



AZURESEQ CE qPCR KIT SARS- CoV-2 PER 200 REAZIONI

ISTRUZIONI PER L'USO

Per uso diagnostico in vitro

PROTOCOLLO VERSIONE V1.0

DOCUMENTO VERSIONE 02

22/10/2020

CE

IVD

INDICE

1. DESTINAZIONE D'USO	4
2. PRINCIPIO DEL METODO	4
3. CONTENUTO DEL KIT	5
4. SPEDIZIONE E CONSERVAZIONE	5
5. RACCOLTA CAMPIONI, TRASFERIMENTO E CONSERVAZIONE	6
5.1 RACCOLTA	6
5.2 TRASPORTO.....	6
5.3 MANIPOLAZIONE.....	7
5.4 CONSERVAZIONE	7
6. MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI, MA NON FORNITI	8
6.1. STRUMENTI.....	8
6.2. REAGENTI	8
6.3. MATERIALI.....	8
7. AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	9
8. PROCEDURA.....	10
8.1. ISTRUZIONI PER ALLESTIRE LE REAZIONI	10
8.1.1. Istruzioni	10
8.2 ALLESTIMENTO QPCR	12
8.2.1 QuantStudio 3, 5, 7 Pro	12
8.2.2 Roche LightCycler 480 System	14
8.2.3 BioRAD CFX96 Touch	14
9. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	15
10. LIMITI DELLA PROCEDURA	17
11. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI	18
12. CONTROLLO QUALITÀ	19
13. CARATTERISTICHE DELLE PERFORMANCE	19
13.1. SENSIBILITÀ ANALITICA – STUDI SUL LIMITE DI RILEVAMENTO (LOD)	19
13.1.1. BioRad CFX96 Touch	19
13.1.2. Applied Biosystems QuantStudio 3/5/7 Pro Real-time PCR System	19
13.1.3. Roche LightCycler® 480 System	20
13.2. SPECIFICITÀ ANALITICA -TEST DI INCLUSIVITA'	20
13.3. SPECIFICITÀ ANALITICA – CROSS REATTIVITA'	21
13.4. STUDI DI INTERFERENZA MICROBICA	23
13.5. TEST DI ROBUSTEZZA	23
13.6. RIPETIBILITÀ E RIPRODUCIBILITÀ.....	24
13.7. PERFORMANCE CLINICA	25
14. REFERENZE.....	26
15. SIMBOLI UTILIZZATI SULLE ETICHETTE	27
16. CONTATTI.....	27

Storico documento – Note importanti e aggiornamenti

Versione Protocollo	Versione Documento	Data	Autore	Sommario variazioni	Autorizzato da
1	v1	01/10/2020	Noémi Petrovicz	Prima versione	Gergely Tölgyesi
1	v2	22/10/2020	Noémi Petrovicz	Sono stati aggiunti Raccolta campione, manipolazione e conservazione (sezione 5), Allestimento qPCR (sezione 8.2) e Referenze (section 14). Corretti errori di battitura.	Gergely Tölgyesi
1	V2	14/06/2021	Laura Galimberti (Translator)		Chiara Barzaghi (Reviewer)

1. Destinazione d'uso

Il kit AzureSeq qPCR SARS-CoV-2 per 200 reazioni è un test RT-qPCR inteso per il rilevamento qualitativo di acido nucleico da 2019-nCoV in tamponi nasofaringei (NP) e orofaringei (OP) da individui con segni e sintomi di infezione riconducibili a COVID-19.

I risultati riguardano l'identificazione dell'RNA 2019-nCoV. L'RNA 2019-nCoV è generalmente rilevabile in tamponi nasofaringei e orofaringei durante la fase acuta dell'infezione. I risultati positivi sono indicativi di infezione attiva.

I risultati negativi non precludono l'infezione da 2019-nCoV e non devono essere utilizzati come unica base per le decisioni sulla gestione del paziente. I risultati negativi devono essere combinati con osservazioni cliniche, anamnesi del paziente e informazioni epidemiologiche.

Il kit AzureSeq CE qPCR SARS-CoV-2 per 200 reazioni è destinato all'uso da parte di personale qualificato e addestrato del Laboratorio Analisi, specificamente istruito e formato nelle tecniche di real-time PCR e nelle procedure diagnostiche in vitro.

2. Principio del metodo

Il test è un test di reazione a catena della polimerasi a trascrizione inversa in Real Time (rRT-PCR) progettato per rilevare l'RNA da due diverse regioni del gene nucleocapsidico SARS-CoV-2 nei tamponi nasofaringei (NP) e orofaringei (OP) dei pazienti con segni e sintomi di infezione riconducibili a COVID-19. Il set di primer e sonde del kit rileva anche la RNasi P (RP) umana in un campione clinico come controllo interno.

Le sequenze di acido nucleico bersaglio dal genoma di SARS-CoV-2 sono le stesse sequenze utilizzate dal CDC per il loro pannello diagnostico RT-PCR Real-Time 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV). Queste sequenze sono contenute in 2 differenti regioni (N1 e N2) del gene del nucleocapside (N) del virus. Gli acidi nucleici vengono isolati e purificati dai tamponi nasofaringei e orofaringei utilizzando sistemi di estrazione degli acidi nucleici ben consolidati. I volumi di input e di eluizione del campione dipendono dal sistema utilizzato. I campioni raccolti in un mezzo di trasporto virale specifico che hanno subito un'incubazione termica possono anch'essi essere utilizzati come input per le fasi successive.

L'acido nucleico purificato, o il campione estratto a caldo viene retrotrascritto in cDNA mediante combinazione dell'acido nucleico con la master mix del kit AzureSeq CE qPCR SARS-CoV-2 per 200 reazioni (di seguito denominato AzureSeq - 200 CE) che viene successivamente amplificato nello strumento PCR Real Time. Nel processo, la sonda si lega a una sequenza target specifica situata tra i primer diretti e inversi. Durante la fase di estensione del ciclo PCR, l'attività nucleasica 5' della Taq polimerasi degrada la sonda, provocando la separazione del colorante reporter dal colorante quencher, generando un segnale fluorescente. A ogni ciclo, molecole di colorante reporter aggiuntive vengono scisse dalle rispettive sonde, aumentando l'intensità della fluorescenza. L'intensità della fluorescenza viene monitorata ad ogni ciclo PCR dallo strumento PCR Real Time.

3. Contenuto del kit

Codice prodotto	Nome prodotto	Numero di provette	Volume (µL)
OA-ITMP-MM-100	2X InhibiTaq Multiplex HotStart MasterMix	2	1000
OA-RT-200	RTScript Reverse Transcriptase, 200U/uL	1	100
OA-CPPM-100uL	CoVi Primer/Probe Mix 3	2	100
OA-NFW-350uL	Nuclease Free Water	2	350

4. Spedizione e Conservazione

Il kit AzureSeq - 200 CE è spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit dovrebbero arrivare congelati. Contattare azureseq.support@omixon.com se alcuni componenti non risultano congelati al momento del ricevimento o sono compromessi durante la spedizione.

