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

REF MD04901, 96 reazioni
MD04902, 4 × 96 reazioni
MD04903, 2 x strisce da 8 pozzetti, alto profilo

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

IVD

IT

Istruzioni per l'uso

MD0490_IM_it

VERSIONE 2302, Ottobre 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 4
4. Composizione del kit 5
5. Condizioni di conservazione, stabilità e manipolazione 5
6. Materiali e strumentazione necessari ma non forniti 6
7. Raccolta e preparazione dei campioni 7
8. Precauzioni e Avvertenze 7
   8.1. Informazioni sulla sicurezza 7
   8.2. Requisiti di manipolazione e procedurali 7
9. Procedura di test 8
   9.1. Impostazione della reazione 8
   9.2. Programmazione dello strumento per PCR in tempo reale 10
10. Analisi dei dati 10
   10.1. Criteri di convalida esecuzione 10
   10.2. Interpretazione dei risultati di test 11
11. Valutazione di performance 13
   11.1. Risultati previsti 13
   11.2. Limite di rilevazione (LoD) - Sensibilità analitica 13
   11.3. Reattività analitica (Inclusività) e Specificità analitica 14
   11.4. Precisione 15
   11.4.1. Ripetibilità 16
   11.4.2. Riproducibilità giornaliera 16
   11.4.3. Riproducibilità da lotto a lotto 16
   11.4.4. Riproducibilità dell'operatore 16
   11.4.5. Riproducibilità tra strumenti 16
   11.5. Valutazione clinica 19
12. Controllo di Qualità 19
13. Supporto Tecnico 19
14. Marchi di fabbrica e Disclaimer 19
15. Spiegazione dei simboli 20
16. Dichiarazione di conformità 21
17. Bibliografia 22

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 su scala globale senza precedenti, portando 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, *dall'acronimo in inglese*), 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 pesa sul sistema sanitario. Tuttavia, il suo tasso di mortalità è molto inferiore a quello di COVID-19. Le tipologie A e B di influenza (Flu) sono quelle dominanti di virus influenzali circolanti, e la maggior parte delle epidemie influenzali sono correlate al tipo A. La trasmissione zoonotica dell'influenza aviaria o suina direttamente agli esseri umani, così come la trasmissione del virus riassortante, ha causato diverse pandemie umane a intermittenza negli ultimi decenni. Le infezioni da virus dell'influenza B (Flu B) sono generalmente limitate all'uomo e causano meno frequentemente epidemie. Il virus respiratorio sinciziale umano (RSV, dall'acronimo in inglese) è il più importante patogeno respiratorio virale pediatrico in tutto il mondo. Il RSV è un membro del genere pneumovirus della famiglia dei paramixovirus. Questo agente altamente infettivo ubiquitario emerge ogni anno durante le epidemie stagionali e quasi il totale della popolazione è stata infettata almeno una volta nei primi 2 anni di vita. La malattia da RSV è responsabile di una notevole morbilità e mortalità e manca un vaccino approvato o una terapia antivirale altamente efficace. Sono necessari diagnosi e isolamento rapidi per evitare la trasmissione nosocomiale e per iniziare un trattamento appropriato.

Le infezioni respiratorie possono "agire sinergicamente", il che significa che le potenziali interazioni tra SARS-CoV-2 e altri virus respiratori potrebbero aumentare la gravità della malattia. Tutti questi virus sono altamente contagiosi e si trasmettono tramite contatto, goccioline respiratorie (tosse e starnuti) e superfici contaminate. COVID-19 potrebbe essere confuso clinicamente con polmonite causata da RSV o virus influenzali e la co-infezione ha una prognosi sfavorevole. Inoltre, la circolazione più ampia di altri virus respiratori applicherà pressione selettiva su SARS-CoV-2 e potrebbe portare alla comparsa di nuove preoccupanti varianti. Quindi, è necessaria un'azione cruciale per fermare un "triplice mix letale" di COVID-19, Influenza e RSV. Le infezioni da COVID-19, influenza e RSV sono spesso difficili da differenziare in base ai soli sintomi e ciascuno dei virus è altamente contagioso. Entrando nella stagione influenzale sarà molto utile disporre di un test per riconoscere malattie respiratorie comuni concomitanti con COVID-19.
La rilevazione precoce di SARS-CoV-2, RSV e dei virus dell'Influenza A e B è di vitale importanza per trattare tempestivamente i pazienti infetti e, in tal modo, 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 COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, 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. Questo kit non fa però distinzione tra Influenza di tipo A e di tipo B, in quanto vengono entrambe rilevate nello stesso canale di

