

**Ricerca RNA SARS CoV-2 in pool di tamponi oro-rinofaringei mediante il sistema POCT (Point Of Care Testing) On-Site Real Time PCR Rapid Shineway.**

**MATERIALI:**

Sono stati realizzati e valutati 6 pool di tamponi oro-rinofaringei precedentemente analizzati presso il Laboratorio Covid ASL-VT appartenente alla RETE regione Lazio CORONet.

I pool sono stati realizzati miscelando 1 tampone oro-rinofaringeo positivo con tamponi oro-rinofaringei negativi secondo lo schema in **Tabella 1 e 2**.

POOL 1:6		POOL 1:12		POOL 1:18	
TAMPONE POSITIVO (n. 0729003301)	TAMPONI NEGATIVI	TAMPONE POSITIVO (n. 0729003301)	TAMPONI NEGATIVI	TAMPONE POSITIVO (n. 0729003301)	TAMPONI NEGATIVI
50 microL	250 microL	25 microL	275 microL	16,7 microL	283,3 microL
Volume totale 300 microL		Volume totale 300 microL		Volume totale 300 microL	

**Tabella 1:** pool realizzati miscelando il campione positivo n. 0729003301 con 5 (pool 1:6), 11 (pool 1:12) e 17 (pool 1:18) tamponi negativi, per un volume totale di 300 microL.

POOL 1:6		POOL 1:12		POOL 1:18	
TAMPONE POSITIVO (n. 0729004201)	TAMPONI NEGATIVI	TAMPONE POSITIVO (n. 0729004201)	TAMPONI NEGATIVI	TAMPONE POSITIVO (n. 0729004201)	TAMPONI NEGATIVI
50 microL	250 microL	25 microL	275 microL	16,7 microL	283,3 microL
Volume totale 300 microL		Volume totale 300 microL		Volume totale 300 microL	

**Tabella 2:** pool realizzati miscelando il campione positivo n. 0729004201 con 5 (pool 1:6), 11 (pool 1:12) e 17 (pool 1:18) tamponi negativi, per un volume totale di 300 microL.

Le caratteristiche dei tamponi oro-rinofaringei utilizzati sono riassunte nella **Tabella 3**, dove sono riassunti i risultati della ricerca dei geni N, RdRP ed E realizzata presso il Laboratorio della rete CORONet e la quantificazione assoluta del campione realizzata presso il Laboratorio...Divisione tecnologie e metodologie per la salvaguardia della salute... dell'ENEA Casaccia.

TAMPONE n.	Copie/microL	Gene N (Ct)	Gene RdRP (Ct)	Gene E (Ct)
0729004201	0,5	39,44	/	/
0729003301	600	24,48	22,75	21,53

**Tabella 3:** caratteristiche dei tamponi positivi utilizzati per la realizzazione dei pool.

**METODI**

Ogni pool è stato analizzato in triplicato realizzando l'estrazione dell'RNA virale mediante l'estrattore automatico (BIOER NPA 32.....) ed il kit (...BIOER MAGABIO BSC71 S1E...) e l'amplificazione in Real Time PCR con lo strumento On-Site Real Time PCR Rapid Shineway ed il kit ( DAAN GENE...) in grado di rilevare il gene N specifico per il virus SARS CoV-2 ed un controllo interno ( RNASEP...).

Il protocollo di amplificazione impiegato è specificato in **Tabella 4**.

## TABELLA

**Tabella 4:** protocollo di amplificazione in Real Time PCR

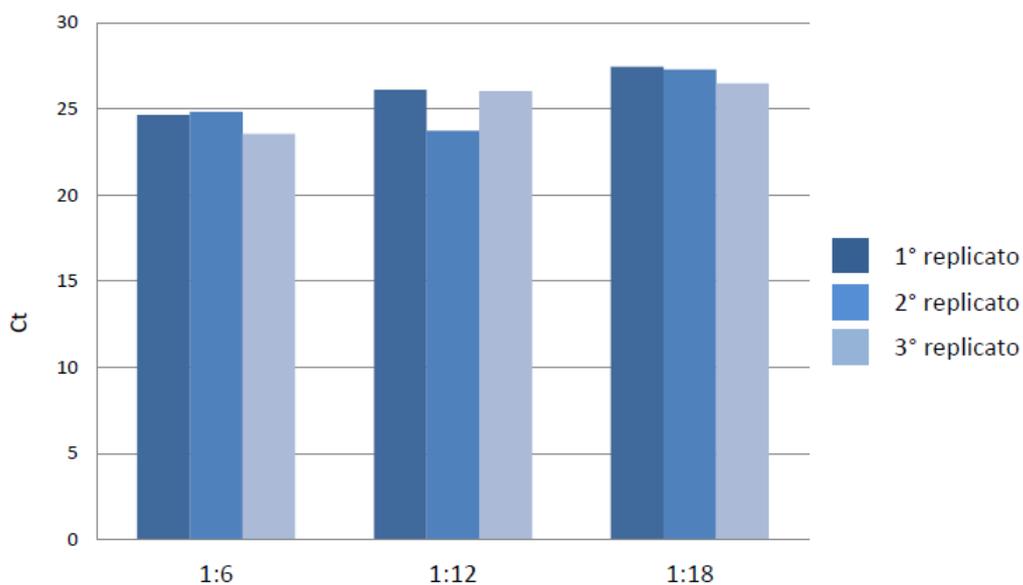
### RISULTATI

Entrambi i tamponi descritti in Tabella 3 sono stati analizzati in singolo con il sistema POCT (Point Of Care Testing) On-Site Real Time PCR Rapid Shineway, ed hanno dato esito positivo per la ricerca del gene N. (risultati di Cesi...).

