


SARS-CoV-2 Triplex PCR kit

**Test per la determinazione di SARS-CoV-2
Multiplex RT-PCR in real time one-step**


(Istruzioni per l'uso ITALIANO: pagina 3)

**One-step real-time RT-PCR multiplex
test for detection of SARS-CoV-2**

(Instructions for use ENGLISH: page 25)

 *100 Test*
100 Tests












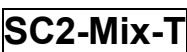


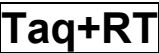
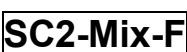


Form S 89-01
Form T 89-02
Form F 89-03

 *24 Test*
24 Tests

Form S 89-01-24
Form T 89-02-24
Form F 89-03-24



LEGENDA SIMBOLI / SYMBOLS LEGEND

	Dispositivo medico diagnostico in-vitro In vitro Diagnostic Medical Device		Dichiarazione di Conformità CE EC Declaration of conformity
	Codice di riferimento Catalogue number		Lotto Batch code
	Data di scadenza Use by		Produttore Manufacturer
	Data di fabbricazione Date of manufacture		Limitazione della temperatura Temperature limitation
	Proteggere dalla luce Protect from light		Mantenere in luoghi asciutti Keep dry
	Contenuto sufficiente per <n> test Contains reagents sufficient for N tests		Attenzione, consultare i documenti di accompagnamento Caution, consult accompanying documents
	Consultare la Metodica operativa Consult operating instructions		PCR-Mix SARS-CoV-2, Form T
	Controllo negativo Negative Control		PCR-Mix SARS-CoV-2, Form S
	Taq polimerasi con trascrittasi inversa		PCR-Mix SARS-CoV-2, Form F
	Controllo positivo Positive Control		Controllo interno Internal Control

1. UTILIZZO PREVISTO

Il kit **SARS-CoV-2 Triplex PCR** è un test multiplex PCR in real time con trascrizione inversa in una fase per il rilevamento di acidi ucleici SARS-CoV-2 da tamponi rinofaringei, tamponi orofaringei e campioni di saliva da soggetti sospettati di COVID-19.

2. PRINCIPIO DEL TEST

Il test si basa sul principio delle reazioni successive a provetta singola di trascrizione inversa e real-time PCR con rilevazione della sonda fluorescente.

Nella prima fase di reazione, l'RNA virale inverso viene trascritto in cDNA. Nella seconda reazione, le sequenze target sono amplificate sul cDNA con primer specifici per target. Durante la reazione di amplificazione, le sonde fluorescenti specifiche del target sono legate a frammenti amplificati e quindi degradate dall'attività esonucleasica della polimerasi 5' → 3'. I fluorofori rilasciati generano un segnale che viene registrato e analizzato da un termociclatore PCR in tempo reale.

Il kit SARS-CoV-2 Triplex PCR rileva simultaneamente tre target nelle regioni di codifica delle proteine ORF1ab, ORF8 e N, ciascuna su un canale di rilevamento separato. Ciò consente di aumentare la robustezza del test in caso di possibili mutazioni nelle regioni in cui si legano primer o sonde.

3. FORMATI E CONTENUTO DEL KIT

3.1 Form S (Miscela di reazione PCR-Mix SC2, sotto paraffina in strisce da 8 provette a basso profilo da 0,1 ml)

Etichetta	Componenti	REF 89-01		REF 89-01-24	
		Volume; µL	Numero	Volume; µL	Numero
SC2- Mix-S	PCR-Mix SC2, Form S	10	Provetta da 13×8× 0.1 mL	10	Provetta da 3×8× 0.1 mL
Taq+R T	Taq DNA- polimerasi con trascrizione inversa	510	1 Provetta	125	1 Provetta
PC	Controllo positivo	Polvere liofilizzata	1 Provetta	Polvere liofilizzata	1 Provetta
NC	Controllo negativo	150	1 Provetta	150	1 Provetta

Il **form S** del prodotto è stato convalidato per essere utilizzato con i seguenti ciclatori PCR real time: Bio-Rad CFX96 (utilizzabile anche con CFX96 Touch), Tecnologia del DNA DTprime (corrisponde a DTlite, SaCycler) e Roche Light Cycler 96. Se si utilizzano altri ciclatori PCR in real time compatibili con provette per PCR da 0,1 mL a basso profilo, contattare il produttore del kit per ulteriori informazioni sulla compatibilità.

3.2 Form T (Miscela di reazione PCR-Mix SC2, sotto paraffina in strisce da 8 provette a basso profilo da 0,1 ml)

Etichetta	Componenti	REF 89-02		REF 89-02-24	
		Volume, μ L	Numero	Volume, μ L	Numero
SC2-Mix-T	PCR-Mix SC2, Form T	10	Provetta da 100x0.2mL	10	Provetta da 24x0.2mL
Taq+R T	Taq DNA-polimerasi con trascrizione inversa	510	1 Provetta	125	1 Provetta
PC	Controllo positivo	Polvere liofilizzata	1 Provetta	Polvere liofilizzata	1 Provetta
NC	Controllo negativo	150	1 Provetta	150	1 Provetta

Il **form T** del prodotto è stato convalidato per l'uso con i seguenti ciclatori PCR in real time: Qiagen Rotor-Gene Q (utilizzabile anche con Corbett Research Rotor-Gene 3000/6000), Bio-Rad CFX96 (utilizzabile anche con CFX96 Touch), tecnologia del DNA DTprime (corrispondente a DTlite, SaCycler). Se si utilizzano altri ciclatori PCR in real time compatibili con provette PCR di profilo normale, contattare il produttore del kit per ulteriori informazioni sulla compatibilità.

3.3 Form F (miscela PCR liquida SC2, la miscela di reazione è in una provetta da 2 mL)

Etichetta	Componenti	REF 89-03		REF 89-03-24	
		Volume, μ L	Numero	Volume, μ L	Numero
SC2-	PCR-Mix	1020	1	250	1

Mix-F	SC2, Form F		Provetta		Provetta
Taq+R T	Taq DNA-polimerasi con trascrizione inversa	510	1 Provetta	125	1 Provetta
PC	Controllo positivo	Polvere liofilizzata	1 Provetta	Lyo-philisiertes Pulver	1 Provetta
NC	Controllo negativo	150	1 Provetta	150	1 Provetta

Il **form F** del prodotto è stato convalidato per l'uso con i seguenti ciclatori PCR in real time: Qiagen Rotor-Gene Q (utilizzabile anche con Corbett Research Rotor-Gene 3000/6000), Bio-Rad CFX96 (utilizzabile anche con CFX96 Touch), Tecnologia del DNA DTprime (corrisponde a DTLite, SaCycler), Roche Light Cycler 96. Se si utilizzano altri ciclatori PCR in real time, contattare il produttore per ulteriori informazioni sulla compatibilità.

4. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Banco da lavoro di sicurezza;
- Ciclatore PCR in real time, a seconda della forma del kit utilizzato, ad es. Bio-Rad CFX-96, tecnologia del DNA DTprime (corrispondente a DTLite, SaCycler), Qiagen Rotor-Gene Q (Corbett Research Rotor-Gene 6000), Roche Light Cycler 96;
- Agitatore;
- Microcentrifuga per provette Eppendorf da 1,5-2 mL;
- Provette per PCR / piastre a micropozzetti, se si utilizza il kit form F;

- Microcentrifuga per provette PCR da 0,1-0,2 mL, strisce da 8 provette o piastre per micropozzetti, a seconda della forma del kit utilizzata;
- Due set di pipette separati per componenti senza DNA / RNA e per componenti contenenti DNA / RNA;
- Puntali con filtro (10, 100; 200 e 1000 μ L);
- Provette monouso per microcentrifuga 1,5-2 mL, senza Dnase / RNase;
- Kit per l'estrazione di DNA / RNA mediante biglie magnetiche (Rif. 80-06) o Kit di estrazione DNA / RNA Prime (Rif. 80-07);
- Aree separate di lavoro per l'estrazione di DNA / RNA (Area di preparazione del campione), preparazione della PCR (Area di preparazione del reagente) e per l'amplificazione in real time della PCR (Area di amplificazione). Ogni area deve avere il proprio set di pipette, strumenti e indumenti da laboratorio.

5. CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEL KIT

Il kit **SARS-CoV-2 Triplex PCR** deve essere conservato a -18 ... -30 ° C, preferibilmente nella confezione originale del kit, fino alla data di scadenza. Il produttore garantisce la funzionalità dei componenti del kit fino a 15 cicli di congelamento e scongelamento. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta della confezione del kit, la data di scadenza per ciascun componente è indicata sull'etichetta della rispettiva provetta. La conservazione a +25 ° C è consentita per non più di 5 giorni (qualsiasi formato di kit).

6. RACCOLTA, TRASPORTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il DNA / RNA totale può essere estratto da tamponi rinofaringei; tamponi orofaringei e saliva, raccolti per il trasporto e lo stoccaggio nel mezzo di trasporto raccomandato. Assicurarsi che le condizioni di raccolta, trasporto e conservazione dei campioni soddisfino tutte le normative locali necessarie.

Tipo di campione	Consigli per la raccolta e il trasporto	Consigli per la conservazione
Tamponi rinofaringei e orofaringei, saliva	I campioni vengono raccolti con i dispositivi di raccolta monouso raccomandati e trasportati in 0,5 mL di soluzione di NaCl allo 0,9% (soluzione salina) o altro mezzo di trasporto idoneo refrigerato a + 2... + 8 °C	<ul style="list-style-type: none"> - A 18-25 °C per ≤ 48 ore - Refrigerato a 2-8 °C per ≤ 4 giorni - Congelato a -18... -35 °C per > 4 giorni

7. PROCEDURA DEL SAGGIO

La procedura completa prevede tre fasi:

- I. Estrazione di RNA
- II. RT-PCR in real time (uno step)
- III. Analisi e interpretazione dei dati

I. Estrazione di RNA

NOTA: tutte le manipolazioni con estrazione di campioni di DNA / RNA devono essere eseguite nell'area di preparazione dei campioni.

NOTA: la qualità dell'RNA estratto ha un profondo impatto sulle prestazioni dell'intero sistema di test. È necessario assicurarsi che il sistema utilizzato per l'estrazione dell'RNA produca RNA di qualità e quantità adatta alla PCR in tempo reale. Il kit SARS-CoV-2 Triplex PCR è stato validato con i seguenti kit e sistemi per l'estrazione di DNA / RNA e sono fortemente raccomandati dal produttore:

- *Kit per l'estrazione di DNA / RNA mediante biglie magnetiche (Astra Biotech, Rif. 80-06)*
- *Kit di estrazione DNA / RNA Prime (Astra Biotech, Rif. 80-07)*

La compatibilità di altre procedure di estrazione di DNA / RNA per l'uso con il kit SARS-CoV-2 Triplex PCR deve essere convalidata dall'utente.

1) Preparare ed etichettare la quantità richiesta di 1,5-2 mL di provette per microcentrifuga pari al numero di campioni e 1 provetta per controllo di estrazione negativa etichettata come "NEC".

NOTA: ogni procedura di estrazione deve essere eseguita utilizzando "NEC".

NOTA: Non è necessario aggiungere il controllo interno **IC** ad ogni campione perché il sistema di test utilizza un controllo interno endogeno (trascrizione di uno dei geni di "pulizia" umani).

2) Collocare **NC** per **100 µL** nella provetta per microcentrifuga contrassegnata con "**NEC**".

Nota: è possibile utilizzare il tampone di eluizione o il controllo negativo incluso nel kit di estrazione DNA / RNA al posto del controllo di estrazione negativo.

3) Seguire il manuale del kit di estrazione DNA / RNA utilizzato.

II. RT-PCR in real time

IMPORTANTE: i controlli positivi e negativi devono essere inclusi in ogni serie.

Form S/T

Preparazione dei componenti del kit

NOTA: la preparazione dei componenti del kit deve essere eseguita nell'area di preparazione del reagente.

- 1) Estrarre dal congelatore e scongelare i seguenti componenti del kit:
 - **PC** (Controllo positivo);
 - **NC** (Controllo negativo);
 - **Taq+RT** (Taq polimerasi con trascrittasi inversa);
 - Quantità richiesta di strisce da 8 provette o singole provette per PCR con **SC2-Mix-S/T** per campioni testati, più 1 provetta per "**NEC**" e 1 provetta per "**PC**".

Rimettere il resto dei componenti nel congelatore.

- 2) Trasferire **PC** e **NC** nell'area di preparazione del campione.

Preparazione della miscela PCR

NOTA: la preparazione della miscela PCR deve essere eseguita nell'area di preparazione del reagente. Non preparare la miscela PCR nella stessa area dell'estrazione di DNA / RNA o dell'amplificazione della PCR per prevenire la contaminazione.

- 1) *Etichettare le provette preparate per PCR con **SC2-Mix-S/T**.*

NOTA: *quando si utilizzano ciclatori PCR in real time con rilevazione fluorescente attraverso il tappo della provetta, etichettare le provette sul bordo del tappo o sulla parete laterale. Quando si utilizzano ciclatori PCR in real time con rilevazione fluorescente attraverso la parete laterale, etichettare le provette sul tappo.*

- 2) **Taq+RT** deve essere agitato delicatamente, evitando formazione di schiuma, e centrifugato a 1500-2400 giri/min per 2-3 s.
- 3) Collocare **Taq+RT** per 10 µl in ogni provetta evitando il contatto della punta con la paraffina.

Erogazione di campioni e controlli di prova

NOTA: *L'erogazione di campioni e controlli di prova deve essere eseguita nell'area di preparazione dei campioni.*

NOTA: utilizzare un puntale con filtro separato per ciascun campione di DNA.

