

RIDA® GENE Coronavirus

REF PG6805



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstrasse 17, 64297 Darmstadt, Germania

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / www.r-biopharm.com



1. Campo di applicazione

Uso per la diagnostica *in vitro*. Il test RIDA®GENE Coronavirus, eseguito sullo strumento di PCR real-time LightCycler® 480 II, è un test di RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dei coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e del MERS-CoV in tamponi nasali/faringei umani non trattati provenienti da persone con segni e sintomi di infezione respiratoria.

Il test RIDA®GENE Coronavirus ha lo scopo di supportare la diagnosi differenziale delle infezioni da coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e da MERS CoV in pazienti con sintomi di infezione respiratoria, in connessione con altri risultati clinici e di laboratorio.

I risultati negativi non escludono l'infezione da coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e MERS e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi.

Il prodotto è destinato all'uso professionale.

2. Sintesi e spiegazione del test

I coronavirus appartengono alla famiglia Coronaviridae e sono virus a filamento singolo di RNA (ss). Data la loro elevata variabilità genetica, singole specie di virus possono superare la barriera fra le specie e infettare ospiti di specie differenti. Esempi di questi superamenti comprendono le infezioni da SARS-CoV (coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave), responsabili della pandemia di SARS del 2002/2003¹ e le di MERS-CoV (sindrome respiratoria mediorientale da coronavirus) comparsa nel 2012.²

I virus SARS-CoV causano i sintomi della polmonite atipica e durante la pandemia del 2002/2003 hanno provocato oltre 1.000 decessi. Si ritiene che i serbatoi di origine siano civette e pipistrelli. Benché le varie vie di trasmissione non siano del tutto chiare, la trasmissione avviene principalmente attraverso goccioline infette. Non si può escludere la trasmissione per contatto o per via oro-fecale.

Nel 2015, in tutto il mondo sono state confermate oltre 1.100 infezioni di MERS-CoV e sono stati registrati più di 420 decessi correlati.^(3,4) La maggior parte di questi casi sono stati riscontrati nella penisola arabica. Anche per la MERS non è stato ancora chiaramente identificato l'ospite originario, ma si sospetta che la fonte primaria di trasmissione sia rappresentata dai dromedari.⁽⁵⁾ Dopo un periodo di incubazione di 1/2 settimane, compaiono sintomi simili a quelli dell'influenza; i casi gravi possono portare a polmonite e distress respiratorio acuto.

Oltre al SARS-CoV e al MERS-CoV, i vari coronavirus patogeni per l'uomo HKU1, NL63, 229E, OC43 causano manifestazione che variano da infezioni respiratorie lievi a sindromi respiratorie acute gravi.⁽⁶⁾ Sebbene tutti e quattro i coronavirus siano presenti a livello mondiale, nei diversi periodi dell'anno questi virus vengono rilevati in diverse regioni del mondo.

Il coronavirus umano 229E (HCoV-229E) appartiene al genere Alphacoronavirus e, insieme al coronavirus umano OC43 (HCoV-OC43, genere: Betacoronavirus), è

spesso responsabile dei raffreddori.⁽²⁾ Altri Betacoronavirus sono il SARS-CoV, il MERS-CoV e il Coronavirus HKU1. Quest'ultimo è stato diagnosticato nel 2005 in Cina in un paziente ospedalizzato con sindrome respiratoria acuta e polmonite.⁽⁷⁾ Le infezioni da coronavirus umano NL63 (HCoV-NL63) sono simili alle infezioni parainfluenzali. Il virus è stato scoperto per la prima volta in un bambino con bronchiolite nei Paesi Bassi nel 2003 e da allora è stato rilevato in tutto il mondo in bambini piccoli e pazienti immunosoppressi con sindrome respiratoria acuta.⁽⁸⁾

3. Principio del test

RIDA®GENE Coronavirus è un test RT-PCR real-time multiplex per la rivelazione qualitativa diretta e la differenziazione dell'RNA dei coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e MERS-CoV. Dopo l'isolamento dell'RNA, si amplificano i frammenti del gene specifico dei coronavirus e del MERS-CoV (ORF1) (se presenti). Le sequenze target amplificate vengono rivelate con sonde a idrolisi etichettate con un quencher a un'estremità e un colorante reporter fluorescente (fluoroforo) all'altra estremità. In presenza di una sequenza target, le sonde ibridano con l'amplicone. Durante l'estensione, la **Taq-Polymerase** separa il reporter dal quencher. Il reporter emette un segnale fluorescente che viene rivelato dall'unità ottica dello strumento di PCR real-time. Il segnale di fluorescenza aumenta con la quantità di ampliconi formati. Il test RIDA®GENE Coronavirus contiene un **Internal Control RNA** (ICR) per verificare la preparazione del campione e/o la potenziale inibizione della PCR.

