pratiche di laboratorio, indossare indumenti protettivi, indossare sempre guanti monouso non talcati, utilizzare occhiali e mascherina. Non mangiare, bere o fumare nell'area di lavoro.

9. Procedura di test

Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di eseguire il saggio. Fare attenzione che tutte le fasi di pipettaggio e l'impostazione della piastra di reazione vengano eseguite su ghiaccio. Dopo aver preparato la piastra, iniziare immediatamente con il protocollo RT-PCR one-step. L'incubazione prolungata di miscele di reazione a temperatura ambiente può causare artefatti PCR che riducono la sensibilità della rilevazione. Prima dell'esperimento, iniziare a risospendere delicatamente le provette di reazione in dotazione, centrifugare per 5 secondi per raccogliere il contenuto sul fondo della provetta e collocare le provette in ghiaccio. **Si consiglia vivamente di pipettare per ultimo il controllo positivo SARS-COV-2 (geni RdRp e N)/RP per evitare contaminazione incrociata.**

9.1. Impostazione della reazione

1. Preparare una miscela RT-PCR sufficiente per il numero di test SARS-COV-2/RNasi P da eseguire con un volume aggiuntivo del 5% per le perdite di pipettaggio. Procedere secondo la tabella seguente che specifica i volumi per 1 e n test (dove n corrisponde al numero totale di reazioni):

COMPONENTE	**1 TEST VOLUME (µL)**	***n* TEST (*) VOLUME + 5% (µL)**
SARS-CoV-2 MMix	10	*n* × 10,5
SARS-CoV-2 PPMix	2	*n* × 2,1
VOLUME FINALE	**12**	***n* × 12,6**

(*) Per calcolare il numero *totale di* reazioni *necessarie per ciascun saggio, contare il numero di campioni e aggiungerne altri due per i controlli negativo e positivo, rispettivamente.*

2. Pipettare 12 µL della miscela RT-PCR in pozzetti singoli in base alla configurazione della piastra sperimentale per PCR in tempo reale.
3. Per il controllo negativo, aggiungere 8 µL di NTC invece di RNA stampo nel pozzetto di controllo negativo. Il volume finale deve essere di 20 µL. In caso di protocollo diretto RT-PCR, includere un secondo controllo negativo, aggiungendo 8 µL di acqua trattata con DEPC (prodotto NZYtech MB43701) invece dei campioni biologici non estratti.
4. a. Per i campioni biologici estratti, aggiungere 8 µL di ciascun campione di RNA nei pozzetti SARS-COV-2/RNasi P, in base alla configurazione della piastra sperimentale. Il volume finale in ciascun pozzetto deve essere di 20 µL.
b. Per i campioni biologici non estratti, dopo trattamento termico a 95 °C per 5 minuti, aggiungere 4 µL di ciascun campione alla piastra qPCR. Aggiungere a ciascun campione 4 µL di acqua trattata con DEPC (prodotto NZYtech MB43701). Il volume finale in ciascun pozzetto dev'essere di 20 20 µL. Non aggiungere più di 4 µL di campione.
5. Per il controllo positivo, aggiungere 8 µL di SARS-COV-2 Neg (RdRp & N) invece di RNA stampo nel pozzetto di controllo positivo. Il volume finale deve essere di 20 µL.
6. Coprire e sigillare la piastra con un'apposita pellicola adesiva ottica prima di procedere con la RT-PCR e con i passaggi di rilevazione.
7. Collocare la piastra di reazione nello strumento per PCR in tempo reale ed eseguire il protocollo RT-PCR in base alla sezione seguente.

9.2. Programmazione dello strumento per PCR in tempo reale

La tabella seguente mostra un protocollo standard ottimizzato su alcune piattaforme. Tuttavia, queste condizioni possono essere adattate e convalidate per adattarsi a diversi protocolli specifici della macchina.

