

## Istruzioni per l'uso

**FlexStar<sup>®</sup>**

**SARS-CoV-2 Type & FLU  
RT-PCR Detection Mix 1.5**

02/2022 IT

**Respiratory**



# FlexStar®

## SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5

Per uso con

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)



FS0021515



384



02 2022



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

## Contenuto

<b>1.</b>	<b>Indicazioni sulle istruzioni per l'uso .....</b>	<b>6</b>
<b>2.</b>	<b>Uso previsto .....</b>	<b>6</b>
<b>3.</b>	<b>Contenuto del prodotto .....</b>	<b>7</b>
<b>4.</b>	<b>Conservazione.....</b>	<b>8</b>
<b>5.</b>	<b>Informazioni generali .....</b>	<b>9</b>
<b>6.</b>	<b>Descrizione del prodotto .....</b>	<b>10</b>
6.1	Componenti .....	11
6.2	Strumenti PCR in tempo reale.....	12
6.3	Tipi di campioni.....	12
<b>7.</b>	<b>Materiale richiesto e non fornito.....</b>	<b>13</b>
<b>8.</b>	<b>Avvertenze, precauzioni e limitazioni.....</b>	<b>14</b>
<b>9.</b>	<b>Procedura .....</b>	<b>16</b>
9.1	Raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni .....	16
9.2	Preparazione del campione.....	17
9.3	Preparazione della master mix .....	19
9.4	Preparazione della reazione.....	20
<b>10.</b>	<b>Programmazione dello strumento PCR in tempo reale .....</b>	<b>22</b>
10.1	Impostazioni .....	22
10.2	Sonde fluorescenti (coloranti).....	23
10.3	Profilo termico e acquisizione dei fluorofori .....	23
<b>11.</b>	<b>Analisi dei dati.....</b>	<b>23</b>
11.1	Validità dei test diagnostici .....	24
11.1.1	Test diagnostico valido .....	24

11.1.2	Test diagnostico non valido .....	24
11.2	Interpretazione dei risultati .....	24
11.2.1	Analisi qualitativa .....	25
<b>12.</b>	<b>Valutazione della performance .....</b>	<b>26</b>
12.1	Tamponi respiratori .....	26
12.1.1	Sensibilità analitica .....	26
12.1.2	Specificità analitica .....	30
12.1.2.1	Campioni negativi .....	31
12.1.2.2	Sostanze interferenti .....	31
12.1.2.3	Reattività crociata .....	32
12.1.3	Inclusività .....	33
12.1.4	Precisione .....	36
12.1.5	Percentuale totale di guasti .....	38
12.1.6	Contaminazione da trasferimento .....	39
12.1.7	Prestazioni cliniche .....	39
<b>13.</b>	<b>Smaltimento .....</b>	<b>41</b>
<b>14.</b>	<b>Controllo di qualità .....</b>	<b>41</b>
<b>15.</b>	<b>Assistenza tecnica .....</b>	<b>42</b>
<b>16.</b>	<b>Letteratura .....</b>	<b>42</b>
<b>17.</b>	<b>Marchi e brevetti .....</b>	<b>43</b>
<b>18.</b>	<b>Spiegazione dei simboli .....</b>	<b>44</b>
<b>19.</b>	<b>Cronologia delle revisioni .....</b>	<b>46</b>

## 1. Indicazioni sulle istruzioni per l'uso

Nel presente manuale, i termini ATTENZIONE e NOTA hanno i seguenti significati:

### ATTENZIONE



Pone l'attenzione su istruzioni e procedure di utilizzo che, se non seguite correttamente, rischiano di causare lesioni personali o compromettere le prestazioni del prodotto. Per ricevere assistenza, contattare l'assistenza tecnica Altona Diagnostics.

### NOTA



Informazioni utili che vengono comunicate all'utente ma che non sono essenziali per il compito da svolgere.

Leggere attentamente le istruzioni per l'uso prima di utilizzare il prodotto.

## 2. Uso previsto

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è un test diagnostico *in vitro* basato sulla tecnologia PCR in tempo reale per il rilevamento qualitativo e la differenziazione di RNA specifico di coronavirus 2 da sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) e influenzavirus in campione di tamponi respiratori umani. Il rilevamento del SARS-CoV-2 si basa sul rilevamento in parallelo del gene E di coronavirus appartenenti al sottogenere B-beta (incluso il SARS-CoV-2) e del gene S del SARS-CoV-2.

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è destinato a essere utilizzato come aiuto per la diagnosi di un'infezione da SARS-CoV-2 e da influenzavirus.

I risultati generati con il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 devono essere interpretati in associazione ad altri risultati clinici e di laboratorio.

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è destinato a essere utilizzato da personale qualificato nelle tecniche di biologia molecolare e nelle procedure di diagnostica *in vitro*.

### 3. Contenuto del prodotto

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 contiene i componenti che seguono:

**Tab. 1:** Componenti del kit

Colore tappo	Componente	Numero di fiale	Volume nominale [µl/fiala]
Blu	Detection Mix <sup>1)</sup>	8	240
Rosso	PC <sup>2)</sup>	2	250
Bianco	NTC <sup>3)</sup>	2	250

<sup>1)</sup> Contiene materiale biologico di origine animale

<sup>2)</sup> Positive Control (controllo positivo) [RNA specifico di sottogenere B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e influenzavirus]

<sup>3)</sup> No Template Control (controllo negativo)

#### 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 del prodotto potrebbero risultare compromesse.

## 4. Conservazione

- Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 viene spedito in ghiaccio secco. I componenti del prodotto 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 l'assistenza tecnica altona Diagnostics per assistenza (vedere capitolo 15. Assistenza tecnica).
- Tutti i componenti devono essere conservati tra -25°C e -15°C all'arrivo.
- Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti del componente Detection Mix, poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del prodotto.
- Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti (più di 4 volte) del Positive Control (PC, controllo positivo) e del No Template Control (NTC, controllo negativo) poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del prodotto.
- La conservazione a temperatura ambiente (max. +30°C) non deve superare un periodo di 2 ore.
- Proteggere il componente Detection Mix dalla luce.