4. Contenuto della confezione

Tabella 1: Contenuto della confezione (i reagenti inclusi nel kit sono sufficienti per 100 determinazioni)

Codice del kit	Reagente	Quantità		Colore del coperchio
1	Reaction Mix	2 ×	700 µl	Giallo, pronto per l'uso
2	PP Mix	1 ×	770 µl	Verde chiaro, pronto per l'uso
3	Enzyme Mix	1 ×	80 µl	Rosso, pronto per l'uso
R	Internal Control RNA	2 ×	1800 µl	Marrone, pronto per l'uso
N	PCR Water	1 ×	500 µl	Bianco, pronto per l'uso
P	Positive Control	1 ×	100 µl	Blu, pronto per l'uso

5. Istruzioni di conservazione

- Seguire le linee guida per la manipolazione contenute nella Tabella 2 e riporre il kit immediatamente dopo l'uso attenendosi alle informazioni specificate.
- Tutti i reagenti devono essere conservati lontano dalla luce a una temperatura di -20 °C e, prima dell'apertura, possono essere utilizzati fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Dopo la data di scadenza la garanzia di qualità non è più valida.
- Tutti i reagenti devono essere scongelati delicatamente prima dell'uso (ad esempio in frigorifero a +2 °C – +8 °C).
- Il congelamento/scongelo ripetuto fino a 15 volte non influisce sulla proprietà del test (se necessario, creare aliquote dopo il primo scongelamento e ricongelare i reagenti immediatamente).
- Raffreddare adeguatamente tutti i reagenti durante la preparazione della PCR (da +2 °C a +8 °C).

Tabella 2: Condizioni di conservazione e informazioni

	Temperatura di conservazione	Tempo massimo di conservazione
Prima dell'apertura	-20 °C	Utilizzabile fino alla data di scadenza stampata
Dopo l'apertura	-20 °C	15 cicli di scongelamento-congelamento

6. Reagenti necessari ma non in dotazione

6.1 Contenuto della confezione

Per eseguire i test RIDA®GENE Coronavirus occorrono i seguenti reagenti:

Reagenti

Acqua per PCR (priva di nucleasi)

6.2 Attrezzatura di laboratorio

Per eseguire i test RIDA®GENE Coronavirus occorre la seguente attrezzatura:

Attrezzatura

Piattaforma di estrazione: Maxwell® RSC (Promega)

Strumento per la PCR real-time: LightCycler® 480 II (Roche)

RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004)

Materiali di consumo per PCR real-time (piastre [profilo basso, pozzetti bianchi, telaio trasparente], contenitori di reazione; fogli)

Centrifuga con rotore per piastre

Agitatore a vortice

Pipette (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)

Puntali per pipette con filtri

Guanti monouso senza talco

Per domande sull'uso di attrezzature per la lavorazione automatizzata, si prega di contattare R-Biopharm AG a automation@r-biopharm.de.

7. Avvertenze e misure precauzionali

Solo per la diagnostica *in vitro*.

Questo test deve essere eseguito esclusivamente da personale di laboratorio qualificato. Osservare le linee guida per il lavoro nei laboratori medici.

Nell'esecuzione del test, attenersi rigorosamente alle istruzioni per l'uso.

Non pipettare con la bocca campioni o reagenti. Evitare il contatto con lesioni cutanee e mucose.

Durante la manipolazione di campioni e reagenti indossare gli appositi dispositivi di protezione individuale (guanti, camice e occhiali di sicurezza adatti) e lavarsi le mani dopo aver eseguito il test.

Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui vengono manipolati i campioni.

Per prevenire la contaminazione incrociata e risultati falsi positivi è necessario utilizzare stanze separate nonché speciali indumenti e strumenti per l'estrazione, la preparazione della PCR e la PCR.

Evitare di contaminare i campioni e i componenti del kit con microbi e nucleasi (DNase/RNase).

I campioni clinici devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere smaltiti in modo appropriato, come tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi.

