



Via Sant'Anna 131-135
61030 Cartoceto PU (IT)
Telephone +39 (0)721 830605
FAX +39 (0)721837154
e-mail: info@diatheva.com
www.diatheva.com



COVID-FLU-RSV All-in-One RT PCR

Versione: **Gennaio 2023**



D-MBK0097



1. USO PREVISTO

COVID-FLU-RSV All-in-One RT PCR è un test multiplex real-time RT-PCR one-step per la rilevazione qualitativa dell'RNA dei virus Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), virus influenzali A/B (FluA/B), e del Virus respiratorio sinciziale A/B (RSV A/B) da campioni di tamponi naso-faringei e salivari. Questo test può essere impiegato nella diagnosi differenziale delle infezioni da SARS-CoV-2, virus influenzali A/B, e virus respiratorio sinciziale in combinazione ad altri dati clinici ed epidemiologici del paziente.

I risultati positivi sono indicativi della presenza di RNA dei virus SARS-CoV-2, Flu ed RSV. Risultati positivi non escludono co-infezioni causate dalla presenza di altri virus o batteri.

Risultati negativi non escludono infezioni causate da SARS-CoV-2, Flu, ed RSV e non possono essere utilizzati come unica base per la gestione clinica del paziente. I risultati negativi devono essere associati alle osservazioni cliniche, alla storia del paziente e alle osservazioni epidemiologiche.

L'utilizzo del prodotto è riservato a personale adeguatamente formato per l'utilizzo della Real-time PCR e delle procedure per la diagnostica in vitro.

2. INTRODUZIONE

A livello internazionale è fortemente raccomandato l'utilizzo di test che consentono la diagnosi differenziale di influenza e COVID-19, questo soprattutto con l'arrivo della stagione influenzale [ESWI, Conclusions of ESWI's andrecommendations, 2020; CDC, <https://www.cdc.gov/flu/symptoms/testing.htm>].

Data la somiglianza in termini di sintomi tra influenza stagionale e COVID-19, la possibilità di utilizzare saggi di tipo multiplex è fondamentale al fine di attuare un controllo efficace della malattia, nonché il trattamento clinico.

3. PRINCIPIO DEL SAGGIO

COVID-FLU-RSV All-in-One RT PCR è un sistema di RT-PCR che consente l'amplificazione e la differenziazione dell'RNA del virus SARS-CoV-2, dei virus influenzali A/B e del virus respiratorio sinciziale A/B in un'unica reazione.

A partire dall'RNA estratto, si effettua un'unica reazione di trascrizione inversa ed amplificazione specifica per SARS-CoV-2, FluA/B, RSV e del target **RNase P** come controllo endogeno per monitorare l'adeguatezza del campione, il processo di estrazione dell'RNA e la presenza di inibitori di PCR. Le regioni target e i fluorofori utilizzati per ogni specifico patogeno sono riportate in Tabella 1:

Tabella 1: Patogeno, Regione target e rispettivo fluoroforo

Patogeno	Regione Target	Fluoroforo
SARS-CoV-2	Gene ORF1b, N	FAM
Flu A/B	Gene M1/NS2	Cal Fluor Orange 560
RSV A/B	Gene M	Cal Fluor Red 610
-	RNase P*	Quasar 670

*Controllo endogeno

4. CONTENUTO DEL KIT

Il kit fornisce tutti i reagenti necessari per l'analisi, inclusi il controllo negativo e il controllo positivo di PCR (Tabella 2).

Tabella 2: Contenuto del kit

Reagente	No vial x Volume	Colore del tappo
Mix 1	1 X 550 µL	Verde
Mix 2	1 X 70 µL	Arancione
Mix Primer/Probe	1 X 1040 µL	Blu
PCR Negative Control	1 X 100 µL	Trasparente
PCR Positive Control	1 X 50 µL	Rosso

5. MATERIALE RICHIESTO NON FORNITO NEL KIT

- Guanti monouso
- Kit per l'isolamento dell'RNA
- Pipette
- Puntali sterili con filtro
- Vortex
- Microcentrifuga da banco
- Strumento di real-time PCR
- Plasteria compatibile per lo strumento di real-time PCR. Piastre white, clear e strip chiuse con foglietti ottici adesivi e tappi ottici.
- Tubi sterili da 1.5 mL
- Congelatori da laboratorio

Il kit è stato validato e può essere utilizzato con i seguenti sistemi di estrazione e termociclatori:

Sistemi di estrazione validati

- QIAamp MinElute Virus spin kit (Qiagen)
- QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen)
- High Pure Viral RNA/DNA Kit (Magen)
- Invisorb® Spin Virus RNA Mini Kit (Strattec)
- Total RNA Purification kit (Norgen)
- MGISP-960 platform using the Virus DNA/RNA Extraction kit (MGI)
- KingFisher™ Flex Purification System using MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit (ThermoFisher)
- Nextractor NX48-S platform using the NX48S VIRAL NA EXTRACTION KIT (Genolution)

Per l'utilizzo con altri metodi di estrazione e/o strumenti di Real-Time PCR contattare Diatheva.

