

# COV19 qcLAMP kit

CE IVD

REF 000055

ISTRUZIONI PER L'USO (IFU)

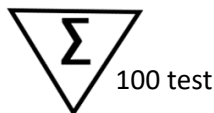
Per la diagnostica *in vitro*

Solo per uso Professionale

*Non destinato a self-test*



## BIOPIX-T



100 test



BIOPIX DNA TECHNOLOGY P.C.  
Science and Technology Park of Crete  
N. Plastira 100, Vasilika Vouton  
GR-700 13, Heraklion, Grecia



[www.biopix-t.com](http://www.biopix-t.com)



[info@biopix-t.com](mailto:info@biopix-t.com)



(+30) 281 0391986

## INTRODUZIONE

Indicazione secondo la Direttiva UE 98/79/CE relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro

1. Categoria del prodotto: Kit medico-diagnostico *in vitro*
2. Nome del prodotto: Kit COV19 qcLAMP
3. Numero di catalogo del prodotto: Cat.no #000055
4. Finalità d'uso: Vedere la sezione "Uso previsto"

Richieste e servizio clienti (A/S)

Inviare un messaggio di posta elettronica ([info@biopix-t.com](mailto:info@biopix-t.com)) per richiedere informazioni sul prodotto.

## Indice

Uso previsto .....	3
Descrizione del prodotto .....	3
Contenuto e componenti dei kit .....	3
Condizioni di conservazione e maneggiamento .....	4
Periodo di validità del kit .....	4
Attrezzature e materiali aggiuntivi necessari, ma non in dotazione .....	4
Avvertenze e precauzioni .....	5
Preparazione dei reagenti .....	7
Raccolta, maneggiamento e preparazione del campione prima del test .....	7
Procedura del test .....	7
Interpretazione dei risultati .....	9
Limitazioni del metodo .....	11
Caratteristiche delle prestazioni .....	12
Limite di rilevamento (LoD) .....	12
Valutazione di sensibilità e specificità analitiche e di precisione .....	12
Valutazione di sensibilità e specificità cliniche .....	13
Simboli usati e la loro spiegazione .....	15
Assistenza tecnica .....	16
Bibliografia .....	16
Abbreviazioni .....	16

## Uso previsto

Il kit COV19 qcLAMP è un test diagnostico molecolare *in vitro*, destinato al rilevamento dell'RNA del virus SARS-CoV-2, in associazione con la Piattaforma PEBBLE qcLAMP Point-of-Care.

Il kit COV19 qcLAMP non richiede l'estrazione dell'RNA e può essere utilizzato con campioni di tamponi rinofaringei e orofaringei provenienti da soggetti sospettati di essere affetti dal COVID-19. Il kit può funzionare anche con RNA estratto.

L'RNA del virus SARS-CoV-2 è generalmente rilevabile nei campioni delle vie respiratorie superiori durante la fase acuta dell'infezione. I risultati positivi sono indicativi della presenza di RNA del virus SARS-CoV-2. Per determinare lo stato di infezione del paziente è necessaria una correlazione clinica con l'anamnesi e altre informazioni diagnostiche del paziente. I risultati positivi non escludono infezioni batteriche o co-infezione con altri virus.

I risultati negativi devono essere considerati come potenzialmente negativi, non precludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per prendere decisioni sulla gestione del paziente. I risultati negativi devono essere abbinati a osservazioni cliniche, all'anamnesi del paziente e a informazioni epidemiologiche.

Il kit COV19 qcLAMP è destinato all'uso da parte di personale qualificato o di operatori sanitari (professionisti), che siano esperti nell'esecuzione di test sulla Piattaforma Pebble qcLAMP. Non è destinato all'uso da parte di privati per test auto-diagnostici.

## Descrizione del prodotto

Il kit COV19 qcLAMP è un kit per il test di Amplificazione degli Acidi Nucleici (NAAT) basato sul metodo dell'amplificazione isometrica mediata da loop con reazione colorimetrica (qcLAMP) in tempo reale, per il rilevamento dell'RNA bersaglio del gene N del virus SARS-CoV-2. Il kit COV19 qcLAMP non richiede l'estrazione dell'RNA e può essere utilizzato direttamente con campioni di tamponi rinofaringei e orofaringei. In alternativa, il kit può fare uso anche di RNA estratto.

Il kit comprende una miscela 2X di Enzimi, che contiene una miscela di polimerasi Bst e trascrittasi inversa termostabile, tampone di reazione ottimizzato, Mg<sup>2+</sup> e dNTP. Comprende anche una miscela di Primer 5X COV19 separata, che contiene primer specifici per SARS-CoV-2, un indicatore per blu di idrossinaftolo (HNB) e una miscela 5X di Primer di Controllo per amplificare un target endogeno umano (RNasi P). Il tampone di campionamento 2X BPX in dotazione neutralizza i comuni inibitori del campione per l'amplificazione e il rilevamento diretti del campione grezzo. Il kit comprende anche olio minerale, che aiuta a prevenire la contaminazione crociata e a ridurre al minimo l'evaporazione.