- 1) Centrifugare a 13000 giri/min l'RNA estratto dai campioni e "NEC" (estratto **NC**) per 1 minuto prima di aggiungerli alle provette per PCR.
- 2) Aggiungere 10 µL di RNA campione e "NEC" nelle corrispondenti provette per PCR evitando il contatto della punta con la paraffina.
- 3) Aggiungere 50 µL **NC** nella provetta **PC**.
- 4) Agitare su agitatore e centrifugare **PC** a 1500-2400 giri al secondo per 2-3 s.
- 5) Aggiungere 10 µL **PC** alla provetta PCR etichettata "PC" evitando il contatto della punta con la paraffina.
- 6) Chiudere le provette per PCR e centrifugare a 1500-2400 giri/min per 2-3 s.

Amplificazione Real-Time PCR

NOTA: l'amplificazione Real-Time PCR deve essere eseguita nell'area Amplificazione. Si consiglia uno spazio separato per quest'area. Seguire le istruzioni del produttore prima di utilizzare il ciclatore per Real-Time PCR.

- Caricare le provette in un ciclatore per Real-Time PCR.
- Utilizzando il software del ciclatore, inserire la posizione dei campioni. Impostare il rilevamento fluorescente sui canali ROX / Arancio, FAM / Verde, HEX / Giallo e Cy5 / Rosso.

- Eseguire il protocollo PCR.

Fase	Temperatura, °C	Tempo	Raccolta dati	Numero di cicli
mantenimento	50	15 min	-	1
mantenimento	94	3 min	-	1
cycling	94	10 s	-	5
	60	20 s	-	
cycling	94	10 s	-	45
	60	20 s	ROX/ aranio FAM/ verde HEX/ giallo Cy5/ rosso	

Form F

Preparazione dei componenti del kit

NOTA: la preparazione dei componenti del kit deve essere eseguita nell'area di preparazione dei reagenti.

1) Estrarre dal congelatore e scongelare i seguenti componenti del kit:

- **PC** (Controllo positivo);
- **NC** (Controllo negativo);
- **Taq+RT** (Taq polimerasi con trascrittasi inversa);
- **SC2-Mix-F** (Buffer PCR con dNTP, primer e sonde)

2) Trasferire **PC** e **NC** nell'area di preparazione dei campioni.

Preparazione della miscela PCR

NOTA: la preparazione della miscela PCR deve essere eseguita nell'area di preparazione dei reagenti. Non preparare la miscela PCR nella stessa area dell'estrazione del DNA / RNA o dell'amplificazione PCR per prevenire la contaminazione del DNA.

1) Preparare ed etichettare la quantità richiesta di provette PCR / strisce/piastre per micropozzetti da 0,1-0,2 mL per i campioni testati, più 1 provetta/pozzetto per "NEC" e 1 provetta/pozzetto per "PC",

Nota: quando si utilizzano termociclatori per real time PCR con rilevamento della fluorescenza attraverso il tappo della provetta, etichettare le provette sul bordo del tappo o sulla parete laterale. Quando si utilizzano termociclatori per PCR in tempo reale con rilevamento fluorescente attraverso la parete laterale, etichettare le provette sul tappo.

2) **SC2-Mix-F** Agitare su vortex e centrifugare **SC2-Mix-F** a 1500-2400 giri/min per 2-3 s.

3) **Taq+RT** Agitare delicatamente **Taq + RT**, evitando la formazione di schiuma, e centrifugare a 1500-2400 giri/min per 2-3 s.

4) Per preparare la Master Mix, in una provetta eppendorf da 1,5-2 mL, mescolare di **SC2-Mix-F** $10 \cdot N$ μ L e di **Taq+RT** $5 \cdot N$ μ L, dove N è il numero totale di reazioni.

Ad esempio, per analizzare 10 campioni e «PC» e «NEC» (12 reazioni in totale) è necessario miscelare 120 μ L di **SC2-Mix-F** e 60 μ L di **Taq+RT**.

NOTA: la provetta di **SC2-Mix-F** è sufficiente per 100 reazioni più 2 reazioni aggiuntive per tenere conto degli errori di pizzicamento. Per impostare esattamente 100 reazioni, aggiungere 510 µL di **Taq+RT** direttamente nella provetta inutilizzata di **SC2-Mix-F**.

- 5) Preparare al vortex Master Mix e centrifugare brevemente per rimuovere le gocce dall'interno del coperchio.

NOTA: non conservare Master Mix (**SC2-Mix-F** e **Taq + RT**) per più di 1 ora a + 2... + 8 ° C.

- 6) Mettere 15 µL di Master Mix in ciascuna provetta / pozzetto PCR.

Erogazione di campioni di prova e controlli

NOTA: la dispensazione dei campioni di prova e dei controlli deve essere eseguita nell'area di preparazione dei campioni.

NOTA: utilizzare un puntale con filtro separato per ogni campione di RNA.

- 7) Centrifugare a 13000 giti/min l'RNA estratto dai campioni e "NEC" (estratto **NC**) per 1 min prima di aggiungerli alle provette per PCR.
- 8) Aggiungere 10 µL di campioni di RNA e "NEC" nelle corrispondenti provette / pozzetti per PCR.
- 9) Aggiungere 50 µL di **NC** alla provetta del **PC**.

- 10) Agitare e centrifugare il **PC** a 1500-2400 giri/min per 2-3 s.
- 11) Aggiungere 10 μ L di **PC** alla provetta PCR / ben etichettata "PC".
- 12) Chiudere le provette e centrifugare a 1500-2400 giri/min per 2-3 s.

Amplificazione Real-Time PCR :

NOTA: *l'amplificazione della real time PCR deve essere eseguita nell'area Amplificazione. Si consiglia uno spazio separato per quest'area. Seguire le istruzioni del produttore prima di utilizzare il PCR Real-Time cycler.*

- Caricare le provette per PCR in un ciclatore per real time PCR.
- Utilizzando il software del ciclatore, inserire la posizione dei campioni. Impostare il rilevamento fluorescente sui canali ROX / Arancio, FAM / Verde, HEX / Giallo e Cy5 / Rosso.
- Eseguire il protocollo PCR.

Fase	Temperatura, °C	Tempo	Raccolta dati	Numero di cicli
Mantenimento	50	15 min	-	1
Mantenimento	94	3 min	-	1
Cycling	94	10 s	-	5
	60	20 s	-	
Cycling	94	10 s	-	45
	60	20 s	ROX/ arancio FAM/ verde HEX/ giallo Cy5/ rosso	

III. Analisi dei dati

1) Condizioni generali:

I coloranti fluorescenti ROX, HEX e Cy5 vengono utilizzati per rilevare l'RNA SC2 e FAM viene utilizzato per rilevare l'RNA IC.

L'analisi dei risultati può essere eseguita con il software del termociclatore Real-Time PCR in base alle sue istruzioni per l'uso. Per i ciclatori convalidati, le istruzioni dettagliate relative alla configurazione del protocollo e all'analisi dei risultati sono fornite in «Astra Biotech: Linee guida per i kit per PCR in tempo reale».

