

**IVD**

Istruzioni per l'uso (italiano)

**1 Destinazione d'uso**

L'ampliCube Coronavirus Panel è un test qualitativo in vitro per il rilevamento specifico dell'RNA del Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (coronavirus responsabile della sindrome respiratoria mediorientale) (MERS-CoV), dell'RNA del nuovo SARS-CoV-2, del SARS-CoV, del Bat SARS-like CoV (coronavirus dei pipistrelli correlato al virus della SARS) e dell'RNA dei coronavirus umani (HCoV) (NL63, OC43, 229E, HKU1) in escreti, tamponi, BAL (lavaggi broncoalveolari), aspirati tracheali o feci umani.

**2 Campo d'applicazione**

Il Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (coronavirus responsabile della sindrome respiratoria mediorientale) (MERS-CoV) e i coronavirus umani (HCoV) con le specie NL63, OC43, 229E e HKU1 appartengono alla famiglia delle *Coronaviridae* e rivestono una grande importanza come agenti eziologici di malattie che vanno da infezioni respiratorie lievi fino alla sindrome respiratoria acuta severa. Circa un terzo di tutte le malattie da raffreddamento sono causate dagli HCoV, il sintomo concomitante più comune è la diarrea. Il MERS-CoV è responsabile della sindrome respiratoria mediorientale, una malattia che si manifesta in forma acuta, spesso a decorso severo e sintomi respiratori simil-influenzali, con polmonite e dispnea. Si dovrebbe considerare la diagnosi differenziale di MERS-CoV in particolare qualora il contatto con persone infettate da MERS-CoV sia avvenuto entro le ultime 2 settimane dall'esordio della malattia in un paese della penisola arabica.

I coronavirus SARS, come il SARS-CoV-2 (agente patogeno eziologico della pandemia da COVID-19), si diffondono prevalentemente per trasmissione da uomo a uomo attraverso goccioline contenute nell'aria respirata. I sintomi possono essere febbre, tosse e disturbi respiratori, fino a polmonite e sindrome di dispnea acuta, con esiti letali in individui che presentano comorbidità.

L'ampliCube Coronavirus Panel trova impiego per il rilevamento e la differenziazione tra MERS-CoV, SARS-CoV (in particolare SARS-CoV-2) e HCoV.

**3 Principio del test**

Il test è un sistema Real-Time PCR (reazione a catena della polimerasi in tempo reale) RT (a trascrittasi inversa), che utilizza primer specifici e sonde marcate per la trascrizione dell'RNA in cDNA, l'amplificazione e il rilevamento dell'RNA di MERS-CoV, SARS-CoV-2, SARS-CoV, Bat SARS-like CoV e HCoV (NL63, OC43, 229E, HKU1).

Per assicurare che gli acidi nucleici isolati dal campione del paziente non contengano sostanze in grado di inibire la RT-PCR, durante l'isolamento dell'acido nucleico al campione viene aggiunto un controllo interno (IC). Tale IC viene trascritto nel cDNA, amplificato e rilevato nella stessa determinazione PCR. In questo modo è possibile escludere risultati del test falsi negativi causati dall'inibizione della reazione RT-PCR. L'IC consente al contempo di attestare l'estrazione degli acidi nucleici dal campione del paziente.

Le sonde per il rilevamento degli acidi nucleici specifici dell'agente patogeno sono marcate con i coloranti reporter FAM (MERS-CoV), HEX (SARS-CoV-2, SARS-CoV, Bat SARS-like CoV) e ATTO Rho 12 (HCoV), le sonde per il rilevamento del controllo interno con ATTO 647N. In questo modo nella stessa porzione di reazione è possibile rilevare simultaneamente tutte le sequenze target.

Il valore Ct (*cycle threshold*) descrive la parte della curva in cui la fluorescenza aumenta per la prima volta in misura esponenziale rispetto al valore di fondo.

**4 Reagenti**

**4.1 Contenuto della confezione**

I reagenti contenuti in una confezione sono sufficienti per 50 determinazioni.

