COVID-19 RNA Vs 2

Multiplex Real-Time RT-PCR per la determinazione di SARS-CoV-2 - Formato Liofilo

4BShoplab

Rev. 3

COVID-19 RNA Vs 2

A. DESTINAZIONE D'USO

Il kit Covid-19 RNA Vs 2 Multiplex Real-Time RT-PCR codificato **COV19RNALYO.CE** è destinato alla rilevazione qualitativa specifica di SARS-CoV-2 in campioni umani (vedi capitolo H) mediante retrotrascrizione e amplificazione simultanee di una regione bersaglio specifica di Genoma Sars-CoV-2 (gene RdRp e gene N). Nella stessa provetta di reazione viene utilizzato un gene umano endogeno come controllo della reazione di Estrazione/Amplificazione (controllo interno). Il kit è stato adattato per l'uso su Real-Time Thermacycler e ABI 7500 Sequence Detection System® (Software SDS versione 1.3.1, Applied Biosystems™*) e CFX96 Real-Time System (Software CFX manager versione 1.7, Biorad™* *)

* Applied Biosystems è un marchio registrato e ABI PRISM® è un marchio registrato di Applera Corporation o delle sue consociate negli Stati Uniti e/o in alcuni altri paesi.
** Biorad è un marchio registrato.

B. INTRODUZIONE

I coronavirus (CoV) sono una vasta famiglia di virus che causano malattie che vanno dal comune raffreddore a malattie più gravi. I segni comuni di infezione includono sintomi respiratori, febbre, tosse, mancanza di respiro e difficoltà respiratorie. Nei casi più gravi, l'infezione può causare polmonite, sindrome respiratoria acuta grave, insufficienza renale e persino la morte. La malattia respiratoria causata dal nuovo coronavirus, rilevata per la prima volta nella città di Wuhan, in Cina, è stata denominata malattia del coronavirus 2019 (COVID-19) e il virus è stato chiamato SARS-CoV-2.
Il virus SARS-CoV-2 è un betacoronavirus, come MERS-CoV e SARS-CoV; sono virus con pericapside, a RNA positivo, a singolo filamento di origine zoonotica.
Il test COV19RNA.CE RT-PCR é in grado di rilevare l'RNA virale riducendo le fasi di manipolazione del campione, fornendo risultati rapidi e con un rischio davvero basso di contaminazione incrociata per il campione in esame.

C. PRINCIPIO DEL TEST

Il Kit **COV19RNALYO.CE** si basa sulla tecnologia Real Time PCR che utilizza Primers e Sonde specifiche.
L'RNA di SARS-CoV-2, ottenuto dal campione biologico tramite la prcedura di estrazione, viene retrotrascritto e amplificato mediante il sistema di amplificazione Real Time. La Multiplex RT-PCR si basa su una reazione in una provetta singola eseguita per ciascun campione. Il test multiplex individua specificamente due regioni del SARS-CoV-2 (RdRp e N) e un controllo interno (IC) endogeno (GAPDH). L'IC endogeno estratto, retrotrascritto e amplificato, funge da controllo di raccolta/estrazione/amplificazione per ciascun campione al fine di garantire una raccolta corretta dei campioni respiratori e l'eventuale identificazione degli inibitori di reazione.

Nota importante:
Il set dei primers e della sonda specifico per la sequenza genomica SARS-CoV-2 (gene N) è raccomandato dal Center for Disease Control and Prevention (CDC).

D. COMPONENTI

Il formato standard del prodotto codificato COV19RNALYO.CE contiene reagenti per 100 reazioni.

Componenti	Etichette e Contenuto	COV19RNALYO.CE 100 Reazioni
A **CODIFICA: ALL/MM-8** **CODICE COLORE: BLUE**	Master mix 5x	N° 1 fiala (Sciogliere con ALL/RB indicato sull'etichetta delle provette)
RB **CODIFICA: ALL/RB** **CODICE COLORE: BLUE**	Master Mix Ricostituzione Tampone	N° 1 provetta/0.40 ml
B **CODIFICA: COV19/CB** **CODICE COLORE: YELLOW**	Primers/Probes Liofili per il gene RdRp, gene N, gene GAPDH	N°2 provette (Sciogliere ALL/C indicato sull'etichetta della provetta)
C **CODIFICA: ALL/C** **CODICE COLORE: RED**	MG Water	N° 1 provetta/1.5 ml
NTC **CODIFICA: ALL/NTC** **CODICE COLORE: WHITE**	Controllo Negativo	N° 1 provetta/1.5 ml
CTRL Controllo Positivo RdRp/N **CODIFICA: COV19/CTRL** **CODICE COLORE: PINK**	DNA Liofilo Controllo Positivo per il gene RdRp, N	N°2 provette (Sciogliere con ALL/C indicato sull'etichetta della provetta)
Foglietto Illustrativo	Istruzioni d'uso	N°1

Nota importante: su richiesta Dia.Pro può fornire reagenti per 200 test, come riportato nella tabella sottostante**:**

1. Componente A	n°2 provette
2. Componente RB	n°2 provette/0,04 ml
3. Componente B	n°4 provette
4. Componente C	n°2 provette/1.5 ml
5. NTC	n°1 provetta/1.5 ml
6. CTRL	n°4 provette
7. Foglietto Illustrativo	n°1
Numero di Test	**200**
Codice	**COV19RNALYO.CE.200**

E. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Il kit codificato **COV19RNALYO.CE** deve essere conservato a +2° C/+8°C.
Una volta risospeso, il **Componente B** (cod. COV19/CB) e il **Componente CTRL** (cod. COV19/CTRL) sono stabili fino a 90 giorni a -20°C. Se i componenti devono essere utilizzati solo in modo intermittente, devono essere congelati in aliquote, evitando scongelamenti e congelamenti ripetuti. Sono consentiti solo tre processi di scongelamento.
Una volta risospeso il componente **ALL/MM-8** è stabile fino a 90 giorni a -20°C. Se il componente deve essere utilizzato solo in modo intermittente, deve essere congelato in aliquote, evitare scongelamenti e congelamenti ripetuti. Sono consentiti solo cinque processi di scongelamento.

F. MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

1. Micropipette calibrate (0.5 µl < volume <1000 µl)
2. Kit di Estrazione RNA
3. MG EtOH
4. Blocco Termico
5. Microcentrifuga
6. Portaprovette
7. Puntale sterile con filtro con barriera aerosol
8. Microprovette Nuclease-Free
9. Microprovette da 0,2 ml o micropiastre per PCR raccomandate dai produttori di strumenti per PCR real- time
10. Guanti monouso non talcati
11. Termociclatore per PCR real-time (*)
12. Fazzoletti di carta assorbenti.
13. Vortex o miscelatori similari.

(*) **Attenzione:** deve essere effettuata regolarmente una calibrazione valida di pure dyes (Pure Spectra Component File) e background (Background Component File).

G. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Il kit deve essere utilizzato solo da personale tecnico esperto e adeguatamente formato, sotto la supervisione di un medico responsabile del laboratorio.
2. Il personale tecnico deve essere specificatamente formato nell'uso di termociclatori real-time, nonché alla manipolazione dei reagenti di Biologia Molecolare e deve avere familiarità con i protocolli di amplificazione per PCR real-time.
3. Per effettuare questo tipo di analisi il kit deve essere utilizzato in un laboratorio certificato e qualificato dall'autorità nazionale di settore (Ministero della Salute o ente similare).
4. Tutto il personale coinvolto nell'esecuzione del test deve indossare indumenti protettivi da laboratorio, guanti non talcati ed occhiali. Evitare l'uso di oggetti appuntiti (aghi) o taglienti (lame). Tutto il personale coinvolto dovrebbe essere formato nelle procedure di biosicurezza, come raccomandato dal Center for Disease Control, Atlanta, Stati Uniti e riportato nella pubblicazione del National Institute of Health: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", ed. 1984.
5. Tutto il personale coinvolto nella manipolazione dei campioni dovrebbe essere vaccinato per HBV e HAV, per i quali sono disponibili vaccini sicuri ed efficaci.
6. L'ambiente di laboratorio deve essere controllato per evitare contaminanti come polvere o agenti microbici a trasmissione per via aerea, al momento dell'apertura dei flaconcini dei kit e dei componenti e dell'esecuzione del test.
7. I componenti A/CB sono fotosensibili. Occorre quindi proteggerli dall'esposizione a luce intensa.
8. Evitare le vibrazioni della superficie del banco dove viene eseguita l'analisi.
9. Al ricevimento, riporre il kit in un frigorifero a temperatura controllata o in una camera fredda ad una temperatura di +2°C/+8°C
10. Non mischiare i componenti dei kit di diversi lotti. Si raccomanda di non scambiare componenti tra kit dello stesso lotto.
11. Assicurarsi che i reagenti siano limpidi e non contengano particelle pesanti visibili o aggregati. In caso contrario, informare il supervisore del laboratorio per avviare le procedure necessarie per la sostituzione del kit.
12. Evitare la contaminazione incrociata tra i campioni utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni campione.
13. Evitare la contaminazione incrociata tra i reagenti del kit utilizzando puntali monouso e sostituendoli dopo ogni uso.
14. Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta esterna della confezione.
15. Trattare tutti i campioni come potenzialmente infettivi. Tutti i campioni umani devono essere manipolati secondo le più recenti linee guida CDC e OMS sulla biosicurezza per la manipolazione e il trattamento di campioni associati alla malattia di coronavirus 2019.
16. Conservare ed estrarre i campioni separatamente da altri reagenti e usare una stanza separata per la loro manipolazione
17. Eseguire tutte le operazioni di lavoro il più rapidamente possibile mantenendo i componenti in ghiaccio o in un blocco di raffreddamento.
18. Il flusso di lavoro del laboratorio deve procedere in maniera unidirezionale, partendo dall'area di estrazione e spostandosi verso le aree di amplificazione e di analisi dati. Non riportare campioni, attrezzatura e reagenti nell'area dove sono stati compiuti i passaggi operativi precedenti.
19. Si raccomanda l'uso di materiale monouso in plastica per la preparazione dei componenti liquidi o per il trasferimento dei componenti nelle stazioni di lavoro automatiche, per evitare la contaminazione incrociata.
20. I materiali di rifiuto prodotti durante l'utilizzo del kit devono essere smaltiti e trattati secondo le direttive nazionali e le leggi che regolamentano il trattamento dei rifiuti di laboratorio provenienti da sostanze chimiche e biologiche. In particolare, i rifiuti liquidi generati dalle procedure di estrazione dei campioni, devono essere trattati come materiale potenzialmente e inattivati prima dello smaltimento. Evitare il contatto dei rifiuti di estrazione con candeggina.
21. Spargimenti accidentali dei campioni e delle operazioni in corso devono essere assorbiti con carta assorbente imbevuta di candeggina per uso domestico e poi con acqua. La carta assorbente deve essere gettata negli appositi contenitori per i rifiuti di laboratorio/ospedali.
22. Gli altri materiali di scarto generati (esempio: puntali utilizzati per i campioni) devono essere trattati come potenzialmente infettivi e smaltiti in conformità alle direttive nazionali e alle leggi concernenti lo smaltimento dei rifiuti di laboratorio.

