altona DIAGNOSTICS

Istruzioni per l'uso

AltoStar®
Norovirus RT-PCR Kit 1.5

04/2022 IT

AltoStar®

AltoStar®

Norovirus RT-PCR Kit 1.5

Per uso con

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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

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

CE

IVD

REF AS0051543

Σ 96

04 2022

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

MAN-AS0051540-IT-S02

Contenuto

1. Indicazioni sulle istruzioni per l'uso 8

2. Uso previsto 9

3. Contenuto del kit 10

4. Conservazione e manipolazione 11

4.1 Conservazione 11

4.2 Manipolazione 12

4.2.1 Master A e Master B 12

4.2.2 Positive Controls (controlli positivi) e No Template Control (controllo negativo) 13

5. Descrizione del prodotto 13

5.1 Informazioni generali 14

5.2 Descrizione dei componenti 15

5.2.1 Master A e Master B 15

5.2.2 Positive Controls (controlli positivi) 15

5.2.3 No Template Control (controllo negativo) 15

5.3 Flussi di lavoro 15

5.3.1 AltoStar® Workflow (flusso di lavoro) 15

5.3.2 Altri flussi di lavoro 16

5.3.2.1 Estrazione degli acidi nucleici 16

5.3.2.2 Strumenti PCR in tempo reale 17

5.4 Campioni 17

5.4.1 Tipi di campioni 17

5.4.2 Raccolta e manipolazione del campione 18

6. Avvertenze, precauzioni e limitazioni 19

7. Utilizzo del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 con l'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro) 21
7.1 Volume del campione 21
7.2 Provette del campione 21
7.3 Codici a barre del campione 22
7.4 Materiale e dispositivi richiesti e non forniti per l'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro) 22
7.5 Materiali e dispositivi generali 23
7.6 Procedura 24
7.6.1 Panoramica dell'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro) 24
7.6.2 Programmazione di un AltoStar® run (processo) 30
7.6.3 Avvio di un processo di preparazione PCR 31
7.6.3.1 Preparazione dei reagenti per un processo di preparazione PCR 32
7.6.3.2 Caricamento dell'AltoStar® AM16 per un processo di preparazione PCR 32
7.6.3.3 Durante il processo di preparazione PCR 36
7.6.4 Fine del processo di preparazione PCR 36
7.6.4.1 Risultati del processo di preparazione PCR 37
7.6.5 Sigillatura della piastra di PCR 39
7.6.5.1 Stabilità della miscela PCR 40
7.6.6 Avvio di un processo PCR 41
7.6.6.1 Durante il processo PCR 42
7.6.6.2 Assegnazione test a gruppi pozzetto 42
7.6.7 Analisi dei dati PCR 45
7.6.7.1 Correzione basale 47
7.6.7.2 Esclusione dei segnali PCR irregolari 49
7.6.7.3 Impostazione delle soglie 53
7.6.8 Validità dei risultati PCR 57

7.6.8.1 Esclusione dei pozzetti contenenti dati invalidi 57
7.6.8.2 Validità di un processo PCR diagnostico..... 60
7.6.8.3 Validità dei risultati per un campione..... 60
7.6.9 Esportazione dei risultati della PCR per l'interpretazione automatizzata dei risultati 61
7.6.10 Esportazione dei risultati della PCR per l'interpretazione manuale dei risultati 62
7.6.10.1 Interpretazione manuale dei risultati 64

8. Utilizzo di AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 con strumenti PCR in tempo reale diversi da CFX96™ Deep Well Dx System..... 66
8.1 Materiale e dispositivi richiesti e non forniti 66
8.2 Procedura 67
8.2.1 Preparazione del campione..... 67
8.2.2 Preparazione della master mix 68
8.2.3 Preparazione della reazione..... 69
8.2.4 Processo PCR 70
8.2.4.1 Programmazione dello strumento PCR in tempo reale 70
8.2.4.2 Impostazioni di processo..... 70
8.2.5 Analisi dei dati 72

9. Dati sulle prestazioni 73
9.1 Feci..... 73
9.1.1 Sensibilità analitica 73
9.1.2 Specificità analitica 75
9.1.2.1 Campioni negativi..... 76
9.1.2.2 Sostanze interferenti 76
9.1.2.3 Reattività crociata..... 77
9.1.3 Precisione..... 78
9.1.4 Percentuale totale di guasti 80
9.1.5 Contaminazione da trasferimento..... 80

9.1.6 Prestazioni cliniche 80

10. Smaltimento 82

11. Controllo di qualità 82

12. Assistenza tecnica 83

13. Letteratura 83

14. Marchi e brevetti 84

15. Simboli 85

16. Protocollo di test per l'AltoStar® Connect software e informazioni per l'integrazione LIMS 87

17. Cronologia delle revisioni 89

1. Indicazioni sulle istruzioni per l'uso

Queste istruzioni per l'uso guidano l'utente nell'utilizzo del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5. I capitoli 1-6 e 9-14 contengono informazioni e istruzioni generali che si applicano ad ogni flusso di lavoro utilizzato con il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5. Il capitolo 7 fornisce istruzioni su come utilizzare l'AltoStar® Automation System AM16 (sistema di automazione) (Hamilton; in seguito indicato come AltoStar® AM16) con l'AltoStar® Connect software (Versione 1.7.4 o superiore, Hamilton) per la preparazione automatizzata della PCR e sul sistema CFX96™ Deep Well Dx System* (Bio-Rad, in seguito indicato come CFX96™ DW Dx) con il software CFX Manager™ Dx (Versione 3.1, Bio-Rad) per la PCR in tempo reale. Il capitolo 8 fornisce istruzioni su come utilizzare il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 in combinazione con altri metodi di estrazione degli acidi nucleici e strumenti di PCR in tempo reale. Per dettagli sull'uso di AltoStar® AM16, AltoStar® Connect software, kit AltoStar® Purification Kit 1.5, AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno) e CFX96™ DW Dx fare riferimento alle rispettive istruzioni per l'uso elencate di seguito:

- AltoStar® Automation System AM16 Manuale d'uso DIV (Hamilton)
- AltoStar® Connect Software Manuale DIV (Hamilton)
- Istruzioni per l'uso AltoStar® Purification Kit 1.5
- Istruzioni per l'uso AltoStar® Internal Control 1.5
- Sistemi CFX96™ Dx e CFX96™ Deep Well Dx Manuale operativo (Bio-Rad)

* "CFX96™ Deep Well Dx System" è il nuovo marchio della versione DIV del sistema di rilevamento CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (sistema di rilevamento) (Bio-Rad).