Il Tampone n. 0729004201 contiene un numero di copie (0,5 copie/microL) al limite di rilevazione del Laboratorio della rete CORONet ed è stato rilevato anche dal sistema in valutazione.

Tutti i pool realizzati con il Tampone n. 0729004201 hanno dato esito negativo come prevedibile dal momento che la concentrazione nei pool del campione risulta minore del limite di rilevazione del sistema (0,5 copie/microL).

Tutti i pool realizzati con il Tampone n. 0729003301 hanno dato esito positivo nei diversi triplicati come descritto nella Figura 1 e nella Tabella 5.

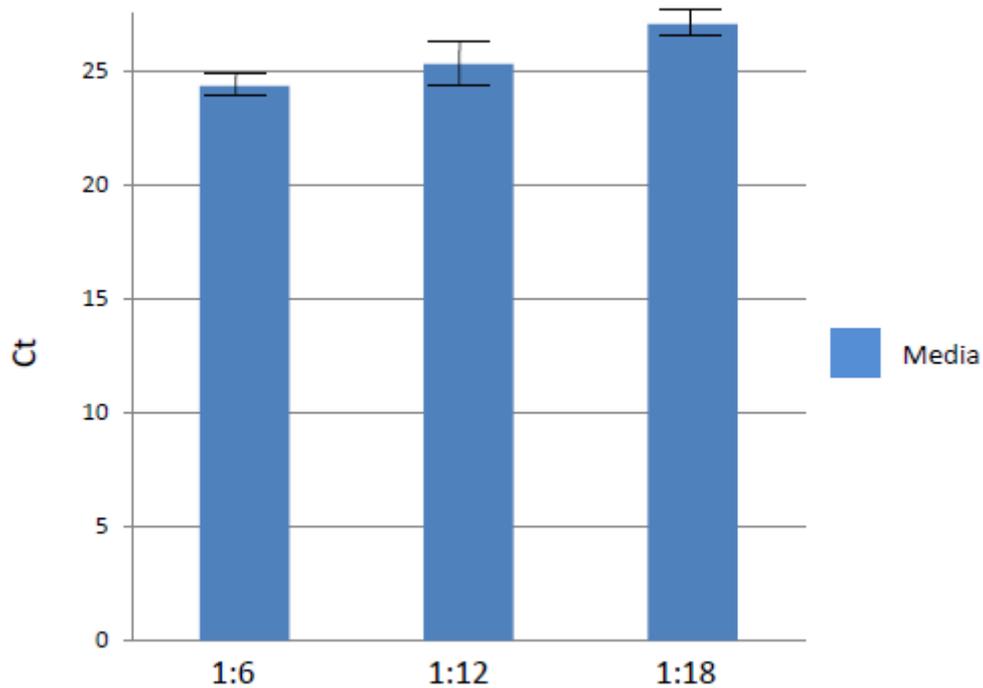


**Figura 1:** risultati in Ct dell'amplificazione del gene N mediante il sistema On-Site Real Time PCR Rapid Shineway di tre pool in triplicato.

	POOL 1:6 (Ct)	POOL 1:12 (Ct)	POOL 1:18 (Ct)
1° replicato	24,64	24,82	23,54
2° replicato	26,10	23,72	26,03
3° replicato	27,43	27,27	26,47

**Tabella 5:** risultati in Ct dell'amplificazione del gene N mediante il sistema On-Site Real Time PCR Rapid Shineway di tre pool in triplicato.

Nella **Figura 2** e nella **Tabella 6** sono riportati i valori della MEDIA e SD (Standard Deviation) dei Ct per i tre pool calcolati sui triplicati di analisi.



**Figura 2:** Media e SD risultati in Ct dell'amplificazione del gene N mediante il sistema On-Site Real Time PCR Rapid Shineway dei tre pool, calcolati sui triplicati di analisi.

	POOL 1:6 (Ct)	POOL 1:12 (Ct)	POOL 1:18 (Ct)
MEDIA	24,33	25,28	27,06
S.D.	+/- 0,57	+/- 1,11	+/- 0,42

**Tabella 6:** Media e SD risultati in Ct dell'amplificazione del gene N mediante il sistema On-Site Real Time PCR Rapid Shineway dei tre pool, calcolati sui triplicati di analisi.

## DISCUSSIONE

**Il sistema On-Site Real Time PCR Rapid Shineway è in grado di individuare la presenza dell'RNA specifico per il gene N specifico del virus SARS CoV-2 in pool di 6, 12 e 18 tamponi oro-rinofaringei** congiuntamente all'amplificazione di un controllo interno. La possibilità di analizzare tamponi in pool riduce notevolmente i tempi di lavorazione del laboratorio **permettendo in due amplificazioni la valutazione di fino a 54 tamponi oro-rinofaringei.**

Dott.ssa Gloria Pessina  
 Responsabile Laboratorio COVID ASL-VT  
 Rete CORONet Lazio