Per evitare che i reagenti si degradino, tutti i componenti devono essere conservati immediatamente a -20°C.

Si consiglia di disporre di un generatore di riserva per il congelatore e di un registro dei dati di temperatura per garantire che i componenti del kit AzureSeq - 200 CE rimangano congelati a -20°C se si lavora in un'area soggetta a interruzioni di corrente.

Il kit scade 12 mesi dopo la data di produzione. Non utilizzarlo dopo la data di scadenza.

Non utilizzare il kit se è difettoso.

Smaltire i reagenti inutilizzati e i rifiuti secondo le normative nazionali.

5. Raccolta campioni, Trasferimento e Conservazione

La raccolta, il trasferimento o la conservazione errata dei campioni può aumentare la probabilità di risultati falso-negativi.

5.1 Raccolta

Fare riferimento al sito del CDC per Interim Guidelines for Collecting, Handling and Testing Clinical Specimens from Patients Under Investigation (OUIs) for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV).

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>

Utilizzare solo tamponi in fibra sintetica e con il bastoncino di plastica. Non utilizzare tamponi di alginato di calcio o con il bastoncino di legno, in quanto potrebbero contenere sostanze che inattivano alcuni virus e inibire il test PCR.

Per una corretta raccolta dei campioni, attenersi alle Istruzioni per l'Uso fornite dal fabbricante del dispositivo in uso.

Tampone orofaringeo

Utilizzare un tampone sterile per strofinare la faringe posteriore, evitando la lingua. Inserire subito i tamponi nelle provette sterili etichettate contenenti il mezzo di trasporto virale. Spezzare ogni bastoncino del dispositivo di raccolta nel punto di rottura (tamponi floccati) o vicino alla punta o tagliare con forbici sterili per consentire di chiudere la provetta con il tappo. Spedire subito il campione con ghiaccio.

Tampone nasofaringeo

Inserire un tampone sterile nella narice parallelamente al palato. Il tampone deve raggiungere una profondità pari alla distanza tra narice e apertura esterna dell'orecchio. Lasciare il tampone in posizione per diversi secondi per assorbire le secrezioni. Rimuovere lentamente il tampone ruotandolo. Inserire subito i tamponi nelle provette sterili etichettate contenenti il mezzo di trasporto virale. Spezzare ogni bastoncino del dispositivo di raccolta nel punto di rottura (tamponi floccati) o vicino alla punta o tagliare con forbici sterili per consentire di chiudere la provetta con il tappo. Spedire subito il campione con ghiaccio.

5.2 Trasporto

Tutti i campioni devono essere trasportati con ghiaccio (es. panetti di ghiaccio, ghiaccio secco, ecc.) e accuratamente sigillati e manipolati.

Il trasporto di campioni clinici deve avvenire in conformità ai regolamenti locali. Attenersi ai regolamenti locali in materia di biosicurezza legati a SARS-CoV-2

5.3 Manipolazione

Durante la manipolazione di campioni potenzialmente infettivi, gli operatori dei laboratori devono indossare i Dispositivi di Protezione Individuale (DPI), che comprendono guanti monouso, camici da laboratorio e protezioni per gli occhi.

Per istruzioni specifiche sulla manipolazione dei campioni clinici per il coronavirus 2019, Vd. anche il sito CDC sopra menzionato.

5.4 Conservazione

I campioni possono essere conservati a 2-8°C fino a 48 ore dalla raccolta. Per periodi di conservazione oltre i 2 giorni, congelare i campioni a -70°C.

Se il campione è conservato per più di 48 ore, è necessario estrarre l'RNA utilizzando un sistema di isolamento dell'RNA validato.

Se il campione non viene congelato e è conservato per meno di 48 ore, è possibile utilizzare l'approccio diretto.

Evitare di congelare/scongelaire il campione ripetutamente. Se il campione viene conservato per un secondo test, è necessario aliquotarlo in diverse provette per evitare troppi cicli di congelamento/scongelaire.

In base al tipo di campione, al mezzo di trasporto utilizzato, alla specifica conservazione e per l'estrazione dell'RNA, potrebbe essere necessario pre-trattare il campione. Attenersi alle istruzioni fornite dal fabbricante.

6. Materiali e Strumenti necessari, ma non forniti

6.1. Strumenti

- Real-time PCR thermal cycler in grado di rilevare canali FAM, HEX o ROX (o equivalenti)
- Thermoblock (adatto per provette per microcentrifuga da 1.5 mL, che riscaldi fino a 95°C)
- Micropipette da 100 µL e 1000 µL
- Pipette multicanale da 10 µL e 100 µL
- Vortex
- Centrifuga

6.2. Reagenti

- Kit di estrazione Viral RNA/total RNA
- Mezzo di trasporto virale (VTM) (Clinichem, Copan, Puritan, CDC VTM, mwe Medical Wire)
- CoVi Negative Control (Codice OA-CVNC-150)
- CoVi Positive Control (Codice OA-CVPC-150)

6.3. Materiali

- Piastre ottiche a 96 pozzetti o provette ottiche da 0.2 mL
- Foglio ottico compatibile con lo strumento qPCR
- Puntali monouso per Pipetta senza DNase/RNase con filtro (10 µL, 20 µL, e 200 µL)
- Provette da 1.5 ml senza DNase/RNase
- Guanti monouso senza polvere
- Prodotti decontaminanti per superfici come "RNase away"
- Materiali necessari per l'estrazione dell'acido nucleico

7. Avvertenze e Precauzioni

Buone pratiche di laboratorio sono essenziali per la corretta esecuzione di questo test. A causa dell'elevata sensibilità del test, è necessario prestare attenzione durante la manipolazione di campioni e materiali durante l'esecuzione del test per mantenere i reagenti e le miscele di amplificazione privi di contaminazione.

Gli utenti dovrebbero prestare attenzione a quanto segue:

- Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di processare i campioni. Qualsiasi deviazione dalle procedure qui descritte può influire sulle prestazioni ottimali.
- Utilizzare un disinfettante per pulire e disinfettare l'area intorno al campione.
- Decontaminare e smaltire tutti i campioni, i reagenti e altri materiali potenzialmente contaminati in conformità con le normative locali.
- Utilizzare precauzioni universali durante l'esecuzione del test. Trattare i campioni come se fossero in grado di trasmettere infezioni.
- Indossare dispositivi di protezione individuale durante l'intera procedura di analisi.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo aver tolto i guanti e smaltire i guanti come rifiuti pericolosi.
- Non ricostituire o diluire i reagenti in volumi diversi da quelli descritti nelle presenti IFU. Non utilizzare un volume di reagenti inferiore a quello specificato in queste IFU. Queste attività possono portare a errori di prestazione.
- Omixon non può fornire supporto per eventuali problemi derivanti dal mancato rispetto di fasi del protocollo descritte in queste IFU.
- Non utilizzare il prodotto in caso di danni rilevabili ai componenti (provette o piastre rotte, tappi allentati ecc.).
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.
- Non sostituire o miscelare i reagenti del kit AzureSeq - 200 CE con reagenti di altri produttori.
- Tutti gli strumenti devono essere sottoposti a manutenzione e utilizzati secondo le indicazioni del fabbricante.
- Ogni posto di lavoro deve essere dotato del proprio set di pipette a volume variabile, dei materiali ausiliari necessari e delle apparecchiature.
- Non mescolare reagenti di lotti diversi o di fiale differenti dello stesso lotto.
- Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nelle aree in cui vengono manipolati campioni o componenti del kit.

