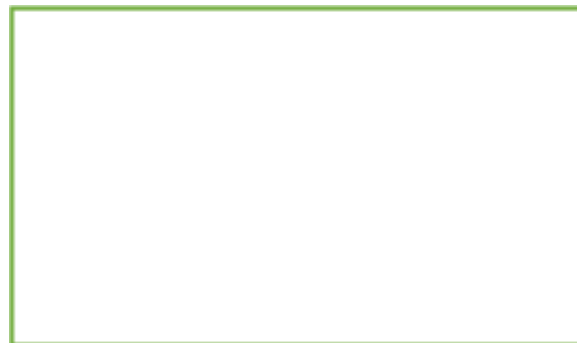




Via Sant'Anna 131-135
61030 Cartoceto PU (IT)
Telephone +39 (0)721 830605
FAX +39 (0)721837154
e-mail: info@diatheva.com
www.diatheva.com



COVID-FLU-RSV RT PCR Detection kit

Versione: **Ottobre 2020**



D-MBK0096



96



USO PREVISTO

COVID-FLU-RSV RT PCR Detection kit 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), Influenza A (Flu A), Influenza B (Flu B) e del Virus respiratorio sinciziale A/B (RSV A/B) da campioni di tamponi naso-faringei. Questo test può essere impiegato nella diagnosi differenziale delle infezioni da SARS-CoV-2, Influenza A, influenza B e virus respiratorio sinciziale in combinazione ad altri dati clinici ed epidemiologici del paziente.

I risultati positivi sono indicativi della presenza di RNA di SARS-CoV-2, FluA, FluB 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, FluA, FluB 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.

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 and recommendations, 2020; CDC, <https://www.cdc.gov/flu/symptoms/testing.htm>].

Data la somiglianza in termini di sintomi tra influenza stagionale e SARS-CoV-2, la possibilità di utilizzare saggi di tipo multiplex è fondamentale al fine di attuare un controllo efficace della malattia, nonché il trattamento clinico.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

COVID-FLU-RSV RT PCR Detection kit è un sistema di RT-PCR che consente l'amplificazione e la differenziazione dell'RNA dei virus del SARS, dell'Influenza umana A, B e del virus respiratorio sinciziale A/B.

A partire dall'RNA estratto, si effettuano due reazioni di trascrizione inversa ed amplificazione di cui:

- Una specifica per SARS-CoV-2 attraverso l'amplificazione simultanea di 3 geni virali specifici (ORF1b/RdRp, S ed N) e del target **RNase P** come controllo positivo interno (IC) per monitorare che il campione sia di accettabile qualità, il processo di estrazione dell'RNA e la presenza di inibitori di PCR.
- Una specifica per Flu A, Flu B ed RSV e del del target **RNase P** come controllo positivo interno (IC) come indicato sopra.

CONTENUTO DEL KIT

Il kit fornisce tutti i reagenti necessari per l'analisi (Tabella 1). Sono inclusi inoltre anche il controllo negativo e il controllo positivo di PCR per entrambe le multiplex COVID-19 e FLU-RSV.

Tabella 1: Contenuto del kit

Reagente	No vial x Volume	Colore del tappo
Mix 1	2 X 690 µL	Verde
Mix 2	2 X 86 µL	Arancio
Mix Primer/Probe COVID-19	2 X 880 µL	Blu
Mix Primer/Probe FLU-RSV	2 X 880 µL	Giallo
PCR Negative Control	1 X 100 µL	Trasparente
PCR Positive Control COVID-19	1 X 50 µL	Rosso
PCR Positive Control FLU-RSV	1 X 50 µL	Viola

**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 clear/strip
- Tubi sterili da 1.5 mL
- Congelatori da laboratorio da -30°C a -10°C/-70°C
- Blocco freddo o ghiaccio

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

Termociclatori

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

Sistemi di estrazione

- RNeasy Mini kit (Qiagen)
- High Pure Viral RNA/DNA Kit (Magen)
- MGISP-960 platform using the Virus DNA/RNA Extraction kit
- KingFisher™ Flex Purification System using MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit
- Purification system using OMNIA LH75 with NucleoMag Pathogen (Macherey-Nagel)
- Total RNA Purification kit (Norgen)

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

**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

**CONDIZIONI
DI TRASPORTO
E
CONSERVAZIONE**

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

**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;
- Scongelare 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 per ciascuna mix;
- 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.