È vietato scambiare e mescolare i componenti (Reaction Mix, PP Mix Enzyme Mix, Internal Control RNA, Positive Control, PCR Water) di un lotto di un kit con i componenti di un altro lotto.

Non utilizzare il kit dopo la data di scadenza. Gli operatori sono responsabili del corretto smaltimento di tutti i reagenti e materiali dopo l'uso. Per lo smaltimento attenersi alle disposizioni nazionali.

I materiali pericolosi sono indicati in base ai requisiti di etichettatura. Per ulteriori dettagli, consultare le schede dei dati di sicurezza (SDS).

8. Raccolta e conservazione dei campioni

8.1 Preparazione dell'RNA da tamponi nasali e faringei

Per la preparazione dell'RNA da striscio, si raccomanda un kit di estrazione dell'acido nucleico reperibile in commercio (come RIDA® Xtract [R-Biopharm]) o un sistema di estrazione dell'acido nucleico (come Maxwell® RSC [Promega]). Fare attenzione alle informazioni fornite dal produttore.

Il test RIDA®GENE Coronavirus contiene un Internal Control RNA che indica l'inibizione potenziale della PCR, verifica l'integrità dei reagenti e conferma l'avvenuta estrazione dell'acido nucleico. L' Internal Control RNA può essere utilizzato solo come controllo di inibizione oppure come processo di controllo dell'estrazione e come controllo di inibizione.

Quando si deve utilizzare l' **Internal Control RNA** solo come controllo di inibizione per l'amplificazione, è necessario aggiungere 1 µl di **Internal Control RNA** alla Master Mix (Tabella 3).

Quando si deve utilizzare l' **Internal Control RNA** come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione per l'amplificazione, durante l'estrazione devono essere utilizzati 20 µl di **Internal Control RNA**. Si raccomanda di aggiungere **Internal Control RNA** alla miscela di campione/tampone di lisi ogniqualvolta possibile e non direttamente al materiale del campione. Si raccomanda di pipettare 1 µl di **Internal Control RNA** per reazione alla PCR Mix, sia per il controllo negativo, sia per il controllo positivo.

9. Esecuzione del test

9.1 Preparazione della Master Mix

Per la PCR è necessario calcolare il numero totale di reazioni (campioni e reazioni di controllo). Ogni volta che viene eseguito il test è necessario includere un controllo positivo e un controllo negativo.

L'aggiunta di un ulteriore 10 % di volume alla Master Mix è consigliata per compensare la perdita della pipetta (Tabella 3 e Tabella 4). Scongelare, vorticare (ad esclusione dell'Enzyme Mix) e centrifugare brevemente prima di usare la **Reaction Mix**, l' **Enzyme Mix**, il **Positive Control**, la **PCR Water** e l' **Internal Control RNA**. I reagenti devono essere sempre adeguatamente raffreddati durante le fasi di lavoro (da +2 °C a +8°C).

Tabella 3: Esempio di calcolo e produzione della Master Mix per 10 reazioni (ICR come controllo di estrazione e di inibizione)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10 %)
1	Reaction Mix	12,5 µl	137,5 µl
2	PP-Mix	6,9 µl	75,9 µl
3	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
	Totale	20,1 µl	221,1 µl

Mescolare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

Tabella 4: Esempio di calcolo e produzione della Master Mix per 10 reazioni (ICR solo come controllo di inibizione)

Codice del kit	Componenti della Master Mix	Quantità per reazione	10 reazioni (più 10 %)
1	Reaction Mix	12,5 µl	137,5 µl
2	PP-Mix	6,9 µl	75,9 µl
3	Enzyme-Mix	0,7 µl	7,7 µl
R	Internal Control RNA	1,0 µl	11 µl
	Totale	21,1 µl	232,0 µl

Mescolare la Master Mix e quindi centrifugare per breve tempo.

9.2 Preparazione della PCR Mix

Pipettare 20 µl della Master Mix in ogni cuvetta di reazione (cuvette o piastre).

Controllo negativo: 5 µl di PCR Water pipettati nella rispettiva Master Mix.

Nota: Quando si utilizza l' Internal Control RNA come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, si raccomanda di pipettare 1 µl di Internal Control RNA in ciascuna PCR Mix del controllo negativo.

Campioni: Dispensare 5 µl di eluato nella rispettiva Master Mix pre-pipettata.

Controllo positivo: Pipettare 5 µl di Positive Control nella rispettiva Master Mix.

