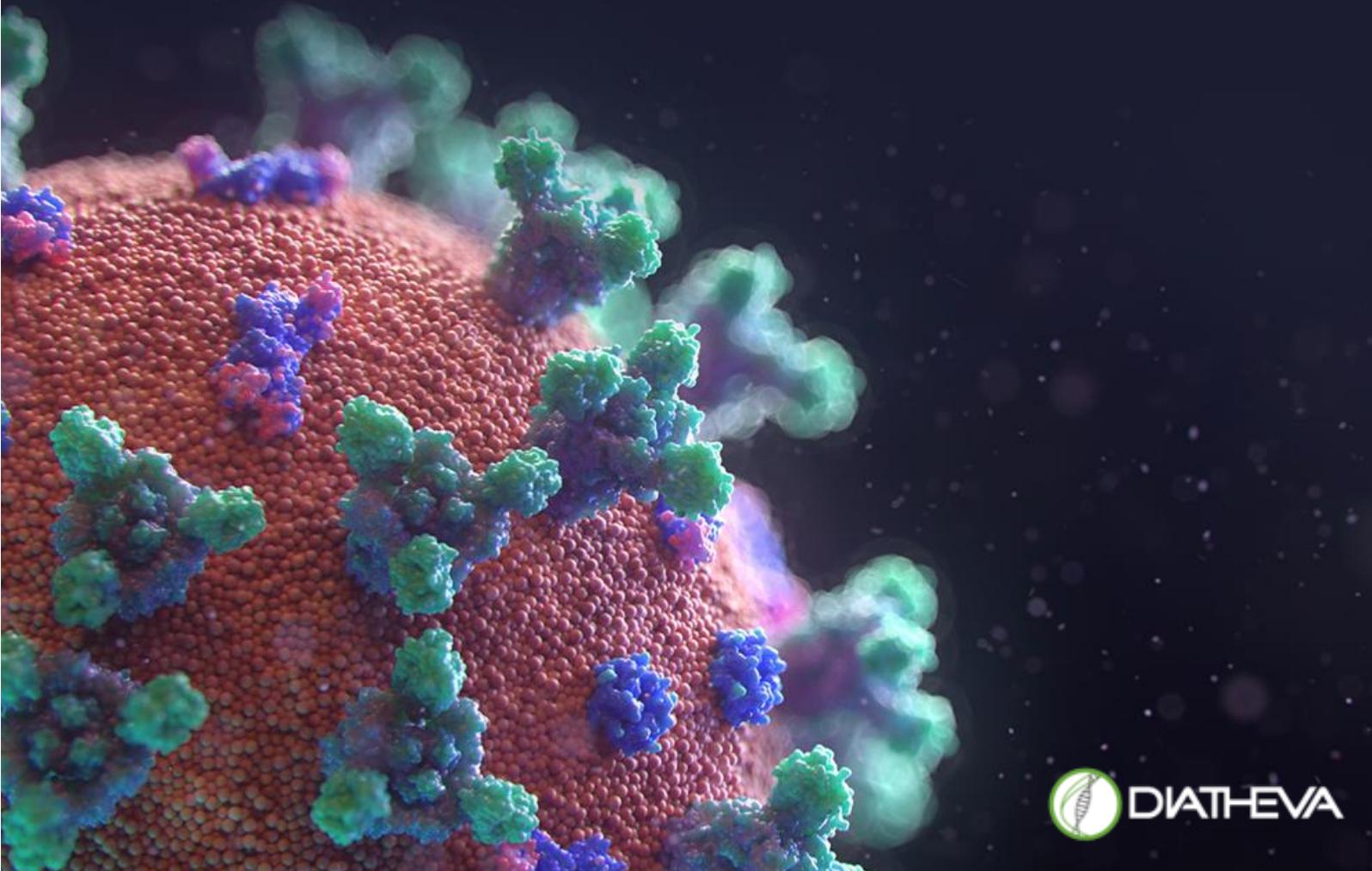


DIATHEVA COVID-19 PCR kit: un nuovo kit, robusto ed altamente sensibile, per una corretta diagnosi anche dei campioni positivi alle nuove varianti del virus

- Un RT PCR kit di nuova generazione con due geni target specifici per SARS-CoV-2, che permettono la corretta diagnosi anche dei campioni positivi alle nuove varianti del virus
- DIATHEVA COVID-19 PCR kit permette di combinare la flessibilità di utilizzo su diversi sistemi di estrazione e piattaforme di real time PCR con l'ottenimento di elevate prestazioni: garanzia di risultati ottimali, riproducibilità del segnale per i campioni anche a più bassa carica virale e maggiore stabilità del controllo interno endogeno.