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 kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 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 norovirus di genogruppo I (GI) e II (GII) in campioni di feci umane. È destinato a essere utilizzato come aiuto per la diagnosi di un'infezione da norovirus.

I risultati generati con il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 devono essere interpretati in associazione ad altri risultati clinici e di laboratorio.

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 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 kit

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 contiene i seguenti componenti:

Tab. 1: Componenti del kit

Colore tappo	Componente	Numero di fiale	Volume nominale [µl/fiala]
Blu	Master A[1)]	8	60[2)]
Viola	Master B[1)]	8	180[3)]
Rosso	PC Norovirus GI[4)]	2	250
Arancione	PC Norovirus GII[4)]	2	250
Bianco	NTC[5)]	2	250

[1)] Contiene materiale biologico di origine animale

[2)] Contiene un volume aggiuntivo di 25 µl per compensare il volume morto necessario per l'automazione su AltoStar® AM16

[3)] Contiene un volume aggiuntivo di 55 µl per compensare il volume morto necessario per l'automazione su AltoStar® AM16

[4)] Controllo positivo, rispettivamente Norovirus GI e GII

[5)] 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.

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 contiene reagenti sufficienti per eseguire 96 reazioni in un massimo di 8 sedute.

Il prodotto viene spedito in ghiaccio secco. Una volta ricevuto e prima del primo utilizzo, controllare il prodotto e i suoi componenti per:

- Integrità
- Completezza rispetto a numero, tipo e riempimento
- Etichettamento corretto
- Data di scadenza
- Stato di congelamento
- Trasparenza e assenza di particolato

Se uno o più componenti del prodotto non sono congelati al momento della ricezione o se ci sono provette mancanti o danneggiate durante la spedizione, contattare l'assistenza tecnica di altona Diagnostics GmbH per assistenza (vedere capitolo 12. Assistenza tecnica).

4. Conservazione e manipolazione

Tutti i reagenti inclusi nel kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 sono soluzioni pronte all'uso.

4.1 Conservazione

Tutti i componenti del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 devono essere conservati tra -25°C e -15°C all'arrivo.

ATTENZIONE

Condizioni di conservazione errate possono compromettere le prestazioni del prodotto.

ATTENZIONE

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

4.2 Manipolazione

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

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 kit diversi. L'uso di lotti diversi dei kit potrebbe compromettere le prestazioni del prodotto.

4.2.1 Master A e Master B

Dopo lo scongelamento, Master A e Master B sono stabili per 5 ore a temperature fino a +30°C.

NOTA

Se Master A e Master B sono stati scongelati ma non usati, possono essere nuovamente congelati e scongelati una volta per successive sedute. Se aperti, eliminare i tappi e usare nuovi tappi per evitare la contaminazione dei reagenti.

4.2.2 Positive Controls (controlli positivi) e No Template Control (controllo negativo)

1. Dopo lo scongelamento, Positive Controls (PC, controlli positivi) e No Template Control (NTC, controllo negativo) sono stabili per 5 ore fino a +30°C.
2. Eliminare i tappi delle provette PC e NTC a ogni utilizzo e usare nuovi coperchi per evitare la contaminazione dei reagenti.
3. Dopo l'uso chiudere le provette di PC e NTC con tappi nuovi e congelarle immediatamente.
4. Non superare le seguenti sequenze di scongelamento-congelamento per ciascuna provetta di PC e NTC: *Scongelamento 1 → Congelamento 1 → Scongelamento 2 → Congelamento 2 → Scongelamento 3 → Congelamento 3 → Scongelamento 4*

5. Descrizione del prodotto

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 è un test diagnostico *in vitro* per il rilevamento qualitativo e la differenziazione di RNA specifico di norovirus GI e norovirus GII in campioni di feci umane.

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 norovirus GI e norovirus GII e sonde target specifiche marcate con un colorante fluorescente per la rilevazione del DNA amplificato.

Oltre al sistema di amplificazione e rilevamento di RNA specifico di norovirus GI e norovirus GII il test include oligonucleotidi per l'amplificazione e il rilevamento del controllo interno [in seguito indicato come IC; AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno)].

Le sonde specifiche per l'RNA di norovirus GI sono marcate con il fluoroforo Cy5 e le sonde specifiche per RNA di norovirus GII sono marcate con il fluoroforo FAM™. La sonda specifica per l'IC è marcata con un fluoroforo (JOE™) rilevabile, per es., nel canale VIC™.

L'uso di sonde collegate a coloranti distinguibili consente il rilevamento in parallelo di RNA specifico di norovirus GI e norovirus GII, nonché il rilevamento dell'IC nei corrispondenti canali di rilevamento dello strumento PCR in tempo reale.

5.1 Informazioni generali

Il genere *Norovirus* (Norovirus) appartiene alla famiglia dei *Caliciviridae* ed era già noto con il nome di *virus di Norwalk*. I Norovirus sono virus a RNA monofilamento, scoperti nel 1972 grazie al microscopio elettronico, e sono caratterizzati da un'elevata variabilità genomica. I Norovirus sono stati classificati in dieci genogruppi (da GI a GX) sulla base della sequenza confrontando le regioni di RNA polimerasi e capside del genoma. I genogruppi I, II e IV sono associati a infezioni nell'essere umano. A oggi, i genogruppi GI e GII sono quelli clinicamente più rilevanti e sono suddivisi rispettivamente in almeno 9 e 27 genotipi.