Nota: Quando si utilizza l' Internal Control RNA come controllo di estrazione per la preparazione del campione e come controllo di inibizione, si raccomanda di pipettare 1 µl di Internal Control RNA in ciascuna PCR Mix del controllo positivo.

Chiudere le cuvette o le piastre di reazione, centrifugare brevemente a bassa velocità e trasferire nello strumento di PCR real-time. Avviare la PCR in base alle impostazioni dello strumento per PCR (Tabella 5 e Tabella 6).

9.3 Impostazione dello strumento per PCR

9.3.1 Profilo universale RT-PCR real-time

Tabella 5: Profilo universale RT-PCR real-time per LightCycler® 480 II

<u>Trascrizione inversa</u>	10 min, 58 °C
Denaturazione iniziale	1 min, 95 °C
Cicli	45 cicli
<u>PCR</u> Denaturazione Appaiamento/Estensione	10 s, 95°C
	15 s, 60°C
Velocità di transizione della temperatura/ velocità di rampa	Durata di conservazione

Nota: l'appaiamento e l'estensione avvengono nella stessa fase.

Nota: è possibile utilizzare il profilo della PCR real-time universale anche per i test del DNA se si combinano le PCR real-time del RIDA®GENE DNA e del RIDA®GENE RNA in un solo ciclo.

9.4 Impostazione del canale di rivelazione

Tabella 6: Selezione dei canali di rivelazione appropriati

Strumento per la PCR real-time	Rivelazione	Canale di rivelazione	Commento
Roche LightCycler® 480 II	Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43)	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001)
	ICR	533/580	
	MERS-CoV	618/660	

10. Controllo qualità

I campioni vengono valutati utilizzando il software di analisi dello strumento di PCR real-time in base alle istruzioni del produttore. Il controllo negativo e il controllo positivo devono mostrare i risultati corretti (vedere Tabella 7).

Il **Positive Control** è disponibile a una concentrazione di 10^3 copie/ μ l. Viene utilizzato in una quantità totale di 5×10^3 copie in ogni esecuzione di PCR.

Tabella 7: Un ciclo di PCR valido deve soddisfare le seguenti condizioni:

Campione	Risultato	Ct ICR	Gene Ct target
Positive Control	Positivo	N/A *1	Vedere certificato di garanzia di qualità
Negative Control	Negativo	Ct >20	0

**1 Un valore Ct per l'ICR non è essenziale per ottenere un risultato positivo per il controllo positivo.*

Se il controllo positivo non rientra nell'intervallo Ct specificato, ma il controllo negativo è valido, tutte le reazioni devono essere rianalizzate, compresi i controlli.

Se il controllo negativo non è negativo, ma il controllo positivo è valido, tutte le reazioni devono essere rianalizzate, compresi i controlli.

Se i valori specificati non sono soddisfatti, prima di ripetere il test è necessario verificare quanto segue:

- Data di scadenza dei reagenti utilizzati
- Funzionalità dell'attrezzatura utilizzata
- Procedura di esecuzione del test corretta

Se le condizioni continuano a non essere soddisfatte dopo aver ripetuto il test, rivolgersi al produttore o al proprio distributore R-Biopharm locale.

11. Interpretazione del risultato

Tabella 8: Interpretazione del risultato

Rivelazione di			Risultato
Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43)	MERS-CoV	ICR	
positivo	negativo	positivo /negativo	Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) rivelabili
negativo	positivo	positivo /negativo	MERS-CoV rivelabile
positivo	positivo	positivo /negativo	Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e MERS-CoV rivelabile
negativo	negativo	positivo	Negativo (geni target non rivelabili)
negativo	negativo	negativo	Non valido

Un campione è positivo se sia l'RNA del campione sia l' **Internal Control RNA** mostrano amplificazione nel sistema di rivelazione.

Un campione è inoltre valutato positivo se l'RNA del campione mostra un'amplificazione, ma l' **Internal Control RNA** non mostra amplificazione nel sistema di rivelazione. In questo caso non è necessario rivelare l' **Internal Control RNA** perché concentrazioni elevate di ampliconi possono far sì che il segnale dell' **Internal Control RNA** sia debole o assente.

Un campione è valutato come negativo se l'RNA del campione non mostra amplificazione, ma è presente un'amplificazione per l' **Internal Control RNA** nel sistema di rivelazione. La rivelazione dell' **Internal Control RNA** può escludere l'inibizione della reazione di PCR.

