

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit (IVD)

Test qualitativo per l'uso su strumenti per
RT-PCR in tempo reale

Istruzioni per l'uso

USA: solo su prescrizione medica



REF 12015534

SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos (1 tubo)

Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix (1 tubo)

Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard (2 tubo)

Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative (2 tubo)



Bio-Rad Laboratories, Inc.
4000 Alfred Nobel Drive Hercules, CA USA 94547




















FRANCE, Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré, 92430 Marnes-la-Coquette,

Traduzioni

I documenti del prodotto possono essere forniti in altre lingue su supporti elettronici.

Glossario dei simboli

 Conformità europea	 Produttore	 Rappresentante autorizzato nell'Unione europea
 Numero di lotto	 Data di scadenza	 Per uso diagnostico in vitro
 Limite di temperatura	 Numero di catalogo	 Consultare le istruzioni per l'uso
 Numero di test	 Per l'uso con	 Numero di serie
Rx Only Solo su prescrizione medica	 Identificazione univoca del dispositivo - Identificatore del dispositivo	 Contiene lattice
 Solo per uso di ricerca	 Solo monouso	 Rischio biologico

Note legali

Nessuna parte della presente pubblicazione può essere riprodotta o trasmessa in alcuna forma o mediante alcun mezzo, elettronico o meccanico, fra cui fotocopia, registrazione o qualsiasi sistema di conservazione o recupero delle informazioni, senza l'autorizzazione scritta di Bio-Rad Laboratories.

Bio-Rad si riserva il diritto di modificare i propri prodotti e servizi in qualsiasi momento. Questo manuale di istruzioni è soggetto a modifiche senza preavviso. Sebbene si impegni a garantire l'accuratezza, Bio-Rad non si assume alcuna responsabilità per errori o per danni derivanti dall'applicazione o dall'utilizzo di queste informazioni.

BIO-RAD, HARD-SHELL e MICROSEAL sono marchi di Bio-Rad Laboratories, Inc. in alcune giurisdizioni.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Le piastre Hard-Shell sono coperte da uno o più dei seguenti brevetti statunitensi o dalle rispettive controparti estere di proprietà di Eppendorf AG: brevetti statunitensi numero 7,347,977, 6,340,589 e 6,528,302.

Tutti i marchi utilizzati nel presente documento appartengono ai rispettivi proprietari.

Questo prodotto e/o il suo utilizzo sono coperti da rivendicazioni di brevetti statunitensi e/o domande di brevetto statunitensi e non statunitensi in sospeso, di proprietà o su licenza di Bio-Rad Laboratories, Inc. L'acquisto del prodotto include un diritto limitato e non trasferibile ai sensi di tale proprietà intellettuale per l'utilizzo del prodotto esclusivamente a fini di ricerca interna e diagnostica. Solo per scopi relativi al test COVID-19, Bio-Rad concede i diritti per l'uso del prodotto per applicazioni commerciali di qualsiasi tipo, inclusi ma non limitati a produzione, controllo di qualità o servizi commerciali, come servizi contrattuali o pagamenti per servizi erogati. Le informazioni relative a una licenza per tali usi possono essere richieste a Bio-Rad Laboratories. Per qualsiasi scopo diverso dal test COVID-19, è responsabilità dell'acquirente/utente finale acquisire ulteriore diritti di proprietà intellettuale eventualmente necessari.

Avvertenze e precauzioni per il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Per uso diagnostico in vitro. Per uso professionale sanitario.

Questo kit di test deve essere manipolato esclusivamente da personale qualificato, con una formazione adeguata sulle procedure di laboratorio e a conoscenza dei potenziali rischi. Indossare indumenti protettivi, guanti e protezioni per occhi/viso adeguati e manipolare in modo appropriato secondo le buone pratiche di laboratorio richieste.

Dispositivi di protezione individuale (DPI)

Si consiglia di indossare correttamente i guanti durante l'uso di componenti e piastre per campioni. Tutti i guanti con capacità di protezione ridotta devono essere eliminati e sostituiti. Considerare la tossicità delle sostanze chimiche e fattori come la durata dell'esposizione, la conservazione e la temperatura quando si decide di riutilizzare guanti esposti ad agenti chimici. Caratteristiche per facilitare la selezione dei guanti per la manipolazione di macchine, test, oli e solventi per la pulizia:

- I guanti in butile sono realizzati in gomma sintetica e proteggono da perossido, acido fluoridrico, basi forti, alcoli, aldeidi e chetoni.
- I guanti in gomma naturale (lattice) sono comodi da indossare e presentano un'eccezionale resistenza alla trazione, elasticità e resistenza alla temperatura.
- I guanti in neoprene sono realizzati in gomma sintetica e offrono buona flessibilità, destrezza delle dita, alta densità e resistenza allo strappo; proteggono da alcoli, acidi organici e alcali.
- I guanti in nitrile sono realizzati con un copolimero e forniscono protezione dai solventi clorurati come il tricloroetilene e il tetracloroetene; offrono protezione quando si lavora con oli, grassi, acidi e sostanze caustiche.

Sommario

Traduzioni	2
Glossario dei simboli	2
Note legali	2
Avvertenze e precauzioni per il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit.....	3
Dispositivi di protezione individuale (DPI)	3
Uso previsto	6
Riepilogo e principio	6
Flusso di lavoro del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit.....	7
Reagenti e strumenti.....	7
Materiali forniti.....	7
Materiali necessari, ma non forniti.....	8
Precauzioni e avvertenze generali	9
Raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni	10
Uso di materiali di controllo.....	11
Manipolazione e conservazione dei reagenti	11
Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit	11
Aree di lavoro.....	11
Manipolazione generale	12
Protocollo del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit	12
Panoramica	12
Estrazione di acidi nucleici	13
Preparazione della reazione RT-PCR in un passaggio (one-step)	13
Configurazione dello strumento Bio-Rad CFX96 Dx.....	14
Esecuzione della piastra RT-PCR sul sistema per PCR in tempo reale CFX96 Dx	16
Analisi dei dati sul sistema per PCR in tempo reale CFX96 Dx.....	16
Configurazione dello strumento AB7500 Fast Dx	17
Analisi dei dati sul sistema per PCR in tempo reale AB7500 Fast Dx.....	18
Interpretazione dei risultati	18
Controlli del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit: NTC, positivo e negativo.....	18
Analisi e interpretazione dei risultati dei campioni dei pazienti	19
Limitazioni.....	21
Caratteristiche delle prestazioni analitiche	22
Sensibilità analitica	22

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Sequenze rilevabili	24
Specificità analitica (reattività crociata)	25
Valutazione clinica	27
Bibliografia	28
Appendice A: Protocollo di qualificazione dello strumento	29
Appendice B: Studio sull'equivalenza dei campioni	31

Uso previsto

Il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) Assay Kit è indicato per il rilevamento qualitativo di acido nucleico da SARS-CoV-2 in campioni delle vie aeree superiori, tra cui campioni di tamponi nasofaringei, tamponi nasali dei turbinati medi, tamponi orofaringei e tamponi nasali anteriori di soggetti con sospetto di COVID-19 da parte del proprio medico. I risultati servono per l'identificazione dell'RNA SARS-CoV-2, generalmente rilevabile nei campioni delle vie respiratorie superiori durante la fase acuta dell'infezione. I risultati positivi sono indicativi della presenza di RNA SARS-CoV-2; per determinare lo stato di infezione del paziente è necessaria la correlazione clinica con l'anamnesi del paziente e altre informazioni diagnostiche. I risultati positivi non escludono l'infezione batterica o la coinfezione con altri virus. I risultati negativi non precludono l'infezione da SARS-CoV-2 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 Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit è destinato all'uso da parte di personale di laboratorio clinico qualificato specificamente formato e istruito sulle tecniche di RT-PCR e sulle procedure diagnostiche in vitro.

Riepilogo e principio

Il 31 dicembre 2019 viene identificato e segnalato all'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) un focolaio di casi di polmonite causato da un nuovo coronavirus (SARS-CoV-2) nella città cinese di Wuhan, nella provincia di Hubei. La rapida diffusione della SARS-CoV-2 in numerose aree del mondo richiede prontezza e reattività di risposta nelle strutture sanitarie e di laboratorio. La disponibilità di test specifici e sensibili per il rilevamento del virus è essenziale per una diagnosi accurata dei casi, la valutazione dell'estensione dell'epidemia, il monitoraggio delle strategie di intervento e gli studi di sorveglianza.

Il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit è un test diagnostico molecolare in vitro contenente i reagenti necessari per eseguire un test RT-PCR. I set di primer e sonde sono progettati per rilevare l'RNA del virus SARS-CoV-2 in campioni delle vie aeree superiori, tra cui campioni di tamponi nasofaringei, tamponi nasali dei turbinati medi, tamponi orofaringei e tamponi nasali anteriori di soggetti con sospetto di COVID-19. Ulteriori analisi e procedure di conferma devono essere eseguite in consultazione con la sanità pubblica e/o altre autorità alle quali è richiesta la segnalazione. Anche i risultati dei test devono essere riferiti in conformità ai requisiti normativi. L'efficacia non è nota nei pazienti asintomatici.

Le sonde e i primer oligonucleotidici per il rilevamento di SARS-CoV-2 sono gli stessi riportati dal Centro statunitense per il controllo e la prevenzione delle malattie (CDC, Center for Disease Control and Prevention) e sono stati selezionati dalle regioni del gene (N1 e N2) del nucleocapside del virus. Il pannello è progettato per il rilevamento specifico del SARS-CoV-2 (due set di primer/sonda). Nel pannello è incluso anche un set di primer/sonda aggiuntivo per rilevare il gene RNase P (*RP*) umano nei campioni di controllo e nei campioni clinici. Per eseguire un test, l'RNA viene isolato e purificato dai campioni di controllo e dai campioni clinici, quindi aggiunto a una master mix realizzata utilizzando Bio-Rad Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix. La master mix include una trascrittasi inversa che trascrive l'RNA in cDNA e una DNA polimerasi che amplifica i frammenti di cDNA che condividono l'omologia con i set di primer/sonda. L'amplificazione di target specifici è monitorata dalla variazione dell'intensità della fluorescenza all'interno di specifiche lunghezze d'onda di eccitazione/emissione utilizzando uno strumento per PCR in tempo reale.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit può essere utilizzato con i sistemi per PCR in tempo reale CFX96 Dx di Bio-Rad e Applied Biosystems 7500 Fast Dx di Thermo Fisher Scientific, Inc. (Tabella 1). Il flusso di lavoro si articola in quattro passaggi (Tabella 2).

