SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD

Kit II RT-qPCR un passo per SARS-CoV-2, geni RdRp e N, IVD

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

REF MD04871, 96 reazioni
MD04872, 4 × 96 reazioni

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

CE IVD

IT

Istruzioni per l'uso

MD0487_IM_it

VERSIONE 2401, Gennaio 2023

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 4
   8.2. Requisiti di manipolazione e procedurali 4
9. Procedura di test 5
   9.1. Impostazione della reazione 5
   9.2. Programmazione dello strumento per Real time PCR 5
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. Inclusività, reattività crociata e sostanze interferenti 7
   11.4. Precisione 8
   11.4.1. Ripetibilità 8
   11.4.2. Riproducibilità giornaliera 8
   11.4.3. Riproducibilità da lotto a lotto 8
   11.4.4. Riproducibilità dell'operatore 8
   11.4.5. Riproducibilità tra strumenti 9
   11.5. Valutazione clinica 9
12. Controllo di Qualità 9
13. Supporto Tecnico 9
14. Marchi di fabbrica e Disclaimer 9
15. Spiegazione dei simboli 10
16. Dichiarazione di conformità 11
17. Bibliografia 12

1. Introduzione

Il Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2 (SARS-CoV-2), precedentemente denominato 2019-nCoV, è l'agente causale del Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) e come il coronavirus della SARS, cui è strettamente correlato, 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. Il SARS-CoV-2, che si ritiene essere di origine zoonotica, 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. Sebbene attualmente siano disponibili vaccini per il controllo di COVID-19, questi non prevengono l'infezione.

2. Uso previsto

Il SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD di NZYtech è un test molecolare di PCR quantitativa in tempo reale (Real time PCR) destinato alla rapida rilevazione qualitativa di acidi nucleici di SARS-CoV-2 in tamponi nasofaringei o orofaringei prelevati da pazienti con sospetto COVID-19. Un risultato positivo indica la presenza di RNA di SARS-CoV-2, 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-qPCR Kit II, RdRp and N 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 per real-time PCR (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 per SARS-CoV-2 hanno omologia del 100% con >95% delle >5M sequenze genomiche disponibili nel database GISAID al settembre 2021, includendo identità completa alle 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 RdRp e N di SARS-CoV-2, e RNasi P umana (RP)). La naturale evoluzione di SARS-CoV-2 implica che nuove informazioni sulle sequenze 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.

La RT-qPCR one-step rimane il metodo più affidabile e sensibile per eseguire una rilevazione accurata dell'RNA di SARS-CoV-2, indicativo di un'infezione in corso. L'RNA virale isolato e purificato da campioni infetti viene retrotrascritto a cDNA e successivamente amplificato in una singola reazione utilizzando due set di primer/sonde altamente specifici che sfruttano il cosiddetto principio TaqMan®. Durante questo processo, le sonde si ricombinano in modo specifico con due regioni del genoma di SARS-CoV-2 , ovvero i geni RdRp (all'interno del gene di poliproteina Orf1ab) e N. Un set aggiuntivo di primer/sonda agisce come controllo interno endogeno per rilevare acidi nucleici del gene RP umano, valutando la qualità del campione. Per consentire l'identificazione di amplificazione dei tre target specifici in una singola reazione, le sonde specifiche per i geni RdRp e N di di SARS-CoV-2 e per RP umana hanno diversi tag, rispettivamente con coloranti reporter HEX™, FAM™ e Cy5™. Si noti che questo pannello contiene un saggio duplex in due canali ottici distinti, HEX (in alternativa VIC o JOE) e FAM, per segnalare le prestazioni delle due amplificazioni SARS-CoV-2. Inoltre, primer e 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-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD di NZYtech fornisce un set completo di reagenti e controlli sufficienti per la rilevazione qualitativa di SARS-CoV-2 in un unico passaggio.