Un campione non è valido se né l'RNA del campione né l' **Internal Control RNA** mostrano amplificazione nel sistema di rivelazione. Il campione contiene inibitori della PCR o si è verificato un errore durante il processo di estrazione. Il campione estratto deve essere diluito 1:10 con PCR Water e nuovamente amplificato oppure è necessario migliorare l'isolamento e la purificazione del campione.

12. Limiti del metodo

1. Il test RIDA®GENE Coronavirus rivela l'RNA dei coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e MERS-CoV RNA da tamponi nasali/faringei umani non trattati. Pertanto non è possibile dedurre una correlazione tra il livello di un determinato valore Ct e la presenza di sintomi clinici gravi. I risultati ottenuti devono sempre essere interpretati in combinazione con la sintomatologia clinica nel suo complesso.
2. La diagnosi non dovrebbe basarsi solo sul risultato del test biologico molecolare, ma dovrebbe sempre tenere conto dell'anamnesi e dei sintomi del paziente.
3. Questo test è verificato solo per i tamponi nasali/faringei umani non trattati.
4. Campionamento, trasporto, stoccaggio e manipolazione impropri o un carico di patogeni inferiore alla sensibilità analitica del test possono portare a risultati falsi negativi.
5. La presenza di inibitori della PCR può portare a risultati falsi negativi o non validi.
6. Come per tutti i test diagnostici *in vitro* basati sulla PCR, possono essere rivelate concentrazioni estremamente basse delle sequenze target, sotto il limite di rivelazione (LoD 95%), ma i risultati ottenuti non sono sempre riproducibili.
7. Mutazioni o polimorfismi nella regione di legame del primer o della sonda possono interferire con la rivelazione di varianti nuove o sconosciute e possono portare a risultati falsi negativi con il RIDA®GENE coronavirus.
8. Un risultato positivo non indica necessariamente la presenza di organismi vitali. Un risultato positivo indica la presenza dei geni target corrispondenti (ORF1).
9. Questo test dovrebbe essere eseguito secondo il regolamento UE sulle buone pratiche di laboratorio (BPL). Durante l'esecuzione del test, l'operatore deve seguire attentamente le istruzioni del produttore.

13. Prestazioni e caratteristiche

13.1 Sensibilità analitica

La RT-PCR real time multiplex RIDA®GENE Coronavirus ha un limite di rivelazione di ≥ 50 copie di RNA/reazione per i coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) e il MERS-CoV (Fig. 1, Fig. 2).

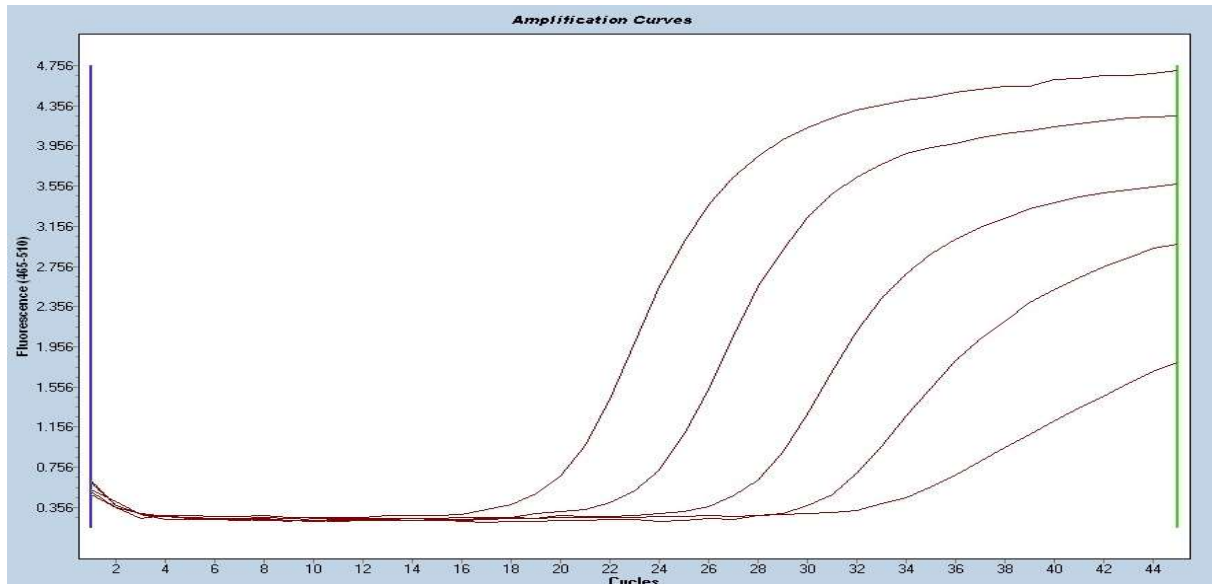


Figura 1: Serie di diluizioni di coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43) ($10^5 - 10^1$ copie di RNA/ μ l) sul LightCycler® 480 II