Tabella 1. Strumenti necessari

Numero di catalogo	Nome del prodotto	Software
12014330	CFX Opus 96 Dx	Software CFX Maestro Dx SE v 2.0 e versioni successive
1845097-IVD 1841000-IVD	CFX96 Dx ORM Termociclatore C1000 Dx	Software CFX Manager Dx v 3.1 e versioni successive
4406985 o 4406984	Sistema per PCR in tempo reale Applied Biosystems 7500 Fast Dx	Software SDS v1.4.1 e versioni successive

Flusso di lavoro del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Tabella 2. Flusso di lavoro del Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Flusso di lavoro	
Passaggio 1	Isolamento dell'RNA virale dai campioni delle vie aeree superiori, tra cui campioni di tamponi nasofaringei, tamponi nasali dei turbinati medi, tamponi orofaringei o tamponi nasali anteriori
Passaggio 2	Impostazione della piastra per RT-PCR
Passaggio 3	Retrotrascrizione in un passaggio (one-step) e PCR
Passaggio 4	Analisi

Reagenti e strumenti

Materiali forniti

Il Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit contiene reagenti sufficienti per processare un totale di 200 reazioni (Tabella 3).

Tabella 3. Materiali necessari inclusi nel kit per il Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Nome del prodotto	Numero di riferimento	QTÀ (Provette)	Volume (µl)	Condizioni di conservazione, °C
4x Reliance One-Step Multiplex Supermix	12010177	1	1000	-20 °C
Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard	16008441	2	300	-20 °C
Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative	16008440	2	300	-20 °C
SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos	12014116	1	300	-20 °C

Nota: le schede di dati di sicurezza (SDS) sono disponibili sul sito bio-rad.com

Materiali necessari, ma non forniti

Reagenti e materiali di consumo:

Reagenti per la purificazione dell'RNA

Il kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMAX di Thermo Fisher Scientific (n. di catalogo A48310, n. A42352) e il QIAGEN QIAamp Viral Mini Kit (n. di catalogo 52906, n. 52904) sono validati per l'uso con il Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit conformemente alle istruzioni del produttore.

Nota: l'estrazione automatizzata (su QIAcube o Kingfisher) utilizzando questi kit è supportata dai produttori e richiede la convalida.

Reagenti e materiali di consumo generici per PCR in tempo reale

Il tampone fosfato salino, pH 7,4 (Thermo Fisher n. di catalogo 10010023 o equivalente) è necessario per preparare i controlli. I materiali aggiuntivi necessari, ma non forniti per utilizzare il Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit sui sistemi per PCR in tempo reale Bio-Rad e Thermo Fisher Scientific sono elencati nella Tabella 4 e Tabella 5.

Tabella 4. Materiali necessari, ma non forniti per l'esecuzione sui sistemi per PCR in tempo reale CFX Opus 96 Dx e CFX96 Dx

Catalogo Bio-Rad n.	Nome	QTÀ (ciascuno)	Condizioni di conservazione
MSB1001	Pellicola sigillante per piastre PCR Microseal 'B', adesiva, ottica	100	Da 15 °C a 30 °C
HSP9955 o equivalente*	HSP9955, piastre per PCR Hard-Shell a 96 pozzetti, profilo basso, parete sottile, con bordo, bianco/bianco	50	Da 15 °C a 30 °C

*Per altre piastre per PCR a 96 pozzetti con struttura superiore colorata e pozzetti di colore bianco, fare riferimento alla brochure sulle piastre per PCR Hard-Shell di Bio-Rad 5496

Tabella 5. Materiali necessari, ma non forniti per l'esecuzione sul sistema per PCR in tempo reale AB7500 Fast Dx

Catalogo Thermo Fisher Scientific n.	Nome del prodotto	QTÀ (ciascuno)	Condizioni di conservazione
4311971	Pellicola adesiva ottica MicroAmp	100	Da 15 °C a 30 °C
4346906	Piastra per reazione ottica veloce a 96 pozzetti con codice a barre, 0,1 ml	20	Da 15 °C a 30 °C

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Strumentazione, software e attrezzatura da laboratorio generale:

L'attrezzatura da laboratorio generale necessaria, ma non fornita per eseguire il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit è elencata nella Tabella 6.

Tabella 6. Attrezzatura da laboratorio generale necessaria, ma non fornita

Descrizione	Fonte
Pipette regolabili mono e multicanales (da 1,00 µl a 1.000 µl)	Rainin o Eppendorf
Microcentrifuga	Più fornitori
Centrifuga per piastre a micropozzetti, con un rotore che ospita micropiastre standard	Più fornitori
Agitatore da laboratorio, miscelatore vortex o equivalente	Più fornitori
Congelatori da laboratorio <ul style="list-style-type: none">• da -30 °C a -10 °C• ≤ -70 °C	Più fornitori
Blocco freddo da 96 pozzetti o ghiaccio	Più fornitori
Provette per microcentrifuga antiaderenti prive di RNasi (1,5 ml e 2,0 ml)	Più fornitori
Puntali per pipette sterili con barriera aerosol (filtrati)	Più fornitori

Precauzioni e avvertenze generali

1. Solo per uso diagnostico in vitro (IVD).
2. Solo per uso professionale.
3. I risultati positivi sono indicativi della presenza di RNA SARS-CoV-2.
4. Tutti i campioni biologici devono essere trattati come potenzialmente infettivi. Utilizzare procedure di laboratorio sicure.
5. Pulire e disinfettare accuratamente tutte le superfici di lavoro con una soluzione fresca di ipoclorito di sodio allo 0,5% (candeggina al 10%) in acqua deionizzata o distillata, seguita da alcol al 70%.
6. Per ridurre al minimo la contaminazione da acido nucleico, decontaminare regolarmente il banco, i pipettatori e le apparecchiature, separare quindi l'area di manipolazione del campione e dell'RNA/DNA dall'area di preparazione del test.
7. Ottimizzare il flusso di lavoro e lo spazio per ridurre al minimo il rischio di contaminazione da carryover dalle reazioni PCR completate.
8. Assicurarsi che il sistema per PCR in tempo reale e il sistema di automazione abbiano uno spazio dedicato in aree separate per evitare la contaminazione da ampliconi.
9. Eseguire la configurazione del test e l'aggiunta del template in posizioni diverse con pipettatori dedicati.
10. Utilizzare procedure di sicurezza di laboratorio adeguate per lavorare con sostanze chimiche e manipolare i campioni.
11. Cambiare frequentemente i guanti quando si trasferiscono e si lavora con reagenti diversi.
12. La mancata osservanza delle procedure e delle condizioni descritte in questo documento può causare risultati errati ed effetti negativi.
13. Non sostituire i reagenti del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit con altri reagenti.
14. La configurazione e l'aggiunta del template devono essere eseguite in condizioni prive di RNasi/DNasi.
15. Si consiglia di verificare adeguatamente gli strumenti prima dell'uso con il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit utilizzando protocolli di test consolidati. Fare riferimento al protocollo di qualificazione dello strumento fornito nell'Appendice A.

16. Assicurarsi che la manutenzione e la calibrazione regolari vengano eseguite su tutte le apparecchiature secondo le raccomandazioni del produttore.
17. Utilizzare puntali e reagenti privi di nucleasi e pulire regolarmente i pipettatori.
18. Assicurarsi che venga utilizzato solo il protocollo dei cicli termici consigliato.
19. Non utilizzare acqua trattata con dietil pirocarbonato (DEPC) per l'amplificazione PCR.
20. Seguire attentamente le procedure e le linee guida fornite per garantire che il test venga eseguito correttamente. Qualsiasi deviazione dalle procedure e dalle linee guida può influire sulle prestazioni ottimali del test.
21. Possono verificarsi risultati falsi positivi se il carryover dei campioni non viene adeguatamente controllato durante la manipolazione e l'elaborazione dei campioni.

Raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni

La raccolta, la conservazione e il trasporto adeguati e appropriati dei campioni sono importanti per ottenere risultati dei test sensibili e accurati. Per garantire campioni e risultati di buona qualità, è altamente consigliata una formazione sulle corrette procedure di raccolta dei campioni. Una risorsa appropriata cui fare riferimento è rappresentata da CLSI MM13-Ed2 (agosto 2020).

1. Criteri di accettazione dei campioni
 - I campioni devono essere raccolti in provette sterili etichettate e spediti secondo i requisiti del laboratorio di analisi.
2. Criteri di rifiuto dei campioni
 - I campioni che non sono stati pre-approvati per il test e quelli etichettati in modo improprio non verranno analizzati fino a quando non si otterranno le informazioni richieste.
3. Raccolta del campione
 - Per la raccolta, la manipolazione e l'analisi di campioni clinici dei pazienti, in relazione alla malattia da coronavirus 2019 (COVID-19), fare riferimento alle linee guida del CDC o dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS).
 - Seguire le istruzioni del produttore per un uso corretto dei dispositivi di raccolta dei campioni.
 - I campioni di tampone devono essere raccolti utilizzando solo tamponi con punta sintetica, come nylon o Dacron®, e un'asta in alluminio o plastica. I tamponi di alginato di calcio sono inaccettabili e i tamponi di cotone con aste di legno sono sconsigliati. Posizionare immediatamente i tamponi in provette sterili contenenti 2-3 ml di terreno di trasporto virale o terreno di trasporto universale.
4. Trasporto di campioni
 - I campioni devono essere imballati, spediti e trasportati secondo l'edizione vigente del regolamento sulle merci pericolose della International Air Transport Association (IATA). Seguire le norme di spedizione per la sostanza biologica UN 3373, categoria B quando si inviano potenziali campioni 2019-nCoV al laboratorio di analisi.
 - Conservare i campioni a 2-8 °C e spedirli con servizio di consegna il giorno successivo al laboratorio di analisi in un impacco di ghiaccio. Se un campione viene congelato a una temperatura di -70 °C o inferiore, spedirlo con servizio di consegna il giorno successivo al laboratorio di analisi in ghiaccio secco.
5. Conservazione dei campioni
 - I campioni possono essere conservati a 2-8 °C fino a 72 ore dopo la raccolta.
 - Se si prevede un ritardo nell'estrazione, conservare i campioni a una temperatura di -70 °C o inferiore.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

- L'acido nucleico estratto deve essere conservato a 4 °C se deve essere utilizzato entro 4 ore, oppure a -70 °C o a una temperatura inferiore se conservato per più di 4 ore.

Uso di materiali di controllo

Controlli da utilizzare con il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit:

- È necessario un controllo senza templatato (NTC) per rilevare la contaminazione del reagente e/o dell'ambiente. Un NTC utilizza acqua priva di RNasi/DNasi al posto di un campione clinico con un minimo di un pozzetto per piastra di reazione.
- È necessario un controllo positivo per rilevare un errore sostanziale della retrotrascrizione e/o del reagente, inclusa l'integrità del primer e della sonda. Il test utilizza Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard prodotto con trascritti di RNA sintetici contenenti cinque geni target: *geni E, N, ORF1ab, RdRP e S* di SARS-CoV-2, ciascuno quantificato a 200.000 copie/ml insieme al background di DNA genomico umano. Questo materiale di controllo viene addizionato in una matrice simile a un campione per ottenere una concentrazione finale di 1.000 copie/ml e l'acido nucleico viene estratto. È necessario includere un controllo positivo per lotto di campioni estratti, con un minimo di un pozzetto di controllo positivo per piastra di reazione.
- È necessario un controllo negativo per rilevare il fallimento del passaggio di estrazione o la contaminazione ambientale/del reagente. Il test utilizza Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative prodotto con DNA e RNA genomici umani. Questo materiale di controllo viene addizionato in una matrice simile a un campione e l'acido nucleico viene estratto. È necessario includere un controllo negativo per lotto di campioni estratti, con un minimo di un pozzetto di controllo negativo per piastra di reazione.