Impostazioni di esecuzione consigliate per RT-qPCR

CICLI	TEMPERATURA	TEMPO	FASE
1	50 °C	20 min	Trascrizione inversa
1	95 °C	2 min	Attivazione della polimerasi
40	95 °C	5 s	Denaturazione
	60 °C	30 s	Annealing/Estensione*

**A seconda dell'apparecchiatura utilizzata, selezionare il canale di rilevazione appropriato.*

Coloranti fluorescenti e Canali di rilevazione

TARGET	COLORANTE FLUORESCENTE	CANALI DI RILEVAZIONE
SARS-CoV-2	FAM™	FAM
RNasi P	JOE™	JOE, VIC o HEX

Il SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD di NZYtech è stato validato per i seguenti sistemi di Real time PCR: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® StepOnePlus, Roche Life Science LightCycler® 480 II, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q e Bio-Rad® CFX96™. Se si utilizza un'altra apparecchiatura, il kit deve essere validato dall'utente utilizzando campioni caratterizzati in precedenza (sia positivi che negativi).

10. Analisi dei dati

10.1. Criteri di convalida esecuzione

La rilevazione di RNA di SARS-CoV-2 viene eseguita rilevando due regioni del genoma target, le quali vengono entrambe rivelate nello stesso canale di fluorescenza (FAM). L'analisi dei dati viene eseguita dal software dello strumento. Considerando le differenze di performance in diversi strumenti per Real time PCR, le soglie per i due segnali di fluorescenza (FAM™ e JOE™) vengono determinate automaticamente dal software con regolazioni manuali in caso necessario. Prima di analizzare i risultati dei campioni, si consiglia di verificare se il test Real time PCR sia valido. Quindi, per ogni piastra, confermare se i risultati per i controlli positivi e negativi sono eseguiti come previsto, secondo i seguenti criteri:

Controllo positivo: le curve di amplificazione dei geni FAM™ (SARS-COV-2, geni RdRp & N) e JOE™ (RP) sono positive. Il controllo positivo dovrebbe amplificarsi a una Ct<30, sia nel canale FAM che nei JOE. Il mancato rispetto di questo criterio di controllo qualità è una forte indicazione che l'esperimento è stato compromesso.

Controllo negativo (nessuna reazione stampo): non viene rilevata alcuna amplificazione. Se il controllo negativo ha una o due curve di amplificazione (canali FAM e/o JOE) con una forma sigmoidale, potrebbe essersi verificata una contaminazione del campione. Si consiglia di eseguire la decontaminazione di routine delle aree di laboratorio, dei materiali e degli strumenti. Ripetere il test seguendo le buone pratiche RT-PCR, partendo da una confezione sigillata.

Se i controlli sono conformi al valore previsto, il test **è valido**. Procedere con l'interpretazione dei risultati per i campioni analizzati.

Se uno dei controlli non mostra la performance prevista, il saggio è stato compromesso o eseguito in modo improprio e deve essere considerato **non valido**.
Ripetere il test

Se il problema persiste, contattare il produttore

10.2. Interpretazione dei risultati di test

SARS-CoV-2 è rilevato se la curva di amplificazione FAM™ mostra una forma sigmoidale con una Ct≤35, indipendentemente dal risultato ottenuto per il saggio RP (JOE™).

SARS-COV-2 non è rilevato se la curva FAM™ non è positiva (Ct>35) mentre RP (JOE™) mostra una curva sigmoidale positiva (Ct<40).

Il **test non è valido** se i saggi SARS-CoV-2 e RP sono entrambi negativi. Il test deve essere ripetuto con acido nucleico ri-purificato dal campione.

La tabella seguente riassume l'interpretazione dei risultati principali (valutare la forma complessiva delle curve di amplificazione; **solo le curve di amplificazione sigmoidale sono indicative di vera amplificazione**).