ISTRUZIONI PER L'USO

1. 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 nella tabella 6.

Per estrazioni con metodi diversi da quelli riportati nella tabella 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.

2. 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 2: Impostazione profilo termico

Fase	Temperature e Tempi	Cicli
Sintesi di cDNA	48°C 10 min	1 X
Denaturazione iniziale	95°C 10 min	1 X
Denaturazione	95°C 15 sec	45 X**
Annealing-estensione*	58°C 60 sec	

*La fluorescenza dei diversi fluorofori è rilevata durante la fase di **annealing-estensione** nei canali specificati nella tabella a seguire

** utilizzare l'impostazione con 40 cicli con lo strumento Rotor gene Q

Tabella 3: Impostazione canali di lettura della fluorescenza

Multiplex	Canali di lettura della fluorescenza			
	FAM	VIC/Cal Fluor Orange 560	Cal Fluor Red 610/ROX	Cy5/Quasar 670
Target Multiplex COVID	ORF1b/RdRp gene	S gene	N gene	RNaseP
Target Multiplex FLU-RSV	M1 gene (Flu A)	NS2 gene (FluB)	M gene (RSV)	RNaseP

- Il volume finale di reazione è **25 µL o 27 µL (per inserire il volume corretto di reazione finale considerare il volume di campione di RNA aggiunto come indicato in tabella 6 sulla base del sistema di estrazione utilizzato)**.
- **Per gli strumenti che lo prevedono selezionare "None" alla voce "Select the dye to use as passive reference"**
- Per lo strumento Rotor gene Q posizionare l'NTC della MIX COVID-19 in posizione 1 e impostare la funzione di "Auto-gain optimization setup", selezionare la funzione "Perform optimization before 1st acquisition". Infine selezionare "Optimize acquiring" selezionando tutti i canali di lettura della fluorescenza mostrati nella tabella nr. 3 relativi a ciascun target.

3. Allestimento delle reazioni

L'allestimento delle reazioni di multiplex per COVID-19 e FLU-RSV richiede la preparazione di due mastermix separate pertanto ciascun campione da testare, PCR Negative Control e il rispettivo PCR Positive Control deve essere testato con entrambe le mastermix. La preparazione delle Mastermix COVID-19 e Mastermix FLU-RSV deve essere eseguita secondo le indicazioni riportate a seguire:

Nota: Mantenere entrambe le Mix primer/probe COVID-19 e Primer/Probe FLU-RSV protetti dalla luce

- Scongellare i componenti. Vortexare la Mix 1, la Mix Primer/Probe COVID-19 e Mix Primer/Probe FLU-RSV per 15 sec e centrifugare brevemente. Vortexare la Mix 2 per 2 sec e centrifugare brevemente.
- In due tubi separati sterili da 1.5 ml, preparare le mastermix di amplificazione necessarie per ogni campione da testare più un controllo Negativo e un controllo Positivo, seguendo lo schema riportato nelle tabelle a seguire:

Tabella 4: Preparazione Mastermix COVID-19

Reagente	Volume reagenti per 1 reazione*
Mix 1**	6.25 µL
Mix 2**	0.78 µL
Mix Primer/Probe COVID-19	15.97 µL
Volume totale	23 µL

Tabella 5: Preparazione Mastermix FLU-RSV

Reagente	Volume reagenti per 1 reazione*
Mix 1**	6.25 µL
Mix 2**	0.78 µL
Mix Primer/Probe FLU-RSV	15.97 µL
Volume totale	23 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 da testare, considerando NTC e Controllo Positivo.