Ogni set di reagenti contiene:

<b>P&amp;P MIX</b>	150 µl di mix di Primer & Probe per MERS-CoV, SARS-CoV, HCoV e controllo interno (coperchio di colore verde)
<b>ENZYME</b>	600 µl mix di enzimi (coperchio di colore bianco) Contiene trascrittasi inversa e DNA polimerasi. (Il componente è colorato di blu.)
<b>CONTROL INT</b>	250 µl di controllo interno (coperchio incolore)

<b>CONTROL +</b>	170 µl di controllo positivo (coperchio di colore rosso)
<b>CONTROL -</b>	2 x 1800 µl di controllo negativo (coperchio di colore blu)
<b>INSTRU</b>	1 Istruzioni per l'uso

**4.2 Reagenti, materiali e dispositivi aggiuntivi richiesti**

- A seconda del termociclatore per Real-Time PCR utilizzato, MIKROGEN fornisce reagenti per la calibrazione del colorante: MIKROGEN *ampliCube Color Compensation* (LightCycler® 480 II (Roche) art. n. 50502), MIKROGEN *ampliCube Color Compensation* (analizzatore cobas z 480 (Roche) art. n. 50503) o il set di calibrazione del colorante per il CFX96 (Bio-Rad, art. n. 50505). Qualora la procedura sia eseguita sul termociclatore per PCR Mic (bms), MIKROGEN fornisce template per il test Mic.
- Estrazione degli acidi nucleici: si raccomandano i seguenti sistemi di estrazione degli acidi nucleici: sistema MagNA Pure®, Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche) o kit *alphaClean Mag RNA/DNA* (MIKROGEN) con procedura su estrattore M32, M48 o M96 (Biorad)
- Termociclatore in tempo reale: LightCycler® 480 II (Roche), analizzatore cobas z 480 (Roche), CFX96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Applied Biosystems), Mic (bms), Rotor-Gene Q (Qiagen)
- Pellicole e piastre per PCR a 96 pozzetti: attenersi alle raccomandazioni del produttore del termociclatore per Real-Time PCR
- Micropipette con siringhe monouso con filtro da 10 µl, 20 µl, 100 µl e 1000 µl
- Miscelatore a vortice ad alta velocità (raccomandati 3200 giri/min)
- Mini-centrifuga
- Se necessario, centrifuga per piastre
- PBS o H<sub>2</sub>O (*grado PCR*) in caso di impiego di tamponi in fibra di nylon floccato senza mezzo di trasporto
- Guanti monouso non talcati
- Blocco di raffreddamento

**5 Conservazione e manipolazione**

- Prima e dopo l'uso conservare i reagenti a una temperatura compresa tra -25°C e -18°C.
- Evitare la ripetizione delle operazioni di congelamento e scongelamento dei componenti (più di dieci volte). Si consiglia di separare i componenti del test dopo il primo scongelamento.
- Durante le fasi di lavoro conservare i reagenti in luogo fresco (da +2°C a +8°C).
- Durante l'esecuzione del test proteggere i componenti del kit dalla luce diretta del sole.
- Prima di iniziare il test scongelare completamente tutti i reagenti, miscelarli (brevemente con il miscelatore a vortice) e centrifugarli.
- Sulle confezioni è riportata una data di scadenza, oltre la quale decade la garanzia di qualità del prodotto.
- Il test deve essere eseguito esclusivamente da personale addestrato e autorizzato.
- In caso di modifiche sostanziali al prodotto oppure alle modalità di impiego da parte dell'utente, l'utilizzo può risultare non conforme alla destinazione d'uso stabilita da MIKROGEN.
- La contaminazione incrociata può condurre a risultati errati. Aggiungere con precauzione i campioni del paziente e i controlli, prestando attenzione che le porzioni di reazione non trabocchino nelle altre cavità.

**6 Avvertenze e prescrizioni di sicurezza**

- Utilizzare solo per la diagnostica in vitro.
- Tutti i campioni del paziente devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo.
- Per l'intera durata dell'esecuzione del test indossare idonei guanti monouso.
- Tutti i reagenti e i materiali che entrano in contatto con campioni potenzialmente infettivi devono essere trattati con idonee sostanze disinfettanti oppure devono essere smaltiti in conformità con le prescrizioni igieniche applicabili. Osservare le indicazioni del produttore relative alla concentrazione e ai tempi di incubazione.
- Non sostituire né mescolare i reagenti con reagenti di kit di lotti diversi, altri kit PCR MIKROGEN o con reagenti di altri produttori.