RISULTATO SARS-COV-2 SARS-CoV-2, CT (FAM™)	RISULTATO RP RP, CT (JOE™)	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI
+ (Ct≤35)	+ (Ct<40)	SARS-CoV-2 rilevato → POSITIVO
+ (Ct≤35)	- (Ct>40)	SARS-CoV-2 rilevato → POSITIVO
- (Ct>35)	+ (Ct<40)	SARS-CoV-2 non rilevato → NEGATIVO
- (Ct>35)	- (Ct>40)	Test non valido, ripetere estrazione e ripetere test

Nota 1: *NZYtech consiglia di ripetere l'analisi per tutti i campioni che mostrano una curva ambigua o atipica tale da non consentire una chiara interpretazione.*

Nota 2: *L'interpretazione dei risultati deve tener conto della possibilità di risultati falsi negativi e falsi positivi.*

- Sebbene il rischio di risultati falsi negativi sia mitigato dalla progettazione a doppio target del presente test, risultati falsi negativi possono essere causati da:
  - Raccolta, manipolazione e/o conservazione non idonee dei campioni.
  - Campione al di fuori della fase viremica.
  - Mancata osservanza delle procedure descritte nel presente manuale.
  - Uso di kit di estrazione o di piattaforma Real time PCR non autorizzati.

- Risultati falsi positivi possono essere causati da:
  - Manipolazione non idonea di campioni contenenti un'elevata concentrazione di RNA virale di SARS-CoV-2.
  - Manipolazione non idonea del controllo positivo SARS-COV-2 pos (RdRp & N).
  - Manipolazione non idonea del prodotto amplificato (piastra post-amplificazione).

Risultati negativi non escludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per le decisioni di gestione dei pazienti. Inoltre, questo test non può escludere malattie causate da altri patogeni batterici o virali.

11. Valutazione di performance

La valutazione di performance del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD di NZYtech è stata effettuata sui sistemi Real time PCR Applied Biosystems® 7500 FAST, Roche Life Science LightCycler 480 Instrument II, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro, Qiagen Rotor-Gene Q e Bio-Rad® CFX96™ con test aggiuntivi sul sistema PCR in tempo reale Applied Biosystems® StepOnePlus. Se si utilizza un'altra apparecchiatura, il kit deve essere validato dall'utente utilizzando campioni caratterizzati in precedenza (sia positivi che negativi).

11.1. Risultati previsti

Tipici grafici di amplificazione, osservati per un campione clinico contenente acidi nucleici di SARS-CoV-2, sono presentati in Figura 1. I due casi rappresentano esempi di campioni clinici che presentano cariche medie (A) e alte (B) sdi SARS-COV-2. Nei casi di cariche di SARS-CoV-2 molto levate (si veda Figura 1B) la curva del canale JOE, corrispondente al gene della RNasi P umana, può essere assente o può presentare una forma atipica.

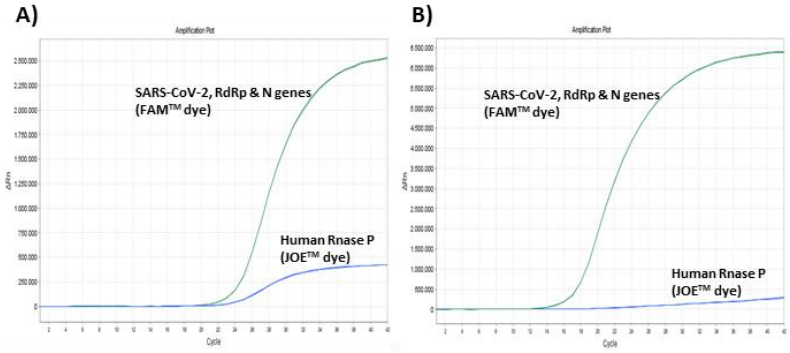

Figura 1. La rilevazione simultanea di SARS-CoV-2 (geni RdRp e N) e target di RNasi-P umana da campioni clinici positivi con cariche di SARS-CoV-2 medie (A) ed elevate (B). Curve verdi (A e B): rilevazione dei target di RNA virale di SARS-CoV-2 (geni RdRp e N) attraverso il canale FAM; curve blu (A e B): rilevazione del gene di RNasi P umana attraverso il canale JOE*. *(*alternativa VIC/HEX)*