**I reagenti Mix 1 e Mix 2 contengono componenti forniti da Solis BioDyne

- Vortexare per 10 sec i tubi contenenti le Master mix e centrifugare brevemente.
- Per ciascun campione da testare, PCR Negative Control e PCR Positive Control, aliquotare **23 µL di ciascuna delle 2 Master mix** nei tubi di PCR o nei pozzetti della piastra preparata per l'esperimento.
- In un'area separata, aggiungere il PCR Negative Control, il campione di RNA da analizzare, il Positive Control COVID-19 ed il Positive Control FLU-RSV nei corrispondenti pozzetti nei quali è stata precedentemente aliquotata la rispettiva master mix seguendo le indicazioni riportate nella tabella sottostante:

Tabella 6: Caricamento dei campioni e controlli

Tipologia di estrazione	Volume campione RNA	Volume PCR Negative Control	Volume PCR Positive Control
<ul style="list-style-type: none"> • RNeasy Mini kit (Qiagen) • QIAamp MinElute Virus spin kit (Qiagen) • High Pure Viral RNA/DNA Kit (Magen) • KingFisher™ Flex Purification System using MagMAX™ Viral/Pathogen II (MVP II) Nucleic Acid Isolation Kit • Purification system using OMNIA LH75 with NucleoMag Pathogen (Macherey-Nagel) • Total RNA Purification kit (Norgen) • Invisorb® Spin Virus RNA Mini Kit (Stratec) 		4 µL	
MGISP-960 platform using the Virus DNA/RNA Extraction kit		2 µL	
AVVERTENZA: Nel caso di utilizzo di differenti kit di estrazione rispetto a quelli raccomandati, è responsabilità dell'utilizzatore verificare attraverso l'uso di campioni standard (es. VEQ) che questa estrazione non comporti una riduzione delle prestazioni del sistema di analisi			

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

Nota: verificare che i reagenti siano sul fondo di ogni pozzetto, altrimenti centrifugare a 800 x g per 1 minuto.

3. Analisi 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.

Utilizzando gli strumenti CFX96, Rotorgene Q 5-plex, ABI 7500, 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 7: Verifica controlli di reazione

Controllo	Canale di fluorescenza			
	FAM	VIC/Cal Fluor Orange 560	Cal Fluor red 610 /ROX	Cy5/ Quasar 670
PCR Positive Control COVID-19	Positivo (Orf1b/RDRP)	Positivo (S)	Positivo (N)	Positivo (RNaseP)
PCR Positive Control FLU-RSV	Positivo (FluA)	Positivo (FluB)	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 prima di procedere

Tabella 8: Analisi dei risultati per la reazione multiplex COVID-19

Amplificazione				Interpretazione del risultato
Target: ORF1b/RdRp	Target: S	Target: N	Target: RNaseP	
FAM	VIC/Cal Fluor Orange 560	Cal Fluor Red 610 /ROX	Cy5/ Quasar 670	
Positivo	Positivo	Positivo	≤40*	Positivo per SARS-CoV-2 RNA
Positivo	Positivo	N/A	≤40*	Positivo per SARS-CoV-2 RNA Uno o più target negativi possono essere indicativi di: - Concentrazione di analita inferiore o vicina al LOD - Presenza di mutazioni nella regione target - Altri fattori
Positivo	N/A	N/A	≤40*	
N/A	Positivo	Positivo	≤40*	
N/A	Positive	N/A	≤40*	
N/A	N/A	Positivo	≤40*	
N/A	N/A	N/A	≤40*	
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.

Tabella 9: Analisi dei risultati per la reazione multiplex FLU-RSV

Amplificazione				Interpretazione del risultato
Target: FLU A	Target: FLU B	Target: RSV A/B	Target: RNaseP	
FAM	VIC/Cal Fluor Orange 560	Cal Fluor Red 610 /ROX	Cy5/ Quasar 670	
Positivo	N/A	N/A	≤40*	Positivo per FLU A RNA
N/A	Positivo	N/A	≤40*	Positivo per FLU B RNA
N/A	N/A	Positivo	≤40*	Positivo per RSV A/B RNA
Positivo	Positivo	N/A	≤40*	Positivo per FLU A e FLU B RNA
N/A	Positivo	Positivo	≤40*	Positivo per FLU B e RSV A/B RNA
Positivo	N/A	Positivo	≤40*	Positivo per FLU A e RSV A/B RNA
N/A	N/A	N/A	≤40	Negativo per tutti i target FLU A FLU B ed RSV A/B
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 interno RNaseP potrebbe essere assente quando si è in presenza di campioni positivi nei quali si amplificano preferenzialmente i geni target virali.