- Prima di eseguire il test, leggere e seguire scrupolosamente tutte le istruzioni per l'uso. Eventuali discrepanze con il protocollo di test riportato nelle istruzioni per l'uso possono determinare risultati errati.

## 7 Prelievo dei campioni e preparazione dei reagenti

### 7.1 Materiale campione

Il materiale di base per l'ampliCube Coronavirus Panel è l'RNA, estratto da escreti, tamponi, BAL, aspirati tracheali o feci di origine umana. La qualità della preparazione degli acidi nucleici influenza il risultato del test. È necessario accertarsi che il metodo di estrazione scelto sia compatibile con la tecnologia Real-Time PCR.

#### 7.1.1 Preparazione del campione

In caso di impiego di un tampone in fibra di nylon floccato senza mezzo di trasporto:

1. Incubare il tampone in 0,5 ml di PBS (tampone fosfato salino) (per l'estrazione con il sistema MagNA Pure®) o in 0,5 ml di H<sub>2</sub>O (per l'estrazione con alphaClean Mag RNA/DNA) per 5 minuti a temperatura ambiente.
2. Gettare il tampone e utilizzare la sospensione PBS o H<sub>2</sub>O per l'estrazione degli acidi nucleici.

### 7.2 Estrazione degli acidi nucleici

Estrarre gli acidi nucleici dal campione del paziente e dal controllo negativo (NC). Si consiglia un volume iniziale di estrazione di 200 µl e un volume di eluizione di 50 µl o 100 µl a seconda del sistema di estrazione. Le estrazioni (sistema MagNA Pure® (Roche) da 400 µl di materiale iniziale eluite in 100 µl hanno mostrato risultati confrontabili. Seguire le istruzioni fornite dal produttore del kit di estrazione.

1. Scongellare il controllo interno (IC) (coperchio incolore) e il controllo negativo (NC) (coperchio di colore blu).  
**Assicurarsi che l'IC e l'NC siano completamente scongelati. Prima dell'uso miscelare rapidamente l'IC e l'NC con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente!**
2. Durante l'estrazione di ogni campione del paziente e dell'NC, aggiungere 5 µl di IC. L'IC deve essere aggiunto al mix di tamponi di lisi dei campioni e non direttamente al materiale campione.
3. Estrarre i campioni del paziente e l'NC. (Nota: l'NC non può essere utilizzato senza estrazione nella PCR!)
4. Il controllo positivo non viene estratto.

Si consiglia il seguente sistema di estrazione degli acidi nucleici, che è stato utilizzato per la valutazione delle prestazioni:

Sistema di estrazione	Volume campione	Volume eluizione
MagNA Pure® 24 (Roche) Total NA Isolation Kit	200 µl	50 µl
M96 Nucleic Acid Extraction System (biocomma) Kit alphaClean Mag RNA/DNA (MIKROGEN)	200 µl	100 µl

Se si desidera utilizzare altri metodi di estrazione, si prega di rivolgersi al produttore per verificarne la compatibilità.

### 7.3 Preparazione del Master mix

1. Scongellare il mix di primer e campioni (coperchio di colore verde) e il mix di enzimi (coperchio di colore bianco). Durante questa operazione proteggere i reagenti dalla luce.  
**Assicurarsi che i reagenti siano completamente scongelati. Prima dell'uso miscelare i reagenti con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente!**
2. Preparare il Master mix attenendosi al seguente schema di pipettaggio:

Componenti	Master mix per 1 reazione
Mix di primer e campioni	3 µl
Mix di enzimi	12 µl
Volume complessivo	15 µl

3. Miscelare tutto il Master mix con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente.
4. Preparare 15 µl di Master mix per ogni reazione PCR.


