



Diagnostic kit for SARS-CoV-2 Nucleic Acid (Real-time PCR)

Istruzioni per l'uso

REF KH-G-M-574-48-CE (48 Test)

 **ATTENERSI SCRUPolosAMENTE ALLE ISTRUZIONI PER L'USO**

[NOME PRODOTTO]

Diagnostic kit for SARS-CoV-2 Nucleic Acid (Real-time PCR)

[CONFEZIONAMENTO]

48 test/kit

[FINALITA' D'USO]

Il test è usato per la determinazione qualitativa dell'acido nucleico di SARS-CoV-2 attraverso l'identificazione della regione ORF1ab e dei geni per le proteine N ed E del genoma virale. Il risultato è da intendersi come supporto alla diagnosi clinica e non deve essere utilizzato come unica base per il trattamento.

[PRINCIPIO DEL METODO]

Le 3 sequenze target del test sono localizzate nella regione ORF1ab e nei geni che codificano per le proteine N e E del genoma del SARS-CoV-2. Sono stati disegnati dei primer specifici per amplificare i segmenti altamente conservati di queste 3 regioni. Specifiche sonde marcate sono state studiate per ibridarsi agli ampliconi. Durante la fase di estensione della reazione di PCR, l'attività 5' esonucleasica della Taq polimerasi taglia il fluoroforo all'estremità 5' dalla sonda, liberandolo nella miscela di reazione, in modo da allontanarlo dalla schermatura del quencher di fluorescenza all'estremità 3', consentendogli di subire la fotostimolazione e di emettere la fluorescenza, che può essere rilevata dallo strumento. Mediante questo meccanismo, l'acido nucleico del SARS-CoV-2 può essere rilevato automaticamente in un sistema di reazione completamente chiuso.

È stato sviluppato un controllo interno (IC) utilizzando una regione di un gene housekeeping (beta-actina). L'amplificazione dei target e dell'IC avviene contemporaneamente nella stessa reazione. L'IC è usato per monitorare che il processo sia stato portato a termine correttamente per ciascun

campione.

[COMPOSIZIONE DEL KIT]

| Reagente | Descrizione | Composizione |
|--------------------------------------|-------------|---|
| <i>Reagente A SARS-CoV-2</i> | 300µL × 1 | Tampone, dNTPs, Mg ²⁺ |
| <i>Reagente B SARS-CoV-2</i> | 400µL × 1 | Taq polimerasi, RNasina, Trascrittasi inversa, UNGasi |
| <i>Reagente C SARS-CoV-2</i> | 300µL × 1 | Primer e sonde |
| <i>Controllo Positivo SARS-CoV-2</i> | 3mL × 1 | Armored RNA dei target ORF1ab/N/E |
| <i>Controllo Negativo SARS-CoV-2</i> | 3mL × 1 | Tampone di conservazione |

Nota: I componenti del kit con differenti numeri di lotto non sono intercambiabili.

[CONSERVAZIONE E STABILITÀ]

Conservare il kit a -15°C o a temperatura inferiore e mantenere al riparo dalla luce. Il kit ha una validità di 12 mesi, e non può essere usato oltre tale periodo.

[STRUMENTI COMPATIBILI]

Strumenti di PCR real-time a fluorescenza con almeno quattro canali di rilevamento (FAM, VIC /HEX, ROX/TEXAS RED, Cy5) quali ABI7500, Bio-Rad CFX96, Tianlong Gentier 96E, etc.

[RACCOLTA DEI CAMPIONI E MODALITÀ DI CONSERVAZIONE]

1. Tipologia di campioni: tampone umano nasofaringeo, plasma
2. Raccolta del campione:
 - 1) Tampone faringeo: strofinare entrambe le tonsille faringee e la parete posteriore della faringe con due tamponi di campionamento in plastica con la testa in fibra di polipropilene e immergere la testa del tampone in una provetta contenente 3 ml di soluzione di conservazione del virus (in alternativa possono essere utilizzati soluzione salina isotonica, liquido di coltura tissutale o buffer salino fosfato), eliminare la parte in plastica e chiudere la provetta.
 - 2) Tampone nasale: inserire delicatamente nella cavità nasale un tampone di campionamento in plastica con la testa in fibra di polipropilene, ruotarlo lentamente ed estrarlo. Ripetere l'operazione nell'altra narice utilizzando un altro tampone. Immergere le 2 teste dei tamponi in una provetta contenente 3 ml di soluzione di conservazione del virus, eliminare le parti in plastica e chiudere la provetta.
 - 3) Campione di plasma: raccogliere il sangue venoso in un tubo di raccolta per il plasma (l'anticoagulante può essere sale di citrato o di EDTA, non utilizzare anticoagulanti a base di eparina. Si raccomanda l'uso di tubi di raccolta con gel separatore). Invertire delicatamente la provetta per

5-10 volte dopo la raccolta e centrifugare a 1500 ~ 1800 x g per 20 minuti. Cercare di evitare che la fibrina precipiti durante la separazione del campione di plasma, per evitare di ostruire i puntali durante l'esecuzione del test.