APPENDICE A - CFX96 Parametri di analisi

Per ogni fluoroforo selezionare "settings", "baseline threshold" e "single threshold-user defined", inserendo i seguenti valori e cliccare OK:

Target/Fluoroforo Mix COVID-19	Target/Fluoroforo Mix FLU-RSV	Valore Threshold
RdRp/Orf1b/FAM	FluA/FAM	80
S/Cal Orange 560	FluB/Cal Orange 560	30
N/Cal red 610	RSV/Cal red 610	40
RNaseP/Quasar 670	RNaseP/Quasar 670	30

ATTENZIONE: per una corretta interpretazione dei risultati, prestare attenzione alle curve di amplificazione.

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

APPENDICE B - Rotor gene Q 5-plex Parametri di analisi

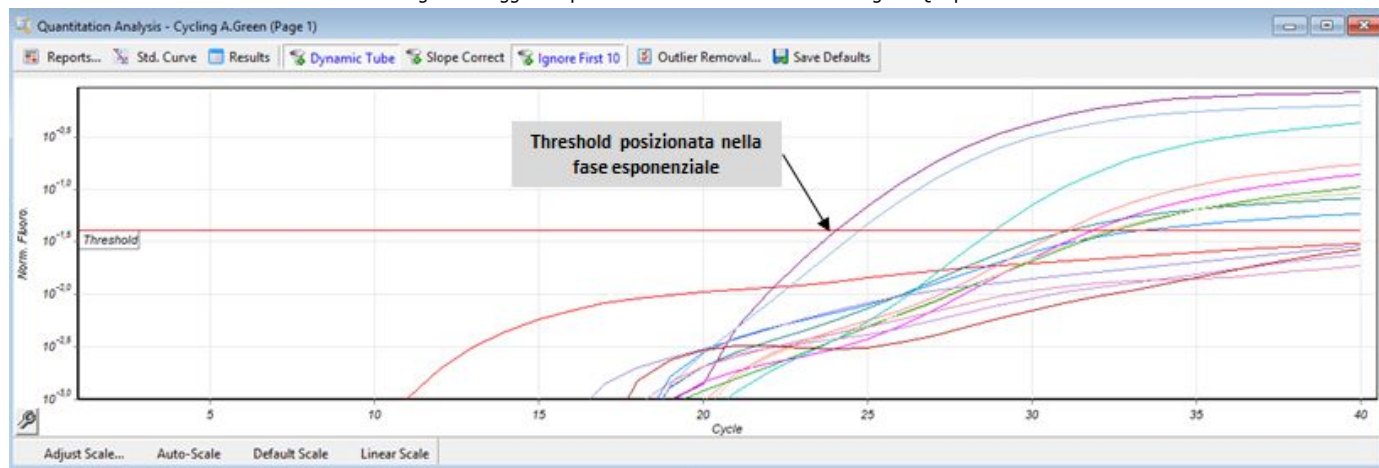
Per ogni fluoroforo procedere all'analisi come segue:

Selezionare la funzione "Dinamic Tube".

Selezionare la funzione "Ignore First" inserendo il valore 10 nella casella "Cycles".

Per settare la threshold spostare manualmente la linea nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza (Fig. 1).