Ogni kit è sufficiente per 100 reazioni. I test vengono eseguiti sulla piattaforma Pebble qcLAMP, che controlla la tempistica e la temperatura della reazione; facilita anche l'analisi colorimetrica digitale in tempo reale delle reazioni di amplificazione. La durata totale del test nella Piattaforma Pebble qcLAMP è di 30 minuti per la valutazione di un risultato negativo. Time-to-positive può variare tra 10 e 27 minuti a seconda della concentrazione iniziale del target.

## Contenuto e componenti dei kit

Il kit COV19 qcLAMP contiene i seguenti componenti per l'esecuzione di **100 test/reazioni qcLAMP**:

**Componenti del kit COV19 qcLAMP**

Componente	Quantità	Volume	Descrizione
<b>Miscela 2X di Enzimi</b>	1 provetta	1,25 mL	Soluzione incolore/tappo nero

<b>Miscela di Primer 5X COV19</b>	1 provetta	0,5 mL	Soluzione viola/tappo viola
<b>Miscela 5X di Primer di Controllo</b>	1 provetta	0,25 mL	Soluzione viola / tappo verde
<b>Acqua priva di nucleasi</b>	1 provetta	1,0 mL	Soluzione incolore/tappo bianco
<b>tampone di campionamento 2X BPX</b>	6 provette	1,8 mL	Soluzione incolore/tappo neutro
<b>Olio minerale</b>	1 provetta	1,8 mL	Soluzione incolore/tappo blu

## Condizioni di conservazione e maneggiamento

All'arrivo, i componenti dei kit devono essere conservati nella confezione originale a -20°C.

Durante la preparazione delle reazioni, tutti i materiali, tranne l'olio minerale, devono essere conservati nel ghiaccio o in un contenitore refrigerato (0-4°C). Durante la manipolazione dei materiali l'olio minerale può rimanere a temperatura ambiente.

La manipolazione impropria dei componenti del kit può portare al deterioramento del kit COV19 qcLAMP e, di conseguenza, a risultati falsati.

Prima del primo utilizzo del kit COV19 qcLAMP, si raccomanda l'aliquotazione di parte del volume iniziale dei reagenti **Miscela 2X di Enzimi** e **Miscela di Primer 5X COV19** per ridurre il rischio di deterioramento del kit, dovuto a più cicli di congelamento-scongelo. Evitare più di 2 cicli di congelamento-scongelo.

## Periodo di validità del kit

Il kit è stabile per 12 mesi a -20°C.

## Attrezzature e materiali aggiuntivi necessari, ma non in dotazione

I materiali e i componenti necessari per il rilevamento di SARS-CoV-2, che non sono inclusi nel kit, sono:

### Per l'uso con RNA estratto o campioni grezzi:

- A. Kit per la raccolta e il trasporto di campioni con virus che colpiscono le vie aeree superiori
- B. La Piattaforma Pebble qcLAMP Point-of-Care (BIOPIX-T)
- C. Controlli positivi (RNA stampo sintetico o plasmide) come gli standard molecolari sintetici di BIO-RAD per SARS-CoV-2 o equivalenti, e controlli negativi (DNA genomico o acqua priva di RNasi).
- D. Altre attrezzature e materiali:
  - 1 Pipette calibrate regolabili.
  - 2 Puntali con filtro sterilizzati per pipette (10 µL, 200 µL e 1000 µL).
  - 3 Provette PCR da 0,2 mL volume massimo (ad es. provetta per PCR Multiply-Pro, provetta SARSTEDT da 0,2 mL).  
 Specifiche: chiusura di sicurezza, micro-provette per PCR ad alto profilo.  
 Dimensioni: Altezza con tappo: 21,6mm-21,7mm, diametro esterno (OD): 5,9mm-6,1mm.
  - 4 Provette PCR da 1,5 mL volume massimo.
  - 5 Soluzioni di degradazione di DNA e RNA come DNAzap™, RNAzap™, candeggina al 10% (ipoclorito di sodio commerciale 5,25-6,0% in soluzione 1:10) o equivalente.

6 Dispositivi di protezione (guanti monouso senza polvere e camice da laboratorio).

**Da utilizzare solo con RNA estratto:**

E. Kit di estrazione dell'RNA e strumenti per l'estrazione dell'RNA totale da campioni clinici.

## Avvertenze e precauzioni

1. Per diagnostica *in vitro* (IVD).
2. Il kit COV19 qcLAMP è certificato solo per il rilevamento di acidi nucleici da SARS-CoV-2, non per altri virus o agenti patogeni.
3. I reagenti devono essere aliquotati in volumi più piccoli, se non utilizzati direttamente, per evitare cicli di congelamento-scongelo multipli.
4. L'elaborazione dei campioni deve essere effettuata seguendo le linee guida di livello di biosicurezza 2 (BSL-2) o superiore.
5. Non aprire le provette al termine delle reazioni qcLAMP, per evitare la contaminazione dell'area con ampliconi del DNA.
6. Non mangiare, bere, fumare, applicare cosmetici o maneggiare lenti a contatto in aree in cui sono presenti reagenti e vengono maneggiati campioni umani.
7. L'uso del kit COV19 qcLAMP e la valutazione dei dati sono limitati al solo personale qualificato.
8. Non utilizzare i componenti del kit COV19 qcLAMP oltre la data di scadenza.
9. Il kit COV19 qcLAMP è stato ottimizzato per essere utilizzato con la piattaforma Pebble qcLAMP.
10. Prima di elaborare il campione, controllare la torbidità e la viscosità del campione. I campioni torbidi e viscosi possono influenzare la reazione e quindi i risultati. In caso di campioni molto torbidi, si consigliano diluizioni 1:10 o 1:100 dei campioni di tampone prima di procedere all'analisi. Tuttavia, questo abbasserà anche il limite di rilevamento (LoD) del test COV19 qcLAMP.
11. Smaltire qualsiasi reagente, contenitore e campione umano utilizzato e non, in conformità alle normative federali, statali e locali.
12. Indossare attrezzature adeguate di protezione individuale (ad es. guanti, camice, protezione per gli occhi) durante la manipolazione dei campioni clinici.