Introduzione

L'emergenza e la rapida diffusione dell'infezione da SARS-CoV-2 (COVID-19) rappresenta una delle più grandi minacce per la salute Pubblica di interi Paesi e Popolazioni. L'utilizzo di test affidabili per la rilevazione e l'identificazione del virus rappresentano alcune delle chiavi fondamentali per controllare la pandemia. Il test molecolare RT-PCR da tampone naso-faringeo è ad oggi considerato il metodo "gold standard".

Dall'inizio della pandemia sono state scoperte migliaia di mutazioni del virus SARS-CoV-2 che causa la malattia. Le evidenze scientifiche riportano che le varianti del Coronavirus ad oggi note sono caratterizzate da mutazioni nella proteina spike (variante Inglese: VOC 202012/01; variante Sudafricana: 501Y.V2; Brasiliana-Giapponese: P1). Tali mutazioni potrebbero non essere rilevate, erroneamente, da test diagnostici molecolari basati sull'identificazione del gene target S (Spike).

In tale circostanze l'European Centre for Disease and Control Prevention (ECDC) ed il Ministero della Salute, raccomandano una valutazione delle prestazioni degli attuali saggi di RT-PCR suggerendo l'esclusione del gene S (ECDC, 20 Dicembre 2020; Circolare del Ministero della Salute 8 Gennaio 2021).

Inoltre, strategie di testing molto estese stanno facendo emergere, in alcuni casi, problemi di interpretazione dei test molecolari in relazione ai risultati positivi a bassa carica virale ("deboli positivi"), riscontrabili nelle fasi iniziali (più raramente) e tardive (più frequentemente) nell'infezione. L'interpretazione dei risultati "deboli positivi" risulta particolarmente complicata per l'assenza di dati di laboratorio attestanti una pregressa positività e/o per il mancato accesso da parte dei laboratori a informazioni riguardanti la storia clinica e il contesto epidemiologico del paziente.

L'utilizzo di più target virali specifici per la rilevazione di SARS-CoV-2 consente di aumentare la sensibilità del saggio di rilevazione, facilitando l'operatore nella fase di interpretazione dei risultati ottenuti dall'amplificazione dei "deboli positivi".

In questo contesto, Diatheva ha sviluppato un kit di nuova generazione per la rilevazione di due target virali specifici per SARS-CoV-2 (ORF 1b ed N), ad oggi non affetti dalle mutazioni rilevate nelle principali Varianti del Coronavirus oggi note, e in presenza di un controllo endogeno altamente riproducibile e affidabile che permette il monitoraggio dell'intero processo dal campionamento all'analisi del dato finale.

Lo scopo di questo studio è quello di valutare le prestazioni del prodotto Diatheva COVID-19 PCR kit. Inoltre, test comparativi con altri saggi CE-IVD sono stati condotti su pannelli di campioni SARS-CoV-2 positivi, includendo una selezione di campioni "deboli positivi".

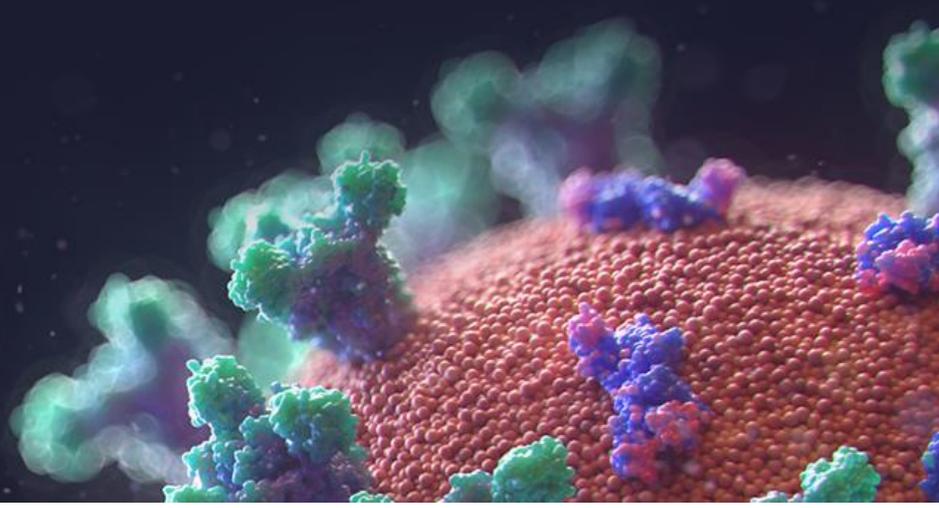
Materiali e metodi

Le prestazioni diagnostiche del Diatheva COVID-19 PCR kit (Cod. Prod.: D-MBK0100, Diatheva) sono state valutate testando campioni delle alte e basse vie respiratorie prelevati da pazienti negativi e positivi a SARS-CoV-2.