3. Conservazione del campione: conservare a 2-8°C per non più di 72 ore, a temperatura inferiore a -15°C per non più di 3 mesi, a temperatura inferiore a -70°C per conservazione a lungo termine. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.
4. Trasporto del campione: trasportare i campioni di sangue intero non separati a 2-25°C e centrifugarli entro 24 ore dalla raccolta. I tamponi faringei, i tamponi nasali, il liquido di lavaggio alveolare, i campioni di saliva, siero e plasma possono essere trasportati a 2-8°C o a temperatura inferiore a -18°C.

[SICUREZZA E RISCHIO BIOLOGICO]

Il Controllo Positivo e il Controllo Negativo del kit sono costituiti da plasma umano non-infetto. Il plasma umano è stato controllato mediante test autorizzati dall'Amministrazione Nazionale dei Prodotti Medici cinese (NMPA) per HBV, HCV, acido nucleico HIV-1, anticorpi anti-HCV, anticorpi anti-HIV-1, anticorpi anti-TP, HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeA e HBcAb e rilevato non reattivo per nessuno dei parametri valutati. Ad ogni modo, nessun test in commercio può fornire la certezza assoluta che i prodotti di derivazione umana o originati da microrganismi inattivati non trasmettano infezioni. Tutti i campioni da testare e i Controlli del kit devono essere considerati come potenzialmente infetti e utilizzati in accordo con le normative di sicurezza e biologica di laboratorio e la manipolazione e il processamento devono essere conformi ai requisiti regolatori.

SARS-CoV-2 è considerato un agente infettante altamente contagioso. Evitare la formazione di droplets (goccioline) e aerosol durante la raccolta, il trasporto e l'analisi dei campioni. Attenersi scrupolosamente alle buone pratiche e procedure di laboratorio microbiologico (GMPP) durante la manipolazione e il processamento dei campioni, compresi quelli di sangue per i dosaggi sierologici.

La manipolazione di materiale con un'alta concentrazione di virus vivi (come ad esempio durante la replicazione e l'isolamento del virus o i saggi di neutralizzazione) o di grandi volumi di materiale infettivo deve essere eseguita solamente da personale competente e adeguatamente formato in laboratori in grado di soddisfare requisiti e pratiche di contenimento essenziali aggiuntivi, come ad esempio BLS-3.

SARS-CoV-2 potrebbe essere sensibile ai disinfettanti con provata efficacia contro i virus con envelope,

inclusi sodio ipoclorito (candeggina) (ad esempio 1000 ppm (0,1%) per la disinfezione generica delle superfici e 10000 ppm (1%) per la disinfezione in caso di versamento di sangue), etanolo al 62-70%, perossido di idrogeno allo 0,5%, composti di ammonio quaternario e composti fenolici, se utilizzati secondo le raccomandazioni del produttore. Altri agenti biocidi come benzalconio cloruro allo 0,05-0,2% o clorexidina gluconato allo 0,02% potrebbero essere meno efficaci.

[ESECUZIONE DEL TEST]

1. Per l'estrazione dell'acido nucleico, fare riferimento alle istruzioni del kit utilizzato in abbinamento (è raccomandato l'uso del kit per l'estrazione degli acidi nucleici prodotto da Shanghai Kehua bio-engineering Co., Ltd).

2. Amplificazione dell'acido nucleico

2.1 Preparazione dei reagenti [area di preparazione dei reagenti]

2.1.1 Scongellare i reagenti A, B e C del kit a temperature ambiente, agitare su vortex vigorosamente ogni provetta, quindi centrifugare a 2000 rpm per 10 sec.

2.1.2 Preparare la PCR master Mix e aggiungere il templatò dell'acido nucleico estratto manualmente o utilizzando uno strumento di trasferimento automatico.