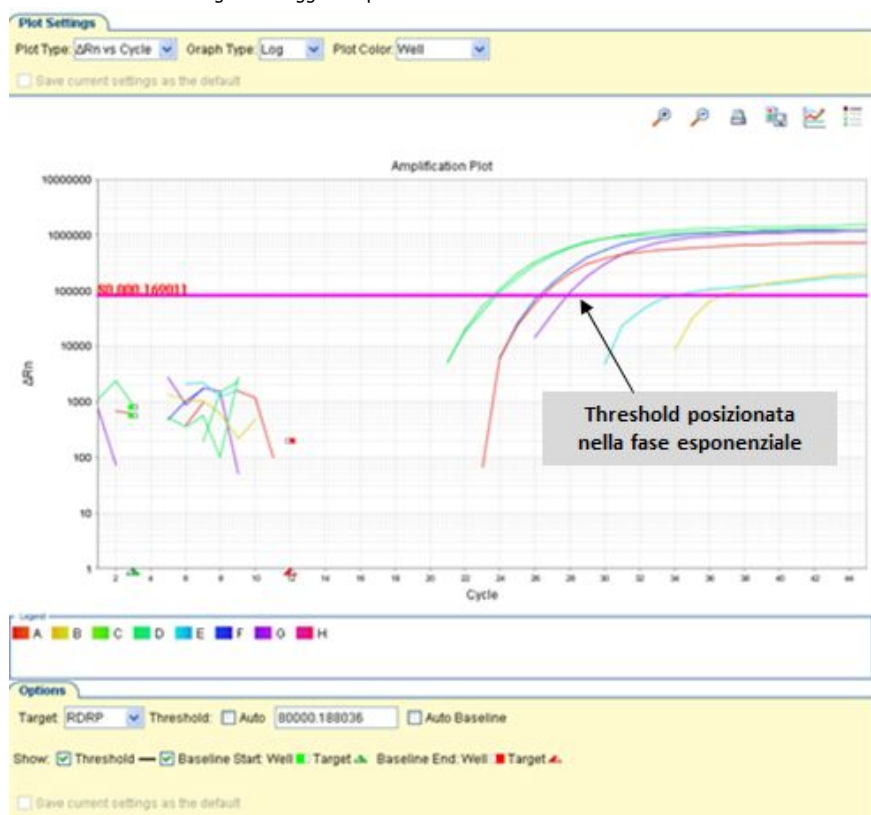
Fig 1: Settaggio dei parametri e Analisi dei dati su Rotor gene Q 5-plex



APPENDICE C - ABI 7500 Parametri di analisi

Per l'analisi, nella schermata "Amplification plot" sezione "Options" deselezionare "Auto Baseline" e "Auto" rispettivamente alla threshold. Per settare la threshold spostare manualmente la linea nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza (Fig. 2).

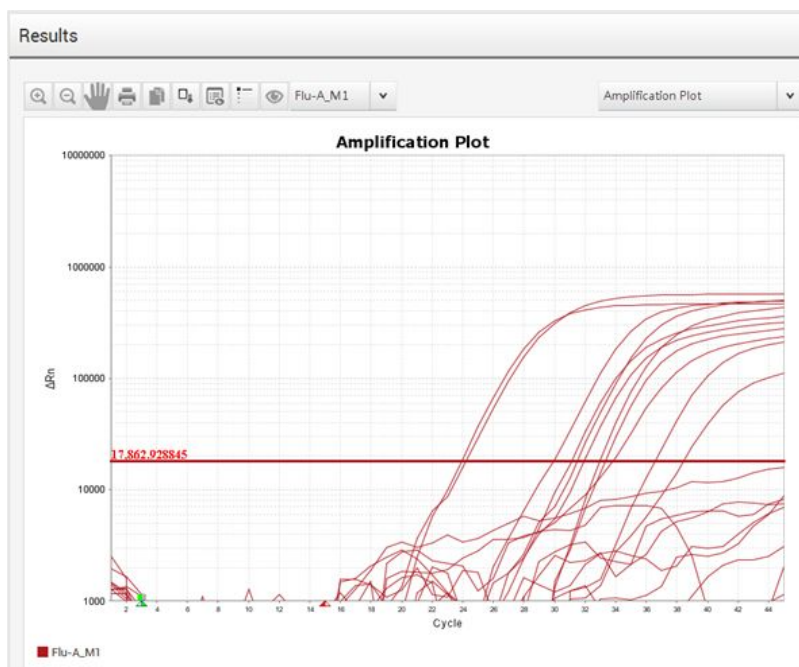
Fig 2: Settaggio dei parametri e Analisi dei dati su ABI 7500



APPENDICE D - Quant Studio 5 Parametri di analisi

Per l'analisi, nella schermata "Results" selezionare nel menu a tendina "Amplification Plot". Selezionare un target alla volta. Cliccare il simbolo "Show Plot Settings" e deselezionare "Auto Baseline" e "Auto" rispettivamente alla threshold. Per settare la threshold spostare manualmente la linea nella fase esponenziale delle curve di fluorescenza. (Fig. 3)

Fig 3: Settaggio dei parametri e Analisi dei dati su Quant Studio 5



PRESTAZIONI DEL DISPOSITIVO

SPECIFICITÀ ANALITICA

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

SENSIBILITÀ ANALITICA

Il Limit of Detection (LoD) è stato determinato testando diluizioni seriali di un costrutto sintetico contenente le tre regioni target COVID e di un costrutto contenente le regioni target FLU/RSV. I risultati sono stati analizzati mediante analisi Probit ($p=0.005$, 95% IC) sugli strumenti CFX96 e ABI 7500.

