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

Kit Multiplex un passo per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B, IVD

REF MD04851, 96 reazioni

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

CE IVD

IT

Istruzioni per l'uso

IM-003it

VERSIONE 01/2022, dicembre 2022

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

Conteúdo

1. Introduzione 3
2. Uso previsto 3
3. Principi del Saggio 3
4. Composizione del kit 5
5. Condizioni di conservazione, stabilità e manipolazione 5
6. Materiali e strumentazione necessari ma non forniti 5
7. Raccolta e preparazione dei campioni 6
8. Precauzioni e Avvertenze 6
   8.1. Informazioni sulla sicurezza 6
   8.2. Requisiti di manipolazione e procedurali 6
9. Procedura di test 7
9.1. Impostazione della reazione 7
9.2. Programmazione dello strumento per PCR in tempo reale 8
10. Analisi dei dati 9
   10.1. Criteri di convalida esecuzione 9
   10.2. Interpretazione dei risultati di test 10
11. Valutazione di performance 11
   11.1. Risultati previsti 11
   11.2. Limite di rilevazione (LoD) - Sensibilità analitica 11
   11.3. Reattività analitica (Inclusività) e Specificità analitica 13
   11.4. Precisione 14
   11.5. Valutazione clinica 16
12. Controllo di Qualità 16
13. Supporto Tecnico 17
14. Marchi di fabbrica e Disclaimer 17
15. Spiegazione dei simboli 17
16. Dichiarazione di conformità 18
17. Bibliografia 19

1. Introduzione

L'attuale pandemia di Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), identificata per la prima volta in Cina e rapidamente diffusasi nella maggior parte dei paesi, ha causato morbilità e mortalità a una scala globale senza precedenti, il che ha portato a crisi sanitarie globali e ha messo a dura prova le risorse sanitarie. L'agente eziologico, il Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), è un nuovo *Betacoronavirus* filogeneticamente affine a SARS-CoV. L'influenza stagionale è un'infezione virale contagiosa delle vie respiratorie e rappresenta una delle principali cause globali di morbilità, mortalità e peso sui servizi sanitari. Tuttavia, il suo tasso di mortalità è molto inferiore a quello di COVID-19. I virus influenzali di tipo A e B sono i tipi dominanti di virus influenzale circolante e le epidemie influenzali sono per la maggior parte correlate al tipo A. Sia i coronavirus che i virus influenzali sono malattie respiratorie altamente contagiose trasmesse tramite contatto, goccioline respiratorie (diffuse da tosse e starnuti) e superfici contaminate. COVID-19 potrebbe essere confusa clinicamente con polmonite causata da virus influenzali e la co-infezione reca una prognosi sfavorevole. La sovrapposizione della stagione influenzale con la pandemia di COVID-19 complica la gestione clinica dei pazienti con sintomi respiratori. La rilevazione precoce di SARS-CoV-2 è di vitale importanza per trattare tempestivamente i pazienti infetti e, pertanto, per ridurre la diffusione delle infezioni. Sarà utile eseguire test in combinazione sia per COVID-19 che per l'influenza, in quanto un campione singolo potrebbe essere utilizzato per distinguere le due infezioni in pazienti che presentano sintomi simili.

2. Uso previsto

Il Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B, IVD di NZYTech è un test molecolare destinato alla rapida rilevazione qualitativa degli agenti eziologici di COVID-19 e influenza (influenza A e influenza B) in campioni biologici umani. Tuttavia, questo kit non fa distinzione tra i tipi di influenza A e B, in quanto vengono entrambi rilevati nello stesso canale di fluorescenza per FAM. Inoltre, altri beta coronavirus o virus influenzali, ad esempio l'influenza C, non vengono rilevati con questo kit. Questo test è destinato ad essere utilizzato come ausilio nella diagnosi di SARS-CoV-2 e di influenza in combinazione con fattori di rischio clinici ed epidemiologici. Un risultato positivo indica la presenza di RNA di SARS-COV-2 e/o RNA, ma per determinare lo stato di infezione del paziente è necessaria la correlazione clinica con l'anamnesi del paziente, oltre ad altre informazioni diagnostiche. Risultati negativi non escludono l'infezione e pertanto l'esito del test non deve essere utilizzato come sola base per il trattamento o per altre decisioni di gestione del paziente. Questo kit è destinato all'uso da parte di personale di laboratorio debitamente qualificato, specificamente addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e nella diagnostica *in vitro* .