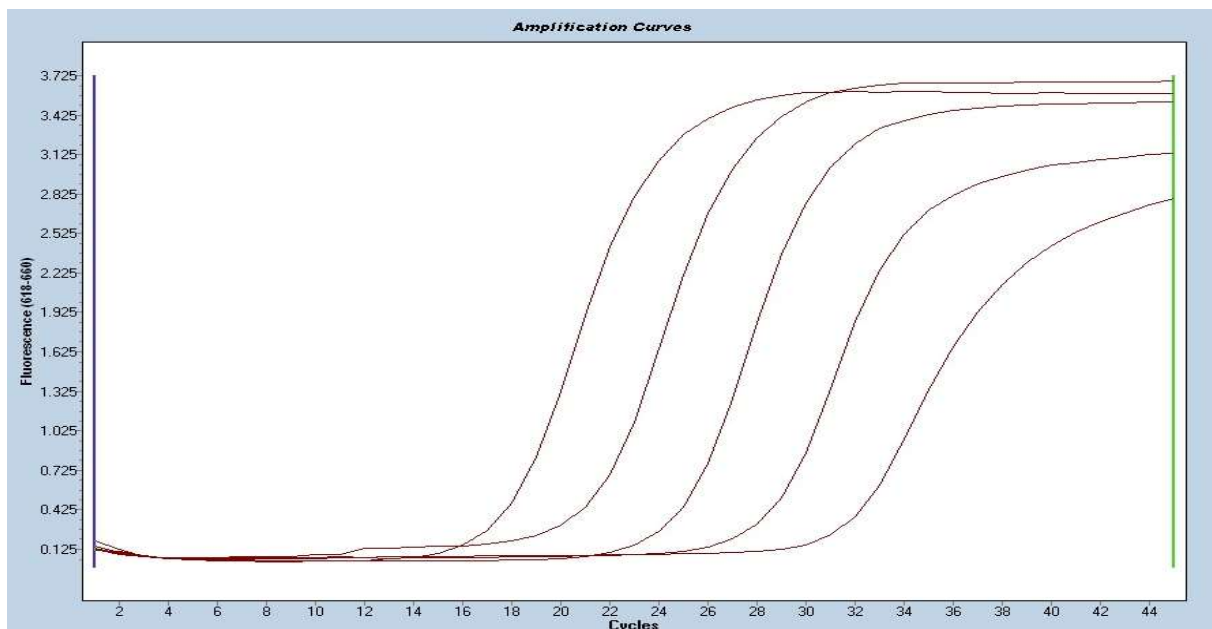


Figura 2: Serie di diluizioni di MERS ($10^5 - 10^1$ copie di RNA/ μ l) >sul LightCycler® 480 II

Il limite di rivelazione dell'intero metodo dipende dalla matrice del campione, dall'estrazione dell'RNA e dal contenuto di RNA.

13.2 Specificità analitica

Il test RIDA®GENE Coronavirus RT-PCR real-time è specifico per i coronavirus. Non sono state rivelate reattività incrociate con le seguenti specie (Tabella 9):