Manipolazione e conservazione dei reagenti

Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

- Il kit contiene supermix per PCR in tempo reale, oligonucleotidi per test, standard e controllo negativo.
- Si consiglia la conservazione a -20 °C, con cicli minimi di congelamento-scongelo.

Aree di lavoro

È necessario adottare tutte le necessarie precauzioni di sicurezza secondo le buone linee guida di laboratorio. È inoltre necessario adottare precauzioni per prevenire la contaminazione crociata dei campioni.

Utilizzare aree di lavoro separate per:

- Estrazione di acidi nucleici.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

- Preparazione dei reagenti (ad esempio, preparazione della master mix).
 - Non portare alcuna reazione amplificata, soluzione target o campioni clinici nell'area di preparazione dei reagenti. Dopo aver lavorato in quest'area, il camice da laboratorio e i guanti devono essere cambiati prima di passare all'area in cui vengono aggiunti gli acidi nucleici.
- Aggiunta di acidi nucleici.
- Strumentazione (ad esempio, termociclatori).

Manipolazione generale

Quando si lavora con l'RNA, è sempre necessario utilizzare una tecnica microbiologica asettica appropriata. Le mani e le particelle di polvere possono trasportare batteri e muffe e sono le fonti più comuni di contaminazione da RNasi. Durante la manipolazione di reagenti, provette e campioni di RNA, indossare sempre guanti in lattice, vinile o nitrile senza polvere per prevenire la contaminazione da RNasi dalla superficie della pelle o dalle attrezzature da laboratorio. Cambiare frequentemente i guanti e tenere chiuse le provette. Durante la procedura, lavorare rapidamente e mantenere tutto su blocchi freddi quando possibile per evitare la degradazione dell'RNA da parte di RNasi endogene o residue. Pulire le superfici di lavoro, le pipette, ecc. con candeggina al 10% o altre soluzioni che possono distruggere gli acidi nucleici e le RNasi. Per eliminare il deterioramento accelerato di plastica e metalli, pulire con il 70% di etanolo dopo aver usato il 10% di candeggina. Assicurarsi che tutta la candeggina sia stata rimossa per eliminare possibili reazioni chimiche tra candeggina e tiocianato di guanidina, presente nei reagenti di estrazione.

Protocollo del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Panoramica

Il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit è indicato per il rilevamento qualitativo dell'RNA del virus SARS-CoV-2 in campioni delle vie aeree superiori, tra cui campioni di tamponi nasofaringei, tamponi nasali dei turbinati medi, tamponi orofaringei e tamponi nasali anteriori. Il dosaggio rileva due regioni del gene nucleocapsidico SARS-CoV-2 (*denominate N1 e N2*) e un gene *RP* umano espresso costitutivamente, tutto in una reazione. Il rilevamento dell'RNA virale non solo aiuta nella diagnosi della malattia, ma fornisce anche informazioni epidemiologiche e di sorveglianza.

Il test si compone di due passaggi principali: (1) estrazione dell'RNA dai campioni dei pazienti e (2) retrotrascrizione in un passaggio (one-step) e amplificazione tramite reazione a catena della polimerasi dei target *N1 e N2* specifici per il rilevamento dell'infezione virale da SARS-CoV-2, e amplificazione del target *RP* per la rilevazione dell'acido nucleico umano di background nel campione del paziente.

Descrizione dei passaggi del test

Gli acidi nucleici vengono isolati e purificati dai campioni delle vie respiratorie superiori utilizzando il kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMAX di Thermo Fisher Scientific o il QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit, seguendo le istruzioni del produttore. Gli acidi nucleici purificati vengono retrotrascritti e amplificati utilizzando Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix. SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos contiene una miscela di primer e sonde per i target SARS-CoV-2 (*N1 e N2*) e il gene *RP* umano per consentire il rilevamento in multiplex dei target.

Estrazione di acidi nucleici

Le prestazioni del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit dipendono dalla quantità e dalla qualità dell'RNA stampo purificato da campioni umani. I seguenti kit e procedure di estrazione commerciali sono stati qualificati e validati per la resa e la purezza dell'RNA da utilizzare con il test:

- Kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMAX Thermo Fisher Scientific (n. di catalogo A48310, n. A42352).
- QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit (n. di catalogo 52906, n. 52904).

Per l'estrazione del campione, seguire le procedure consigliate dal produttore. In ogni lotto di estrazione devono essere inclusi un controllo positivo e un controllo negativo.

Nota: l'estrazione automatizzata (su QIAcube o Kingfisher) utilizzando questi kit è supportata dai produttori e richiede la convalida.

Preparazione dei controlli

Controllo positivo: Aggiungere 5 µl di Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard in una provetta contenente 995 µl di tampone fosfato salino (PBS). Trattare come un campione del paziente ed elaborare per l'estrazione dell'acido nucleico insieme ad altri campioni secondo le istruzioni del produttore.

Controllo negativo: Aggiungere 5 µl di Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative in una provetta contenente 995 µl di PBS. Trattare come un campione del paziente ed elaborare per l'estrazione dell'acido nucleico insieme ad altri campioni secondo le istruzioni del produttore.

Preparazione della reazione RT-PCR in un passaggio (one-step)

1. Assicurarsi che i campioni di RNA estratti siano scongelati in ghiaccio.

Nota: non miscelare i campioni di RNA con il vortex. I campioni di RNA possono essere miscelati scuotendo le provette, proseguendo con una breve centrifugazione per raccogliere il contenuto sul fondo delle provette.

2. Scongela tutti i componenti del kit in ghiaccio.
3. Miscelare brevemente con il vortex ogni provetta per garantire l'omogeneità, quindi centrifugare per raccogliere il contenuto sul fondo di ciascuna provetta.

Nota: il Reliance One-Step Multiplex Supermix è viscoso. È fondamentale miscelare con il vortex prima di iniziare la preparazione della miscela del test.

4. Preparazione della master mix RT-PCR:
 - a. Preparare una master mix in base al numero di campioni del paziente e controlli da analizzare più il 10% in più di volume (Tabella 7) quando viene analizzato più di 1 campione.
 - b. Miscelare brevemente con il vortex la master mix e centrifugare per raccogliere il contenuto sul fondo della provetta.

Tabella 7. Volumi dei componenti della master mix RT-PCR

Componente	Volume per 1 campione (µl)	Volume per 96 campioni (µl)	Volume per N campioni (µl)
Reliance One-Step Multiplex RT-qPCR Supermix	5,0	528	(5,0 x N) x 1,1
SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos	1,5	158	(1,5 x N) x 1,1
Acqua priva di RNasi/DNasi	3,5	370	(3,5 x N) x 1,1
Volume per reazione	10,0	1.056	(10,0 x N) x 1,1

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

5. Dispensare 10 µl della master mix nei pozzetti appropriati della piastra RT-PCR.
6. Aggiungere 10 µl di acqua priva di RNasi/DNasi in un pozzetto per un NTC.
7. Aggiungere 10 µl di materiale di controllo negativo in un pozzetto per un controllo negativo.
8. Aggiungere 10 µl di materiale di controllo positivo in un pozzetto per un controllo positivo.
9. Per i rimanenti pozzetti, aggiungere 10 µl di campione di RNA estratto per pozzetto.
10. Sigillare la piastra con pellicola sigillante per piastre PCR Microseal 'B' o pellicola adesiva ottica MicroAmp.
11. Miscelare con il vortex la piastra per 30 secondi ad alta velocità.
12. Centrifugare la piastra di reazione RT-PCR per 30 secondi a 1.000 RCF per rimuovere eventuali bolle d'aria e consentire alla reazione RT-PCR di depositarsi sul fondo dei pozzetti. Se rimangono delle bolle, centrifugare di nuovo la piastra.
13. Procedere con il caricamento della piastra di reazione RT-PCR su uno strumento per PCR in tempo reale CFX Opus 96 Dx, CFX96 Dx o AB7500 Fast Dx.

Configurazione dello strumento Bio-Rad CFX96 Dx

Le seguenti istruzioni si riferiscono all'esecuzione del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit su un sistema per PCR in tempo reale CFX96 Dx controllato da computer. Per informazioni più dettagliate, fare riferimento al manuale dello strumento.

L'uso del software Bio-Rad CFX Maestro Dx SE o CFX Manager Dx prevede tre fasi per un'analisi RT-PCR:

1. Impostazione del protocollo
2. Impostazione della piastra
3. Esecuzione della reazione di RT-PCR

Impostazione del protocollo dei cicli per il sistema per PCR in tempo reale CFX Opus 96 Dx o CFX96 Dx

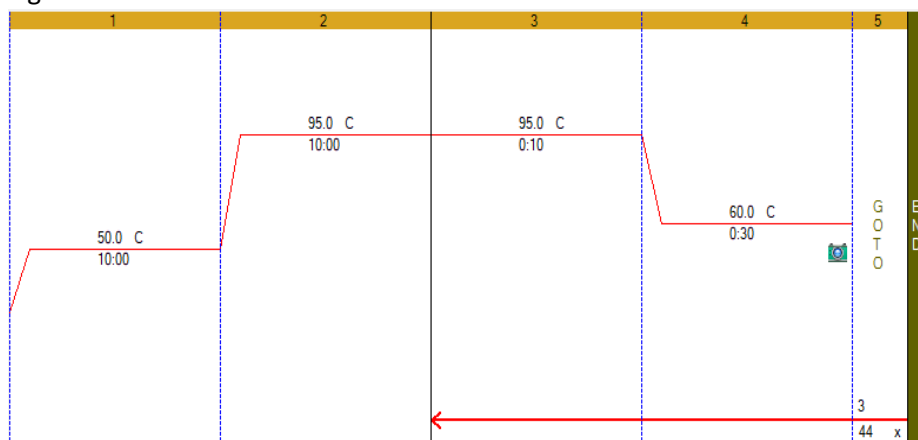
1. Fare clic su **File** (File) -> **New** (Nuovo) -> **Protocol** (Protocollo) nella barra dei menu per aprire l'editor del protocollo.
2. Modificare il volume del campione in 20 µl.
3. Modificare il protocollo dei cicli secondo le linee guida riportate nella Tabella 8 sottostante:

Tabella 8. Protocollo dei cicli termici

Numero di passaggio	Passaggio del ciclo	Temperatura (°C)	Durata	Cicli
1	Retrotrascrizione	50	10 minuti	1
2	Attivazione enzimatica	95	10 minuti	1
3	Denaturazione	95	10 secondi	45
4	Annealing/estensione/lettura piastra	60	30 secondi	
5	Andare al passaggio 3 e ripetere 44 volte	--	--	

4. Confermare che il passaggio 4 includa una lettura della piastra, come indicato dal simbolo di una fotocamera nel passaggio.
5. Per aggiungere una lettura piastra al passaggio 4, fare clic sul passaggio per evidenziarla, quindi fare clic su **Add Plate Read to Step** (Aggiungi lettura piastra al passaggio).