3. Principi del Saggio

Il Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B, IVD di NZYTech fornisce il set completo di reagenti e sonde per la rilevazione qualitativa dei genomi di SARS-CoV-2 e/o inflienza, attraverso le comuni piattaforme PCR in tempo reale (si vedano le specifiche strumento richieste in **Sezione 6**). SARS-CoV-2 viene identificato rilevando target di RT-qPCR situati nei geni RdRp e N. I virus dell'influenza A e dell'influenza B, invece, vengono rivelati attraverso l'amplificazione di target situati rispettivamente nei geni M1 e NS2. Il Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B, IVD di NZYTech è realizzato per avere il profilo di

rilevazione più ampio possibile, pur rimanendo specifico per i genomi di SARS-CoV-2 e dei tipi di Influenza A e B. Fornisce il set completo di reagenti e sonde per rilevare i tre genomi virali, comprendendo un efficace controllo interno per confermare tra l'altro l'estrazione efficiente dell'RNA campione e l'assenza di inibitori della PCR. Questo kit individua regioni altamente conservate di genomi di SARS-CoV-2 (includento l'identità completa per le varianti Delta (B.1.617.2) e Omicron (B.1.1.529)) e influenza A e B, mediante un set di primer/sonde altamente ottimizzato. I primer e le sonde hanno omologia del 100% con >95% delle >10000 sequenze genomiche disponibili nel database GISAID al novembre 2022. Inoltre, primer e sonde non mostrano omologia significativa con genomi non correlati, il che rende questo test altamente specifico. L'evoluzione naturale dei virus rilevati da questo kit implica che nuove informazioni sulla sequenza diventeranno disponibili successivamente, riflettendo le strategie di adattamento virale. 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 è il metodo più veloce e affidabile per eseguire una rilevazione accurata degli RNA virali di SARS-CoV-2 e Influenza A e B. Il Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B, IVD di NZYTech è un saggio multiplex che rileva SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B e acidi nucleici umani (che fungono da controllo positivo interno). L'RNA estratto e purificato viene trascritto a cDNA e successivamente amplificato in una singola reazione utilizzando cinque set di primer/sonde altamente specifici, ovvero quelli che rivelano l'RNA polimerasi dipendente da RNA di SARS-CoV-2 (RdRp) e i geni della fosfoproteina del nucleocapside (N), geni specifici di matrice dell'Influenza A e B e Nonstrutturali (NS2) e il gene della ribonucleasi P umana (RNasi P, RP). Il kit sfrutta il cosiddetto principio TaqMan®. Durante questo processo, le sonde si legano specificamente ai loro geni target e dopo amplificazione del DNA, tramite due primer di affiancamento, sono soggette a degradazione che porta alla separazione del colorante reporter dal quencher, con conseguente incremento della fluorescenza. La rilevazione del controllo interno (il gene della RNasi P umana) convalida l'efficacia del processo di estrazione e l'assenza di inibitori della PCR potenzialmente presenti nei campioni biologici umani. Per consentire l'identificazione dell'amplificazione dei cinque target specifici in una singola reazione, le sonde specifiche di SARS-CoV-2, Influenza A e B e RNasi P umana hanno tag diversi, rispettivamente coloranti reporter Texas Red®, FAM™ ed HEX™ . Si noti che questo pannello contiene un saggio duplex nei canali Texas Red® (geni target specifici per SARS-CoV-2 RdRp e N) e FAM™ (geni target specifici per Influenza A e Influenza B). Ciò consente di riportare una performance additiva dei dosaggi per la rilevazione di SARS-CoV-2, ma preclude la distinzione tra infezioni di Influenza A e B. Inoltre, i cinque set di primer/sonde sono forniti in concentrazioni ottimizzate garantendo che l'amplificazione di acidi nucleici meno abbondanti non sia compromessa quando sono presenti altri target virali a concentrazioni più elevate.