11.2. Limite di rilevazione (LoD) - Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è stata definita come la concentrazione più bassa di analita che può essere rilevata in modo con affidabilità del 95%. Questa è stata determinata analizzando gli acidi nucleici di SARS-COV-2 con numeri di copie differenti, singolarmente o aggiunti all'RNA estratto da campioni orofaringei negativi, utilizzando 3 differenti lotti di kit seguendo condizioni di reazione di test tipiche. I test sono stati ripetuti su 4 giorni, producendo 48 replicati per ciascuna concentrazione di SARS-CoV-2 testata. Insieme, i dati hanno rivelato che il SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD di NZYtech rileva 0,15 copie/µL di RNA virale di SARS-CoV-2 con confidenza ≥95%. Quindi, il Limite provvisorio di rilevazione (LoD) è stato determinato essere 0,15 copie/µL o 150 copie/ml. Il LoD provvisorio è stato confermato da due operatori differenti usando tre lotti di kit in un esperimento con un totale di 48 replicati di matrice di tampone orofaringeo negativo addizionati indipendentemente. La capacità del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD di rilevare il virus a cariche diverse (da 5 × 10^6 a 5 copie per reazione) è presentata in Figura 2.

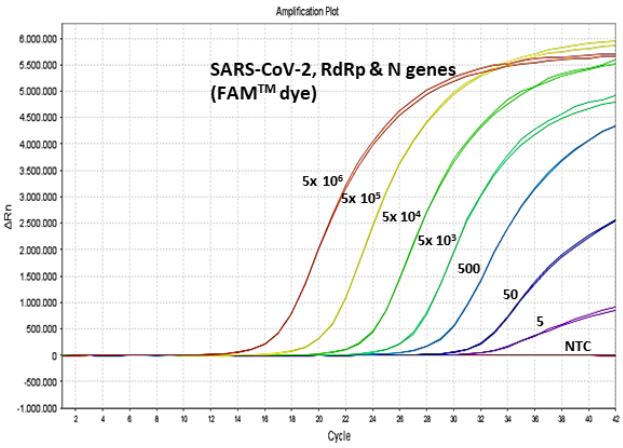

Figura 2. Sensibilità del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD. Grafico di amplificazione (numero di ciclo *vs.* fluorescenza - ΔRN) di diluizioni seriali 1:10 del vRNA di SARS-COV-2, da 5 × 10^6 copie a 5 copie per reazione attraverso il canale FAM. NTC, No Template Control (controllo negativo).

Per campioni non soggetti a protocollo di estrazione di acido nucleico e recuperati nel buffer indicato precedentemente, la sensibilità analitica è stata dapprima valutata confrontando i valori Ct di campioni clinici soggetti e non soggetti al processo di estrazione. Sono stati quindi selezionati 50 campioni clinici inizialmente classificati come positivi. Il saggio RT-PCR confronta i risultati del rilevamento di SARS-CoV-2 ottenuti per i campioni di RNA estratto con i corrispondenti campioni diretti non estratti. Per 50 campioni clinici positivi testati (soggetti ad estrazione "plus" RT-PCR o con il protocollo diretto RT-PCR) il valore minimo di Ct osservato è di 16,1 ed il maggiore di 34,9. I risultati indicano che, per il rilevamento di SARS-CoV-2, la differenza media dei valori Ct tra le due procedure è di 0,1. Il risultato suggerisce che il LoD non cambia a prescindere dal fatto che il campione sia sottoposto o meno ad uno step iniziale di estrazione dell'RNA. Come tale, il LoD del kit è stato rimisurato e confermato da due diversi operatori, per un totale di 48 replicati. I risultati ottenuti confermano che usando il formato del test diretto, il kit è in grado di rilevare 0,15 copie/µL di RNA virale di SARS-CoV-2 con una confidenza ≥95%.