8. Procedura

Il kit AzureSeq contiene un test di controllo che utilizza come target RNaseP. Si tratta di un controllo interno necessario per confermare la presenza di acido nucleico in ogni campione eseguito con il kit AzureSeq e viene utilizzato per confermare generalmente la funzionalità dei componenti del kit del test.

Oltre a questo, non ci sono controlli esterni forniti con il kit di test AzureSeq - 200 CE. Gli operatori sono tenuti ad utilizzare i controlli positivi e negativi disponibili in commercio da Omixon come prodotti separati (i codici sono elencati nella Sezione 5) oppure possono utilizzare i controlli del proprio laboratorio.

8.1. Istruzioni per allestire le reazioni

In caso di approccio diretto senza estrazione separata dell'RNA (trattamento termico), seguire le istruzioni del passaggio 1. In caso si parta da RNA purificato con kit di estrazione dell'RNA regolari e convalidati, saltare i passaggi 1-4 e iniziare con il passaggio 5.

8.1.1. Istruzioni

Consigliato per l'uso solo con tamponi OP o NP in mezzo di trasporto virale (VTM) dei seguenti produttori: Clinichem, Copan, Puritan, CDC VTM, mwe Medical Wire.

Il campione in VTM può essere conservato fino a 48 ore a 4°C.

1. Ottenere il materiale OP/NP da tampone in VTM.
2. Trasferire 100-200µL di materiale OP/NP VTM da tampone in provette senza DNasi/RNasi compatibili.
3. Riscaldare il campione per 5 minuti a 95 °C.
4. Dopo l'incubazione, vortexare il campione riscaldato a ~ 1500 x rpm per 30 secondi per raccogliere il materiale sul fondo della provetta. Conservare in ghiaccio fino al momento del bisogno. Il campione è ora pronto per essere aggiunto alla reazione RT-qPCR (vedere i passaggi seguenti).
5. Scongela completamente la CoVi primer/sonda mix 3 (provetta/tappo marrone) mettendola su ghiaccio per ~ 30 minuti. Una volta scongelata, centrifugare brevemente per raccogliere sul fondo della provetta, quindi aggiungere **384 µL** di acqua priva di nucleasi alla provetta. Contrassegnare la provetta alla quale si è aggiunta l'acqua.
6. Agitare la provetta con il vortex alla massima velocità per 10 secondi per miscelare, quindi centrifugare brevemente per raccogliere sul fondo della provetta.
7. Procedere all'allestimento della master mix come mostrato di seguito in una camera bianca o in un'area designata.

Allestimento reazione per un volume di reazione pari a 20 μ L :

Componenti	Volume/ reazione (μ L)	Volume/100 reazioni (μ L)	Concentrazione finale
2x InhibiTaq Multiplex qPCR MasterMix	10	1000	1x
RTScript Reverse Transcriptase, 200U/ μ L	0.5	50	5U/ μ L
Diluted Primer/Probe Mix (step #5)	4.5	450	1x

8. Mescolare la master mix pipettando ripetutamente su e giù con la pipetta impostata al doppio del volume della master mix da aggiungere o, tappando la provetta, agitando brevemente su vortex e centrifugando brevemente per raccogliere la miscela.
9. Distribuire **15 μ L** della master mix utilizzando una pipetta appropriata in tutti i pozzetti della piastra che verrà utilizzata.
10. Aggiungere **5 μ L** di campioni, controllo positivo o controllo negativo nei pozzetti appropriati.
11. Sigillare la piastra, agitare brevemente o picchiettare per mescolare; centrifugare per raccogliere i campioni miscelati.
12. Posizionare la piastra nello strumento real-time designato e eseguire il seguente programma.

Cicli raccomandati:

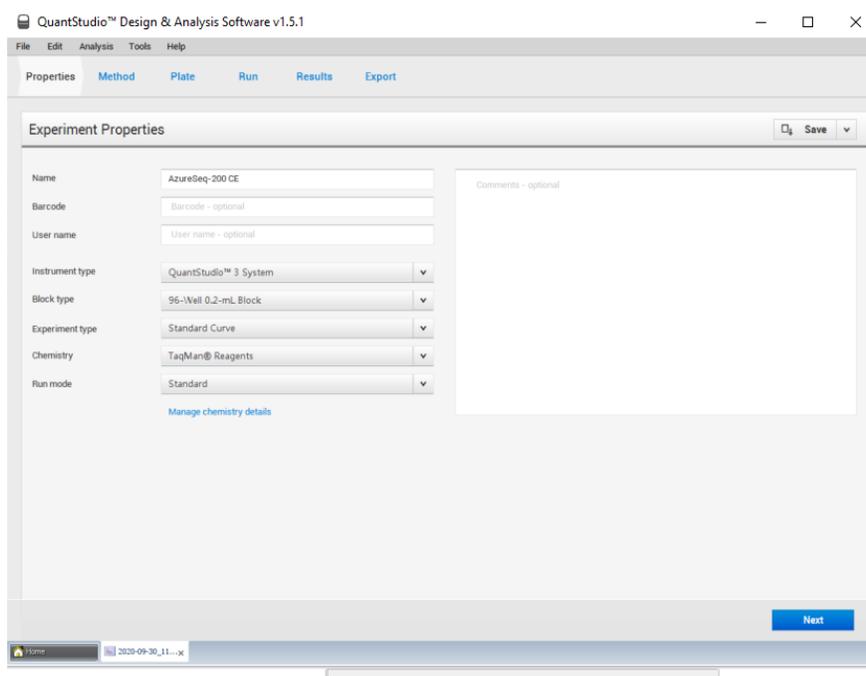
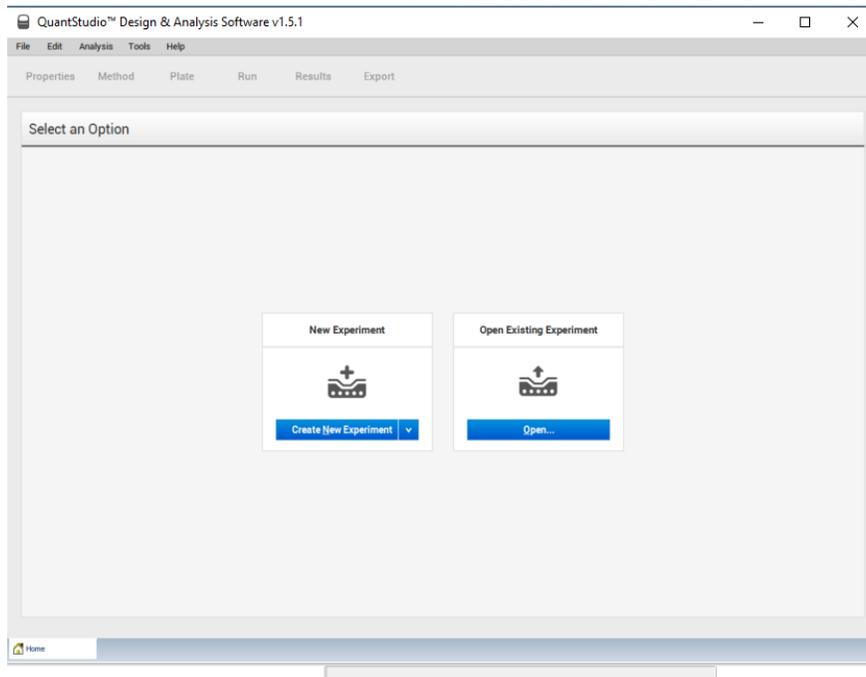
Sequenza dei cicli	Fase	Numero di cicli	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tempo
Incubazione RT	1	1	50	15 minuti
Attivazione enzimatica	2	1	95	2 minuti
Amplificazione	3	45	95	3 secondi
			60**	30 secondi