4. Composizione del kit

Il Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B (IVD) di NZYTech fornisce un set completo di reagenti sufficienti per eseguire 96 reazioni RT-qPCR in un unico passaggio.

Componente del kit		**Numero di Fiale**	**Volume (per fiala)**
MMix COVID-19/Influenza	Mix Master Sonda RT-qPCR NZYMultiplex One-step(2×)	1	1050 µL
Mix Primer COVID-19/Influenza	Mix Primer COVID-19 e Influenza A/B (20×)	1	103 µL
Mix Sonda COVID-19/Influenza	Mix Sonda COVID-19 e Influenza A/B (20×)	1	103 µL
COVID-19/Influenza Pos 1	COVID-19 e Influenza A/B Controllo Positivo 1 (SARS-CoV-2 ORF1ab, Influenza B NS2 e geni RP umani)	1	105 µL
COVID-19/Influenza Pos 2	COVID-19 e Influenza A/B Controllo Positivo 2 (SARS-CoV -2 N, Influenza B M1 e geni RP umani)	1	105 µL
NTC	Controllo No-template	1	105 µL

5. Condizioni di conservazione, stabilità e manipolazione

Il Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR (IVD) di COVID-19 e Influenza A/B viene spedito refrigerato. Tutti i componenti devono essere conservati immediatamente a una temperatura compresa tra -85 °C e -15 °C all'arrivo. 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.

- 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 sonda COVID-19 e Influenza A/B (20×) deve essere conservato al riparo dalla luce. In particolare, non esporre Il Mix Master RT-qPCR NZYMultiplex One-Step alla luce diretta del sole dopo la combinazione con il mix 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 canali di fluorescenza Texas Red®, FAM™ ed HEX™ (a lunghezze di emissione di 615, 520 e 556 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.

- Pipettatori 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, lavaggio/aspirati nasofaringei, aspirati nasali, sputo, fluido di risciacquo della gola e BAL), 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 CE IVD sono il materiale di partenza per il Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR (IVD) di COVID-19 e Influenza A/B di NZYTech. 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 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.

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). Questa rilevazione mediante il kit 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 puntali monouso certificati DNase/RNase free.

- Utilizzare punte con filtro certificati DNase/RNase free in tutto il protocollo 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.
- I controlli positivi contengono stampi in un elevato numero di copie; devono essere aperti ed elaborati lontano dai campioni da testare e da componenti del kit per evitare contaminazione incrociata.
- Utilizzare sempre l'acqua fornita nel kit (acqua COVID/ Influenza Neg /DNase free).
- 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 manipolati 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.
- 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 versato la piastra, iniziare immediatamente con il protocollo RT-qPCR one-step. L'incubazione prolungata di miscele di reazione a temperatura ambiente può causare artefatti di 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 i controlli positivi 1 e 2 per COVID-19 e Influenza A/B per ultimi 1 e 2 in modo da evitare contaminazioni incrociate.**

9.1. Impostazione della reazione

1. Preparare una miscela RT-qPCR sufficiente per il numero di test SARS-CoV-2 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)
COVID-19/Flu Mix (2x)(**)	10	*n* × 10,5
Mix primer COVID-19/Flu (20×)	1	*n* × 1,05
Mix sonda COVID-19/Flu (20×)	1	*n* × 1,05
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 tre per il controllo negativo e per i due positivi.
(**) Si noti che è possibile osservare un precipitato nella parte inferiore della provetta di miscela master, in particolare dopo cicli multipli di congelamento/scongelamento. Per garantire prestazioni ottimali, assicurarsi che tutti i componenti siano scongelati e risospesi prima dell'uso. In questo caso, non centrifugare la miscela master prima del pipettaggio.