### 7.4 Preparazione della reazione RT-PCR


1. Scongellare il controllo positivo (PC) (coperchio di colore rosso).  
**Assicurarsi che i reagenti siano completamente scongelati. Prima dell'uso miscelare i reagenti con il miscelatore a vortice e centrifugare brevemente!**

Componenti	1 reazione
Master mix da 7.3	15 µl
Eluato campione o NC oppure il PC	10 µl

2. Pipettare 10 µl di eluato campione in 15 µl di Master mix.
3. Pipettare 10 µl di controllo positivo (non preparato) in 15 µl di Master mix.
4. Pipettare 10 µl di eluato del controllo negativo in 15 µl di Master mix.

Ogni ciclo deve contenere un controllo positivo e uno negativo!  
Chiudere la piastra PCR con una pellicola ottica adesiva e chiudere i recipienti di reazione con i relativi coperchi.

 **Le piastre PCR e i recipienti di reazione devono essere miscelati nel miscelatore a vortice per almeno 5 secondi al numero di giri massimo e poi centrifugati brevemente.**

 **I recipienti di reazione PCR per il termociclatore PCR Mic devono essere miscelati nel miscelatore a vortice per almeno 10 secondi al numero di giri massimo.**

## 8 Programmazione del termociclatore in tempo reale

L'ampliCube Coronavirus Panel è stato valutato con il LightCycler® 480 Instrument II (Roche) e convalidato su analizzatore cobas z 480 (Roche), CFX96 (Bio-Rad), QuantStudio 5 (Applied Biosystems), Mic (bms) e Rotor-Gene Q (Qiagen).

### 8.1 Impostazione dei canali di rilevamento

#### LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controllo interno (IC)
Colore	verde	giallo	arancione	rosso
Colorante reporter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Eccitazione	465 nm	533 nm	533 nm	618 nm
Emissione	510 nm	580 nm	610 nm	660 nm

In caso d'impiego del LightCycler® 480 Instrument II (Roche) è necessario utilizzare un kit Color Compensation (art. n. 50502) fornito da MIKROGEN.

#### Analizzatore cobas z 480 (Roche)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controllo interno (IC)
Colore	verde	giallo	arancione	rosso
Colorante reporter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Eccitazione	465 nm	540 nm	540 nm	610 nm
Emissione	510 nm	580 nm	610 nm	670 nm

In caso d'impiego dell'analizzatore cobas z 480 (Roche) è necessario utilizzare un kit Color Compensation (art. n. 50503) fornito da MIKROGEN.

#### CFX96 (Bio-Rad)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controllo interno (IC)
Colore	verde	giallo	arancione	rosso
Colorante reporter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Modalità	Tutti i canali			

La raccolta e la valutazione dei dati sul CFX96 avvengono secondo il metodo *calc / data acquisition mode: all channels*. Per ATTO Rho 12 e per ATTO 647N va prima eseguita una calibrazione del CFX96 (Bio-

Rad). Il necessario set di calibrazione del colorante (CFX96 (Bio-Rad), art. n. 50505) è disponibile presso MIKROGEN.

### QuantStudio 5 (Applied Biosystems)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controllo interno (IC)
Colore	verde	giallo	arancione	rosso
Colorante reporter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Eccitazione	X1 / 470 nm	X2 / 520 nm	X4 / 580 nm	X5 / 640 nm
Emissione	M1 / 520 nm	M2 / 558 nm	M4 / 623 nm	M5 / 682 nm
Quencher	[nessuno]	[nessuno]	[nessuno]	[nessuno]

Selezionare in Settings (Impostazioni) 1. Run mode "standard" (Modalità di esecuzione "standard"), 2. Reference dye "none" (Colorante di riferimento "nessuno"), 3. Experiment type "custom" (Tipo di esperimento "personalizzato").

### Mic (bms)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controllo interno (IC)
Colore	verde	giallo	arancione	rosso

Per eseguire la procedura, MIKROGEN fornisce template per il test Mic convalidati. Vi preghiamo di utilizzare esclusivamente i template per il test Mic di MIKROGEN. I template più recenti per il test Mic di MIKROGEN possono essere scaricati gratuitamente dalla homepage di MIKROGEN ([www.mikrogen.de](http://www.mikrogen.de)).