** Rilevare la fluorescenza durante la fase di annealing/estensione (60 $^{\circ}$ C) sui canali FAM, HEX e ROX (o canali equivalenti).

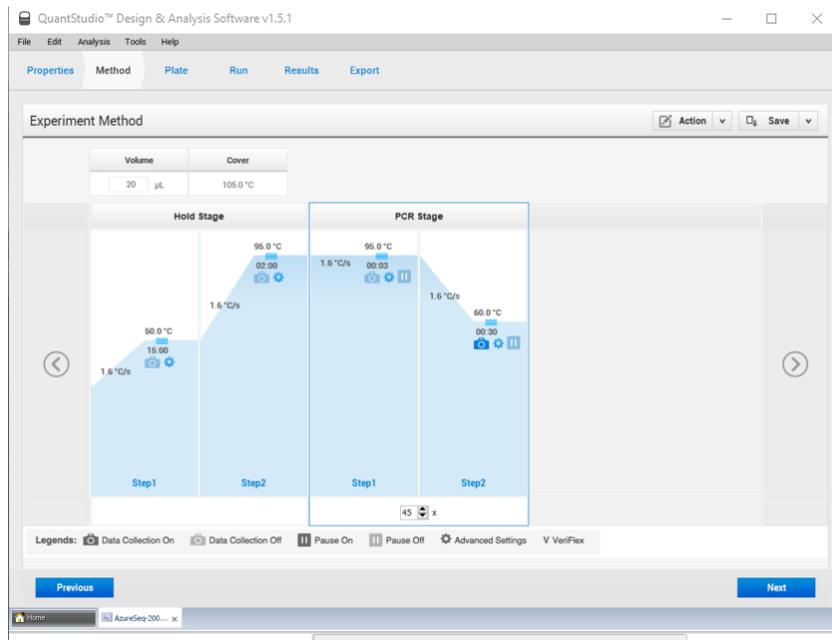
8.2 Allestimento qPCR

8.2.1 QuantStudio 3, 5, 7 Pro

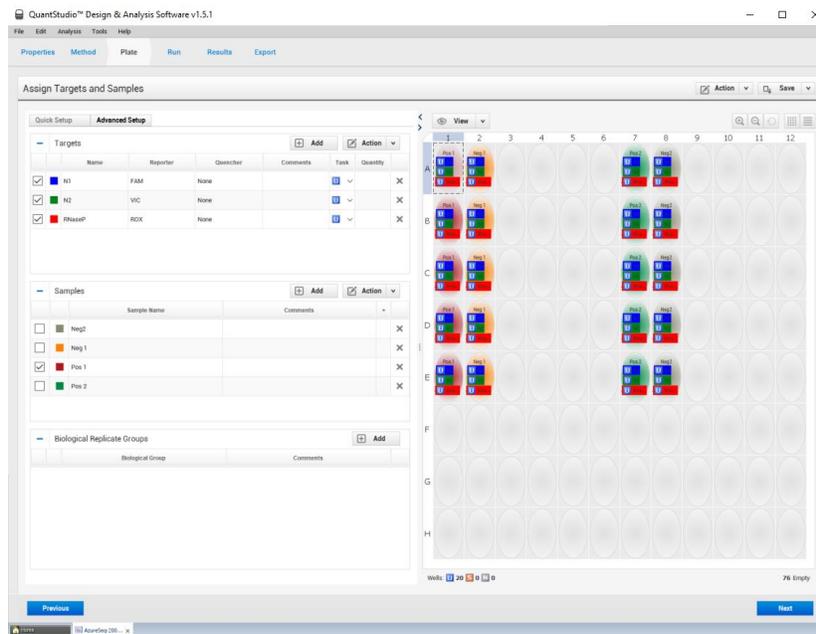
1 – Creare un nuovo test e allestire le Properties (Instrument Type, Block Type, Experiment Type, Chemistry, Run mode) come da immagine seguente.



2 – Impostare la metodica in base al programma PCR che appare qui sotto.



3 – Impostare target e campioni sul Plate tab e assegnare i canali.



4 – Esportare il protocollo su una chiave USB.

5 – Caricare il test dalla chiave USB sullo strumento qPCR, inserire la piastra e avviare la corsa.

8.2.2 Roche LightCycler 480 System

Per ulteriori informazioni in merito all'utilizzo dello strumento LightCycler 480 fare riferimento al relativo Manuale per l'ins.

- Creare un 'Detection Format' per impostare target (N1, N2, RNaseP) e canali (FAM, HEX, ROX – o equivalente).
- Riavviare il software per accedere al Detection Format appena creato.
- Selezionare il colore della piastra e creare un nuovo test.
- Selezionare il nuovo Detection Format dal menu a tendina.
- Impostare la dimensione del blocco a 96 e il volume di reazione a 20 µL.
- Impostare il programma PCR illustrato nella sezione 8.1.1.
- Impostare la Modalità di analisi su 'None' per l'incubazione RT e l'attivatore di enzima e 'Quantification' per lo step di amplificazione.
- Impostare la rampa su 4.4 per le fasi 1, 2 e il primo step della fase 3 e su 2.2 per il secondo step della fase 3.
- Caricare la piastra e avviare la corsa.