Thermalcyclers

- CFX96 Biorad
- ABI7500 Applied Biosystems
- Rotor gene Q 5-plex Biorad
- Quant Studio 5 Applied Biosystems

6. LIMITAZIONI DEL SAGGIO

- I campioni devono essere raccolti, trasportati e conservati utilizzando appropriate procedure e condizioni. La raccolta, il trasferimento, lo stoccaggio e il processamento non corretto dei campioni possono causare risultati errati.
- Il kit utilizza RNA purificato come campione da analizzare. La qualità dell'RNA estratto da campioni biologici è essenziale per la qualità dei risultati ottenuti con il kit.

Risultati falsi negativi possono derivare da:

- Errata raccolta del campione
- Degradazione dell'RNA virale durante il trasporto/stoccaggio
- Utilizzo di un metodo di estrazione non compatibile
- Presenza di inibitori di RT-PCR
- Eventuali polimorfismi nelle regioni target in cui ibridano le sequenze (primers e probes) potrebbero compromettere la rilevazione dei target
- Mancata osservanza delle istruzioni d'uso

Risultati falsi positivi possono derivare da:

- Contaminazioni durante la raccolta, la manipolazione o la preparazione del campione
- Contaminazioni durante la manipolazione del prodotto

7. CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

All'arrivo, conservare a -20° C. Se conservati alla temperatura consigliata, tutti i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza.

Le performance del kit non sono compromesse fino a 5 scongelamenti. Se i reagenti vengono utilizzati a intermittenza, si consiglia di conservarli in aliquote.

8. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Leggere attentamente tutte le Informazioni di Prodotto prima di usare il kit.

L'operatore deve sempre prestare attenzione a:

- Determinare le aree pre e post PCR. Non condividere strumenti o consumabili (pipette, puntali, tubi ecc) tra queste aree;
- Conservare separatamente il materiale positivo da tutti gli altri reagenti e, se possibile, aggiungerlo alla mix di reazione in un'area separata;
- Non usare nessun reagente dopo la data di scadenza indicata nell'etichetta;
- Indossare guanti sterili durante tutte le procedure;
- Scongellare tutti i componenti del kit e proteggerli dalla luce prima di iniziare il saggio. Dopo lo scongelamento, miscelare i componenti e centrifugare brevemente;
- Non sostituire o miscelare i reagenti di differenti lotti, al fine di mantenere buone performances;
- In ogni corsa includere 1 PCR Negative control e 1 PCR Positive Control;
- Minimizzare la manipolazione del campione;
- Cambiare frequentemente i guanti;
- Lavare le superfici del banco di lavoro con ipoclorito di sodio al 5%;
- Utilizzare materiali di laboratorio sterili e monouso e non riutilizzare i tubi e i puntali;
- Conservare i reagenti alla temperatura raccomandata;
- Smaltire i rifiuti in conformità con le normative locali;
- La qualità della preparazione del campione può influenzare la qualità del test di RT-PCR.

9. ISTRUZIONI PER L'USO

9.1. RACCOLTA DEL CAMPIONE

Per i metodi di raccolta, fare riferimento alle istruzioni del produttore dei dispositivi di raccolta dei campioni.

Per la raccolta dei campioni delle vie respiratorie superiori e inferiori si raccomanda l'uso di un sistema di raccolta sterile.

Per la raccolta del campione di saliva si consiglia l'uso di provette da centrifuga OMNIgen ORAL (DNAgenotec, codice OME-505), Salivette® (codice Sarsted 51.1534) o tubi sterili a bocca larga in polipropilene e fondo conico (es. Falcon® 50mL).

9.2. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni devono essere estratti secondo i requisiti e le procedure dei rispettivi kit di estrazione dell'RNA virale

[<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/laboratory-guidance>].

Il kit è stato testato su campioni di RNA estratti con i metodi indicati a pagina 2. Per estrazioni con metodi diversi da quelli riportati si prega di contattare Diatheva. I campioni di RNA estratti devono essere conservati a temperature inferiori o uguali a -70°C, evitando ripetuti cicli di congelamento e scongelamento.