Figura 1: Protocollo dei cicli finale



6. Salvare il protocollo facendo clic su **File** (File) -> **Save As** (Salva con nome).
7. Denominare il file di protocollo "**Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Protocol**".
8. Fare clic su OK per uscire dalla schermata Protocol Editor (Editor protocollo).

Impostazione della piastra per il sistema per PCR in tempo reale CFX Opus 96 Dx o CFX96 Dx

1. Fare clic su **File** (File) -> **New** (Nuovo) -> **New Plate** (Nuova piastra) nella barra dei menu per aprire l'editor piastra.
2. Selezionare **Settings** (Impostazioni) -> **Plate Size** (Dimensioni piastra) selezionare 96 pozzetti.
3. Selezionare **Settings** (Impostazioni) -> **Plate Type** (Tipo di piastra) selezionare BR White (BR bianco).
4. Espandere il menu a tendina a destra di **Scan Mode** (Modalità di scansione) e selezionare **All Channels** (Tutti i canali).
5. Evidenziare i pozzetti sulla piastra che conterranno i campioni e i controlli. Per evidenziare tutti i pozzetti, fare clic sull'angolo superiore sinistro dell'immagine della piastra.
6. Fare clic su **Select Fluorophores** (Seleziona fluorofori) e selezionare FAM, HEX e Texas Red spuntando la casella Selected (Selezionato) a destra del fluoroforo (deselezionare SYBR). Fare clic su OK per applicare le modifiche.
7. Definire il tipo di campione per ogni pozzetto evidenziando i pozzetti, quindi scegliere l'identificatore appropriato dal menu a tendina Sample Type (Tipo di campione).
8. Applicare i **nomi dei target e i fluorofori** a tutti i pozzetti evidenziando i pozzetti e quindi selezionando la casella Load (Carica) a sinistra di ciascuno dei fluorofori elencati nella sezione Target Name (Nome target). Per includere il nome del target, sostituire <none> (nessuno) nella casella di testo aperta a destra del fluoroforo con quanto segue:
 - FAM – SARS-CoV-2 (N1)
 - HEX – SARS-CoV-2 (N2)
 - Texas – RNase PSuggerimento: fare clic su Enter (Invio) dopo aver modificato ogni nome target da applicare al layout della piastra.
9. Salvare il file facendo clic su **File** (File) -> **Save As** (Salva con nome).
10. Denominare il file della piastra "**Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Plate Setup**".
11. Fare clic su **Save** (Salva) per applicare le modifiche.
12. Chiudere il file facendo clic su **File** (File) -> **Close** (Chiudi).

Esecuzione della piastra RT-PCR sul sistema per PCR in tempo reale CFX96 Dx

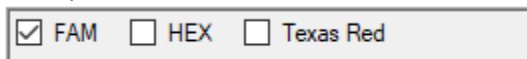
1. Selezionare lo strumento dal menu a tendina Select Instrument (Seleziona strumento) nella procedura guidata di avvio.
2. Fare clic su User-defined (Definito dall'utente) nella sezione Select run type (Seleziona tipo di analisi) della procedura guidata di avvio. Si aprirà il pannello Run Setup (Impostazione analisi).
3. Fare clic su **Select Existing** (Seleziona esistente) nella scheda del protocollo.
4. Selezionare il file del protocollo dei cicli "**Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-PCR Protocol.prcl**".
5. Fare clic su Open (Apri) per applicare le impostazioni.
6. Verificare che il protocollo dei cicli sia come mostrato nella Tabella 8.
7. Fare clic sulla scheda Plate (Piastra) nel pannello Run Setup (Impostazione analisi).
8. Fare clic su **Select Existing** (Seleziona esistente).
9. Selezionare il file di impostazione della piastra "**Bio-Rad SARS-CoV-2 RT-qPCR Plate Setup.pltd**".
10. Fare clic su Open (Apri) per applicare le impostazioni.
11. Fare clic sulla scheda **Start Run** (Avvia analisi) nel pannello Run Setup (Impostazione analisi).
12. Selezionare lo strumento nella sezione Start Run on Selected Blocks (Avvia analisi sui blocchi selezionati) selezionando la casella a sinistra del nome dello strumento.
13. Caricare la piastra nello strumento.
14. Fare clic su **Start Run** (Avvia analisi).
15. Definire un nome file per il file dell'analisi e fare clic su Save (Salva) per avviare l'analisi.

Analisi dei dati sul sistema per PCR in tempo reale CFX96 Dx

Il file dei dati dell'analisi si aprirà automaticamente al termine della corsa. Per aprire un file che è stato chiuso, fare clic su **File** (File) -> **Open** (Apri) -> **Data File** (File di dati) selezionare il file di dati dal menu.

Per analizzare i dati, modificare i valori di linea basale e soglia per ciascun fluoroforo nella scheda **Quantification** (Quantificazione).

1. Fare clic su **Settings** (Impostazioni) -> **Cycles to Analyze** (Cicli da analizzare) immettere "5" nella prima cella per sostituire l'impostazione predefinita "1". Fare clic su OK per applicare le modifiche.
2. Deselezionare i fluorofori HEX e Texas Red deselezionando le caselle corrispondenti sotto il grafico di amplificazione. Solo la casella FAM deve essere selezionata.



3. Selezionare **Log Scale** (Scala logaritmica) selezionando la casella in basso a destra del grafico di amplificazione.
 Log Scale
4. Ispezionare visivamente le curve di amplificazione. Qualsiasi pozzetto con amplificazione nel canale FAM dovrebbe mostrare un aumento esponenziale dei valori RFU fino a quando la reazione non raggiunge il plateau.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

5. Se le curve di amplificazione non sono esponenziali, può essere necessario apportare una modifica manuale della linea basale. Per definire manualmente la linea basale, selezionare **Settings** (Impostazioni) -> **Baseline Threshold** (Soglia linea basale). Evidenziare il pozzetto da modificare, immettere 2 nella cella **Baseline Begin** (Inizio linea basale), immettere un numero di ciclo pari a 2 cicli prima che la traccia di amplificazione inizi a salire nella cella **Baseline End** (Fine linea basale). Fare clic su **OK** per applicare le modifiche.
6. Impostare la soglia FAM nel grafico di amplificazione facendo clic e trascinando la linea della soglia finché non si trova all'interno della fase esponenziale delle curve di fluorescenza e al di sopra di qualsiasi segnale di fondo.
7. Confermare la linea basale e definire la soglia per i canali HEX e Texas Red selezionando il fluoroforo appropriato nel passaggio 2 e ripetendo la procedura descritta sopra.

Configurazione dello strumento AB7500 Fast Dx

Le seguenti istruzioni sono essenziali per eseguire il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit su un sistema per PCR in tempo reale AB7500 Fast Dx. Per informazioni più dettagliate sull'impostazione della piastra e del protocollo dei cicli, fare riferimento al manuale dello strumento per PCR in tempo reale AB7500 Fast Dx.

1. Avviare il software 7500.
2. Selezionare **File** (File) -> **New** (Nuovo) nella barra dei menu.
3. Definire quanto segue:
 - a. **Assay** (Test) – **Standard Curve (Absolute Quantitation)** [Curva standard (Quantificazione assoluta)]
 - b. **Container** (Contenitore) – **96-Well Clear** (96 pozzetti trasparenti)
 - c. **Template** (Modello) – **Blank Document** (Documento vuoto)
 - d. **Run Mode** (Modalità di analisi) – **Standard 7500**
4. Assegnare il colorante reporter come definito nella Tabella 9.

Tabella 9: Coloranti reporter richiesti

Colorante reporter	Rivelatore
FAM	<i>N1</i>
HEX	<i>N2</i>
TEXAS RED	<i>RP</i>

Nota: per il dosaggio N2, è applicabile il canale VIC per rilevare questo target.

5. Selezionare **Passive Reference** (Riferimento passivo) -> **None** (Nessuno).
6. Definire il protocollo dei cicli utilizzando i valori elencati nella Tabella 10.

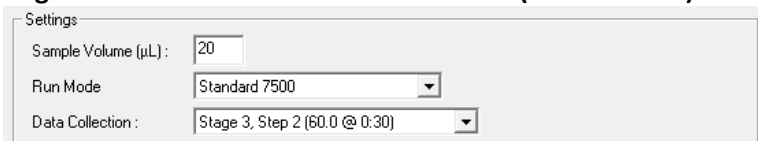
Tabella 10. Protocollo dei cicli termici per AB7500 Fast Dx

Passaggio del ciclo	Temperatura (°C)	Durata	Numero di cicli
Retrotrascrizione	50	10 minuti	1
Attivazione enzimatica	95	10 minuti	1
Denaturazione	95	10 secondi	45
Annealing/estensione	60	30 secondi	

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

7. Definire la fase di raccolta dati selezionando Stage 3, step 2 (60.0 @ 0:30) [Fase 3, passaggio 2 (60,0 a 0:30)] dal menu a tendina Data Collection (Raccolta dati), selezionare Stage 3, Step 2 (60.0 @ 0:30) [Fase 3, passaggio 2 (60,0 a 0:30)], vedere la Figura 2.

Figura 2: Menu a tendina Data Collection (Raccolta dati)



Settings	
Sample Volume (µL):	20
Run Mode	Standard 7500
Data Collection:	Stage 3, Step 2 (60.0 @ 0:30)

Analisi dei dati sul sistema per PCR in tempo reale AB7500 Fast Dx

Le seguenti istruzioni sono essenziali per analizzare i risultati ottenuti utilizzando il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit con il sistema per PCR in tempo reale AB7500 Fast Dx. Per informazioni più dettagliate sull'analisi dei dati, fare riferimento al manuale dello strumento per PCR in tempo reale AB7500 Fast Dx.

