

Istruzioni per l'uso

RealStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

01/2021 IT

RealStar[®]

SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Per uso con

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)



821015



384



01 2021



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Contenuto

1.	Usò previsto	6
2.	Componenti del kit.....	6
3.	Conservazione.....	7
4.	Materiale e dispositivi richiesti e non forniti	8
5.	Informazioni generali	9
6.	Descrizione del prodotto	9
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale	11
6.2	Tipi di campioni, manipolazione e conservazione.....	11
7.	Avvertenze, precauzioni e limitazioni.....	13
8.	Procedura	16
8.1	Preparazione del campione	16
8.2	Preparazione della Master Mix.....	19
8.3	Preparazione della reazione	21
9.	Programmazione dello strumento PCR in tempo reale	22
9.1	Impostazioni	22
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti)	22
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti	23
10.	Analisi dei dati.....	23
10.1	Validità dei test diagnostici	24
10.1.1	Test diagnostico valido	24
10.1.2	Test diagnostico non valido	24
10.2	Interpretazione dei risultati	24
10.2.1	Analisi qualitativa	25

11. Dati di performance	26
11.1 Sensibilità analitica.....	26
11.2 Specificità analitica.....	28
11.2.1 Inclusività	29
11.2.2 Reattività crociata.....	31
11.3 Precisione	33
11.4 Valutazione diagnostica	34
12. Controllo di qualità	35
13. Assistenza tecnica	35
14. Letteratura	35
15. Marchi e brevetti.....	36
16. Spiegazione dei simboli	37

1. Uso previsto

Il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo dell'RNA specifico di coronavirus appartenente al sottogenere B-beta (sottogenere B-βCoV) e di sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2).

Destinato a essere utilizzato come aiuto nella diagnosi nei soggetti con segni e sintomi di malattia da coronavirus 2019 (COVID-2019) in associazione a fattori di rischio clinici ed epidemiologici.

Il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è destinato a essere utilizzato da personale qualificato in laboratori adeguatamente equipaggiati seguendo le linee guida sulla biosicurezza dei laboratori.

2. Componenti del kit

Colore coperchio	Componente	Numero di fiale	Volume [μl/fiale]
Blu	Master A	8	240
Viola	Master B	8	720
Rosso	Positive Control*	2	250
Verde	Internal Control	4	1000
Bianco	Water (PCR grade)	2	500

* Il controllo positivo contiene entrambe i target, sottogenere B-βCoV e SARS-CoV-2

Positive Control = Controllo positivo

Internal Control (IC) = Controllo interno

Water (PCR grade) = Acqua (testata per PCR)

ATTENZIONE



Prima del primo utilizzo controllare la completezza del prodotto e di tutti i suoi componenti rispetto a numero, tipo e riempimento. Non utilizzare un prodotto difettoso o incompleto, in quanto le sue prestazioni potrebbero risultare compromesse.

3. Conservazione

- Il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del kit devono arrivare congelati. Se uno o più componenti non sono congelati al momento della ricezione o se le provette sono state danneggiate durante la spedizione, contattare Altona Diagnostics GmbH per assistenza.
- Tutti i componenti devono essere conservati tra -25°C e -15°C dopo l'arrivo.
- Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti (più di due volte) dei reagenti Master, controllo interno e controllo positivo, poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del test. I reagenti devono essere congelati in aliquote, in caso di utilizzo intermittente.
- La conservazione tra +2°C e +8°C non deve superare un periodo di due ore.
- Proteggere il Master A e il Master B dalla luce.

ATTENZIONE



Condizioni di conservazione errate possono causare la compromissione delle prestazioni del prodotto stesso.

ATTENZIONE



Non superare il numero di sequenze di scongelamento e congelamento ripetute e la durata delle manipolazioni specificate in queste istruzioni per l'uso.

ATTENZIONE

Non utilizzare i componenti del prodotto oltre la data di scadenza stampata sull'etichetta.

4. Materiale e dispositivi richiesti e non forniti

- Strumento PCR in tempo reale appropriato (vedere capitolo 6.1 Strumenti PCR in tempo reale)
- Sistema o kit di estrazione di acidi nucleici appropriato (vedere capitolo 8.1 Preparazione del campione)
- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Centrifuga con rotore per piastre per microtitolazione, se si utilizzano piastre di reazione a 96 pozzetti
- Vortex mixer
- Piastre di reazione o provette di reazione appropriate a 96 pozzetti con materiale di chiusura (ottico) corrispondente
- Pipette (regolabili)
- Puntali con filtro (monouso)
- Guanti senza polvere (monouso)

NOTA

Assicurarsi che tutti gli strumenti utilizzati siano stati installati, calibrati, controllati e sottoposti a manutenzione secondo le istruzioni e le raccomandazioni del produttore.

NOTA

Si consiglia di utilizzare il rotore a 72 pozzetti con le appropriate provette di reazione da 0,1 ml, se si utilizza il Rotor-Gene® Q 5/6 plex (QIAGEN)

5. Informazioni generali

Il coronavirus 2 da sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) è un virus a RNA monofilamento a polarità positiva appartenente alla famiglia dei Coronaviridae, genere betacoronavirus, sottogenere B.