Sono stati analizzati un totale di 67 campioni negativi per SARS-CoV-2 per determinare la specificità clinica e 186 campioni positivi per SARS-CoV-2 per la sensibilità clinica.

I campioni sono stati sottoposti ad estrazione di RNA, da parte di laboratori partner accreditati per l'analisi, utilizzando i seguenti sistemi di estrazione automatica: MGISP-960 (MGI), KingFisher™ Flex Purification System (ThermoFisher) e Nextractor NX48-S (Genolution). Tutti i campioni analizzati sono stati precedentemente caratterizzati tramite metodi RT-PCR con marchio CE-IVD. Gli RNA ottenuti sono stati quindi amplificati utilizzando Diatheva COVID-19 PCR kit su strumenti di amplificazione quali CFX96 (Bio-Rad), Rotor Gene Q (Qiagen), Quant Studio 5 e ABI 7500 (Applied Biosystems).

Una selezione di 22 campioni è stata suddivisa in "alti positivi" (n=12) e "deboli positivi" (n=10) sulla base dei valori di Ct ottenuti dai laboratori che hanno fornito gli estratti. Questi estratti sono stati amplificati utilizzando altri tre kit di RT-PCR disponibili sul mercato, certificati CE-IVD, per la rilevazione qualitativa di SARS-CoV-2 secondo le istruzioni fornite dal produttore. L'analisi statistica dei risultati è stata effettuata utilizzando il software GraphPad Prism 5.



Risultati e Discussione

I risultati ottenuti dalla valutazione delle prestazioni del Diatheva COVID-19 PCR kit, analizzando un totale di 253 campioni, sono riassunti in Tabella 1. La sensibilità e la specificità diagnostica ottenute sono del 100% e il Valore Kappa di Cohen è 1.00 (concordanza perfetta con la diagnosi dichiarata dai laboratori partner accreditati) dimostrando che il kit Diatheva è altamente sensibile e specifico.

Tabella 1: Specificità, sensibilità e valore Kappa di Cohen per SARS-CoV-2

SARS-CoV-2		Competitor CE-IVD*		
		Positivi	Negativi	Totale
Diatheva COVID-19 PCR kit	Positivi	186	0	186
	Negativi	0	67	67
	Totale	186	67	253

*Diagnosi di riferimento fornita dai laboratori partner

Dal pannello di campioni SARS-CoV-2 positivi testati sono stati selezionati campioni "alti positivi" e "deboli positivi" per lo studio di comparazione con kit di RT-PCR disponibili in commercio.

I 12 campioni clinici "alti positivi" sono stati correttamente identificati positivi con tutti i kit utilizzati (Diatheva COVID-19 PCR kit, Competitor 1, 2 e 3), nello specifico è stata osservata l'amplificazione per tutti i target dei kit. Per questi campioni il kit Diatheva e i Competitor 1 e 3 mostrano una distribuzione simile di valori di Ct, mentre il Competitor 2 presenta un aumento generico dei valori di Ct. Come osservato in Fig 1A la mediana dei valori di Ct ottenuta per il target N del kit Diatheva ha il valore minore.

Per quanto riguarda i "deboli positivi" il numero dei campioni correttamente diagnosticati con i diversi kit di RT-PCR varia da 8 a 10 su un totale di 10 campioni analizzati.

Figura 1A

Confronto RT-PCR di campioni clinici SARS-CoV-2 positivi ad alta carica virale ("alti positivi")

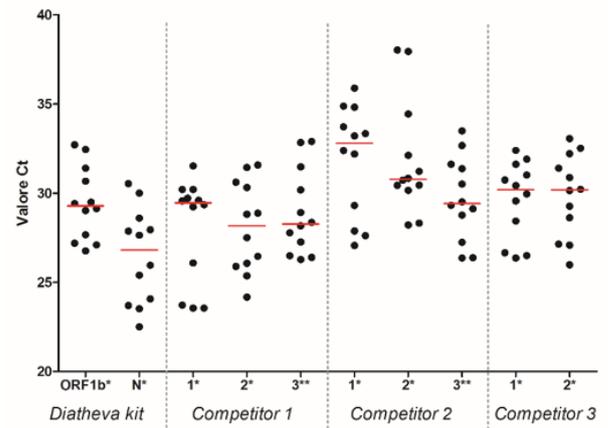


Figura 1B

Confronto RT-PCR di campioni clinici SARS-CoV-2 positivi a bassa carica virale ("deboli positivi")