Avvertenze da prendere in considerazione durante l'utilizzo del kit:

Avvertenza	Causa	Raccomandazione
<b>Il colore iniziale della Miscela di Primer 5X COV19 e della Miscela 5X di Primer di Controllo non è viola.</b>	Il kit non è stato conservato in modo corretto.	Conservare il kit a -20°C.
	I reagenti del kit sono stati sottoposti a troppi cicli di congelamento-scongelo.	Ridurre al minimo il numero di cicli di congelamento-scongelo.
<b>Il colore iniziale della reazione è azzurro cielo (prima del posizionamento nella piattaforma Pebble qcLAMP).</b>	La reazione non è stata preparata correttamente.	Assicurare la corretta miscelazione dei reagenti e la precisione dei volumi pipettati.
	Il kit non è stato conservato in modo corretto.	Conservare il kit a -20°C.
	Kit utilizzato dopo la data di scadenza.	Utilizzare prima della data di scadenza.
	I reagenti del kit sono stati sottoposti a troppi cicli di congelamento-scongelo.	Ridurre al minimo il numero di cicli di congelamento-scongelo.
<b>Le reazioni di controllo positive non mostrano amplificazione.</b>	I reagenti del kit sono stati sottoposti a troppi cicli di congelamento-scongelo.	Ridurre al minimo il numero di cicli di congelamento-scongelo.

	Kit conservato in modo non corretto.	Conservare il kit a -20°C.
	Kit utilizzato dopo la data di scadenza.	Utilizzare prima della data di scadenza.
	La reazione non è stata preparata correttamente.	Assicurare la corretta miscelazione dei reagenti e la precisione dei volumi pipettati.
	Non è stato aggiunto RNA.	Assicurarsi che il campione venga aggiunto nella reazione.
	Il controllo positivo dell'RNA è stato degradato.	Evitare cicli di congelamento-scongelo multipli e aliquotare i reagenti in modo appropriato.
	Reagenti del kit contaminati da RNasi.	Utilizzare soluzioni (ad es. etanolo, soluzione di cloro, detergente) per pulire le superfici e i dispositivi. Utilizzare dispositivi di protezione. Sostituire le scorte di reagenti con nuovi materiali.
<b>I campioni di RNA estratto non mostrano amplificazione.</b>	Il processo di estrazione non è stato eseguito correttamente.	Utilizzare la miscela 5X di Primer di Controllo per la verifica del processo di estrazione.
	La carica virale è al di sotto del limite di rilevamento.	I risultati negativi non precludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per prendere decisioni sulla gestione del paziente. Il campionamento e il test devono essere ripetuti almeno 24 ore dopo.
<b>I campioni grezzi non mostrano amplificazione.</b>	I campioni grezzi contengono muco o sangue.	Ridurre la viscosità diluendo i campioni di tampone 10x o 100x prima di procedere, oppure prelevare nuovamente il campione di tampone.
	La carica virale è al di sotto del limite di rilevamento.	I risultati negativi non precludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per decisioni sulla gestione del paziente. Il campionamento e il test devono essere ripetuti almeno 24 ore dopo.
<b>Le reazioni negative mostrano amplificazione.</b>	Contaminazione del campione con RNA.	Non aprire mai le provette di reazione dopo l'amplificazione. Utilizzare solo provette con coperchi sicuri e che non sono già state utilizzate. Utilizzare una soluzione di degradazione del DNA per pulire lo spazio di lavoro e le attrezzature, o una soluzione di candeggina al 10%. Sostituire le scorte di reagenti con nuovi materiali. Cambiare i puntali delle pipette tra un campione e l'altro.
	Kit conservato in modo non corretto.	Conservare il kit a -20°C.

	I reagenti del kit sono stati sottoposti a troppi cicli di congelamento-scongelo.	Ridurre al minimo il numero di cicli di congelamento-scongelo.
	Amplificazione del controllo negativo.	Tutte le reazioni devono essere preparate e mantenute su ghiaccio prima dell'amplificazione. Eseguire le reazioni qcLAMP subito dopo la preparazione.

## Preparazione dei reagenti

Tutti i reagenti sono pronti per essere miscelati e utilizzati senza previa preparazione.

Prima del primo utilizzo del kit COV19 qcLAMP, si raccomanda l'aliquotazione di parte del volume iniziale dei reagenti **Miscela di Enzimi 2X** e **Miscela di Primer 5X COV19** per ridurre il rischio di deterioramento del kit, dovuto a cicli di congelamento-scongelo multipli.