COMPONENTE DEL KIT		**VOLUME (PER FIALA)**	**NUMERO DI FIALE**	
			MD04871	**MD04872**
SARS-CoV-2 MMix II, ROX (RdRp & N)*	NZYSupreme One-step RT-qPCR Master Mix, ROX*	1050 µL	1	4
SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N)	Primer/sonda SARS-CoV-2/RP Mix II (etichettato HEX™, FAM™ e Cy5™)	205 µL	1	4
SARS-CoV-2 POS (RdRp e N)	SARS-CoV-2 (geni RdRp e N)/Controllo positivo RP (1×10^4 copie/µL)	105 µL	1	4
NTC	Controllo "No-Template"	105 µL	1	4

**Anche se la maggior parte degli strumenti PCR in tempo reale che leggono il colorante ROX consente agli utenti di eseguire esperimenti e analizzare dati senza ROX, l'inclusione di questo colorante di riferimento passivo interno previene errori di interpretazione dei dati e consente di rilevare e diagnosticare errori.*

5. Condizioni di conservazione, stabilità e manipolazione

Il SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD viene spedito refrigerato. All'arrivo, tutti i componenti devono essere conservati immediatamente 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. Procedere anche con le seguenti indicazioni:

- Ridurre al minimo il numero di cicli di congelamento-scongelamento conservando per aliquote di lavoro. Se necessario, i componenti del kit possono essere aliquotati in volumi più piccoli dopo lo scongelamento.
- Il Mix II di primer/sonda SARS-CoV-2/RP deve essere conservato al riparo dalla luce. In particolare, non esporre il SARS-CoV-2 M Mix II ROX (RdRp & N) alla luce diretta del sole dopo averlo risospeso con il mix primer/sonda.
- 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 che rileva coloranti fluorescenti quali FAM™, HEX™/JOE™/VIC™ e Cy5™ (a lunghezze d'onda di emissione di 520 e 556/555/670 nm, 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.

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 devono essere trasportati e conservati a basse temperature in conformità alle normative sulla biosicurezza. L'RNA o gli acidi nucleici totali estratti secondo un protocollo IVD costituiscono il materiale di partenza per il SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N 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 puro. 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 RP. Ciò è utile per controllare l'efficienza dell'isolamento dell'RNA e/o la presenza di inibitori durante l'elaborazione del campione.

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.

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 procedurali

- 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 monouso certificati 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 la provetta NTC per preparare la reazione di controllo no-template.
- 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-qPCR 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 su ghiaccio. **Si consiglia vivamente di pipettare per ultimo il controllo positivo SARS-CoV-2 (geni RdRp e N) onde evitare contaminazioni crociate.**

9.1. Impostazione della reazione

1. Preparare una miscela RT-qPCR sufficiente per il numero di test SARS-CoV-2/ RP 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 II, ROX (RdRp & N)(**)	10	*n* × 10,5
SARS-CoV-2 PPMix II (RdRp & N)	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 no-template e positivo, rispettivamente.

(**) Si noti che è possibile osservare un precipitato nella parte inferiore della provetta di miscela master. Dopo aver scongelato la miscela master, rimettere in sospensione prima dell'uso. In questo caso, non far ruotare la miscela master prima del pipettaggio.

2. Pipettare 12 µL della miscela RT-PCR in pozzetti singoli in base alla configurazione della piastra di reazione per Real time PCR.
3. Per il controllo "no-template", aggiungere 8 µL di NTC invece di RNA stampo nel pozzetto di controllo no-template. Il volume finale deve essere di 20 µL.
4. Per i campioni biologici, 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.
5. Per il controllo positivo, aggiungere 8 µL di SARS-CoV-2 POS (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 Real time PCR ed eseguire il protocollo RT-PCR in base alla sezione seguente.

9.2. Programmazione dello strumento per Real time PCR

Le tabelle seguenti mostrano due protocolli termici ottimizzati (standard e rapido) per eseguire test SARS-CoV-2/RP utilizzando SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD, sulle piattaforme di seguito indicate.

- **Protocollo standard**

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.*

Il **protocollo standard** per SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD di NZYtech è stato convalidato per i seguenti sistemi Real time PCR: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro e Bio-Rad® CFX96™. Se si utilizzano altre apparecchiature, il kit deve essere convalidato dall'utente utilizzando campioni precedentemente caratterizzati (sia positivi che negativi).

- **Protocollo rapido**

CICLI	TEMPERATURA	TEMPO	FASE
1	50 °C	10 min	Reverse Transcription
1	95 °C	1 min	Polymerase activation
40	95 °C	5 s	Denaturation
	60 °C	20 s	Annealing/Extension*

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

Il **protocollo rapido** per SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD di NZYtech è stato convalidato per i seguenti sistemi PCR in tempo reale: Applied Biosystems® QuantStudio 5 e Bio-Rad® CFX96™. Se si utilizzano altre apparecchiature, il kit deve essere convalidato dall'utente utilizzando campioni precedentemente caratterizzati (sia positivi che negativi).