Il SARS-CoV-2 è comparso nella regione cinese di Wuhan nel mese di dicembre 2019 e si è diffuso in tutto il mondo in appena 2 mesi. Inizialmente il virus era stato definito come 2019-nCoV (nuovo Coronavirus), ed è stato ribattezzato come SARS-CoV-2 dall'"International Committee on Taxonomy of Viruses" l'11 febbraio 2020. Nello stesso momento, l'OMS ha denominato COVID-19 la malattia causata dal SARS-CoV-2. Considerando il rapido inasprimento e propagazione della COVID-19 in tutto il mondo, il 12 marzo 2020 l'OMS ha dichiarato l'epidemia come pandemia.

Il virus SARS-CoV-2 è estremamente contagioso, viene trasmesso tramite aerosol e goccioline e causa infezioni respiratorie acute con sintomi simili a quelli influenzali. Soprattutto nelle persone anziane e in quelle con patologie preesistenti, ma non esclusivamente in esse, l'infezione da SARS-CoV-2 può causare una malattia grave e potenzialmente fatale. Sono stati riferiti casi sia di infezione asintomatica sia di malattia lieve, malattia grave e decesso.

6. Descrizione del prodotto

Il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è un test diagnostico *in vitro*, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo dell'RNA specifico di coronavirus appartenente al sottogenere B-beta (sottogenere B-βCoV) e di sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2).

Il test include un sistema di amplificazione eterologa (controllo interno) per identificare la possibile inibizione della RT-PCR e per confermare l'integrità dei reagenti del kit.

La tecnologia RT-PCR in tempo reale utilizza la reazione della trascrittasi inversa (RT) per convertire l'RNA in DNA complementare (cDNA), la reazione a catena della polimerasi (PCR) per l'amplificazione di sequenze target particolari e sonde target-specifiche per la rilevazione del DNA amplificato. Le sonde sono marcate con un reporter fluorescente (fluoroforo) ed un quencher.

Le sonde specifiche per l'RNA di sottogenere B- β CoV (gene target E) sono marcate con il fluoroforo FAM™ mentre le sonde specifiche per l'RNA di SARS-CoV-2 (gene target S) sono marcate con il fluoroforo Cy5. La sonda specifica per il controllo interno (IC) è marcata con il fluoroforo JOE™.

L'uso di sonde marcate con coloranti distinguibili consente il rilevamento in parallelo dell'RNA specifico di sottogenere B- β CoV e SARS-CoV-2, nonché il rilevamento del controllo interno nei corrispondenti canali di rivelazione dello strumento PCR in tempo reale.

Il test comprende tre processi in un'unica provetta:

- Trascrizione inversa dell'RNA target e del controllo interno in cDNA
- Amplificazione PCR del cDNA target e controllo interno
- Rilevamento simultaneo di ampliconi da PCR mediante sonde marcate con colorante fluorescente

Il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è composto da:

- Master A
- Master B
- Positive Control (sottogenere B- β CoV, SARS-CoV-2)
- Internal Control
- Water (PCR grade)

Positive Control = Controllo positivo

Internal Control = Controllo interno

Water (PCR grade) = Acqua (testata per PCR)

Master A e Master B contengono tutti i componenti (tampone per PCR, trascrittasi inversa, DNA polimerasi, sali di magnesio, primers e sonde) per consentire la trascrizione inversa, l'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento dell'RNA specifico di sottogenere B-βCoV (gene target E), SARS-CoV-2 (gene target S) e del controllo interno in una singola reazione.

6.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti di PCR in tempo reale:

- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

6.2 Tipi di campioni, manipolazione e conservazione

Il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è stato validato per essere utilizzato con i seguenti tipi di campione:

- Tamponi respiratori umani prelevati in Universal Transport Medium™ (UTM®)

Il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è stato validato utilizzando il kit di purificazione AltoStar® Purification Kit 1.5 sul sistema di automazione AltoStar® Automation System AM16 per l'estrazione e la purificazione degli acidi nucleici.

Per il prelievo del campione si devono utilizzare tamponi con punta in fibra di dacron o poliestere e steli in plastica disponibili in commercio. I tamponi secchi devono essere risospesi in Universal Transport Medium (per es. UTM® di Copan). Non si devono usare tamponi in alginato di calcio, tamponi con stelo di legno e/o con punta in cotone o tamponi prelevati in gel agar. Il trasporto deve avvenire seguendo le istruzioni locali e nazionali per il trasporto di materiali biologici.

Prima dell'uso, i tamponi respiratori risospesi in UTM® non devono essere conservati per più di 48 ore a temperatura ambiente (da +20°C a +25°C), 5 giorni da +2°C a +8°C o 2 mesi da -25°C a -15°C.