## Raccolta, maneggiamento e preparazione del campione prima del test

Si raccomanda di utilizzare il prima possibile tutte le provette di reazione aperte. Utilizzare i componenti del kit prima della data di scadenza, seguendo le raccomandazioni del produttore. È molto importante utilizzare strumenti e reagenti privi di RNasi. Inoltre, si raccomanda di eseguire le fasi di preparazione in aree prive di nucleasi, utilizzando esclusivamente pipette con puntali con filtro.

### Da seguire per il test con RNA estratto:

#### Procedura di raccolta del campione:

1. Raccogliere campioni di tampone rinofaringeo e orofaringeo in qualsiasi soluzione solubilizzata.
2. Prelevare 200 µL del campione raccolto ed eseguire l'estrazione dell'RNA. Eluire l'RNA estratto in 30-50 µL di acqua priva di RNasi e metterlo subito su ghiaccio o conservare a -20°C.

### Da seguire per il test con un campione grezzo:

Per eseguire un test senza estrazione dell'RNA, i campioni di tampone rinofaringeo e orofaringeo devono essere solubilizzati in una delle seguenti soluzioni:

**CITOSWAB®** (Mezzo di trasporto virale –VTM-, 3mL).

**Improviral™** (Mezzo conservante virale –VPM-, 3mL).

**Liofilchem®** (Mezzo di trasporto virale –VTM-, 3mL).

Le seguenti soluzioni **NON** sono compatibili:

**Biocomma, MWE, LITUO**, che quindi **NON DEVONO MAI** essere utilizzate con questo kit.

#### La raccolta del campione deve essere effettuata come segue:

1. Raccogliere campioni di tampone rinofaringeo e orofaringeo in una soluzione solubilizzata.
2. Rimuovere 100 µL del campione raccolto e mescolare bene con 100 µL di soluzione tampone campione 2X BPX. Usare immediatamente.

## Procedura del test

La preparazione del campione deve essere eseguita prima della procedura del test. Conservare i campioni preparati su ghiaccio fino al momento dell'uso.



Conservare sul ghiaccio o in una ghiacciaia le provette del kit COV19 qcLAMP (miscela 2X di Enzimi, miscela di Primer 5X COV19, miscela di Primer di Controllo 5X, acqua priva di nucleasi) e le reazioni durante la preparazione. L'olio minerale può essere tenuto a temperatura ambiente durante la preparazione dei test.

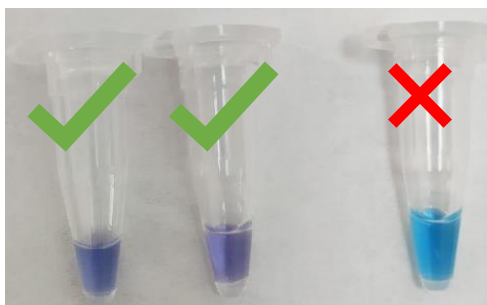
#### A. Da seguire con campioni di RNA estratto:

1. Prima di preparare una miscela, pipettare delicatamente su e giù la soluzione di miscela di Enzimi 2X e la soluzione miscela di Primer 5X COV19.
2. Preparare uno o più test come specificato nella tabella seguente e metterli su ghiaccio. La preparazione di 25  $\mu$ L per il rilevamento dell'RNA del virus SARS-CoV-2 in una provetta da 0,2 mL (non in dotazione nel kit) va eseguita secondo le seguenti istruzioni. Aggiungere i reagenti in ciascuna provetta nel seguente ordine:

Reagente	Volume per reazione ( $\mu$ L)
Miscela 2X di Enzimi	12,5
Miscela di Primer di Controllo/ 5X COV19	5
Acqua priva di nucleasi	5,5
RNA estratto	2

Il volume totale per una reazione deve essere pari a 25 $\mu$ L.

**N.B.** Il colore iniziale della reazione qcLAMP da 25  $\mu$ L deve essere viola o blu scuro (vedere la figura sotto - provetta a sinistra). Se il colore è azzurro cielo (vedi figura sotto – provetta a destra), non eseguire il test. Per maggiori informazioni consultare la sezione Avvertenze e precauzioni.



3. Aggiungere con attenzione 15  $\mu$ L di olio minerale sul lato di ciascuna provetta e attendere circa 30 secondi, fino a che non si formi uno strato sopra la reazione qcLAMP. Assicurarsi che l'olio non si mescoli alla reazione.
4. Collocare le reazioni nella piattaforma Pebble qcLAMP ed eseguire i test seguendo le istruzioni per l'uso della piattaforma Pebble qcLAMP. Il numero massimo di campioni che possono essere analizzati contemporaneamente è 6.

Per la verifica di un'estrazione di RNA eseguita in modo corretto, si può ripetere la procedura di cui sopra per la rilevazione di un target endogeno umano (controllo interno, IC), il gene RNasi P, sostituendo la miscela di Primer 5X COV19 con la miscela del Primer di Controllo 5X. Utilizzare la soluzione miscela del Primer di Controllo 5X per eseguire questo test. In questo caso, seguire i passaggi 1-4 sostituendo la provetta di miscela di Primer 5X COV19 con la provetta della Miscela di Primer di Controllo 5X.

Questo test è facoltativo e può essere eseguito separatamente per ciascun campione.