H. CAMPIONE: PREPARAZIONE E RACCOMANDAZIONI

Per i test diagnostici iniziali per COVID-19, il Center for Disease Control, Atlanta, USA (CDC) raccomanda la raccolta e l'analisi dei campioni delle **vie respiratorie superiori** (tamponi nasofaringei e orofaringei) e delle **vie respiratorie inferiori** (espettorato, se possibile) per i pazienti con tosse produttiva. L'induzione dell'espettorato non è raccomandata. I campioni devono essere raccolti il prima possibile una volta identificata una persona sotto indagine (PUI), indipendentemente dal momento in cui si manifestano i sintomi.

1. Raccogliere 2-3 ml di campione di lavaggio broncoalveolare e aspirato tracheale in un contenitore sterile, con tappo a vite, a prova di perdite, per la raccolta dell'espettorato o in un contenitore sterile asciutto. Refrigerare il campione a 2-8°C (≤ 48h).
2. Chiedere al paziente di sciacquare la bocca con acqua e quindi espettorare l'espettorato profondo della tosse direttamente in un contenitore di raccolta sterile, a prova di perdite, con tappo a vite o in un contenitore sterile asciutto. Refrigerare il campione a 2-8°C (≤ 48h).
3. Per i campioni nasofaringei (NP) e orofaringei (OP) utilizzare solo tamponi in fibra sintetica con stelo in plastica. Non utilizzare tamponi in alginato di calcio o tamponi con asta di legno, poiché potrebbero contenere sostanze che inattivano alcuni virus e inibiscono il test PCR. Collocare immediatamente i tamponi in provette sterili contenenti 2-3 ml di terreno di trasporto virale. I campioni NP e OP devono essere conservati in provette separate. Refrigerare il campione a 2-8°C (≤ 5 giorni).
4. Raccogliere 2-3 ml di lavaggio/aspirato nasofaringeo o aspirato nasale in un contenitore di raccolta dell'espettorato sterile, a prova di perdite, con tappo a vite o in un contenitore sterile asciutto. Refrigerare il campione a 2-8°C (≤ 48h).
5. Evitare l'aggiunta di conservanti ai campioni.
6. I campioni devono essere chiaramente identificati con codici o no i per evitare interpretazioni errate dei risultati.
7. I campioni che desiderano essere stoccati per un periodo più lungo devono essere conservati a -70°C. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.
8. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni appena prima dell'estrazione per evitare la degradazione dell'acido nucleico.
9. Si consiglia di prelevare campioni di siero (campione acuto e campione convalescente) per ulteriori test sierologici.
10. Tutti i campioni raccolti per le indagini di laboratorio devono essere considerati potenzialmente infettivi.
11. Gli operatori sanitari che raccolgono o trasportano campioni clinici devono attenersi rigorosamente alle linee guida per la prevenzione e il controllo delle infezioni e alle normative nazionali o internazionali per il trasporto di sostanze infettive per ridurre al minimo la possibilità di esposizione ad agenti patogeni.

I. PREPARAZIONE DEI COMPONENTI E AVVERTENZE

Master mix:

Componente A

• Aprire delicatamente il tappo della provetta evitando dispersioni di polvere.
• Dissolvere omogeneamente il Componente A liofilizzato con il volume di componente RB (Codice: ALL/RB) indicato sull'etichetta della provetta.
• Lasciarlo dissolvere sul banco per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C <RT< 25°C)
• Mescolare bene

ATTENZIONE: il componente A è fotosensibile. Proteggerlo dall' esposizione a luce intensa.

Componente RB

• Centrifugare la provetta per 1 min a 11000 rpm.
• Aprire con attenzione il tappo della provetta.
• Trasferire 400ul del componente RB (codice: ALL/RB) nella provetta del Componente A (codice: ALL/MM-8)

Primer/probe per il gene RdRp, il gene N e il gene GAPDH

Componente B

• Centrifugare la provetta per 1 min a 11000 rpm.
• Aprire delicatamente il tappo della provetta evitando dispersioni di polvere.
• Dissolvere omogeneamente il componente B liofilizzato con il volume di componente C (Codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
• Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C <RT< 25°C)
• Vortexare brevemente

ATTENZIONE: il componente B è fotosensibile. Proteggerlo dall' esposizione a luce intensa.

Acqua MG:

Componente C. Pronto all'uso.

Controllo Negativo:

NTC. Pronto all'uso.