2.1.3 Preparare ogni PCR Master Mix come segue:

| | |
|---------------------------------|------|
| Reagente A | 6µL |
| Reagente B | 8µL |
| Reagente C | 6µL |
| Volume finale di PCR Master Mix | 20µL |

2.2 Aggiunta del campione [area di processamento del campione]

Aggiungere rispettivamente 20µL di controllo negativo, 20µL di controllo positivo e 20µL di acido nucleico estratto alla PCR Master Mix di ogni campione, ottenendo un volume finale di 40µL. Tappare le provette da PCR o la piastra da 96-pozzetti, centrifugare brevemente a bassa velocità, quindi trasferire all'area di rilevamento.

2.3 Amplificazione mediante PCR e rilevamento della fluorescenza [area di rilevamento della PCR]

2.3.1 Posizionare le provette di reazione o la piastra nello strumento da PCR e impostare il ciclo di amplificazione secondo la procedura seguente:

2.3.2 Selezionare i canali di rilevamento della fluorescenza: ORF1ab (FAM), gene N (ROX), gene E (CY5), IC (VIC/HEX).

2.3.3 Impostare il campione: inserire il nome e il tipo di ciascun campione nella finestra corrispondente del software dello strumento.

2.3.4 Avviare la reazione di PCR impostando la seguente procedura:

| Step | | Temperatura (°C) | Tempo | No. Cicli | di |
|-------------------------------------|---|------------------|--------|-----------|----|
| 1 | UNG action | 25°C | 5 min | 1 | |
| 2 | Reverse transcription | 50°C | 25 min | 1 | |
| 3 | Taq polymerase activation | 95°C | 10 min | 1 | |
| 4 | Degeneration | 95°C | 10 sec | 5 | |
| | Annealing | 55°C | 20 sec | | |
| | Extension | 72°C | 20 sec | | |
| 5 | Degeneration | 95°C | 10 sec | 40 | |
| | Annealing, extension and fluorescence detection | 60°C | 45 sec | | |
| Dati acquisiti a 60 ° C allo step 5 | | | | | |

[CONTROLLO QUALITÀ]

Il Controllo Positivo di SARS-CoV-2 e il Controllo Negativo di SARS-CoV-2 devono essere inclusi in ciascuna seduta per garantirne la validità. L'esperimento è valido quando 2 dei criteri di seguito elencati sono soddisfatti contemporaneamente, altrimenti l'esperimento non è valido e deve essere ripetuto.

1) Controllo Negativo: nessun rilevamento dei geni target, e valore di Ct dell'IC ≤ 40 .

2) Controllo Positivo: rilevamento di tutti i 3 geni target, con valore di Ct ≤ 40 .

Per i campioni in cui non è stato rilevato nessuno dei 3 geni target, il valore di Ct dell'IC dovrebbe essere < 40 . Se l'IC non è rilevato nei campioni con risultato negativo, il risultato del campione in analisi non può essere considerato valido. Indagare il motivo e ripetere il campione.

[INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI]

1. Se sono stati rilevati più di due dei target di ORF1ab e dei geni N ed E, e la curva è a forma di S, con una significativa fase di crescita esponenziale, il risultato può essere interpretato come positivo per l'acido nucleico del SARS-CoV-2.

2. Se è stato rilevato solo uno dei target di ORF1ab e dei geni N ed E, si suggerisce di ripetere il campione e, se il risultato dell'analisi ripetuta indica che sono stati rilevati più di due geni target e la curva è a forma di S, con una significativa fase di crescita esponenziale, il risultato può essere interpretato come positivo per l'acido nucleico di SARS-CoV-2. Se viene ancora rilevato un solo target positivo, il campione

è ritenuto dubbio e la sequenza deve essere identificata con altri metodi, come il sequenziamento.

3. Negativo: se non c'è alcun rilevamento dei tre canali (ORF1ab, geni N ed E) e il risultato del rilevamento dell'IC è positivo, il risultato può essere interpretato come negativo per l'acido nucleico di SARS-CoV-2.

[LIMITI DELLA PROCEDURA]

1. Il kit è usato per il rilevamento qualitativo dell'acido nucleico del nuovo coronavirus (SARS-CoV-2) in tamponi nasofaringei, espettorato, liquido di lavaggio bronco-alveolare, campioni di siero o plasma, e i risultati non costituiscono espressione diretta del contenuto virale nei campioni originali.