**N.B.** I controlli positivi (RNA sintetico o plasmide) e negativi (DNA genomico o acqua priva di nucleasi) devono essere utilizzati durante l'analisi del campione o separatamente, per verificare la qualità dei componenti del kit. I controlli positivi o negativi non sono inclusi nel kit.

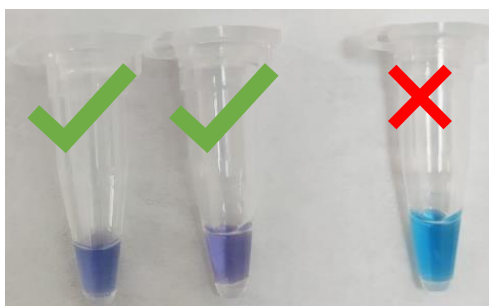
### B. Da seguire per la rilevazione diretta di campioni grezzi:

1. Prima di preparare una miscela, pipettare delicatamente su e giù la miscela 2X di Enzimi e la miscela di Primer 5X COV19.
2. Preparare uno o più test come specificato nella tabella seguente e metterli su ghiaccio. La preparazione di 25  $\mu$ L per la rilevazione dell'RNA del virus SARS-CoV-2 in una provetta da 0,2 mL (non in dotazione nel kit) viene eseguita secondo le seguenti istruzioni. Aggiungere i reagenti in ciascuna provetta nel seguente ordine:

Reagente	Volume per reazione ( $\mu$ L)
Miscela 2X di Enzimi	12,5
Miscela di Primer di Controllo/ 5X COV19	5
Acqua priva di nucleasi	2,5
Campione grezzo mescolato con tampone di campionamento 2X BPX	5

Il volume totale per una reazione deve essere pari a 25 $\mu$ L.

**N.B.** Il colore iniziale della reazione qLAMP da 25  $\mu$ L deve essere viola o blu scuro (vedere la figura sotto - provetta a sinistra). Se il colore è azzurro cielo (vedi figura sotto – provetta a destra), non eseguire il test. Per maggiori informazioni consultare la sezione Avvertenze e precauzioni.



3. Aggiungere con attenzione 15  $\mu$ L di olio minerale sul lato di ciascuna provetta e attendere circa 30 secondi fino a che non si formi uno strato sopra la reazione qLAMP. Assicurarsi che l'olio non si mescoli alla miscela della reazione.
4. Collocare le reazioni nella piattaforma Pebble qLAMP ed eseguire i test seguendo le istruzioni per l'uso della piattaforma Pebble qLAMP. Il numero massimo di campioni che possono essere analizzati contemporaneamente è 6.

## Interpretazione dei risultati

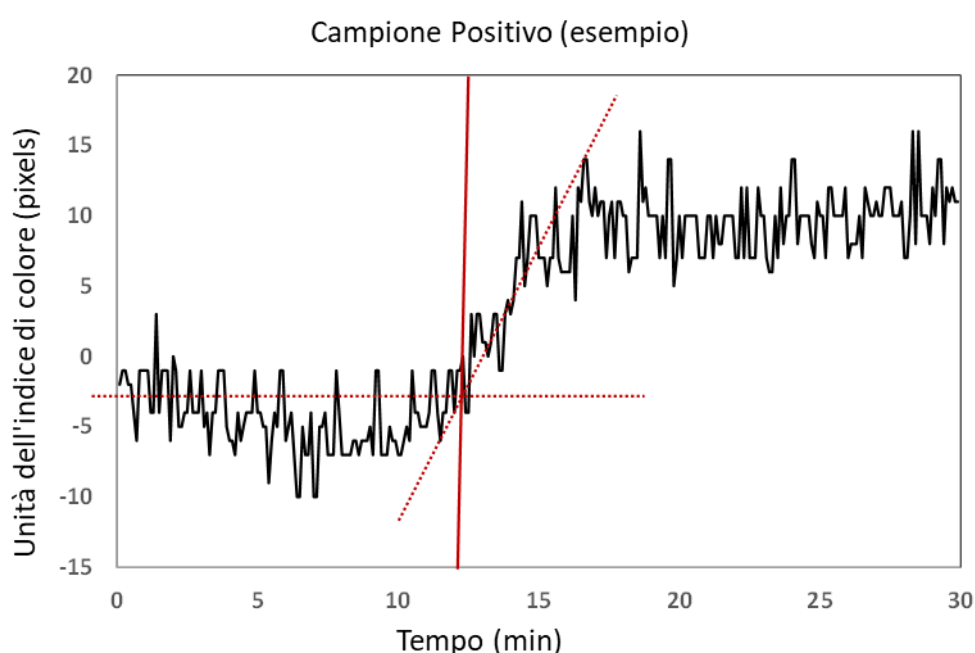
La Piattaforma Pebble qLAMP utilizza una mini fotocamera digitale per monitorare in tempo reale la transizione attraverso varie sfumature di colore, durante l'amplificazione LAMP con analisi colorimetrica. La fotocamera raccoglie immagini non calibrate, a intervalli di tempo predefiniti (intervalli di 10 secondi) ed estrae automaticamente i valori dei canali rosso, verde e blu (RGB).