Tabella A: LoD SARS CoV-2

Virus	Gene target	LOD (copie/reazione)
SARS-CoV-2	RdRp/ORF1b	4.07
	S	5.01
	N	11.7

Tabella B: LoD FluA, FluB e RSV A/B

Virus	Gene target	LOD (copie/reazione)
FluA	M1	12,9
FluB	NS2	14,45
RSV A/B	M	10,70

RIPETIBILITÀ

Mix COVID-19 (SARS-CoV-2)

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

Tabella C: valore medio di Ct e CV% di campioni positivi a SARS-CoV-2

Mix COVID-19	Valore di Ct medio (CV%)		
	Campione alto positivo	Campione medio positivo	Campione basso positivo
ORF1b/RdRp	19.37 (0.37)	26.95 (1.50)	31.00 (0.43)
S	18.49 (0.04)	25.75 (0.74)	30.27 (0.47)
N	19.76 (0.47)	26.85 (0.97)	31.85 (0.80)

Mix FLU-RSV (FluA, FluB, RSV A/B)

La ripetibilità del test è stata valutata analizzando replicati di tre differenti campioni clinici in una seduta su CFX96. I campioni analizzati includono un campione positivo all'Influenza A, un campione positivo all'influenza B e uno positivo ad RSV. Il CV% per i target FluA, FluB e RSV A/B è mostrato in tabella D e per tutti i virus è sempre <1:

Tabella D: valore medio di Ct e CV% di campioni positivi a FluA, FluB o RSV

Mix FLU-RSV	Valore di Ct medio (CV%)		
	Campione FluA positivo	Campione FluB positivo	Campione RSV A/B positivo
FluA	31.72 (0.25)	-	-
FluB	-	31.02 (0.59)	-
RSV A/B	-	-	38.51 (0.94)

RIPRODUCIBILITÀ

Mix COVID-19 (SARS-CoV-2)

La riproducibilità del test (variabilità *inter-assay*) è stata valutata analizzando tre campioni clinici in due differenti sedute su CFX96 e ABI 7500. I campioni analizzati includono un campione alto positivo, uno medio positivo e uno basso positivo. Il CV% per i geni target di SARS-CoV-2 è mostrato in tabella E e per tutti i target del virus è sempre ≤ 3 :

Tabella E: valore medio di Ct e CV% di campioni positivi a SARS-CoV-2

Mix COVID-19	Valore di Ct medio (CV%)		
	Campione alto positivo	Campione medio positivo	Campione basso positivo
ORF1b/RdRp	18.84 (2.82)	31.73 (2.05)	33.12 (2.52)
S	17.25 (1.19)	31.31 (3.00)	32.61 (0.15)
N	17.46 (1.34)	33.32 (2.80)	34.73 (1.06)

Mix FLU-RSV (FluA, FluB, RSV A/B)

La riproducibilità del test (variabilità *inter-assay*) è stata valutata analizzando tre differenti campioni clinici in due differenti sedute su CFX96 e ABI 7500. I campioni analizzati includono un campione positivo all'Influenza A, uno positivo all'influenza B e uno positivo ad RSV. Il CV% per i target FluA, FluB e RSV A/B è mostrato in tabella F e per tutti i virus è sempre < 2 :

Tabella F: valore medio di Ct e CV% di campioni positivi a FluA, FluB o RSV

Mix FLU-RSV	Valore di Ct medio (CV%)		
	Campione FluA positivo	Campione FluB positivo	Campione RSV positivo
FluA	31.11 (0.09)	-	-
FluB	-	30.76 (1.10)	-
RSV A/B	-	-	37.06 (0.04)

ROBUSTEZZA

Mix COVID-19 (SARS-CoV-2)

La robustezza del metodo è stata valutata analizzando l'impatto di diversi metodi di estrazione (Tabella G), diversi operatori e diversi termociclatori (Tabella H).