fluorescenza per FAM™. Inoltre, altri betacoronavirus 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, Influenza A e B e RSV in combinazione con fattori di rischio clinici ed epidemiologici. Un risultato positivo indica la presenza di RNA virale di SARS-COV-2 e/o Influenza A/B e/o RSV, tuttavia 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 COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech fornisce il set completo di reagenti e sonde per la rilevazione qualitativa dei genomi di SARS-CoV-2 e/o Influenza e/o RSV attraverso le comuni piattaforme PCR in tempo reale (si vedano le specifiche richieste in **Sezione 6**). SARS-CoV-2 è identificato rilevando target RT-qPCR situati nei geni RdRp e N, mentre RSV (sottotipi A e B) è identificato rilevando target situati nel gene L. 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 COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech è realizzato per avere un profilo di rilevazione più ampio possibile, pur rimanendo specifico per i genomi di SARS-CoV-2 e dell'Influenza di tipo A e B. Esso fornisce il set completo di reagenti e sonde per rilevare i quattro genomi virali, incluso un efficace controllo interno per confermare inoltre l'estrazione efficiente dell'RNA del campione e l'assenza di inibitori della PCR. Questo kit ha come target regioni altamente conservate dei genomi di SARS-CoV-2, RSV (sottotipi A e B) e Influenza A e B, mediante un set di primer/sonde altamente ottimizzato. Inoltre, i primer e le sonde non hanno significativa omologia con genomi non correlati, rendendo questo test altamente specifico, in modo da non osservare alcuna reattività crociata con organismi che si possono trovare nel tratto respiratorio. L'evoluzione naturale dei virus rilevati da questo kit implica che nuove informazioni sulla sequenza diventeranno in seguito disponibili, come osservato dalle 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 in tempo reale One-step è il metodo più veloce e affidabile per eseguire l'individuazione accurata degli RNA virali di SARS-CoV-2, Influenza A e B, e RSV. Il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech è un saggio multiplex che rileva SARS-CoV-2, Influenza A, Influenza B, RSV 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 sei set di primer/sonde altamente specifici: quelli che rilevano l'RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) di SARS-CoV-2 e i geni della fosfoproteina del nucleocapside (N), geni specifici di matrice dell'Influenza A e B e Nonstrutturali 2 (NS2) e il gene L di RSV 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 sei target

specifici in una singola reazione, le sonde specifiche di SARS-CoV-2, Influenza A e B, RSV e RNasi P umana hanno tag diversi, rispettivamente i coloranti reporter Texas Red™, FAM™, HEX™ e Cy5™. Si noti che questo panel 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 ottenere una performance additiva per la rilevazione di SARS-CoV-2, ma preclude la distinzione tra infezioni di Influenza A e B. Inoltre, questo test non intende differenziare i sottotipi del virus di Influenza A, né le linee evolutive del virus dell'Influenza B o i sottogruppi di RSV. Se occorre differenziare ceppi specifici del virus dell'influenza e dei sottotipi di RSV, saranno necessari ulteriori test. Inoltre, i cinque set di primer/sonde sono forniti in concentrazioni ottimizzate garantendo che l'amplificazione di acidi nucleici meno abbondanti non sia compromessa nel caso siano presenti altri target virali a concentrazioni più elevate.

4. Composizione del kit

Il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech fornisce un set completo di reagenti sufficienti per eseguire reazioni RT-qPCR in un unico passaggio. Il kit è disponibile in formato di tubo: referenza MD04901 per le 96 reazioni e referenza MD04902 per 4x 96 reazioni.

COMPONENTE DEL KIT		**VOLUME** (PER FIALA)	**NUMERO DI PROVETTE**		**COLORE DEL TAPPO**
			MD04901	**MD04902**	
COVID-19, Flu A/B, RSV MMix	Master Mix di Sonda RT-qPCR One-step Multiplex NZYSupreme (2×)	1050 µL	1	4	Neutro
COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix	Mix Primer e Sonda (Primer & Probe) di COVID-19, Flu A/B, RSV (10×)	205 µL	1	4	Marrone
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1	Controllo Positivo 1 COVID-19, Influenza A/B, RSV	105 µL	1	4	Rosso
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2	Controllo Positivo 2 COVID-19, Influenza A/B, RSV	105 µL	1	4	Rosso
NTC	Controllo No-template (acqua priva di RNasi/DNasi)	105 µL	1	4	Neutro

Come alternativa, il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech è disponibile in formato di strisce da 8 pozzetti, con soluzione pronta per l'uso che include una miscela NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Master Mix e una miscela di primer-sonda, per realizzare 16 reazioni RT-qPCR (2 strisce da 8 pozzetti, alto profilo), semplificando e ottimizzando il test.

COMPONENTE DEL KIT		VOLUME (PER FIALA)	NUMERO DI TUBI/STRISCE	COLORE DEL TAPPO
			MD04903	
COVID-19, Flu A/B, RSV Mix	Soluzione pronta per l'uso di una miscela NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Master Mix e miscela di primer-sonda	Striscia da 8 pozzetti x 12 µL per pozzetto	2	Neutro
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1	Controllo Positivo 1 COVID-19, Influenza A/B, RSV	20 µL	1	Rosso
COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2	Controllo Positivo 2 COVID-19, Influenza A/B, RSV	20 µL	1	Rosso
NTC	Controllo No-template (acqua priva di RNasi/DNasi)	20 µL	2	Neutro

5. Condizioni di conservazione, stabilità e manipolazione

Il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech viene spedito refrigerato. Tutti i componenti devono essere conservati immediatamente a una temperatura compresa tra -85 °C e -15 °C all'arrivo. I componenti del kit devono inoltre essere riposti in freezer immediatamente dopo l'uso per ridurre al minimo il tempo trascorso a temperatura ambiente.