Controllo Positivo per RdRp, gene N:

Componente CTRL

• Centrifugare la provetta per 1 min a 11000 rpm.
• Aprire delicatamente il tappo della provetta evitando dispersioni di polvere.
• Dissolvere omogeneamente il componente B liofilizzato con il volume di componente C (Codice: ALL/C) indicato sull'etichetta della provetta.
• Lasciarlo dissolvere sul piano di lavoro per almeno 10 min a temperatura ambiente (15°C <RT< 25°C)
• Vortexare brevemente

L. STRUMENTI E ACCESSORI UTILIZZATI IN COMBINAZIONE CON IL KIT

1. **Le micropipette** devono essere calibrate e devono essere sottoposte a regolare decontaminazione (alcol ad uso domestico, soluzione di candeggina al 10%, disinfettanti ad uso ospedaliero) nelle parti che possono accidentalmente venire in contatto con il campione. Devono inoltre essere regolarmente controllate per garantire una precisione dell'1% e un'esattezza +/-5%.
2. **Dispositivo di estrazione:** il kit COV19RNALYO.CE deve essere utilizzato solo in combinazione con il kit QIAamp Viral RNA Mini codificato: 52904 (QIAGEN), il kit NucleoSpin Virus codificato: FC140983 (Macherey-Nagel) e il kit QIAamp MinElute Virus Spin codificato: 57704 (QIAGEN). Gli utilizzatori finali devono seguire scrupolosamente le Istruzioni per l'uso fornite dai produttori.
3. **Termociclatori real-time.** Il Kit COV19RNALYO.CE è destinato all'uso in combinazione solo con i termociclatori Real Time ABI 7500, software SDS versione 1.3.1 (Applied Biosystems), e CFX96 Real-Time System, Software CFX manager version 1.7, Biorad™
4. Gli utilizzatori finali devono seguire rigorosamente le istruzioni per l'uso fornite dai produttori.

M. CONTROLLI E OPERAZIONI PRE-ANALISI

1. Verificare la data di scadenza del kit stampata sull'etichetta esterna della confezione del kit. Non utilizzare se scaduto.
2. Verificare che i componenti non siano contaminati da particelle o aggregati visibili ad occhio nudo. Accertarsi che il prodotto non si sia danneggiato durante il trasporto e che non sia presente alcuna fuoriscita di liquidi all'interno della scatola.
3. Avviare i termociclatori, verificare le impostazioni ed assicurarsi di utilizzare il protocollo di analisi corretto.
4. Seguire rigorosamente le istruzionicontenute nel manuale dello strumento fornito dai produttori per la corretta impostazione dei termociclatori real-time.
5. Verificare che le micropipette siano impostate sul volume richiesto.
6. Verificare che tutte le altre apparecchiature siano disponibili e pronte per l'uso.
7. In caso di problemi, sospendere il test ed informare il supervisore.

N. PROCEDURA D'ANALISI

Il test deve essere eseguito secondo le istruzioni qui di seguito riportate.

N.1 Estrazione dell'RNA

La fase di estrazione dell'RNA genomico di Wuhan COVID-19 deve essere eseguita esclusivamente in combinazione con i seguenti kit:

Materiale	Descrizione	Codice Kit	Produttore
Campioni Respiratori/Siero	Nucleospin Virus kit	740983	MN™
	QIAamp Viral RNA mini kit®	52904	Qiagen™
	QIAamp Virus MinElute kit®	57704	Qiagen™

L'isolamento dell'RNA deve essere eseguito esclusivamente in conformità al manuale d'istruzioni fornito dal Fabbricante (QIAGEN™; MN™).

Nota Importante: I seguenti volumi devono essere rigorosamente rispettati nelle procedure di estrazione:

Descrizione	Volume Campione µl	Volume di eluizione µl
NucleoSpin Virus kit	400	60
QIAamp Viral RNA mini kit®	140	60
QIAamp Virus MinElute kit®	200	100

L'RNA raccolto dai campioni, non utilizzato nella sezione di analisi, deve essere conservato congelato (-18°C/-22°C).

Nota Importante:

Il valore Ct del controllo interno per il campione negativo viene utilizzato per valutare se la raccolta del campione e le procedure di estrazione dell'RNA sono state eseguite correttamente (vedere la sezione Q).

N.2 Allestimento della reazione

Il kit COV19RNALYO.CE è destinato all'uso solo in combinazione con i termociclatori in real-time ABI 7500, software SDS versione 1.3.1 (Applied Biosystems) e CFX96 Real-Time System, software CFX manager versione 1.7, Biorad™

N.2.1 Preparazione dell' RT-PCR

Importante: *Nel paragrafo O é riportato un esempio di schema di dispensazione, che occorre consultare prima di iniziare le operazioni descritte di seguito.*

• Preparare i componenti come descritto nel paragrafo I;
• Preparare il numero richiesto di provette di reazione oppure una piastra di reazione a 96 pozzetti per i campioni in esame e per il controllo positivo (preparato come descritto nel paragrafo I).

Nota Importante:
1- Utilizzare solo provette ottiche o micropiastre consigliate dai produttori di termociclatori Real-Time.

• Considerare che i campioni, se possibile, dovrebbero essere analizzati in duplicato.
• Includere almeno 1 provetta per l'NTC (controllo negativo)
• Preparare la **miscela di reazione** per **campioni, NTC e controllo positivo (CTRL)** come da tabella seguente:

Preparazione della miscela di reazione

Numero di Reazioni		x1	x12
A	Master mix	4 µl	48 µl
B	Primers/probes	2 µl	24 µl
C	Acqua MG	4 µ	48 µl
Tot vol.		**10 µl**	**120 µl**

• Dispensare 10 ul di miscela di amplificazione in ogni provetta di reazione o pozzetto della micropiastra.
• Aggiungere 10 ul di **campioni, NTC, CTRL** alle provette di reazione.
• Chiudere bene le provette di reazione
• Centrifugare brevemente le provette di reazione a 2000 rpm/min
• Non lasciare le provette di reazione a temperatura ambiente (TA) per più di 30 minuti ed esposte alla luce (coprire le provette).
• Caricare le provette di reazione nel termoblocco dello strumento real-time.

