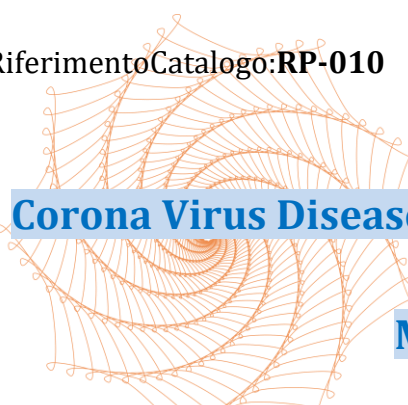


Riferimento Catalogo: **RP-010**



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

Manuale di Istruzioni

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

[Specifiche della confezione] 100 Tests/confezione

[Utilizzo suggerito]

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.

FAST LABORATORY DIAGNOSTICS

[Componenti principali del kit]

Il kit contiene il seguenti component: reaction solution, primer probe mixed solution, mixed enzyme solution, RNase-free ddH₂O, negative control, positive control, e istruzioni come in Tabella.

Tabella

Component name	Specifications	Quantity
Reaction solution	1250µL	2 Tube
Primer probe mixture	300µL	1 Tube
Mixed enzyme solution	200µL	1 Tube
RNase-free ddH ₂ O	1500µL	1 Tube
Negative control	500µL	1 Tube
Positive control	500µL	1 Tube
Instructions Manual	-	1

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.*

[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 10 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 conservato in un luogo refrigerato e buio a -15 ° C o inferiore, il che non influirà sull'uso entro il periodo di validità.

[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.

[Requisiti dei campioni]

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 al 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 il 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.

FAST LABORATORY DIAGNOSTICS

Mettere insieme il tampone rinofaringeo e il tampone orofaringeo in una provetta 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)

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.

- 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.
- 2) Calcola il numero di reazioni richieste per l'esperimento e distribuisce i reagenti nella provetta di reazione PCR in sequenza secondo il metodo di preparazione del sistema di reazione nella Tabella 2. La provetta di reazione PCR viene trasferita nell'area di preparazione del campione e i restanti reagenti sono conservati a una temperatura pari o inferiore a -15°C e tenuti lontano dalla luce.

Tabella 2

Composition	Dosage (Volume)
Reaction solution	25 μL
Primer probe mixture	3 μL
Mixed enzyme solution	2 μL
RNase-free ddH ₂ O	15 μL

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.

FAST LABORATORY DIAGNOSTICS

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.

1. 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.

Sistema	Impostare il sistema di reazione su 50µL		
Acquisizione del segnale	Selezionare il canale FAM per rilevare il gene N del virus; Selezionare il canale VIC / HEX per rilevare la regione di virus ORF-1ab; Seleziona il canale ROX per rilevare lo standard interno.		
Condizioni di Reazione	Fase	Condizioni	Numero di Cicli
	Transcrittasi Inversa	50°C: 30min	1
	Pre-denaturazione	95°C: 3min	1
	PCR	95°C: 15s 60°C: 30s (Raccogliere il segnale di fluorescenza alla fine di questo passaggio)	45

[Analisi 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.

[Determinazione del valore positivo]

1. Determinazione della validità del test:

- 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.

1. 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.

[Interpretazione dei risultati del test]

1. In primo luogo, analizzare se lo standard interno ha una curva di amplificazione nel canale ROX e $Ct \leq 40$. Se esiste, indica che il test è valido e che è possibile eseguire l'analisi successiva:

	Risultati		Risultato del test ed interpretazione
	N gene (FAM channel)	ORF1ab (VIC / HEX channel)	
a	+	-	Sospetto positive, ripetere il test
b	-	+	Sospetto positive, ripetere il test
c	+	+	Acido nucleico virale rilevato nel campione
d	-	-	Assenza di acido nucleico virale rilevato nel campione

Nota: *un test PCR negativo non può escludere clinicamente la possibilità di COVID-19.*

- I campioni con singola positività (a o b) devono essere ripetuti. Se il singolo target è ancora positivo, il risultato del test del campione è positivo.
- 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.
- 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).
- 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.

[Indice di performance del prodotto]

1. Specificità: le sonde di primer utilizzate in questo kit sono basate su COVID-19.

La sequenza conservata è progettata per avere un alto tasso di rilevazione per il frammento del gene bersaglio. Questo kit non ha reattività crociata con coronavirus (HKU1, OC43, NL63 e 229E), coronavirus SARS, coronavirus MERS, virus influenzale, virus parainfluenzale, virus respiratorio sinciziale e adenovirus positivi.

1. **Limite minimo di rilevamento:** Il limite minimo di rilevamento di questo kit è 1000 copie / mL.

[Limitazioni]

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]

Il personale di laboratorio deve avere una formazione professionale e una certa esperienza.

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.

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.

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.

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.

Il banco da lavoro e vari oggetti sperimentali sono spesso disinfettati con ipoclorito di sodio al 10%, alcool al 75% e lampade UV.

1. La macchina per PCR in tempo reale richiede una calibrazione frequente e la pulizia dei pozzetti (fori) della piastra campione.
2. Per prevenire l'interferenza di fluorescenza, evitare il contatto diretto con le provette di reazione PCR octaplex
3. 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.
4. 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: 18/03/2020.*

Manufactured for OaCP by:

Wuhan HealthCare Biotechnology Co., Ltd.

No. 666, Gaoxin Boulevard, Optics Valley Biolake, Building B6, 4/5F.

Wuhan, Hubei, 430075, PR of China.



FAST LABORATORY DIAGNOSTICS