ATTENZIONE



Trattare sempre i campioni come infettivi e ad elevato rischio (biologico) conformemente alle procedure di laboratorio sicure. Pulire immediatamente gli sversamenti di campioni utilizzando un disinfettante adatto. Manipolare i materiali contaminati come se fossero con rischio biologico.

NOTA



La conservazione in congelatore dei campioni non compromette le prestazioni del kit. Quando si lavora con campioni congelati, assicurarsi che essi siano completamente scongelati e correttamente miscelati prima dell'uso.

NOTA



Non utilizzare tamponi in alginato di calcio, poiché questo potrebbe portare a risultati errati o non validi a causa dell'inibizione della PCR.

7. Avvertenze, precauzioni e limitazioni

- Prima del primo utilizzo controllare la completezza del prodotto e di tutti i suoi componenti rispetto a numero, tipo e riempimento. Non utilizzare un prodotto difettoso o incompleto, in quanto le sue prestazioni potrebbero risultare compromesse.
- Non utilizzare altri tipi di campione! L'uso di altri tipi di campione può compromettere le prestazioni del prodotto.
- La presenza di inibitori della PCR può causare risultati falsi negativi o non validi.
- Nel caso in cui il campione contenga altri patogeni diversi da SARS-CoV-2, potrebbe presentarsi una competizione con l'amplificazione del target o reattività crociata.
- Condizioni di conservazione errate possono causare la compromissione delle prestazioni del prodotto stesso.
- La mancata centrifugazione dei componenti del prodotto dopo lo scongelamento potrebbe causare una contaminazione dei componenti con residui del reagente nei tappi e di conseguenza la compromissione delle prestazioni del prodotto.
- Non superare il numero di sequenze di scongelamento e congelamento ripetuti e la durata delle manipolazioni specificate in queste istruzioni per l'uso.
- Non utilizzare i componenti del prodotto oltre la data di scadenza stampata sull'etichetta.
- L'errata manipolazione dei componenti del prodotto e dei campioni può portare a una contaminazione, causando risultati errati nell'esame IVD.
 - Non scambiare i tappi di fiale o flaconi, perché ciò potrebbe causare contaminazione crociata.
 - Per ridurre al minimo il rischio di contaminazione da trasferimento, conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separatamente dai componenti del kit.
 - Utilizzare aree di lavoro separate per preparazione del campione, impostazione della reazione e attività di amplificazione/rilevazione.

- Indossare sempre guanti monouso.
- Non aprire le piastre PCR o le provette dopo l'amplificazione, per evitare contaminazione con ampliconi.
- Errate condizioni di conservazione degli eluati possono causare la degradazione delle sequenze target di SARS-CoV-2.
- Non superare il tempo conservazione della miscela PCR. Ciò potrebbe causare la compromissione delle prestazioni del prodotto.
- Trattare sempre i campioni come infettivi e ad elevato rischio (biologico) conformemente alle procedure di laboratorio sicure. Pulire immediatamente gli sversamenti di campioni utilizzando un disinfettante adatto. Manipolare i materiali contaminati come se fosse con rischio biologico.
- Smaltire i rifiuti pericolosi e biologici solo conformemente alle normative locali e nazionali in modo da evitare la contaminazione ambientale.
- Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati devono essere interpretati tenendo conto di tutti i risultati clinici e di laboratorio.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma di SARS-CoV-2 coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare il mancato rilevamento della presenza del patogeno.
- Se il sistema di preparazione dei campioni utilizza tamponi di lavaggio contenenti etanolo, assicurarsi di eliminare eventuali tracce di etanolo prima dell'eluizione dell'acido nucleico. L'etanolo è un forte inibitore della PCR in tempo reale.
- L'uso dell'RNA carrier è fondamentale per l'efficienza di estrazione e la stabilità dell'acido nucleico estratto.
- Questo test non deve essere utilizzato direttamente sul campione. Prima di utilizzare questo test, devono essere condotti appropriati metodi di estrazione dell'acido nucleico.
- Per risultati ottimali è richiesta la rigorosa osservanza delle istruzioni per l'uso.
- L'utilizzo di questo prodotto è limitato al personale appositamente istruito e addestrato nelle tecniche di PCR in tempo reale e procedure diagnostiche *in vitro*.

- La buona pratica di laboratorio è essenziale per la corretta esecuzione di questo test. È necessario prestare la massima attenzione per preservare la purezza dei componenti del kit e le impostazioni di reazione. Tutti i reagenti devono essere attentamente monitorati per impurità e contaminazione. Eventuali reagenti sospetti devono essere eliminati.
- Per l'esecuzione ottimale di questo test sono necessarie adeguate procedure di raccolta, trasporto, conservazione ed elaborazione dei campioni.
- Il dosaggio del gene E (canale FAM™) rileva l'RNA specifico del sottogenere B-betacoronavirus, compreso il coronavirus della SARS e diversi coronavirus di pipistrello. Segnali isolati con il dosaggio del gene E potrebbero indicare la presenza di coronavirus della SARS o coronavirus di pipistrello.