N.3 Dopo aver impostato lo strumento real-time come descritto nel paragrafo N4 (Programmazione dello strumento) procedere con la sessione di analisi.

N.4 Programmazione dello Strumento

Per la programmazione dello strumento fare riferimento al manuale d'istruzioni fornito dai produttori.

N.4.1 Profilo Termico RT-PCR

Il profilo termico è riportato nella tabella sottostante:

Fase	Ciclo	Temp.	Durata
1	1	50°C	20 min
1	1	95°C	10 min
2	45	95°C	15 sec
		58°C (*)	45 sec

NOTA IMPORTANTE: (*) fase per la raccolta dei dati in tempo reale.

ATTENZIONE: prestare attenzione a configurare il termociclatore real-time con il profilo termico corretto, seguendo le istruzioni del manuale dello strumento fornito dal produttore.

N.4.2 Selezione dei Fluorofori

Seguendo le istruzioni contenute nei manuali dei termociclatori real-time (CFX96 e ABI7500) selezionare i fluorofori riportati nella tabella sottostante:

gene RdRp / gene N / Rilevamento del controllo interno

Determinazione	Reporter	Quencher
POL (gene RdRp)	FAM	Non Fluorescente
NUC (gene N)	Cy5	Non Fluorescente
Controllo Interno (IC)	JOE/VIC	Non Fluorescente
Riferimento Passivo (ABI7500)	ROX	

ATTENZIONE: prestare attenzione durante la programmazione e l'impostazione dello strumento real-time seguendo le istruzioni del manuale fornito dal produttore.

O. SCHEMA DEL TEST

Di seguito è riportato un esempio di schema di dispensazione per l'analisi:

Micropiastra o provette

	1	2	3
A	**CTRL**		
B	NTC		
C	Campione 1		
D	Campione 2		
E	Campione 3		
F	Campione 4		
G	Campione 5		
H	Campione 6		

Legenda: NTC = controllo negativo; CTRL = COVID-19 DNA controllo positivo per il gene RdRn e gene N; campione 1,2,3, etc.. = campioni in esame.

P. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

Q. P.1 Impostazioni Pre-Analisi

Prima di iniziare l'analisi:
- Impostare la "baseline" (il livello di fluorescenza di base) come indicato di seguito:

"baseline"	
ABI™PRISM® 7500 SDS	**Auto Baseline**
BIORAD™ CFX96®	**Auto Calculated Baseline**

- Impostare manualmente la "Threshold" di fluorescenza FAM/Cy5/ JOE/VIC

"Threshold"	ABI™PRISM® 7500 SDS
FAM (POL)	0.15
Cy5 (NUC)	0.15
JOE (IC)	0.15

"Threshold"	BIORAD™ CFX96®
FAM (POL)	250
Cy5 (NUC)	250
VIC (IC)	150

P.2 Analisi dei Dati

Ogni volta che si utilizza il kit viene effettuato un controllo sul Controllo Positivo per verificare se i valori di Ct sono quelli previsti e riportati nella tabella sottostante.

Controllo	Requisiti
CTRL	Ct (Threshold Cycle) < 28.5

Q. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

Per ogni campione si presume che il valore Ct JOE/VIC del controllo interno convalidi la raccolta, l'estrazione e il rilevamento dell'RNA SARS-CoV-2 come descritto nella tabella seguente:

POL - FAM	NUC – CY5	Internal Control – JOE/VIC	Assay Result
CAMPIONE POSITIVO	CAMPIONE POSITIVO	Ct < 33	CORRETTO
		Ct ≥ 33 o indeterminato	CORRETTO*
CAMPIONE NEGATIVO	CAMPIONE NEGATIVO	Ct < 33	CORRETTO
		Ct ≥ 33 o indeterminato	NON VALIDO**
CAMPIONE NEGATIVO	CAMPIONE POSITIVO	Ct < 33	NON VALIDO***
		Ct ≥ 33 o indeterminato	NON VALIDO**
CAMPIONE POSITIVE	CAMPIONE NEGATIVO	Ct < 33	NON VALIDO***
		Ct ≥ 33 o indeterminato	NON VALIDO**

*L'elevata concentrazione iniziale di RNA SARS-CoV-2 nel campione può portare a un segnale fluorescente RIDOTTO o ASSENTE del controllo interno IC di controllo interno a causa della competizione tra reagenti.
**Possono verificarsi problemi durante la raccolta (campione iniziale contenente un numero insufficiente di cellule) o durante la fase di estrazione (presenza di inibitori) o durante la fase di amplificazione (retrotrascrizione/amplificazione inefficiente o assente) portando a un risultato errato.
La procedura del test deve essere ripetuta partendo dalla fase di Estrazione e/o utilizzando un campione fresco proveniente dal paziente.
***Si possono verificare problemi durante la fase di estrazione o durante la fase di amplificazione (retrotrascrizione/amplificazione inefficiente o assente) portando a un risultato errato. La procedura del test deve essere ripetuta partendo dalla fase di Estrazione e/o utilizzando un campione fresco proveniente dal paziente.
Se il risultato viene confermato due volte il campione potrebbe essere positivo per altri Sarbecovirus.