2. Pipettare 12 µL della miscela RT-qPCR in pozzetti singoli in base alla configurazione della piastra di reazione per Real time PCR.
3. Per il controllo negativo, aggiungere 8 µL di controllo no-template (NTC) invece di stampo RNA nel pozzetto di controllo negativo. 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/Influenza , in base alla configurazione della piastra sperimentale. Il volume finale in ciascun pozzetto deve essere di 20 µL.
5. Per i due controlli positivi, aggiungere 8 µL di COVID-19/Flu Pos 1 (rileva i geni SARS-COV-2 ORF1ab, Influenza B NS2 e RP umano) e 8 µL di COVID-19/Flu pos 2 (geni SARS-COV-2 N, Influenza A M1 e RP umano) al posto dello stampo RNA nei pozzetti 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-qPCR e con i passaggi di rilevazione.
7. Collocare la piastra di reazione nello strumento per PCR in tempo reale ed eseguire il protocollo RT-qPCR secondo la sezione che segue.

9.2. Programmazione dello strumento per PCR in tempo reale

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

Impostazioni consigliate di esecuzione RT- PCR

Cicli	Temperatura	Tempo	Fase
1	50 °C	20 min	Trascrizione inversa
1	95 °C	3 min	Attivazione della polimerasi
40	95 °C	5 s	Denaturazione
	60 °C	1 min	Annealing/Estensione

[*]I dati fluorogenici devono essere raccolti durante questa fase attraverso i canali Texas Red/JUN, FAM e HEX/VIC.

Marcatori fluorescenti & rivelatori

Targets	Marcatore fluorescente
RdRp & N targets (SARS-CoV-2)	Texas Red®
Influenza A M1 target (Influenza A)	FAM™
Influenza B NS2 target (Influenza B)	FAM™
RNase P	HEX™/VIC®
COVID-19/Influenza Pos 1	Texas Red® & FAM™ & HEX™/VIC®
COVID-19/Influenza Pos 2	Texas Red® & FAM™ & HEX™/VIC®

Il Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B di NZYTech è stato convalidato per i seguenti sistemi PCR in tempo reale: Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5 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

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 (Texas Red, FAM^{T} e HEX/VIC) vengono determinate automaticamente dal software con regolazioni manuali nel caso in cui ciò si renda necessario. Prima di analizzare i risultati dei campioni, si consiglia di verificare se il test PCR in tempo reale sia valido. Quindi, per ogni piastra, confermare se i risultati per i controlli positivi e negativi sono eseguiti come previsto, secondo i seguenti criteri:

Controlli positivi: L'amplificazione delle curve FAM (Influenza B nel controllo 1 e Influenza A nel controllo 2), Texas Red (gene SARS-CoV-2 ORF1ab in controllo 1 e gene N in controllo 2) e HEX/VIC (RNasi P) è positiva. I controlli positivi dovrebbero amplificarsi a Ct<32, nei tre canali. 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 presenta curve di amplificazione (Texas Red, FAM e HEX/VIC) di forma sigmoidale, è possibile che si sia verificata una contaminazione del campione. Ripetere il test seguendo buone pratiche RT-qPCR.

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 Texas Red mostra una forma sigmoidalecon un Ct≤35, indipendentemente dal risultato ottenuto per il saggio RNase P (HEX/VIC).

Influenza A e/o Influenza B è rilevata se la curva di amplificazione FAM^{T} mostra una forma sigmoidale con una Ct≤35, indipendentemente dal risultato ottenuto per il saggio RNase P (HEX/VIC).

SARS-CoV-2 e Influenza A e/o Influenza B non sono rilevati se le curve Texas Red e FAM non amplificano o amplificano a Ct>35, mentre il saggio RNasi P (HEX/VIC) mostra una curva sigmoidale positiva (Ct≤40).