L'analisi dei risultati può essere eseguita solo utilizzando i seguenti parametri: Cq **ORF1**, Cq **ORF8**, Cq **N**, Cq **PC** e Cq **IC** che sono specificati per ciascun lotto nel foglio di controllo qualità fornito con ogni kit.

Cq **ORF1** = valore critico del ciclo di quantificazione per SC2 nel canale ROX, è cruciale per il rilevamento di risultati positivi;

Cq **ORF8** = valore critico del ciclo di quantificazione per SC2 nel canale HEX, è cruciale per la rilevazione di risultati positivi;

Cq **N** = valore critico del ciclo di quantificazione per SC2 nel canale Cy5, è cruciale per la rilevazione di risultati positivi;

Cq **PC** = Il valore critico del ciclo di quantificazione per il controllo positivo (PC) nei canali ROX, HEX e Cy5

viene utilizzato per determinare se i componenti del kit per la trascrizione inversa e l'amplificazione e il rilevamento della PCR funzionano correttamente è cruciale per i risultati negativi del rilevamento

Cq_{IC} = Il valore critico del ciclo di quantificazione per il controllo interno (IC) nel canale FAM viene utilizzato per controllare tutte le fasi dell'analisi, inclusa la qualità della procedura di estrazione dell'RNA.

- **I risultati della prova di funzionamento sono validi se:**
- $Cq_{PC} \leq Cq_{PC}$ nei canali ROX, HEX e Cy5. Nel caso in cui il valore Cq per PC sia $> Cq_{PC}$, allora tutti i campioni definiti come positivi in questa seduta dovrebbero essere considerati validi, mentre tutti i campioni definiti come negativi dovrebbero essere considerati non validi.
- $Cq_{NEC} > Cq_{ORF1}$ nel canale ROX e $Cq_{NEC} > Cq_{IC}$ nel canale FAM, ma ci sono alcune eccezioni (per maggiori informazioni vedere 2) Interpretazione dei dati).
- $Cq_{NEC} > Cq_{ORF8}$ nel canale HEX e $Cq_{NEC} > Cq_{IC}$ nel canale FAM, ma ci sono alcune eccezioni (per maggiori informazioni vedere 2) Interpretazione dei dati).
- $Cq_{NEC} > Cq_N$ nel canale Cy5 e $Cq_{NEC} > Cq_{IC}$ nel canale FAM, ma ci sono alcune eccezioni (per maggiori informazioni vedere 2) Interpretazione dei dati).

2) Interpretazione dei dati

Il campione è considerato positivo per l'RNA di SC2 se per due dei tre target:

$Cq \leq Cq_{ORF1}$ nel canale ROX

$Cq \leq Cq$ **ORF8** nel canale HEX

$Cq \leq Cq$ **N** nel canale Cy5

Cq of PC $\leq Cq$ **PC** nel canale ROX

anche se $Cq > Cq$ **IC** nel canale FAM o non è determinato

Il campione è considerato negativo per l'RNA di SC2:

$Cq > Cq$ **ORF1** nel canale ROX o non è determinato

$Cq > Cq$ **ORF8** nel canale HEX o non è determinato

$Cq > Cq$ **N** nel canale Cy5 o non è determinato

$Cq \leq Cq$ **IC** nel canale FAM,

$Cq \leq Cq$ **PC** nel canale ROX.

Il campione è considerato non valido se per due qualsiasi dei tre target:

$Cq > Cq$ **ORF1** nel canale ROX o non è determinato

$Cq > Cq$ **ORF8** nel canale HEX o non è determinato

$Cq > Cq$ **N** nel canale Cy5 o non è determinato

ma una delle seguenti condizioni è vera:

$Cq > Cq$ **IC** nel canale FAM o non è determinato

$Cq > Cq$ **PC** nel canale ROX, HEX, Cy5 o non è determinato

In caso di contaminazione:

Cq di NEC $\leq Cq$ **ORF1** nel canale ROX e / o Cq di NEC $\leq Cq$ **ORF8** nel canale HEX e / o Cq di NEC $\leq Cq$ **N** nel canale Cy5. Devono essere prese misure per eliminare la fonte di contaminazione. In caso di contaminazione, tutti i campioni positivi che soddisfano la condizione $Cq \geq (Cq \text{ di NEC} - 5)$ nei canali ROX, HEX, Cy5 sono considerati non validi, gli altri risultati sono considerati validi.

Per tutti i campioni con risultati non validi si consiglia di eseguire l'analisi dalla fase di estrazione dell'RNA.

8. CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI DEL KIT

Sensibilità analitica:

Il limite di rilevamento del kit valutato tramite analisi probit è di 1000 copie di RNA genomico SC2 per 1 mL di campione (o circa 10 copie per reazione). Questo limite è definito per il livello di confidenza 95%. Si presume che siano stati prelevati 100 µl di campione per l'estrazione di DNA / RNA e il volume di eluizione fosse di 60 µl.

Specificità analitica:

L'analisi in silico delle sequenze di primer e sonda non ha mostrato alcuna omologia con le sequenze del genoma dei seguenti organismi: Humancoronavirus 229E, Coronavirus umano OC43, Coronavirus umano HKU1, Coronavirus umano NL63, SARS-coronavirus, MERS-coronavirus, Adenovirus (es.C1 Ad.71) , Metapneumovirus umano (hMPV), Parainfluenzavirus 1-4, Influenza A e B, Enterovirus (es. EV68), Virus respiratorio sinciziale, Rhinovirus, Chlamydia pneumoniae, Haemophilus influenzae, Legionella pneumophila, Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pneumoniae pneumoniae, Pneumocystis jirovecii (PJP), Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus salivarius.

Sensibilità e specificità diagnostica:

La valutazione diagnostica del kit SARS-CoV-2 Triplex PCR è stata eseguita su 210 campioni clinici (tamponi nasofaringei, tamponi orofaringei e saliva). L'RNA dai campioni è stato estratto con il Kit di Estrazione Prime DNA/RNA.

I risultati del kit SARS-CoV-2 Triplex PCR sono stati confrontati con quelli del kit diagnostico di riferimento per il rilevamento di SARS-CoV-2 (kit di riferimento) e sono presentati nella tabella seguente:

Risultati del kit PCR SARS-CoV-2 Triplex	Kit di riferimento positivo (47)	Kit di riferimento negativo (163)
Positivo	47	0
Negativo	0	163

La sensibilità diagnostica è del 100%.

La specificità diagnostica è del 100%.

9. LIMITAZIONI DEL METODO

Qualsiasi diagnosi clinica non dovrebbe essere basata solo sui risultati dei metodi diagnostici in vitro. Per la diagnosi finale, un medico dovrebbe considerare tutti i risultati dei test clinici e di laboratorio disponibili.

10. MISURE DI SICUREZZA




Taq DNA-polimerasi + RT **Taq+RT**, controllo positivo **PC** sono nocivi, irritanti e possono causare gravi lesioni oculari; devono essere osservate le seguenti precauzioni:


- Lavarsi accuratamente le mani dopo la manipolazione.
- Non mangiare, bere o fumare durante l'utilizzo di questo prodotto.
- Indossare guanti / indumenti protettivi / protezione per gli occhi / protezione per il viso.
- Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.
- Utilizzare solo all'aperto o in un'area ben ventilata.
- Conservare in un'area ben ventilata.
- IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Chiamare un centro antiveneni o un medico in caso di malessere. Non provocare il vomito.