I risultati ottenuti con questo kit devono essere interpretati tenendo conto dei sintomi clinici e degli altri parametri di laboratorio relativi alle condizioni del paziente.
Sono possibili i seguenti risultati:

Tabella di risoluzione dei problemi

	POL-FAM	NUC-CY5	JOE	Risultato	CONTROLLO
CAMPIONE sconosciuto	+	+	+/-	RISULTATO CORRETTO *Positivo*	***IMPORTANTE***: Un'elevata concentrazione iniziale di RNA SARS-CoV-2 può portare a un segnale fluorescente RIDOTTO o ASSENTE del controllo interno I.C. per competizione tra reagenti.
CAMPIONE sconosciuto	+	-	-/+	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Inibizione, errore nella procedura di raccolta/ amplificazione	1. il colorante CY5 sia selezionato per il rilevamento NUC e i coloranti JOE/VIC per il rilevamento IC; 2. l'Analisi sia stata eseguita con le corrette impostazioni dello Strumento; 3. il kit sia stato correttamente conservato; 4. nessun potenziale inibitore della PCR abbia contaminato la provetta; 5. la procedura di estrazione sia stata eseguita correttamente;
CAMPIONE sconosciuto	-	+	-/+	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Inibizione, errore nella procedura di raccolta/ amplificazione	1. il colorante FAM sia selezionato per il rilevamento POL e i coloranti JOE/VIC per il rilevamento IC; 2. l'Analisi sia stata eseguita con le corrette impostazioni dello Strumento; 3. il kit sia stato correttamente conservato; 4. nessun potenziale inibitore della PCR abbia contaminato la provetta; 5. la procedura di estrazione sia stata eseguita correttamente;
CAMPIONE sconosciuto	-	-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Inibizione, errore nella procedura di raccolta/ amplificazione	1. i componenti siano stati preparati correttamente 2. non sia stato commesso alcun errore nella procedura di dosaggio; 3. il colorante FAM sia selezionato per il rilevamento POL, il colorante CY5 per il rilevamento NUC e i coloranti JOE/VIC per il rilevamento IC; 4. l'Analisi sia stata eseguita con le corrette impostazioni dello strumento; 5. il kit sia stato correttamente conservato; nessun potenziale inibitore della PCR inibitore della PCR abbia contaminato la provetta; 6. che la procedura di Estrazione sia stata eseguita correttamente;
CAMPIONE sconosciuto	-	-	+	RISULTATO CORRETTO *Negativo*	
CTRL	+	+	-	RISULTATO CORRETTO	***IMPORTANTE***: NO Controllo Interno I.C. segnale su CTRL perché controllo endogeno.
CTRL	-	-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Errore nel pipettaggio o nella procedura	1. i componenti siano stati preparati correttamente 2. non sia stato commesso alcun errore nella procedura di dosaggio; 3. il colorante FAM sia selezionato per il rilevamento POL e il colorante CY5 sia selezionato per il rilevamento NUC 4. l'Analisi sia stata eseguita con le corrette impostazioni dello strumento; 5. il kit sia stato correttamente conservato; 6. nessun potenziale inibitore della PCR abbia contaminato la provetta
CTRL	-	+	-	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Errore nella procedura	1. il colorante CY5 sia selezionato per il rilevamento NUC 2. l'Analisi sia stata eseguita con le corrette impostazioni dello Strumento; 3. il kit sia stato correttamente conservato; 4. nessun potenziale inibitore della PCR abbia contaminato la provetta
CTRL	+	-	-	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Errore nella procedura	1. il colorante FAM sia selezionato per il rilevamento POL 2. l'Analisi sia stata eseguita con le corrette impostazioni dello strumento; 3. il kit sia stato correttamente conservato; 4. nessun potenziale inibitore della PCR abbia contaminato la provetta
NTC	-	-	-	RISULTATO CORRETTO	***IMPORTANTE***: NO Controllo Interno I.C. segnale su NTC perché controllo endogeno.
NTC	+	-	+/-	ATTENZIONE! POSSIBILITAv' DI: Contaminazione	1. i componenti siano stati preparati correttamente 2. non sia stato commesso alcun errore nella procedura di dosaggio; 3. lo spazio di lavoro

					e gli strumenti vengono decontaminati a intervalli regolari; 4. il kit sia stato correttamente conservato;
NTC	-	+	+/-	ATTENZIONE! POSSIBILITA' DI: Contaminazione	1. i componenti siano stati preparati correttamente 2. non sia stato commesso alcun errore nella procedura di dosaggio; 3. lo spazio di lavoro e gli strumenti siano decontaminati a intervalli regolari; 4. il kit sia stato correttamente conservato;

Se si verifica uno o più dei problemi descritti nella tabella precedente, dopo la verifica, segnalare al supervisore l'eventuale problema residuo per l'eventuale adozione di ulteriori misure.
Note importanti:

1. *l'interpretazione dei risultati deve essere condotta dietro supervisione del responsabile di laboratorio, al fine di ridurre il rischio di errori di giudizio o di interpretazioni errate.*
2. *Al momento della trasmissione dei risultati del test dal laboratorio ad un centro informatico, prestare attenzione a evitare trasferimenti di dati.*

R. PERFORMANCE
La valutazione delle performnce è stata eseguita in conformità a quanto indicato nelle specifiche tecniche Interne o ITS. La valutazione delle performance è stata condotta presso i laboratori di DiaPro su materiali forniti dai laboratori medici di riferimento.