Tabella 9: Organismi potenzialmente cross-reattivi

Organismo	Risultato del test	
	Coronavirus (HKU1, NL63, 229E, OC43)	MERS-CoV
<i>Acinetobacter baumannii</i> , ceppo 5377	negativo	negativo
Adenovirus	negativo	negativo
Adenovirus 1, umano, ceppo Adenoid 71	negativo	negativo
Adenovirus 7, umano, ceppo Gomen	negativo	negativo
Adenovirus 40, umano, ceppo Dugan	negativo	negativo
Adenovirus 41, umano, ceppo Tak	negativo	negativo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	negativo	negativo
<i>Arcobacter butzleri</i>	negativo	negativo
Astrovirus	negativo	negativo
<i>Bacillus cereus</i>	negativo	negativo
<i>Bacteroides fragilis</i>	negativo	negativo
<i>Bordetella parapertussis</i> , ceppo 12822	negativo	negativo
<i>Bordetella pertussis</i> Tohama 1	negativo	negativo
<i>Campylobacter coli</i>	negativo	negativo
<i>Campylobacter jejuni</i>	negativo	negativo
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	negativo	negativo
<i>Campylobacter lari</i> sottosp. <i>lari</i>	negativo	negativo
<i>Campylobacter upsaliensis</i>	negativo	negativo
<i>Candida albicans</i>	negativo	negativo
<i>Citrobacter freundii</i> NCTC 9750	negativo	negativo
<i>Clostridium bifermentans</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium difficile</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium perfringens</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium sporogenes</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium septicum</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium novyi</i>	negativo	negativo
<i>Clostridium sordellii</i>	negativo	negativo
<i>E. coli</i> (O26:H-)	negativo	negativo
<i>E. coli</i> (O6)	negativo	negativo

<i>E. coli</i> (O157:H7)	negativo	negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	negativo	negativo
<i>Enterococcus faecalis</i>	negativo	negativo
Virus di Epstein-Barr, ceppo B95-8	negativo	negativo
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	negativo	negativo
Virus dell'herpes simplex 1, ceppo McIntyre	negativo	negativo
Virus dell'herpes simplex 2, ceppo MS	negativo	negativo
Metapneumovirus umano	negativo	negativo
Coxsackie B4 umano	negativo	negativo
Cytomegalovirus umano	negativo	negativo
Virus parainfluenzale umano 1, ceppo C35	negativo	negativo
Virus parainfluenzale umano 2, ceppo Greer	negativo	negativo
Virus parainfluenzale umano 4b, ceppo CH19503	negativo	negativo
Virus parainfluenzale umano, sierotipo 3	negativo	negativo
Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo Long	negativo	negativo
Virus respiratorio sinciziale umano, ceppo 9320	negativo	negativo
Rhinovirus umano genogruppo A	negativo	negativo
Virus dell'influenza A/PR/8/34	negativo	negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ceppo MGH 78578	negativo	negativo
<i>Legionella pneumophila</i> sottosp. <i>pneumophila</i>	negativo	negativo
<i>Klebsiella oxytoca</i>	negativo	negativo
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , ceppo FH di agente Eaton	negativo	negativo
<i>Neisseria meningitidis</i> , ceppo FAM18	negativo	negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	negativo	negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	negativo
Rotavirus	negativo	negativo
<i>Salmonella enteritidis</i>	negativo	negativo
<i>Salmonella typhimurium</i>	negativo	negativo
<i>Serratia liquefaciens</i>	negativo	negativo
<i>Shigella flexneri</i>	negativo	negativo

<i>Staphylococcus aureus</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negativo	negativo
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> SM131	negativo	negativo
<i>Staphylococcus hominis</i> sottosp. <i>novobiosepticus</i> R22	negativo	negativo
<i>Streptococcus pneumoniae</i> , ceppo NCTC 7465	negativo	negativo
Virus Varicella Zoster (tipo B)	negativo	negativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	negativo	negativo
<i>Yersinia enterocolitica</i>	negativo	negativo

Sostanze interferenti

La presenza di inibitori della RT-PCR e sostanze interferenti può portare a risultati falsi negativi o non validi. Analogamente, sono stati studiati gli effetti di diverse sostanze che potrebbero essere presenti in quanto ampiamente utilizzate nelle infezioni del tratto respiratorio o a causa della loro presenza diffusa nei campioni corrispondenti.

Le sostanze che potrebbero influenzare significativamente i risultati del test sono state prima esaminate in un'analisi di interferenza. Sono state identificate varie sostanze che potrebbero essere presenti come residui dell'estrazione, a causa dell'uso diffuso nelle infezioni respiratorie (vari farmaci da banco o soggetti a prescrizione), oppure a causa della presenza diffusa nei campioni di controllo corrispondenti (ad esempio, mucine sulla superficie delle mucose o sangue), e inizialmente le stesse sono state controllate in concentrazioni elevate (tre volte la dose giornaliera o la simulazione del "caso peggiore"). Se dall'analisi di interferenza risultava una possibile interferenza con una delle sostanze esaminate, è stata stabilita una relazione dose-effetto tra la concentrazione della sostanza in questione e l'interferenza.