8.2.3 BioRAD CFX96 Touch

Per ulteriori informazioni in merito all'utilizzo dello strumento CFX96™ Touch fare riferimento al relativo Manuale per l'Operatore

- Avviare il software CFX Manager sul computer collegato a CFX96.
- Creare un Nuovo Protocollo selezionando la tipologia di corsa in 'User-defined'.
- Fare click su 'Edit Selected' sul tab 'Protocol' per modificare il protocollo. Impostare i parametri del programma PCR illustrato nella sezione 8.1.1.
- Fare click su 'Edit Selected' sul tab 'Plate' per impostare la piastra.
- Fare click su 'Select Fluorophores', selezionare la cyberbox dei fluorofori (FAM, HEX, ROX – o equivalente).
- Specificare il pozzetto del controllo positivo, impostare il tipo di campione come "Positive Control" e la rilevazione della fluorescenza (target N1 - target FAM, N2 - HEX, Rnase P - ROX).
- Specificare il pozzetto del controllo negativo, impostare il tipo di campione come "Negative Control" e la rilevazione della fluorescenza (target N1 - target FAM, N2 - HEX, Rnase P - ROX).
- I pozzetti con i campioni clinici devono essere impostati come Unknown, impostare la rilevazione della fluorescenza (target N1 - target FAM, N2 - HEX, Rnase P - ROX).
- Nel menu Setting impostare il tipo di piastra come BR bianca.
- Andare a Start Run, selezionare il nome del Blocco (strumento PCR) da utilizzare, chiudere il coperchio e avviare la corsa.

9. Interpretazione dei risultati

Tutti i controlli del test devono essere esaminati prima dell'interpretazione dei risultati del paziente. Se i controlli non sono validi, i risultati del paziente non possono essere interpretati. Rilevare la fluorescenza durante la fase di annealing/estensione (60°C) sui canali FAM, HEX e ROX (o canali equivalenti). I valori Ct <40 sono interpretati come positivi dall'utilizzatore degli strumenti BioRad CFX96, Roche Lightcycler 480 System and QuantStudio 3, 5, and 7 Pro.

SARS-CoV-2 N1 (FAM)	SARS-CoV-2 N2 (HEX)	RNase P (Texas Red)	Interpretazione del risultato	Azione
+	+	+/-	SARS-CoV-2 positivo	Riferire i risultati all'Operatore sanitario e alle agenzie di sanità pubblica appropriate.
Se solo uno dei due target è positivo		+/-	Non conclusivo	Ripetere il test.
-	-	+	SARS-CoV-2 Non rilevato	Riferire i risultati all'Operatore sanitario.
-	-	-	Non valido	Ripetere il test. Se ancora non valido, raccogliere un altro campione. Se un altro campione non è disponibile, segnalarlo al medico.

Utilizzare la tabella sopra come guida generale per l'interpretazione dei risultati.

Per riportare il risultato di un test su un paziente, tutti i controlli all'interno della stessa seduta devono essere validi e produrre i risultati attesi. Se uno o entrambi i controlli vengono considerati non validi o producono risultati non attesi, non deve essere riportato alcun risultato del paziente di quella seduta.

RNase P (Controllo estrazione)

Tutti i campioni clinici devono mostrare curve di crescita della fluorescenza nella reazione della RNasi P che superano il threshold entro 40.00 cicli (< 40,00 Ct), indicando così la presenza del gene RNasi P umano. Il mancato rilevamento della RNasi P in qualsiasi campione clinico può indicare:

- Non corretta estrazione di acido nucleico/non corretta estrazione a caldo di materiali con conseguente perdita di RNA e/o degradazione dell'RNA.
- Assenza di materiale cellulare umano sufficiente a causa della cattiva raccolta o della perdita di integrità del campione.
- Impostazione e esecuzione impropria della procedura.
- Malfunzionamento del reagente o della strumentazione.

Se il test RP non produce un risultato positivo per i campioni clinici umani, interpretare come segue:

- Se 2019-nCoV N1 e N2 sono positivi anche in assenza di RP positivo, il risultato è da considerarsi valido. È possibile che alcuni campioni non presentino curve di crescita dell'RNasi P a causa del basso numero di cellule nel campione clinico originale. Un segnale RP negativo non preclude la presenza dell'RNA del virus 2019-nCoV in un campione clinico.
- Se tutti i marker 2019-nCoV E RNasi P sono negativi per il campione, il risultato deve essere considerato non valido. Se è disponibile un campione residuo, ripetere la procedura di estrazione e ripetere il test. Se tutti i marker rimangono negativi dopo il nuovo test, segnalare i risultati come non validi e, se possibile, raccogliere un nuovo campione.

Marcatori 2019-nCoV (N1 e N2)

- Quando tutti i controlli mostrano le prestazioni attese, un campione è considerato negativo se il ciclo soglia delle curve di crescita 2019-nCoV (N1, N2) NON supera la linea della soglia entro 40,00 cicli (<40,00 Ct) E la curva di crescita dell'RNasi P SUPERA la linea di soglia entro 40,00 cicli (<40,00 Ct).
- Quando tutti i controlli mostrano le prestazioni attese, un campione è considerato positivo per 2019-nCoV se il ciclo soglia delle curve di crescita 2019-nCoV (N1, N2) supera la linea della soglia entro 40,00 cicli (<40,00 Ct). L'RNase P può o non può essere positivo come descritto sopra, ma il risultato 2019-nCoV è ancora valido.
- Quando tutti i controlli mostrano le prestazioni attese e le curve di crescita per i marker 2019-nCoV (N1, N2) E il marker RNase P NON superano il ciclo soglia della curva di crescita entro 40,00 cicli (<40,00 Ct), il risultato non è valido. L'RNA estratto (ottenuto con metodo diretto o con isolamento regolare) dal campione deve essere nuovamente testato. In assenza di altro RNA, estrarlo nuovamente dal campione residuo e ripetere il test. Se il campione nuovamente testato è negativo per tutti i marker e RNasi P, il risultato non è valido e si deve prendere in considerazione la raccolta di un nuovo campione dal paziente.
- Quando tutti i controlli mostrano le prestazioni previste e il ciclo soglia della curva di crescita per un qualsiasi marker (N1 o N2, ma non entrambi i marker) supera la linea della soglia entro 40,00 cicli (<40,00 Ct) il risultato non è conclusivo. L'RNA estratto dovrebbe essere ritestato. In assenza di altro RNA, estrarlo nuovamente dal campione residuo e ripetere il test.

10. Limiti della procedura

- Gli operatori devono essere addestrati per questa tecnologia prima dell'uso di questo dispositivo.
- Tutti i risultati diagnostici generati devono essere interpretati insieme ad altri risultati clinici o di laboratorio.
- È responsabilità dell'Operatore convalidare le prestazioni del sistema per qualsiasi procedura utilizzata nel proprio laboratorio che non sia compresa negli studi sulle prestazioni di Omixon Biocomputing Ltd.
- Utilizzare questo prodotto solo con i seguenti campioni biologici umani: tamponi nasofaringei (NP) e tamponi orofaringei (OP).
- L'efficienza dell'approccio diretto (senza estrazione di RNA; trattamento termico) dipende fortemente dal mezzo VTM utilizzato durante il processo di raccolta del campione. Si consiglia vivamente di utilizzare VTM dei seguenti produttori: Clinichem, Copan, Puritan, CDC VTM. Il VTM di altri produttori deve essere convalidato dal laboratorio dell'utilizzatore finale.
- Un risultato negativo non esclude la possibilità di infezione, poiché i risultati dipendono dalla raccolta appropriata dei campioni e dall'assenza di inibitori. La presenza di inibitori della PCR può causare risultati non validi o inconcludenti che richiedono la ripetizione.
- Possono verificarsi risultati falsi positivi a causa di diversi motivi, la maggior parte dei quali si riferiscono alla contaminazione da RNA durante la manipolazione e la preparazione dei campioni.