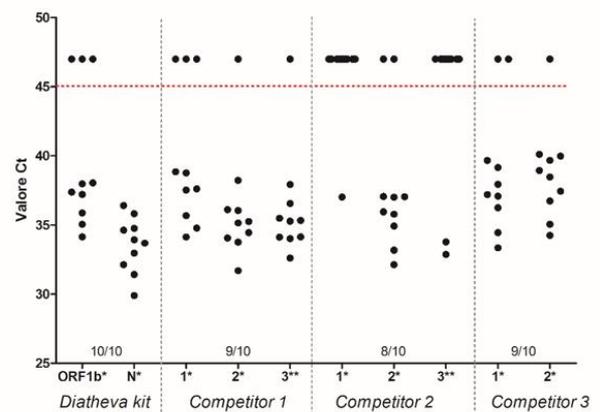


Figura 1. A) Grafico a plot dei valori di Ct ottenuti dall'amplificazione di campioni alti positivi (n=12) utilizzando il Diatheva COVID-19 PCR kit e altri tre kit commerciali (95% IC). La linea rossa mostra la mediana dei Ct per ciascun target dei kit utilizzati. B) Grafico a plot dei valori di Ct ottenuti dall'amplificazione di campioni deboli positivi (n=10) utilizzando il Diatheva COVID-19 PCR kit e altri tre kit commerciali (95% IC). I segnali sopra la linea rossa orizzontale tratteggiata, all'altezza del valore di Ct 45, sono identificati come negativi. Sotto la distribuzione dei segnali ottenuti, viene indicato per ciascun kit il rapporto dei positivi rilevati rispetto al totale dei positivi, ad es.: 10/10 significa che 10 su 10 campioni testati sono stati rilevati come positivi secondo le istruzioni d'uso fornite dal produttore. *gene virale specifico per SARS CoV-2; **gene virale specifico per Beta coronavirus.

L'unico target virale in grado di rilevare correttamente tutti i 10 campioni "deboli positivi" è N utilizzato nel Diatheva COVID-19 PCR kit. Il Competitor 1 ha rilevato un campione come "presunto positivo" secondo le istruzioni fornite dal produttore in quanto si è amplificato solo un gene virale specifico per beta coronavirus (Fig. 1B). Questi risultati dimostrano che il target N del kit Diatheva è il più sensibile tra quelli comparati. Tutti i campioni analizzati sono stati inoltre valutati in termini di segnali di amplificazione, considerando l'intensità di fluorescenza e l'aspetto delle curve. Un