R.1 SENSIBILITA' ANALITICA
La sensibilità analitica può essere espressa come **limite di determinazione. Limite di determinazione (LOD):** è la quantità minima del target che può essere determinata da un sistema con una probabilità dichiarata.
Per i test NAT, viene espresso come concentrazione minima dell'**analita** che, dopo ripetizioni multiple del test, fornisce un risultato positivo. Il **limite di determinazione (LOD)** è stato determinato testando diluizioni seriali di un campione quantificato sul reagente di ricerca NIBSC per l'RNA Sars-CoV-2 (codice 19/304).
Le diluizioni dei campioni a 750 copie/ml e 500 copie/ ml sono state testate su 20 replicanti.
Nel kit **COV19RNALYO.CE** il valore LOD è stato definito come la quantità del target risultato positivo 19 su 20 replicati.
Sulla base dei risultati ottenuti il Limite di determinazione al 100% del sistema è stato calcolato in 750 copie/ml.
Il Limite di determinazione all'85% del sistema è stato calcolato in 500 copie/ml.

I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti:

750 copie/ml		gene RdRp		
		Positivo	**Negativo**	**Totale**
gene N	**Positivo**	18	1	**19**
	Negativo	1	0	**1**
		19	**1**	**20**

500 copie/ml		gene RdRp		
		Positivo	**Negativo**	**Totale**
gene N	**Positivo**	16	0	**16**
	Negativo	1	3	**4**
		17	**3**	**20**

R.2 SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA E SENSIBILITÀ

R.2.1 Specificità Diagnostica:
La specificità diagnostica è la probabilità che il dispositivo fornisca un risultato negativo in assenza del marker bersaglio. Quindi , il risultato **vero negativo** è un campione sicuramente negativo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico. Questo parametro è stato studiato esaminando 22 campioni nasofaringei negativi per l' RNA di SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 RNA Campioni Negativi

VERI NEGATIVI	22
FALSI POSITIVI	0
TOTALE CAMPIONI	22
SPECIFICITA' %	**100**

Sulla base dei risultati ottenuti è stata calcolata una Specificità Diagnostica del 100%.

R.2.2 Sendibilità Dignostica
La sensibilità diagnostica è la probabilità che il dispositivo dia un risultato positivo in presenza del marker bersaglio. Quindi, il risultato **vero positivo** è un campione sicuramente positivo per il marker bersaglio e correttamente classificato dal dispositivo diagnostico.
Per il kit codice COV19RNALYO.CE questo parametro è stato studiato esaminando 27 campioni nosofaringei positivi per l' RNA di SARS-CoV-2:

SARS-CoV-2 RNA Campioni Positivi

VERI POSITIVI	27
FALSI NEGATIVI	0
TOTALE CAMPIONI	27
SENSIBILITA' %	**100**

Sulla base dei risultati ottenuti è stata calcolata una Sensibilità Diagnostica del 100%.

Sensibilità Diagnostica	100 %
Specificità Diagnostica	100 %

R.2.3 Pannello di Competenza
Le prestazioni del kit Covid-19 RNA Vs 2 Multiplex Real-Time RT-PCR codificato **COV19RNALYO.CE** sono state testate con il **programma QCMD 2020 SARS-CoV-2 EQA** (cod. SCV2_20 – C1).
Il pannello contiene campioni positivi, negativi e interferenti in una matrice simile a un tampone (Transport Medium - TM).
I campioni sono stati purificati utilizzando il mini kit QIAamp Viral RNA seguendo la procedura del produttore.
I risultati ottenuti sono riportati nella tabella sottostante:

Codice	Obiettivo	Correlazione campioni	Ct POL	Ct NUC	Ct IC
SCV2_101C1-01	**Coronavirus 229E**	**3.93dPCR cp/ml**	**Und**	**Und**	30.13
SCV2_101C1-02	**SARS-CoV2**	**4.12dPCR cp/ml**	29.46	28.43	29.16
SCV2_101C1-03	**SARS-CoV2**	**3.15dPCR cp/ml**	32.45	31.41	30.09
SCV2_101C1-04	**SARS-CoV2**	**2.82dPCR cp/ml**	33.29	32.31	29.19
SCV2_101C1-05	**SARS-CoV2**	**2.82dPCR cp/ml**	33.44	32.33	29.44

R.2.4 Sensibilità alle varianti SARS-CoV-2
La capacità del kit COV19RNALYO.CE di rilevare le nuove varianti SARS-CoV-2 è stata studiata esaminando diluizioni seriali dei controlli RNA reperiti da fornitori di riferimento internazionali (come ad esempio l'AMPLIRUN di Vircell, SPAGNA). I Controlli delle Varianti sono stati testati da 1E+04 copie/ul a 5E-01 copie/ul uisando come riferimento il controllo AMPLIRUN SARS-CoV-2 RNA (codice MBC137-R).
Il kit codice COV19RNALYO.CE ha mostrato una sensibilità uguale su tutti i controlli eseguiti sull RNA delle varianti rilevando con successo entrambe le regioni target (N e RdRp) fino a 1E+00 copie/ul.
A causa della mancanza di preparati di riferimento internazionali per tutte le varianti SARS-Cov-2 oggi circolanti in tutto il mondo, Dia.Pro ha eseguito uno studio bioinformatico valutando l'omologia di sequenza delle regioni target amplificate.
Grazie alla progettazione eseguita su sequenze altamente conservate di Geni SARS-Cov-2 strutturali altamente stabili lo Studio Bioinformatico ha mostrato una forte omologia dei Primers e delle Sonde utilizzate nel kit con tutte le Varianti di Virus circolanti e oggi depositate nei più importanti Database Internazionali. I risultati ottenuti sono descritti in dettaglio nel Fascicolo Tecnico del Prodotto.