9.3. SETUP STRUMENTO DI REAL TIME PCR

Prima di preparare la miscela di reazione, programmare lo strumento di real-time PCR con il seguente profilo termico:

Tabella 3: Impostazione profilo termico

Fase	Temperature e tempi	Cicli
Sintesi di cDNA	48°C 20 min	1 X
Denaturazione iniziale	95°C 2 min	1 X
Denaturazione	95°C 10 sec	42 X**
Annealing-estensione*	58°C 1 min	

*La fluorescenza dei diversi fluorofori è rilevata durante la fase di **annealing-estensione** nei canali specificati in Tabella 4

**utilizzare l'impostazione con 40 cicli con lo strumento Rotor gene Q 5-plex (Biorad)

Per il Rotor gene Q è richiesta la gain optimization nei canali di acquisizione: selezionare "Perform Optimisation Before 1 st Acquisition" inserendo in prima posizione l'NTC (PCR Negative Control)

Tabella 4: Impostazione canali di lettura della fluorescenza

Multiplex	Canali di lettura della fluorescenza			
	FAM (Green Channel)	VIC/ Cal Fluor Orange 560 (Yellow Channel)	ROX/ Cal Fluor Red 610 (Orange Channel)	Cy5/ Quasar 670 (Red Channel)
Target	SARS-CoV-2	Flu A/B	RSV A/B	RNaseP

- Il volume finale di reazione è **20 µL**
- **Per gli strumenti che lo prevedono in "Run mode" o alla richiesta "Which ramp speed do you want to use in the instrument run" selezionare "Standard",** esempi rispettivi per QS5 e ABI 7500
- **Per gli strumenti che lo prevedono, nella rispettiva casella "Quencher" di ogni target, selezionare "None",** es: ABI 7500, QS5
- **Per gli strumenti che lo prevedono, selezionare "None" alla voce "Select the dye to use as passive reference"** es. ABI 7500, QS5

9.4. ALLESTIMENTO DELLE REAZIONI

Tutti gli esperimenti devono includere un controllo negativo di PCR (NTC-No Template Control), contenente tutti i reagenti di reazione ad eccezione del template, e un controllo positivo di PCR, contenente tutti i reagenti di reazione e il PCR Positive Control. Entrambi i controlli sono necessari per verificare la validità della reazione di PCR in quanto il controllo negativo consente di determinare la presenza di potenziali contaminazioni mentre il controllo positivo consente di verificare la correttezza del set up di reazione/corsa. In fase di analisi sono inoltre fondamentali per il settaggio della threshold.

- Scongellare i componenti protetti dalla luce.
- Vortexare gentilmente la Mix 1 e la Mix Primer/Probe per 6 sec e centrifugare brevemente. Vortexare gentilmente la Mix 2 per 2 sec e centrifugare brevemente.
- In un tubo sterile, preparare la mix di amplificazione (Master mix) necessaria per ogni campione da testare più un controllo Negativo e un controllo Positivo, seguendo lo schema riportato in tabella 5:

Tabella 5: Preparazione Mastermix

Reagente	Volume reagenti per 1 reazione*
Mix 1	5 µL
Mix 2	0.625 µL
Mix Primer/Probe	9.375 µL
Volume totale	15 µL

*Per l'analisi di più di un campione, moltiplicare i volumi di Mix 1, Mix 2 e Mix Primer/Probe per il numero di campioni +1 (N+1) da testare, considerando NTC e Controllo Positivo.

- Vortexare gentilmente per 6 sec il tubo contenente la Mastermix e centrifugare brevemente.
- Per ciascun campione da testare, PCR Negative Control e PCR Positive Control, aliquotare **15 µL della Mastermix** nei tubi di PCR o nei pozzetti della piastra preparata per l'esperimento.
- Aggiungere **5 µL del PCR Negative Control** nel tubo corrispondente
- In un'area separata, aggiungere **5 µL di campione di RNA da analizzare e di Positive Control** nei corrispondenti pozzetti nei quali è stata precedentemente aliquotata la Mastermix

- Sigillare ermeticamente i tubi e caricarli nello strumento di real-time PCR, seguendo le istruzioni del produttore

NOTA: Si raccomanda di centrifugare i tubi o la piastra di PCR prima di inserirli nel termociclatore per eliminare le bolle d'aria e raccogliere tutti i reagenti sul fondo di ogni pozzetto. Verificare che il liquido sia sul fondo di ogni pozzetto, altrimenti centrifugare di nuovo a rpm più alti per un tempo più lungo

9.5. ANALISI E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'analisi dei risultati deve essere eseguita con il programma dello strumento di PCR riferendosi al manuale per informazioni dettagliate. Impostare i valori di baseline e threshold. Alcuni software eseguono automaticamente l'analisi dei dati, in questo caso è consigliabile verificare queste impostazioni. Per l'analisi manuale dei dati, analizzare il file di PCR separatamente per i quattro fluorofori.