2. Si raccomanda di utilizzare il kit in abbinamento ai reagenti per l'estrazione degli acidi nucleici e la strumentazione dedicata di Shanghai Kehua bio-engineering Co., Ltd. Se si utilizzano altri reagenti per l'estrazione dell'acido nucleico, l'intera procedura dovrebbe essere prima validata.

3. I primer e le sonde sono stati posizionati in corrispondenza del dominio altamente conservato del genoma del nuovo coronavirus (SARS-CoV-2). In rari casi possono comparire mutazioni nel genoma virale nelle posizioni riconosciute dai primer o dalle sonde e questo potrebbe portare ad un mancato rilevamento dell'RNA del virus.

4. Sebbene il kit adotti il sistema anti carryover UNG-dUTP, che può prevenire efficacemente la contaminazione dei prodotti di PCR, la contaminazione dell'acido nucleico da parte dei controlli positivi o dei campioni stessi deve essere comunque tenuta sotto controllo mediante buona pratica di laboratorio e osservanza scrupolosa delle procedure specificate in queste istruzioni per l'uso.

[PRESTAZIONI DEL METODO]

1. Concordezza del 100% con il riferimento negativo di controllo qualità del produttore.

2. Concordezza del 100% con il riferimento positivo di controllo qualità del produttore.

3. Limite di rilevamento (LoD): è stato determinato a 10 copie/reazione con il materiale di riferimento dell'Accademia Cinese di Metrologia. Con 200µl di volume iniziale di campione, il LoD a 150 copie/mL è stato validato sia per i tamponi nasofaringei che per i campioni di plasma.

4. Ripetibilità: sono stati testati 10 replicati consecutivi di due campioni di riferimento, uno alto e uno basso positivo, con un CV% del valore di $C_t \leq 5\%$ per ogni campione.

5. Riproducibilità: 2 campioni costituiti da diluizioni del materiale di riferimento dell'acido nucleico SARS-CoV-2 dell'Accademia Cinese di Metrologia sono stati testati da due operatori, ciascuno dei quali

ha eseguito una seduta al giorno, per 5 giorni con 5 replicati per campione, per seduta. La variabilità del valore Ct è risultata inferiore al 5%

| Sample | Target | Within day | | Between day | | Within operator | | Between operator | | Total | |
|--------|--------|------------|------|-------------|------|-----------------|------|------------------|------|-------|------|
| | | SD | CV | SD | CV | SD | CV | SD | CV | SD | CV |
| J1 | ORF1ab | 0.33 | 1.1% | 0.68 | 2.3% | 0.76 | 2.6% | 0.15 | 0.5% | 0.77 | 2.7% |
| | N | 0.19 | 0.7% | 0.50 | 1.6% | 0.54 | 1.7% | 0.00 | 0.3% | 0.54 | 1.8% |
| | E | 0.19 | 0.7% | 0.50 | 1.9% | 0.54 | 2.0% | 0.00 | 0.0% | 0.54 | 2.0% |
| J2 | ORF1ab | 0.58 | 1.9% | 0.66 | 2.1% | 0.87 | 2.8% | 0.23 | 0.7% | 0.90 | 2.9% |
| | N | 0.39 | 1.3% | 0.27 | 0.9% | 0.47 | 1.6% | 0.06 | 0.2% | 0.47 | 1.6% |
| | E | 0.32 | 1.1% | 0.44 | 1.5% | 0.54 | 1.9% | 0.00 | 0.0% | 0.54 | 1.9% |

6. Reazioni crociate

I campioni contenenti i seguenti microrganismi o acidi nucleici hanno dato risultati negativi, quando testati:

| <i>Microorganismi</i> | | |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Adenovirus</i> | <i>Candida albicans</i> | Human coronavirus 229E |
| Human Metapneumovirus | <i>Haemophilus influenzae</i> | Human coronavirus OC43 |
| Parainfluenza virus | <i>Legionella pneumophila</i> | Human coronavirus HKU1 |
| Rhinovirus | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Human coronavirus NL63 |
| Chlamydia pneumoniae | <i>Staphylococcus aureus</i> | SARS-coronavirus |
| Influenza A virus (H1N1) | <i>S.pyrogenes</i> | MERS-coronavirus |
| Influenza B virus | HPV | <i>Streptococcus pneumonia</i> |
| RSV | HSV | <i>Bordetella pertussis</i> |
| EV71 | CMV | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> |
| CA16 | HEV | <i>Pneumocystis jirovecii</i> (PJP) |
| | | Pool di lavaggi nasali umani |
| | | RNA del fago MS2 |