8. Procedura

ATTENZIONE



L'errata manipolazione dei componenti del prodotto e dei campioni può portare a una contaminazione, causando risultati errati nell'esame IVD.

- Non scambiare i tappi di fiale o flaconi, perché ciò potrebbe causare contaminazione crociata.

- Per ridurre al minimo il rischio di contaminazione da trasferimento, conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separatamente dai componenti del kit.

- Utilizzare aree di lavoro separate per preparazione del campione, impostazione della reazione e attività di amplificazione/rilevazione.

- Indossare sempre guanti monouso.

- Non aprire le piastre PCR di reazione dopo l'amplificazione, per evitare contaminazione con ampliconi.

8.1 Preparazione del campione

L'RNA estratto è il materiale di partenza per il kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0.

Il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è stato validato con tamponi respiratori umani usando il sistema di automazione AltoStar® Automation System AM16 in combinazione con il kit di purificazione AltoStar® Purification Kit 1.5.

Potrebbero anche essere appropriati sistemi e kit di estrazione dell'acido nucleico alternativi (si veda più sotto). L'idoneità della procedura di estrazione dell'acido nucleico per l'uso con RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 deve essere convalidata dall'utente.

- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIAasymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® EasyMAG® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Se si utilizza una procedura di preparazione del campione basata su colonna di centrifugazione che include tamponi di lavaggio contenenti etanolo, si consiglia di effettuare un'ulteriore fase di centrifugazione per 10 minuti a circa 17000 x g (~ 13000 rpm), usando una nuova provetta di raccolta, prima dell'eluizione dell'acido nucleico.

Dopo il completamento della procedura di estrazione, gli eluati nella piastra non eluito sono stabili a temperatura ambiente (max. +30°C) per un totale di 6 ore. Gli eluati in una piastra eluito possono essere conservati da +2°C a +8°C fino a 24 ore prima dell'avvio dell'impostazione di una reazione PCR.

ATTENZIONE



Non utilizzare altri tipi di campione! L'uso di altri tipi di campione può compromettere le prestazioni del prodotto.

ATTENZIONE



Se il sistema di preparazione dei campioni utilizza tamponi di lavaggio contenenti etanolo, assicurarsi di eliminare eventuali tracce di etanolo prima dell'eluizione dell'acido nucleico. L'etanolo è un forte inibitore della PCR in tempo reale.

ATTENZIONE



L'uso dell'RNA carrier è fondamentale per l'efficienza di estrazione e la stabilità dell'acido nucleico estratto.

ATTENZIONE

Trattare sempre i campioni come infettivi e ad elevato rischio (biologico) conformemente alle procedure di laboratorio sicure. Pulire immediatamente gli sversamenti di campioni utilizzando un disinfettante adatto. Manipolare i materiali contaminati come se fossero con rischio biologico.

ATTENZIONE

La presenza di inibitori della PCR può causare risultati falsi negativi o non validi.

ATTENZIONE

Questo test non deve essere utilizzato direttamente sul campione. Prima di utilizzare questo test, devono essere condotti appropriati metodi di estrazione dell'acido nucleico.

ATTENZIONE

Smaltire i rifiuti pericolosi e biologici solo conformemente alle normative locali e nazionali in modo da evitare la contaminazione ambientale.

ATTENZIONE

Errate condizioni di conservazione degli eluati possono causare la degradazione delle sequenze target di sottogenere B-βCoV e SARS-CoV-2.

Per ricevere ulteriori informazioni e assistenza tecnica riguardanti pre-trattamento e preparazione dei campioni, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 13. Assistenza tecnica).

8.2 Preparazione della Master Mix

Tutti i reagenti e i campioni devono essere completamente scongelati, miscelati (mediante pipettaggio o passaggio delicato su un agitatore vortex) e centrifugati brevemente prima dell'uso.

Il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 contiene un controllo interno (IC) eterologo, che può essere utilizzato o come controllo di inibizione della RT-PCR o come controllo della procedura di preparazione del campione (estrazione dell'acido nucleico) e come controllo di inibizione della RT-PCR.

- ▶ Se l'IC viene utilizzato come controllo di inibizione della RT-PCR, ma non come controllo della procedura di preparazione del campione, impostare la Master Mix secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Controllo interno	1 µl	12 µl
Volume Master Mix	21 µl	252 µl

- ▶ Se l'IC viene utilizzato come controllo per la procedura di preparazione del campione e come controllo di inibizione della RT-PCR, aggiungere l'IC durante la procedura di estrazione dell'acido nucleico.
- ▶ Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, l'IC **non deve** essere aggiunto direttamente al campione. L'IC deve essere sempre aggiunto alla miscela campione/tampone di lisi. Il volume dell'IC da aggiungere dipende sempre e soltanto dal volume di eluizione. Rappresenta il 10% del volume di eluizione. Ad esempio, se l'acido nucleico deve essere eluito in 60 µl di tampone di eluizione o acqua, devono essere aggiunti 6 µl di IC per campione nella miscela campione/tampone di lisi.