Il cambio di colore è espresso come unità di indice del colore (pixel) sull'asse Y di una curva in tempo reale, visualizzata sullo schermo di un dispositivo smart. È possibile visualizzare contemporaneamente fino a 6 (sei) curve.

La durata di un test è di 30 min. La valutazione dei risultati deve essere eseguita dall'utente finale (si noti che questo è un test solo per uso professionale).

### **Risultati positivi del test**

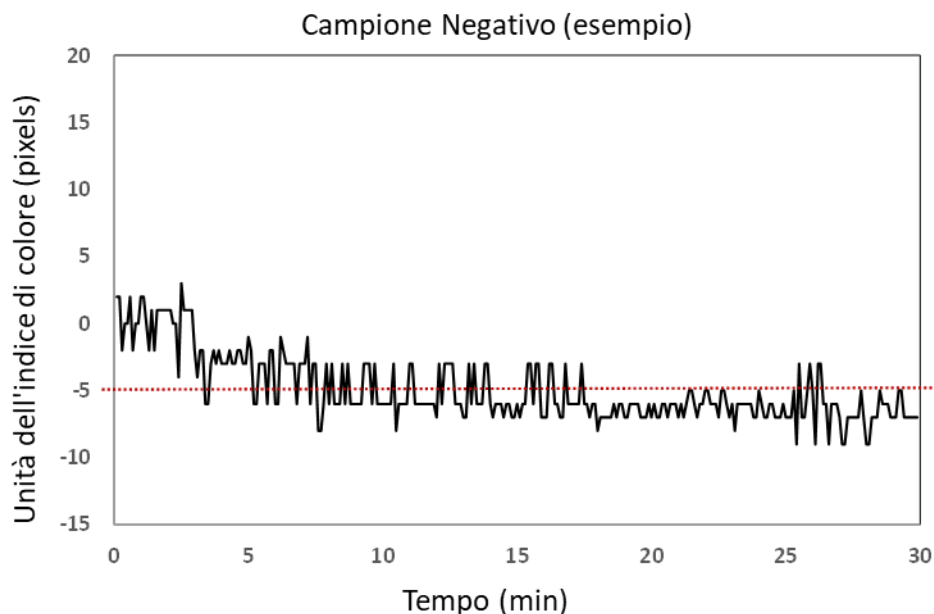
Il momento specifico in cui si verifica una variazione nella pendenza della curva in tempo reale (aumento delle unità dell'indice di colore) corrisponde al risultato "time-to-positive" (linea rossa continua). Questo è il punto in cui si incrociano le due linee rosse tratteggiate (vedere immagine sotto). Quando un campione è positivo per qualsiasi target, la pendenza della curva cambierà, come mostrato nell'immagine qui di seguito.



### **Risultati negativi del test**

Un risultato negativo è indicato da una curva piatta (le unità dell'indice di colore non aumentano), che si mantiene per tutto il periodo di monitoraggio.

Quando un campione è negativo per qualsiasi target, la pendenza della curva **NON CAMBIA** (vedere immagine sotto).



### **Risultati di test non validi**

I risultati negativi di test con RNA estratto e miscela di Primer di Controllo 5X devono essere considerati non validi. Il processo di isolamento dell'RNA e la preparazione delle reazioni devono essere ripetuti. Per maggiori informazioni consultare la sezione Avvertenze e precauzioni.

I risultati positivi che compaiono dopo **27 minuti NON SONO** validi e devono essere ripetuti.

### **Limitazioni del metodo**

1. Per ottenere risultati affidabili, è indispensabile attenersi alle Istruzioni per l'Uso del kit COVID-19 qCLAMP. Le modifiche alla configurazione o alla preparazione della reazione possono comportare il fallimento dei test.
2. I risultati devono essere interpretati tenendo conto di tutti gli altri dati raccolti per il campione. L'interpretazione deve essere eseguita da personale qualificato ed esperto con questo tipo di kit.
3. Le mutazioni all'interno della sequenza target possono comportare il mancato rilevamento della presenza del virus.
4. Gli inibitori o altri tipi di interferenza possono dare un risultato negativo falso. In tal caso, può essere utile un altro tipo di campione o metodo di isolamento. Non sono stati condotti studi di interferenza degli effetti dei comuni farmaci sul raffreddore, sulle reazioni.
5. Questo test non può escludere malattie causate da altri agenti patogeni virali o batterici.
6. I valori predittivi positivi e negativi dipendono fortemente dall'incidenza. I risultati negativi falsi dei test sono più probabili quando l'incidenza della malattia è elevata. I risultati positivi falsi dei test sono più probabili quando l'incidenza della malattia è da moderata a bassa.
7. I test effettuati con il kit COVID-19 qCLAMP indicano solo se una persona è infetta al momento da questo particolare coronavirus. Non forniscono informazioni su altre malattie o sintomi, e non dicono se un paziente è stato precedentemente infettato dal virus o se presenta immunità al virus.
8. Un risultato negativo falso può verificarsi se il livello di carica virale in un campione è inferiore al limite di rilevamento del test, o se il campione è stato raccolto, maneggiato o trasportato in modo improprio.

9. Questo kit è stato validato con campioni umani.

## Caratteristiche delle prestazioni

### Limite di rilevamento (LoD)

Per valutare le affermazioni sulla capacità di rilevamento del kit, sono state eseguite tre misurazioni indipendenti con sei repliche ciascuna con 5 µL di un controllo positivo, contenenti rispettivamente 50 copie/µL e 25 copie/µL di materiale di riferimento standard SARS-CoV-2 di Bio-Rad (Cat.no #COV19) disciolto in H<sub>2</sub>O. La valutazione è stata eseguita utilizzando un unico lotto di reagenti e un dispositivo.

### Valutazione di sensibilità e specificità analitiche e di precisione

È stata eseguita una validazione tecnica del kit COV19 qcLAMP con la Piattaforma Pebble qcLAMP Point-of-Care in conformità alla norma EN 13612:2002.

La sensibilità analitica del kit, e in particolare la capacità di rilevamento, è stata determinata seguendo le raccomandazioni pubblicate dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Sono stati selezionati due tipi di matrice per tenere conto della variabilità della matrice: acqua priva di DNAsi e RNAsi e RNA umano isolato dalla saliva umana. L'RNA della saliva umana è stato utilizzato per imitare la complessità della matrice dei campioni dei pazienti locali. Lo studio comprendeva quattro campioni di pazienti individuali, unici e naturali, secondo gli standard CLSI EP17-A2. La saliva umana è stata raccolta da quattro volontari sani e l'RNA è stato isolato con il kit Qiagen RNeasy (Cat.no #74192). L'RNA umano isolato è stato riunito per generare la matrice rappresentativa.

I campioni di basso livello sono stati preparati aggiungendo il materiale di riferimento standard per SARS-CoV-2 di Bio-Rad (Cat.no #COV19) a ciascun tipo di matrice, per ottenere una concentrazione finale di 50 copie del misurando/µL (LoD).

Il progetto sperimentale consisteva in misurazioni replicate su bianco-campioni (NC) e campioni di basso livello (PC), utilizzando due diversi lotti di reagenti con esperimenti eseguiti in più giorni su un unico strumento, ma da due operatori diversi. Il piano di elaborazione è stato impostato secondo gli standard CLSI EP17-A2 e conteneva tutti i fattori di progettazione richiesti e il numero richiesto di repliche.

La percentuale di campioni veri positivi e veri positivi identificati correttamente dal kit COV19 qcLAMP sulla Piattaforma Pebble qcLAMP doveva essere >95%. La precisione è stata espressa come proporzione di veri positivi e veri negativi in tutti i casi valutati.

### Risultati delle misurazioni per la qualificazione

Le misurazioni effettuate e l'interpretazione dei dati sono riassunte nelle seguenti tabelle:

Tipo di campione	Lotto dei reagenti	Operatore	Misurazione	Punti dati raccolti			
				Controllo positivo (PC)_H2O_50		Controllo positivo (PC)_H2O_25	
				Corretto	Falso	Corretto	Falso
Controllo positivo	Lotto 1	Operatore 1	1	6	0	5	1
			2	6	0	4	2
			3	6	0	4	2

Sulla base dei dati sopra riportati, il limite di rilevamento (LoD) è risultato pari a 50 copie/µL.

				correct		false		% correct		% correct		% correct		% correct
				Matrix human RNA	Matrix H2O	Matrix human RNA	Matrix H2O	Matrix human RNA	Matrix H2O	Matrix human RNA	Matrix H2O	Matrix human RNA	Matrix H2O	
Positive	Lot 1	Operator 1	Day 1	6	6	0	0	100	100	93.33	96.67	95		
			Day 2	6	6	0	0	100.0	100.0					
		Operator 2	Day 1	4	6	2	0	66.7	100.0					
			Day 2	12	11	0	1	100.0	91.7					
	Lot 2	Operator 1	Day 1	6	6	0	0	100.0	100.0					
			Day 2	6	6	0	0	100.0	100.0					
			Day 3	6	4	0	2	100.0	66.7					
		Operator 2	Day 1	6	6	0	0	100.0	100.0					
			Day 2	6	6	0	0	100.0	100.0					
				100.00	93.33	96.7	95.8							
Negative	Lot 1	Operator 1	Day 1	4	6	2	0	66.7	100.0	93.33	100.00	96.7		
			Day 2	6	6	0	0	100.0	100.0					
		Operator 2	Day 1	6	6	0	0	100.0	100.0					
			Day 2	12	12	0	0	100.0	100.0					
	Lot 2	Operator 1	Day 1	4	6	2	0	66.7	100.0					
			Day 2	6	6	0	0	100.0	100.0					
			Day 3	6	6	0	0	100.0	100.0					
		Operator 2	Day 1	6	6	0	0	100.0	100.0					
			Day 2	6	6	0	0	100.0	100.0					
				93.33	100.00	96.7	96.7							

Il numero di veri positivi era pari a 115, il numero di falsi positivi era pari a 5, mentre il numero di veri negativi era 116 e il rapporto dei falsi negativi era 4. Sulla base di queste cifre, sono state calcolate la sensibilità (tasso di veri positivi), la specificità (tasso di veri negativi) e la precisione, come segue:

**Sensibilità analitica: 0,958 (95,8%)**

**Specificità analitica: 0,967 (96,7%)**

**Precisione: 0,9625 (96,3%)**

### Valutazione di sensibilità e specificità cliniche

I test clinici sono stati eseguiti su un totale di 645 campioni rinofaringei o orofaringei testati per il COVID-19 (347 negativi e 298 positivi, con e senza estrazione di RNA), compresi i campioni di pazienti sintomatici o asintomatici di tutti i sessi e di tutte le età. Gli studi di validazione clinica sono stati eseguiti con campioni congelati (RNA estratto congelato e campioni grezzi congelati), mentre si è tentato di bilanciare l'inclusione di cariche virali basse, medie e alte. La specificità e la sensibilità diagnostiche sono state determinate sulla base di test su campioni RT-PCR, come metodo di riferimento, e qCLAMP come metodo di test.