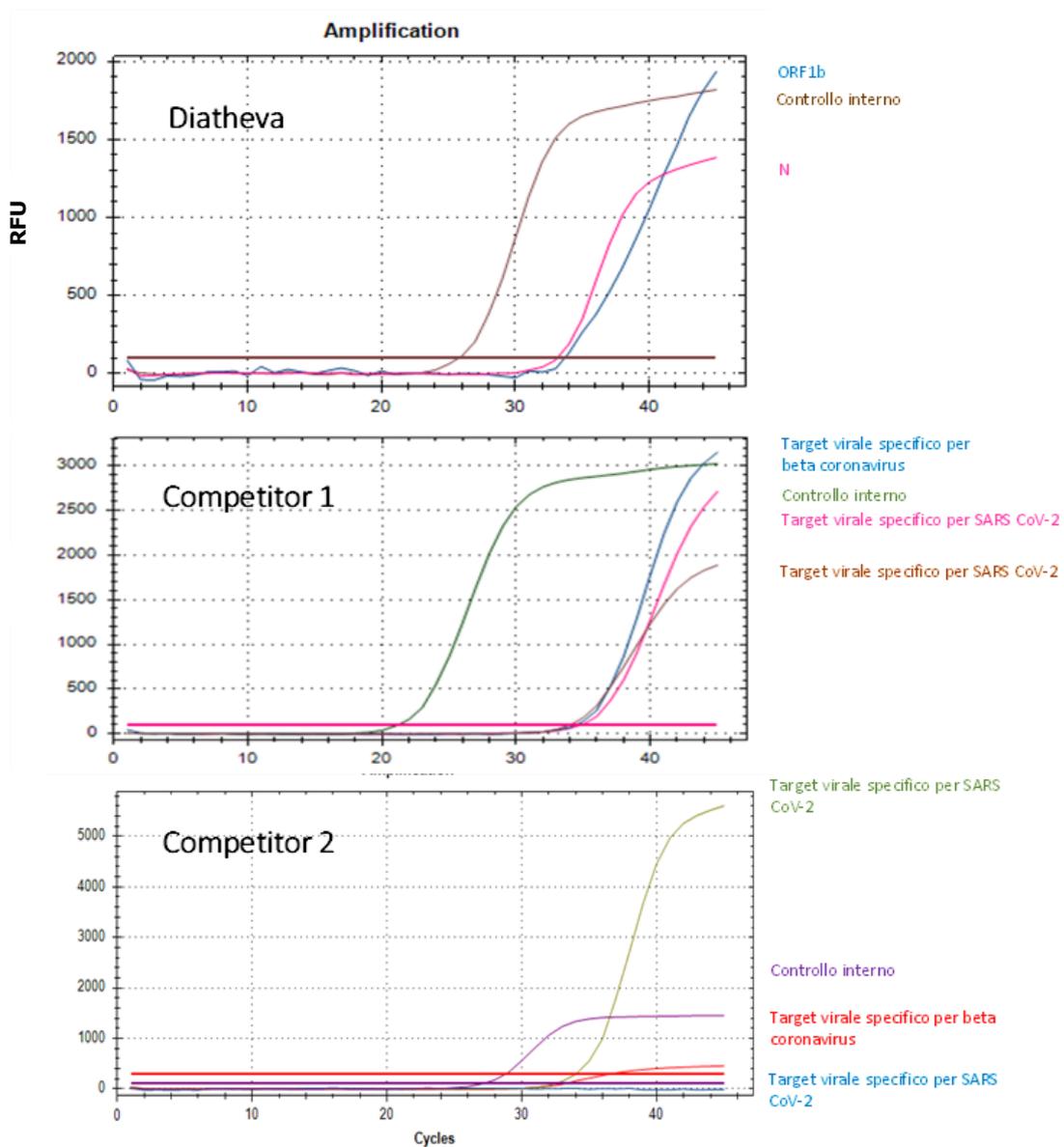


Figura 2. Aspetto tipico delle curve di amplificazione ottenute utilizzando Diatheva COVID-19 PCR kit e altri kit competitor per l'analisi di un campione debole positivo estratto con KingFisher™ Flex Purification System

esempio dei segnali di amplificazione ottenuti in presenza di un campione "debole positivo" è riportato in Fig.2. Come osservato, Diatheva COVID-19 PCR kit permette di ottenere delle curve di amplificazione di facile interpretazione per l'operatore. La stessa considerazione è valida anche per il Competitor 1, mentre con il Competitor 2 solo uno dei target virali specifici mostra una curva di amplificazione di facile interpretazione.

Conclusioni

Dal confronto con gli altri kit CE-IVD si osserva che Diatheva COVID-19 PCR kit permette di ottenere una migliore rilevazione dei campioni "deboli positivi", processati con tre diversi sistemi di

estrazione automatica, mostrando ottime prestazioni diagnostiche e facilitando l'operatore nell'interpretazione dei risultati. Grazie all'amplificazione specifica dei target ORF1b ed N è garantito il rilevamento anche di campioni positivi per la presenza delle varianti del virus al momento più diffuse.

Referenze

- RAPID RISK ASSESSMENT EDCD 21 GENNAIO 2021 OGGETTO: Risk related to the spread of new SARS-CoV-2 variants of concern in the EU/EEA
- CIRCOLARE Ministero della Salute 8 Gennaio 2021 OGGETTO: Aggiornamento della definizione di caso COVID-19 e strategie di testing

Codice Prodotto	Descrizione Prodotto	Tecnologia	Formato
D-MBK0100	DIATHEVA COVID-19 PCR KIT	Real Time RT PCR	96 test

Visita il sito www.diatheva.com per maggiori informazioni

Visita la pagina www.diathevacovid-19.com per informazioni riguardanti tutti i prodotti COVID-19 forniti da Diatheva.

Per informazioni, contattare info@diatheva.com



Diatheva è parte della Divisione Biotecnologie di SOL Group Spa, insieme a Personal Genomics Srl e Cryolab Srl