

Product Cat. No.:
P-COVID-19-1/ RP-010.

CE-IVD Registration No.: DE/CA20/IVD-Luxuslebenswelt-62/20.

Corona Virus Disease 2019 (COVID-19) Nucleic Acid Detection Kit

MANUALE D'USO



[Nome del prodotto] Corona Virus Disease 2019 (CoViD-19) Nucleic Acid Detection Kit (Real-Time PCR)

[Caratteristiche] 100 Tests/Box.

[Indicazioni d'uso]

Questo kit viene utilizzato per il rilevamento qualitativo in vitro di casi sospetti di polmonite da nuova infezione da coronavirus.

I campioni possono provenire da tampone rinofaringeo, espettorato e campioni di liquido di lavaggio broncoalveolare che richiedono diagnosi o diagnosi differenziale di nuova infezione da virus coronarico, geni **ORF1ab** e **N**.

[Principio del Test]

Questo kit è progettato per il gene ORF1ab appena rilasciato e per la regione conservata che codifica per la sequenza del gene N della proteina nucleocapside recentemente pubblicata sulla piattaforma GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data). Due coppie di primer specifici e sonde Taqman sono state utilizzate per analizzare quantitativamente gli acidi nucleici virali nel campione utilizzando la tecnologia di rilevazione della PCR a fluorescenza in una fase.

Il sistema di reazione PCR contiene primer e sonde relative allo standard interno endogeno RNaseP.

I processi di raccolta, estrazione e reazione del campione vengono monitorati rilevando lo standard interno per evitare risultati falsi negativi.

[Componenti principale]

Kit composition

Component name	Specifications	Quantity	Main components
Reaction solution	850µL	2 Tubes	Primers, Sonde, 5 × RT PCR Buffer
Mixed enzyme solution	150µL	2 Tubes	Transcrittasi inversa, DNA polimerasi, dNTP, Mg2 +
Controllo Negativo	400µL	1 Tube	Pseudovirus contenente frammenti standard interni
Controllo Positivo	400µL	1 Tube	Pseudovirus contenente frammenti target e frammenti standard interni
Manuale	-	1 copy	-

Richiesti ma non forniti con il kit: reagenti per estrazione e purificazione degli acidi nucleici.

Nota: *i componenti di kit con numero di lotto differenti non possono essere usati intercambiabilmente tra loro.*

I controlli positive e negative devono essere usati dalla fase di estrazione degli acidi nucleici.

[Conservazione e validità]

1. Il kit deve essere conservato congelato e protetto dalla luce a temperature di -15°C o inferiore. Il periodo di validità è di 6 mesi. La data di produzione e il periodo di validità sono indicati sulla confezione esterna.
2. Evitare cicli ripetuti di congelamento / scongelamento del kit. Il numero di cicli di congelamento-scongelamento non deve essere maggiore di 7.
3. Dopo la chiusura, il kit deve essere

[Strumenti Compatibili]

1. Questo kit è adatto per la piattaforma Applied Biosystem ABI7500, le piattaforme Bio-Rad e Agilent MX-3000.
2. Per altri modelli non elencati, questo kit non è stato eseguito esperimenti rilevanti. Se l'utente deve utilizzare qualsiasi altro strumento per eseguire il rilevamento di questo reagente, contattare il nostro ufficio tecnico per il relativo supporto.

NB: Altri strumenti compatibili: *QuantStudio (Thermo Fisher), Applied Biosystems, Bio-Rad, Agilent (MX-3000), MGITech, LighCycler 480II & Z480 (Roche), SLAN-96S thermocycler series and other quantitative fluorescence PCR platforms with FAM, VIC/HEX and Cy5 fluorescence detection channel.*

[Sample Requirements]

1. I campioni provengono da tamponi rinofaringei, tamponi orofaringei, ecc. Il metodo operativo specifico è il seguente:
 - i) Tamponi nasofaringei: l'operatore ruota delicatamente i tamponi sterili bagnati parallelamente all'angolo della mascella superiore da sinistra a destra e da una narice alla rinofaringe interna del canale nasale. Generalmente, quando il tampone viene inserito con resistenza, il tampone rimarrà per 2-3 secondi e poi ruoterà lentamente per uscire.
 - ii) Tampone orofaringeo: l'operatore tiene l'abbassalingua contro la radice posteriore della lingua del paziente, l'altra mano tiene la radice del tampone sterile, quindi sposta i lati sinistro e destro del tampone sterile bagnato e la testa del tampone raschia rapidamente e saldamente le secrezioni da entrambi i lati della tonsilla e dalla parte posteriore della gola.

Mettere insieme il tampone rinofaringeo e/o il tampone orofaringeo in una provetta da da 1,0 ml in soluzione salina.