Impostazione dei valori di linea basale e soglia

1. Selezionare **File** (File) -> **Open** (Apri) selezionare il file di dati da analizzare.
2. Selezionare la scheda **Result** (Risultato) nell'angolo in alto a sinistra del software.
3. Fare clic sulla scheda **Amplification Plot** (Grafico di amplificazione).
4. Evidenziare tutti i campioni dell'analisi per visualizzare tutte le curve di amplificazione.
5. Impostare **Data** (Dati) su **Delta Rn vs. Cycle** (Delta Rn vs. Ciclo) sul lato destro della finestra.
6. Impostare **Detector** (Rilevatore) su **N1**.
7. Impostare **Line Color** (Colore linea) su **Detector Color** (Colore rilevatore).
8. Selezionare **Manual Ct** (Ct manuale) e **Manual Baseline** (Linea basale manuale) in **Analysis Settings** (Impostazioni analisi). Non modificare i numeri predefiniti della linea basale manuale.
9. Fare clic e trascinare la linea della soglia finché non si trova all'interno della fase esponenziale delle curve di fluorescenza e al di sopra di qualsiasi segnale di fondo.
10. Fare clic sul pulsante **Analyze** (Analizza) nell'angolo inferiore destro della finestra. La soglia rossa diventerà verde, indicando che i dati sono stati analizzati.
11. Ripetere i passaggi 6-10 per analizzare i risultati per ogni set di marker.

Interpretazione dei risultati

Prima di interpretare i risultati del paziente, è necessario esaminare l'NTC, il controllo positivo e il controllo negativo. Se i controlli non sono validi, i risultati del paziente non possono essere interpretati.

Controlli del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit: NTC, positivo e negativo

NTC (controllo senza template)

Le reazioni NTC per la miscela di oligonucleotidi SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos non devono mostrare segnali positivi in alcun canale (FAM, HEX o Texas Red) per nessuno dei tre target testati, *N1*, *N2* o *RP*. Se una delle reazioni NTC mostra positività, potrebbe essersi verificata una contaminazione del campione. Invalidare l'analisi e ripetere il test con l'acido nucleico estratto residuo attenendosi

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

rigorosamente alle linee guida. Se il risultato del test ripetuto è positivo, estrarre nuovamente e rianalizzare tutti i campioni inclusi in quel lotto.

Controllo positivo

Il controllo positivo produrrà risultati positivi ($Cq < 40$) per il rilevamento di set di primer e sonde *N1*, *N2* e *RP*.

Controllo negativo

Il controllo negativo deve produrre un risultato positivo con set di primer e sonde *RP* ($Cq < 40$) e risultati negativi con tutti i target SARS-CoV-2 *N1* e *N2*.

Analisi e interpretazione dei risultati dei campioni dei pazienti

La valutazione dei risultati dei test sui campioni clinici deve essere eseguita dopo che i controlli positivi e negativi sono stati esaminati e ritenuti validi e accettabili. Le prestazioni attese dei controlli del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR assay sono mostrate nella Tabella 11.

Tabella 11. Prestazioni attese dei controlli nel Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

Tipo di controllo	Nome controllo esterno	Usato per monitorare	SARS-CoV-2		Controllo interno	Cq previsto		
			N1	N2	RP	N1	N2	RP
NTC	Acqua priva di RNasi/DNasi	Contaminazione del reagente e/o dell'ambiente	Negativo	Negativo	Negativo	Cq ≥ 40 o N.A.		
Negativo	SARS-CoV-2 Negative	Contaminazione del reagente e/o dell'ambiente	Negativo	Negativo	Positivo	Cq ≥ 40 o N.A.	Cq ≥ 40 o N.A.	< 40
Positivo	SARS-CoV-2 Standard	Errore sostanziale del reagente, compresa l'integrità del primer e della sonda	Positivo	Positivo	Positivo	< 40	< 40	< 40

Se un controllo non soddisfa questi criteri, il test potrebbe indicare una configurazione o un'esecuzione improprie oppure un malfunzionamento o guasto del reagente o dell'apparecchiatura. Invalidare l'esecuzione e ripetere il test.

RP (Controllo interno)

Tutti i campioni clinici devono mostrare segnali positivi con i primer *RP* e la sonda ($Cq < 40$), indicando così la presenza dell'RNA di *RP* umano. Un mancato rilevamento di *RP* in qualsiasi campione clinico può indicare:

- Estrazione impropria di acido nucleico da materiali clinici con conseguente perdita di RNA e/o degradazione dell'RNA.
- Assenza di materiale cellulare umano sufficiente a causa di una procedura di raccolta non corretta o della perdita di integrità del campione.
- Impostazione ed esecuzione impropria del test.
- Malfunzionamento del reagente o dell'apparecchiatura.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Se il *dosaggio RP* non produce un risultato positivo per un campione clinico umano, interpretare come segue:

- Se SARS-CoV-2 *N1* e *N2* sono positivi, anche in assenza di *RP* positivo, il risultato è da considerarsi valido. È possibile che alcuni campioni non mostrino *RP* come positivo ($Cq < 40$) a causa del basso numero di cellule nel campione clinico originale. Un segnale *RP* negativo non preclude la presenza di RNA del virus SARS-CoV-2 in un campione clinico.
- Se tutti i marker SARS-CoV-2 e *RP* sono negativi per il campione, il risultato deve essere considerato non valido per il campione. Se è disponibile un campione residuo, ripetere la procedura di estrazione e ripetere il test. Se tutti i marker rimangono negativi dopo la ripetizione del test, segnalare i risultati come non validi e raccogliere un nuovo campione.

Marker SARS-CoV-2 (*N1* e *N2*)

- Il SARS-CoV-2 viene rilevato quando tutti i controlli mostrano le prestazioni attese e le curve di amplificazione per i marker SARS-CoV-2 (*N1* e *N2*) attraversano la linea di soglia entro 40 cicli. L'*RP* può o può non essere positivo come descritto sopra, ma il risultato SARS-CoV2 è comunque valido.
- Il SARS-CoV-2 non viene rilevato quando tutti i controlli mostrano le prestazioni attese, NESSUNA delle curve di amplificazione dei marker SARS-CoV-2 (*N1*, *N2*) supera la linea di soglia entro 40 cicli, la curva di amplificazione RNasi P attraversa la linea di soglia entro 40 cicli.
- Il risultato è inconcludente quando tutti i controlli mostrano le prestazioni attese, una delle due curve di amplificazione per uno dei marker SARS-CoV-2 (*N1* o *N2*, ma non entrambi i marker) supera la soglia entro 40 cicli. L'RNA estratto deve essere rianalizzato. Se non è disponibile RNA residuo, estrarre nuovamente l'RNA dal campione residuo e ripetere il test. Se si ottiene lo stesso risultato, segnalare il risultato inconcludente.
- Il risultato non è valido quando tutti i controlli mostrano le prestazioni attese, le curve di amplificazione per i marker SARS-CoV-2 (*N1*, *N2*) E il marker *RP* NON superano la soglia entro 40 cicli. L'RNA estratto dal campione deve essere nuovamente analizzato. Se non è disponibile RNA residuo, estrarre nuovamente l'RNA dal campione residuo e ripetere il test. Se il campione nuovamente testato è negativo per tutti i marker e *RP*, il risultato non è valido ed è necessario prendere in considerazione la raccolta di un nuovo campione dal paziente.

Per facilità di interpretazione, fare riferimento alle linee guida riportate nella Tabella 12.

Tabella 12. Guida all'interpretazione dei risultati ottenuti con il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

SARS-CoV-2 Risultato N1	SARS-CoV-2 Risultato N2	Controllo interno Risultato RP	Interpretazione	Azioni
Positivo (Cq < 40)	Positivo (Cq < 40)	Positivo o negativo	SARS-CoV-2 rilevato	Conservare i campioni a -70 °C secondo necessità e riferire i risultati all'autorità sanitaria pubblica competente.
Se solo uno dei due target è positivo (Cq < 40)		Positivo o negativo	Inconcludente	Ripetere il test dell'acido nucleico e/o estrarre nuovamente e ripetere la RT-PCR. Se il risultato ripetuto rimane inconcludente, contattare l'autorità sanitaria pubblica competente per istruzioni sul trasferimento del campione o ulteriori indicazioni.
Negativo (Cq ≥ 40 o N.A.)	Negativo (Cq ≥ 40 o N.A.)	Positivo (Cq < 40)	SARS-CoV-2 non rilevato	Segnalare i risultati all'autorità sanitaria pubblica competente.
Negativo (Cq ≥ 40 o N.A.)	Negativo (Cq ≥ 40 o N.A.)	Negativo (Cq ≥ 40 o N.A.)	Risultato non valido	Ripetere l'estrazione e la RT-PCR. Se il risultato ripetuto rimane non valido, prendere in considerazione la possibilità di raccogliere un nuovo campione dal paziente.

Limitazioni

1. Il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit è stato valutato solo per l'uso sui sistemi per PCR in tempo reale CFX Opus 96 Dx, CFX96 Dx e AB7500 Fast Dx.
2. Le prestazioni del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit sono state stabilite su campioni delle vie aeree superiori, tra cui campioni di tamponi nasofaringei, tamponi nasali dei turbinati medi, tamponi orofaringei e tamponi nasali anteriori. L'uso del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit con altri tipi di campioni non è stato valutato e le caratteristiche di prestazione non sono note.
3. L'affidabilità dei risultati dipende dalle corrette procedure di raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni.
4. Questo test viene utilizzato per il rilevamento dell'RNA di SARS-CoV-2 nei campioni delle vie respiratorie superiori raccolti in un mezzo di trasporto universale (UTM) o un sistema di trasporto virale universale (UVT). L'analisi di altri tipi di campioni con il Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit può produrre risultati non accurati.
5. Il rilevamento dell'RNA di SARS-CoV-2 può essere influenzato dai metodi di raccolta del campione, da fattori legati al paziente (ad esempio, la presenza di sintomi) e/o dallo stadio dell'infezione.
6. Il risultato del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit è una valutazione qualitativa dei campioni dei pazienti positivi a SARS-CoV-2. L'utente valuta i risultati della RT-PCR per i controlli e i campioni dei pazienti per effettuare una chiamata qualitativa di SARS-CoV-2 rilevato o non rilevato. I valori riportati non devono essere utilizzati o interpretati come quantitativi.
7. Come altro qualsiasi test molecolare, le mutazioni all'interno delle regioni target del Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit potrebbero influenzare il legame del primer e/o della sonda, determinando un mancato rilevamento della presenza di un virus.

8. A causa delle differenze intrinseche tra le tecnologie, si raccomanda che, prima di passare da una tecnologia all'altra, gli utenti eseguano studi di correlazione dei metodi nel proprio laboratorio al fine di qualificare le differenze tecnologiche. A causa delle suddette differenze tra le tecnologie, non ci si deve aspettare un accordo del cento per cento tra i risultati. Gli utenti devono seguire le proprie politiche/procedure specifiche.