### ATTENZIONE



Condizioni di conservazione errate possono compromettere le prestazioni del prodotto.

### ATTENZIONE



Non superare il numero di sequenze di scongelamento e congelamento ripetuti e la durata delle manipolazioni specificate in queste istruzioni per l'uso, in quanto le prestazioni del prodotto potrebbero risultare compromesse.

### ATTENZIONE



Non usare i prodotti oltre la data di scadenza. L'uso di prodotti scaduti potrebbe compromettere le prestazioni del prodotto.



## 5. Informazioni generali

### SARS-CoV-2

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 [1,2].

### Influenzavirus

L'influenza è una patologia infettiva causata da virus a RNA della famiglia degli *Orthomyxoviridae* (virus dell'influenza) [3,4]. I virus dell'influenza sono caratterizzati dal cambiamento continuo degli antigeni di superficie principali emoagglutinina (H) e neuraminidasi (N) (drift antigenico) [5]. Questi virus infettano uccelli e mammiferi tramite gli aerosol [6]. I virus dell'influenza A e dell'influenza B umana (Influenzavirus A e B) causano gravi infezioni prevalentemente localizzate nel tratto respiratorio, i cui sintomi più frequenti sono febbre e tosse. Nei casi più gravi, l'influenza causa una polmonite che può essere fatale, in particolare nei bambini e nelle persone anziane [7].

## NOTA



A causa dell'evoluzione molecolare relativamente veloce dei virus RNA, sussiste un rischio intrinseco, per ogni sistema di test basato sulla RT-PCR, che un accumulo di mutazioni nel tempo possa portare a risultati falso-negativi.

## 6. Descrizione del prodotto

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è un test diagnostico *in vitro*. In combinazione con il FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 consente il rilevamento qualitativo e la differenziazione di RNA specifico dei coronavirus del sottogenere B-beta (sottogenere B-βCoV, gene E), di SARS-CoV-2 (gene S) e influenzavirus (A+B) in campioni di tamponi respiratori umani.

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è basato sulla tecnologia RT-PCR in tempo reale, che 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 specifiche di sottogenere B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e influenza (A+B) e sonde target specifiche marcate con un colorante fluorescente per il rilevamento del cDNA amplificato.

Oltre ai sistemi di amplificazione e rilevamento di RNA specifico di sottogenere B-βCoV, SARS-CoV-2 e influenzavirus, il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 include oligonucleotidi per l'amplificazione e il rilevamento del controllo interno (IC, AltoStar® Internal Control 1.5). L'IC viene aggiunto automaticamente all'inizio della procedura di purificazione degli acidi nucleici sull'AltoStar® Automation System AM16 (sistema di automazione), (in seguito indicato come AltoStar® AM16). Per maggiori dettagli, fare riferimento alle istruzioni per l'uso dell'AltoStar® Internal Control 1.5.

Le sonde specifiche per RNA di sottogenere B-βCoV (gene E) sono marcate con il fluoroforo ROX™, le sonde specifiche per RNA di SARS-CoV-2 (gene S) sono marcate con il fluoroforo Cy5 e le sonde specifiche per RNA di influenzavirus (A+B) sono marcate con il fluoroforo FAM™. La sonda specifica per l'IC è marcata con il fluoroforo JOE™.

L'uso di sonde collegate a coloranti distinguibili consente il rilevamento in parallelo di sottogenere B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S), influenzavirus (A+B), nonché il rilevamento dell'IC nei corrispondenti canali di rilevamento dello strumento PCR in tempo reale.

### 6.1 Componenti

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 contiene reagenti sufficienti per 384 reazioni. Il prodotto consiste nei componenti che seguono:

- Detection Mix<sup>1)</sup>
- PC<sup>2)</sup>
- NTC<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Contiene materiale biologico di origine animale

<sup>2)</sup> Positive Control (controllo positivo) [RNA specifico di sottogenere B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e influenzavirus]

<sup>3)</sup> No Template Control (controllo negativo)

Ad eccezione della DNA polimerasi e della trascrittasi inversa, che sono incluse nel componente FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5, il componente Detection Mix contiene tutti i reagenti (tampone PCR, sale di magnesio, primer e sonde) per consentire il rilevamento e la differenziazione di sottogenere B-βCoV (gene E) e SARS-CoV-2 (gene S) e il rilevamento di RNA specifico del virus dell'influenza (A+B), nonché di RNA specifico dell'IC.

Il PC contiene RNA specifico di sottogenere B-βCoV (gene E) e SARS-CoV-2 (gene S), nonché RNA specifico di influenzavirus. Viene usato per verificare la funzionalità dei sistemi di amplificazione e rilevamento specifici di sottogenere B-βCoV, SARS-CoV-2 e influenzavirus.

L'NTC non contiene RNA specifico del sottogenere B-βCoV, di SARS-CoV-2 o di influenzavirus (A+B), ma contiene il template dell'IC. L'NTC viene usato come controllo negativo per la RT-PCR in tempo reale specifica per sottogenere B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e influenzavirus (A+B), e indica la possibile contaminazione del componente Detection Mix.