11. Risoluzione dei problemi

Problema	Possibile origine della causa	Suggerimento
L'intensità della fluorescenza è debole o non appare nel controllo positivo	Degradazione della sonda	Utilizzare una nuova aliquota della sonda o ripetere il test con un kit di un nuovo lotto
Elevata incoerenza nei segnali di fluorescenza nei campioni	Pipettaggio non accurato	Utilizzare pipette calibrate, assicurarsi di aggiungere un volume uguale di reagenti a ciascun pozzetto / provetta
Il segnale fluorescente viene rilevato nella reazione del controllo negativo	Contaminazione da Carry Over	Cambiare sempre i puntali tra i campioni. Fare attenzione quando si dispensano campioni, controlli negativi e controlli positivi
	Contaminazione della master mix per l'amplificazione	Utilizzare una nuova aliquota della miscela di amplificazione
	Contaminazione dell'area di estrazione /preparazione	Utilizzare un disinfettante per pulire e disinfettare le aree
Nessun segnale fluorescente viene rilevato in tutti i campioni, compreso il controllo positivo	Degradazione della sonda	Utilizzare una nuova aliquota della sonda
	Errore nel settaggio del Thermal Cycler	Verificare la corretta impostazione del programma dello strumento Real Time PCR
	Master mix preparata in modo errato, possibile componente omesso	Verificare ogni componente e ripetere la preparazione della PCR master mix
Risultati falsi negativi	Presenza di inibitori della RT-PCR	Convalidare il kit di estrazione dell'RNA prima dell'uso. Utilizzare VTM dei produttori consigliati elencati in questa IFU
	Non corretta raccolta dei campioni	Seguire il metodo validato per la raccolta campioni
	Mancata osservanza delle istruzioni per l'uso	Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di processare i campioni. La non attinenza alle procedure qui descritte può influire sulle prestazioni ottimali.
	Uso di reagenti non autorizzati	Non sostituire o miscelare i reagenti del kit AzureSeq con reagenti di altri produttori.
Risultati falsi positivi	Cross contaminazioni tra campioni	Prestare particolare attenzione quando si maneggiano i campioni dei pazienti, utilizzare processi di tracciabilità semplici e convalidati
	Scambio di campioni	

12. Controllo Qualità

Si consiglia di validare l'intera procedura di analisi (diretta o includendo un'estrazione di RNA separata) e la sessione di amplificazione elaborando un campione testato negativo e un campione testato positivo (o un materiale di riferimento calibrato).

13. Caratteristiche delle performance

13.1. Sensibilità analitica – Studi sul limite di rilevamento (LoD)

Lo studio LoD ha stabilito la concentrazione più bassa di SARS-CoV-2 (copie genomiche equivalenti (cp)/reazione) che può essere rilevata dai dosaggi N1 e N2 almeno il 95% delle volte utilizzando i reagenti AzureSeq - 200 CE. Gli studi LoD sono stati eseguiti su diversi strumenti PCR Real Time.

13.1.1. BioRad CFX96 Touch

È stato determinato che il LoD per i reagenti AzureSeq - 200 CE per RNA genomico sul sistema di rilevamento in Real Time BioRad CFX96 Touch è di 5 copie per reazioni da 20 µL (o 0,25 copie/µL) per N1 e 10 copie per reazioni da 20 µL (o 0,5 copie/µL) per N2. L'RNA genomico è stato aggiunto direttamente nelle reazioni PCR e quindi analizzato sul sistema di rilevamento in Real Time BioRad CFX96 Touch Real-Time.

<i>RNA genomico con BioRAD CFX96 Touch Real-Time Detection System</i>						
Targets	N1			N2		
RNA Conc. (copie/µL)	0.05 (.2x)	0.25 (1x)	0.5 (2x)	0.05 (.1x)	0.5 (1x)	1 (2x)
Positivo/Totale	10/20	20/20	20/20	1/20	20/20	20/20
Medie Ct (solo positivi)	N/A	37.05	36.25	N/A	37.01	35.91
Deviazione Standard Ct	N/A	0.68	0.55	N/A	0.5	0.33

13.1.2. Applied Biosystems QuantStudio 3/5/7 Pro Real-time PCR System

È stato determinato che il LoD per i reagenti AzureSeq - 200 CE per l'RNA genomico su Applied Biosystems QuantStudio 3 Real Time PCR System è di 10 copie per reazione da 20 µL (o 0,5 copie/µL) per entrambi i target N1 e N2. L'RNA genomico è stato aggiunto direttamente alle reazioni PCR e quindi analizzato sul sistema QuantStudio Real-Time PCR.

E' stato condotto uno studio di concordanza confrontando gli strumenti QuantStudio 3, 5 e 7 Pro utilizzando 20 campioni clinici, precedentemente identificati come positivi (n=11) e negativi (n=9) per SARS-CoV-2. Le Cts medie sono state calcolate per N1, N2 e RNaseP per ciascuno strumento con i campioni positivi mentre le Ct medie per RNaseP sono state calcolate per tutti i campioni negativi. Questi dati dimostrano che non vi sono differenze attese nei risultati clinici tra queste piattaforme.

<i>RNA genomico con ThermoFisher QuantStudio 3 Real-Time PCR System</i>								
Targets	N1				N2			
RNA Conc. (copies/ μ L)	0.25	0.5	1	2	0.25	0.5	1	2
Positivi/Totale	16/20	20/20	20/20	20/20	15/20	19/20	20/20	20/20
Medie Ct (solo positivi)	32.04	31.12	30.45	29.04	38.67	37.02	36.47	34.35
Deviazione Standard Ct	7.89	3.58	4.10	4.09	2.57	4.78	2.61	3.14

13.1.3. Roche LightCycler® 480 System

È stato determinato che il LoD per i reagenti AzureSeq - 200 CE per l'RNA genomico su Roche LightCycler® 480 real-time PCR System è di 10 copie per reazioni da 20- μ L (o 0.5 copie/ μ L) per entrambi i target N1 e N2. L'RNA genomico è stato aggiunto direttamente alle reazioni PCR e quindi analizzato sul sistema Roche LightCycler® 480 System.

<i>RNA genomico con Roche LightCycler® 480 System</i>						
Targets	N1			N2		
RNA Conc. (copies/ μ L)	0,5	1	2	0,5	1	2
Positivi/Totale	22/23	23/23	23/23	23/23	23/23	23/23
Medie Ct (solo positivi)	37,63	36,76	35,78	36,37	35,55	34,61
Deviazione Standard Ct	0,9062	0,5680	0,1956	1,795	0,4712	0,4441

13.2. Specificità analitica – Test di inclusività

Il sistema AzureSeq utilizza il set di primer/sonda per i marcatori SARS-CoV-2 N1 e N2 progettati dal CDC che ha condotto l'analisi in-silico su sequenze note di SARS-CoV-2. I dati di questa analisi sono disponibili nel pannello diagnostico FDA EUA EUA200001 "CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostics Panel.

