Kit III RT-qPCR One-Step per SARS-COV-2, 5 Target, IVD

REF MD04911, 96 reazioni
MD04912, 4 × 96 reazioni

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

IVD

IT

Istruzioni per l'uso

IM-007it

VERSIONE 03/2022, settembre 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

Contenuti

1. Introduzione 3

2. Uso previsto 3

3. Principi del Saggio 3

4. Composizione del kit..... 4

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 di sicurezza..... 6

8.2 Requisiti di manipolazione e procedurali 6

9. Procedura di test 7

9.1 Impostazione di 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 dei test 9

11. Valutazione di performance..... 12

11.1 Risultati attesi 12

11.2 Limite di rilevazione (LoD) - Sensibilità analitica 12

11.3 Inclusività, reattività crociata e sostanze interferenti..... 13

11.4 Precisione 14

11.5 Valutazione clinica 16

12. Controllo di qualità 16

13. Supporto tecnico 16

14. Marchi di fabbrica e Disclaimer 16

15. Spiegazione dei simboli 17

16. Dichiarazione di conformità 18

17. Bibliografia 19

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 lo strettamente affine coronavirus della SARS 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 di malattia, compresi gli anziani (60 anni e più), i fumatori e le persone con malattie croniche come malattie cardiache o polmonari, cancro, diabete, e i pazienti con sistema immunitario indebolito. Sebbene attualmente siano disponibili vaccini per il controllo della COVID-19, essi non prevengono l'infezione nelle popolazioni vaccinate.

2. Uso previsto

Il Kit RT-qPCRIII One-Step per SARS-COV-2 , 5 target, IVD di NZYTech è un test molecolare in tempo reale di reazione a catena della trascrizione inversa della polimerasi destinato alla rapida rilevazione qualitativa di acidi nucleici di SARS-CoV-2 in tamponi nasofaringei o orofaringei prelevati da individui sospetti di COVID-19. Questo kit è stato progettato per consentire una rilevazione affidabile ed efficiente del virus SARS-COV-2 che compensa la comparsa di varianti con significative differenze genetiche rispetto a quelle attualmente in circolazione. Il Kit RT-qPCRIII One-Step per SARS-COV-2 , 5 target, IVD di NZYTech offre la capacità di rilevare contemporaneamente 5 target virali, facendo in modo che, anche nel caso in cui uno o più target diventino impraticabili a causa di alterazioni genetiche accumulate nel virus, la diagnosi rimanga efficace. 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 PCR in tempo reale e nella diagnostica *in vitro*.

3. Principi del Saggio

Il Kit III per RT-qPCR One-Step per SARS-COV-2, 5 target, 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**). Questo kit NZYTech ha come target specifiche del genoma SARS-COV-2, in particolare il gene della RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp), il gene della fosfoproteina del nucleocapside (N) e una

regione specifica del gene della proteina di involucro strutturale (E), che è presente in tutti i genomi di *Sarbecovirus* (incluso il virus SARS-COV-2). Tutte le sequenze target sono state selezionate per avere la massima sensibilità di rivelazione. I primer e le sonde del kit per SARS-CoV-2 hanno omologia del 100% con >95% di >5M sequenze genomiche disponibili nel database GISAID al maggio 2022, incluse l'identità completa delle varianti Delta (B.1.617.2) e Omicron (B.1.1.529). Inoltre, i primer e le sonde mirati a 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, tra le altre cose. Inoltre, il test utilizza tre controlli esterni (due controlli positivi a basso titolo forniti con il kit e controllo negativo), come descritto di seguito. Il controllo positivo 1 di SARS-COV-2 (RdRp, N & E)/RP consiste in frammenti di acido nucleico contenenti tre sequenze target del genoma di SARS-COV-2 localizzate in regioni specifiche dei geni RdRp, N ed E, e una sequenza target localizzata nel gene della RNasi P (RP) umana. Il controllo positivo 2 di SARS-COV-2 (RdRp, N & e)/RP consiste in frammenti di acido nucleico localizzati negli stessi geni indicati per il controllo positivo 1 di SARS-COV-2 (RdRp, N & e)/RP, ma contenenti sequenze target distinte all'interno di quei geni, e una sequenza target localizzata nel gene della RNasi P (RP) umana. La naturale evoluzione di SARS-CoV-2 implica che nuove informazioni sulle sequenze saranno disponibili dopo la progettazione iniziale di questo kit, che riflette le strategie di adattamento di SARS-CoV-2. Pertanto, NZYTech rivisita periodicamente i cinque 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 un rivelazione accurata dell'RNA di SARS-CoV-2, che è indicativo di un'infezione umana. L'RNA virale isolato e purificato da campioni infetti viene retrotrascritto a cDNA e successivamente amplificato in una singola reazione utilizzando cinque set di primer/sonda altamente specifici che sfruttano il cosiddetto principio TaqMan®. Per consentire di identificare l'amplificazione dei sei target specifici in una singola reazione, le sonde specifiche per RdRp di SARS-CoV-2, i geni N ed E e per RP umana hanno tag diversi, rispettivamente con coloranti reporter HEX™, FAM™ e Cy5™ Questo kit consiste in un saggio hexaplex in quattro canali ottici distinti: due target localizzati nel gene RdRp sono rilevati in HEX (alternativamente VIC o JOE), due target localizzati nel gene N sono rilevati in FAM, un target localizzato nel gene E (presente in tutti i *Sarbecovirus*) è rilevato in Texas Red (in alternativa JUN), e il target endogeno umano viene rivelato in Cy5. Si noti che questo gruppo include quattro sequenze target di SARS-COV-2 che emettono fluorescenza rilevata in due canali consentendo di aumentare l'affidabilità e la sensibilità della rivelazione di 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 Kit III RT-qPCR One-Step per SARS-CoV-2 , 5 Target, IVD di NZYTech fornisce un set completo di reagenti e controlli sufficienti per la rivelazione qualitativa di SARS-CoV-2 in un unico passaggio.