1. Campione di fluido di lavaggio alveolare: utilizzare una siringa sterile per prelevare il campione e posizionarlo in una provetta da centrifuga per l'ispezione.
2. La contaminazione incrociata tra i campioni deve essere evitata.
3. I campioni devono essere testati immediatamente dopo la raccolta o conservati a $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ per l'ispezione. Per una conservazione a lungo termine, conservare a temperature uguali o inferiori a -70°C .

[Metodo del test]

1. Preparazione del reagente: (area di preparazione del reagente)

- 1) In ogni reazione di PCR, vengono rilevati simultaneamente controlli positivi e negativi. Ogni campione è testato per la regione ORF1ab, il gene N e lo standard interno endogeno.
- 2) 1) Rimuovere il kit dal frigorifero al di sotto di -15°C e metterlo a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$) per il dethawing. Dopo completa dissoluzione, agitare e mescolare bene e centrifugare a bassa velocità per 10 secondi.
- 3) 2) Calcola il numero di reazioni richieste per l'attuale esperimento n ($n = \text{numero di campioni} + \text{controllo negativo} + \text{controllo positivo}$) e mescola i reagenti secondo il metodo di preparazione del sistema di reazione nella Tabella 2 e poi dividi in $20\ \mu\text{L}$ / reazione. Trasferire la provetta di reazione PCR nell'area di preparazione del campione e rimettere i restanti reagenti a $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ e tenere lontano dalla luce.

Tabella 2

Composition	Dosage (Volume)
Reaction solution	17µL
Mixed enzyme solution	3µL
Total volume	20µL

1. Preparazione del campione: (area di preparazione del campione)

Estrazione di RNA:

Si consiglia di utilizzare kit di estrazione di acido nucleico disponibili in commercio per estrarre il campione di RNA per il rilevamento della PCR. Seguire le istruzioni del kit di estrazione per estrarre.

Aggiunta del campione:

- a. Rimuovere i reagenti preparati nell'area di preparazione dei reagenti e centrifugare a bassa velocità per 10 secondi.
- b. Aggiungere l'RNA da testare, il controllo positivo e il controllo negativo alle provette di reazione PCR, rispettivamente, in una quantità di 5 µL / pozzetto.
- c. Coprire le provette di reazione PCR, registrare la sequenza di caricamento del template e centrifugare a bassa velocità per 10 secondi.
- d. Trasferire le provette di reazione PCR nell'area di amplificazione dell'acido nucleico per l'operazione.

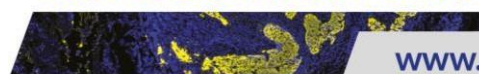
Nota: evitare la contaminazione durante l'estrazione e il caricamento del campione di RNA. Se il template di RNA estratto non può essere immediatamente testato, si consiglia di conservare a -70 °C o inferiore.

2. PCR: (regione di amplificazione dell'acido nucleico)

- 1) Avviare, riscaldare e controllare le prestazioni della macchina.
- 2) Prendere le provette di reazione PCR preparate nell'area di preparazione dei campioni e posizionarle nelle posizioni corrispondenti nel serbatoio di campionamento della macchina (Prima di controllare la macchina, verificare che le provette di reazione siano ben chiuse per evitare l'inquinamento da aerosol dello strumento e ambiente a causa della perdita di prodotti PCR) e registrare l'ordine di posizionamento.
- 3) Impostare i parametri rilevanti dell'amplificazione dell'acido nucleico nella macchina secondo la Tabella 3 ed eseguire l'amplificazione della PCR.

System	Set the reaction system to 25µL		
Acquisizione del segnale	Selezionare FAM e VIC per rilevare i geni virali ORF1ab ed N. Selezionare Cy5 per rilevare lo standard interno.		
Condizioni di Reazione PCR	Fase	Condizioni	Numero di cicli
	Trascrizione inversa	50°C: 15min	1
	Pre-denaturazione	95°C: 15min	1
	PCR	94°C: 15s 55°C: 45s (rilevare il segnale fluorescente alla fine di questi step)	45

Nota: ABI series fluorescence quantitative PCR instrument does not choose ROX calibration, and select <None> for quenching group.



1. Lettura dei risultati

Per l'analisi dei dati, selezionare ΔRn VS Cycle e Linear mode; impostare la soglia appropriata, selezionare Auto Baseline, visualizzare la curva di fluorescenza e ottenere la curva quantitativa di fluorescenza e il valore Ct nello strumento Real-Time PCR.