Caratteristiche delle prestazioni analitiche

Sensibilità analitica

Sono stati condotti studi sul limite di detection (LoD) per determinare la concentrazione più bassa rilevabile di SARS-CoV-2. La concentrazione più bassa rilevabile è stata definita come quella per la quale una percentuale maggiore o uguale al 95% di tutti i replicati (veri positivi) risulta positivo utilizzando il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit. Gli studi di LoD sono stati eseguiti utilizzando campioni costituiti da tamponi nasofaringei negativi per SARS-CoV-2 ai quali è stato aggiunto (prima della purificazione degli acidi nucleici) virus sintetico SARS-CoV-2 titolato (AccuPlex SARS-COV-2, Seracare, n. di catalogo 0505-0126). È stata testata una diluizione seriale 1:2 (2-fold) compresa tra 31,5 e 500 copie per ml. Per ciascuna concentrazione sono stati estratti venti replicati utilizzando QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit o il kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMax di Thermo Fisher. I campioni di acido nucleico estratti sono stati successivamente testati con il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit sui sistemi CFX96 Dx e AB7500 Fast Dx. Il LoD è stato determinato come la quantità più bassa di virus rilevata con almeno 19 replicati risultati positivi per entrambi i dosaggi N1 e N2.

I risultati LoD del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit per il rilevamento di SARS-CoV-2 da campioni estratti utilizzando QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit sono mostrati nelle Tabelle 13 e 14. Sul sistema CFX96 Dx, il LoD è di 125 copie virali/ml (Tabella 13). Sui sistemi CFX Opus 96 Dx e AB7500 Fast Dx, il LoD è di 250 copie virali/ml (Tabelle 14 e 15). I risultati LoD del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit per il rilevamento di SARS-CoV-2 da campioni estratti utilizzando il kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMax di Thermo Fisher sono mostrati nelle Tabelle da 16 a 18. Sui sistemi CFX Opus 96 Dx, CFX96 Dx e AB7500 Fast Dx, il LoD è di 125 copie virali/ml. In sintesi, l'intervallo LoD è di 125-250 copie virali/ml su tali strumenti, indipendentemente dal metodo di purificazione degli acidi nucleici (Tabella 19).

Tabella 13. Risultati LoD CFX96 Dx per campioni estratti con QIAamp Viral RNA Mini Kit

Copie di SARS-CoV-2/ml	Sistema per PCR in tempo reale CFX96 Dx			
	Dosaggio N1		Dosaggio N2	
	Replicati positivi/ Replicati totali	Cq medio replicati positivi	Replicati positivi/ Replicati totali	Cq medio replicati positivi
500	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
250	20/20	31,25	20/20	32,88
125	19/20	32,4	20/20	34,6
62,5	19/20	32,86	18/20	35,57
31,25	15/20	33,49	15/20	36,36

Tabella 14. Risultati LoD CFX Opus 96 Dx per campioni estratti con QIAamp Viral RNA Mini Kit

Copie di SARS-CoV-2/ml	Sistema per PCR in tempo reale CFX Opus 96 Dx			
	Dosaggio N1		Dosaggio N2	
	Replicati positivi/ Replicati totali	Cq medio replicati positivi	Replicati positivi/ Replicati totali	Cq medio replicati positivi
500	20/20	31,39	20/20	32,19
250	20/20	33,00	20/20	33,64
125	16/20	33,89	19/20	35,06
62,5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
31,25	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

Tabella 15. Risultati LoD AB7500 Fast Dx per campioni estratti con QIAamp Viral RNA Mini Kit

Copie di SARS-CoV-2/ml	Sistema per PCR in tempo reale AB7500 Dx			
	Dosaggio N1		Dosaggio N2	
	Replicati positivi/ Replicati totali	Cq medio replicati positivi	Replicati positivi/ Replicati totali	Cq medio replicati positivi
500	20/20	33,06	20/20	34,36
250	20/20	34,61	20/20	36,04
125	19/20	36,07	15/20	37,95
62,5	18/20	35,84	17/20	37,38
31,25	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

Tabella 16. Risultati LoD CFX96 Dx per campioni estratti con il kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMax

Copie di SARS-CoV-2/ml	Sistema per PCR in tempo reale CFX96 Dx			
	Dosaggio N1		Dosaggio N2	
	Replicati positivi/ Replicati totali	Cq medio replicati positivi	Replicati positivi/ Replicati totali	Cq medio replicati positivi
500	20/20	33,31	20/20	33,53
250	19/20	33,45	20/20	33,63
125	19/20	34,48	20/20	35,07
62,5	18/20	35,56	15/20	37,47
31,25	11/20	36,14	10/20	38,06

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Tabella 17. Risultati LoD CFX Opus 96 Dx per campioni estratti con il kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMax

Copie di SARS-CoV-2/ml	Sistema per PCR in tempo reale CFX Opus 96 Dx			
	Dosaggio N1		Dosaggio N2	
	Replicati positivi/ Replicati totali	Cq medio replicati positivi	Replicati positivi/ Replicati totali	Cq medio replicati positivi
500	20/20	33,57	20/20	33,52
250	20/20	33,65	20/20	33,82
125	20/20	34,99	19/20	34,98
62,5	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.

Tabella 18. Risultati LoD AB7500 Dx per campioni estratti con il kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMax

Copie di SARS-CoV-2/ml	Sistema per PCR in tempo reale AB7500 Dx			
	Dosaggio N1		Dosaggio N2	
	Replicati positivi/ Replicati totali	Cq medio replicati positivi	Replicati positivi/ Replicati totali	Cq medio replicati positivi
500	20/20	33,72	20/20	35,44
250	20/20	34,29	20/20	35,94
125	20/20	35,34	20/20	37,04
62,5	13/20	36,76	12/20	38,2
31,25	6/20	37,47	9/20	39,17

Tabella 19. Riepilogo LoD per il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit

	QIAamp Viral RNA Mini Kit	Kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMax
CFX96 Dx	125 copie/ml	125 copie/ml
CFX Opus 96 Dx	250 copie/ml	125 copie/ml
AB7500 Dx	250 copie/ml	125 copie/ml

Sequenze rilevabili

Le sequenze Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Oligos (primer e sonde) per *N1*, *N2* e *RP* sono state sviluppate dal CDC. (GISAID, <https://www.gisaid.org>) al 20 giugno 2020 per validare quali siano le sequenze riconoscibili in accordo con il pannello diagnostico RT-PCR in tempo reale CDC 2019 nCoV. In questo studio è stata utilizzata una valutazione di 31.623 sequenze SARS-CoV-2 disponibili in GISAID. Ad eccezione di un mismatch nucleotidico con frequenza > 1% (2,00%) alla terza posizione della sonda N1, la frequenza di tutti i mismatch era < 1%, indicando che la prevalenza dei mismatch era sporadica. Solo una sequenza (0,0032%) presentava due mismatch nucleotidici nella sonda N1 e un'altra sequenza da un diverso isolato (0,0032%) presentava due mismatch nucleotidici nel primer inverso N1. Non è stato riscontrato che le sequenze presentassero più di un mismatch in qualsiasi regione di primer/sonda N2.

Il rischio che un singolo mismatch comporti una significativa perdita di reattività e un risultato falso negativo è basso in quanto il disegno dei primer e delle sonde con temperature di fusione > 60 °C e delle condizioni di esecuzione del test con temperatura di annealing a 55 °C consentono di tollerare uno o due mismatch.

Specificità analitica (reattività crociata)

L'analisi in silico per i patogeni elencati nella Tabella 20 è stata eseguita scaricando le sequenze di riferimento da GenBank per il genoma di ciascuno degli organismi. Le sequenze di riferimento sono state confrontate con i target Bio-Rad SARS-CoV-2, N1 e N2 per tutte le possibili combinazioni (primer diretto, primer inverso, sonda e complementi inversi per ciascuno di essi) per determinare la percentuale di omologia. Se una qualsiasi di queste combinazioni di primer è stata mappata su una sequenza su filamenti opposti con un'omologia >80% sullo stesso target entro una breve distanza (≤ 100 bp), le potenziali amplificazioni sono state evidenziate. Sulla base di questa analisi in silico non è prevista alcuna potenziale reattività crociata indesiderata, ad eccezione di SARS-coronavirus (SARS-CoV) con il target N2.

L'analisi in silico per il set di primer/sonda N1 ha mostrato un'alta omologia di sequenza della sonda N1 con SARS-CoV e genoma di coronavirus SARS-simile di pipistrello. Tuttavia, i primer diretti e inversi non hanno mostrato alcuna omologia di sequenza con il genoma del coronavirus SARS-CoV e SARS-simile di pipistrello. Combinando i risultati dei primer e delle sonde, non ci sono omologie significative con il genoma umano, altri coronavirus o microflora umana che predirebbero potenziali risultati di RT-PCR falsi positivi.

Tabella 20. Analisi in silico per SARS-CoV-2

Patogeni testati in silico	Reattività crociata indesiderata a N1	Reattività crociata indesiderata a N2
SARS-CoV	Non rilevato	Corrispondenza di omologia 92%*
MERS-coronavirus	Non rilevato	Non rilevato
Adenovirus umano A	Non rilevato	Non rilevato
Adenovirus umano B1	Non rilevato	Non rilevato
Adenovirus umano B2	Non rilevato	Non rilevato
Adenovirus umano C	Non rilevato	Non rilevato
Adenovirus umano D	Non rilevato	Non rilevato
Adenovirus umano E	Non rilevato	Non rilevato
Adenovirus umano F	Non rilevato	Non rilevato
Metapneumovirus umano (hMPV)	Non rilevato	Non rilevato
Virus parainfluenzale 1	Non rilevato	Non rilevato
Virus parainfluenzale 2	Non rilevato	Non rilevato
Virus parainfluenzale 3	Non rilevato	Non rilevato
Virus parainfluenzale 4	Non rilevato	Non rilevato
Influenza A H3N2	Non rilevato	Non rilevato
Influenza A H2N2	Non rilevato	Non rilevato
Influenza A H7N9	Non rilevato	Non rilevato
Influenza A H1N1	Non rilevato	Non rilevato
Influenza B	Non rilevato	Non rilevato

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

Patogeni testati in silico	Reattività crociata indesiderata a N1	Reattività crociata indesiderata a N2
Enterovirus umano A	Non rilevato	Non rilevato
Enterovirus umano B	Non rilevato	Non rilevato
Enterovirus E, Enterovirus bovino	Non rilevato	Non rilevato
Enterovirus F	Non rilevato	Non rilevato
Enterovirus G, Enterovirus suino 9	Non rilevato	Non rilevato
Enterovirus H, Enterovirus di scimmia A	Non rilevato	Non rilevato
Enterovirus J ceppo 1631	Non rilevato	Non rilevato
Enterovirus J ceppo N203	Non rilevato	Non rilevato
Virus respiratorio sinciziale	Non rilevato	Non rilevato
Rhinovirus A, Rhinovirus umano 89	Non rilevato	Non rilevato
Rhinovirus A, rhinovirus umano 1 ceppo ATCC VR-1559	Non rilevato	Non rilevato
Rhinovirus B	Non rilevato	Non rilevato
Rhinovirus C, Rhinovirus umano C	Non rilevato	Non rilevato
Rhinovirus C, Rhinovirus umano NAT001	Non rilevato	Non rilevato
<i>Haemophilus influenzae</i>	Non rilevato	Non rilevato
<i>Legionella pneumophila</i>	Non rilevato	Non rilevato
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Non rilevato	Non rilevato
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Non rilevato	Non rilevato
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Non rilevato	Non rilevato
Enterovirus (ad esempio EV68)	Non rilevato	Non rilevato
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	Non rilevato	Non rilevato

**L'analisi del primer diretto del target N2 ha mostrato un'elevata omologia con i coronavirus SARS-simili di pipistrello. Tuttavia, le sequenze del primer inverso e della sonda non hanno mostrato alcuna omologia significativa con il genoma umano, altri coronavirus o microflora umana che predirebbe potenziali risultati di RT-PCR falsi positivi. Combinando i risultati dei primer e delle sonde, non è possibile prevedere potenziali risultati di RT-PCR falsi positivi.*

Oltre all'analisi *in silico*, il CDC ha riportato specificità analitica ed esclusività dimostrando i risultati attesi per ciascun organismo indicato nella Tabella 21 e confermando che i risultati finali non sono influenzati da questi virus.