### Rotor-Gene Q (Qiagen)

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controllo interno (IC)
Colore	verde	giallo	arancione	rosso
Colorante reporter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N
Eccitazione	470 nm	530 nm	585 nm	625 nm
Emissione	510 nm	555 nm	610 nm	660 nm
Guadagno	5	5	5	5

### 8.2 Programma PCR

Retrotrascrizione	50°C	8 min
Denaturazione	95°C	3 min
<b>Amplificazione</b>	<b>45 cicli</b>	
• Denaturazione	95°C	10 sec
• Annealing/Estensione	60°C	45 sec

Per informazioni di base sulla programmazione dei diversi termociclatori in tempo reale, fare riferimento alle istruzioni del termociclatore in uso. Per informazioni specifiche sulla programmazione del termociclatore per Real-Time PCR utilizzando l'ampliCube Coronavirus Panel, contattare il produttore.

## 9 Risultati

La valutazione dei dati sul LightCycler® 480 II è avvenuta con il metodo *Abs Quant/2nd Derivative Max*.

### 9.1 Validazione

- Il controllo negativo deve rimanere al di sotto del *valore soglia (threshold)*. Il controllo interno (IC) nel controllo negativo deve mostrare un andamento positivo della curva. Se il controllo negativo mostra un andamento positivo della curva (contaminazione) o se l'IC nel controllo negativo non è valido, il test non è valutabile.
- Il controllo positivo deve mostrare un andamento positivo della curva.  
Il valore Ct del controllo positivo deve essere < 33. Un controllo positivo al di fuori di questo intervallo indica un problema nell'amplificazione.

- Il controllo interno (IC) in campioni negativi deve mostrare un andamento positivo della curva. Il segnale dell'IC di un campione del paziente deve essere confrontato con il segnale dell'IC nel controllo negativo estratto. Una differenza > +3 per il valore Ct dell'IC di un campione rispetto all'IC del controllo negativo oppure la mancanza di un segnale IC nel campione possono indicare un'inibizione significativa della reazione RT-PCR. In questi casi un risultato negativo del test non è valido.

### 9.2 Analisi

L'analisi dei dati può aver luogo con il software del termociclatore per PCR o con una soluzione software appositamente supportata da MIKROGEN per l'analisi automatizzata della PCR e la relativa interpretazione. In caso d'impiego di un LightCycler® 480 II, la valutazione può essere eseguita con il metodo *Abs Quant/2nd Derivative Max* (raccomandato) o con il metodo *Abs Quant/Fit Points*. Ulteriori informazioni e relative istruzioni sono disponibili a richiesta presso MIKROGEN.

	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controllo interno (IC)	
Colore	verde	giallo	arancione	rosso	
Colorante reporter	FAM	HEX	ATTO Rho12	ATTO 647N	
Valutazione con	LightCycler 480 II	465-510	533-580	533-610	618-660
	cobas z 480	465-510	540-580	540-610	610-670
	CFX96	FAM	HEX	ROX	Cy5
	QuantStudio 5	FAM	VIC	ROX	ATTO 647N
	Mic	FAM	HEX	ROX	Cy5
Rotor-Gene Q	verde	giallo	arancione	rosso	

Segnali superiori al *valore soglia* vengono valutati come risultati positivi. I campi vuoti nella tabella sono considerati un risultato negativo.

Colore	MERS-CoV	SARS-CoV-2 SARS-CoV Bat SARS- like CoV	HCoV	Controllo interno (IC)
verde	positivo	---	---	---
giallo	---	positivo	---	---
arancione	---	---	positivo	---
rosso	---	---	---	positivo*

\* In caso di segnali positivi nei canali di rilevamento degli agenti patogeni, il segnale del controllo interno non è necessario per l'interpretazione del test. Un elevato carico di patogeni nel campione del paziente può condurre a un segnale minore o inesistente per il controllo interno.