11.3. Reattività analitica (Inclusività) e Specificità analitica

L'inclusività e la reattività crociata sono state valutate mediante analisi *in silico* di sonde oligonucleotidiche e primer contro patogeni correlati a SARS-CoV-2 e patogeni normali che causano infezioni con sintomi simili, rispettivamente. Dopo l'analisi *in silico*, è stato riscontrato che il test rileva tutti i ceppi di virus SARS-CoV-2 e non mostra reattività con specie non SARS-CoV-2.

L'analisi *in vitro* per la reattività crociata (esclusività) è stata eseguita per confermare che il SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD (MD0483) non reagiscono con altri organismi della flora umana ed i patogeni che possono essere comunamente riscontrati nel campione clinico. Questo studio è stato eseguito utilizzando tre pannelli commerciali di patogeni respiratori provenienti da ZeptoMetrix Multimarker Controls (#MDZ001), NATtrol™ Respiratory Pathogen Panel-1 (#NATRPP-1) e NATtrol™ RP Controls, (#NATRPC-NNS). Questi pannelli sono rappresentativi dei veri campioni clinici umani, inclusi Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A H1N1 (NY02/2009), Rhinovirus Tipo 1A, Adenovirus Tipo 3; Parainfluenza Tipo 1, Parainfluenza Tipo 2, Parainfluenza Tipo 3, Parainfluenza Tipo 4, Metapneumovirus (Perù 6-2003), *Chlamydophila pneumoniae* (CWL-029), *Mycoplasma pneumoniae* (M-129), Coxsackievirus (Tipo A1), Influenza A H1N1 (A/New Cal/20/99), influenza A H1N1 (A/Singapore/63/04), influenza B (B/Florida/02/06), virus respiratorio sinciziale A, virus respiratorio sinciziale B (CH93 (18)-18), Coronavirus (ricombinante HKU-1), Coronavirus (OC43), Coronavirus (NL63), Coronavirus (229E), *Bordetella pertussis* (A639), *Bordetella pertussis* (A747), *Bordetella holmesii* (F061), *Legionella pneumophila* (Philadelphia) e Human Bocavirus. Inoltre, sono stati testati anche altri microbi comuni del tratto orale e respiratorio, tra cui *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,* Streptococcus pyogenes, Streptomyces avermitilis, Streptomyces albidoflavus. Nessuno degli organismi testati ha interferito con la performance del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD generando un risultato falso positivo o un segnale non specifico.

L'impatto di 17 potenziali sostanze interferenti è stato valutato in test costituiti da campioni nasofaringei negativi addizionati con campioni positivi per SARS-CoV-2 a ~ 3x LoD. Sostanze potenziali interferenti sono state aggiunte ai campioni artificiali a concentrazioni che rappresentano i livelli più alti previsti nei campioni di pazienti respiratori umani sulla base dei dati della letteratura. Tutti i test sono stati eseguiti in quintuplice copia e i risultati sono stati confrontati con i dati ottenuti con un test di controllo che non conteneva interferenti. Alle concentrazioni testate, i risultati hanno rivelato che nessuna delle molecole in esame ha influito sulla sensibilità del rilevamento. La tabella seguente riassume i dati raccolti nell'ambito di questi esperimenti. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti sullo strumento PCR in tempo reale Applied Biosystems® 7500 FAST.