### 6.2 Strumenti PCR in tempo reale

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è stato sviluppato e validato per essere utilizzato con i seguenti strumenti PCR in tempo reale:

- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

#### NOTA



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

### 6.3 Tipi di campioni

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è stato validato per essere utilizzato con il seguente tipo di campione:

- Campione da tampone respiratorio umano

#### ATTENZIONE



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

## 7. Materiale richiesto e non fornito

I seguenti strumenti e materiali di consumo aggiuntivi sono necessari per l'uso del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 ma non sono forniti insieme al prodotto:

- Strumento PCR in tempo reale appropriato (vedere capitolo 6.2 Strumenti PCR in tempo reale)
- Sistema o kit di estrazione di acidi nucleici appropriato (vedere capitolo 9.2 Preparazione del campione)
- Vortex mixer
- Centrifuga (per es. centrifuga da banco) per centrifugazione dei reagenti del kit
- Centrifuga per centrifugazione delle piastre di PCR
- 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)

Reagenti richiesti ma non inclusi nel FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5:

- FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 (ordine N° FS0011515)
- AltoStar® Internal Control 1.5 (ordine N° IC15-16/IC15-46)

## 8. 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 del prodotto potrebbero risultare compromesse.
- Condizioni di conservazione errate possono compromettere le 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, in quanto le prestazioni del prodotto potrebbero risultare compromesse.
- Non usare i prodotti oltre la data di scadenza. L'uso di prodotti scaduti potrebbe compromettere le prestazioni del prodotto.
- Non utilizzare altri tipi di campione! L'uso di altri tipi di campione potrebbe compromettere le prestazioni del prodotto.
- La manipolazione errata dei componenti del prodotto e dei campioni può causare contaminazione e compromettere le prestazioni del prodotto:
  - Non scambiare le provette o i tappi dei flaconi.
  - Conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separato dai componenti del kit.
  - Utilizzare aree di lavoro separate per preparazione del campione, impostazione della reazione e attività di amplificazione/rilevazione.
  - Smaltire sempre i guanti dopo la manipolazione di materiale positivo e/o potenzialmente positivo.
  - Non aprire le piastre di PCR e/o le provette dopo l'amplificazione.
- Non mescolare i componenti di lotti di FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 diversi, in quanto le prestazioni del prodotto potrebbero risultare compromesse.
- Trattare sempre i campioni come materiale infetto e ad elevato rischio (biologico) conformemente alle procedure di sicurezza e di laboratorio. Pulire immediatamente gli sversamenti di campioni utilizzando un disinfettante adatto. Manipolare i materiali contaminati come se fosse con rischio biologico.
- La presenza di inibitori della PCR potrebbe causare risultati falsi negativi o invalidi.
- Lo smaltimento dei rifiuti pericolosi e biologici deve essere conforme alle normative locali e nazionali in modo da evitare la contaminazione ambientale.

- Errate condizioni di conservazione degli eluati possono causare la degradazione della sequenza target di sottogenere B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e/o influenzavirus e compromettere le prestazioni del prodotto.
- La mancata centrifugazione dei componenti del prodotto dopo lo scongelamento potrebbe causare una contaminazione con residui del reagente nei coperchi e potrebbe compromettere le prestazioni del prodotto.
- Non superare la durata di conservazione della miscela PCR, in quanto le prestazioni del prodotto potrebbero risultare compromesse.
- Come con qualsiasi test diagnostico, i risultati vanno interpretati tenendo conto di tutti i risultati clinici e di laboratorio.
- Nel caso in cui il campione contenga altri patogeni diversi da sottogenere B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e/o influenzavirus potrebbe presentarsi una competizione con l'amplificazione del target o reattività crociata, con conseguenti risultati errati dell'esame DIV.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma di sottogenere B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e/o influenzavirus coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare il mancato rilevamento della presenza dei patogeni.

## 9. Procedura

### ATTENZIONE

La manipolazione errata dei componenti del prodotto e dei campioni può causare contaminazione e compromettere le prestazioni del prodotto:

- Non scambiare le provette o i tappi dei flaconi.
- Conservare il materiale positivo e/o potenzialmente positivo separato dai componenti del kit.
- Utilizzare aree di lavoro separate per preparazione del campione, impostazione della reazione e attività di amplificazione/rilevazione.
- Smaltire sempre i guanti dopo la manipolazione di materiale positivo e/o potenzialmente positivo.
- Non aprire le piastre di PCR e/o le provette dopo l'amplificazione.



### ATTENZIONE

Non mescolare i componenti di lotti di FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 diversi, in quanto le prestazioni del prodotto potrebbero risultare compromesse.



### 9.1 Raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni

Per la raccolta dei campioni si devono usare tamponi con punta in dacron o poliestere e asta in plastica disponibili sul mercato. I tamponi secchi devono essere risospesi in terreno di trasporto universale (per es. UTM® di Copan). Non si devono usare tamponi in alginato di calcio, tamponi con asta di legno e/o punta in cotone e tamponi raccolti in gel di agar. Il trasporto deve avvenire seguendo le istruzioni locali e nazionali per il trasporto dei 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 a +2°C a +8°C o 2 mesi da -25°C a -15°C.



### ATTENZIONE



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

### NOTA



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

### NOTA



Non usare tamponi in alginato di calcio, perché ciò potrebbe portare a risultati errati o invalidi a causa dell'inibizione PCR.

### NOTA



Non usare tamponi con asta in legno e/o punta in cotone o tamponi con gel agar come terreno di trasporto, perché resti di legno, cotone e/o agar potrebbero interferire con il trasferimento del campione sull'AltoStar® AM16 e i campioni non saranno elaborati.

## 9.2 Preparazione del campione

L'RNA estratto è il materiale di partenza per il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5. La qualità dell'RNA estratto ha un profondo impatto sulle prestazioni del prodotto.

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è stato validato con campioni da tampone respiratorio umano usando AltoStar® AM16 in combinazione con il kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Dopo il completamento dell'estrazione degli acidi nucleici con lo strumento AltoStar® AM16, gli eluati nella eluate plate (piastra degli eluati) non sigillata sono stabili a temperatura ambiente (max. +30°C) per un totale di 4 ore.

Gli eluati in una eluate plate (piastra degli eluati) sigillata possono essere conservati da +2°C a +8°C fino a 24 ore prima dell'avvio dell'impostazione di una reazione. Per informazioni più dettagliate sulla sigillatura delle eluate plate (piastre degli eluati), fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Potrebbero anche essere appropriati sistemi e kit di estrazione di acidi nucleici alternativi. Tuttavia, l'idoneità della procedura di estrazione degli acidi nucleici per l'uso con il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 deve essere validata dall'utente.