2. Procedure di controllo qualità

- i) Controllo positivo: i valori Ct del canale FAM, VIC / HEX e del canale standard interno (ROX) sono <37 , con un significativo aumento esponenziale.
- ii) Controllo negativo: i valori Ct del canale FAM, VIC / HEX e del canale standard interno (ROX) sono > 40 o nessun valore Ct, la linea è dritta o leggermente obliqua, senza periodo di crescita esponenziale significativo e periodo di plateau.
- iii) I requisiti di cui sopra devono essere soddisfatti nello stesso esperimento contemporaneamente. Altrimenti, l'esperimento non è valido e deve essere ripetuto.

3. Lettura dei risultati

- i) Positivo: i valori Ct del gene target e dello standard interno sono <37 , con un significativo aumento esponenziale.
- ii) Sospetto: il gene target e il valore Ct standard interno è compreso tra 37 e 40. Il campione deve essere testato ripetutamente.
- iii) Negativo: il gene target e i valori Ct standard interni sono > 40 o nessun valore Ct.

	Test results		Risultato ed Interpretazione
	N gene (FAM channel)	ORF1ab (VIC channel)	
a	+	-	Sospetto positivo
b	-	+	Sospetto positivo
c	+	+	Positivo
d	-	-	Negativo

1. Per campioni con singola positività (a o b) si consiglia la ripetizione del test. Se il singolo target è ancora positivo, il risultato del test del campione è positivo.

2. Se lo standard interno non rileva Ct o $Ct > 40$ nel canale ROX, significa che la concentrazione del campione di prova è troppo bassa o che esiste una sostanza di interferenza che inibisce la reazione. È necessario preparare nuovamente l'esperimento.

3. Per campioni positivi e colture di virus, non sono richiesti i risultati dei test standard interni. Per i campioni negativi, il test standard interno dovrebbe essere positivo. Se il test standard interno è negativo, il risultato del test del campione non è valido e la causa deve essere trovata ed eliminata. Ricampiona e ripeti l'esperimento (se i risultati del test dell'esperimento ripetuto non sono ancora validi, contatta il nostro ufficio tecnico).

4 Determinazione dei risultati dell'area grigia: se il segnale di fluorescenza di un campione ha un aumento significativo nel canale FAM, VIC / HEX, ma il valore Ct è > 40 , il campione si trova nell'area grigia e deve essere riesaminato. Se il risultato del nuovo test è ancora nell'area grigia, viene giudicato positivo

[Determinazione del valore positivo]

1. Risultato positivo: la curva quantitativa fluorescente presenta una curva di amplificazione, valore Ct \leq 40.
2. Risultato negativo: la curva quantitativa fluorescente non ha curva di amplificazione o valore Ct $>$ 40.

[Interpretazione dei risultati]

1. I controlli negativi e positivi devono essere testati in ciascun esperimento e il risultato della prova può essere determinato solo quando i controlli soddisfano i requisiti del controllo di qualità.
2. Quando i canali di test FAM e VIC sono positivi, il risultato del canale Cy5 può essere negativo.
3. Se il risultato standard interno è negativo, se anche i segnali di test FAM e VIC del campione di test sono negativi, il risultato del test del campione non è valido e la causa deve essere trovata ed eliminata e l'esperimento deve essere ripetuto per questo campione

[Indice di performance del test]

1. **Specificità:** α -interferon, Zanamivir, Ribavirin, Oseltamivir, Paramivir, Lopinavir, Ritonavir (Litonavir) Abidor (Abidol), Levofloxacin, Azithromycin, Ceftriaxone, Meropenem, Tobramycin, Histamine hydrochloride, Phenylephrine (Benzolin), Oxymetazoline (Hydroxymezoline), Sodium chloride non hanno mostrato interferenze con il kit.
2. **Cross-reazione:** Itri agenti patogeni simili alle nuove specie di coronavirus 2019 (COVID-19) o che causano sintomi simili (nuovo virus dell'influenza H1N1 (2009), virus dell'influenza H1N1 stagionale), influenza A H3N2, H5N1, H7N9, influenza B Yamagata, influenza B di tipo B Victoria, virus respiratorio sinciziale di tipo A, virus respiratorio sinciziale di tipo B, parainfluenza di tipo I, parainfluenza di tipo II, parainfluenza di tipo III, Adenovirus 1, 2, 3, 4, 5, 7, 55 tipi, Enterovirus A, B, C, D, virus di Epstein-Barr, virus del morbillo, citomegalovirus umano, Rotavirus, Norovirus, virus della parotite, virus della varicella-zoster, Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, Batteri della legione, Pertussis, Haemophilus influenzae, Staphylococcus aureus, Streptococci, Streptococcus Streptococcus pyogenes, Klebsiella pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis e DNA genomico umano non hanno reagito in modo crociato.
3. **Precisione:** il coefficiente di variazione tra lotti / tra lotti, tra giorni / tra giorni tra diversi operatori non deve essere superiore al 5,0%.
4. **Tasso di coincidenza dei controlli positivi negativi:** il tasso di coincidenza di 3 controlli positivi e 10 prodotti di controllo negativo è del 100%.
5. **Limite minimo di rilevamento:** il limite minimo di rilevamento di questo kit è 500 copie / mL