- IN CASO DI INGESTIONE: chiamare un centro antiveleni o un medico in caso di malessere. Sciacquare la bocca.
 - IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati, sciacquare la pelle con abbondante acqua e sapone / fare una doccia. Chiamare un centro antiveleni o un medico in caso di malessere.
 - IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Rimuovere le lenti a contatto se presenti e se facile da eseguire. Continuare a risciacquare.
 - Lavare gli indumenti contaminati prima di riutilizzarli.
-
- **Questo kit è solo per uso diagnostico in vitro.** L'operatore deve seguire attentamente il manuale per ottenere dati affidabili. Questo manuale di istruzioni è valido solo per il presente kit con i contenuti elencati. Qualsiasi sostituzione dei componenti del kit non è consentita dalle normative CE.
 - Il test deve essere eseguito solo da personale qualificato che segue le linee guida di una buona pratica di laboratorio.
 - Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza.
 - Non unire reagenti di lotti diversi o di provette diverse dello stesso lotto. Dopo l'uso, chiudere immediatamente tutte le provette per evitare perdite.
 - Si consiglia di impostare protocolli blank di PCR prima dell'analisi. Si consiglia di inserire in anticipo tutte le informazioni necessarie sui campioni nel software PCR cyclers.

- La tecnologia PCR è estremamente sensibile e soggetta a problemi di contaminazione. Pertanto, impostare tre aree di lavoro separate per a) preparazione del campione b) preparazione del reagente PCR ec) amplificazione PCR. Per ogni area di lavoro deve essere riservato un set di pipette, strumenti e indumenti protettivi.
- Utilizzare puntali con filtro sterili per il pipettaggio e utilizzare pipette PCR speciali per pipettaggio senza aerosol.
- Usare sempre punte nuove per prelevare le diverse soluzioni.
- Decontaminare regolarmente le pipette e i banchi del laboratorio.
- Dopo l'uso, tutti i reagenti e i componenti del test devono essere eliminati secondo le normative locali.



- Taq DNA-Polymerasi+RT **Taq+RT**, Controllo positivo e **PC** sono nocivi per la vita acquatica. Evitare il rilascio nell'ambiente.
-  Tutti i materiali di origine animale utilizzati per la produzione dei componenti del kit sono risultati sicuri per l'uomo. Tuttavia, nessuno dei test di laboratorio conosciuti garantisce la totale assenza di agenti pericolosi. Pertanto, tutti i componenti del kit e i campioni del paziente devono essere trattati come potenzialmente pericolosi.

-  Dopo l'uso, tutti i componenti del kit, i campioni e tutti i materiali di consumo che sono entrati in contatto con i campioni durante la manipolazione, la conservazione o l'analisi (provette, fiale, guanti, puntali per pipette ecc.) devono essere raccolti separatamente e sterilizzati mediante autoclave o trattamento disinfettante. Dopo la sterilizzazione, tutti i componenti del kit e i materiali monouso possono essere utilizzati come rifiuti non pericolosi. Altri componenti del kit devono essere gettati nella spazzatura convenzionale.

-  Devono essere prese le seguenti precauzioni:
 - non fumare, mangiare o bere durante l'esecuzione del test;
 - utilizzare sempre guanti protettivi durante l'esecuzione del test;
 - quando si manipola il **PC** fare attenzione a evitare che schizzi;
 - non pipettare mai il materiale con la bocca;
 - in caso di fuoriuscita di reagenti o campioni, asciugare immediatamente le fuoriuscite e lavare accuratamente l'area interessata utilizzando un decontaminante adatto.

- Per l'utilizzo del kit è necessario applicare la pratica di buon utilizzo del laboratorio, comprese tutte le normative generali e individuali.

1. INTENDED USE

SARS-CoV-2 Triplex PCR kit is one-step reverse transcription real-time PCR multiplex test for detection of SARS-CoV-2 nucleic acids from nasopharyngeal swabs, oropharyngeal swabs and saliva samples from individuals suspected of COVID-19.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The test is based on the principle of one-tube subsequent reactions of reverse transcription and real-time PCR with fluorescent probe detection.

During first reaction, purified viral RNA is reverse transcribed into cDNA. During second reaction, target sequences are amplified from cDNA template with target-specific primers. During amplification reaction, target-specific fluorescent probes are bound to amplified fragments and then degrade by polymerase 5' → 3' exonuclease activity. Released fluorophores generate signal that is detected and analysed by real-time PCR thermocycler.

SARS-CoV-2 Triplex PCR kit simultaneously detects three targets, in ORF1ab, ORF8 and N protein coding regions, each on separate detection channel. This allows increasing the robustness of the test in case of possible arising mutations in the regions where primers or probes bind.

3. KIT FORMATS AND CONTENTS

3.1. Form S (PCR-Mix SC2 reaction mix under paraffin in 0.1 mL low profile 8-tube strips)

Label	Component	REF 89-01		REF 89-01-24	
		Volume; μL	Quantity	Volume; μL	Quantity
SC2-Mix-S	PCR-Mix SC2, Form S	10	13×8×0.1 mL tube	10	3×8×0.1 mL tubes
Taq+RT	Taq DNA-polymerase with Reverse Transcriptase	510	1 tube	125	1 tube
PC	Positive Control	Lyophilized powder	1 tube	Lyophilized powder	1 tube
NC	Negative Control	150	1 tube	150	1 tube

The Form S of the product was validated to be used with the following real-time PCR cyclers: Bio-Rad CFX96 (also can be used with CFX96 Touch), DNA-Technology DTprime (corresponds to DTlite, SaCycler), and Roche Light Cycler 96. While using other real-time PCR cyclers compatible with 0.1 mL low profile PCR tubes, contact the kit manufacturer for more information concerning compatibility.

3.2. Form T (PCR-Mix SC2 reaction mix under paraffin in individual 0.2 mL regular profile tubes)

Label	Component	REF 89-02		REF 89-02-24	
		Volume; μL	Quantity	Volume; μL	Quantity
SC2-Mix-T	PCR-Mix SC2, Form T	10	100 x 0.2 mL tubes	10	24 x 0.2 mL tubes
Taq+RT	Taq DNA-polymerase with Reverse	510	1 tube	125	1 tube

	Transcriptase				
PC	Positive Control	Lyophilized powder	1 tube	Lyophilized powder	1 tube
NC	Negative Control	150	1 tube	150	1 tube

The Form T of the product was validated with following real-time PCR cyclers: Qiagen Rotor-Gene Q (also can be used with Corbett Research Rotor-Gene 3000/6000), Bio-Rad CFX96 (also can be used with CFX96 Touch), DNA-Technology DTprime (corresponds to DTlite, SaCycler). While using other real-time PCR cyclers compatible with regular profile PCR tubes, contact the kit manufacturer for more information concerning compatibility.