### ATTENZIONE



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

### ATTENZIONE



Trattare sempre i campioni come materiale infetto e ad elevato rischio (biologico) conformemente alle procedure di sicurezza e di laboratorio. 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 potrebbe causare risultati falsi negativi o invalidi.

### ATTENZIONE



Lo smaltimento dei rifiuti pericolosi e biologici deve essere conforme alle normative locali e nazionali in modo da evitare la contaminazione ambientale.

### ATTENZIONE



Errate condizioni di conservazione degli eluati possono causare la degradazione della sequenza target di sottogenere B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e/o influenzavirus e compromettere le prestazioni del prodotto.

Per ricevere ulteriori informazioni e assistenza tecnica riguardanti pre-trattamento e preparazione del campione contattare il servizio di assistenza tecnica Altona Diagnostics (vedere capitolo 15. Assistenza tecnica).

### 9.3 Preparazione della master mix

Tutti i reagenti e i campioni devono essere completamente scongelati, miscelati (mediante pipettatura o vortice delicato) e centrifugati brevemente prima dell'uso.

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è configurato per l'uso con il FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 e con AltoStar® Internal Control 1.5, che permette di controllare la procedura di preparazione del campione (estrazione degli acidi nucleici) e la successiva RT-PCR.

- ▶ L'IC viene aggiunto automaticamente all'inizio della procedura di purificazione degli acidi nucleici sull'AltoStar® AM16.
- ▶ Quando si utilizzano metodi diversi per l'estrazione degli acidi nucleici, l'IC deve essere aggiunto durante la fase di lisi, manualmente o automaticamente da parte del rispettivo strumento.
- ▶ Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione degli acidi nucleici, non aggiungere mai l'IC 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 50% 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 30 µl di IC per campione nella miscela campione/tampone di lisi.

- Preparare la master mix secondo lo schema di pipettaggio che segue:

**Tab. 2:** Schema di pipettaggio (preparazione della master mix)

Numero di reazioni (rxns)	1	12
Detection Mix	5 µl	60 µl
Amplification Mix	15 µl	180 µl
<b>Volume master mix</b>	<b>20 µl</b>	<b>240 µl</b>

### ATTENZIONE



La mancata centrifugazione dei componenti del prodotto dopo lo scongelamento potrebbe causare una contaminazione con residui del reagente nei coperchi e potrebbe compromettere le prestazioni del prodotto.

## 9.4 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 degli acidi nucleici) o 10 µl dei controlli (PC o NTC).

**Tab. 3:** Schema di pipettaggio (preparazione della reazione)

Preparazione della reazione	
Master mix	20 µl
Campione o controllo	10 µl
<b>Volume totale</b>	<b>30 µl</b>

- ▶ Assicurarsi che siano utilizzati almeno 1 PC e 1 NTC per ogni processo.
- ▶ 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 e le provette di reazione in una centrifuga appropriata per 30 secondi a circa 1.000 x g (~ 3.000 rpm).
- ▶ L'NTC non contiene già il template dell'IC nella concentrazione corretta.

Dopo il completamento del processo di preparazione della miscela PCR, la miscela RT-PCR nella piastra di PCR sigillata è stabile a temperatura ambiente (max. +30°C) per un massimo di 30 minuti.

### ATTENZIONE



Non superare la durata di conservazione della miscela PCR, in quanto le prestazioni del prodotto potrebbero risultare compromesse.

## 10. 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 d'uso del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sulla programmazione per l'utilizzo del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 su specifici strumenti PCR in tempo reale, contattare l'assistenza tecnica Altona Diagnostics (vedere capitolo 15. Assistenza tecnica).

### 10.1 Impostazioni

- Definire i seguenti parametri:

**Tab. 4:** Impostazioni di processo

Impostazioni	
Volume di reazione	30 µl
Velocità di rampa	Default
Riferimento passivo	Nessuno

## 10.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

**Tab. 5:** Sonde fluorescenti

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

## 10.3 Profilo termico e acquisizione dei fluorofori

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

**Tab. 6:** Profilo termico e acquisizione dei fluorofori

	Stadio	Ripetizioni del ciclo	Acquisizione	Temperatura [°C]	Tempo [min:s]
Trascrizione inversa	Hold	1	-	52	05:00
Denaturazione	Hold	1	-	95	00:05
Amplificazione	Cycling	45	-	95	00:05
			Sì	58	00:25

## 11. Analisi dei dati

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

Per istruzioni dettagliate sull'analisi dei dati generati con il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 su diversi strumenti PCR in tempo reale, contattare l'assistenza tecnica Altona Diagnostics (vedere capitolo 15. Assistenza tecnica).

## 11.1 Validità dei test diagnostici

### 11.1.1 Test diagnostico valido

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

**Tab. 7:** Condizioni di controllo per un test valido

Controllo	Canale di rilevamento			
	ROX™	Cy5	FAM™	JOE™
Positive Control (controllo positivo) [sottogenere B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e influenzavirus]	+	+	+	Non applicabile
Controllo negativo	-	-	-	+

### 11.1.2 Test diagnostico non valido

Un test diagnostico **non è valido**, (i) se il processo non è stato completato 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.

## 11.2 Interpretazione dei risultati

### ATTENZIONE



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



## 11.2.1 Analisi qualitativa

Tab. 8: Interpretazione dei risultati

Canale di rilevamento				Interpretazione dei risultati
ROX™ (Gene E)	Cy5 (Gene S)	FAM™ [In- fluenza (A+B)]	JOE™ (IC)	
+	+	-	+/-*	Rilevato RNA specifico di sottogenere B-βCoV e SARS-CoV-2.
+	-	-	+/-*	Rilevato solo RNA specifico di sottogenere B-βCoV.**
-	+	-	+/-*	Rilevato solo RNA specifico di SARS-CoV-2.**
-	-	+	+/-*	Rilevato solo RNA di influenzavirus (A e/o B).
+	-	+	+/-*	Rilevato RNA specifico di sottogenere B-βCoV e di influenzavirus (A e/o B).
-	+	+	+/-*	Rilevato RNA specifico di SARS-CoV-2 e di influenzavirus (A e/o B).
+	+	+	+/-*	Rilevato RNA specifico di sottogenere B-βCoV, SARS-CoV-2 e influenzavirus (A e/o B).
-	-	-	+	Non rilevato RNA specifico né di sottogenere B-βCoV né di SARS-CoV-2, né di influenzavirus (A e/o B). Il campione non contiene quantità rilevabili di RNA specifico di sottogenere B-βCoV, SARS-CoV-2 o influenzavirus.
-	-	-	-	Inibizione della RT-PCR o guasto del reagente. Ripetere i test dal campione originale o raccogliere e testare un nuovo campione.

\* Il rilevamento dell'IC nel canale di rilevamento JOE™ non è necessario in caso di risultati positivi del canale di rilevamento ROX™ e/o Cy5 e/o FAM™. Un'elevata carica di RNA di sottogenere B-βCoV (gene E target) e/o di SARS-CoV-2 (gene S target) e/o di influenza (A+B) nel campione può portare a segnali di IC ridotti o assenti.

\*\*Il rilevamento in uno solo dei due rispettivi canali di rilevamento per sottogenere B-βCoV (gene E) e per SARS-CoV-2 (gene S) potrebbe essere dovuto a una bassa concentrazione di RNA virale vicina al limite di rilevabilità o alla mutazione di una delle due sequenze target.

## 12. Valutazione della performance

Le prestazioni del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 sono state valutate usando il Standard Internazionale dell'OMS "1<sup>st</sup> WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code: 20/146)", materiale di influenzavirus A (influenza A H3N2, ceppo Wisconsin/67/05) e materiale di influenzavirus B (ceppo Florida/04/06) disponibili in commercio.

### 12.1 Tamponi respiratori

#### 12.1.1 Sensibilità analitica

Per la determinazione del limite di rilevabilità (LoD) è stata generata una serie di diluizioni del Standard Internazionale dell'OMS "1<sup>st</sup> WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA", materiale di influenzavirus A (influenza A H3N2, ceppo Wisconsin/67/05) e materiale di influenzavirus B (ceppo Florida/04/06) disponibili sul mercato, diluiti in terreno di trasporto universale (UTM®, Copan) contenente matrice nasale simulata [5% p/v Mucina, 5% v/v sangue, 0,8% v/v NaCl (soluzione salina al 95%) e 0,00002% p/v DNA genomico umano (richiesta di 510 k per saggio BD MAX™ MRSA XT assay; numero di accesso: K133605)].

È stata analizzata una serie di diluizioni del Standard Internazionale dell'OMS "1<sup>st</sup> WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA" nell'intervallo tra 1,00E+04 UI/ml e 5,00E-01 UI/ml. Per influenzavirus A e influenzavirus B è stata analizzata una serie di diluizioni nell'intervallo tra 2,00E+03 copie/ml e 1,00E+01 copie/ml.

Ogni diluizione è stata analizzata in 8 replicati in 3 diversi processi (n totale = 24 per diluizione) utilizzando combinazioni di:

- 3 lotti di FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5
- 3 lotti di FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5

- 3 lotti di kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lotti di AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 strumenti AltoStar® AM16
- 3 strumenti CFX96™ DW Dx

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

**Tab. 9:** Risultati PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 per SARS-CoV-2 (gene S)

Concentrazione [UI/ml]	N [totale]	N [positivo]	Tasso di successo [%]
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	24	100
3,16E+01	24	10	42
1,00E+01	24	4	17
3,16E+00	24	5	21
1,00E+00	24	1	4
5,00E-01	24	1	4

Il LoD del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 per il rilevamento di SARS-CoV-2 (gene S) in UTM® è 201 UI/ml (intervallo di confidenza del 95%: 107-501 UI/ml).

**Tab. 10:** Risultati PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 per SARS-CoV-2 (gene E)

Concentrazione [UI/ml]	N [totale]	N [positivo]	Tasso di successo [%]
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	23	96
3,16E+01	24	10	42
1,00E+01	24	4	17
3,16E+00	24	2	8
1,00E+00	24	1	4
5,00E-01	24	1	4

Il LoD del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 per il rilevamento di SARS-CoV-2 (gene E) in UTM® è 226 UI/ml (intervallo di confidenza del 95%: 124-545 UI/ml).

**Tab. 11:** Risultati PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 per influenzavirus A

Concentrazione [copie/ml]	N [totale]	N [positivo]	Tasso di successo [%]
2,00E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	23	96
2,50E+02	24	22	92
1,00E+02	24	17	71
5,00E+01	24	9	38
2,50E+01	24	6	25
1,00E+01	24	1	4

Il LoD del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 per il rilevamento di influenzavirus A in UTM® è 341 copie/ml (intervallo di confidenza del 95%: 230-611 copie/ml).

**Tab. 12:** Risultati PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 per influenzavirus B

Concentrazione [copie/ml]	N [totale]	N [positivo]	Tasso di successo [%]
2,00E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	24	100
2,50E+02	24	19	79
1,00E+02	24	3	13
5,00E+01	24	6	25
2,50E+01	24	5	21
1,00E+01	24	1	4

Il LoD del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 per il rilevamento di influenzavirus B in UTM® è 432 copie/ml (intervallo di confidenza del 95%: 286-780 copie/ml).

### 12.1.2 Specificità analitica

La specificità analitica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 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 pertinenti di SARS-CoV-2 ed influenzavirus fossero rilevati.

Per la verifica della specificità analitica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 sono stati effettuati gli esperimenti che seguono (vedere i capitoli da 12.1.2.1 Campioni negativi a 12.1.2.3 Reattività crociata).