Tabella 21. Specificità/esclusività riportate dal CDC

Virus	Ceppo	Fonte	2019-nCoV_ N1	2019-nCoV_ N2	Risultato finale
Coronavirus umano	229E	Isolato	0/3	0/3	Neg.
Coronavirus umano	OC43	Isolato	0/3	0/3	Neg.
Coronavirus umano	NL63	Campione clinico	0/3	0/3	Neg.
Coronavirus umano	HKU1	Campione clinico	0/3	0/3	Neg.
MERS-coronavirus		Isolato	0/3	0/3	Neg.
SARS-coronavirus		Isolato	0/3	0/3	Neg.
Bocavirus		Campione clinico	0/3	0/3	Neg.
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		Isolato	0/3	0/3	Neg.
<i>Streptococcus</i>		Isolato	0/3	0/3	Neg.
Influenza A(H1N1)		Isolato	0/3	0/3	Neg.
Influenza A(H3N2)		Isolato	0/3	0/3	Neg.
Influenza B		Isolato	0/3	0/3	Neg.
Adenovirus umano, tipo 1	Ad71	Isolato	0/3	0/3	Neg.
Metapneumovirus umano		Isolato	0/3	0/3	Neg.
Virus respiratorio sinciziale	Long A	Isolato	0/3	0/3	Neg.
Rhinovirus		Isolato	0/3	0/3	Neg.
Parainfluenza 1	C35	Isolato	0/3	0/3	Neg.
Parainfluenza 2	Greer	Isolato	0/3	0/3	Neg.
Parainfluenza 3	C-43	Isolato	0/3	0/3	Neg.
Parainfluenza 4	M-25	Isolato	0/3	0/3	Neg.

Valutazione clinica

Le prestazioni del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit con campioni clinici di tampone nasofaringeo sono state valutate utilizzando 34 campioni clinici negativi e 34 campioni clinici positivi confermati. I campioni prelevati da iSpecimen sono stati raccolti da pazienti con segni e sintomi di un'infezione delle vie respiratorie superiori. I campioni sono stati raccolti da personale qualificato secondo il foglietto illustrativo del dispositivo di raccolta e conservati congelati a -80 °C. I campioni positivi rappresentavano un'ampia gamma di carica virale e includevano anche campioni debolmente positivi. Tutti i campioni erano stati testati precedentemente con un test molecolare di comparazione ad alta sensibilità.

L'acido nucleico è stato purificato dai 68 campioni clinici utilizzando il kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMax di Thermo Fisher utilizzando un volume di campione di 200 µl e un volume di eluzione di 100 µl. I campioni sono stati randomizzati in cieco e valutati con il Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit di Bio-Rad utilizzando il sistema per PCR in tempo reale CFX96 Dx Bio-Rad, in quanto, questo strumento, ha un LoD simile al sistema per PCR in tempo reale AB7500 Fast Dx. Per la valutazione clinica è stato utilizzato il kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMax in quanto, il LoD rientrava nel doppio del LoD stabilito con il metodo di estrazione QIAamp Viral RNA Mini su entrambi gli strumenti.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

I risultati ottenuti dai campioni testati utilizzando il Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit di Bio-Rad sono stati confrontati con i risultati ottenuti da un'analisi di comparazione molecolare.

I risultati degli studi clinici (Tabella 22) mostrano una concordanza positiva (PPA, *Positive Percentage Agreement*) del 97,1% con un intervallo di confidenza al 95% compreso tra 85,1% e 99,5% e una percentuale di concordanza negativa (NPA, *Negative Percentage Agreement*) del 100% con un intervallo di confidenza al 95% compreso tra 89,9% e 100%.

Tabella 22. PPA e NPA del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit rispetto al comparatore

Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR	Test comparatore positivo	Test comparatore negativo	Totale	PPA [IC 95%]	NPA [IC 95%]
Test positivo	33	0	34	97,1% [85,1%-99,5%]	100% [89,9%-100%]
Inconcludente	1	0	0		
Test negativo	0	34	34		
Totale	34	34	68		

Ci sono stati due risultati discordanti (campione 37 e 65) durante i test iniziali; il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit è risultato negativo laddove il test effettuato con il test molecolare di comparazione era positivo. La ripetizione del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit sul campione 37 ha confermato il risultato confermando che il campione è positivo. Un campione residuo insufficiente ha impedito la ripetizione del test del campione 65.

Bibliografia

1. Center for Disease Control and Prevention. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5a edizione. brevetti Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health HHS Publication No. (CDC) 21-1112, revised December 2009.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections. Approved Guideline-Fourth Edition. CLSI Document M29-A4: Wayne, PA; CLSI, 2014.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods. Approved Guideline-Second Edition. CLSI Document MM13-Ed2. Wayne, PA; CLSI, 2020.
4. World Health Organization. Laboratory Testing for Coronavirus Disease (COVID-19) in Suspected Human Cases: Interim Guidance. March 19, 2020, World Health Organization, <https://apps.who.int/iris/handle/10665/331501> (accessed 2020-05-08).
5. Centers for Disease Control and Prevention. CDC 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time RT-PCR diagnostic panel services (Revision:05). Centers for Disease Control and Prevention 2020, Atlanta, GA. <https://www.fda.gov/media/134922/download>.

Appendice A: Protocollo di qualificazione dello strumento

Scopo

Questa appendice ha lo scopo di fornire delle raccomandazioni su come preparare un pannello di campioni di controllo da utilizzare per verificare le prestazioni del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit da parte dell'utente finale.

Materiali necessari

Descrizione	Quantità	Incluso nel kit
Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard	1 fiala	Sì
Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative	1 fiala	Sì
Tampone fosfato salino (PBS, pH 7,4)	3 ml*	No

*La quantità indicata è per preparare un set di 9 campioni

Precauzioni

Il controllo positivo fornito con il Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit è composto da trascritto di RNA che codifica per i geni SARS-CoV-2 N1 e N2 e DNA genomico umano per l'amplificazione del gene RP. Questo controllo non è infettivo. Entrambi i controlli Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard e Negative sono esclusivamente monouso; non ricongelare. Il Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit deve essere manipolato in conformità con le buone pratiche di laboratorio.

I materiali di controllo e gli altri componenti del kit devono essere conservati a temperature appropriate, come descritto nelle Istruzioni per l'uso (IFU), e conservati in ghiaccio una volta scongelati. I campioni di RNA estratti devono essere mantenuti freddi durante la preparazione e l'uso.

Istruzioni per la preparazione di campioni da utilizzare per la qualifica prima dell'estrazione con QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit

1. Preparare una quantità sufficiente di tampone AVL (con carrier RNA) per 9 campioni, secondo le istruzioni del produttore.
2. Etichettare tre provette prive di RNasi da 1,5 ml con A, B e C. Etichettare nove provette da 1,5 ml numerandole da 1 a 9.
3. Aliquotare 995 µl di PBS nella provetta "A", quindi aggiungere 5 µl di Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard. Miscelare bene.
4. Aliquotare 900 µl di PBS nella provetta "B", quindi aggiungere 100 µl di provetta "A". Miscelare bene.
5. Aliquotare 995 µl di PBS nella provetta "C", quindi aggiungere 5 µl di Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative. Miscelare bene.
6. Aliquotare 560 µl di tampone AVL contenente carrier RNA in ciascuna delle nove provette etichettate 1-9.
7. Aggiungere 140 µl di provetta A in ciascuna delle provette 1-3.
8. Aggiungere 140 µl di provetta B in ciascuna delle provette 4-6.
9. Aggiungere 140 µl di provetta C in ciascuna delle provette 7-9.
10. Estrarre i campioni utilizzando QIAamp Viral RNA Mini Kit seguendo le istruzioni del produttore, eluendo i campioni in 60 µl di AVE.

Istruzioni per la preparazione di campioni per la qualifica prima dell'estrazione con il kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMAX Thermo Fisher

1. Etichettare tre provette prive di RNasi da 1,5 ml con A, B e C.
2. Aliquotare 995 µl di PBS nella provetta "A", quindi aggiungere 5 µl di Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Standard. Miscelare bene.
3. Aliquotare 900 µl di PBS nella provetta "B", quindi aggiungere 100 µl di provetta "A". Miscelare bene.
4. Aliquotare 995 µl di PBS nella provetta "C", quindi aggiungere 5 µl di Exact Diagnostics SARS-CoV-2 Negative.
5. Aliquotare 10 µl di proteinasi K dal kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMAX in ciascuno dei nove pozzetti, designati 1-9, di una piastra da 96 pozzetti deep-well.
6. Aggiungere 200 µl di provetta A in ciascuno dei pozzetti 1-3.
7. Aggiungere 200 µl di provetta B in ciascuno dei pozzetti 4-6.
8. Aggiungere 200 µl di provetta C in ciascuno dei pozzetti 7-9.
9. Estrarre i campioni utilizzando il kit di isolamento degli acidi nucleici virali/patogeni MagMAX seguendo le istruzioni del produttore, eluendo i campioni in 100 µl di soluzione di eluizione.

Test di campioni estratti

Seguire le istruzioni per l'uso del Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Kit per analizzare almeno una volta ciascuno dei campioni negativi, a concentrazione moderata e a bassa concentrazione.

Risultati attesi

Le provette 1-3 e i pozzetti 1-3 contengono una concentrazione moderata di SARS-CoV-2 e dovrebbero essere positivi per N1, N2 e RP.

Le provette 4-6 e i pozzetti 4-6 contengono una bassa concentrazione di SARS-CoV-2 e dovrebbero essere positivi per N1, N2 e RP.

Le provette 7-9 e i pozzetti 7-9 sono campioni negativi e dovrebbero essere negativi per N1 e N2, ma positivi per RP.

Criteri di accettazione

Campioni negativi (provette 7-9): il 100% (3/3) dovrebbe essere in accordo con i risultati attesi.

Campioni moderati (provette 1-3): il 100% (3/3) dovrebbe essere in accordo con i risultati attesi.