Risultati analisi in-silico delle sequenze di primer e sonda:

Per dimostrare l'inclusività prevista per il pannello diagnostico RT-PCR Real Time CDC 2019-nCoV, il primer oligonucleotidico e le sequenze della sonda del pannello diagnostico RT-PCR Real Time CDC 2019-nCoV sono state valutate rispetto a 31.623 sequenze disponibili nel database Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID, <https://www.gisaid.org>) al 20 giugno 2020.

Di seguito sono mostrate le discrepanze dei nucleotidi nelle regioni primer/sonda con frequenze >0,1%. Con l'eccezione di una mancata corrispondenza nucleotidica con frequenza > 1% (2,00%) alla terza posizione della sonda N1, la frequenza di tutte le discrepanze era <1%, indicando che la prevalenza delle discrepanze era sporadica. Solo una sequenza (0,0032%) presentava due discrepanze nucleotidiche nella sonda N1 e un'altra sequenza da un diverso isolato (0,0032%) presentava due discrepanze nucleotidiche nel primer reverse N1. Non è stato riscontrato che le sequenze presentassero più di una mancata corrispondenza in qualsiasi regione di primer/sonda N2. Il rischio che queste discrepanze determinino una significativa perdita di reattività causando un risultato falso negativo è estremamente basso a causa del design dei primer e delle sonde, con temperature di melting >60°C e con temperatura di annealing a 55°C che possono tollerare fino a due mancate corrispondenze.

Analisi di inclusività in-silico del pannello diagnostico CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR rispetto a 31,623 sequenze di genoma disponibili presso GISAID al 20 Giugno 2020

Primer/Sonda	Sonda N1	N1 reverse		Sonda N2
Sede (5'>3')	3	15	21	13
Discrepanza Nucleotidica	C>T	G>T	T>C	C>T
N. discrepanze	632	34	71	46
Frequenza discrepanze (%)	2.00	0.11	0.22	0.15

13.3. Specificità analitica – Cross reattività

AzureSeq sta utilizzando il set di primer/sonda per i marker SARS-CoV-2 N1 e N2 progettati dal CDC che ha condotto il test di cross reattività in-silico. Il CDC ha anche condotto un wet test per la cross reattività utilizzando l'Elenco di Organismi Raccomandato dalla FDA. I dati di queste analisi sono disponibili nel FDA EUA EUA200001 "CDC 2019-Novel Coronavirus (2019- nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostics Panel"

Risultato – test specificità/esclusività: analisi in silico

Le query di analisi BLASTn dei primer e delle sonde dei test rRT-PCR 2019-nCoV sono state eseguite su sequenze nucleotidiche di dominio pubblico. I parametri di ricerca nel database erano i seguenti:

- 1) La raccolta di nucleotidi è costituita da sequenze GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + RefSeq, ma esclude EST, STS, GSS, WGS, TSA, sequenze brevettate nonché sequenze HTGS di fase 0, 1 e 2 e sequenze più lunghe di 100 Mb; 2) Il database non è ridondante. Le sequenze identiche sono state unite in un'unica voce, preservando le informazioni su accesso, IG, titolo e tassonomia per ciascuna

voce; 3) Il Database è stato aggiornato il 10/03/2019; 4) I parametri di ricerca si aggiustano automaticamente per brevi sequenze di input e la soglia prevista è 1000; 5) I punteggi di corrispondenza e discrepanza sono rispettivamente 1 e -3; 6) La penalty per creare e estendere un gap in un allineamento è rispettivamente di 5 e 2.

2019-nCoV_N1 Assay:

La sequenza della sonda del test rRT-PCR 2019-nCoV N1 ha mostrato un'omologia di sequenza elevata con il genoma del coronavirus SARS e del Bat-SARS. Tuttavia, i primer forward e reverse non hanno mostrato omologia di sequenza con il genoma del coronavirus della SARS e del Bat-SARS. Combinando primer e sonda, non ci sono omologie significative con il genoma umano, altri coronavirus o microflora umana che potrebbero prevedere potenziali risultati falsi positivi della rRT-PCR.

2019-nCoV_N2 Assay:

La sequenza dei primer diretti del test rRT-PCR 2019-nCoV N2 ha mostrato un'elevata omologia di sequenza con i coronavirus Bat-SARS. Le sequenze del primer reverse e della sonda non hanno mostrato alcuna omologia significativa con il genoma umano, altri coronavirus o la microflora umana. Combinando primer e sonda, non è possibile prevedere potenziali risultati falsi positivi della rRT-PCR.

In sintesi, il test 2019-nCoV rRT-PCR N1 e N2, progettato per il rilevamento specifico del 2019-nCoV, non ha mostrato omologie combinate significative con il genoma umano, altri coronavirus o microflora umana che potrebbero prevedere potenziali risultati falsi positivi della rRT-PCR.

Oltre all'analisi in-silico, sono stati estratti e testati diversi organismi con il pannello diagnostico RT-PCR Real Time CDC 2019-nCoV per dimostrare specificità ed esclusività analitiche. Gli studi sono stati eseguiti con acidi nucleici estratti utilizzando lo strumento QIAGEN EZ1 Advanced XL e il kit EZ1 DSP Virus. Gli acidi nucleici sono stati estratti da preparazioni ad alto titolo (tipicamente ≥ 105 PFU / mL o ≥ 106 CFU/mL). Il test è stato eseguito utilizzando la master Mix ThermoFisher Scientific TaqPath™ 1-step RT-qPCR, CG sullo strumento Applied Biosystems™ 7500 Fast Dx Real-Time PCR. I dati dimostrano che con il pannello diagnostico RT-PCR Real Time CDC 2019-nCoV si ottengono per ciascun organismo i risultati attesi.

Specificità/Esclusività del Pannello diagnostico CDC 2019-nCoV Real-Time RT-PCR

Virus	Ceppo	Origine	2019-nCoV N1	2019-nCoV N1	Risultati
Human coronavirus	229E	Isolato	0/3	0/3	Negativo
Human coronavirus	OC43	Isolatp	0/3	0/3	Negativo
Human coronavirus	NL63	Campioni clinici	0/3	0/3	Negativo
Human coronavirus	HKU1	Campioni clinici	0/3	0/3	Negativo
MERS-coronavirus	-	Isolato	0/3	0/3	Negativo
SARS- coronavirus	-	Isolatp	0/3	0/3	Negativo
bocavirus	-	Campioni clinici	0/3	0/3	Negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-	Isolato	0/3	0/3	Negativo
<i>Streptococcus</i>	-	Isolato	0/3	0/3	Negativo
Influenza A (H1N1)	-	Isolato	0/3	0/3	Negativo
Influenza A (H3N2)	-	Isolato	0/3	0/3	Negativo
Influenza B	-	Isolato	0/3	0/3	Negativo
Human adenovirus (1-es típus)	Ad71	Isolato	0/3	0/3	Negativo
Human metapneumovirus	-	Isolato	0/3	0/3	Negativo
Respiratory Syncytial Virus	Long A	Isolato	0/3	0/3	Negativo
Rhinovirus	-	Isolato	0/3	0/3	Negativo
Parainfluenza 1	C35	Isolato	0/3	0/3	Negativo
Parainfluenza 2	Greer	Isolato	0/3	0/3	Negativo
Parainfluenza 3	C-43	Isolato	0/3	0/3	Negativo
Parainfluenza 4	M-25	Isolato	0/3	0/3	Negativo

13.4. Studi di interferenza microbica

Non sono richiesti studi sull'interferenza microbica, poiché l'analisi in-silico condotta dal CDC (FDA EUA EUA200001 "CDC 2019-Novel Coronavirus (2019- nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostics Panel") non ha soddisfatto i criteri che richiederebbero di condurre studi sulle interferenze.