I coloranti fluorescenti utilizzati in questo kit e i rispettivi canali di rilevazione sono:

TARGET	COLORANTE FLUORESCENTE*	CANALI DI RILEVAZIONE
SARS-CoV-2, gene RdRp	HEX™	JOE, VIC o HEX
SARS-CoV-2, gene N	FAM™	FAM
RNasi P	Cy5™	Cy5

**L'apertura del canale ROX consente di utilizzare questo colorante di riferimento passivo interno per evitare errori di interpretazione dei dati ed errori conseguenti.*

10. Analisi dei dati

10.1. Criteri di convalida esecuzione

La presenza di RNA SARS-CoV-2 viene eseguita rilevando due regioni del genoma virale in canali di fluorescenza differenti (FAM e HEX), e il controllo di RP umano in un terzo canale (Cy5). 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 tre segnali di fluorescenza (FAM™, HEX™ e Cy5™) vengono determinate automaticamente dal software o, se necessario, con regolazioni manuali. Prima di analizzare i risultati dei campioni, si consiglia di verificare che il test Real time PCR sia valido. Quindi, per ogni piastra, confermare che i risultati per i controlli positivi e negativi sono eseguiti come previsto, secondo i seguenti criteri:

Controllo positivo: Le curve di amplificazione delle curve JOE (per il gene RdRp di SARS-CoV-2), FAM (per il gene N di SARS-CoV-2) e Cy5 (per il gene RP) sono positive. Il controllo positivo dovrebbe amplificarsi a una Ct<30, sia nei canali FAM, JOE che nel Cy5. Il mancato rispetto di questo criterio di controllo qualità è una forte indicazione che l'esperimento è stato compromesso.

Controllo negativo (NTC): non viene rilevata alcuna amplificazione. Se il controllo negativo ha una, due o tre curve di amplificazione (JOE, FAM e/o Cy5) con una forma sigmoidale, può essersi verificata una contaminazione del campione. Ripetere il test seguendo le buone pratiche RT-PCR.

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 entrambe le curve di amplificazione JOE e FAM presentano una forma sigmoidale con Ct≤36, indipendentemente dal risultato ottenuto per il saggio RP (Cy5).
- **SARS-CoV-2 non è rilevato** se entrambe le curve di amplificazione JOE e FAM non sono positive (Ct>36) mentre la RP (Cy5) mostra una curva sigmoidale positiva (Ct<40).
- **Il test non è conclusivo per SARS-CoV-2** se le curve di amplificazione JOE o FAM non mostrano una forma sigmoidale con un Ct≤36 mentre l'altro target SARS-CoV-2 è positivo, indipendentemente dal risultato ottenuto per il saggio RP (Cy5). Il test deve essere ripetuto con acido nucleico ri-purificato dal campione.
- **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 GENE RDRP SARS-CoV-2, CT (JOE)	**RISULTATO SARS-CoV-2** GENE N SARS-CoV-2, CT (FAM)	**RISULTATO RP** GENE RP, CT (CY5)	**INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**
+ (Ct≤36)	+ (Ct≤36)	+/-	SARS-CoV-2 rilevato → POSITIVO
+ (Ct≤36)	- (Ct>36)	+/-	SARS-CoV-2 rilevato solo per un target → NON CONCLUSIVO
- (Ct>36)	+ (Ct≤36)	+/-	SARS-CoV-2 rilevato solo per un target → NON CONCLUSIVO
- (Ct>36)	- (Ct>36)	+ (Ct<40)	SARS-CoV-2 non rilevato → NEGATIVO
- (Ct>36)	- (Ct>36)	- (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 PCR in tempo reale 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 POS (RdRp & N) SARS-CoV2 di controllo positivo.
  - 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 delle prestazioni del SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD di NZYtech è stata effettuata utilizzando il protocollo standard sopraindicato su sistemi di Real time PCR Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Applied Biosystems® QuantStudio 6 Pro 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).

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 casi rappresentano esempi di campioni clinici che presentano cariche medie (Pannello A) e alte (Pannello B) di SARS-CoV-2. Si noti che in casi di cariche di SARS-CoV-2 molto elevate la curva del canale HEX, corrispondente al gene della RNasi P umana, può essere assente o può presentare una forma atipica (Figura 1A).