R.3 SPECIFICITÀ ANALITICA
La specificità analitica è la capacità del metodo di rilevare solo la sequenza dell' RNA bersaglio.
La specificità analitica del test COV19RNALYO.CE SARS- CoV-2 RNA è stata studiata come segue:

1. Il set di primer/probe del gene RdRp è stato scelto analizzando la sequenza target del genoma con un software appropriato (BioEdit Sequence Alignment Editor, Oligo Analyzer e Primer Express v.3.0" fornito da Applied Biosystem Inc.).
2. Il set di primer/probe del gene N è stato scelto tra quelli pubblicati dai Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Atlanta.
3. Il set di primer/probe e la sequenza del genoma target sono stati controllati con il software "BLAST", per verificare se una qualsiasi delle sequenze nucleotidiche depositate nelle banche genomiche mondiali ha qualche omologia con Wuhan Covid-19, e con il Software "ClustalW", per confrontare le sequenze target del genoma dei diversi genotipi di Toxoplasma.
4. La specificità è stata ottimizzata attraverso la selezione di condizioni di reazione stringenti.
5. I campioni provenienti da un panello di pazienti affetti da infezioni dovute a potenziali organismi interferenti sono stati ottenuti dall'European Virus Archive (Marsiglia, Francia).

I risultati sono riportati nella tabella seguente:

Organismo	Regione RdRp	Regione N
HCoV-NL63	Negativo	Negativo
HCoV-229E	Negativo	Negativo
HCoV-OC43	Negativo	Negativo
MERS-CoV	Negativo	Negativo
SARS-CoV	Negativo	Positivo *

*risultati discordanti tra le due regioni target potrebbero significare l'omologia nella sequenza della regione N tra SARS-CoV e SARS-CoV-2. La Regione RdRp mostra una specificità perfetta.

Un ulteriore controllo SARS-CoV titolato (1.2E+04 copie/ul) è stato testato per verificare ulteriormente la specificità analitica del kit codificato **COV19RNALYO.CE.**
In questo caso non è stata rilevata alcuna cross-reattività su entrambe le regioni target, il che significa una specificità completa del kit **COV19RNALYO.CE** per SARS-CoV-2.

T . LIMITAZIONI

Si consiglia all'utente di questo kit di leggere attentamente e comprendere l'inserto allegato alla confezione. È' necessaria la massima osservanza del protocollo per ottenere risultati attendibili. In particolare, un'accurata operazione di pipettaggio del campione e del reagente, l'applicazione di un corretto flusso di lavoro e un'attenta programmazione del termociclatore sono fondamentali per una determinazione e una quantificazione accurate e riproducibili dell'RNA SARS-CoV-2. La determinazione dell'RNA di SARS-CoV-2 in un campione di paziente ha ampie implicazioni mediche, sociali, psicologiche ed economiche. Il rilevamento di un possibile caso umano di patogeno emergente che causa una grave malattia respiratoria acuta dovrebbe essere immediatamente notificato alle autorità sanitarie pubbliche locali e nazionali. In linea con il Regolamento sanitario internazionale (IHR) 2005, l'autorità sanitaria nazionale deve notificare all'OMS entro 24 ore tutti gli eventi che possono costituire un'emergenza di salute pubblica. Si raccomanda quindi che riservatezza, supporto appropriato e valutazione medica siano considerati come aspetti essenziali della sequenza analitica.

U. BIBLIOGRAFIA

1. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real- time RT-PCR. V.M. Corman et al. www.eurosurvellance.org
2. Real-Time RT-PCR panel for dection 2019-novel coronavirus. Center for disease control and prevention (CDC).
3. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR. HKU ; LKS faculty of medice school of public health.
4. Interim guidelines for collecting, handling and testing clinical specimens from person under investigation (PUIs) for coronavirus disease 2019 (COVID-19). Center for disease control and prevention (CDC).
5. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. World Health Organization (WHO) 17th of January 2020.
6. Polmonite da nuovo coronavirus (2019-nCoV) in Cina. 0001997-22/01/2020-DGPRE-DGPRE-P. Ministero della Salute, direzione generale della prevenzione sanitaria.
7. Development of a quantitative assay for SARS coronavirus and correlation of GAPDH mRNA with SARS coronavirus in clinical specimens. S.C.C. Wong et al.; J Clin Pathol 2005;58:276-280.

V. SIMBOLI

LEGENDA			
REF	Codice del prodotto		Temperatura di conservazione
IVD	Dispositivo dignostico in vitro		Istruzioni d'uso
LOT	Numero Lotto		Fabbricante
	Data di scadenza		Numero di test
CE	Marchio di conformità CE		Data di produzione

Tutti i Prodotti IVD sono fabbricati dall'Azienda nell'ambito e sotto il controllo di un Sistema di Qualità certificato conforme alla Norma ISO 13485.Ogni lotto è sottoposto ad una procedura di Controllo di Qualità e rilasciato alle vendite solo se conforme alle specifiche tecniche comuni Europee e ai criteri di accettabilità definiti.

4BShopLab

consip

acquistinretepa

DISTRIBUTORE

4BShop Lab Srls

info@4BShopLab.com

www.4BShopLab.com

+39.0371.18.56.643

PRODUTTORE

Dia.Pro - Diagnostic Bioprobes Srl

DIA. PRO

MADE IN ITALY

EN ISO 13485:2013 Certified

CE FIND Because diagnosis matters