Campioni a bassa positività (provette 4-6): almeno il 66% (2/3) dovrebbe essere in accordo con i risultati attesi.

Appendice B: Studio sull'equivalenza dei campioni

È stato condotto uno studio sull'equivalenza dei tipi di campioni per stabilire se la provenienza dei campioni da matrici cliniche diverse dai tamponi nasofaringei influisce sulla sensibilità di rilevamento di un determinato virus. In particolare, è stata valutata la capacità del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit (CE-IVD) di rilevare il virus SARS-CoV-2 alla concentrazione di 3x LoD, precedentemente stabilita per i tamponi nasofaringei (Tabella A1), nei campioni di tamponi nasali anteriori, tamponi nasali dei turbinati medi e tamponi orofaringei. Il LoD nei tamponi nasofaringei è stato precedentemente determinato come la quantità più bassa di virus rilevata con almeno il 95% dei replicati risultati positivi; il rilevamento alla concentrazione di 3x LoD è considerata equivalente. Fare riferimento alla sezione LoD per ulteriori informazioni.

Nello studio sull'equivalenza dei tipi di campioni sono stati utilizzati campioni artificiali di virus SARS-CoV-2 inattivato addizionati in campioni di tamponi nasali anteriori, tamponi nasali dei turbinati medi o tamponi orofaringei clinicamente negativi raggruppati. I campioni artificiali sono stati preparati mescolando ogni virus individualmente a 3x LoD in un pool di matrice clinica negativa per ciascun tipo di campione. I campioni di controllo positivo e negativo sono stati preparati utilizzando Exact Diagnostic SARS-CoV-2 Standard e Negative Run Control (Bio-Rad, n. di catalogo 16008441, 16008440) addizionati in un pool di matrici cliniche negative per ciascun tipo di campione. Ciascun campione è stato estratto in triplicato utilizzando il QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit (140 µl di volume di campione iniziale e 60 µl di volume di eluizione). L'acido nucleico di queste estrazioni è stato analizzato sul sistema CFX96 Touch con il Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit (CE-IVD) come indicato nelle Istruzioni per l'uso.

Tabella A1. Riepilogo del LoD dei ceppi virali valutato nello studio sull'equivalenza dei tipi di campioni

Virus	Ceppo	3x LoD
SARS-CoV-2	2019-nCoV/USA-WA1/2020	375 cp/ml

Tutti i controlli sono stati eseguiti come previsto. Per ciascuna delle matrici cliniche, i campioni artificiali contenenti virus SARS-CoV-2 sono risultati positivi come previsto e sono risultati negativi nel campione di controllo senza virus (Tabella A2).

Tabella A2. Risultati dello studio sull'equivalenza dei tipi di campioni

Tipo campione	Dosaggio N1		Dosaggio N2	
	Num. pos.	Cq med.	Num. pos.	Cq med.
Tampone nasofaringeo	3/3	37,83	3/3	38,78
Tampone nasale anteriore	3/3	36,89	3/3	38,56
Tampone nasale del turbinato medio	3/3	35,36	3/3	36,00
Tampone orofaringeo	3/3	37,41	3/3	37,21

Questi dati indicano un'equivalenza in termini di sensibilità del Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR Assay Kit (CE-IVD) nel rilevare il virus SARS-CoV-2 in campioni di tamponi nasofaringei, tamponi nasali anteriori, tamponi nasali dei turbinati medi e tamponi orofaringei.

Bio-Rad Reliance SARS-CoV-2 RT-PCR IVD Assay Kit

ASSISTENZA TECNICA

Contattare il proprio ufficio Bio-Rad regionale. Per le informazioni di contatto, visitare il sito Web www.bio-rad.com.



**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

**For further information, please contact the Bio-Rad office nearest
you or visit our website at www.bio-rad.com**

4000 Alfred Nobel Drive
Hercules, California 94547
Telephone (510) 724-7000
FAX (510) 741-6373
www.bio-rad.com

Australia, Bio-Rad Laboratories Pty. Ltd., Level 5, 446 Victoria Road, Gladesville, New South Wales 2111 • Phone +61 (2) 9914 2800 • Fax +61 (2) 9914 2888
Austria, Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H., Hummelgasse 88/3-6, A-1130 Vienna • Phone +43 (0) 1 877 89 01 9 • Fax +43 (0) 1 876 56 29
Belgium, Bio-Rad Laboratories N.V., Winninglaan 3, BE-9140 Temse • Phone +32 (0) 3 710 53 00 • Fax +32 (0) 3 710 53 01
Brazil, Bio-Rad Laboratórios Brasil Ltda, Avenida Doutor Churci Zaidan, 1.240 cj 1902 e 1904 Morumbi Corporate Santo Amaro, São Paulo, SP CEP 04711-130 • Phone +55 11 3065 7550
Canada, Bio-Rad Laboratories Ltd., 2403 Guénette Street, Montréal, Québec H4R 2E9 • Phone +1 514 334 4372 • Fax +1 514 334 0872
China, Bio-Rad Laboratories (Shanghai) Co., Ltd. Room 601, Allian Plaza, No. 168 Jingzhou Road, Yangpu District, Shanghai 200082 • Phone +86 21 6169 8500 • Fax +86 21 6169 8599
Czech Republic, Bio-Rad spol. s r.o., Ptkrtova 1737/1a, 14000 Prague 4 • Phone +420 241 431 660
Denmark, Bio-Rad Laboratories, Symbion Science Park, Fruebjergvej 3, DK-2100 Copenhagen East • Phone +45 44 52 10 00 • Fax +45 44 52 10 01
Finland, Bio-Rad Finland Oy, Kutomotte 16 FI-00380, Helsinki • Phone +358 9 804 22 00
France, Bio-Rad, 3 boulevard Raymond Poincaré, 92430 Marnes-la-Coquette • Phone +33 (0) 1 47 95 60 00 • Fax +33 (0) 1 47 41 91 33
Germany, Bio-Rad Laboratories GmbH, Kapellenstraße 12, D-85622 Feldkirchen, Munich • Phone +49 (0) 89 31884 393 • Fax +49 (0) 89 31884 136
Greece, Bio-Rad Laboratories M.E.P.E., 2-4 Mesogion Ave. (Athens Tower) 11527 Ampelokipi, Athens • Phone +30 210 7774396 • Fax +30 210 7774376
Hong Kong, Bio-Rad Pacific Ltd., Unit 1101, 11/F DCH Commercial Centre, 25 Westlands Road, Quarry Bay • Phone +85 2 2789 3300 • Fax +85 2 2789 1257
Hungary, Bio-Rad Hungary Ltd., Futó utca 47-53, 1082, Budapest • Phone +36 1 459 6190 • Fax +36 1 459 6101
India, Bio-Rad Laboratories India Pvt. Ltd., EMAAR Digital Greens, 9th Floor, Tower A- Sector 61 Gurugram-122 102, Haryana 122 015 • Phone +91 124 4029300 • Fax +91 124 2398115
Israel, Bio-Rad Laboratories Ltd., 14 Homa Street, New Industrial Area, Rishon Le Zion 75150 • Phone +972 3 963 6025 • Fax +972 3 951 4129
Italy, Bio-Rad Laboratories S.r.l., Via Cellini 18/A, 20090 Segrate, Milan • Phone +39 02 94 86 600 • Fax +39 02 21609399
Japan, Bio-Rad Laboratories K.K., Tennoz Central Tower 20F, 2-2-24 Higashi-Shinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo 140-0002 • Phone +81 3 6361 7070 • Fax +81 3 5463 8481
Korea, Bio-Rad Korea Ltd., 10th Floor, Hyunjuk Building, 832-41, Yeoksam-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-080 • Phone +82 080 007 7373 • Fax +82 (2) 3472 7003
Mexico, Bio-Rad, S.A., Avenida Eugenia 197, Piso 10-A, Colonia Narvarte, Delegación Benito Juárez C.P. 03020 Mexico, D.F. • Phone +52 (55) 5488 7670 • Fax +52 (55) 1107 7246
The Netherlands, Bio-Rad Laboratories B.V., Postbus 222, 3900 AE Veenendaal • Phone +31 (0) 318 540 666 • Fax +31 (0) 318 542 216
New Zealand, Bio-Rad New Zealand, 189 Bush Road Rosedale, Auckland • Phone +64 (9) 415 2280 • Fax +64 (9) 415 2284
Norway, Bio-Rad Laboratories, Nydalsveien 33, 0481 Oslo • Phone +47 23 38 41 30 • Fax +47 23 38 41 39
Poland, Bio-Rad Patska Sp. z o.o., Przykopywa 33, Level 4, Building A, 01-208, Warsaw • Phone +48 22 331 99 99 • Fax +48 22 331 99 88
Portugal, Bio-Rad Laboratories, Lda., Edifício Prime, Ave. Quinta Grande, 53 – Fracção 3B Alfragide 26114-521, Amadora • Phone +351 21 47 27 700 • Fax +351 21 47 27 777
Russia, Bio-Rad Laboratori, 117105, Russian Federation, Moscow, Varshavskoe sh., 9, Bldg., 1B • Phone +7 495 721 1404 • Fax +7 495 721 1412
Singapore, Bio-Rad Laboratories (Singapore) Pte. Ltd., 3A International Business Park Road, #11-10/16, ICON @ IBP Tower B, Singapore 609935 • Phone +65 6415 3170 • Fax +65 6415 3189
South Africa, Bio-Rad Laboratories (Pty) Ltd., 34 Bolton Ave, Rosebank, Johannesburg • Phone +27 11 442 8506 • Fax +27 11 442 8525
Spain, Bio-Rad Laboratories, S.A., C/ Caléndula, 95, Edificio M. Miriparc II, El Soto de la Moraleja, 28109 Alcobendas • Phone +34 91 490 6580 • Fax +34 91 590 5211
Sweden, Bio-Rad Laboratories A.B., Solna Strandväg 3, SE-171 54 Solna, P.O. Box 1097, SE-172 22 Sundbyberg • Phone +46 844 98053 • Fax +46 8 55 51 27 80
Switzerland, Bio-Rad Laboratories AG, Pra Rond 23, CH-1785 Cressier • Phone +41 (0) 61 717 9555 • Fax +41 (0) 61 717 9550
Taiwan, Bio-Rad Laboratories Taiwan Ltd., 14th F.B, No. 126, Sec. 4, Nan-King East Road, Taipei 10546 Taiwan, R.O.C. • Phone +886 (2) 2578 7189 • Fax +886 (2) 2578 6890
Thailand, Bio-Rad Laboratories Ltd., 1st & 2nd Floor, Lumpini I Bldg., 239/2 Rajdamri Road., Lumpini, Pathumwan, Bangkok 10330 • Phone (662)651 8311 • Fax (662) 651 8312
United Kingdom, Bio-Rad Laboratories Ltd., The Junction Station Road, Watford, Hertfordshire, WD17 1ET • Phone +44 (0) 1923 471301 • Fax +44 (0) 1923 471340