Il **test non è valido** se i saggi SARS-CoV-2, Influenza A/B e RNasiP sono 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 (Texas Red)	**Risultato Influenza A/B.** (FAM)	**Risultato RNasi P** (HEX)	**Interpretazione dei risultati**
+ (Ct≤35)	**- (Ct>35)**	**+ (Ct≤40)**	**SARS-CoV-2 rilevato → POSITIVO**
+ (Ct≤35)	**- (Ct>35)**	**- (Ct>40)**	**SARS-CoV-2 rilevato → POSITIVO**
- (Ct>35)	**+ (Ct≤35)**	**+ (Ct≤40)**	**Influenza A/B rilevata → POSITIVO**
- (Ct>35)	**+ (Ct≤35)**	**- (Ct>40)**	**Influenza A/B rilevata → POSITIVO**
+ (Ct≤35)	**+ (Ct≤35)**	**+ (Ct≤40)**	**SARS-CoV-2 e Influenza A/B rilevati → POSITIVO**
+ (Ct≤35)	**+ (Ct≤35)**	**- (Ct>40)**	**SARS-CoV-2 e Influenza A/B rilevati → POSITIVO**
- (Ct>35)	**- (Ct>35)**	**+ (Ct≤40)**	**SARS-CoV-2 e Influenza A/B non rilevati → NEGATIVO**
- (Ct>35)	**- (Ct>35)**	**- (Ct>40)**	**Test non valido, ripetere l'estrazione e 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.
- Manipolazione non idonea dei controlli positivi.
- Manipolazione non idonea del prodotto amplificato (piastra post-amplificazione).

Risultati negativi non escludono l'infezione e non devono essere utilizzati come unica base per il trattamento o per altre decisioni di gestione dei pazienti. Inoltre questo test non può escludere malattie causate da altri patogeni batterici o virali.

11. Valutazione di performance

Queste prestazioni del kit sono state convalidate per gli strumenti specificati nella sezione 9.2 (si veda sopra). 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 campioni clinici negativi (Figura 1A) o campioni da pazienti infettati con SARS-CoV-2 (Figura 1B), Influenza A e/o Influenza B (Figura 1C), o entrambi (Figura 1D), sono presentati in Figura 1.

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, Influenza A e Influenza B 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 testata. Insieme, i dati hanno rivelato che il Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B, IVD (IVD) di NZYTech rileva 0,25 copie/µl di RNA di SARS-CoV-2, 0,75 copie/µl di RNA di influenza A e 1,25 copie/µl di RNA di influenza B con una confidenza ≥95%. Quindiì, il Limite provvisorio di Rilevazione (LoD) è stato determinato essere 0,25 copie/µl o 250 copie/ml per SARS-CoV-2, 0,75 copie/µl o 750 copie/ml per Influenza A e 1,25 copie/µl o 1250 copie/ml per Influenza B. il LoD provvisorio è stato confermato da due operatori diversi utilizzando tre lotti di kit in un esperimento con un totale di 48 replicati di matrice tampone orofaringeo negativo inseriti indipendentemente. La capacità del Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B (IVD) di NZYTech di rilevare il virus a cariche diverse è illustrata in Figura 2.