## 10 Limiti del metodo, limitazioni

- I risultati dei test devono essere sempre considerati nel contesto del quadro clinico del paziente. Le conseguenze terapeutiche dei rilevamenti devono essere determinate in considerazione dei dati clinici.
- Un risultato negativo del test per MERS-CoV, SARS-CoV-2 / SARS-CoV / Bat SARS-like CoV o HCoV non può escludere un'infezione dai rispettivi agenti patogeni.

## 11 Caratteristiche delle prestazioni

### 11.1 Sensibilità e specificità diagnostica

La sensibilità e la specificità sono state determinate sulla base di campioni del paziente definiti positivi e negativi.

Tabella 1: Campioni definiti positivi

ampliCube Coronavirus Panel	MERS-CoV (n=4)	SARS-CoV-2 (n=126)	HCoV (n=17)
Negativo	0	3	0
Positivo	4	123	17
<b>Sensibilità [%]</b>	<b>100</b>	<b>97,62</b>	<b>100</b>
<b>CI [%]</b> Intervallo di confidenza (ingl. confidence interval)	<b>51,01 – 100</b>	<b>93,23 – 99,19</b>	<b>81,57 – 100</b>



**Tabella 2:** Campioni definiti negativi

ampliCube Coronavirus Panel	MERS-CoV (n=24)	SARS-CoV-2 (n=490)	HCoV (n=24)
Negativo	24	486	24
Positivo	0	4	0
<b>Specificità [%]</b>	<b>100</b>	<b>99,18</b>	<b>100</b>
<b>CI [%]</b>			
Intervallo di confidenza (ingl. confidence interval)	<b>86,20 – 100</b>	<b>97,92 – 99,68</b>	<b>86,20 – 100</b>

## 11.2 Sensibilità analitica

### 11.2.1 Limite di rilevabilità (LoD) in copie/PCR

Il limite di rilevabilità (LoD) dell'ampliCube Coronavirus Panel è stato determinato con una serie di diluizioni a concentrazioni note di blocchi di DNA genomico a doppio filamento (gBlock) su un sistema LightCycler® 480 II (Roche). Il limite di rilevabilità del 95% è stato definito mediante analisi di regressione probit con il software CombiStats™ versione 5.0 (Consiglio d'Europa). Il limite di rilevabilità è stato poi confermato con 20 replicati per ogni LoD.

**Tabella 3a:** Limite di rilevabilità (LoD) per MERS e HCoV in copie/PCR

	MERS-CoV	HCoV
<b>LoD [copie/PCR]</b> Limite di rilevabilità del 95%	4,14	12,41*
<b>CI 95% [copie/PCR]</b> Intervallo di confidenza (ingl. confidence interval)	2,75 – 9,43	8,93 – 22,59

\* I dati si riferiscono a HCoV OC43; sono stati testati anche HCoV 229E, NL63 e HKU1. I limiti di rilevabilità erano compresi tra 20,54 e 89,48.

**Tabella 3b:** Limite di rilevabilità (LoD) per SARS-CoV-2/SARS-CoV/Bat SARS-like CoV in copie/PCR

	SARS-CoV-2	SARS-CoV	Bat SARS-like CoV
<b>LoD [copie/PCR]</b> Limite di rilevabilità del 95%	2,9	6,74	6,35
<b>CI 95% [copie/PCR]</b> Intervallo di confidenza (ingl. confidence interval)	1,9 – 6,4	4,12 – 14,68	4,14 – 14,43

### 11.2.2 Limite di rilevabilità (LoD) per SARS-CoV-2 in unità internazionali

Il LoD per le regioni target del SARS-CoV-2 è stato inoltre determinato con tre serie di diluizioni indipendenti (7 livelli di diluizione ciascuna) utilizzando lo standard OMS (primo standard internazionale OMS per l'RNA di SARS-CoV-2 (codice NIBSC: 20/146)), compresa l'estrazione degli acidi nucleici (kit *alpha*Clean Mag RNA/DNA in M96 Biocomma) su un sistema LightCycler® 480 II (Roche) e successiva analisi di regressione probit (software CombiStats™ versione 6.0 (Consiglio d'Europa)). Il limite di rilevabilità dell'ampliCube Coronavirus Panel è indicato in Unità Internazionali (UI) per µl secondo lo standard OMS.