I Norovirus sono responsabili della maggior parte delle gastroenteriti acute non batteriche dell'essere umano nei paesi industrializzati. I sintomi del virus, vomito e diarrea, si presentano dopo un breve tempo di incubazione che va da 8 a 72 ore. I Norovirus sono altamente infettivi.

Infezioni con Norovirus possono essere causate da cibo e/o acqua potabile contaminati o dalla trasmissione virale da persona a persona. Il Norovirus può causare ampi scoppi epidemici nelle situazioni di stretto contatto umano come ospedali, case di riposo, crociere, ecc.

In anni recenti è stato riferito un aumento sostanziale delle epidemie da norovirus in Europa occidentale. Per impedire l'ulteriore diffusione dell'agente causativo durante un'epidemia, è necessaria l'applicazione immediata di misure igieniche e sistemi diagnostici rapidi e sensibili. Dato che il norovirus appartenente ai genogruppi I e II è difficile da coltivare in coltura cellulare, e dato che gli immunodosaggi enzimatici non si sono rivelati abbastanza sensibili e/o specifici, la RT-PCR è attualmente il metodo prescelto per la diagnosi delle infezioni da norovirus [1,2,3].

5.2 Descrizione dei componenti

5.2.1 Master A e Master B

Master A e Master B contengono tutti i componenti (tampone per PCR, transcrittasi inversa, DNA polimerasi, sale di magnesio, primer e sonde) per consentire la trascrizione inversa, oltre all'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento target e la differenziazione di RNA specifico di norovirus GI e norovirus GII e dell'IC in una singola reazione.

5.2.2 Positive Controls (controlli positivi)

I PC contengono concentrazioni standardizzate di RNA specifico di norovirus GI e norovirus GII. Sono usati per verificare la funzionalità dei sistemi di amplificazione e rilevamento di RNA specifico di norovirus GI e norovirus GII inclusi nel kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5.

5.2.3 No Template Control (controllo negativo)

L'NTC non contiene RNA specifico di norovirus GI e di norovirus GII ma contiene il template dell'IC. L'NTC viene usato come controllo negativo dell'RNA specifico di norovirus GI e di norovirus GII per la RT-PCR in tempo reale e indica la possibile contaminazione di Master A e Master B.

5.3 Flussi di lavoro

5.3.1 AltoStar® Workflow (flusso di lavoro)

L'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro) include i prodotti DIV che seguono:

- AltoStar® Automation System AM16 (sistema di automazione) (Hamilton)
- AltoStar® Connect software versione 1.7.4 o superiore (Hamilton)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad) con CFX Manager™ Dx software versione 3.1 (Bio-Rad)

Il flusso di lavaro include i passi che seguono:

1. Programmazione di un AltoStar® run (processo).
2. Processo di purificazione sull'AltoStar® AM16 utilizzando il kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e l'AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno).
3. Processo di preparazione RT-PCR sull'AltoStar® AM16 utilizzando il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5.
4. Processo RT-PCR in tempo reale su un CFX96™ DW Dx.

Per ulteriori dettagli sui passi 3 e 4 del flusso di lavoro, fare riferimento al capitolo 7. Utilizzo del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 con l'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro). Tutti i tipi di campione e i volumi di campione specificati per l'uso con il kit AltoStar® Purification Kit 1.5 possono essere elaborati simultaneamente sull'AltoStar® AM16. Ogni campione può essere analizzato con tanti test PCR in tempo reale in parallelo quanti ne vengono permessi dall'eluato disponibile.

NOTA

I test con profili di temperatura PCR differenti vengono automaticamente smistati a piastre di PCR diverse.

5.3.2 Altri flussi di lavoro

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 può essere utilizzato con flussi di lavoro compatibili (manuali o automatizzati). Gli strumenti PCR in tempo reale validati per l'uso con il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 sono elencati nel capitolo 5.3.2.2 Strumenti PCR in tempo reale. L'uso di procedure di estrazione alternative deve essere validato dall'utente.

5.3.2.1 Estrazione degli acidi nucleici

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 può essere utilizzato con sistemi di estrazione degli acidi nucleici diversi da AltoStar® AM16. L'uso di procedure alternative per l'estrazione degli acidi nucleici deve essere validato dall'utente. Fare riferimento al capitolo 8.2.1 Preparazione del campione per istruzioni su come utilizzare l'AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno) in combinazione con altri metodi di estrazione diversi dal kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

5.3.2.2 Strumenti PCR in tempo reale

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 è stato sviluppato e validato con i seguenti strumenti PCR in tempo reale:

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

Se si utilizza uno degli strumenti PCR in tempo reale elencati sopra (eccetto il CFX96™ Deep Well Dx System), la preparazione PCR, la programmazione dello strumento e l'analisi dei dati devono essere eseguiti manualmente (per maggiori dettagli vedere i capitoli da 8.2.2 Preparazione della master mix a 8.2.5 Analisi dei dati).

5.4 Campioni

5.4.1 Tipi di campioni

Il tipo di campione che segue è validato per l'uso con il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5:

- Feci umane

ATTENZIONE

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

5.4.2 Raccolta e manipolazione del campione

Prima dell'uso, i campioni di sospensione fecale non devono essere conservati per più di 48 ore a temperatura ambiente (+20°C a +25°C), 72 ore a +2°C a +8°C o 7 giorni 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

I campioni devono essere privi di solidi e componenti ad alta viscosità. I solidi e i componenti ad alta viscosità interferiscono con il trasferimento del campione sull'AltoStar® AM16 e i campioni non vengono quindi elaborati.

6. 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 usare i prodotti oltre la data di scadenza. L'uso di prodotti scaduti potrebbe 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.
- 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 kit diversi. L'uso di lotti di kit diversi 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.
- 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.
- Errate condizioni di conservazione degli eluati possono causare la degradazione della sequenza target di norovirus GI e/o di norovirus GII e compromettere le prestazioni del prodotto.