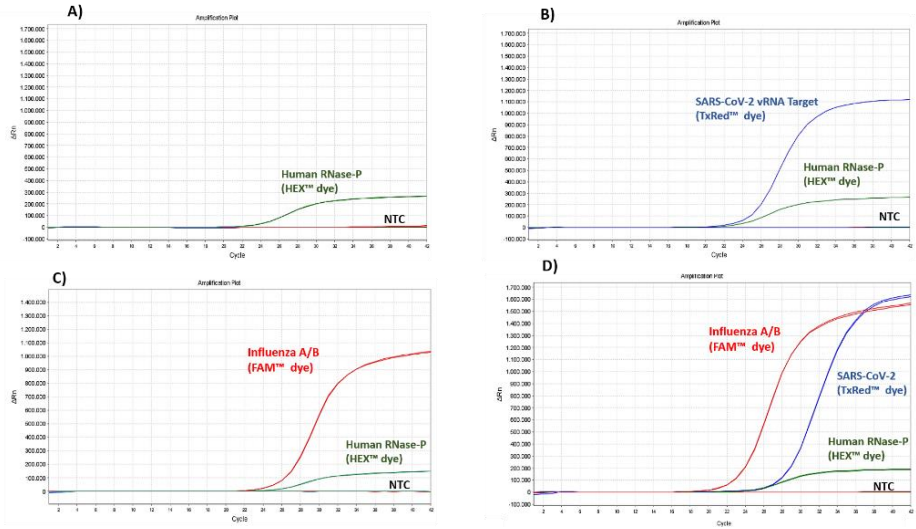

Figura 1. Rilevazione di target di SARS-CoV-2, Influenza A/B e RNasi-P umana da campioni clinici negativi (A) o da campioni clinici infetti da SARS-CoV-2 (B), Influenza A e/o Influenza B (C) o sia da SARS-CoV-2 che da Influenza A/B (D). Curva blu, rilevazione dei target di vRNA di SARS-CoV-2 attraverso il canale Texas Red® . Curva rossa, rilevazione dei target di Influenza A e/o Influenza B attraverso il canale FAM™ . Curva verde, rilevazione del gene della RNasi P umana attraverso il canale HEX™ .

La sensibilità analitica del Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B (IVD) di NZYTech nel contesto di uno scenario di co-infezione è stata valutata eseguendo una serie di esperimenti di diluizione seriale utilizzando campioni di co-infezione simulata per ciascuno dei due target virali. Per creare i campioni di co-infezione simulata, sono state aggiunte esattamente 10^4 copie di acidi nucleici di Influenza A e 10^4 copie di acidi nucleici di Influenza B alla curva standard di SARS-CoV-2. Invece, 10^4 copie di SARS-CoV-2 sono state aggiunte alle curve standard di Influenza A e Influenza B. Quattro replicati dei campioni di tre lotti di kit (per un totale di 12 replicati per diluizione) sono stati analizzati con il Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B (IVD) per determinare la sensibilità del saggio quando in un campione sono presenti più target virali. I dati hanno rivelato che il LoD di SARS-CoV-2 e dell'Influenza A erano inalterati in caso di co-infezione. Tuttavia, il LoD di Influenza B è cambiato a 1,75 copie/µL o 1750 copie/ml in caso di co-infezione.