**Tabella 3c:** Limite di rilevabilità (LoD) per SARS-CoV-2 in UI/µl secondo lo standard OMS

	SARS-CoV-2
<b>LoD [UI/µl]</b> Limite di rilevabilità del 95%	2,72
<b>CI 95% [UI/µl]</b> Intervallo di confidenza (ingl. confidence interval)	1,53 – 6,55

## 11.3 Specificità analitica

La ricerca in BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)) mostra che le sonde e i primer selezionati dell'ampliCube Coronavirus Panel rilevano in modo specifico gli agenti patogeni selezionati. È stata inoltre determinata la specificità attraverso l'esame del DNA/RNA genomico di ulteriori batteri e virus patogeni per l'uomo.

**Tabella 4:** Batteri e virus testati per mostrare la specificità analitica dell'ampliCube Coronavirus Panel.

Batteri	Virus
<i>Bordetella holmesii</i>	Adenovirus A
<i>Bordetella parapertussis</i>	Citomegalovirus
<i>Bordetella pertussis</i>	Enterovirus
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Virus di Epstein-Barr
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Influenza A
	Influenza B
	Virus del morbillo
	Parotite
	Virus parainfluenzale
	Virus respiratorio sinciziale (RSV) A
	Rhinovirus 58 (A)

Nessuno di questi campioni ha mostrato un segnale positivo. Le sonde e i primer utilizzati nell'ampliCube Coronavirus Panel non hanno mostrato reazioni crociate con gli agenti patogeni elencati in Tabella 4. Il controllo interno (IC) è stato valido in tutti i test.

## 11.4 Equivalenza di diversi materiali campione

È stato determinato il coefficiente di variazione (CV) del valore Ct tra acqua ed estratto del rispettivo materiale campione dopo aggiunta di DNA plasmidico in concentrazione nota.

**Tabella 5:** Equivalenza di diversi materiali campione

	MERS-CoV	SARS-CoV-2	SARS-CoV	Bat SARS-like CoV	HCoV
CV [%] (BAL, H <sub>2</sub> O)	1,37	2,11	1,62	2,21	0,58
CV [%] (escreato, H <sub>2</sub> O)	2,42	2,32	1,54	3,42	1,91
CV [%] (tampone, H <sub>2</sub> O)	1,51	1,28	1,47	1,50	1,08
CV [%] (feci, H <sub>2</sub> O)	1,94	1,33	1,28	1,98	0,85

Il coefficiente di variazione (CV), basato sul valore Ct (*cycle threshold*) tra acqua ed estratti di acidi nucleici (raccolti dai diversi materiali campione), è stato per tutti i geni target ≤ 3,42%.