Componente del kit		Volume (per fiala)	Numero di fiale	
			MD04911	MD04912
MMix III SARS-COV-2 (RdRp e N ed E)	Master Mix di Sonda RT-qPCR One-step Multiplex NZYSupreme (2×)	1050 µl	1	4
MMix III SARS-COV-2 (RdRp, N ed E)	SARS-COV-2 (RdRp, N ed E)/RP PPMix III (10×)	205 µl	1	4
POS 1 SARS-CoV-2 (RdRp, N ed E)	Controllo Positivo 1 di SARS-COV-2 (RdRp, N ed E)/RP	105 µl	1	4
POS 2 SARS-CoV-2 (RdRp, N ed E)	Controllo Positivo 2 di SARS-COV-2 (RdRp, N ed E)/RP	105 µl	1	4
NTC	Controllo "No-Template"	105 µl	1	4

5. Condizioni di conservazione, stabilità e manipolazione

Il Kit III per RT-qPCR One-Step di SARS-CoV-2, 5 Target, IVD, 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. Procedere anche con le seguenti indicazioni:

- Ridurre al minimo il numero di cicli di congelamento-scongelamento conservando in aliquote di lavoro. Se appropriato, i componenti del kit possono essere aliquotati in volumi più piccoli dopo lo scongelamento.
- Il SARS-CoV-2 PPMix III (RdRp, N ed E) deve essere conservato al riparo dalla luce. In particolare, non esporre il SARS-COV-2 MMix III (RdRp, N ed E) alla luce solare diretta dopo combinazione con SARS-COV-2 PPMix III (RdRp, N ed E).
- 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 PCR in tempo reale che rileva coloranti fluorescenti FAM™, HEX™/VIC™/JOE™, Texas Red®/JUN™ e Cy5™ (a lunghezze d'onda di emissione di 520/556/603 e 670 nm, rispettivamente). Si vedano nella **Sezione 11** i modelli di strumento per i quali il kit è stato convalidato.
- Apparecchiature e articoli monouso per l'isolamento di RNA virale da campioni respiratori.
- Contenitori in plastica per qPCR certificati DNAse/RNAse free: provette per PCR, strip, tappi, piastre a 96 pozzetti, pellicole adesive.
- Pipettatori e puntali filtranti (certificati DNAse/RNAse free).
- Guanti monouso.
- Vortice 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 sono il materiale di partenza per il Kit III RT-qPCR One-Step per SARS-CoV-2, 5 Target, 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 potente inibitore di PCR in tempo reale, 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 rivelazione 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 utilizzare reagenti provenienti da lotti di produzione diversi.
- Non utilizzare reagenti di altri produttori insieme ai reagenti di questo kit di test.
- In tutte le procedure devono essere utilizzati contenitori in plastica e pipette monouso certificati DNAse/RNAse free.
- Utilizzare punte filtranti certificati DNAse/RNAse free per 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 template in un elevato numero di copie; devono essere aperti e manipolati lontano dai campioni di test e da componenti del kit per evitare contaminazione crociata.