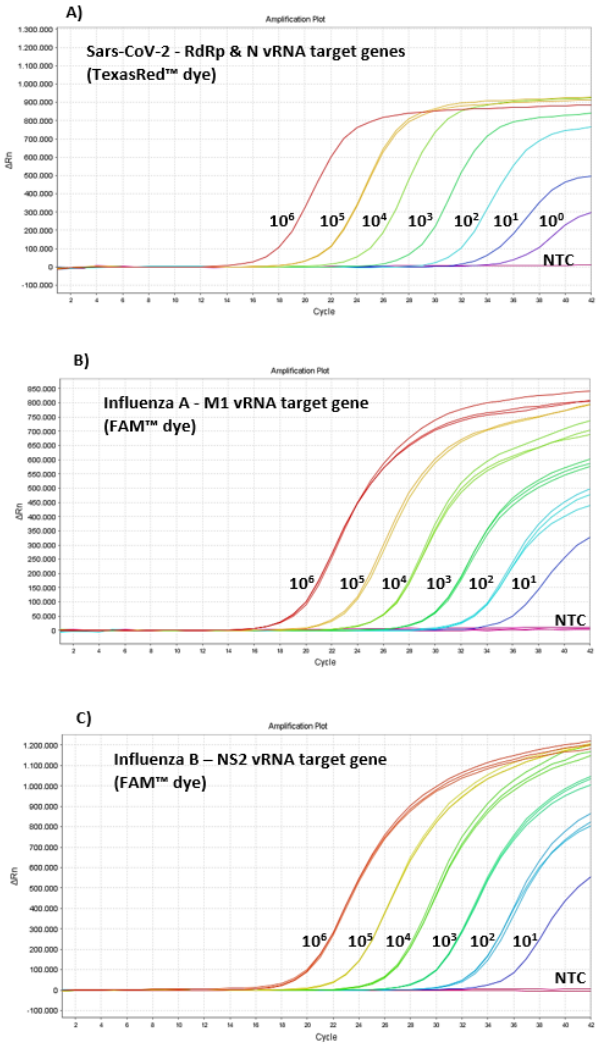

Figura 2. Sensibilità del Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B (IVD). Grafico di amplificazione (numero di ciclo *vs.* fluorescenza - ΔRN) delle diluizioni seriali 1:10 del vRNA di SARS-CoV-2 (A), Influenza A (B) e Influenza B (C). NTC, No Template Control (controllo negativo).

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 agenti patogeni correlati a SARS-CoV-2, Influenza A and Influenza B e patogeni normali che causano infezione con sintomi simili, rispettivamente. Dopo analisi *in silico*, il saggio si è dimostrato in grado di rilevare tutti i ceppi di virus SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B e non ha mostrato reattività con specie prive di relazione. Oltre

all'analisi *in silico*, la RT-qPCR Multiplex One-Step è stata eseguita su acidi nucleici di comuni microrganismi del tratto orale e respiratorio, tra i quali*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*. Nessuno degli agenti patogeni testati dal Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B (IVD) ha generato un segnale di amplificazione rilevabile.

11.4. Precisione

La precisione del saggio per il Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B (IVD) di NZYTech è stata determinata mediante test ripetuti di campioni positivi presentanti due livelli di carica virale, 200 (bassa carica virale) e 2000 (media carica virale) copie per reazione, aggiunti a RNA estratto da campioni orofaringei negativi, utilizzando 3 diversi lotti di kit 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 riepilogati nelle tre tabelle (una per ciascun target) mostrate di seguito.

11.4.1. Ripetibilità

La ripetibilità è stata valutata da un operatore analizzando 12 replicati di ciascun campione (200 e 2000 copie per reazione), per un numero finale di 24 test eseguiti per target.

11.4.2. Riproducibilità giornaliera

La riproducibilità giornaliera è stata valutata da un operatore analizzando 48 replicati di ciascun campione (200 e 2000 copie per reazione), per 4 giorni con 12 replicati di ciascuna concentrazione al giorno (sono stati eseguiti in totale 96 saggi per target).

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 (200 e 2000 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 24 replicati di ciascun campione (200 e 2000 copie per reazione), da quattro operatori diversi con 6 replicati per operatore e per carica virale, per un totale di 36 replicati per operatore, compresi i 3 target del kit.

Precisione del Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B (IVD) di NZYTech , rilevando al tempo stesso il target di SARS-CoV-2.

Variabile		SARS-CoV-2 (Copie/Reazione)	
		200	**2000**
Ripetibilità	n	12	12
	Cq media	28,87	26,35
	Coefficiente di variazione (%)	0,95	1,92
	% Rilevazione replicato	100	100
Riproducibilità giornaliera	n	12	12
	Cq media	28,87	26,35
	Coefficiente di variazione (%)	0,95	1,92
	% Rilevazione replicato	100	100
Riproducibilità da lotto a lotto	n	60	60
	Cq media	28,86	25,97
	Coefficiente di variazione (%)	1,97	2,71
	% Rilevazione replicato	100	100
Riproducibilità dell'operatore	n	24	24
	Cq media	28,87	25,68
	Coefficiente di variazione (%)	2,54	2,20
	% Rilevazione replicato	100	100
Riproducibilità tra strumenti	n	24	24
Riproducibilità	Cq media	29,83	26,89
	Coefficiente di variazione (%)	3,29	2,46
	% Rilevazione replicato	100	100

Precisione del Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B (IVD) di NZYTech rilevando contemporaneamente target di Influenza A.