13.5. Test di robustezza

L'equivalenza del test è stata confrontata con diverse Master Mix di enzimi.

Cinquanta (50) copie di RNA genomico vengono addizionate in reazioni da 20 µL sul sistema di rilevamento in Real Time BioRad CFX96 Touch. 12 campioni positivi vengono testati con ciascuna Master Mix.

Le Master Mix Enzimatiche testate sono:

- Thermo Fisher TaqPath 1-Step RT-qPCR System
- Promega GoTaq Probe-1 Step RT-qPCR System
- AzureSeq-200 CE

Confronto reagenti: RNA Genomico aggiunte alle reazioni PCR su strumento BioRad						
Targets	N1			N2		
Master Mix	AzureSeq-200 CE	Thermo Fisher TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	Promega GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System	AzureSeq-200 CE	Thermo Fisher TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	Promega GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System
Positivi/Totale	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
Medie Ct	34.78	33.12	33.97	35.89	35.38	35.87
Deviazione Standard Ct	0.31	0.24	0.20	0.27	0.25	0.16

13.6. Ripetibilità e Riproducibilità

I campioni positivi e negativi sono stati generati aggiungendo il controllo negativo e positivo nelle reazioni PCR in base alle Istruzioni per l'Uso. 5 replicati dei campioni positivi e negativi sono stati processati su QuantStudio 3 real time PCR instrument di Applied Biosystems da due Operatori per testare la ripetibilità e la riproducibilità delle corse e la variabilità da Operatore a Operatore.

	Risultati Operatore 1				Risultati Operatore 2				Concordanza Operatori (%)
	N1	N2	RNase P	Concordanza replicati (%)	N1	N2	RNase P	Concordanza replicati (%)	
Campioni positivi	5/5	5/5	5/5	100	5/5	5/5	5/5	100	100
Campioni negativi	5/5	5/5	5/5	100	5/5	5/5	5/5	100	100

13.7. Performance clinica

I campioni clinici di tampone orofaringeo (OP) precedentemente determinati dal sistema BioRad CFX96 come positivi (11 campioni) o negativi (6 campioni) per SARS-CoV-2 sono stati estratti sul sistema KingFisher Flex. Cinque (5) microlitri del campione eluito sono stati aggiunti ai reagenti AzureSeq e amplificati e rilevati sul sistema BioRad CFX96. Tutti i campioni positivi e negativi hanno mostrato una concordanza del 100% con la caratterizzazione originale tramite comparatore.

I campioni clinici nasofaringei (NP) (30 positivi e 30 negativi) sono stati raccolti in VTM prodotto da Clinichem Ltd. (Ungheria) e elaborati utilizzando l'estrazione diretta dell'RNA mediante il flusso di lavoro di trattamento termico come da protocollo. Cinque (5) microlitri dei campioni trattati termicamente sono stati aggiunti ai reagenti AzureSeq e amplificati e rilevati sul sistema Roche LightCycler® 480. Tutti i campioni positivi e negativi hanno mostrato una concordanza del 100% con la caratterizzazione originale tramite comparatore.

Piattaforma	Tipologia campione	Protocollo	Risultati con AzureSeq-200 CE		Risultati con comparatore		Concordanza (%)
			Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
BioRAD CFX96	Campioni clinici orofaringei (OP)	Con isolamento RNA	11	6	11	6	100
Roche LightCycler® 480	Campioni Clinici nasofaringei (NP)	Senza isolamento RNA	30	30	30	30	100

14. Referenze

- 8/2003. (III.13.) ESzCsM rendelet az in-vitro diagnosztikai orvostechnikai eszközökről
- AzureSeq Validation Kit Functional Assay 96 well plate 20ul
- COMMUNICATION FROM THE COMMISSION Guidelines on COVID-19 in vitro diagnostic tests and their performance, Brussels, 15.4.2020 C(2020) 2391 final
- DIRECTIVE 98/79/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical devices Working document of Commission services - Current performance of COVID-19 test methods and devices and proposed performance criteria 16 April 2020 (working document)
- ISO 13485:2016 - Medical devices - Quality management systems
- ISO 14971:2019 Medical devices — Application of risk management to medical devices
- Regulation (EC) No. 1907/2006 and Regulation (EC) No. 1272/2008
- BS EN ISO 23640:2015 In vitro diagnostic medical devices. Evaluation of stability of in vitro diagnostic reagents
- BS EN ISO 18113-1:2011 In vitro diagnostic medical devices. Information supplied by the manufacturer (labelling). Terms, definitions, and general requirements
- BS EN ISO 18113-2:2011 In vitro diagnostic medical Devices. Information supplied by the manufacturer (labelling). In vitro diagnostic reagents for professional use
- ISO 15223-1:2016 Medical devices — Symbols to be used with medical device labels, labelling and information to be supplied — Part 1: General requirements
- BS EN 13612:2002 Performance evaluation of in vitro diagnostic medical devices
- CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel, CDC-006-00019, Revision: 05, Effective: 07/13/2020
- ISO 20916:2019 In vitro diagnostic medical devices — Clinical performance studies using specimens from human subjects — Good study practice

15. Simboli utilizzati sulle etichette

	Numero di lotto
	Codice prodotto
	Consultare le Istruzioni per l'Uso
	Contenuto sufficiente per <n> test
	Fabbricante legale. La data che appare accanto a questo simbolo si riferisce alla data di produzione
	Temperatura di conservazione raccomandata
	Data di scadenza
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Conformità europea

16. Contatti

Per assistenza generale su questo protocollo:

Email azureseq.support@omixon.com

Telefono +36-70-672-7551

Informazioni sul Fabbricante

Nome società: Omixon Biocomputing Ltd

Indirizzo: Fehérvári út 50-52/6

Città: Budapest

Codice postale: H-1117

Paese: Ungheria

Distributore esclusivo per l'Italia:

Dia4it Srl - Via Alfieri, 24 - 20854 Vedano al Lambro (MB)

Tel. +39 (0)39 2324505

www.dia4it.it

info@dia4it.it –