- Non utilizzare nessuna versione del protocollo di test diversa da quella indicata nel codice a barre 2D di queste istruzioni per l'uso. L'uso di una versione errata del protocollo di test potrebbe 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.
- Per evitare la contaminazione dei reagenti non riutilizzare i tappi delle provette, 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.
- La presenza di inibitori della PCR potrebbe causare risultati falsi negativi o invalidi.
- Non utilizzare volumi diversi di Master A e Master B per la preparazione della master mix rispetto a quanto specificato in queste istruzioni per l'uso, in quanto le prestazioni del prodotto potrebbero risultare compromesse.
- Non superare la durata di conservazione della miscela PCR, in quanto le prestazioni del prodotto potrebbero risultare compromesse.
- Non mescolare i campioni o gli ID dei campioni durante la preparazione PCR o il trasferimento nello strumento PCR. Questo potrebbe portare a risultati falsi positivi o falsi negativi a causa di un'errata assegnazione dei campioni.
- Non utilizzare condizioni di cycling diverse da quelle specificate in queste istruzioni per l'uso, in quanto le prestazioni del prodotto potrebbero risultare compromesse.
- Non utilizzare impostazioni di controllo diverse da quanto specificato in queste istruzioni per l'uso per l'analisi dei dati, in quanto potrebbero causare risultati dell'esame DIV errati.
- Nel caso in cui il campione contenga altri patogeni diversi da norovirus GI e/o norovirus GII potrebbe presentarsi una competizione con l'amplificazione del target o reattività crociata, con conseguenti risultati errati dell'esame DIV.
- Lo smaltimento dei rifiuti pericolosi e biologici deve essere conforme alle normative locali e nazionali in modo da evitare la contaminazione ambientale.
- Le potenziali mutazioni all'interno delle regioni target del genoma norovirus GI e/o norovirus GII coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare il mancato rilevamento della presenza dei patogeni.

7. Utilizzo del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 con l'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro)

La parte che segue di queste istruzioni per l'uso descrive l'utilizzo del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 in combinazione con l'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro). L'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro) comprende diversi prodotti DIV [AltoStar® AM16, AltoStar® Connect software, AltoStar® Purification Kit 1.5, AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno) e CFX96™ DW Dx]. L'uso di tali prodotti è descritto dettagliatamente nelle rispettive istruzioni per l'uso.

- AltoStar® Automation System AM16 Manuale d'uso DIV (Hamilton)
- AltoStar® Connect Software Manuale DIV (Hamilton)
- Istruzioni per l'uso AltoStar® Purification Kit 1.5
- Istruzioni per l'uso AltoStar® Internal Control 1.5
- Sistemi CFX96™ Dx e CFX96™ Deep Well Dx Manuale operativo (Bio-Rad)

7.1 Volume del campione

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 è validato per le purificazioni di acidi nucleici da un volume del campione di 500 µl quando si usa l'AltoStar® AM16. È necessario fornire un volume del campione aggiuntivo per tener conto del volume morto della provetta del campione usata (vedere capitolo 7.2 Provette del campione).

7.2 Provette del campione

Le provette del campione adatte per essere usate con l'AltoStar® AM16 possono essere acquistate da altona Diagnostics (provetta da 7 ml con tappo, 82 x 13 mm, VK000010). L'utente può testare altre provette del campione per l'applicazione con il dispositivo. Per maggiori dettagli, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.3 Codici a barre del campione

Per l'identificazione automatizzata dei campioni con l'AltoStar® AM16 tutte le provette dei campioni devono essere etichettate con un codice a barre adatto. Per maggiori dettagli, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.4 Materiale e dispositivi richiesti e non forniti per l'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro)

I materiali e dispositivi mostrati nella tabella 2 devono essere ordinati da altona Diagnostics.

Tab. 2: Materiali e dispositivi richiesti

Materiale	Descrizione	N° ordine
AltoStar® Molecular Diagnostic Workflow	Bundle di prodotti contenente AltoStar® Automation System AM16 (sistema di automazione), AltoStar® Connect software (versione 1.7.4 o superiore) e hardware IT	AM16
AltoStar® Detection	Bundle di prodotti contenente CFX96™ Deep Well Dx System con software CFX Manager™ Dx (versione 3.1), uno scanner di codici a barre e hardware IT	DT16
AltoStar® Purification Kit 1.5	Chimica per l'isolamento e la purificazione degli acidi nucleici per l'uso con AltoStar® Automation System AM16 (sistema di automazione)	PK15-16/ PK15-46
AltoStar® Internal Control 1.5	Controllo di estrazione degli acidi nucleici e amplificazione per PCR	IC15-16/ IC15-46
PCR Plate	Piastra multiwell da 96 pozzetti, semibordata, con codice a barre, con pozzetti bianchi	VK000005
PCR Plate Sealing Foil	Pellicola di sigillatura per piastra di PCR	VK000006
1,000 µl CO-RE Tips	Puntali con filtro da 1.000 µl per l'uso con AltoStar® Automation System AM16 (sistema di automazione)	VK000007

Materiale	Descrizione	N° ordine
300 µl CO-RE Tips	Puntali con filtro da 300 µl per l'uso con AltoStar® Automation System AM16 (sistema di automazione)	VK000008
Pooling Tube	Provetta con codice a barre per miscela dei reagenti PCR	VK000002
Waste Bag	Sacca sterile autoclavabile per l'uso con AltoStar® Automation System AM16 (sistema di automazione)	VK000009
Screw Cap - red	Tappo a vite per provette PC Norovirus GI (rosso)	VK000012
Screw Cap - orange	Tappo a vite per provette PC Norovirus GII (arancione)	VK000014
Screw Cap - blue	Tappo a vite per provette Master A (blu)	VK000013
Screw Cap - purple	Tappo a vite per provette Master B (viola)	VK000015
Screw Cap - white	Tappo a vite per provette NTC (bianco)	VK000016

Tab. 3: Ulteriori materiali e dispositivi di laboratorio

Materiale	Descrizione	N° ordine
Sigillatore per piastre	per es. AltoStar® Plate Sealer (sigillatore per piastre)	VK000023
	per es. PX1 Plate Sealer (Bio-Rad)	VK000033

7.5 Materiali e dispositivi generali

- Vortex mixer
- Guanti senza polvere (monouso)
- Centrifuga per centrifugazione dei componenti del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5
- Centrifuga per centrifugazione delle piastre di PCR
- Soluzione di cloruro di sodio allo 0,9 %

7.6 Procedura

7.6.1 Panoramica dell'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro)

Le fasi dell'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro) completo sono riassunte nella tabella 4. Le informazioni sulle impostazioni specifiche da utilizzare con il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 sono riportate nel capitolo 7.6.2 Programmazione di un AltoStar® run (processo). Per istruzioni dettagliate sui passi 1-5 fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit AltoStar® Purification Kit 1.5, dell'AltoStar® Connect software e dello strumento AltoStar® AM16.