- Ridurre al minimo il numero di cicli di congelamento-scongelamento preparando aliquote di lavoro. Se necessario, i componenti del kit possono essere aliquotati in volumi più piccoli dopo lo scongelamento.
- Il componente COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix deve essere conservato al riparo dalla luce. In particolare, non esporre il componente COVID-19, Flu A/B, RSV MMix alla luce diretta del sole dopo aver aggiunto il COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix. Il componente COVID-19, Flu A/B, RSV Mix incluso nel formato di strisce da 8 pozzetti (referenza MD04903), deve anche essere conservato protetto dalla luce.
- Se la confezione del 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 canali di fluorescenza Texas Red, FAM e HEX/VIC e Cy5 (a lunghezze d'onda di emissione di 615, 520, 556 e 670 nm, rispettivamente). Si vedano nella **Sezione 11** i modelli di strumento per i quali il kit è stato convalidato.
- Apparecchiature e materiali monouso per l'isolamento di RNA virale da campioni respiratori.
- Contenitori in plastica per qPCR certificati RNase/DNase free: provette per PCR, strisce, tappi, piastre a 96 pozzetti, pellicole adesive (necessari solo per i prodotti con referenza MD04901 e MD04902).
- Pipettatori e puntali con filtro (certificati RNase/DNase free).
- Guanti monouso.
- Vortice e centrifuga.

7. Raccolta e preparazione dei campioni

Il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech è stato validato con campioni di tamponi nasofaringei o orofaringei. Per ottenere risultati ottimali, sono cruciali 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 CE IVD sono il materiale di partenza per il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech. Assicurarsi che i campioni di RNA siano conformi in termini di purezza, concentrazione e integrità degli acidi nucleici. Un rapporto $A_{260/280}$ di ~2 è generalmente accettato per l'RNA puro. Poiché l'etanolo è un forte inibitore della PCR, è necessario eliminarlo completamente prima dell'eluizione dell'acido nucleico durante l'estrazione. Il kit NZYtech integra una reazione interna di controllo per il processo di estrazione dell'RNA che ha come target l'RNA umano co-purificato con l'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 portare al fallimento del saggio o dare risultati errati. A causa dell'elevata sensibilità del kit, è necessario prestare particolare attenzione a non contaminare i reagenti e le miscele di amplificazione PCR.

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 di test.
- In tutte le procedure devono essere utilizzati contenitori in plastica e pipette monouso certificati RNase/DNase free.
- Utilizzare puntali con filtro certificati RNase/DNase free durante 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 elevato numero di copie; devono essere aperti e manipolatilontano dai campioni di test e da componenti del kit per evitare contaminazione incrociata.
- Utilizzare sempre l'acqua fornita nel kit (acqua NTC/Controllo No-template/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 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 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 sperimentale 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 su ghiaccio. **Si consiglia vivamente di pipettare i controlli positivi 1 e 2 per COVID-19 e Influenza A/B per ultimi in modo da evitare contaminazioni incrociate.**

9.1. Impostazione della reazione

Per i kit com referenza MD04901 e MD04902 - tubi

1. Preparare una miscela RT-qPCR sufficiente per il numero di test 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). Conserva il volume restante d'accordo con la **Sezione 5.**

COMPONENTE	1 TEST VOLUME (µL)	*n* TEST* VOLUME + 5% (µL)
COVID-19, Flu A/B, RSV MMix**	10	*n* × 10,5
COVID-19, Flu A/B, RSV PPMix	2	*n* × 2,1
VOLUME FINALE	**12**	***n* × 12,6**

(*) Per calcolare il numero totale di reazioni necessarie per ciascun saggio, contare il numero di campioni e aggiungerne altri tre per il controllo negativo e per i due positivi.
(**) Si noti che è possibile osservare un precipitato nella parte inferiore della provetta della master mix, 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 master mix prima del pipettaggio.

2. Pipettare 12 µL della miscela RT-qPCR nei singoli pozzetti in base alla configurazione della piastra sperimentale per PCR in tempo reale.
3. Procedere al passaggio **8.** per i controlli e i campioni biologici

Per il kit com referenza MD04903 – strisce da 8 pozzetti

4. Determinare il numero di reazioni necessarie al saggio, contare il numero di campioni e aggiungere altre tre reazioni: una per il controlo negativo e due per i controlli positivi. Conservare le strisce da 8 pozzetti non utilizzate, protette dalla luce, secondo le istruzioni indicate nella **Sezione 5.**
5. Assicurarsi che le strisce da 8 pozzetti siano completamente scongelate.
6. Centrifugare brevemente le strisce da 8 pozzetti per garantire omogenità. Ogni singolo pozzetto include già 12 µL di COVID-19, Flu A/B, RSV Mix, una miscela pronta all'uso che comprende NZYSupreme Multiplex One-step RT-qPCR Master Mix e una miscela di primer e sonda, garantendo corrette proporzioni.
7. Procedere al passaggio **8.** per i controlli e i campioni biologici.

Controlli e campioni

8. Per il controllo negativo, aggiungere 8 µL di NTC invece del template RNA nel pozzetto del controllo negativo. Il volume finale deve essere di 20 µL.
9. Per i campioni biologici, aggiungere 8 µL di ciascun campione di RNA nei pozzetti del campione, in base alla configurazione della piastra sperimentale/strisce da 8 pozzetti. Il volume finale in ciascun pozzetto deve essere di 20 µL.
10. Per i due controlli positivi, aggiungere 8 µL di COVID-19, Flu A/B, RSV POS 1 (rileva i geni SARS-CoV-2 ORF1ab, Influenza B NS2, RSV L and RP umano) e 8 µL di COVID-19, Flu A/B, RSV POS 2 (SARS-CoV-2 N, Influenza A M1, RSV L e RP umano) al posto del template RNA nei pozzetti del controllo positivo. Il volume finale deve essere di 20 µL.
11. Per i kit con referenza MD04901 e MD04902, coprire e sigillare la piastra con una pellicola adesiva ottica o tappi. Per il kit con referenza MD04903, coprire le strisce da 8 pozzetti con le strisce extra da 8 tappi incluse in questo formato.
12. Posizionare la piastra di reazione/strisce da 8 pozzetti¥ nello strumento PCR in tempo reale ed eseguire il protocollo RT-qPCR secondo la sezione seguente.

¥ Si prega di notare che le ***strisce da 8 pozzetti ad alto profilo sono compatibili esclusivamente con termociclatori a blocchi da 0,2 mL.***

9.2. Programmazione dello strumento per PCR in tempo reale

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

Impostazioni di esecuzione consigliate per RT-qPCR

CICLI	TEMPERATURA	ORA	PASSAGGIO
1	50 °C	10 min	Trascrizione inversa
1	95 °C	3 min	Attivazione della polimerasi
40	95 °C	5 s	Denaturazione
	60 °C	30 s	Annealing/Estensione*

**I dati fluorogenici devono essere raccolti durante questa fase attraverso i canali Texas Red, FAM, VIC/ HEX e Cy5.*

Coloranti fluorescenti e Canali di rilevazione

Target	Colorante fluorescente	Canali di rilevazione
COVID-19 (SARS-CoV-2)	Texas Red™	Texas Red/JUN
Flu A/B (Influenza A/Influenza B)	FAM™	FAM
RSV	HEX™	VIC/HEX o JOE
RNasi P	Cy5™	Cy5

Il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech, con referenza MD04901 e MD04902, è stato convalidato per i seguenti sistemi PCR in tempo reale: Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5, Roche Life Science LightCycler® 96 System e Bio-Rad® CFX Opus. Il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, referenza MD04903, è stato convalidato per i seguenti sistemi Real Time PCR: Applied Biosystems® 7500 and Bioer LineGene Mini S. Se si utilizza un'altra apparecchiatura, il kit deve essere convalidato 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 dei diversi strumenti per PCR in tempo reale, le soglie per i tre segnali di fluorescenza (Texas Red, FAM, VIC/HEX e Cy5) 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 siano eseguiti come previsto, secondo i seguenti criteri:

Controlli positivi: L'amplificazione delle curve FAM (Influenza B in Controllo 1 e Influenza A in Controllo 2), Texas Red (gene SARS-CoV-2 ORF1ab in Controllo 1 e gene N in Controllo 2), VIC/HEX (gene RSV L) and Cy5 (gene RP) è positiva. I controlli positivi dovrebbero amplificarsi a Cts < 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 (nessuna reazione template): non viene rilevata alcuna amplificazione. Se il controllo negativo presenta curve di amplificazione (Texas Red, FAM, VIC/HEX 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 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

Il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech usa i seguenti valori di cutoff Ct per i target di saggio per l'interpretazione dei risultati:

VALORE CT	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI
Amplificazione CT ≤35	Rilevato (+) → POSITIVO
Nessuna amplificazione Ct>35	Non rilevato (-) → NEGATIVO

SARS-CoV-2 è rilevato se la curva di amplificazione Texas Red mostra una forma sigmoidale con Ct≤ 35, indipendentemente dal risultato ottenuto per il saggio RNasi P (Cy5).

Influenza A e/o Influenza B è rilevata se la curva di amplificazione FAM mostra una forma sigmoidale con Ct ≤ 35, indipendentemente dal risultato ottenuto per il saggio RNasi P (Cy5).

RSV è rilevato se la curva di amplificazione Texas Red mostra una forma sigmoidale con Ct≤35, indipendentemente dal risultato ottenuto per il saggio RNase P (Cy5).

SARS-CoV-2, Influenza A e/o Influenza B, RSV non vengono rilevati se le curve Texas Red, FAM e VIC/HEX non si amplificano o si amplificano a Ct>35, mentre il saggio per RNasi P (Cy5) mostra una curva sigmoidale positiva (CT≤40).

Il **test non è valido** se i saggi per 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**).

SARS-COV-2 (TEXAS RED)	**INFLUENZA A/B** (FAM)	**RSV** (VIC/HEX)	**RP** (CY5)	**INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI**
+	-	-	+/-*	SARS-CoV-2 rilevato → POSITIVO
-	+	-	+/-*	Influenza A/B rilevata → POSITIVO
-	-	+	+/-*	RSV → POSITIVO
+	+	-	+/-*	SARS-CoV-2 e Influenza A/B rilevati → POSITIVO
+	-	+	+/-*	SARS-CoV-2 e RSV rilevati → POSITIVO
-	+	+	+/-*	Influenza A/B e RSV rilevati → POSITIVO
+	+	+	+/-*	SARS-COV-2, Influenza A/B, RSV rilevati→ POSITIVO
-	-	-	+	SARS-CoV-2, Influenza A/B e RSV non rilevati → NEGATIVO
-	-	-	-	Test non valido, ripetere l'estrazione

** La rilevazione di controllo interno sul canale Cy5 non è richiesta per risultati positivi sui canali di rilevazione Texas Red, FAM o HEX. Un'elevata concentrazione/carica di RNA virale rilevabile nel campione può portare a un segnale di controllo interno ridotto o assente.*

Nota: 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 prelevato al di fuori della fase viremica/sintomatica.
  - Degradazione del campione.
  - Presenza di inibitori della RT-qPCR.
  - Mutazioni nel genoma virale.
  - Mancata osservanza delle procedure descritte nel presente manuale.
  - Uso di kit di piattaforme PCR in tempo reale non convalidati.

- Risultati falsi positivi possono essere causati da:
  - Manipolazione non idonea di campioni contenenti un'elevata concentrazione di RNA virale. Data l'elevata suscettibilità del metodo RT-qPCR per le contaminazioni crociate, deve essere prestata particolare attenzione durante l'isolamento dell'RNA
  - 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 informazione 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 con infezione da SARS-CoV-2 (Figura 1B), co-infezione con SARS-CoV-2 e Influenza A/B (C), e co-infezione con SARS-CoV-2 Influenza A/B e RSV (D), 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 con affidabilità del 95%. Questa è stata determinata analizzando gli acidi nucleici di SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B a numeri di copie differenti, aggiunti in RNA estratto da campioni nasofaringei o orofaringei negativi, utilizzando 3 differenti lotti di kit seguendo condizioni di reazione di test tipiche. I test sono stati ripetuti su 4 giorni, producendo 48 replicati per ciascuna concentrazione di testata. Insieme, i dati hanno rivelato che il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech rileva 0,25 copie/µL di SARS-CoV-2, 0,375 copie/µL di influenza A, 0,375 copie/µl di Influenza B e 0,375 copie di RSV con un'affidabilità ≥95%.

Quindi, il limite provvisorio di rivelazione (LoD) è stato determinato essere 0,25 copie/µL o 250 copie/mL per SARS-CoV-2, 0,375 copie/µL o 375 copie/mL per RSV, 0,375 copie/µL o 375 copie/mL per Influenza A e 0,375 copie/µL o 375 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 tamponi orofaringei negativi (OPS) e tamponi nasofaringei (NPS) raggruppati artificialmente, che sono poi stati addizionati con varie concentrazioni di virus (inattivato) da SARS-CoV-2, influenza A, influenza B, RSV A o RSV B. Sia i campioni di NPs che quelli OPS raggruppati sono stati addizionati con varie concentrazioni di virus dai seguenti ceppi: Virus SARS-CoV-2 (variante Omicron isolata), Virus dell'Influenza A: ceppo A/Michigan/45/2015 (H1N1) pdm09), ceppo A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), Virus dell'Influenza B ceppo B/Colorado/06/2017 (Vitoria lineage) e ceppo B/Phuket/3073/2013 (Yamagata lineage), RSV A e RSV B (ceppo CH93 (18)-18), a diverse concentrazioni ed analizzati tramite il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD. Il kit LoD è stato confermato per il kit con referenza MD04903 da due diversi operatori, utilizzando tre lotti del kit. Questo esperimento comprendeva un totale di 48 replicati dei campioni negativi OPS/NPS raggruppati artificialmente, addizionati con varie concentrazioni del virus da SARS-CoV-2, influenza A, influenza B, RSV A o RSV B.

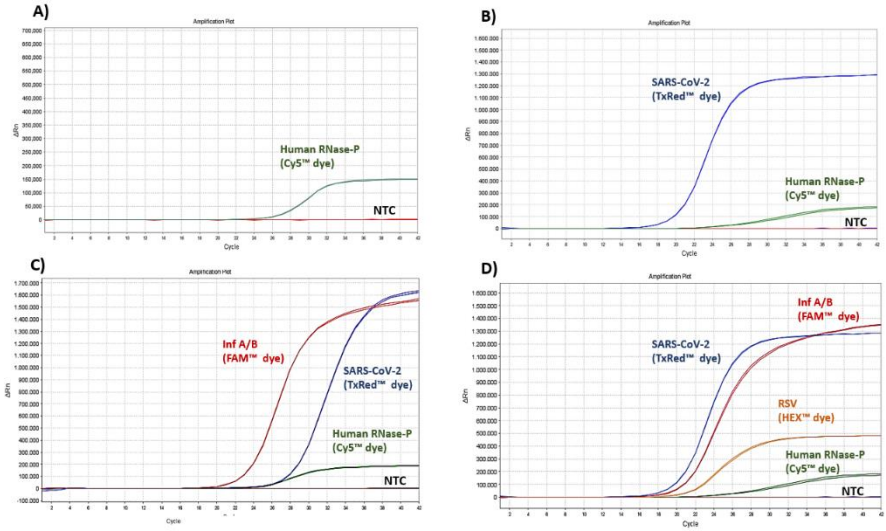

Figura 1. Rilevazione di target di SARS-CoV-2, Influenza A/B e RNasi-P umana da campioni clinici negativi (A) o da campioni clinici con infezione da SARS-CoV-2 (B), co-infezione da SARS-CoV-2 e Influenza A/B (C) o co-infezione da SARS-CoV-2, Influenza A/B e RSV (D) Curva blu, rilevazione dei target di vRNA di SARS-CoV-2 attraverso il canale Texas Red/JUN. Curva rossa, rilevazione dei target di Influenza A e/o Influenza B attraverso il canale FAM. Curva arancione, rilevazione del gene della RSV L umana attraverso il canale VIC/HEX/JOE. Curva verde, rilevazione del gene della RNasi P umana attraverso il canale Cy5.

La sensibilità analitica del COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech nel contesto di una co-infezione (interferenza competitiva) 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 10^3 copie di acidi nucleici di RSV, 10^3 copie di Influenza A e 10^3 copie di Influenza B alla curva standard di SARS-CoV-2. Per contro, 10^3 copie di SARS-CoV-2 e 10^3 copie di RSV sono state aggiunte alle curve standard di Influenza A e Influenza B. Almeno 10^3 copie di acidi nucleici di Influenza A e 10^3 copie di acidi nucleici di Influenza B sono stati aggiunti alla curva standard RSV. Campioni di tre lotti di kit sono stati analizzati in quadruplicato (per un totale di 12 replicati per diluizione) con il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, 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 era inalterato in caso di co-infezione. Tuttavia, il LoD di RSV cambiava a 0,75 copie/µL o 750 copie/mL e quello dell'Influenza B cambiava a 1,25 copie/µL o 1250 copie/mL in aso di co-infezione. Per l'Influenza A il LoD cambiava a 2,5 copie/µL o 2500 copie/mL in caso di co-infezione.

11.3. Reattività analitica (Inclusività) e Specificità analitica

L'inclusività e la reattività crociata sono state valutate mediante analisi *in silico* di sonde e primer oligonucleotidici contro agenti patogeni correlati a SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B, RSV e patogeni normali che causano infezione con sintomi simili, rispettivamente. Su analisi *in silico*, il

design del saggio si è dimostrato in grado di rilevare tutti i ceppi virali di SARS-CoV-2, Influenza A/B e RSV e non ha mostrato reattività con specie prive di relazione. Oltre all'analisi *in silico*, il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, è stata eseguita su acidi nucleici di comuni microrganismi orali e del tratto respiratorio, tra cui *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Dickeya dadantii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia nova*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces albidoflavus*. Nessuno degli agenti patogeni testati dal COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, ha generato un segnale di amplificazione rilevabile.

L'impatto di 17 potenziali sostanze interferenti è stato valutato mediante test consistenti in 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 triplicato usando tre lotti di kit 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 sullo strumento per PCR in tempo reale 7500 FAST di Applied Biosystems™ (usato con il software 7500 v2.3).

Potenziale Interferente	Principio Attivo	Concentrazione finale nel campione	Interferenza Si (S) or No (N)				
			SARS-CoV-2	Influenza A	Influenza B	RSV A	RSV B
Acqua di mare isotonica (rinomero)	NaCl	15% v/v	N	N	N	N	N
Spray gola, anestetico orale e analgesico (Strepfen)	Flurbiprofene	5% v/v	N	N	N	N	N
Soluzione per lavaggio nasale (Allergy spray - Vibrocil)	Fluticasone propionato	5% v/v	N	N	N	N	N
Spray nasale ai corticosteroidi (Nasomet)	Mometasone furoato	5% v/v	N	N	N	N	N
Spray nasale ai corticosteroidi (Pulmicort)	Budesonide	5% v/v	N	N	N	N	N
Antimicrobico, sistemico (Trobex)	Trobamicina	10 µg/mL	N	N	N	N	N
Analgesico orale, antinfiammatorio e antisettico (Pyralvex)	Estratto di rabarbaro, acido salicilico	5% v/v	N	N	N	N	N
Argomento oralfaringeo antimicotico e antibatterico (Daktarin)	Miconazolo	5 mg/mL	N	N	N	N	N
Soluzione di collutorio antisettici (Eludril Gé)	Clorexidina gluconato, Clorobutanolo emiidrato	5% v/v	N	N	N	N	N
Antitosse, Sciroppo (Codipront)	Codeina, citrato di feniltoloxamina	5% v/v	N	N	N	N	N
Sangue intero (umano)	-	4% v/v	N	N	N	N	N
Farmaco antivirale (Tamiflu)	Oseltamivir	7,5 mg/mL	N	N	N	N	N
Mucolitico (Mucolsovan)	Ambroxolo cloridrato	5% v/v	N	N	N	N	N
Soluzione di gocce nasali (Nasarox)	Ossimetazolina cloridrato	10% v/v	N	N	N	N	N
Antibiotico, unguento nasale (Bactroban)	Mupirocina	5 mg/mL	N	N	N	N	N
Saliva (umana)	-	25% v/v	N	N	N	N	N
Etanolo assoluto	Alcol	5% v/v	N	N	N	N	N

11.4. Precisione

La precisione del saggio per il COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech è stata determinata mediante test ripetuti di campioni positivi rappresentanti due livelli di carica virale, 3× copie LoD e 30× copie LoD per reazione, aggiunte a RNA estratto da campioni orofaringei negativi, utilizzando 3 diversi lotti di kit e seguendo 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 per ciascun campione (3× e 30× copie LoD 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 (3× e 30× 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 84 replicati di ciascun campione (3× e 30× copie per reazione) utilizzando 3 lotti di kit diversi con 28 replicati per lotto.

11.4.4. Riproducibilità dell'operatore

La riproducibilità dell'operatore è stata valutata analizzando 24 replicati di ciascun campione (3× copie LoD e 30× copie LoD 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.

11.4.5. Riproducibilità tra strumenti

La riproducibilità tra strumenti per i kit con referenza MD04901 e MD04902 è stata misurata da un operatore mediante test di 24 replicati di ciascun campione (3× LoD e 30× LoD copie per reazione), usando due strumenti qPCR diversi (Applied Biosystems® 7500 FAST, Applied Biosystems® QuantStudio 5), per un totale di 48 test per campione. Inoltre, la riproducibilità tra strumenti per il kit con referenza MD04903 è stata valutata anche da un operatore attraverso l'analisi di 24 replicati di ciascun campione (3x LoD e 30x LoD copie per reazione), in due diversi strumenti qPCR (Applied Biosystems™ 7500 e Bioer LineGene Mini S), per un totale di 48 test per campione.

Precisione del COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech, con rilevazione simultanea del target SARS-CoV-2.

VARIABILE		SARS-CoV-2 (COPIE/REAZIONE)	
		3× LOD	30× LOD
RIPETIBILITÀ	n	12	12
	Cq media	33,84	30,75
	Coefficiente di variazione (%)	0,61	0,19
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ GIORNALIERA	n	48	48
	Cq media	33,79	30,66
	Coefficiente di variazione (%)	2,02	1,62
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ DA LOTTO A LOTTO	n	84	84
	Cq media	33,82	30,59
	Coefficiente di variazione (%)	1,96	1,60
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ DELL'OPERATORE	n	24	24
	Cq media	33,86	30,73
	Coefficiente di variazione (%)	1,26	1,13
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ TRA STRUMENTI	n	48	48
	Cq media	33,75	30,80
	Coefficiente di variazione (%)	2,25	2,62
	% Rilevazione replicato	100	100

Precisione del COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech con rilevazione simultanea del target Influenza A.

VARIABILE		INFLUENZA A (COPIE/REAZIONE)	
		3× LOD	30× LOD
RIPETIBILITÀ	n	12	12
	Cq media	34,39	31,26
	Coefficiente di variazione (%)	3,31	1,05
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ GIORNALIERA	n	48	48
	Cq media	34,30	30,92
	Coefficiente di variazione (%)	2,90	1,52
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ DA LOTTO A LOTTO	n	84	84
	Cq media	34,28	30,76
	Coefficiente di variazione (%)	2,55	1,88
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ DELL'OPERATORE	n	24	24
	Cq media	34,14	30,97
	Coefficiente di variazione (%)	1,43	0,57
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ TRA STRUMENTI	n	48	48
	Cq media	33,82	30,28
	Coefficiente di variazione (%)	3,39	3,09
	% Rilevazione replicato	100	100

Precisione del COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech con rilevazione simultanea del target Influenza B.

VARIABILE		INFLUENZA B (COPIE/REAZIONE)	
		3× LOD	30× LOD
RIPETIBILITÀ	n	12	12
	Cq media	33,87	30,63
	Coefficiente di variazione (%)	1,85	1,19
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ GIORNALIERA	n	48	48
	Cq media	33,75	30,23
	Coefficiente di variazione (%)	2,10	2,56
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ DA LOTTO A LOTTO	n	84	84
	Cq media	33,73	30,23
	Coefficiente di variazione (%)	1,99	2,00
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ DELL'OPERATORE	n	24	24
	Cq media	33,70	30,34
	Coefficiente di variazione (%)	1,51	0,65
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ TRA STRUMENTI	n	48	48
	Cq media	33,59	30,01
	Coefficiente di variazione (%)	2,86	2,46
	% Rilevazione replicato	100	100

Precisione del COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech, mentre rileva il target di RSV.

VARIABILE		RSV (COPIE/REAZIONE)	
		3× LOD	30× LOD
RIPETIBILITÀ	n	12	12
	Cq media	33,66	30,126
	Coefficiente di variazione (%)	1,00	0,84
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ GIORNALIERA	n	48	48
	Cq media	33,24	30,05
	Coefficiente di variazione (%)	2,55	0,84
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ DA LOTTO A LOTTO	n	84	84
	Cq media	33,50	30,26
	Coefficiente di variazione (%)	2,16	1,23
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ DELL'OPERATORE	n	24	24
	Cq media	33,32	30,18
	Coefficiente di variazione (%)	2,85	1,33
	% Rilevazione replicato	100	100
RIPRODUCIBILITÀ TRA STRUMENTI	n	48	48
	Cq media	32,67	29,83
	Coefficiente di variazione (%)	2,97	2,14
	% Rilevazione replicato	100	100

11.5. Valutazione clinica

Le prestazioni del COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech sono state valutate da un laboratorio indipendente di diagnostica molecolare con la raccolta di campioni di tamponi nasofaringei o orofaringei. In totale sono stati analizzati 1516 campioni clinici: 850 campioni negativi; 293 campioni clinici positivi per SARS-COV-2 (da maggio 2021 a giugno 2022, questo periodo copre diverse ondate di SARS-CoV-2); 123 campioni clinici positivi per influenza A (41 per AH1, 41 per AH1N1 pdm, 41 per AH3); 82 campioni clinici positivi per influenza B (41 per lineage Vitoria e 41 per lineage Yamagata); 168 campioni positivi per RSV (88 per sottotipo A e 88 per sottotipo B). I dati hanno rivelato che è stato raggiunto una percentuale di concordanza del 99% per tutti i campioni positivi e negativi testati. Inoltre, è stato anche eseguito il confronto delle prestazioni cliniche del kit COVID-19, influenza A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR di NZYtech, IVD con referenza MD04901 e referenza MD04903. I dati hanno rivelato che il 100% della sensibilità clinica (PPA) e il 100% della specificità clinica (NPA) sono stati raggiunti rispettivamente per tutti i campioni positivi e negativi testati.

12. Controllo di Qualità

Tutti i componenti del COVID-19, Flu A/B, RSV Multiplex One-Step RT-qPCR Kit, IVD, di NZYtech, sono testati seguendo i protocolli sopra descritti. Il sistema di PCR in tempo reale hexaplex consente di rilevare i target descritti per l'identificazione di RNA virale di SARS-CoV-2 (geni RdRp ed N), RNA virale di Influenza A/B (geni M1 e NS2, rispettivamente), RNA virale di RSV (gene L) e anche la RNasi P umana (gene RP). Amplificazioni positive sono osservate per geni target, controllo positivo e controlli interni tramite canali Texas Red, FAM, HEX/VIC e Cy5, secondo i rispettivi coloranti reporter dei 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 (miscela primer/sonda)
CONTROL −	Controllo negativo		

16. Dichiarazione di conformità

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

Numero di catalogo: MD04901, MD04902 and MD04903

Uso previsto: Rilevazione qualitativa di SARS-CoV-2, Influenza A e Influenza B, e RSV

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

Produttore: NZYtech - Genes & Enzymes,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

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

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

Joana Brás, PhD

Direttore Tecnico

17. Bibliografia

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

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

Hansen CL, Chaves SS, Demont C, Viboud C.J (2022). Mortality Associated With Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the US, 1999-2018. AMA Netw Open. 5(2):e220527. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2022.0527.

Dhanasekaran, V., Sullivan, S., Edwards, K.M. et al. (2022). Human seasonal influenza under COVID-19 and the potential consequences of influenza lineage elimination. NAT Commun 13, 1721 (2022). https://doi.org/10.1038/s41467-022-29402-5.

Chottipitayasunondh T, Fischer TK, Heraud JM, Hurt AC, Monto AS, Osterhaus A, Shu Y, Tam J (2021). Influenza and COVID-19: what does co-existence mean? Influ Other Respir Viruses. 15: 407-412

WHO: 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. 30 settembre 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.