POTENZIALE INTERFERENCE	PRINCIPIO ATTIVO	CONCENTRAZIONE FINALE NEL CAMPIONE	INTERFERENZA SI (S) OR NO (N)
Acqua di mare isotonica (Rhinomer)	NaCl	15% v/v	N
Spray gola, anestetico orale e analgesico (Strepfen)	Flurbiprofene	5% v/v	N
Soluzione per lavaggio nasale (Allergy spray – Vibrocil)	Fluticasone propinato	5% v/v	N
Spray nasale ai corticosteroidi (Nasomet)	Mometasone furoato	5% v/v	N
Spray nasale ai corticosteroidi (Pulmicort)	Budesonide	5% v/v	N
Antimicrobico, sistemico (Trobex)	Trobamicina	10 µg/mL	N
Analgesocp orale, antinfiammatorio e antisettico (Pyralvex)	Estratto di rabarbaro, acido salicilico	5% v/v	N
Argomento oralfaringeo antimicotico e antibatterico (Daktarin)	Miconazolo	5 mg/mL	N
Soluzione di collutorio antisettici (Eludril Gé)	Clorexidina gluconato, Clorobutanolo emiidrato	5% v/v	N
Antitosse, Sciroppo (Codipront)	Codeina, citrato di feniltoloxamina	5% v/v	N
Sangue inteiro (umano)	-	4% v/v	N
Farmaco antivirale (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/mL	N
Mucolitico (Mucosolvan)	Ambroxolo cloridrato	5% v/v	N
Soluzione di gocce nasali (Nasarox)	Ossimetazolina cloridrato	10% v/v	N
Antibiotico, ungento nasale (Bactroban)	Mupirocina	5 mg/mL	N
Saliva (umana)	-	25% v/v	N
Etanolo assoluto	Alcol	5% v/v	N

11.4. Precisione

La precisione del saggio per il SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD di NZYtech è stata determinata mediante test ripetuti di acidi nucleici SARS-CoV-2 che rappresentano due livelli di carica virale, 5 (1,67 × LoD) e 150 (50× LoD) copie per reazione (0,25 e 7,50 copie/µL), singolarmente o aggiunti all'RNA estratto da campioni orofaringei negativi, utilizzando 3 lotti di kit diversi e seguendo le condizioni tipiche di reazione di test. La precisione è stata valutata misurando la media di Cq, il coefficiente di variazione di Cq e la percentuale di rilevazione di replicato, come descritto di seguito per ciascun caso. I dati vengono riassunti nella tabella visualizzata alla pagina che segue.

11.4.1. Ripetibilità

La ripetibilità è stata valutata da un operatore analizzando 36 replicati di ciascun campione (5 e 150 copie per reazione), per un numero finale di 72 test eseguiti.

11.4.2. Riproducibilità giornaliera

La riproducibilità giornaliera è stata valutata da un operatore analizzando 72 replicati di ciascun campione (5 e 150 copie per reazione), per 4 giorni con 18 replicati di ciascuna concentrazione al giorno (sono stati eseguiti in totale 144 saggi).

11.4.3. Riproducibilità da lotto a lotto

La riproducibilità tra lotti è stata valutata da un operatore attraverso l'analisi di 144 replicati di ciascun campione (5 e 150 copie per reazione) utilizzando 3 lotti di kit diversi con 48 replicati per lotto.

11.4.4. Riproducibilità dell'operatore

La riproducibilità dell'operatore è stata valutata analizzando 72 replicati di ciascun campione (5 e 150 copie per reazione), da quattro operatori diversi, con 36 replicati per operatore.

11.4.5. Riproducibilità tra strumenti

La riproducibilità tra strumenti è stata misurata da un operatore mediante test di 36 replicati di ciascun campione (5 e 150 copie per reazione), in due strumenti qPCR diversi (Applied Biosystems® 7500, Applied Biosystems® StepOnePlus), in un totale di 72 test per campione.

Sensibilità del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD

VARIABILE TESTATA		SARS-CoV-2 (COPIE/REAZIONE)	
		5	**150**
RIPETIBILITÀ	n	36	36
	Cq media	31,72	26,30
	Coefficiente di variazione (%)	1,94	1,60
	% Rilevazione replicato	100	100

RIPRODUCIBILITÀ GIORNALIERA	n	72	72
	Cq media	31,42	26,13
	Coefficiente di variazione (%)	1,50	1,55
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ DA LOTTO A LOTTO	n	144	144
	Cq media	31,49	26,24
	Coefficiente di variazione (%)	1,61	1,46
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ DELL'OPERATORE	n	72	72
	Cq media	31,45	26,21
	Coefficiente di variazione (%)	1,41	1,61
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ TRA STRUMENTI	n	72	72
	Cq media	31,81	26,46
	Coefficiente di variazione (%)	1,61	1,35
	% Rilevazione replicato	100	100

11.5. Valutazione clinica

Le prestazioni del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD con campioni prelevati da tampone nasofaringeo, sono state valutate da tre laboratori esterni. In totale, sono stati analizzati 340 campioni clinici negativi e 386 campioni clinici positivi. I dati hanno rivelato una percentuale di concordanza del 100% per tutti i campioni positivi e negativi testati. La valutazione della performance del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD è stata anche testata per campioni prelevati da tampone nasofaringeo non soggetti ad iniziale protocollo di estrazione dell'acido nucleico. In totale, sono stati analizzati 104 campioni clinici negativi e 51 campioni clinici positivi. La percentuale di concordanza per i campioni positivi e negativi analizzati è risultata essere del 100%.

12. Controllo di Qualità

Tutti i componenti del SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD sono testati seguendo i protocolli descritti sopra. Il sistema di PCR triplex in tempo reale consente la rilevazione di target descritti per l'identificazione di RNA virale di SARS-CoV-2 (geni RdRp e N) e mRNA umano (gene RNasi P, RP). Amplificazioni positive sono osservate per geni bersaglio, controllo positivo e controlli interni attraverso canali FAM e JOE, secondo i rispettivi primer/coloranti reporter del set di sonde.

13. Supporto Tecnico

Per il Supporto tecnico, contattare il nostro team di supporto tecnico dedicato al numero telefonico: +351 (0) 21 364 35 14 o tramite e-mail: info@nzytech.com.

14. Marchi di fabbrica e Disclaimer

Tutti i marchi di fabbrica presenti in questo manuale sono proprietà dei rispettivi proprietari.

15. Spiegazione dei simboli

IVD	Dispositivo medico-diagnostico *in vitro*		Consultare le istruzioni per l'uso
REF	Numero di catalogo		Produttore
LOT	Codice lotto		Utilizzare fino a
	Limite di temperatura	Σ	Sufficiente per
CONTROL +	Controllo positivo		Tenere lontano dalla luce solare (miscela primer/sonda)
CONTROL −	Controllo negativo		

16. Dichiarazione di conformità

Nome prodotto: SARS-CoV-2 One-Step RT-PCR Kit, RdRp and N target genes, IVD

Numero di catalogo MD04831

Uso previsto: Rilevazione qualitativa di SARS-CoV-2

Classificazione: Altri (non compresi nell'allegato II o non destinato all'autodiagnostici) secondo la Direttiva 98/79/CE

Produttore: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Noi, NZYtech, Lda – Genes & Enzyzes, con la presente, dichiariamo che questo prodotto, cui si riferisce la presente dichiarazione di conformità, è conforme ai seguenti standard e ad altra documentazione normativa ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016, ai sensi delle disposizioni della Direttiva 98/79/CE e il Regolamento (UE) 2017/746 su dispositivi medico-diagnostici *in vitro*, recepite nelle legislazioni nazionali degli Stati Membri dell'Unione Europea.

La scheda tecnica del prodotto è conservata presso NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício e, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.

Joana Brás, PhD

Direttore Tecnico

17. Bibliografia

WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. 13 march 2020. Disponibile online all'indirizzo 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 marzo 2020. Disponibile online all'indirizzo 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), pp. 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): Severe acute respiratory syndrome-related 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