- 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 manipolati come se fossero infettivi, 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 professionista 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 sperimentale vengano eseguite su ghiaccio. Dopo avere versato la piastra, iniziare immediatamente 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 miscelare 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 SARS-COV-2 POS 1 (RdRp, N ed E) e SARS-COV-2 POS 2 (RdRp, N ed E) alla fine per evitare contaminazioni crociate.**

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)**
SARS-COV-2 MMix III (RdRp, N ed E)(**)	10	*n* × 10,5
SARS-COV-2 MMix III (RdRp, N ed E)	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, in particolare dopo cicli multipli di congelamento/scongelamento. Dopo aver scongelato la miscela master,

rimettere in sospensione prima dell'uso. In questo caso, non far girare la miscela master prima del pipettaggio.

2. Pipettare 12 µL della miscela RT-qPCR in pozzetti singoli in base alla configurazione della piastra sperimentale per PCR in tempo reale.

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 campione, 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 SARS-CoV-2 POS 1 (RdRp, N ed E) e 8 µL di SARS-CoV-2 POS 2 (RdRp, N ed E) 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-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 per eseguire test SARS-CoV-2/RP utilizzando Kit III per RT-qPCR One-Step di SARS-CoV-2 , 5 Target, IVD, sulle piattaforme indicate di seguito.

Cicli	Temperatura	Ora	Passaggio
1	50 °C	10 min	Trascrizione inversa
1	95 °C	2 min	Attivazione della polimerasi
40	95 °C	5 s	Denaturazione
	60 °C	60 s	Annealing/Estensione*

**A seconda dell'apparecchiatura utilizzata, selezionare il canale di rilevazione appropriato. Raccogliere i segnali attraverso i canali FAM, HEX/JOE/VIC, Texas Red/JUN e Cy5.*

Coloranti fluorescenti e Canali di rilevazione

Target	Colorante fluorescente	Canali di rilevazione
SARS-CoV-2, gene RdRp	HEX™	HEX/VIC/JOE
SARS-CoV-2, gene N	FAM™	FAM
SARS-CoV-2, gene E	Texas Red®	Texas Red/JUN
Gene RNasi P	Cy5™	Cy5

Il Kit III RT-qPCR One-Step per SARS-CoV-2 , 5 Target, IVD di NZYTech è stato validato per i seguenti sistemi di PCR in tempo reale: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystem®

QuantStudio 5, Roche LightCycler® 480 II 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 SARS-CoV-2 viene eseguita individuando cinque regioni del genoma virale, che vengono rilevate in canali di fluorescenza differenti (FAM, HEX e Texas Red), e il controllo di RP umano in un quarto canale (Cy5). L'analisi dei dati viene eseguita dal software dello strumento. Considerando le differenze di performance in diversi strumenti per PCR in tempo reale, le soglie per i quattro segnali di fluorescenza (FAM, HEX, Texas Red e Cy5) vengono determinate automaticamente dal software con aggiustamenti 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: Le curve di amplificazione di HEX (due target per il gene RdRp di SARS-CoV-2), FAM (due target per il gene N di SARS-CoV-2), Texas Red (un target per il gene E di SARS-COV-2) e Cy5 (per il gene RP) sono positive. I controlli positivi dovrebbero amplificarsi a Ct < 32, nei quattro canali. 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 presenta curve di amplificazione (HEX, FAM, Texas Red e Cy5) di forma sigmoidale, è possibile che si sia verificata una contaminazione del campione. Ripetere il test seguendo buone pratiche RT-qPCR.

Se i controlli corrispondono a quanto previsto, il test è **valido**. Procedere con l'interpretazione dei risultati per i campioni testati.

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

Il Kit III per RT-qPCR One-Step per SARS-CoV-2, 5 Target, IVD, di NZYTech utilizza i seguenti valori di cutoff Ct per l'interpretazione dei risultati:

Valore Ct	Interpretazione dei risultati
CT ≤36, Amplificazione	**Rilevato (+) → POSITIVO**
CT>36, Nessuna amplificazione	**Non Rilevato (-) → NEGATIVO**

SARS-CoV-2 è rilevato se le curve di amplificazione HEX**,** FAM e Texas Red presentano una forma sigmoidale con Ct≤36, indipendentemente dal risultato ottenuto per il saggio RP (Cy5).