## 12 Riferimenti bibliografici

- L.-Y. Chang et al. (2006): Lack of Association between Infection with a Novel Human Coronavirus (HCoV), HCoV-NH, and Kawasaki Disease in Taiwan. *The Journal of Infectious Diseases*, Jan. 2006, 193:283-6, 0022-1899/2006/19302-0015\$15.00
- L. Louie et al. (2006): Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus in Stool Specimens by Commercially Available Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assays. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 2006, Vol. 44, No. 11, p. 4193-4193, doi:10.1128/JCM.01202-06
- F. Esper et al. (2005): Evidence of a Novel Human Coronavirus That Is Associated with Respiratory Tract Disease in Infants and Young Children. *The Journal of Infectious Diseases*, Feb. 2005, 191:492-8, 0022-1899/2005/19104-0002\$15.00
- F. Esper et al. (2010): Human coronaviruses are uncommon in patients with gastrointestinal illness. *Journal of Clinical Virology*, March 2010, Vol. 48, p. 131-133, doi:10.1016/j.jcv.2010.03.007
- M. Jevšnik et al. (2013): Detection of human coronaviruses in simultaneously collected stool samples and nasopharyngeal swabs from hospitalized children with acute gastroenteritis. *Virology Journal*, 2013, 10:46, doi:10.1186/1743-422X-10-46
- I. M. Mackay et al. (2015): MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology Journal*, Dec. 2015, 12:222, DOI 10.1186/s12985-015-0439-5
- M. C. Nunes et al. (2014): Clinical Epidemiology of Bocavirus, Rhinovirus, Two Polyomaviruses and Four Coronaviruses in HIV-Infected and HIV-Uninfected South African Children. *Plos One*, Feb. 2014, Vol. 9, Issue 2, e86448
- L. A. Sipulwa (2016): Molecular characterization of human coronaviruses and their circulation dynamics in Kenya, 2009–2012. *Virology Journal*, 13:18, DOI 10.1186/s12985-016-0474-x
- I. Wilhelmi (2003): Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*, April 2003, Vol. 9, No. 4, p. 247-262
- F. Wu et al. (2020): A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* (2020) DOI:10.1038/s41586-020-2008-3
- R. Ralph et al. (2020): 2019-nCoV (Wuhan virus), a novel Coronavirus: human-to-human transmission, travel-related cases, and vaccine readiness. *J Infect Dev Ctries* 2020; 14(1):3-17
- W. G. Carlos et al. (2020): Novel Wuhan (2019-nCoV) Coronavirus. *Am J Respir Crit Care Med* 2020 Vol. 201, P7-P8
- S.-Q. Deng et H.-J. Peng (2020): Characteristics of and Public Health Responses to the Coronavirus Disease 2019 Outbreak in China. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 575-584


14. Muenchhoff Maximilian, Mairhofer Helga, Nitschko Hans, Grzimek-Koschewa Natascha, Hoffmann Dieter, Berger Annemarie, Rabenau Holger, Widera Marek, Ackermann Nikolaus, Konrad Regina, Zange Sabine, Graf Alexander, Krebs Stefan, Blum Helmut, Sing Andreas, Liebl Bernhard, Wölfel Roman, Ciesek Sandra, Drosten Christian, Protzer Ulrike, Boehm Stephan, Keppler Oliver T. Multicentre comparison of quantitative PCR-based assays to detect SARS-CoV-2, Germany, March 2020. Euro Surveill. 2020;25(24):pii=2001057. <https://doi.org/10.2807/15607917.ES.2020.25.24.2001057>
15. Ute Eberle, Clara Wimmer, Ingrid Huber, Antonie Neubauer-Juric, Giuseppe Valenza, Nikolaus Ackermann, Andreas Sing (for the Bavarian SARS-CoV-2-Public Health Laboratory Team), Comparison of nine different commercially available molecular assays for detection of SARS-CoV-2 RNA, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Springer, published online: 29 January 2021, <https://doi.org/10.1007/s10096-021-04159-9>

Su richiesta saremo lieti di inviarvi ulteriore documentazione.

### 13 Spiegazione dei simboli

	Contiene reattivi sufficienti per <n> determinazioni Numero degli inserimenti
<b>P&amp;P MIX</b>	Mix di primer e campioni
<b>ENZYME</b>	Mix di enzimi
<b>CONTROL INT</b>	Controllo interno
<b>CONTROL +</b>	Controllo positivo
<b>CONTROL -</b>	Controllo negativo
<b>INSTRU</b>	Istruzioni per l'uso
	Osservare le istruzioni per l'uso
<b>CONT</b>	Contenuto, contiene
<b>IVD</b>	Test in vitro
<b>LOT</b>	Numero di lotto/versione
<b>REF</b>	Numero di catalogo
	Utilizzare entro Data di scadenza
	Conservare a una temperatura compresa tra x°C e y°C
	Produttore

### 14 Dati sul produttore e sulla versione

<b>ampliCube Coronavirus Panel</b>		Articolo n° <b>50142</b>
Istruzioni per l'uso valido da		GAACCV004IT 2023-04
	<b>MIKROGEN GmbH</b> Anna-Sigmund-Str. 10 82061 Neuried Germania Tel. +49 89 54801-0 Fax +49 89 54801-100 E-mail <a href="mailto:mikrogen@mikrogen.de">mikrogen@mikrogen.de</a> Internet <a href="http://www.mikrogen.de">www.mikrogen.de</a>	
		<b>CE</b>