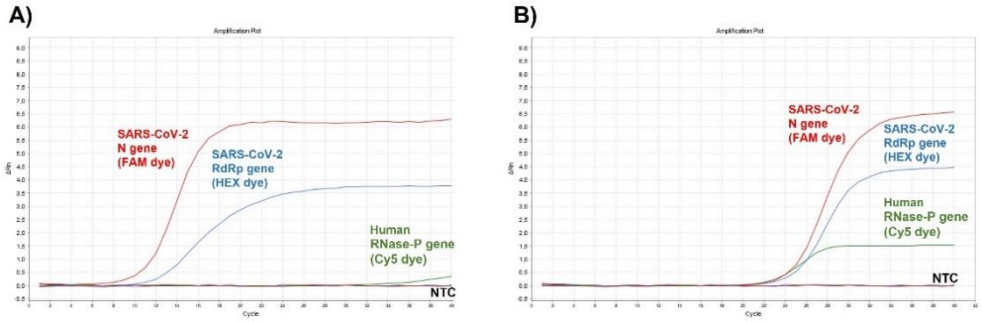

Figura 1. Rilevazione simultanea di target di SARS-CoV-2 (geni RdRp e N) e di RNasi-P umana da campioni clinici positivi con cariche di SARS-CoV-2 elevate (A) ed medie (B). **Curva rossa**: rilevazione del target di vRNA SARS-CovV-2 (gene N) attraverso il canale FAM; **curva blu**: rilevazione del target di vRNA SARS-CoV-2 (gene RdRp) attraverso il canale HEX (*alternative VIC/JOE*); **curva verde**: rilevazione del gene di RNasi P umana attraverso il canale Cy5.

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 con affidabilità del 95%. Questa è stata determinata testando acidi nucleici di SARS-CoV-2 a numeri di copie differenti, singolarmente o aggiunti all'RNA estratto da campioni orofaringei negativi, utilizzando 3 differenti lotti di kit e seguendo condizioni di reazione di test tipiche. I test sono stati ripetuti su 3 giorni, producendo 96 replicati per ciascuna concentrazione di SARS-CoV-2 testata. Insieme, i dati hanno rivelato che il SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD di NZYtech rileva 0,25 copie/µL di RNA virale di SARS-CoV-2 con confidenza ≥95%, usando il protocollo standard. 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. Lo stesso LoD è stato confermato per il protocollo rapido.

11.3. Inclusività, reattività crociata e sostanze interferenti

Inclusività e reattività crociata sono state valutate mediante analisi *in silico* di sonde oligonucleotidiche e primer contro agenti patogeni correlati a SARS-CoV-2 e patogeni normali che causano infezione con sintomi simili, rispettivamente. Dopo l'analisi *in silico*, il saggio si è rivelato in grado di rilevare tutti i ceppi di virus SARS-CoV-2 e non ha mostrato 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-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD di NZYtechnon non reagisca con altri microrganismi colonizzanti umani e patogeni comunemente incontrati in campioni clinici. Questo studio è stato eseguito utilizzando tre pannelli commerciali di patogeno respiratorio provenienti da ZeptoMetrix, in particolare Controlli Multimarker RP (#MDZ001), Pannello 1 di patogeno respiratorio (#NATRPP-1) e Controlli RP NATtrol™, (#NATRPC-NNS). Tali gruppi comprendono sondaggi rappresentativi di reali campioni clinici umani, tra cui 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 (HKU-1 ricombinante), Coronavirus (OC43), Coronavirus (NL63), Coronavirus (229E), *Bordetella. pertussis* (A639), *Bordetella pertussis* (A747), *Bordetella holmesii* (F061), *Legionella pneumophila* (Philadelphia) e Bocavirus umano. Tutti i test sono stati eseguiti in triplicati. Inoltre, sono stati anche testati altri microrganismi comuni del tratto respiratorio umano, 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* e *Streptomyces albidoflavus*. I dati, raccolti utilizzando tre diversi lotti di kit, hanno confermato che nessuno degli organismi testati interferiva con le prestazioni del SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD di NZYtech generando risultato falso positivo o segnale aspecifico.

L'impatto di 17 potenziali sostanze interferenti è stato valutato mediante test consistenti di campioni nasofaringei negativi, addizionati con campioni positivi a SARS-CoV-2 a ~3× LoD. Ai campioni artificiali sono state aggiunte potenziali sostanze interferenti a concentrazioni che rappresentano i livelli più elevati attesi in campioni respiratori umani in base ai dati in letteratura. Tutti i test sono stati eseguiti in quintuplicato 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 influenzato la sensibilità della rilevazione. La tabella seguente riepiloga i dati raccolti in base a questi esperimenti. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti con lo strumento per PCR in tempo reale 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 di saggio per il SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD di NZYtech è stata determinata mediante test ripetuti di acidi nucleici di SARS-CoV-2 che rappresentano due livelli di carica virale, 15 (1,67 × LoD) e 150 (50× LoD) copie per reazione (0,75 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 sono riepilogati nella tabella che segue.