SARS-CoV-2 è rilevato se le curve di amplificazione HEX e FAM presentano una forma sigmoidale con Ct≤36, indipendentemente dal risultato ottenuto per i saggi E (Texas Red) e RP (Cy5).

SARS-CoV-2 è rilevato se le curve di amplificazione HEX e Texas Red mostrano una forma sigmoidale con Ct≤ 36, indipendentemente dal risultato ottenuto per i saggi N (FAM) e RP (Cy5).

SARS-CoV-2 è rilevato se le curve di amplificazione FAM e Texas Red presentano una forma sigmoidale con Ct≤36, indipendentemente dal risultato ottenuto per i saggi RdRp (HEX) e RP (Cy5).

SARS-CoV-2 non è rilevato se le curve FAM, HEX e Texas Red non sono positive (Ct>36), mentre il saggio RNasi P (Cy5) mostra una curva sigmoidale positiva (Ct≤40).

Il test non è conclusivo per SARS-CoV-2 se solo una curva di amplificazione (FAM, HEX o Texas Red) mostra una forma sigmoidale con un Ct≤36 mentre gli altri target SARS-CoV-2 sono negativi, 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**).

SARS-CoV-2 Gene RdRp, (HEX)	**SARS-CoV-2** Gene N, (FAM)	**SARS-CoV-2** Gene E, (Texas Red)	**RP** Gene RP, (Cy5)	**Interpretazione dei risultati**
+	+	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 rilevato → POSITIVO**
+	+	-	+ / - *	**SARS-CoV-2 rilevato → POSITIVO**
+	-	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 rilevato → POSITIVO**
-	+	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 rilevato → POSITIVO**
+	-	-	+ / - *	**SARS-CoV-2 rilevato solo per un target → NON CONCLUSIVO**
-	+	-	+ / - *	**SARS-CoV-2 rilevato solo per un target → NON CONCLUSIVO**
-	-	+	+ / - *	**SARS-CoV-2 rilevato solo per un target → NON CONCLUSIVO**
-	-	-	+	**SARS-CoV-2 non rilevato → NEGATIVO**
-	-	-	-	**Test non valido, ripetere estrazione e ripetere test**

**Un'elevata concentrazione/carico di RNA virale rilevabile nel campione può portare a segni di controllo ridotti o assenti (RP, Cy5).*

Nota: NZYTech consiglia di ripetere l'analisi per tutti i campioni che mostrano una curva ambigua o atipica tale da non consentire una chiara interpretazione. L'interpretazione dei risultati deve tener conto della possibilità di risultati falsi negativi e falsi positivi.

Per quanto il rischio di risultati falsi negativi sia mitigato dalla concezione 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 1 di SARS-CoV-2 (RdRp, N ed E) e di POS 2 di SARS-CoV-2 (RdRp, N ed E).
- 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 Kit III per RT-qPCR One-Step per SARS-CoV-2 , 5 Target, IVD di NZYTech è stata effettuata su Applied Biosystem® 7500 FAST, Applied Biosystem® QuantStudio 5, Roche LightCycler® 480 II 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 Cy5, corrispondente al gene della RNasi P umana, può essere assente o può presentare una forma atipica (Figura 1A).

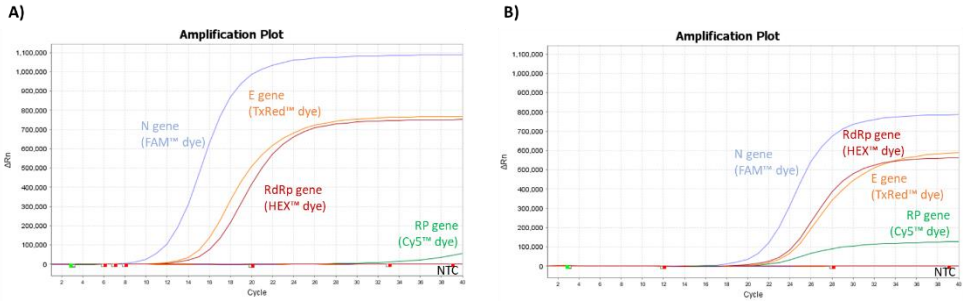

Figura 1. Rilevazione simultanea di target di SARS-CoV-2 (geni RdRp, N ed E) e di RNasi-P umana da campioni clinici positivi con cariche di SARS-CoV-2 elevate (A) e medie (B). Curva rossa: rilevazione di due target di vRNA SARS-CoV-2 (gene RdRp) attraverso il canale HEX; Curva blu: rilevazione di due target di vRNA SARS-CoV-2 (gene N) attraverso il canale FAM; Curva arancione: rilevazione di un target di vRNA di SARS-CoV-2 (gene E) attraverso il canale Texas Red; 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 in modo con affidabilità del 95%. Questa è stata determinata testando acidi nucleici di SARS-CoV-2 a numeri di copie differenti, singolarmente o aggiunti in 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. I dati hanno rivelato che il Kit III RT-qPCR One-Step per SARS-COV-2 , 5 Target, IVD di NZYTech rileva 0,25 copie/µL o 250 copie/mL di RNA virale di SARS-CoV-2 con affidabilità ≥95%. 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.

11.3 Inclusività, reattività crociata e sostanze interferenti

Inclusività e reattività crociata sono state valutate mediante analisi *in silico* di sonde oligonucleotidiche e primer diretti ad agenti patogeni correlati a SARS-CoV-2 e patogeni normali che causano infezione con sintomi simili, rispettivamente. Su analisi *in silico*, il saggio si è mostrato in grado di rilevare tutti i ceppi di virus SARS-CoV-2 e non ha mostrato reattività con specie non-SARS-CoV-2. Inoltre, è stata eseguita l'analisi *in vitro* per la reattività crociata (esclusività) per confermare che il Kit III per RT-qPCR One-Step per SARS-CoV-2, 5 Target, IVD di NZYTech non reagisce con altri microrganismi colonizzanti umani e patogeni comunemente riscontrati in campioni clinici. Questo studio è stato eseguito utilizzando un gruppo commerciale di patogeni respiratori proveniente da ZeptoMetrix, segnatamente il NATtrol ™ Respiratory Verification Panel (# NATRVP-IDI). Questo gruppo comprende un insieme di campioni rappresentativi di campioni clinici umani reali, tra cui Influenza A H1N1 (A/New Cal/20/99), Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A 2009 H1N1pdm, Influenza B (B/Florida/02/06), Metapneumovirus 8 (Perù 6-2003), Virus Respiratorio Sinciziale A, Rhinovirus Tipo 1A, Virus della Parainfluenza Tipo 1, Virus della Parainfluenza Tipo 2, Virus della Parainfluenza Tipo 3, Virus della Parainfluenza Tipo 4, Adenovirus Tipo 3, Coronavirus NL63, Coronavirus 229E, Coronavirus OC43, Coronavirus HKU-1, *M. pneumoniae* M-129, *C. pneumoniae* CWL-029 e *B. pertussis* A639. 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 Kit III RT-qPCR One-Step per SARS-COV-2, 5 Target, IVD, generando risultati falsi-positivi o segnale aspecifico.

L'impatto di 17 potenziali sostanze interferenti è stato valutato mediante test 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 sulla base dei 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 di Applied Biosystems®.

Potenziale Interferente	Principio attivo	Concentrazione finale nel campione	Interferenza Sì (S) or No (N)
Acqua di mare isotonica (rinomero)	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 propionato	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
Analgesico 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 intero (umano)	-	4% v/v	N
Farmaco antivirale (Tamiflu)	oseltamivir	7,5 mg/mL	N
Mucolitico (Mucolsovan)	Ambroxolo cloridrato	5% v/v	N
Soluzione di gocce nasali (Nasarox)	Ossimetazolina cloridrato	10% v/v	N
Antibiotico, unguento 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 Kit III RT-qPCR One-Step per SARS-CoV-2 , 5 Target, IVD di NZYTech è stata determinata mediante test ripetuti di acidi nucleici di SARS-CoV-2 rappresentanti due livelli di carica virale, 15 (3 × LoD) e 150 (30× LoD) copie per reazione (0,75 e 7,50 copie/µL), aggiunti in RNA estratto da campioni orofaringei negativi, utilizzando 3 lotti di kit diversi e seguendo tipiche condizioni 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 seguente.

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 36 replicati di ciascun campione (15 e 150 copie per reazione), per 3 giorni con 12 replicati di ciascuna concentrazione al giorno (sono stati eseguiti in totale 72 saggi).

11.4.3. Riproducibilità da lotto a lotto

La riproducibilità tra lotti è stata valutata da un operatore attraverso l'analisi di 36 replicati di ciascun campione (15 e 150 copie per reazione) utilizzando 3 lotti di kit diversi con 24 replicati per lotto.