3.3. Form F (liquid PCR-Mix SC2 reaction mix is in 2 mL tube)

Label	Component	REF 89-03		REF 89-03-24	
		Volume; μ L	Quantity	Volume; μ L	Quantity
SC2-Mix-F	PCR-Mix SC2, Form F	1020	1 tube	250	1 tube
Taq+RT	Taq DNA-polymerase with Reverse Transcriptase	510	1 tube	125	1 tube
PC	Positive Control	Lyophilized powder	1 tube	Lyophilized powder	1 tube
NC	Negative Control	150	1 tube	150	1 tube

The Form F of the product was validated to be used with following real-time PCR cyclers: Qiagen Rotor-Gene Q (also can be used with Corbett Research Rotor-Gene 3000/6000), Bio-Rad CFX96 (also can be used with CFX96 Touch), DNA-Technology DTprime (corresponds to DTlite, SaCycler), Roche Light Cycler

96. While using other real-time PCR cyclers contact the manufacturer for more information concerning compatibility.

4. MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Biosafety cabinet;
- Real-Time PCR cycler, dependent of the kit form used, e.g. Bio-Rad CFX-96 , DNA-Technology DTprime (corresponds to DTlite, SaCycler), Qiagen Rotor-Gene Q (Corbett Research Rotor-Gene 6000), Roche Light Cycler96;
- Vortex mixer;
- Microcentrifuge for 1.5-2 mL eppendorf tubes;
- PCR tubes/microwell plates, if using kit form F;
- Microcentrifuge for 0.1-0.2 mL PCR tubes, 8-tube strips or microwell plates, depending on kit form used;
- Two separate pipette sets for DNA/RNA-free and DNA/RNA-containing components;
- Filter tips (10, 100; 200 and 1000 µL);
- Disposable safe-lock 1.5-2 mL microcentrifuge tubes, DNase/RNase free;
- Magnetic DNA/RNA extraction kit (Ref 80-06) or Prime DNA/RNA Extraction kit (Ref 80-07);
- Separate working areas for DNA/RNA extraction (Sample Preparation Area), PCR preparation (Reagent Preparation Area) and for real-time PCR amplification (Amplification Area). Each area must have own set of pipettes, instruments and laboratory clothing.

5. STORAGE CONDITIONS AND STABILITY OF THE KIT

SARS-CoV-2 Triplex PCR kit should be stored at -18...-30 °C, preferably in the original kit box, until the expiration date. The manufacturer guarantees the functionality of the kit components up to 15 freezing and thawing cycles.

The expiry date of the kit is stated on the kit box label, expiry date for each component is indicated on the respective tube label. Storage at +25 °C is allowed for no more than 5 days (any kit format).

6. SPECIMEN COLLECTION, TRANSPORTATION AND STORAGE

Total DNA/RNA can be extracted from nasopharyngeal swabs; oropharyngeal swabs and saliva, collected for transportation and storage in recommended transport medium. Please, ensure that sample collection, transportation and storage conditions meet all necessary local regulations.

Type of specimen	Recommendations for collection and transportation	Recommendations for storage
Nasopharyngeal and oropharyngeal swabs, saliva	Specimens are collected with recommended disposable collection devices and transported in 0.5 mL of 0.9 % NaCl solution (saline) or other suitable transport medium refrigerated at +2...+8 °C	<ul style="list-style-type: none"> ○ At 18-25 °C for ≤ 48 hours ○ Refrigerated at 2-8 °C for ≤ 4 days ○ Frozen at -18...-35 °C for > 4 days

7. ASSAY PROCEDURE

The complete procedure consists of three stages:

I. RNA extraction

- II. Real-Time RT-PCR (one-step)
- III. Data analysis and interpretation

I. RNA extraction

NOTE: All manipulations with samples and DNA/RNA extraction must be done in Sample Preparation Area.

NOTE: The quality of the extracted RNA has a profound impact on the performance of the entire test system. It has to be ensured that the system used for RNA extraction yields RNA of quality and quantity suitable for real-time PCR. SARS-CoV-2 Triplex PCR kit was validated with the following kits and systems for DNA/RNA extraction, and are strongly recommended by the manufacturer:

- Magnetic DNA/RNA extraction kit (Astra Biotech, Ref 80-06)
- Prime DNA/RNA Extraction kit (Astra Biotech, Ref 80-07)

The compatibility of other DNA/RNA extraction procedures for use with SARS-CoV-2 Triplex PCR kit has to be validated by the user.

- 1) Prepare and label required quantity of 1.5-2 mL microcentrifuge tubes equal to the number of samples and 1 tube for negative extraction control labeled as “NEC”.

NOTE: Each extraction procedure should be performed using “NEC”.

NOTE: You do not need to put in each sample Internal Control **IC**, because test system uses endogeneous internal control (transcript of one of human «housekeeping genes»).

2) Add 100 µL **NC** into the microcentrifuge tube marked “NEC”.

NOTE: The Elution buffer or Negative control contained in DNA/RNA extraction kit can be used instead of negative extraction control.

3) Follow the manual of DNA/RNA extraction kit used.

II. Real-Time RT-PCR

IMPORTANT: Positive and Negative Controls must be included in each run.

Form S/T

Kit components preparation

NOTE: Kit components preparation has to be done in the Reagent Preparation Area

- 1) Take out from the freezer and thaw the following components of the kit:
 - **PC** (positive control);
 - **NC** (negative control);
 - **Taq+RT** (Taq polymerase with Reverse Transcriptase);
 - Required quantity of 8-tube strips or individual PCR tubes with **SC2-Mix-S/T** for tested samples, plus 1 tube for “NEC” and 1 tube for “PC”.

The rest of components put back in the freezer.

2) Transfer **PC** and **NC** to the Sample Preparation Area.

PCR mix preparation

NOTE: PCR mix preparation has to be done in the Reagent Preparation Area. Do not prepare the PCR mix in the same area as the DNA/RNA extraction or PCR amplification to prevent contamination.

- 1) Label prepared PCR tubes with **SC2-Mix-S/T**.

NOTE: When using real-time PCR cyclers with fluorescent detection through the tube cap, label tubes on the edge of the cap or on side wall. When using real-time PCR cyclers with fluorescent detection through the side wall, label tubes on the cap.

- 2) Gently vortex **Taq+RT**, avoiding foaming, and centrifuge at 1500-2400 rpm for 2-3 s.
- 3) Place 10 µl of **Taq+RT** into each tube avoiding tip contact with paraffin.

Dispensing of test samples and controls

NOTE: Dispensing of test samples and controls has to be performed in the Sample Preparation Area.

NOTE: Use a separate filter tip for each DNA sample.