I passi 6-11 sono descritti più dettagliatamente nei capitoli da 7.6.3 Avvio di un processo di preparazione PCR a 7.6.10 Esportazione dei risultati della PCR per l'interpretazione manuale dei risultati.

Tab. 4: Panoramica dell'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro)

Passo	Azione
1. Avviare l'AltoStar® AM16	• Accendere l'AltoStar® AM16. • Accendere il computer e il monitor. • Avviare il AltoStar® Connect software.
2. Effettuare la manutenzione	• Nella barra dei menu fare clic su **Application** → **Instrument Maintenance** (Applicazione → Manutenzione dello strumento). ◦ Se si deve effettuare la Manutenzione settimanale, fare clic su **Start Weekly Maintenance** (Avvia manutenzione settimanale). ◦ Se si deve effettuare la Manutenzione giornaliera, fare clic su **Start Daily Maintenance** (Avvia manutenzione giornaliera). • Seguire le istruzioni su schermo per il processo di manutenzione.

Passo	Azione
3. Programmare un AltoStar® run (processo)	• Nella barra dei menu fare clic su **Program Run** → **Program Run** (**AltoStar® Purification**) [Programmazione processo → Programmazione processo (Purificazione AltoStar®)]. In alternativa, tornare allo Schermo di Avvio e fare clic sul pulsante **Program Run** (Programmazione processo). • Inserire i campioni o importarli dal LIMS. • Selezionare i test per i campioni, a meno che non siano già stati importati dal LIMS: ◦ AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 • Fare clic sul pulsante **Create Run** (Crea processo) nella barra degli strumenti per creare l'AltoStar® run (processo).

Passo	Azione
4. Avviare un processo di purificazione	• Nella barra dei menu fare clic su **Purification** → **Start Purification** (Purificazione → Avvia purificazione). In alternativa, tornare allo Schermo di Avvio e fare clic sul pulsante **Start Purification** (Avvia purificazione). • Selezionare il processo di purificazione da avviare per mostrare i campioni inclusi nel processo di purificazione selezionato. • Preparare i reagenti di purificazione: ◦ Assicurarsi che i reagenti di purificazione da usare abbiano lo stesso numero di caricamento [tranne l'AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno)] e che non siano scaduti. ◦ Se nel Lysis Buffer (tampone di lisi) sono visibili dei precipitati, scaldarlo (≤ +50°C) fino a che non si dissolvono completamente. ◦ Scongelare completamente l'IC [AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno)] e agitare su vortex per 5 secondi. ◦ Agitare su vortex le Magnetic Beads (microsfere magnetiche) per 5 secondi senza bagnare il coperchio. • Preparare i campioni per il processo di purificazione da avviare come descritto nelle istruzioni per l'uso del kit AltoStar® Purification Kit 1.5. • Fare clic sul pulsante **Start Run** (Avvia processo) nella barra degli strumenti. • Per caricare lo strumento seguire le istruzioni delle finestre di dialogo di carico. • Confermare il messaggio Loading Complete (Caricamento completo) con **OK** o attendere 10 secondi. Il sistema effettuerà ora automaticamente il processo di purificazione.

Passo	Azione
5. Finire il processo di purificazione	• Assicurarsi che il vassoio di caricamento sia vuoto e confermare la finestra di dialogo Run Finished (Processo terminato) con **OK.** • Seguire le istruzioni nella finestra di dialogo Maintenance (Manutenzione) e confermare con **OK**. • Sigillare e conservare i componenti del kit AltoStar® Purification Kit 1.5 che è possibile riutilizzare. Gli eluati nella eluate plate (piastra degli eluati) non sigillata sono stabili a temperatura ambiente (max. +30°C) per un totale di 4 ore. • Se il processo di preparazione PCR associato non viene avviato immediatamente, sigillare la eluate plate (piastra degli eluati) con la Eluate Plate Sealing Foil (pellicola sigillante per piastra degli eluati) e conservare a +2°C a +8°C fino a 24 ore. • Visualizzare i risultati del processo di purificazione per confermare che l'elaborazione di ciascun campione sia stata effettuata con successo.

Passo	Azione
6. Avviare un processo di preparazione PCR	• Nella barra dei menu, fare clic su **PCR Setup** → **Start PCR Setup** (Preparazione PCR → Avvia preparazione PCR). In alternativa, tornare allo Schermo di Avvio e fare clic sul pulsante **Start PCR Setup** (Avvia preparazione PCR). • Selezionare il processo di preparazione PCR da avviare per visualizzare la eluate plate (piastra degli eluati) e i reagenti inclusi nel processo di preparazione PCR selezionato. • Preparare i reagenti PCR: ◦ Assicurarsi che Master e Controlli da usare provengano dallo stesso lotto di kit e non siano scaduti. ◦ Scongelare la quantità richiesta di provette di Master e Controllo, agitare su vortex brevemente e centrifugare. • Se la eluate plate (piastra degli eluati) è sigillata, centrifugarla brevemente e dissigillarla con cura. • Fare clic sul pulsante **Start Run** (Avvia processo) nella barra degli strumenti. • Per caricare lo strumento seguire le istruzioni della finestra di dialogo Loading (Caricamento). • Confermare il messaggio Loading Complete (Caricamento completo) con **OK** o attendere 10 secondi. Il sistema effettuerà ora automaticamente il processo di preparazione PCR.
7. Finire il processo di preparazione PCR	• Assicurarsi che il vassoio di caricamento sia vuoto e confermare la finestra di dialogo Run Finished (Processo terminato) con **OK**. • Seguire le istruzioni nella finestra di dialogo Maintenance (Manutenzione) e confermare con **OK**. • Chiudere e conservare i componenti del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 che è possibile riutilizzare. • Visualizzare i risultati del processo di preparazione PCR per confermare che l'elaborazione di ciascun campione sia stata effettuata con successo.