- Se l'IC è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, preparare la Master Mix secondo il seguente schema:

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Master A	5 µl	60 µl
Master B	15 µl	180 µl
Volume Master Mix	20 µl	240 µl

ATTENZIONE



La mancata centrifugazione dei componenti del prodotto dopo lo scongelamento potrebbe causare una contaminazione dei componenti con residui del reagente nei tappi e di conseguenza la compromissione delle prestazioni del prodotto.

NOTA



Se l'IC (controllo interno) è stato aggiunto durante la procedura di preparazione del campione, almeno il controllo negativo deve includere l'IC.

NOTA



Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, non aggiungere mai l'IC direttamente al campione.

8.3 Preparazione della reazione

- ▶ Pipettare 20 µl di Master Mix in ciascuno dei pozzetti richiesti di un'appropriata piastra di reazione ottica a 96 pozzetti o di un'appropriata provetta di reazione ottica.
- ▶ Aggiungere 10 µl di campione (eluato dall'estrazione dell'acido nucleico) o 10 µl del controllo (controllo positivo o negativo).

Preparazione della reazione	
Master Mix	20 µl
Campione o controllo	10 µl
Volume totale	30 µl

- ▶ Assicurarsi che almeno un controllo positivo e almeno un controllo negativo siano utilizzati ad ogni esecuzione del saggio.
- ▶ Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con la Master Mix pipettando su e giù.
- ▶ Chiudere la piastra di reazione a 96 pozzetti con tappi o pellicola adesiva ottica adeguati e le provette di reazione con tappi appropriati.
- ▶ Centrifugare la piastra di reazione a 96 pozzetti in una centrifuga con rotore per piastra di microtitolazione per 30 secondi a circa 1.000 x g (~ 3.000 rpm).

Dopo il completamento dell'impostazione della reazione PCR la miscela PCR è stabile a temperatura ambiente (max. +30°C) per 30 minuti.

ATTENZIONE



Non superare il tempo conservazione della miscela PCR. Ciò potrebbe causare la compromissione delle prestazioni del prodotto.

9. Programmazione dello strumento PCR in tempo reale

Per informazioni di base sull'impostazione e la programmazione dei diversi strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sulla programmazione dell'utilizzo del RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 su specifici strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 13. Assistenza tecnica).

9.1 Impostazioni

- Definire i seguenti parametri:

Impostazioni	
Volume di reazione	30 µl
Velocità di rampa	Predefinito
Riferimento passivo	ROX™

9.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

Target	Nome sonda	Reporter	Quencher
RNA specifico del sottogenere B-βCoV	Gene E	FAM™	(Nessuno)
RNA specifico di SARS-CoV-2	Gene S	Cy5	(Nessuno)
Controllo interno	IC	JOE™	(Nessuno)

9.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti

- Impostare il profilo della temperatura e l'acquisizione del colorante:

	Fase	Ripetizioni del ciclo	Acquisizione	Temperatura [°C]	Durata [min:sec]
Trascrizione inversa	Mantenimento	1	-	55	20:00
Denaturazione	Mantenimento	1	-	95	02:00
Amplificazione	Ciclaggio	45	-	95	00:15
			sì	55	00:45
			-	72	00:15

10. Analisi dei dati

Per informazioni di base sull'analisi dei dati su specifici strumenti PCR in tempo reale, consultare il manuale utente del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sull'analisi dei dati generati con RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 su diversi strumenti PCR in tempo reale, contattare il nostro supporto tecnico (vedere il capitolo 13. Assistenza tecnica).

10.1 Validità dei test diagnostici

10.1.1 Test diagnostico valido

Un test diagnostico è **valido** se sono soddisfatte le seguenti condizioni di controllo:

Controllo	Canale		
	FAM™	Cy5	JOE™
Controllo positivo [sottogenere B-βCoV e SARS-CoV-2]	+	+	+/-*
Controllo negativo	-	-	+

* La presenza o l'assenza di un segnale nel canale JOE™ non è rilevante per la validità dell'esecuzione del test.

10.1.2 Test diagnostico non valido

Un test diagnostico **non è valido**, (i) se l'esecuzione non è stata completata o (ii) se una delle condizioni di controllo per un test diagnostico **valido** non è soddisfatta.

In caso di test diagnostici **non validi** ripetere i test utilizzando gli acidi nucleici purificati rimanenti o ricominciare dai campioni originali.

10.2 Interpretazione dei risultati

ATTENZIONE



Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati devono essere interpretati tenendo conto di tutti i risultati clinici e di laboratorio.

10.2.1 Analisi qualitativa

Canale			Interpretazione dei risultati
FAM™ (Gene E)	Cy5 (Gene S)	JOE™ (Controllo interno)	
+	+	+*	Rilevato RNA specifico sottogenere B-βCoV e SARS-CoV-2. Positivo per SARS-CoV-2.
+	-	+*	Rilevato solo RNA specifico sottogenere B-βCoV. Presunto positivo per SARS-CoV-2. ^{1,2}
-	+	+*	Rilevato solo RNA specifico SARS-CoV-2. Positivo per SARS-CoV-2. ¹
-	-	+	Non rilevato RNA specifico né sottogenere B-βCoV né SARS-CoV-2. Il campione non contiene quantità rilevabili di RNA specifico per SARS-CoV-2.
-	-	-	Inibizione della RT-PCR o guasto del reagente. Ripetere i test dal campione originale o raccogliere e testare un nuovo campione.