Non sono state individuate interferenze per le sostanze elencate nella Tabella 10.

Tabella 10: Sostanze potenzialmente interferenti

Sostanza potenzialmente interferente	Concentrazione
Ciprofloxacina 500 mg (ciprofloxacina)	25 mg/ml
Ampicillina	25 mg/ml
ratioAllerg 50 µg (beclometasone dipropionato)	10 % [v/v]
Sangue umano	2 % [v/v]
Eritromicina	10 % [v/v]
Flutide Nasal (fluticasone propionato)	25 mg/ml
Robitussin (guaifenesina/destrometorfano)	10 % [v/v]
Chloraseptic® spray per la gola dolorante (fenolo)	10 % [v/v]
Mucine	60 µg/ml
Cloruro di sodio	10 % [v/v]
Nasivin 0,05% (ossimetazolina)	10 % [v/v]
Tobramicina	4 µg/ml
Oseltamivir fosfato	25 mg/ml

13.3 Reattività analitica

La reattività della RT-PCR real time multiplex RIDA®GENE Coronavirus è stata esaminata rispetto a vari sottotipi del coronavirus (vedi tab. 11). Tutti i sottotipi di coronavirus del panel campione sono stati rivelati tramite RT-PCR real-time multiplex RIDA®GENE Coronavirus. La reattività del sottotipo HKU1 è stata analizzata mediante sequenze abbinate.

Tabella 11: Test di reattività analitica

Ceppo - Sottotipo	Concentrazione	Risultato	
		Coronavirus	MERS-CoV
Coronavirus – HKU1	*	positivo	negativo
Coronavirus – OC43	1,5 x 10 ⁻¹ U/ml	positivo	negativo
Coronavirus – NL63	1,2 x 10 ⁻¹ U/ml	positivo	negativo
Coronavirus – 229E	1,2 x 10 ⁰ U/ml	positivo	negativo
Coronavirus – MERS	1,0 x 10 ⁻⁵ U/ml	negativo	positivo










*La reattività analitica al coronavirus HKU1 è stata rivelata con un'analisi BLAST.

14. Cronologia delle versioni

Numero della versione	Sezione e denominazione
2017-09-20	Versione precedente
2021-08-13	Revisione generale: 1. Campo di applicazione 4. Contenuto della confezione 5. Istruzioni di conservazione 6. Reagenti necessari ma non in dotazione 7. Avvertenze e misure precauzionali 8. Raccolta e conservazione dei campioni 9. Esecuzione del test 10. Controllo qualità 12. Limiti del metodo 13. Prestazioni e caratteristiche
2022-04-19	6. Reagenti necessari ma non in dotazione (RIDA®GENE Color Compensation Kit IV (PG0004))

15. Descrizione dei simboli

Simboli generali

	Usò per la diagnostica in vitro
	Attenersi alle istruzioni per l'uso
	Numero di lotto
	Data di scadenza
	Temperatura di conservazione
	Numero di catalogo
	Quantità di test
	Data di produzione
	Fabbricante

Simboli specifici del test

Reaction Mix	Reaction Mix
PP-Mix	Miscela primer/campione
Enzyme-Mix	Enzyme Mix
Internal Control RNA	Controllo dell'estrazione/inibizione
PCR Water	Negative Control
Positive Control	Positive Control

16. Bibliografia

1. World Health Organization Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) multi-country outbreak - Update 6 http://www.who.int/csr/don/2003_03_21/en/ accessed 28.07.2015
2. To K.W. et al. From SARS coronavirus to novel animal and human coronaviruses. *J Thorac Dis* 2013; 5 (S2):S103-S108.
3. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS CoV) – Saudi Arabia <http://www.who.int/csr/don/29-april-2015-mers-saudi-arabia/en/> accessed 30.07.2015
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: severe respiratory illness associated with Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)–worldwide, 2012–2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013; 62:480–483
5. Adney DR et al. Replication and shedding of MERS-CoV in upper respiratory tract of inoculated dromedary camels. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20:1999–2005
6. US Centers for Disease Control and Prevention. MERS clinical features [cited 2015 May 30]. <http://www.cdc.gov/coronavirus/mers/clinical-features.html> accessed 30.07.2015
7. Woo PC et al. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J Virol* 2005;79: 884-95.
8. Van der Hoek L, Pyrc K, Jebbink MF, et al. Identification of a new human coronavirus. *Nat Med* 2004;10: 368-373.