Passo	Azione
8. Sigillare la piastra di PCR	• Sigillare la piastra di PCR con una PCR Plate Sealing Foil (pellicola sigillante per piastra di PCR).
9. Avviare il processo PCR	• Accendere il CFX96™ DW Dx, il computer e il monitor collegati. • Avviare il software CFX Manager™ Dx. • Aprire il CFX96™ DW Dx. • Centrifugare la piastra di PCR e inserirla nel CFX96™ DW Dx. • Selezionare **File** → **Open** → **LIMS File…** (File → Apri → File LIMS) dalla barra dei menu. • Scansionare il codice a barre della piastra di PCR con lo scanner di codici a barre portatile. • Chiudere il CFX96™ DW Dx. • Fare clic sul pulsante **Start Run** (Avvia processo) per avviare il processo PCR. Assegnare un nome e salvare il file del processo PCR. Il CFX96™ DW Dx effettuerà ora automaticamente il processo PCR.
10. Separare i test per l'analisi individuale	• Separare tutti i test del processo PCR in gruppi pozzetto distinti.
11. Analizzare i dati e interpretare i risultati del processo PCR	Individualmente per ciascun gruppo pozzetto: • Effettuare una correzione basale in tutti i pozzetti per tutti i canali di rilevamento utilizzati. • Escludere i pozzetti con segnali PCR irregolari. • Impostare le soglie di tutti i canali di rilevamento secondo i controlli. • Escludere i pozzetti contenenti dati invalidi. • Generare il file risultati LIMS per l'esportazione dei risultati al LIMS. • Generare il report dei risultati per l'interpretazione manuale dei risultati.

ATTENZIONE

Errate condizioni di conservazione degli eluati possono causare la degradazione della sequenza target di norovirus GI e/o di norovirus GII e compromettere le prestazioni del prodotto.

7.6.2 Programmazione di un AltoStar® run (processo)

Per istruzioni dettagliate sull'avvio di un processo AltoStar®, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit AltoStar® Purification Kit 1.5, dell'AltoStar® Connect software e dello strumento AltoStar® AM16. Le impostazioni specifiche da utilizzare con il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 sono elencate di seguito:

- Sono selezionati PC ed NTC.
- Il volume del campione richiesto è 500 µl più il volume morto per la rispettiva provetta del campione (vedere capitoli 7.1 Volume del campione e 7.2 Provette del campione).
- Il volume di eluato richiesto per l'AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 è di 10 µl.
- Assicurarsi di utilizzare la versione del protocollo di test corretta per il processo. Per informazioni sulla versione del protocollo corrente vedere capitolo 16. Protocollo di test per l'AltoStar® Connect software e informazioni per l'integrazione LIMS. Il rispettivo protocollo di test è codificato nel codice a barre 2D visualizzato in tale posizione. Per informazioni sul protocollo di purificazione e di test da importare nell'AltoStar® Connect software fare riferimento alle rispettive istruzioni per l'uso.

ATTENZIONE

Non utilizzare nessuna versione del protocollo di test diversa da quella indicata nel codice a barre 2D di queste istruzioni per l'uso. L'uso di una versione errata del protocollo di test potrebbe compromettere le prestazioni del prodotto.

7.6.3 Avvio di un processo di preparazione PCR

1. Selezionare **PCR Setup** → **Start PCR Setup** (Preparazione PCR → Avvia preparazione PCR) nella barra dei menu. In alternativa, tornare allo Schermo di Avvio dell'AltoStar® Connect software e selezionare il pulsante **Start PCR Setup** (Avvia preparazione PCR). Viene visualizzata la schermata Start PCR Setup Run (Avvia processo di preparazione PCR).

I processi di preparazione PCR in attesa vengono visualizzati nella tabella Programmed PCR Setup Runs (Processi di preparazione PCR programmati) sulla parte sinistra dello schermo.

2. Selezionare il processo di preparazione PCR da avviare nella tabella Programmed PCR Setup Runs (Processi di preparazione PCR programmati).

   - I campioni inclusi nei processi di preparazione PCR selezionati vengono visualizzati nella tabella sul lato superiore destro della schermata [Samples in selected PCR Setup Run (Campioni nel processo di preparazione PCR selezionato)].
   - I controlli necessari per i processi di preparazione PCR selezionati vengono visualizzati nella tabella sul lato centrale destro della schermata [Controls in selected PCR Setup Run (Controlli nel processo di preparazione PCR selezionato)].
   - Il numero di provette master necessario nei processi di preparazione PCR selezionati viene visualizzato nella tabella sul lato inferiore destro della schermata [Required master tubes for the selected PCR Setup Run (Provette master necessarie per il processo di preparazione PCR selezionato)].

NOTA

Il numero di campioni prioritari in un processo di preparazione PCR viene visualizzato nella colonna **No. of prioritized Samples** (n° di campioni prioritari). Effettuare i processi di preparazione PCR prima con i campioni prioritari in modo da facilitare una elaborazione più rapida dei campioni prioritari.