* Il rilevamento del controllo interno nel canale di rilevamento JOE™ non è necessario in caso di risultati positivi del canale di rilevamento FAM™ o del canale di rilevamento Cy5. Un elevato carico di RNA di sottogenere B-βCoV (gene target E) e/o SARS-CoV-2 (gene target S) nel campione può portare a segnali del controllo interno ridotti o assenti.

¹ Il rilevamento in uno solo dei due rispettivi canali di rilevamento per il gene E e per il gene S potrebbe essere dovuto a una bassa concentrazione di RNA virale vicina al limite di rilevamento o alla mutazione di una delle due sequenze target.

² Il campione può essere ri-testato ripetendo l'estrazione e l'RT-PCR. Se il risultato rimane presunto positivo anche dopo la ripetizione, un ulteriore test di conferma può essere effettuato.

11. Dati di performance

La valutazione delle prestazioni analitiche del RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è stata fatta usando una coltura cellulare di SARS-CoV-2 in surnatante inattivata termicamente (*BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*) fornita dall'Institute of Virology, Charité Berlino, Germania.

11.1 Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è stata determinata dall'analisi delle serie di diluizioni di coltura cellulare di SARS-CoV-2 in surnatante inattivata termicamente (*BetaCoV/Munich/ChVir984/2020* fornita dall'Institute of Virology, Charité Berlino, Germania) diluita in Universal Transport Medium™ (UTM®, Copan) contenente matrice nasale simulata [5 % w/v Mucina, 5 % v/v sangue, 0,8 % v/v NaCl (95 % salina) e 0,00002 % w/v DNA genomico umano (richiesta 510k per il saggio BD MAX™ MRSA XT; codice di accesso: K133605)].

Ogni diluizione è stata analizzata in 8 replicati in 3 giorni differenti (n° totale = 24 per diluizione) usando combinazioni di 3 lotti di kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0, 3 lotti di kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e 3 lotti di AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno). I test sono stati effettuati usando 3 diversi AltoStar® Automation System AM16 (sistema di automazione) e CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema di rilevamento) (Bio-Rad).

Sono stati combinati i dati da tutti i test ed è stata quindi effettuata un'analisi probit per determinare il valore LoD 95 %.

Tab. 2: Risultati RT-PCR usati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento di RNA specifico di SARS-CoV-2 (gene E)

Conc. input [UFP/ml]	Numero di replicati	Numero di positivi	Hit Rate [%]
1,00E+00	24	24	100
3,16E-01	24	24	100
1,00E-01	24	24	100
3,16E-02	24	24	100
1,00E-02	24	21	88
3,16E-03	24	12	50
1,00E-03	24	4	17
3,16E-04	24	1	4
1,00E-04	24	2	8

La sensibilità analitica del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 per SARS-CoV-2 (gene E) è stata determinata con analisi probit. Per il rilevamento di RNA di SARS-CoV-2 (gene E), la sensibilità analitica è di 0,025 UFP/ml [intervallo di confidenza del 95 % (IC): 0,014 - 0,060 UFP/ml].

Tab. 3: Risultati RT-PCR usati per il calcolo della sensibilità analitica rispetto al rilevamento di RNA specifico di SARS-CoV-2 (gene S)

Conc. input [UFP/ml]	Numero di replicati	Numero di positivi	Hit Rate [%]
1,00E+00	24	24	100
3,16E-01	24	24	100
1,00E-01	24	24	100
3,16E-02	24	24	100
1,00E-02	24	23	96
3,16E-03	24	15	63
1,00E-03	24	4	17
3,16E-04	24	2	8
1,00E-04	24	1	4

La sensibilità analitica del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 per SARS-CoV-2 (gene S) è stata determinata con analisi probit. Per il rilevamento di RNA di SARS-CoV-2 (gene S), la sensibilità analitica è di 0,014 UFP/ml [intervallo di confidenza del 95 % (IC): 0,008 - 0,032 UFP/ml].

11.2 Specificità analitica

La specificità analitica del RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è assicurata dall'accurata selezione degli oligonucleotidi (primer e sonde). Gli oligonucleotidi sono stati controllati mediante analisi comparativa delle sequenze rispetto a sequenze pubblicamente disponibili per garantire che tutti i genotipi sottogenere B-βCoV (gene target E) e SARS-CoV-2 (gene target S) pertinenti fossero rilevati.

11.2.1 Inclusività

L'inclusività del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è stata valutata per differenti isolati di SARS-CoV-2 con analisi chimica per via umida. I risultati vengono mostrati nella Tabella 4.