### 12.1.2.1 Campioni negativi

30 campioni di tampone respiratorio negativi per SARS-CoV-2, influenzavirus A e influenzavirus B da singoli donatori sono stati testati con il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5. Tutti i campioni (30 su 30) sono risultati negativi per il RNA specifico di SARS-CoV-2, influenzavirus A ed influenzavirus B e positivi per l'IC. La specificità analitica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 per i campioni da tampone respiratorio è  $\geq 95\%$ .

### 12.1.2.2 Sostanze interferenti

Per valutare l'influenza di sostanze endogene ed esogene potenzialmente interferenti sulle prestazioni del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 sono state aggiunte sostanze selezionate all'UTM® contenente SARS-CoV-2, influenzavirus A e influenzavirus B in una concentrazione finale di 3 x LoD (rispettivamente 6,03E+02 UI/ml, 1,02E+03 copie/ml e 1,29E+03 copie/ml) e in UTM® non contenente SARS-CoV-2, influenzavirus A o influenzavirus B.

I risultati ottenuti per i campioni contenenti sostanze potenzialmente interferenti sono stati confrontati ai risultati generati per i campioni in UTM® che non contenevano interferenze aggiunte. Ogni campione è stato elaborato in 3 replicati.

Non è stata osservata alcuna interferenza nei campioni contenenti livelli elevati di:

- Sostanze endogene
  - DNA genomico umano
  - Sangue intero umano
  - Mucine
- Sostanze esogene
  - Spray nasale antiallergico (contenente beclometasone dipropionato)
  - Spray nasale decongestionante (contenente xilometazolina cloridrato e dexpanthenolo)
  - Mupirocina
  - Zanamivir

**ATTENZIONE**



La presenza di inibitori della PCR potrebbe causare risultati falsi negativi o invalidi.

### 12.1.2.3 Reattività crociata

La specificità analitica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 rispetto alla reattività crociata con altri patogeni diversi da SARS-CoV-2, influenzavirus A e influenzavirus B è stata valutata analizzando:

- Patogeni correlati al virus SARS-CoV-2 e ai virus dell'influenza
- Patogeni che causano sintomi simili all'infezione da SARS-CoV-2 o dai virus influenzali

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 non ha reagito in modo incrociato con nessuno dei seguenti patogeni:

- Adenovirus
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Chlamydia pneumoniae*
- Enterovirus
- *Haemophilus influenzae*
- Coronavirus umano 229E
- Coronavirus umano NL63
- Coronavirus umano OC43
- Metapneumovirus umano (hMPV)
- *Legionella pneumophila*
- MERS-coronavirus
- *Moraxella catarrhalis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- Parainfluenza virus 1-4
- *Pneumocystis jirovecii*
- Virus respiratorio sinciziale A
- Virus respiratorio sinciziale B
- Rhinovirus
- *Streptococcus pneumoniae*



**ATTENZIONE**

Nel caso in cui il campione contenga altri patogeni diversi da sottogenere B-βCoV (gene E), SARS-CoV-2 (gene S) e/o influenzavirus, potrebbe presentarsi una competizione con le amplificazioni del target o reattività crociata, con conseguenti risultati errati dell'esame DIV.

**12.1.3 Inclusività**

La specificità del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 in relazione al rilevamento di varianti diverse di SARS-CoV-2 e di ceppi diversi di influenzavirus viene inoltre assicurata dalla selezione di primer e sonde. Per verificare che il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 permetta il rilevamento di diverse varianti di SARS-CoV-2 e di diversi ceppi di virus influenzali, sono stati analizzati i ceppi e le varianti che seguono (fare riferimento alle tabelle 13 e 15).

**Tab. 13:** Sottogeneri di SARS-CoV-2 analizzati

Variante (sottogenere)	Canale ROX™ (gene E)	Canale Cy5 (gene S)	Canale VIC™ (IC)
BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 (wild type)	+	+	+
2019-nCoV/Italy-INMI1 (wild type)	+	+	+
Alfa (B.1.1.7)	+	+	+
Beta (B.1.351)	+	+	+
Delta (B.1.617.2)	+	+	+
Gamma (P.1)	+	+	+

**Tab. 14:** Inclusività [analisi *in silico* per 2.993.884 sequenze di genoma intero di SARS-CoV-2 pubblicate in GISAID e.V. ([www.gisaid.org](http://www.gisaid.org)) alla data 10 ottobre 2021 e 518.615 sequenze di genoma intero pubblicate nel National Center for Biotechnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) alla data del 10 ottobre 2021 per gene E e gene S target: FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5].

3.512.499 sequenze di genoma intero		Sequenze che presentano il 100% di omologia	Sequenze che presentano mismatch (numero di mismatch)
Gene E	Forward primer	3.505.942	6.549 (1) 8 (2)
	Reverse primer	3.509.461	3.032 (1) 5 (2) 1 (3)**
	Sonda	3.510.308	2.183 (1) 4 (2)
Gene S	Forward primer	3.491.594	20.728 (1) 160 (2)
	Reverse primer	3.490.361	22.061 (1) 77 (2)
	Sonda	3.498.798	13.653 (1) 44 (2) 3 (3) 1 (4)*

\* La sequenza (ID di accesso EPI\_ISL\_415593, GISAID) presentava 4 mismatch nel sito di legame della sonda per il gene S. Questa sequenza è stata pubblicata il 10 marzo 2020 ed è originaria di Washington, Stati Uniti. Da allora, nessuna delle sequenze pubblicate ha presentato un numero così alto di mismatch. La sequenza è stata commentata dagli autori nel modo seguente: "Attenzione. La presenza di alcuni segmenti di NNN (1,74% della sequenza complessiva) indica una qualità non ideale del sequenziamento; di conseguenza non è stato studiato l'impatto degli oligonucleotidi specifici del gene S.

\*\*La sequenza (accesso MW584978.1) presentava 3 mismatch nel sito di legame del reverse primer per il gene E. Il campione è stato raccolto il 3 aprile 2020 e pubblicato a febbraio 2021 ed è originario di Cleveland, Stati Uniti. Da allora, nessuna delle sequenze pubblicate ha presentato un numero così alto di mismatch.