[AVVERTENZE]

1. Per garantire l'accuratezza e l'affidabilità dei risultati sperimentali, per il prelievo e il processamento dei campioni devono essere utilizzate pipette calibrate e provette per PCR, provette per centrifuga, puntali, etc. monouso e certificati; tutti gli apparecchi devono essere privi di DNAsi e RNAsi.
2. Gli operatori che eseguono la PCR devono essere qualificati e addestrati, con una certa esperienza.
3. È obbligatorio indossare camice e guanti monouso (in lattice senza polvere) durante l'esecuzione dell'esperimento. I guanti devono essere cambiati frequentemente per evitare contaminazione da RNAsi

e cross contaminazione tra i campioni.

4. Deve essere rigorosamente osservata la buona pratica di differenziazione delle zone di esecuzione dell'esperimento:

Zona 1: Area di preparazione del reagente – preparazione dei reagenti per l'amplificazione;

Zona 2: Area di processamento del campione – processamento del campione e dei controlli

Zona 3: Area di rilevamento della PCR – Rilevamento dell'avvenuta amplificazione

I consumabili e gli strumenti collocati in ciascuna delle diverse zone sono dedicati e non devono essere utilizzati in altre aree. Al termine di ciascun esperimento, pulire immediatamente l'area di lavoro.

5. Tutti i reagenti devono essere completamente scongelati a temperatura ambiente, miscelati su vortex vigorosamente e centrifugati brevemente a bassa velocità prima dell'uso.

6. Il campione deve essere processato in una cappa biologica per proteggere l'operatore e prevenire la contaminazione ambientale.

7. Per ciascun esperimento devono essere preparati un controllo negativo e un controllo positivo; i reagenti di lotti diversi non possono essere mescolati e il kit deve essere utilizzato entro la data di scadenza.

8. Evitare la formazione di bolle durante la dispensazione dell'acido nucleico estratto nella PCR Master Mix e verificare che le provette o le piastre di reazione siano correttamente tappate o sigillate prima di caricarle nello strumento, per evitare la contaminazione dello strumento in caso di perdite.

9. Al termine dell'esperimento, estrarre la provetta o la piastra di reazione dallo strumento, sigillarla in un sacchetto di plastica e smaltirla nell'apposita area.

10. I puntali utilizzati nell'esperimento devono essere inseriti in un cilindro di scarico con sodio ipoclorito al 10% e smaltiti adeguatamente.

11. L'area di lavoro e le varie apparecchiature sperimentali devono essere decontaminate con ipoclorito di sodio al 10%, alcool al 75% e lampada UV.

















12. Lo strumento per PCR real-time a fluorescenza deve essere calibrato frequentemente e i fori della piastra di caricamento del campione devono essere puliti.

13. I campioni da analizzare con questo kit devono essere considerati potenzialmente infetti e devono essere maneggiati e trattati secondo le procedure di laboratorio per il trattamento delle malattie infettive.

[RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI]

1. The key points of 2019 novel coronavirus nucleic acid test reagents registration technology review;
2. Administrative measures for clinical gene amplification Laboratory of medical institutions. NO.194
General Office of the Ministry of Health.

Legenda dei simboli utilizzati

| | | | |
|---|--|---|--|
|  | Attenzione |  | Limite di temperatura ($\leq -15^{\circ}\text{C}$) |
|  | Numero di lotto |  | Data di produzione |
|  | Dispositivo medico per uso diagnostic in vitro |  | Consultare le istruzioni per l'uso |
|  | Numero di catalogo |  | Non utilizzare se la confezione è danneggiata |
|  | Utilizzare per |  | Contenuto sufficiente per "n" test |
|  | Non riusare |  | Rischio biologico |
|  | Produttore |  | Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea |
|  | Tenere lontano dalla luce solare |  | Marchio CE |



Produttore: Shanghai Kehua bio-engineering Co., Ltd
 Sede legale: 1189 Qinzhou North Road, 200233, Shanghai, Cina
 Sede operativa: 701 Guiping Road, 200233, Shanghai, Cina
 Telefono: +86-21-64850088, +86-8008203370
 FAX: +86-21-64950975
 Sito web: <http://www.skhb.com>



Dr. Eberhard Spanuth Dianeering-Diagnostics Engineering & Research
 Friedrichstrasse 26 D 69221 Dossenheim, Germany
 Tel: +49 (0) 6221 879 634
 Fax: +49(0) 6221 879 627