Tab. 4: Inclusività (per via umida) kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Ceppo/isolato di SARS-CoV-2	Fonte/tipo di campione	Concentrazione
<i>BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*</i>	Institute of Virology; Charité Berlino, Germania/ coltura cellulare in surnatante inattivata termicamente	1,00E+04 copie/μl
2019-nCoV/Italy-INMI1	European Virus Archive Global/RNA	1,00E+06 copie/μl

* Per la determinazione del LoD e la valutazione delle prestazioni cliniche del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è stato usato il ceppo *BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*.

Tab. 5: Inclusività (analisi *in silico* per 155.031 sequenze di genoma intero di SARS-CoV-2, pubblicate in GISAID e.V. (www.gisaid.org) e 36.630 sequenze di genoma intero pubblicate nel National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) alla data del 5 novembre 2020 per gene E e gene S target): RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

191.661 sequenze di genoma intero		Omologia	Commenti
Gene E	Forward primer	191.553 sequenze: 100 %	106 sequenze: 96,2 % (1 mismatch) 2 sequenze: 92,3 % (2 mismatch)
	Reverse primer	191.602 sequenze: 100 %	58 sequenze: 95,5 % (1 mismatch) 1 sequenza: 90,9 % (2 mismatch)
	Sonda	191.539 sequenze: 100 %	122 sequenze: 95,7 % (1 mismatch)
Gene S	Forward primer	191.419 sequenze: 100 %	239 sequenze: 95,2 % (1 mismatch) 3 sequenze: 90,5 % (2 mismatch)
	Reverse primer	190.996 sequenze: 100 %	662 sequenze: 95,5 % (1 mismatch) 3 sequenze: 90,1 % (2 mismatch)
	Sonda	190.534 sequenze: 100 %	1.120 sequenze: 96,3 % (1 mismatch) 6 sequenze: 92,6 % (2 mismatch) 1 sequenza: 85,2 %* (4 mismatch)

* La sequenza (ID di accesso EPI_ISL_415593, GISAID) ha mostrato 4 mismatch nel in sito di legame della sonda per il gene S. Questa sequenza è stata pubblicata il 10 marzo 2020 a Washington, USA. Da allora, nessuna delle sequenze pubblicate ha presentato nuovamente una quantità così elevata di mismatch. La sequenza è stata così commentata dagli autori "Attenzione. allungamenti di NNNs (1,74 % della sequenza totale)", il che indica una qualità non ideale del sequenziamento, e quindi l'impatto sugli oligonucleotidi specifici del gene S non è stato analizzato.

A seconda della posizione, è molto improbabile che gli eventi di mutazione che portano a ≤ 2 mismatch in una singola sequenza di oligonucleotide abbiano un qualsiasi effetto negativo significativo sulle prestazioni del saggio. Tutte queste sequenze (≤ 2 mismatch) analizzate per via umida nell'ambito delle attività di sorveglianza post-immissione sul mercato per il kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 hanno finora confermato che le prestazioni non erano influenzate da tali mutazioni. Con l'eccezione di un'unica sequenza, nessuna delle altre sequenze analizzate ha presentato mismatch in più di un oligonucleotide e nessuna delle sequenze disallineate ha presentato mismatch con entrambi i sistemi di rilevamento specifici (gene E e gene S), pertanto non ci si attende che la reattività degli specifici oligonucleotidi inclusi nel kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 ne sia compromessa.

11.2.2 Reattività crociata

La specificità analitica del RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 rispetto alla reattività crociata con altri patogeni differenti da SARS-CoV-2 è stata valutata analizzando virus correlati a SARS-CoV-2, patogeni che causano sintomi simili all'infezione da SARS-CoV-2 e patogeni che è probabile si presentino nei pazienti affetti da infezione da SARS-CoV-2.

Con l'eccezione di SARS-coronavirus*, il kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

- Coronavirus umano 229E
- Coronavirus umano OC43
- Coronavirus umano NL63
- MERS-coronavirus
- Adenovirus
- Metapneumovirus umano (hMPV)
- Parainfluenza virus 1
- Parainfluenza virus 2
- Parainfluenza virus 3
- Parainfluenza virus 4
- Influenzavirus A
- Influenzavirus B
- Enterovirus
- Virus respiratorio sinciziale A
- Virus respiratorio sinciziale B
- Rhinovirus
- *Chlamydia pneumoniae*
- *Haemophilus influenzae*

- *Legionella pneumophila*
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Bordetella pertussis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Pneumocystis jirovecii* (PJP)
- *Candida albicans*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus salivarius*

* Si ottiene un risultato positivo per SARS-coronavirus con il kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 nel canale FAM™, perché il gene E target non è specifico per SARS-CoV-2, ma rileva tutti i sottogeneri dei B-betacoronavirus, compreso il coronavirus della SARS.

ATTENZIONE



Nel caso in cui il campione contenga altri patogeni diversi da SARS-CoV-2, potrebbe presentarsi una competizione con l'amplificazione del target o reattività crociata.

11.3 Precisione

La precisione del RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è stata determinata come variabilità intra-dosaggio (variabilità all'interno di un esperimento), variabilità inter-dosaggio (variabilità tra esperimenti diversi) e variabilità inter-lotto (variabilità tra lotti di produzione diversi). La variabilità totale è stata calcolata combinando le tre analisi.

I dati di variabilità sono espressi in termini di deviazione standard e coefficiente di variazione sulla base del ciclo soglia (C_t) - valori. Almeno 4 replicati per campione sono stati analizzati per la variabilità intra-dosaggio, inter-dosaggio e inter-lotto.

Tab. 6: Dati di precisione (CV % [valori C_t]) per campioni UTM® di SARS-CoV-2 fortemente positivi

	Campione SARS-CoV-2 fortemente positivo [C_t nel canale FAM™, gene E target]	Campione SARS-CoV-2 fortemente positivo [C_t nel canale Cy5, gene S target]
Variabilità intra-dosaggio	0,15 - 0,61	0,02 - 0,34
Variabilità inter-dosaggio	1,80 - 2,10	1,53 - 1,64
Variabilità inter-lotto	0,44	0,41
Variabilità totale	1,83	1,22

Tutti i campioni analizzati a 3x LoD (campioni debolmente positivi) sono risultati positivi per SARS-CoV-2 (gene E e gene S).

Tab. 7: Dati sulla precisione (CV % [valori C_t]) per il Controllo interno nei campioni UTM® negativi per SARS-CoV-2

	Controllo interno
Variabilità intra-dosaggio	0,12 - 0,49
Variabilità inter-dosaggio	0,36 - 1,33
Variabilità inter-lotto	0,39
Variabilità totale	1,02

11.4 Valutazione diagnostica

Il kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è stato valutato in uno studio comparativo con il kit marcato CE Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks). 110 campioni da tamponi respiratori da controlli di routine su SARS-CoV-2 sono stati analizzati retrospettivamente in parallelo usando il kit Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit in combinazione con il sistema di preparazione dei campioni *m*Sample Preparation Systems RNA (Abbott) e lo strumento *m*2000sp Instrument (Abbott) e con il kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 in combinazione con il kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e l'AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno) sull'AltoStar® Automation System AM16 (sistema di automazione) e il CFX96™ Deep Well Dx System (Sistema di rilevamento) (Bio-Rad). Per l'analisi qualitativa sono stati esclusi tutti i campioni con un risultato non valido per uno o entrambi i saggi. I risultati dei 104 campioni restanti vengono mostrati nella Tabella 8.

Tab. 8: Risultati della valutazione di sensibilità e specificità diagnostica per SARS-CoV-2 in campioni da tamponi respiratori

		Kit Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks)	
		POSITIVO	NEGATIVO
Kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0	POSITIVO	51	2
	NEGATIVO	0	51

Sensibilità e specificità diagnostica del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 rispetto al kit Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit erano rispettivamente del 100 % e del 96 %.

12. Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione della qualità certificato ISO EN 13485 di Altona Diagnostics GmbH, ogni lotto di RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è testato in base a specifiche prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

13. Assistenza tecnica

Per l'assistenza ai clienti, si prega di contattare il nostro supporto tecnico:

e-mail: support@altona-diagnostics.com

telefono: **+49-(0)40-5480676-0**

14. Letteratura

Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise e David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.

Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.

15. Marchi e brevetti

AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); BD MAX™ (BD); NucliSENS®, EasyMag® (bioMérieux); CFX96™ (Bio-Rad); Universal Transport Medium™, UTM® (Copan); JOE™ (Life Technologies); Maxwell® (Promega); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); VERSANT® (Siemens Healthcare); FAM™, ROX™ (Thermo Fisher Scientific).

Nomi registrati, marchi, ecc. utilizzati in questo documento, anche se non specificamente contrassegnati come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

Il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è un kit diagnostico marcato CE secondo la direttiva diagnostica *in vitro* europea 98/79/CE.















Prodotto non concesso in licenza con Health Canada e non approvato o autorizzato dalla FDA.



altona Diagnostics RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 ha ricevuto l'Autorizzazione provvisoria dalla Health Sciences Authority di Singapore.

Non disponibile in tutti i Paesi.

© 2021 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

16. Spiegazione dei simboli

Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
	Codice lotto
	Colore del tappo
	Numero di catalogo
	Indice
	Numero
	Componente
	Global Trade Identification Number
	Istruzioni per l'uso
	Contiene sufficienti per "n" test / reazioni (rxns)
	Limite di temperatura
	Da usare entro
	Fornitore
	Attenzione: Evidenzia istruzioni per l'uso o procedure che, se non vengono seguite correttamente, potrebbero causare lesioni personali o influire sulle prestazioni del prodotto. Contattare l'assistenza tecnica di Altona Diagnostics per avere assistenza.

Simbolo	Spiegazione
	Nota: All'utente vengono fornite informazioni utili ma non essenziali per il compito da svolgere.
	Versione

always a drop ahead.

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