Prima di fare clic sul pulsante **Start Run** (Avvia processo) nella barra degli strumenti, preparare i reagenti necessari come descritto nel capitolo 7.6.3.1 Preparazione dei reagenti per un processo di preparazione PCR. Se la eluate plate (piastra degli eluati) richiesta per il processo di preparazione PCR selezionato è stata sigillata per la conservazione, prepararla come descritto nelle istruzioni per l'uso del kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

7.6.3.1 Preparazione dei reagenti per un processo di preparazione PCR

1. Scongelare completamente controlli richiesti e numero richiesto di provette Master a temperatura ambiente (max. +30°C).
2. Miscelare i reagenti agitando su vortex con delicatezza.
3. Centrifugare brevemente le provette per rimuovere le gocce dal coperchio.

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.

7.6.3.2 Caricamento dell'AltoStar® AM16 per un processo di preparazione PCR

Per informazioni dettagliate sul processo di caricamento fare riferimento alle istruzioni per l'uso dell'AltoStar® AM16 e dell'AltoStar® Connect software.

1. Fare clic sul pulsante **Start Run** (Avvia processo) nella barra degli strumenti della schermata Start PCR Setup Run (Avvia processo di preparazione PCR) per visualizzare la finestra di dialogo Loading (Caricamento).

La finestra di dialogo Loading è costituita da una rappresentazione visiva della piattaforma AltoStar® AM16 in alto e da una tabella che specifica carrier, rispettivi binari sulla piattaforma dell'AltoStar® AM16 per ciascun carrier, materiale da caricare su ciascun carrier e commenti relativi al caricamento del carrier.

NOTA

Per visualizzare la posizione di un elemento su un carrier e la posizione del carrier sulla piattaforma dell'AltoStar® AM16, selezionare la riga relativa della tabella nella finestra di dialogo Loading (Caricamento).

Viene visualizzata la posizione dell'elemento e del suo carrier:

- Evidenziato in rosso nella rappresentazione visiva della piattaforma dello strumento
- Sull'AltoStar® AM16 con le spie di caricamento lampeggianti sopra i binari in cui deve essere posizionato il carrier selezionato

2. Caricare il materiale necessario, la eluate plate (piastra degli eluati) preparata e i reagenti preparati sui carrier adatti.

- Scambiare solo rack dei puntali da 1.000 µl **completamente vuoti** con rack dei puntali da 1.000 µl **completamente pieni** sul carrier per puntali.
- Scambiare solo rack dei puntali da 300 µl **completamente vuoti** con rack dei puntali da 300 µl **completamente pieni** sul carrier piastre e puntali.

NOTA

Scambiare rack dei puntali non completamente vuoti e manipolare i singoli puntali potrebbe interferire con la gestione automatica dei puntali e causare interruzioni del processo.

- Porre la eluate plate (piastra degli eluati) richiesta con il pozzetto A1 a sinistra della posizione nera della piastra.
- Porre una piastra di PCR con pozzetto A1 a sinistra della posizione frontale argento della piastra.
- Caricare un carrier da 24 con una provetta di pooling non utilizzata per ciascun test nel processo di preparazione PCR.
- Spingere delicatamente le provette fino in fondo al carrier e farle ruotare fino a che i codici a barre delle provette sono visibili attraverso la finestra del carrier.
- Caricare il carrier per reagenti da 32 con i componenti del test richiesti per il processo di preparazione PCR.
- Spingere delicatamente le provette fino in fondo al carrier e farle ruotare fino a che i codici a barre delle provette sono visibili attraverso la finestra del carrier.

NOTA

La posizione delle singole provette sui supporti è arbitraria.

NOTA

Il volume dei componenti caricati non viene controllato dal sistema prima dell'elaborazione. Un volume dei componenti insufficiente impedirà l'effettuazione con successo della preparazione PCR per il test interessato.

NOTA

Iniziare un processo di preparazione PCR senza rimuovere i coperchi dalle provette potrebbe provocare l'interruzione del processo in corso.

3. Caricare i carrier con il codice a barre verso il retro, a destra.
4. Inserire i carrier pieni nei rispettivi binari tra i blocchi anteriore e posteriore del vassoio di caricamento fino a che non toccano i ganci di arresto sul lato più lontano del vassoio di caricamento.

NOTA

Spingere i supporti oltre i ganci di arresto potrebbe danneggiare lo strumento e interferire con il processo di caricamento.

5. Controllare che la piastra di espulsione puntali e il contenitore di rifiuto dei puntali siano in posizione corretta e che nel contenitore sia stata posta una nuova sacca per rifiuti.
6. Fare clic su **OK** nella finestra di dialogo Loading (Caricamento) per procedere con il processo di caricamento.

NOTA

Facendo clic su **Cancel** (Annulla) il processo di preparazione PCR viene cancellato, ma può essere riavviato (vedere capitolo 7.6.3 Avvio di un processo di preparazione PCR).

L'AltoStar® AM16 carica i carrier nello strumento ed effettua le verifiche dei codici a barre.

NOTA

L'AltoStar® AM16 verifica automaticamente:

- Tipo e posizione corretta dei carrier caricati
- Identità e posizione corretta degli elementi caricati sui carrier
- Congruenza del lotto dei componenti dei singoli kit del test AltoStar®
- Non scadenza di tutti i componenti del test AltoStar® caricati
- Corretto posizionamento della piastra di espulsione puntali

Se uno qualsiasi di questi controlli dà errore, l'utente viene avvisato con una casella di dialogo del messaggio che specifica il problema in corso e le istruzioni per correggerlo di conseguenza. Per maggiori informazioni sulla gestione degli errori, fare riferimento alle istruzioni per l'uso dell'AltoStar® Connect software.

NOTA

Alterare le posizioni di qualsiasi elemento caricato dopo che il carrier è stato caricato nello strumento può causare l'interruzione del processo di preparazione PCR e/o il danneggiamento dello strumento.

Quando tutti i controlli sono stati superati viene visualizzata la finestra di dialogo Loading Complete (Caricamento completo).

7. Confermare la finestra di dialogo Loading Complete (Caricamento completo) facendo clic su **OK** o attendendo per 10 secondi l'avvio automatico del processo.

NOTA

Facendo clic su **Cancel** (Annulla) il processo di preparazione PCR viene cancellato, ma può essere riavviato (vedere capitolo 7.6.3 Avvio di un processo di preparazione PCR).