Tabella G: valore di Ct e CV% di campioni estratti con metodo manuale (Magen) e metodo automatico (MGI)

Mix COVID-19	Campione alto positivo			Campione medio positivo			Campione basso positivo		
	MGI* (Ct)	Magen** (Ct)	CV(%)	MGI* (Ct)	Magen** (Ct)	CV(%)	MGI* (Ct)	Magen** (Ct)	CV(%)
ORF1b/RdRp	18.37	19.47	4.11	29.73	31.13	3.25	33.88	33.41	0.99
S	17.07	18.03	3.87	29.11	30.14	2.46	33.59	32.94	1.38
N	17.91	18.87	3.69	31.09	31.81	1.62	35.43	35.17	0.52
RNse P	27.22	29.59	5.90	28.42	29.03	1.5	30.6	30.49	0.25

* High Pure Viral RNA/DNA Kit (Magen)

** Piattaforma MGISP-960 con Virus DNA/RNA Extraction kit (MGI)

I risultati ottenuti mostrano una concordanza del 100% nella diagnosi di tutti i target per tutti i campioni estratti con i due diversi metodi di estrazione. Il CV% per i geni target di SARS-CoV-2, calcolato dai valori di Ct ottenuti con i due metodi di estrazione, è sempre ≤ 6 :

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

Mix COVID-19	Positivi diagnosticati/Totale positivi	% diagnosticati
CFX96 Operatore 1	68/68	100
ABI 7500 Operatore 2	23/23	100
RGQ 5-plex Operatore 2	10/10	100

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

Mix FLU-RSV (FluA, FluB, RSV A/B)

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

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

Mix COVID-19	Positivi diagnosticati/Totale positivi	% diagnosticati
CFX96 Operatore 1	14/14	100
Quant Studio 5 Operatore 2	134/134	100

VALUTAZIONE CLINICA

Mix COVID-19 (SARS-CoV-2)

La specificità clinica è stata valutata testando 19 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 nella Tabella 6.

I risultati sono riassunti nella Tabella L.

Tabella L: Specificità, sensibilità e valore Kappa per SARS-CoV-2

SARS-CoV-2		Competitor CE-IVD		
		Positivi	Negativi	Totale
COVID-FLU-RSV RT PCR Detection kit	Positivi	74	0	74
	Negativi	0	19	19
	Totale	74	19	93

- Sensibilità diagnostica: 100%
- Specificità diagnostica: 100%
- Valore Kappa: 1 (95% IC)

Mix FLU-RSV (FluA, FluB, RSV A/B)

La specificità clinica è stata valutata testando 19 campioni negativi per FluA, FluB e RSV. La sensibilità clinica è stata valutata testando 50 campioni positivi per FluA, 49 campioni positivi per FluB e 37 campioni positivi per RSV. Tutti i campioni analizzati sono stati caratterizzati tramite un metodo RT-PCR di riferimento.

I risultati sono riassunti nelle Tabelle M, N, O.

Tabella M: Specificità, sensibilità e valore Kappa per FluA

FluA		Reference Method		
		Positivi	Negativi	Totale
COVID-FLU-RSV RT PCR Detection kit	Positivi	50	0	50
	Negativi	0	19	19
	Totale	50	19	69

- Sensibilità diagnostica: 100%
- Specificità diagnostica: 100%

Tabella N: Specificità, sensibilità e valore Kappa per FluB

FluB		Reference Method		
		Positivi	Negativi	Totale
COVID-FLU-RSV RT PCR Detection kit	Positivi	49	0	49
	Negativi	0	19	19
	Totale	49	19	68

- Sensibilità diagnostica: 100%
- Specificità diagnostica: 100%

Tabella O: Specificità, sensibilità e valore Kappa per RSV

RSV A/B		Competitor CE-IVD		
		Positivi	Negativi	Totale
COVID-FL U-RSV RT PCR Detection kit	Positivi	37	0	37
	Negativi	0	19	19
	Totale	37	19	56

- Sensibilità diagnostica: 100%
- Specificità diagnostica: 100%