11.4.1. Ripetibilità

La ripetibilità è stata valutata da un operatore analizzando 12 replicati di ciascun campione (15 e 150 copie per reazione), per un numero finale di 24 test eseguiti.

11.4.2. Riproducibilità giornaliera

La riproducibilità giornaliera è stata valutata da un operatore analizzando 48 replicati di ciascun campione (15 e 150 copie per reazione), per 4 giorni con 12 replicati di ciascuna concentrazione al giorno (sono stati eseguiti in totale 120 saggi).

11.4.3. Riproducibilità da lotto a lotto

La riproducibilità tra lotti è stata valutata da un operatore attraverso l'analisi di 60 replicati di ciascun campione (15 e 150 copie per reazione) utilizzando 3 lotti di kit diversi con 20 replicati per lotto.

11.4.4. Riproducibilità dell'operatore

La riproducibilità dell'operatore è stata valutata analizzando 36 replicati di ciascun campione (15 e 150 copie per reazione), da tre operatori diversi, con 12 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 (15 e 150 copie per reazione), in tre strumenti qPCR diversi (Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5 e Bio-Rad® CFX96™ Real Time PCR Systems), in un totale di 72 test per campione.

Precisione del SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD di NZYtech

VARIABILE TESTATA		GENE RDRP (COPIE/REAZIONE)		GENE N (COPIE/REAZIONE)	
		15	**150**	**15**	**150**
RIPETIBILITÀ	n	12	12	12	12
	Cq media	31,67	28,46	31,59	28,36
	Coefficiente di variazione (%)	1,45	0,66	1,18	0,77
	% Rilevazione replicato	100	100	100	100
RIPRODUCIBILITÀ GIORNALIERA	n	48	48	48	48
	Cq media	32,26	28,89	32,30	28,89
	Coefficiente di variazione (%)	1,73	1,23	1,73	1,33
	% Rilevazione replicato	98	100	98	100
RIPRODUCIBILITÀ DA LOTTO A LOTTO	n	60	60	60	60
	Cq media	32,14	28,81	32,16	28,78
	Coefficiente di variazione (%)	1,83	1,29	1,87	1,44
	% Rilevazione replicato	98	100	98	100
RIPRODUCIBILITÀ DELL'OPERATORE	n	36	36	36	36
	Cq media	31,59	28,37	31,71	28,47
	Coefficiente di variazione (%)	1,92	0,74	1,82	0,84
	% Rilevazione replicato	100	100	100	100
RIPRODUCIBILITÀ TRA STRUMENTI	n	36	36	36	36
	Cq media	31,74	28,53	32,31	29,21
	Coefficiente di variazione (%)	1,67	1,22	2,02	2,12
	% Rilevazione replicato	100	100	100	100

11.5. Valutazione clinica

Le prestazioni del SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD di NZYtech con campioni prelevati di tampone nasofaringeo, sono state valutate da due laboratori esterni usando il protocollo standard. In totale, sono stati analizzati 240 campioni clinici negativi e 130 campioni clinici positivi. I dati hanno rivelato un grado di accordo del 100% per tutti i campioni positivi e negativi testati. Il protocollo rapido è stato anch'esso validato con campioni positivi e negativi da tamponi nasofaringei. I dati hanno rivelato un grado di accordo del 100% per tutti i campioni clinici testati.

12. Controllo di Qualità

Tutti i componenti del SARS-CoV-2 One-Step RT-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD di NZYtech 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 tramite canali FAM, HEX/JOE/VIC e Cy5 secondo i rispettivi coloranti reporter di set primer/sonda.

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-qPCR Kit II, RdRp and N genes, IVD

Numero di catalogo MD04871 e MD04872

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, qui dichiariamo che questo prodotto, cui si riferisce la presente dichiarazione di conformità, è conforme ai seguenti standard e ad altri documenti normativi ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016, ai sensi delle disposizioni della Direttiva 98/79/CE e del Regolamento (EU) 2017/746 su dispositivi medico-diagnostici *in vitro*, così come trasposti 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