Precisione del Kit III RT-qPCR One-Step per SARS-COV-2, 5 Target, IVD

Variabile testata		Gene RdRp (Copie/reazione)		Gene N (Copie/reazione)		Gene E (Copie/reazione)	
		15	150	15	150	15	150
Ripetibilità							
	n	12	12	12	12	12	12
	Cq media	32,40	29,07	31,67	28,46	32,89	29,28
	Coefficiente di variazione (%)	1,53	1,23	1,94	1,48	2,79	2,24
	% Rilevazione replicato	100	100	100	100	100	100
Riproducibilità giornaliera							
	n	36	36	36	36	36	36
	Cq media	32,57	29,56	31,87	28,58	31,95	30,24
	Coefficiente di variazione (%)	2,31	2,58	2,51	2,76	3,48	3,22
	% Rilevazione replicato	100	100	100	100	100	100
Riproducibilità da lotto a lotto							
	n	36	36	36	36	36	36
	Cq media	32,55	29,39	31,77	28,42	32,13	30,03
	Coefficiente di variazione (%)	2,25	2,49	2,68	2,30	3,87	3,24
	% Rilevazione replicato	100	100	100	100	98	100
Riproducibilità Operatore							
	n	36	36	36	36	36	36
	Cq media	32,44	29,33	31,88	28,68	32,03	29,66
	Coefficiente di variazione (%)	1,56	2,14	1,63	2,24	3,46	3,07
	% Rilevazione replicato	100	100	100	100	100	100
Riproducibilità tra strumenti							
	n	48	48	48	48	48	48
	Cq media	33,10	29,96	32,08	29,00	32,90	30,55
	Coefficiente di variazione (%)	1,98	1,24	2,68	2,83	4,12	3,87
	% Rilevazione replicato	100	100	100	100	96	100

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 48 replicati di ciascun campione (15 e 150 copie per reazione), in quattro strumenti qPCR diversi (Applied

Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche LightCycler® 96 e Bio-Rad® CFX96™), in un totale di 96 test per campione.

11.5 Valutazione clinica

Le prestazioni del Kit III RT-qPCR One-Step per SARS-CoV-2, 5 Target, IVD di NZYTech con campioni prelevati di tampone nasofaringeo, sono state valutate da un laboratorio esterno. In totale, sono stati analizzati 501 campioni clinici negativi e 150 campioni clinici positivi. I dati hanno rivelato che è stato raggiunto un accordo del 97.4% per tutti i campioni positivi e negativi testati.

12. Controllo di Qualità

Tutti i componenti del Kit III RT-qPCR One-Step per SARS-CoV-2, 5 Target, IVD di NZYTech sono testati seguendo i protocolli descritti sopra. Il sistema PCR in tempo reale hexaplex consente la rilevazione di target descritti per l'identificazione di RNA virale di SARS-CoV-2 (geni RdRp, N ed E) e mRNA umano (gene RNasi P, RP). Amplificazioni positive sono osservate per geni bersaglio, controlli positivi e controlli interni attraverso canali FAM, HEX, Texas Red 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		Sufficiente per
CONTROL +	Controllo positivo		Tenere lontano dalla luce solare (mix primer/sonda)
CONTROL -	Controllo negativo		

16. Dichiarazione di conformità

Nome prodotto: Kit III RT-qPCR One-Step per SARS-COV-2, 5 Target, IVD

Numero di catalogo MD04911 e MD04912.

Uso previsto: Rilevazione qualitativa di SARS-CoV-2

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

Nathan J, Hardenbrook1 e Peijun Zhang (2022). A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. Current Opinion in Virology. 52:123–134.

Swets MC, Russell CD, Harrison EM, Dochrety AB, Lone N, Girvan M, Hardwick HE; ISARIC4C Investigators, Visser LG, Openshaw PJM, Groeneveld GH, Semple MG, Baillie JK (2022). SARS-CoV-2 co-infection with influenza viruses, respiratory syncytial virus, or adenoviruses. Lancet 399(10334):1463-1464. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00383-X.

Gomez GB, Mahé C, Chaves SS (2021). Uncertain effects of the pandemic on respiratory viruses. Science 372:1043-1044.

Irwin Junggreis, Rachel Sealfon e Manolis Kellis (2021). SARS-CoV-2 gene content and COVID-19 mutation impact by comparing 44 *Sarbecovirus* genomes. Nature Communications. 12:2642.

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

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.

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.

WHO: Clinical management of severe acute respiratory infection (SARI) when COVID-19 disease is suspected. 13 march 2020. Disponibile ol-line all'indirizzo https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/clinical-management-of-novel-cov.pdf.

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