#### A. Test clinici con campioni di RNA estratto

L'RNA estratto (congelato) di 318 campioni (150 positivi e 168 negativi) è stato analizzato utilizzando il kit COV19 qCLAMP con la Piattaforma Pebble qCLAMP Point-of-Care. I campioni positivi avevano riportato valori soglia del ciclo RT-qPCR compresi tra 12 e 35. Il risultato time-to-positive più veloce osservato con qCLAMP è stato di 10,7 min per un campione con un valore soglia del ciclo (Ct) di 16, mentre il massimo è stato di 26,8 min per un Ct di 30.

I dati corrispondenti sono riassunti nella tabella seguente:

Valore soglia del ciclo (Ct)	RT-PCR positiva	Proporzione	qcLAMP	PPA
<25	69	46%	69	100%
25-29	48	32%	43	91,7%
30-34	33	22%	24	75,8%

Metodo qcLAMP	Metodo RT-PCR		Totale	
	Positivo	Negativo		
Positivo	138	2	140	
Negativo	12	166	178	
Totale	150	168	318	

**Sensibilità totale: 92%** (95% CI: 87,7%-96,3%)

**Specificità totale: 98,8%** (95% CI: 97,2%-100%)

**Precisione: 95,6%**

#### B. Test clinici con campioni grezzi (senza estrazione di RNA)

326 campioni grezzi congelati sono stati analizzati utilizzando il kit COVID-19 qcLAMP con la Piattaforma Pebble qcLAMP Point-of-Care. I campioni positivi avevano riportato valori soglia del ciclo RT-qPCR compresi tra 12 e 31. Il risultato time-to-positive più veloce osservato con qcLAMP è stato di 11,5 min per un campione con un valore soglia del ciclo (Ct) di 14, mentre il massimo è stato di 23,8 min per un Ct di 26.

I dati corrispondenti sono riassunti nella tabella seguente:

Valore soglia del ciclo (Ct)	RT-PCR positiva	Proporzione	qcLAMP	PPA
<25	104	70,7%	101	97,1%
25-29	36	24,5%	13	36,1%
30-34	7	4,8%	2	28,6%










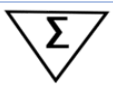


Metodo qcLAMP	Metodo RT-PCR		Totale	
	Positivo	Negativo		
Positivo	125	1	126	
Negativo	22	178	200	
Totale	147	179	326	

**Sensibilità totale: 85,0%** (95% CI: 79,2%-90,8%)

**Specificità totale: 99,4%** (95% CI: 98,3%-100%)

**Precisione: 93%**

## Simboli usati e la loro spiegazione

Simboli	Spiegazione
	Sito web
@	E-mail
	Numero di telefono
<b>IVD</b>	Per la diagnostica <i>in vitro</i>
<b>LOT</b>	Codice del lotto
<b>REF</b>	Numero di catalogo
	Consultare le Istruzione per l'uso delle parti elettroniche
	Produttore
<b>CE</b>	Marchatura CE
	Non utilizzare se la confezione è danneggiata
	Mantenere asciutto
	Diagnostica <i>in vitro</i> presso il paziente
	Non destinato a self-test
	Limite di temperatura (per il trasporto)
 100 test	Contiene una quantità sufficiente per 100 test
<b>SN</b>	Numero di serie
	Data di scadenza
<b>UDI</b>	Identificatore univoco del dispositivo
	Riciclabile



## Assistenza tecnica

Per assistenza tecnica, contattare la BIOPIX-T ai seguenti recapiti:

**Indirizzo:** BIOPIX DNA TECHNOLOGY P.C., Science and Technology Park of Crete, N. Plastira 100, Vasilika Vouton, GR-700 13, Heraklion, Grecia.

**Telefono:** (+30) 281 0391986

**E-mail:** [support@biopix-t.com](mailto:support@biopix-t.com) / [info@biopix-t.com](mailto:info@biopix-t.com)

## Bibliografia

Papadakis et al., "Real-time colorimetric LAMP methodology for quantitative nucleic acids detection at the Point-of-Care," no. 89, pp. 1–20, 2020, doi: 10.1101/2020.07.22.215251.

Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO), "Coronavirus disease 2019 (2019-nCoV) Situation Report – 11," WHO Bull., n. gennaio 31, pagg. 1–7, 2020.

## Abbreviazioni

Cat.no: Numero di catalogo

LAMP: Amplificazione isoterma mediata da loop

qLAMP: Amplificazione isoterma mediata da loop con analisi quantitativa colorimetrica

PCR: Reazione a Catena della Polimerasi

RNA: Acido ribonucleico

DNA: Acido desossiribonucleico

mL: millilitro

µL: microlitro