NOTA: per una corretta interpretazione dei risultati, prestare attenzione alle curve di amplificazione. Nello specifico, nel grafico di amplificazione in fase lineare, verificare che la threshold sia impostata in maniera tale da intersecare la fase esponenziale della curva di fluorescenza del PCR Positive Control e che sia sopra ogni segnale di background. Il valore di threshold per i differenti strumenti può variare a causa delle differenti intensità di segnale.

Utilizzando gli strumenti CFX96, ABI 7500, Rotor gene Q 5-plex, Quant Studio 5 riferirsi rispettivamente alle **appendici A, B, C, D** per il set-up dei parametri di analisi.

Prima di interpretare i risultati relativi ai campioni è necessario verificare la validità dell'analisi della PCR. Procedere con la verifica dei controlli in base alla seguente tabella:

Tabella 6: Verifica controlli di reazione

Controllo	Canale di fluorescenza			
	FAM (Green Channel)	VIC/ Cal Fluor Orange 560 (Yellow Channel)	ROX/ Cal Fluor red 610 (Orange Channel)	Cy5/ Quasar 670 (Red Channel)
PCR Positive Control	Positivo (SARS-CoV-2)	Positivo (Flu A/B)	Positivo (RSV A/B)	Positivo (RNaseP)
PCR Negative Control (NTC)	Nessun segnale di amplificazione	Nessun segnale di amplificazione	Nessun segnale di amplificazione	Nessun segnale di amplificazione

Se la corsa è valida, continuare con l'interpretazione dei risultati dei campioni secondo la tabella seguente. Contrariamente, se la corsa non è valida ripetere il test.

La tabella seguente elenca un esempio di risultati previsti per il kit con controllo positivo e controllo negativo validi. I valori di cut off dei Ct riportati di seguito sono stati ricavati dalla verifica del prodotto e da studi di validazione. Spetta all'utilizzatore determinare i valori specifici di cut off dei Ct per ottenere prestazioni ottimali.

Tabella 7: Analisi dei risultati

Amplificazione				Interpretazione del risultato
Target: SARS-CoV-2	Target: Flu A/B	Target: RSV A/B	Target: RNaseP	
FAM (Green Channel)	VIC/ Cal Fluor Orange 560 (Yellow Channel)	ROX/ Cal Fluor red 610 (Orange Channel)	Cy5/ Quasar 670 (Red Channel)	
≤40	N/A	N/A	≤40*	Positivo per SARS-CoV-2 RNA
N/A	≤40	N/A	≤40*	Positivo per Flu A/B RNA
N/A	N/A	≤40	≤40*	Positivo per RSV A/B RNA
≤40	≤40	≤40	≤40*	Positivo per SARS-CoV-2, Flu A/B e RSV A/B RNA
≤40	≤40	N/A	≤40*	Positivo per SARS-CoV-2 e Flu A/B RNA
≤40	N/A	≤40	≤40*	Positivo per SARS-CoV-2 e RSV A/B RNA
N/A	≤40	≤40	≤40*	Positivo per Flu A/B e RSV A/B RNA
N/A	N/A	N/A	≤40	Negativo per SARS-CoV-2, Flu A/B e RSV A/B RNA
N/A	N/A	N/A	>40 o N/A	Risultato invalido (ripetere il test). Se si ottiene nuovamente lo stesso risultato si suggerisce un nuovo campionamento.

*l'amplificazione del controllo endogeno RNaseP potrebbe essere assente quando si è in presenza di campioni positivi nei quali si amplificano preferenzialmente i geni target virali.

9.6. RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

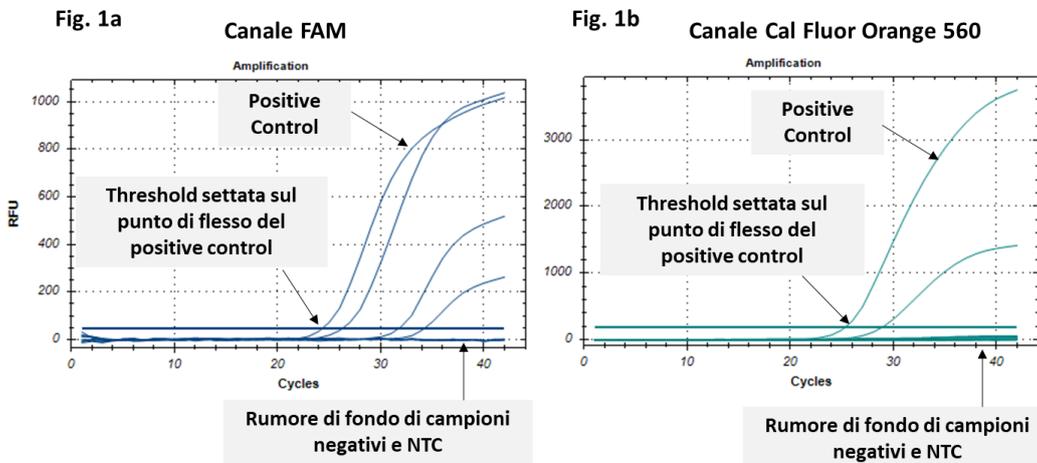
OSSERVAZIONE	PROBABILI CAUSE	SOLUZIONE
Nessun segnale di amplificazione da parte del controllo positivo e dei campioni	Non è stato programmato correttamente lo strumento	Verificare le impostazioni del profilo termico e ripetere il test utilizzando le impostazioni corrette
	Conservazione non corretta dei reagenti o utilizzo degli stessi oltre la data di conservazione	Verificare le condizioni di conservazione e utilizzare un nuovo kit se necessario
Nessun segnale o presenza segnale di amplificazione molto debole del controllo endogeno (RNaseP)	Elevata concentrazione dell'acido nucleico del patogeno	Se si osserva un segnale di amplificazione relativo al patogeno ma non relativo al controllo interno è probabile che quest'ultimo sia inibito dall'elevato titolo virale
	Prelievo non idoneo del campione	Eseguire un nuovo prelievo e procedere ripetendo il test dall'estrazione
	Problema nel processo di estrazione	Ripetere il test dall'estrazione
Presunto falso positivo o segnale target osservato nel Controllo Negativo di PCR	Contaminazione	Decontaminazione di tutte le superfici e aree di lavoro con ipoclorito di sodio. Utilizzo di puntali con filtro. Ripetere l'intera procedura a partire dallo step di estrazione
Presunto falso negativo o assenza di segnale nel controllo positivo	Errore nella raccolta del campione	Verificare il metodo di raccolta del campione
	Errata conservazione del campione	Raccogliere nuovamente il campione e ripetere l'intero procedimento a partire dall'estrazione conservandolo secondo le raccomandazioni
	Errore nel processo di estrazione degli acidi nucleici	Verificare la procedura di estrazione e ripetere l'intero procedimento
	Presenza di inibitori della PCR	Procedere con una diluizione del campione
	Errore nell'aggiunta dell'acido nucleico al tubo di amplificazione	Verificare di aggiungere correttamente il campione al corrispondente tubo di amplificazione in base alla tipologia di estrazione utilizzata
	Preparazione errata della miscela di amplificazione	Confermare l'aggiunta di tutti i componenti alla miscela di reazione. Tutti i reagenti devono essere omogenati e centrifugati prima dell'uso
Presenza di segnali di fluorescenza anomali	Reazione di amplificazione non centrifugata	Ripetere la reazione di amplificazione dopo aver centrifugato la plate e /o i tubi prima di avviare la reazione
	Evaporazione del campione nel termociclature dovuta ad una errata sigillatura dei tubi di reazione	Ripetere la reazione di amplificazione dopo aver sigillato correttamente la plate o i tubi prima dell'avvio
	Plasticheria per termociclature non idonea	Contattare Diatheva e ripetere la reazione con la plasticheria indicata
	Presenza di bolle nel tubo di reazione	Ripetere la reazione di amplificazione dopo aver centrifugato la plate e /o i tubi, verificare l'assenza di bolle prima di avviare la reazione

APPENDICE A - CFX96 Parametri di analisi

Dal comando setting selezionare "baseline setting" e impostare "baseline subtracted curve fit"

Per settare la threshold spostare manualmente la linea nella fase esponenziale della curva di fluorescenza del Positive Control osservata nel grafico in **fase lineare**. Un esempio di analisi per il target SARS-CoV-2, valido anche per RSV A/B e per RNase P, è riportato in Figura 1a mentre un esempio di analisi per il target Flu A/B è riportato in Figura 1b. Se in alcuni campioni il segnale di fluorescenza ha un andamento anomalo o compaiono degli artefatti, è possibile migliorare l'andamento delle curve selezionando "Settings", "Baseline threshold": selezionare i campioni con andamento anomalo e impostare nella rispettiva casella *baseline end* il valore 20.

Fig 1: Settaggio dei parametri e analisi dei dati in fase lineare su CFX96 per il canale FAM-SARS-CoV-2 (Fig.1a) e per il canale Cal Fluor Orange 560-Flu A/B (Fig.1b)

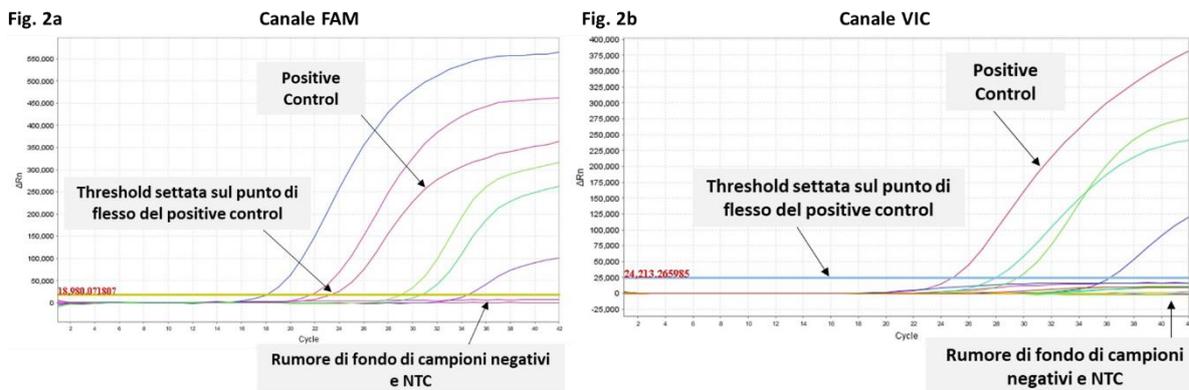


APPENDICE B - ABI 7500 Parametri di analisi

Per l'analisi, nella schermata "Amplification plot" sezione "Options" mantenere selezionato "Auto baseline" e deselezionare "Auto" per il campo "threshold".

Per settare la threshold spostare manualmente la linea nella fase esponenziale della curva di fluorescenza del Positive Control osservata nel grafico in **fase lineare**. Un esempio di analisi per il target SARS-CoV-2, valido anche per RSV A/B e RNase P, è riportato in Figura 2a mentre un esempio di analisi per il target Flu A/B è riportato in Figura 2b.

Fig 2: Settaggio dei parametri e analisi dei dati in fase lineare su ABI 7500 per il canale FAM-SARS-CoV-2 (Fig.2a) e per il canale VIC-Flu A/B (Fig.2b)



APPENDICE C – Rotor gene Q 5-plex Parametri di analisi

Per ogni fluoroforo procedere all'analisi come segue:

Selezionare la funzione "Dinamic Tube". Selezionare la funzione "Ignore First" inserendo il valore 15 nella casella "Cycles". Per settare la threshold spostare manualmente la linea nella fase esponenziale della curva di fluorescenza del Positive Control osservata nel grafico in **fase lineare**. Un esempio di analisi per il target SARS-CoV-2, valido anche per RSV A/B e RNase P, è riportato in Figura 3a mentre un esempio di analisi per il target Flu A/B è riportato in Figura 3b.

Fig 3: Settaggio dei parametri e analisi dei dati in fase lineare su Rotor gene Q 5-plex per il canale GREEN-SARS-CoV-2 (Fig.3a) e per il canale YELLOW-Flu A/B (Fig.3b)

Fig. 3a Canale GREEN



Rumore di fondo di campioni negativi e NTC

Fig. 3b Canale YELLOW



Rumore di fondo di campioni negativi e NTC

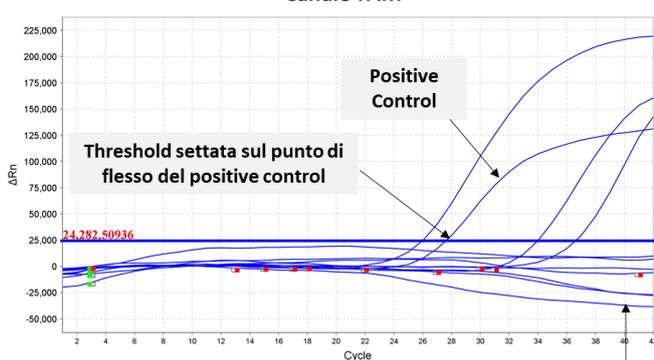
APPENDICE D – Quant Studio 5 Parametri di analisi

Per l'analisi, nella schermata "Results" sezionare il menù a tendina "Amplification Plot", mantenere selezionato "Auto baseline" e deselezionare "Auto" per il campo "threshold".

Per settare la threshold spostare manualmente la linea nella fase esponenziale della curva di fluorescenza del Positive Control osservata nel grafico in **fase lineare**. Un esempio di analisi per il target SARS-CoV-2, valido anche per RNase P, è riportato in Figura 4a mentre un esempio di analisi per il target Flu A/B, valido anche per RSV A/B, è riportato in Figura 4b.

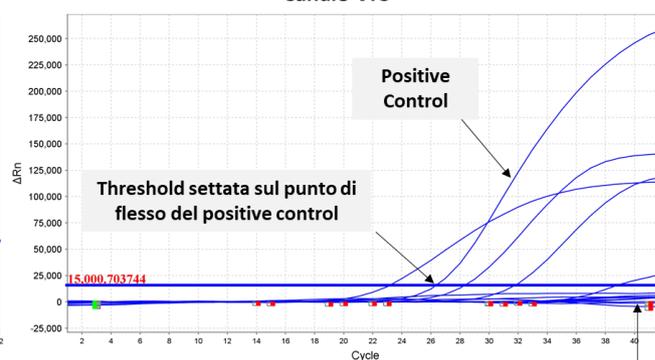
Fig 4: Settaggio dei parametri e analisi dei dati in fase lineare su Quant Studio 5 per il canale FAM-SARS-CoV-2 (Fig.4a) e per il canale VIC-Flu A/B (Fig.4b)

Fig. 4a Canale FAM



Rumore di fondo di campioni negativi e NTC

Fig. 4b Canale VIC



Rumore di fondo di campioni negativi e NTC

APPENDICE E - PRESTAZIONI DEL DISPOSITIVO

SPECIFICITÀ ANALITICA

La specificità analitica del COVID-FLU-RSV All-in-One RT PCR kit è garantita dalla scelta accurata e specifica di primer e probe pubblicati sulle linee guida internazionali emanate dall'OMS e CDC.

SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica del COVID-FLU-RSV All-in-One RT PCR kit è stata determinata utilizzando l'RNA genomico TWIST SYNTHETIC SARS-CoV-2 RNA CONTROL 2 (Cat. No. 102024, TWIST BIOSCIENCE) per il target SARS-CoV-2, il TWIST SYNTHETIC INFLUENZA H1N1 (2009) RNA CONTROL (Cat. No. 103001, TWIST BIOSCIENCE) per il target Influenza A, il TWIST SYNTHETIC INFLUENZA B RNA CONTROL BSL-1 (Cat. No. 103003, TWIST BIOSCIENCE) per il target Influenza B e l'AMPLIRUN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS (subtype A) RNA CONTROL (Cat. No. MBC041, Vircell) per il target RSV. L'RNA è stato sottoposto a diluizioni seriali e i risultati sono stati analizzati mediante analisi Probit ($p=0.005$, 95% IC) sullo strumento ABI7500 (Applied Biosystems). Il LOD determinato per il target SARS-CoV-2 corrisponde a 3.83 copie/PCR, per il target Influenza A corrisponde a 16.59 copie/PCR, per il target Influenza B corrisponde a 2.39 copie/PCR e per il target RSV corrisponde a 1.28 copie/PCR.

RIPETIBILITÀ

La ripetibilità del test (variabilità *intra-assay*) è stata valutata analizzando replicati di 5 differenti campioni clinici in una seduta su CFX96 (Biorad). I campioni analizzati includono un campione alto positivo, uno medio positivo e uno basso positivo a SARS-CoV-2, un campione positivo all'Influenza A/B e un campione positivo a RSV. Il coefficiente di variazione percentuale (CV%) per i target SARS-CoV-2, Flu A/B e RSV A/B è mostrato in tabella A e per tutti i virus è sempre <1.0:

Tabella A: valore medio di Ct e CV% di campioni positivi a SARS-CoV-2, Flu A/B e RSV A/B

	Valore di Ct medio (CV%)				
	Campione SARS-CoV-2 alto positivo	Campione SARS-CoV-2 medio positivo	Campione SARS-CoV-2 basso positivo	Campione Flu A/B positivo	Campione RSV A/B positivo
SARS-CoV-2	26.24 (0.27)	31.55 (0.90)	34.31 (0.31)	-	-
Flu A/B	-	-	-	27.90 (0.63)	-
RSV A/B	-	-	-	-	32.41 (0.07)