[Limitazioni del test]

1. I risultati del test di questo kit sono solo per riferimento clinico. La diagnosi clinica e il trattamento dei pazienti devono essere considerati in combinazione con sintomi / segni, anamnesi, altri test di laboratorio e risposta al trattamento.
2. Il trattamento improprio del campione durante il processo di raccolta, trasporto, conservazione e estrazione dell'acido nucleico può facilmente causare degradazione dell'RNA e produrre risultati falsi negativi.
3. Quando la concentrazione di acidi nucleici rilevata nel campione è inferiore al limite minimo di rilevazione, possono verificarsi risultati falsi negativi.
4. Se si verifica una contaminazione incrociata durante la raccolta e la preparazione del campione, è facile ottenere risultati falsi positivi.
5. Alcune persone infette hanno un gran numero di virus morti nei loro campioni a causa dell'assunzione di farmaci antivirali. Al momento, questo kit potrebbe rilevare forti risultati positivi e risultati negativi rilevati con il metodo di coltura. In caso di tali risultati, deve essere indagata la recente situazione terapeutica della persona sottoposta a test.
6. Variazioni della sequenza mirata del virus da testare o altri motivi che portano a cambiamenti nella sequenza possono condurre a risultati falsi negativi.

7. Per il nuovo virus, il tipo di campione più adatto e il miglior tempo di campionamento dopo l'infezione potrebbero non essere confermati. Pertanto, la possibilità di risultati falsi negativi sarà ridotta se i campioni vengono raccolti nello stesso paziente in tempi e parti diversi.

[Precauzioni]

1. Il personale di laboratorio deve avere una formazione professionale e una certa esperienza.
2. Il processo sperimentale deve essere eseguito in aree distinte (zona di preparazione del reagente, zona di elaborazione del campione, zona di amplificazione dell'acido nucleico). Strumenti e attrezzature dedicati dovrebbero essere usati in ogni fase dell'operazione dell'esperimento. Dovrebbero essere previsti requisiti rigorosi per ridurre al minimo la contaminazione incrociata.
3. I materiali di consumo sperimentali (come provette da centrifuga, teste di aspirazione, ecc.) Dovrebbero avere ragionevoli procedure di pulizia e ispezione di qualità per evitare che la contaminazione causi risultati falsi positivi o inibitori della reazione di amplificazione per causare risultati falsi negativi.
4. Gli strumenti e il loro sistema di alimentazione di supporto devono essere controllati prima dell'uso per garantire il normale funzionamento del reagente dopo che il reagente è stato scaricato sulla macchina.
5. I puntali di aspirazione utilizzate nell'esperimento devono essere inserite direttamente nel serbatoio di rifiuti contenente ipoclorito di sodio al 10% e gettate insieme ad altri prodotti di scarto.
6. Il banco da lavoro e vari oggetti sperimentali devono essere spesso disinfettati con ipoclorito di sodio al 10%, alcool al 75% e lampade UV.
7. La macchina per PCR in tempo reale richiede una calibrazione frequente e la pulizia dei pozzetti (fori) della piastra campione.
8. Per prevenire l'interferenza di fluorescenza, evitare il contatto diretto con le provette di reazione PCR octaplex
9. Il controllo positivo in questo kit non è contagioso e non causerà danni al corpo umano. Tuttavia, si consiglia di trattarlo come una sostanza potenzialmente infettiva quando lo si utilizza.
10. I campioni di prova coinvolti in questo kit devono essere considerati come sostanze infettive e la loro manipolazione deve soddisfare i requisiti pertinenti delle Linee guida generali per la biosicurezza della microbiologia e dei laboratori biomedici del Ministero della salute e dei regolamenti sulla gestione dei rifiuti medici.

[Versione e approvazione]: *Manual version: V1.0; Approval date: 10/06/2020.*

Distribuito da
CROSSTRAK LTD ,
7, Johnston Road Woodford Green, Essex, UK IG8 0XA
UK Company Registration Number 12553111
UK+44 784 200 4986 | IT +39 347 350 0142 www.crosstrak.co.uk



Prodotto per OaCP da:
Wuhan HealthCare Biotechnology Co., Ltd.
No. 666, Gaoxin Boulevard, Optics Valley Biolake, Building B6, 4/5F.
Wuhan, Hubei, 430075, PR of China.