In base alla posizione, è estremamente improbabile che gli eventi di mutazione che portano a  $\leq 2$  mismatch in un'unica sequenza di oligonucleotidi abbiano un impatto negativo significativo sulle prestazioni del test. Tutte le sequenze simili ( $\leq 2$  mismatch) analizzate per via umida in esperimenti di laboratorio per scopi di sorveglianza post-market dei kit RealStar®, FlexStar® e AltoStar® per il rilevamento di SARS-CoV-2 hanno finora confermato che le prestazioni non sono state compromesse 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 nei kit RealStar®, FlexStar® e AltoStar® per il rilevamento del SARS-CoV-2 ne sia compromessa.

**Tab. 15:** Ceppi di influenzavirus A e B analizzati

Sottotipo/ceppo	Canale FAM™ (influenzavirus A e B)	Canale VIC™ (IC)
Influenzavirus A, sottotipo H1N1 (New Caledonia/20/98)	+	+
Influenzavirus A, sottotipo H1N1pdm09 (A/NY/02/2009)	+	+
Influenzavirus A, sottotipo A/H3N2 variante drift (A/Sachsen/2/2015)	+	+
Influenzavirus A, sottotipo H5N1 (A/Anhui/1/05)	+	+
Influenzavirus B (B/Colorado/6/2017, sottogenere B-Victoria)	+	+
Influenzavirus B (B/Phuket/3073/2013, B/Yamagata sottogenere 16/88)	+	+

### 12.1.4 Precisione

La precisione del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è stata valutata utilizzando un pannello costituito da:

- 1 campione fortemente positivo per SARS-CoV-2 [50 x LoD (1,00E+04 UI/ml)] in UTM® contenente matrice nasale simulata
- 1 campione fortemente positivo per influenzavirus A [50 x LoD (1,70E+04 copie/ml)] in UTM® contenente matrice nasale simulata
- 1 campione fortemente positivo per influenzavirus B [50 x LoD (2,16E+04 copie/ml)] in UTM® contenente matrice nasale simulata
- 1 campione debolmente positivo per SARS-CoV-2 [3 x LoD (6,03E+02 UI/ml)] in UTM® contenente matrice nasale simulata
- 1 campione debolmente positivo per influenzavirus A [3 x LoD (1,02E+03 copie/ml)] in UTM® contenente matrice nasale simulata
- 1 campione debolmente positivo per influenzavirus B [3 x LoD (1,29E+03 copie/ml)] in UTM® contenente matrice nasale simulata
- 1 campione negativo per SARS-CoV-2, influenzavirus A e influenzavirus B (UTM® contenente matrice nasale simulata)

Ogni membro del pannello è stato testato in almeno 6 replicati per processo.

Sono stati effettuati 5 test in 5 giorni diversi utilizzando combinazioni di:

- 3 lotti di FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5
- 3 lotti di FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5
- 3 lotti di kit AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lotti di AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 strumenti AltoStar® AM16
- 3 strumenti CFX96™ DW Dx

La ripetibilità (variabilità intra-test), la variabilità inter-lotto e la riproducibilità (variabilità totale) sono state determinate in base a quanto segue:

- Valori di ciclo soglia ( $C_q^*$ ) per campioni fortemente positivi per SARS-CoV-2, influenzavirus A e influenzavirus B (vedere tabelle 16 e 17)
- Valori di ciclo soglia ( $C_q^*$ ) per l'IC in campioni negativi per SARS-CoV-2, influenzavirus A e influenzavirus B (vedere tabella 18)

\* Notare che il termine  $C_q$  selezionato è equivalente alla designazione di  $C_t$ , che potrebbe essere utilizzato da altri termociclatori diversi da CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

**Tab. 16:** Dati di precisione [CV % (valori  $C_q$ )] per campioni fortemente positivi per SARS-CoV-2

	Campione fortemente positivo per SARS-CoV-2 ( $C_q$ nel canale ROX™, gene E target)	Campione fortemente positivo per SARS-CoV-2 ( $C_q$ nel canale Cy5, gene S target)
Variabilità intra-test	0,21-0,42	0,44-0,60
Variabilità inter-lotto	0,59	0,52
Variabilità totale	0,89	0,63

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

**Tab. 17:** Dati di precisione [CV % (valori  $C_q$ )] per campioni fortemente positivi per influenzavirus A e influenzavirus B

	Campione fortemente positivo per influenzavirus A ( $C_q$ nel canale FAM™)	Campione fortemente positivo per influenzavirus B ( $C_q$ nel canale FAM™)
Variabilità intra-test	0,93-1,16	0,52-1,48
Variabilità inter-lotto	1,02	1,02
Variabilità totale	1,48	1,69

Tutti i campioni analizzati a 3 x LoD (campioni debolmente positivi) sono risultati positivi per influenzavirus A e influenzavirus B.

**Tab. 18:** Dati di precisione [CV % (valori  $C_q$ )] per l'IC in campioni negativi per SARS-CoV-2, influenzavirus A e influenzavirus B

	IC
Variabilità intra-test	0,23-0,35
Variabilità inter-lotto	0,38
Variabilità totale	0,74

### 12.1.5 Percentuale totale di guasti

La robustezza del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è stata valutata testando 30 campioni da tamponi respiratori umani negativi per SARS-CoV-2, influenzavirus A e influenzavirus B da singoli donatori con aggiunta di SARS-CoV-2, influenzavirus A e influenzavirus B fino a una concentrazione finale di 3 x LoD (6,03E+02 UI/ml di SARS-CoV-2, 1,02E+03 copie/ml di influenzavirus A e 1,29E+03 copie/ml di influenzavirus B). Tutti i campioni analizzati (30 su 30) sono risultati positivi nei canali di rilevamento fluorescente specifici di SARS-CoV-2 (Cy5 e ROX™) e di influenzavirus A e influenzavirus B (FAM™).