- 1) Centrifuge the RNA extracted from the specimens and “NEC” (**NC** extract) at 13000 rpm for 1 min before adding them to the PCR tubes.
- 2) Add 10 µl of specimen RNA and “NEC” to corresponding PCR tubes avoiding tip contact with paraffin.
- 3) Add 50 µL of **NC** to the **PC** tube.
- 4) Vortex and centrifuge the **PC** at 1500-2400 rpm for 2-3 s.
- 5) Add 10 µL of **PC** to the PCR tube labeled “PC” avoiding tip contact with paraffin.

6) Close PCR tubes and centrifuge at 1500-2400 rpm for 2-3 s.

Real-Time PCR Amplification

NOTE: *Real-Time PCR Amplification has to be performed in the Amplification area. Separate room for this area is recommended. Follow the manufacturer instruction before using PCR Real-Time cycler.*

- Load PCR tubes into a real-time PCR cycler.
- Using cycler's software, fill in the location of the samples. Set up fluorescent detection on the channels ROX/Orange, FAM/Green, HEX/Yellow and Cy5/Red.
- Run the PCR protocol.

Stage	Temperature, °C	Time	Data collection	Number of cycles
Hold	50	15 min	-	1
Hold	94	3 min	-	1
Cycling	94	10 s	-	5
	60	20 s	-	
Cycling	94	10 s	-	45
	60	20 s	ROX/ Orange FAM/ Green HEX/ Yellow Cy5/ Red	

Form F

Kit components preparation

NOTE: *Kit components preparation has to be done in the Reagent Preparation Area*

- 1) Take out from the freezer and thaw the following components of the kit:

- **PC** (positive control);
 - **NC** (negative control);
 - **Taq+RT** (Taq polymerase with Reverse Transcriptase);
 - **SC2-Mix-F** (PCR buffer with dNTPs, primers and probes).
- 2) Transfer **PC** and **NC** to the Sample Preparation Area.

PCR mix preparation

NOTE: *PCR mix preparation has to be performed in the Reagent Preparation Area. Do not prepare the PCR mix in the same area as the DNA/RNA extraction or PCR amplification to prevent contamination.*

- 1) Prepare and label required quantity of 0.1-0.2 mL PCR tubes/strips/microwell plates for tested samples, plus 1 tube/well for “NEC” and 1 tube/well for “PC”.

Note: *when using real-time PCR cyclers with fluorescent detection through the tube cap, label tubes on the edge of the cap or on side wall. When using real-time PCR cyclers with fluorescent detection through the side wall, label tubes on the cap.*

- 2) Vortex and centrifuge the **SC2-Mix-F** at 1500-2400 rpm for 2-3 s.
- 3) Gently vortex **Taq+RT**, avoiding foaming, and centrifuge at 1500-2400 rpm for 2-3 s.
- 4) To prepare Master Mix, in 1.5-2 mL eppendorf tube, mix $10 \times N$ μ L of **SC2-Mix-F** and $5 \times N$ μ L of **Taq+RT**, where N is the total number of reactions.

For example, to run 10 samples, and «PC» and «NEC» (12 reactions total) you should mix 120 μ L of **SC2-Mix-F** and 60 μ L of **Taq+RT**.

NOTE: Tube of **SC2-Mix-F** is sufficient for 100 reactions plus 2 additional reactions to account for pipetting errors. To set up exactly 100 reactions, add 510 μ L of **Taq+RT** directly into unused tube of **SC2-Mix-F**.

5) Vortex prepared Master Mix and spin briefly to remove drops from the inside of the lid.

NOTE: Do not store Master Mix (**SC2-Mix-F** plus **Taq+RT**) for more than 1 hour at +2...+8 °C.

6) Put 15 μ L of Master Mix into each PCR tube/ well.

Dispensing of test samples and controls

NOTE: Dispensing of test samples and controls have to be performed in the Sample Preparation Area.

NOTE: Use a separate filter tip for each RNA sample.

7) Centrifuge the RNA extracted from the specimens and “NEC” (**NC** extract) at 13000 rpm for 1 min before adding them to the PCR tubes.

8) Add 10 μ L of specimens RNA and “NEC” in corresponding PCR tubes/wells.

9) Add 50 μ L of **NC** to the **PC** tube.

10) Vortex and centrifuge the **PC** at 1500-2400 rpm for 2-3 s.

11) Add 10 μ L of **PC** to the PCR tube/well labeled “PC”.

12) Close the tubes and centrifuge at 1500-2400 rpm for 2-3 s.

Real-Time PCR Amplification:

NOTE: Real-Time PCR Amplification has to be performed in the Amplification area. Separate room for this area is recommended. Follow the manufacturer’s instructions before using the PCR Real-Time cycler.

- Load PCR tubes into a real-time PCR cycler.
- Using cycler's software, fill in the location of the samples. Set up fluorescent detection on the channels ROX/Orange, FAM/Green, HEX/Yellow and Cy5/Red.
- Run the PCR protocol.

Stage	Temperature, °C	Time	Data collection	Number of cycles
Hold	50	15 min	-	1
Hold	94	3 min	-	1
Cycling	94	10 s	-	5
	60	20 s	-	
Cycling	94	10 s	-	45
	60	20 s	ROX/ Orange FAM/ Green HEX/ Yellow Cy5/ Red	

III. Data Analysis

1) General conditions:

Fluorescent dyes ROX, HEX and Cy5 are used to detect the SC2 RNA and FAM is used to detect the **IC** RNA.

Analysis of the results can be performed with Real-Time PCR thermal cycler's software according to its instruction for use. For the validated cyclers detailed instructions concerning protocol set up and results analysis are given in «Astra Biotech: Real-Time PCR kits Guidelines».

Analysis of the results can be performed only by using following parameters: Cq **ORF1**, Cq **ORF8**, Cq **N**, Cq **PC** and Cq **IC** that are specified for each lot in the Quality Control Sheet provided with every kit.

Cq **ORF1** = critical value of quantification cycle for SC2 in the ROX channel, is crucial for detection positive results;

Cq **ORF8** = critical value of quantification cycle for SC2 in the HEX channel, is crucial for detection positive results;

Cq **N** = critical value of quantification cycle for SC2 in the Cy5 channel, is crucial for detection positive results;

Cq **PC** = critical value of quantification cycle for Positive Control (PC) in the ROX, HEX and Cy5 channels is used to determine whether kit components for reverse transcription and PCR amplification and detection work properly is crucial for detection negative results;

Cq **IC** = critical value of quantification cycle for Internal Control (IC) in the FAM channel is used to control all stages of the analysis, including quality of RNA extraction procedure.

The results of test run are valid if:

- Cq PC \leq Cq **PC** in the ROX, HEX and Cy5 channels. In the case when Cq value for PC is $>$ Cq **PC**, then all the specimens defined as positive in this run should be considered as valid, whereas all the specimens defined as negative should be considered as invalid.
- Cq of NEC $>$ Cq **ORF1** in the ROX channel and Cq of NEC $>$ Cq **IC** in the FAM channel, but there are some exceptions (for more information see 2) Data interpretation).