RIPRODUCIBILITÀ

La riproducibilità del test (variabilità *inter-assay*) è stata valutata analizzando 5 campioni clinici in due differenti sedute rispettivamente su ABI7500 (Applied Biosystems) e CFX96 (Biorad). I campioni analizzati includono un campione alto positivo, uno medio positivo e uno basso positivo a SARS-CoV-2, un campione positivo all'Influenza A/B e un campione positivo a RSV. Il coefficiente di variazione percentuale (CV%) per i target SARS-CoV-2, Flu A/B e RSV A/B è mostrato in tabella B e per tutti i virus è sempre <0.8:

Tabella B: valore medio di Ct e CV% di campioni positivi a SARS-CoV-2, Flu A/B e RSV A/B

	Valore di Ct medio (CV%)				
	Campione SARS-CoV-2 alto positivo	Campione SARS-CoV-2 medio positivo	Campione SARS-CoV-2 basso positivo	Campione Flu A/B positivo	Campione RSV A/B positivo
SARS-CoV-2	26.27 (0.16)	31.39 (0.72)	34.36 (0.60)	-	-
Flu A/B	-	-	-	27.84 (0.33)	-
RSV A/B	-	-	-	-	32.44 (0.22)

ROBUSTEZZA

La robustezza del metodo è stata valutata analizzando l'impatto di diversi operatori e diversi termociclatori (Tabella C).

Tabella C: Campioni positivi diagnosticati in diversi termociclatori da diversi operatori

	Positivi diagnosticati/Totale positivi	% diagnosticati
CFX96 (Operatore 1)	34/34	100
ABI 7500 (Operatore 2)	42/42	100
QuantStudio 5 (Operatore 3)	30/30	100
RGQ 5-plex (Operatore 2)	26/26	100

Per tutti gli strumenti e tutti gli operatori si è ottenuta una concordanza del 100% rispetto alla diagnosi dei campioni.

VALUTAZIONE CLINICA

SARS-CoV-2

La specificità clinica è stata valutata testando 90 campioni negativi per SARS-CoV-2 e la sensibilità clinica è stata valutata testando 74 campioni positivi per SARS-CoV-2. Tutti i campioni analizzati sono stati caratterizzati tramite un metodo RT-PCR con marchio CE-IVD. Gli RNA sono stati estratti utilizzando i kit di estrazione elencati al punto 5 "Materiale richiesto non fornito nel kit".

I risultati sono riassunti nella Tabella D.

Tabella D: Specificità, sensibilità e valore Kappa di Cohen per SARS-CoV-2

SARS-CoV-2		Competitor CE-IVD		
		Positivi	Negativi	Totale
COVID-FLU-RSV All-in-One RT PCR	Positivi	74	0	74
	Negativi	0	90	90
	Totale	74	90	164

- Sensibilità diagnostica: 100%
- Specificità diagnostica: 100%
- Valore Kappa di Cohen: 1.00 (concordanza perfetta)

Influenza A/B

La specificità clinica è stata valutata testando 117 campioni negativi per Flu A/B. La sensibilità clinica è stata valutata testando 22 campioni positivi per Flu A/B. Tutti i campioni analizzati sono stati caratterizzati tramite un metodo RT-PCR di riferimento.

I risultati sono riassunti nella Tabella E.

Tabella E: Specificità, sensibilità e valore Kappa per Flu A/B

FluA/B		Metodo di riferimento CDC		
		Positivi	Negativi	Totale
COVID-FLU-RSV All-in-One RT PCR	Positivi	22	0	22
	Negativi	0	117	117
	Totale	22	117	139

- Sensibilità diagnostica: 100%
- Specificità diagnostica: 100%
- Valore Kappa di Cohen: 1.00 (concordanza perfetta)

RSV A/B

La specificità clinica è stata valutata testando 117 campioni negativi per RSV A/B. La sensibilità clinica è stata valutata testando 22 campioni positivi per RSV A/B. Tutti i campioni analizzati sono stati caratterizzati tramite un metodo RT-PCR di riferimento.

I risultati sono riassunti nella Tabella F.

Tabella F: Specificità, sensibilità e valore Kappa per RSV A/B

RSV A/B		Metodo di riferimento CDC		
		Positivi	Negativi	Totale
COVID-FLU-RSV All-in-One RT PCR	Positivi	22	0	22
	Negativi	0	117	117
	Totale	22	117	139

- Sensibilità diagnostica: 100%
- Specificità diagnostica: 100%
- Valore Kappa di Cohen: 1.00 (concordanza perfetta)

La validazione clinica è stata condotta in collaborazione con il centro di riferimento regionale per la sorveglianza virologica di influenza e COVID-19, Dipartimento di Scienze Biomediche per la Salute, Università degli Studi di Milano.