### 12.1.6 Contaminazione da trasferimento

La contaminazione da trasferimento è soprattutto un rischio dipendente dal flusso di lavoro e indipendente dal test PCR utilizzato. Per l'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro) come modello di esempio è stato usato il kit AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Il potenziale di contaminazione crociata da trasferimento da campioni altamente positivi è stato valutato analizzando alternando campioni fortemente positivi (1,00E+07 UI/ml) e campioni negativi a parvovirus B19 (n = 44 ciascuno per processo; 2 processi) con il kit AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Non è stata osservata alcuna contaminazione da trasferimento, cioè tutti i campioni negativi per parvovirus B19 hanno dato un risultato negativo.

### 12.1.7 Prestazioni cliniche

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è stato valutato in uno studio comparativo con il marcato CE *ampli*Cube Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik). Retrospectivamente, 165 campioni da tampone respiratorio umano sono stati testati in parallelo.

Il *ampli*Cube Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) è stato utilizzato in combinazione con il kit MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche) e con lo strumento MagNA Pure 96 Extraction System (Roche).

Il FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è stato usato in combinazione con il kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e l'AltoStar® Internal Control 1.5 su AltoStar® AM16 e CFX96™ DW Dx.

Per l'analisi qualitativa sono stati esclusi tutti i campioni con risultato invalido per uno o entrambi i test.

I risultati per i restanti campioni (164 per SARS-CoV-2 e 152 per gli influenzavirus) sono mostrati rispettivamente nelle tabelle 19 e 20.

**Tab. 19:** Risultati della valutazione della sensibilità e specificità diagnostica per SARS-CoV-2 nei campioni da tamponi respiratori

		<i>ampliCube</i> Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik)	
		POSITIVO	NEGATIVO
FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5	POSITIVO	58	1
	NEGATIVO	0	105

La sensibilità e la specificità diagnostica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 rispetto al test *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) erano rispettivamente del 100% (intervallo di confidenza 93,8%-100%) e del 99,1% (intervallo di confidenza 94,9%-100%).

**Tab. 20:** Risultati della valutazione della sensibilità e specificità diagnostica per influenzavirus nei campioni da tamponi respiratori

		<i>ampliCube</i> Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik)	
		POSITIVO	NEGATIVO
FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5	POSITIVO	37	1
	NEGATIVO	0	114



La sensibilità e la specificità diagnostica del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 rispetto al test *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) erano rispettivamente del 100% (intervallo di confidenza 90,1%-100%) e del 95,3% (intervallo di confidenza 95,3%-100%).

### 13. Smaltimento

Smaltire i rifiuti pericolosi e biologici conformemente alle normative locali e nazionali. I componenti del prodotto residui e i rifiuti non devono essere sversati in fogne, corsi d'acqua o nel terreno.

#### ATTENZIONE



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

#### ATTENZIONE



Lo smaltimento dei rifiuti pericolosi e biologici deve essere conforme alle normative locali e nazionali in modo da evitare la contaminazione ambientale.

### 14. Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione della qualità di Altona Diagnostics GmbH certificato EN ISO 13485, ogni lotto del FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 è testato in base a specifiche prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

## 15. Assistenza tecnica

Per l'assistenza ai clienti, contattare l'assistenza tecnica Altona Diagnostics:

**e-mail:** [support@altona-diagnostics.com](mailto:support@altona-diagnostics.com)

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

### NOTA



In caso di incidenti gravi verificatisi in relazione al prodotto informare Altona Diagnostics e l'autorità nazionale competente.

## 16. Letteratura

- [1] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise e David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10<sup>a</sup> Edizione. ASM Press, 2011.
- [2] Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Terza Edizione. Mosby, 2010.
- [3] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Index of Viruses — Orthomyxovirus (2019). Virus Taxonomy: 2018b Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, visitato il 24 marzo 2020.
- [4] Kawaoka Y, ed. (2006). "Influenza Virology: Current Topics". Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-06-6. <https://www.caister.com/flu>, visitato il 24 marzo 2020.
- [5] Bouvier NM, Palese P (2008). "The biology of influenza viruses". Vaccine. Vol.26, Suppl. 4:D49-D53. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.039. PMID 19230160.
- [6] Richard M, Fouchier RAM (2016) "Influenza A virus transmission via respiratory aerosols or droplets as it relates to pandemic potential". FEMS Microbiology Reviews. Vol.40, edizione 1:68-85. doi:10.1093/femsre/fuv039. PMID 26385895.
- [7] Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Scheda informativa - "Influenza (stagionale)". 18 novembre 2018. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)), visitato il 24 marzo 2020.

## 17. Marchi e brevetti

AltoStar®, FlexStar® (altona Diagnostics); CFX96™ (Bio-Rad); UTM® (Copan); Rotor-Gene® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); FAM™, JOE™, ROX™, VIC™ (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 FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 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.

Non disponibile in tutti i paesi.

© 2022 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

## 18. Spiegazione dei simboli

Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
	Global Trade Item Number
	Codice lotto
	Indice
	Colore del tappo
	Numero di catalogo
	Numero
	Componente
	Istruzioni per l'uso
	Contiene sufficienti per "n" test / reazioni (rxns)
	Limite di temperatura
	Da usare entro
	Fabbricante
	Attenzione
	Numero materiale

Simbolo	Spiegazione
	Versione
	Nota
	Contiene materiale biologico di origine animale

## 19. Cronologia delle revisioni

**Tab. 21:** Cronologia delle revisioni

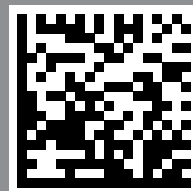
Identificativo	Data di emissione [mese/anno]	Modifiche
MAN-FS0021510-IT-S01	02/2022	Release iniziale



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](mailto:info@altona-diagnostics.com)

**[www.altona-diagnostics.com](http://www.altona-diagnostics.com)**



COV-FlexStar-DM-CE-EN-02\_01/2021