- Cq of NEC $>$ Cq **ORF8** in the HEX channel and Cq of NEC $>$ Cq **IC** in the FAM channel, but there are some exceptions (for more information see 2) Data interpretation).
- Cq of NEC $>$ Cq **N** in the Cy5 channel and Cq of NEC $>$ Cq **IC** in the FAM channel, but there are some exceptions (for more information see 2) Data interpretation).

2) Data interpretation

Specimen is considered as positive for RNA of SC2 if for any two of three targets:

$Cq \leq Cq$ **ORF1** in the ROX channel

$Cq \leq Cq$ **ORF8** in the HEX channel

$Cq \leq Cq$ **N** in the Cy5 channel

Cq of PC $\leq Cq$ **PC** in the ROX channel

even if $Cq > Cq$ **IC** in the FAM channel or is not determined.

Specimen is considered as negative for RNA of SC2:

$Cq > Cq$ **ORF1** in the ROX channel or is not determined

$Cq > Cq$ **ORF8** in the HEX channel or is not determined

$Cq > Cq$ **N** in the Cy5 channel or is not determined

$Cq \leq Cq$ **IC** in the FAM channel,

$Cq \leq Cq$ **PC** in the ROX channel.

Specimen is considered as invalid if for any two of three targets:

$Cq > Cq$ **ORF1** in the ROX channel or is not determined

$Cq > Cq$ **ORF8** in the HEX channel or is not determined

$Cq > Cq$ **N** in the Cy5 channel or is not determined

but any of the following is true:

$Cq > Cq_{IC}$ in the FAM channel or is not determined

$Cq > Cq_{PC}$ in the ROX, HEX, Cy5 channel or is not determined

In case of contamination:

$Cq_{NEC} \leq Cq_{ORF1}$ in the ROX channel and/or

$Cq_{NEC} \leq Cq_{ORF8}$ in the HEX channel and/or

$Cq_{NEC} \leq Cq_N$ in the Cy5 channel. Measures must be taken to eradicate the source of contamination. In case of contamination, all positive specimens satisfying condition $Cq \geq (Cq_{NEC} - 5)$ in the ROX, HEX, Cy5 channels are considered as invalid, the other results are considered as valid.

For all specimens with invalid results it is recommended to perform the analysis from the RNA extraction stage.

8. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE KIT

Analytical sensitivity:

The detection limit of the kit evaluated via probit analysis is 1000 copies of SC2 genomic RNA per 1 mL of sample (or ca. 10 copies per reaction). This limit is defined for confidence level 95 %. It is assumed that 100 µl of specimen was taken for DNA/RNA extraction and elution volume was 60 µl.

Analytical specificity:

In silico analysis of primer and probe sequences showed no homology with genome sequences of the following organisms: *Humancoronavirus 229E*, *Human coronavirus OC43*, *Human*

coronavirus HKU1, Human coronavirus NL63, SARS-coronavirus, MERS-coronavirus, Adenovirus (e.g. C1 Ad. 71), Human Metapneumovirus (hMPV), Parainfluenzavirus 1-4, Influenza A & B, Enterovirus (e.g. EV68), Respiratory syncytial virus, Rhinovirus, Chlamydia pneumoniae, Haemophilus influenzae, Legionella pneumophila, Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, Bordetellapertussis, Mycoplasma pneumoniae, Pneumocystis jirovecii (PJP), Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermis, Staphylococcus salivariuss.

Diagnostic sensitivity and specificity:

Diagnostic evaluation of SARS-CoV-2 Triplex PCR kit was performed on 210 clinical samples (nasopharyngeal swabs, oropharyngeal swabs, and saliva). RNA from the samples was extracted with Prime DNA/RNA Extraction kit.

Results of SARS-CoV-2 Triplex PCR kit were compared with those of reference diagnostic kit for SARS-CoV-2 detection (Reference kit) and are presented in the table below:

SARS-CoV-2 Triplex PCR kit results	Reference kit Positive (47)	Reference kit Negative (163)
Positive	47	0
Negative	0	163

Diagnostic sensitivity is 100%.

Diagnostic specificity is 100%.

9. LIMITATIONS OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of *in vitro* diagnostic methods alone. For final diagnosis a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory tests findings.

10. SAFETY PRECAUTIONS



Taq DNA-polymerase+RT **Taq+RT**, Positive Control **PC** are harmful, irritant and can cause serious eye damage; the following precautions should be observed:



- Wash the hands thoroughly after handling.
- Do not eat, drink or smoke when using this product.
- Wear protective gloves/ protective clothing/eye protection/ face protection.
- Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapors/ spray.

- Use only outdoors or in a well-ventilated area.
 - Store in a well-ventilated area.
 - IF INHALED: remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing. Call a poison center or doctor/physician if you feel unwell. Do not induce vomiting.
 - IF SWALLOWED: call a poison center or doctor/physician if you feel unwell. Rinse mouth.
 - IF ON SKIN: remove/ take off immediately all contaminated clothes, rinse skin with plenty of soap and water/ shower. Call a poison center or doctor/physician if you feel unwell.
 - IF IN EYES: rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses if present and easy to do. Continue rinsing.
 - Wash contaminate clothing before reuse.
-
- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** The operator should thoroughly follow the manual to obtain reliable data. This instruction manual is valid only for the present kit with the listed contents. Any exchange of the kit components is not allowed by CE regulations.
 - Test should only be performed by skilled personnel who follow GLP (Good Laboratory Practice) guidelines.
 - Don't use the kit after its expiration date.
 - Do not pool reagents from different lots or from different tubes of the same lot. After use, immediately close all tubes in order to avoid leakage.
 - We recommend setting up blank protocols of PCR before the analysis. We recommend filling all necessary sample information in PCR cycler software beforehand.


- PCR technology is extremely sensitive and prone to contamination issues. Therefore, set up three separate working areas for a) sample preparation b) PCR reagent preparation and c) PCR amplification. For each working area an own set of pipettes, instruments and protective clothing should be reserved.
- Use sterile filter tips for pipetting and use special PCR pipettes for aerosol free pipetting.
- Always use fresh tips to pick different solutions.
- Routinely decontaminate your pipettes and the laboratory benches.
- After usage, all the reagents and test components should be discarded according to local regulations.



Taq DNA-polymerase+RT **Taq+RT**, Positive Control **PC** are harmful for aquatic life. Avoid release to the environment.

-  Any materials of animal origin used for manufacturing of kit components were found safe for humans. However, none of known laboratory test guarantees total absence of the hazardous agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.
-  After usage, all kit components, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving or disinfectant treatment. After sterilization all kit

components and disposable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.

-  The following precautions should be taken:
 - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
 - always use protective gloves while performing the assay;
 - never pipette material by mouth;
 - be careful while handling **PC**, avoid its splashing;
 - in case of any reagent or sample spillage, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using suitable decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



DISTRIBUITO IN ITALIA DA

MERIDIAN HEALTHCARE srl
Via Caronda, 446 SC/A - 95100 CATANIA - ITALIA
Tel.: +39 095 7256869 Fax: +39 095 7254454
e-mail: info@meridianhealthcare.it
web: www.meridianhealthcare.it

 Meridian Healthcare®