Il processo di preparazione PCR si avvia e viene effettuato senza intervento dell'utente.

7.6.3.3 Durante il processo di preparazione PCR

Non è necessaria nessuna ulteriore interazione dell'utente fino alla fine del processo di preparazione PCR. Viene visualizzato Processing Status Screen (Schermata processo di purificazione) che mostra lo stato del processo di preparazione PCR e la stima del tempo rimanente.

NOTA

Spingere o tirare i carrier o lo sportello dell'AltoStar® AM16 durante un processo di preparazione PCR potrebbe causare l'interruzione del processo.

7.6.4 Fine del processo di preparazione PCR

Alla fine del processo di preparazione PCR viene visualizzata la finestra di dialogo Run finished (Processo terminato).

1. Assicurarsi che il vassoio di caricamento sia vuoto.
2. Confermare la finestra di dialogo Run finished (Processo terminato) facendo clic su **OK**.

L'AltoStar® AM16 scaricherà i carrier. Assicurarsi di non impedire fisicamente i carrier in fase di scarico.

Dopo lo scarico viene visualizzata la finestra di dialogo Maintenance (Manutenzione).

3. Seguire le istruzioni della finestra di dialogo Maintenance (Manutenzione).

La tabella della finestra di dialogo visualizza il numero di reazioni nelle provette Master che non sono state usate nel processo di preparazione PCR.

4. Se deve essere avviato immediatamente un altro processo di preparazione PCR che usa la eluate plate (piastra degli eluati) attualmente caricata, la eluate plate (piastra degli eluati) può restare non sigillata nella posizione del carrier. Se **non** è così, sigillare e conservare la piastra degli eluati. Per ulteriori informazioni, fare riferimento alle istruzioni per l'uso del kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

NOTA

Gli eluati nella eluate plate (piastra degli eluati) sono stabili a temperatura ambiente (max. +30°C) per un totale di 4 ore dopo il completamento del processo di purificazione.

5. Chiudere le provette di reagente con tappi per provetta nuovi appropriati.

ATTENZIONE

Per evitare la contaminazione dei reagenti non riutilizzare i tappi delle provette, in quanto le prestazioni del prodotto potrebbero risultare compromesse.

6. Conservare i reagenti per il riutilizzo come descritto nel capitolo 4.2 Manipolazione.
7. Smaltire i materiali usati (vedere capitolo 10. Smaltimento).
8. Confermare la finestra di dialogo Maintenance (Manutenzione) facendo clic su **OK**.

7.6.4.1 Risultati del processo di preparazione PCR

I risultati del processo di preparazione PCR sono salvati nell'AltoStar® Connect software.

1. Fare clic su **PCR Setup** → **PCR Setup Results** (Preparazione PCR → Risultati preparazione PCR) nella barra dei menu per accedere alla schermata Results (Risultati).

La schermata Results (Risultati) visualizza una tabella con tutti i campioni utilizzati nell'ultimo processo di preparazione PCR e una colonna **Status** (Stato) a destra che mostra se il processo di preparazione PCR per un dato campione è stato portato a termine completamente (vedere tabella 5).

Tab. 5: Risultati del processo di preparazione PCR

Status (Stato)	Risultato del processo di preparazione PCR
Processed (Elaborato)	• L'eluato è stato elaborato con successo nel processo di preparazione PCR. • La miscela RT-PCR risultante è pronta all'uso in un processo PCR.
Error (Errore)	• L'eluato non è stato elaborato con successo. • La rispettiva miscela RT-PCR sarà automaticamente omessa nell'analisi PCR seguente.

2. Per visualizzare i risultati dei processi di preparazione PCR precedenti, fare clic sul pulsante **Load** (Carica) nella barra dei menu, selezionare il processo di preparazione PCR desiderato dall'elenco nella finestra di dialogo Load Results (Carica risultati) che si apre e fare clic su **OK**.

L'AltoStar® Connect software genera automaticamente 3 file denominati risultato del processo di preparazione PCR:

- Un file LIMS (.xml) che inoltra informazioni dettagliate sul processo di preparazione PCR, compresi i risultati di ritorno al LIMS
- Un report (.pdf) che contiene informazioni dettagliate sul processo di preparazione PCR, compresi i risultati a fini di documentazione
- Un file del termociclatore (.plrn) per la programmazione automatica del CFX96™ DW Dx

Questi file vengono salvati nella posizione specificata nelle System Settings (Impostazioni di sistema) dell'AltoStar® Connect software.

NOTA

i

I file del risultato del processo di preparazione PCR possono essere generati nuovamente caricando il relativo processo di preparazione PCR e facendo clic sul pulsante **Create LIMS File** (Crea file LIMS) per generare il file LIMS, il pulsante **Create Report** (Crea report) per generare il report il pulsante **Create Bio-Rad Cycler File** (Crea file del termociclatore) per generare il file del termociclatore.

7.6.5 Sigillatura della piastra di PCR

Dopo il completamento del processo di preparazione PCR, la piastra di PCR deve essere sigillata con pellicola di sigillatura piastra di PCR. Si raccomanda di utilizzare AltoStar® Plate Sealer (sigillatore per piastre) [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)] o PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad). L'idoneità di sigillatori per piastre diversi da quelli raccomandati deve essere valutata dall'utente.

Se per la sigillatura viene usato uno dei sigillatori per piastre raccomandato, procedere come segue:

1. Accendere il sigillatore per piastre e assicurarsi che l'adattatore per piastre non sia nel cassetto.
2. Assicurarsi che le impostazioni del sigillatore per piastre siano come indicato di seguito:

Tab. 6: Impostazioni del sigillatore per piastre

Sigillatore per piastre	Impostazioni	
	Temperatura [°C]	Tempo [s]
AltoStar® Plate Sealer [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)]	170	2
PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)	175	3

3. Attendere fino al raggiungimento della temperatura impostata. Potrebbe essere necessario attendere qualche minuto.
4. Porre la piastra di PCR sull'adattatore per piastre del sigillatore per piastre.
5. