

Istruzioni per l'uso

RealStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

05/2020 IT

RealStar[®]

SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Per uso con

Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
LightCycler® 480 Instrument II (Roche)



821015



384



05 2020



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

Contenuto

1.	Usò previsto	6
2.	Componenti del kit.....	7
3.	Conservazione.....	8
4.	Materiale e dispositivi richiesti e non forniti	9
5.	Informazioni generali	10
6.	Descrizione del prodotto	10
6.1	Strumenti per PCR in tempo reale	12
6.2	Tipi di campioni	12
7.	Avvertenze e precauzioni	13
8.	Procedura	15
8.1	Preparazione del campione	15
8.2	Preparazione della Master Mix.....	18
8.3	Preparazione della reazione	20
9.	Programmazione dello strumento PCR in tempo reale	21
9.1	Impostazioni	21
9.2	Sonde fluorescenti (coloranti)	21
9.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti	22
10.	Analisi dei dati.....	22
10.1	Validità dei test diagnostici	23
10.1.1	Test diagnostico valido	23
10.1.2	Test diagnostico non valido	23
10.2	Interpretazione dei risultati	23
10.2.1	Analisi qualitativa	24

11. Dati di performance	25
11.1 Sensibilità analitica.....	25
11.2 Specificità analitica.....	29
11.2.1 Inclusività	29
11.2.2 Reattività crociata.....	31
11.3 Precisione	32
11.4 Valutazione diagnostica	33
12. Limitazioni	35
13. Controllo di qualità	35
14. Assistenza tecnica	35
15. Letteratura	36
16. Marchi e brevetti.....	36
17. 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 targets, 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 ripetuti 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® 6000 (Corbett Research) o 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.

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 B-βCoV (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 B-βCoV 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:

- Trascrittasi 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 (B-βCoV, 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 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:

- Mx 3005P™ QPCR System (Stratagene)
- VERSANT® kPCR Molecular System AD (Siemens Healthcare Diagnostics)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

6.2 Tipi di campioni

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 terreno di trasporto universale (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.

7. Avvertenze e precauzioni

- 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.

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 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 a 2 °C - 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 fosse 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 B- β CoV e SARS-CoV-2.

Per ricevere ulteriori informazioni e assistenza tecnica riguardanti pre-trattamento e preparazione dei campioni contattare il nostro servizio di assistenza tecnica (vedere il capitolo 14. 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 14. 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 di B-βCoV	Gene E target	FAM™	(Nessuno)
RNA specifico di SARS-CoV-2	Gene S target	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 14. 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 [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 B-βCoV e SARS-CoV-2. Positivo per SARS-CoV-2.
+	-	+*	Rilevato solo RNA specifico 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 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 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 della performance del RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è stata effettuata usando diluizioni seriali di coltura cellulare di SARS-CoV-2 in surnatante inattivata termicamente (4,6E+05 unità formanti placca (UFP)/ml prima dell'inattivazione; Institute of Virology, Charité Berlino, Germania).

11.1 Sensibilità analitica

Stima del Limite di rilevabilità (LoD):

Sono state usate diluizioni seriali di coltura cellulare di SARS-CoV-2 in surnatante inattivata termicamente (4,6E+05 unità formanti placca (UFP)/ml prima dell'inattivazione; Institute of Virology, Charité Berlino, Germania).

Per l'estrazione, a 700 µl di UTM® contenenti matrice nasale simulata (il campione conteneva matrice nasale simulata (5 % w/v mucina, 5 % v/v sangue intero, 0,8 % v/v NaCl (95 % salina) e 0,00002 % w/v DNA genomico umano)) è stata aggiunta la coltura cellulare diluita di SARS-CoV-2 in surnatante e caricati sul sistema AltoStar® Automation System AM16 per l'estrazione dell'acido nucleico con il kit di purificazione AltoStar® Purification Kit 1.5.

Ogni diluizione è stata estratta in cinque replicati e analizzata con il kit PCR RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 sul sistema di rilevamento CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System. La concentrazione più bassa alla quale tutti i replicati sono risultati positivi è stata trattata come LoD provvisorio. I risultati sono disponibili nelle Tabelle 1 e 2.

Tab. 1: Determinazione del LoD provvisorio usando il sistema di automazione AltoStar® Automation System AM16 in combinazione con il kit di purificazione PCR AltoStar® Purification Kit 1.5 per l'estrazione degli acidi nucleici - Target: gene E

Target	Concentrazione [UFP/ml]	Percentuale di rilevazione	Replicato 1 C _t (FAM™)	Replicato 2 C _t (FAM™)	Replicato 3 C _t (FAM™)	Replicato 4 C _t (FAM™)	Replicato 5 C _t (FAM™)
Gene E	1,00E-01	5/5	32,79	33,30	33,03	33,24	33,14
	3,16E-02	4/5	-	35,23	35,25	39,43	34,22
	1,00E-02	4/5	-	35,68	38,77	36,25	36,10
	3,16E-03	2/5	-	-	-	38,30	38,70
	1,00E-03	0/5	-	-	-	-	-
	3,16E-04	0/5	-	-	-	-	-

Tab. 2: Determinazione del LoD provvisorio usando il sistema di automazione AltoStar® Automation System AM16 in combinazione con il kit di purificazione PCR AltoStar® Purification Kit 1.5 per l'estrazione degli acidi nucleici - Target: gene S

Target	Concentrazione [UFP/ml]	Percentuale di rilevazione	Replicato 1 C _t (Cy5)	Replicato 2 C _t (Cy5)	Replicato 3 C _t (Cy5)	Replicato 4 C _t (Cy5)	Replicato 5 C _t (Cy5)
Gene S	1,00E-01	5/5	32,75	32,82	33,07	32,95	33,14
	3,16E-02	3/5	-	35,43	34,54	-	35,44
	1,00E-02	4/5	-	37,41	36,01	38,64	39,21
	3,16E-03	1/5	-	-	-	37,80	-
	1,00E-03	2/5	-	-	38,98	-	39,76
	3,16E-04	0/5	-	-	-	-	-

Il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 in associazione al sistema di automazione AltoStar® Automation System AM16/kit di purificazione AltoStar® Purification Kit 1.5 e al sistema di rilevamento CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System ha rilevato 5 replicati su 5 con una concentrazione di 1,00E-01 UFP/ml per entrambi i target, il gene S e il gene E. Di conseguenza, questa concentrazione è stata considerata LoD provvisorio.

Conferma del Limite di rilevabilità (LoD):

Sulla base del LoD provvisorio, la coltura cellulare di SARS-CoV-2 in surnatante inattivata termicamente è stata aggiunta a 20 campioni UTM® contenenti matrice nasale simulata fino a una concentrazione finale di 1,00E-01 UFP/ml. Gli acidi nucleici sono stati estratti con il kit di purificazione AltoStar® Purification Kit 1.5 sul sistema di automazione AltoStar® Automation System AM16 come descritto più sopra. Gli eluati ottenuti sono stati analizzati con il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 sul sistema di rilevamento CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System. I risultati sono disponibili nella Tabella 3.

Tab. 3: Conferma del LoD sul sistema di rilevamento CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System

Concentrazione SARS-CoV-2 = 1,00E-01 UFP/ml				
Campione	Pos/Neg	C _t (FAM™)	C _t (Cy5)	C _t (JOE™)
1	Pos	33,02	33,04	29,57
2	Pos	33,28	33,29	29,34
3	Neg	-	-	29,25
4	Pos	33,34	33,76	29,45
5	Pos	32,82	33,88	29,42
6	Pos	32,79	32,85	29,61
7	Pos	32,43	33,53	29,53
8	Pos	33,14	33,26	29,47
9	Pos	33,01	32,68	29,45
10	Pos	33,2	33,45	29,31
11	Pos	33,21	33,51	29,41
12	Pos	32,99	34,11	29,56
13	Pos	32,69	33,13	29,41
14	Pos	33,67	34,33	29,52
15	Pos	32,55	32,76	29,48
16	Pos	33,26	33,32	29,33
17	Pos	33,2	32,53	29,36
18	Pos	32,78	33,00	29,51
19	Pos	33,13	33,31	29,47
20	Pos	33,28	33,43	29,46
Statistiche	Media C _t	33,04	33,32	29,45
	SD	0,30	0,47	0,09
	CV %	0,92	1,42	0,32
	Risultato	19/20		

Il kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 in associazione al sistema di automazione AltoStar® Automation System AM16/kit di purificazione AltoStar® Purification Kit 1.5 e al sistema di rilevamento CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System ha rilevato 19 replicati su 20 a una concentrazione di 1,00E-01 UFP/ml.

Pertanto il LoD confermato LoD è 1,00E-01 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 B-βCoV (gene target E) e SARS-CoV-2 (gene target S) pertinenti fossero rilevati.

11.2.1 Inclusività

L'inclusività del 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) 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	4,6E+05 UFP/ml
2019-nCoV//Italy-INMI1	European Virus Archive Global/ RNA	1,00E+04 copie/μl

* Per la determinazione del LoD e la valutazione delle prestazioni cliniche del 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 1906 sequenze di genoma intero di SARS-CoV-2, 1809 delle quali sono state pubblicate in GISAID e.V. (www.gisaid.org) e 107 sono state pubblicate nel National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) alla data del 27 marzo 2020 per gene E e gene S target): RealStar®SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

1916 sequenze di genoma intero		Omologia	Commenti
Gene E	Forward primer	1915 sequenze: 100 %	1 sequenza 96 % (1 mismatch)
	Reverse primer	1915 sequenze: 100 %	1 sequenza 95 % (1 mismatch)
	Sonda	1914 sequenze: 100 %	2 sequenze: 95 % (1 mismatch)
Gene S	Forward primer	1912 sequenze: 100 %	4 sequenze: 95 % (1 mismatch)
	Reverse primer	1903 sequenze: 100 %	13 sequenze: 95 % (1 mismatch)
	Sonda	1881 sequenze: 100 %	34 sequenze: 95 % (1 mismatch); 1 sequenza: 91 % (2 mismatch)

In una singola sequenza di oligonucleotidi gli eventi di mutazione che hanno portato a ≤ 2 mismatch non hanno alcun impatto negativo significativo sull'amplificazione della rispettiva sequenza target. Nessuna delle 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 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.

Il 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
- SARS-coronavirus3
- 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*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Bordetella pertussis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- *Pneumocystis jirovecii* (PJP)
- *Candida albicans*
- *Pseudomonas aeruginosa*

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	0,13 - 0,75	0,39 - 1,35
Variabilità inter-dosaggio	0,40 - 2,12	0,52 - 0,62
Variabilità inter-lotto	0,22	1,53
Variabilità totale	2,74	2,02

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	0,17 - 0,37
Variabilità inter-dosaggio	0,05 - 0,95
Variabilità inter-lotto	0,42
Variabilità totale	1,19

11.4 Valutazione diagnostica

Per prevedere le prestazioni cliniche con un intervallo di confidenza (IC) al 95 %, è stata preparata una coltura cellulare di SARS-CoV-2 in surnatante a differenti concentrazioni, in cieco e aggiunta a un totale di 34 singoli tamponi rinofaringei risospesi in terreno di trasporto universale (Universal Transport Medium™, UTM®).

A dieci campioni ciascuno è stato aggiunto RNA a una concentrazione finale di 1x LoD (1,00E-01 UFP/ml), a quattordici campioni ciascuno è stato aggiunto RNA a una concentrazione finale di 2x LoD (2,00E-01 PFU/ml), e a dieci campioni ciascuno è stato aggiunto RNA a una concentrazione finale di 20 x LoD (2,00E00 PFU/ml). Ad altri 35 singoli tamponi rinofaringei presunti negativi per SARS-CoV-2 risospesi in Universal Transport Medium™ (UTM®) non è stato aggiunto alcun analita. Tutti i campioni erano in cieco e trattati da un operatore imparziale. Gli acidi nucleici sono stati estratti usando il sistema di automazione AltoStar® Automation System AM16 in combinazione con il kit di purificazione AltoStar® Purification Kit 1.5 (Altona Diagnostics).

Gli eluati sono stati analizzati con il RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 sul Sistema di rilevamento CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Lo smascheramento della chiave di spiking in cieco è avvenuto dopo il completamento dei risultati. I risultati vengono mostrati nella Tabella 8.

Tab. 8: Risultati dell'analisi dei campioni clinici

Concentrazione del campione [UFP/ml]	Percentuale di rilevazione gene target S	Percentuale di rilevazione gene target E
1x LoD (1,00E-01)	9/10	10/10
2x LoD (2,00E-01)	14/14	14/14
20x LoD (2,00E00)	10/10	10/10
negativo	0/35	0/35

Il 95 % (23/24) dei campioni con una concentrazione di SARS-CoV-2 del 1x o 2x LoD sono risultati positivi per il gene target S e sono stati riferiti come "Positivi per l'RNA di SARS-CoV-2". Un campione era positivo solo per il gene E target ed è stato riferito come "Presunto positivo per l'RNA di SARS-CoV-2". Tutti (100 %) questi campioni sono risultati positivi per il gene E target. Tra i campioni con una concentrazione pari a 20x LoD, tutti (100 %) sono risultati positivi sia per il gene S, sia per il gene E target. Tutti i campioni non spiked (100 %) sono risultati negativi per entrambi i target.

12. Limitazioni

- 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.

13. 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.

14. 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

15. 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.

16. Marchi e brevetti

AltoStar®, RealStar® (altona Diagnostics); ABI Prism® (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); FAM™, JOE™, ROX™ (Life Technologies); LightCycler® (Roche); Maxwell® (Promega); Mx 3005P™ (Stratagene); NucliSENS®, easyMag® (bioMérieux); Rotor-Gene®, QIAamp®, QIAsymphony® (QIAGEN); VERSANT® (Siemens Healthcare); Universal Transport Medium™, UTM® (Copan).

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.

© 2020 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

17. Spiegazione dei simboli

Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
	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
	Note
	Versione

Note:

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