Variabile		Influenza A (copie/reazione)	
		200	**2000**
Ripetibilità	n	12	12
	Cq media	30,47	26,46
	Coefficiente di variazione (%)	0,82	0,53
	% Rilevazione replicato	100	100
Riproducibilità giornaliera	n	48	48
	Cq media	30,75	26,51
	Coefficiente di variazione (%)	1,39	1,13
	% Rilevazione replicato	100	100
Riproducibilità da lotto a lotto	n	60	60
	Cq media	30,69	26,61
	Coefficiente di variazione (%)	1,35	1,13
	% Rilevazione replicato	100	100
Riproducibilità dell'operatore	n	24	24
	Cq media	30,79	26,61
	Coefficiente di variazione (%)	1,55	1,06
	% Rilevazione replicato	100	100
Riproducibilità tra strumenti	n	24	24
Riproducibilità	Cq media	30,00	26,07
	Coefficiente di variazione (%)	1,76	1,63
	% Rilevazione replicato	100	100

Precisione del Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B (IVD) di NZYTech, rilevando al tempo stesso il target di Influenza B.

Variabile		Influenza A (Copie/Reazione)	
		200	**2000**
Ripetibilità	n	12	12
	Cq media	30,72	26,82
	Coefficiente di variazione (%)	0,81	1,08
	% Rilevazione replicato	100	100
Riproducibilità giornaliera	n	48	48
	Cq media	30,78	26,82
	Coefficiente di variazione (%)	1,14	3,05
	% Rilevazione replicato	100	100
Riproducibilità da lotto a lotto	n	60	60
	Cq media	30,76	26,82
	Coefficiente di variazione (%)	1,08	2,77
	% Rilevazione replicato	100	100
Riproducibilità dell'operatore	n	24	24
	Cq media	30,87	26,71
	Coefficiente di variazione (%)	1,11	0,73
	% Rilevazione replicato	100	100
Riproducibilità tra strumenti Riproducibilità	n	24	24
	Cq media	30,15	26,34
	Coefficiente di variazione (%)	2,01	2,04
	% Rilevazione replicato	100	100

11.4.5. Riproducibilità tra strumenti

La riproducibilità tra strumenti è stata misurata da un operatore mediante test di 36 replicati di ciascun campione (200 e 2000 copie per reazione), in due strumenti qPCR diversi (Applied Biosystem® 7500, Applied Biosystem® QuantStudio 5), in un totale di 72 test per campione.

11.5. Valutazione clinica

Le prestazioni del del Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B (IVD) di NZYTech, con campioni clinici respiratori raccolti , sono state valutate da un laboratorio esterno. In totale sono stati analizzati 250 campioni clinici, vale a dire 72 campioni clinici positivi per il virus dell'Influenza A (36 per AH1 e 36 per AH3); 58 campioni clinici positivi per il virus dell'influenza B; 60 campioni clinici positivi per SARS-CoV-2 e 60 negativi clinici. I dati hanno rivelato che la concordanza dei campioni positivi e negativi è del 100%.

12. Controllo di Qualità

Tutti i componenti del Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B (IVD) di NZYTech, sono testati seguendo i protocolli descritti sopra. Il sistema di PCR pentaplex in tempo reale consente la rilevazione di bersagli descritti per l'identificazione di RNA virale di SARS-CoV-2 (geni RdRp e N), RNA virale di Influenza A/B (M1) e geni NS2, rispettivamente) così come l'RNasi P umana (gene RP). Amplificazioni positive sono osservate per geni target, controllo positivo e

controlli interni attraverso i canali Texas Red®, FAM™ ed HEX™/VIC®, secondo i rispettivi coloranti reporter del set primers/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		Sufficiente per
CONTROL +	Controllo positivo		Tenere lontano dalla luce solare (miscela primer/sonda)
CONTROL -	Controllo negativo		

16. Dichiarazione di conformità

Nome prodotto: Kit Multiplex One-Step per RT-qPCR di COVID-19 e Influenza A/B, IVD.

Numero di catalogo MD04851.

Uso previsto: Rilevazione qualitativa di SARS-CoV-2 e Influenza A/B.

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 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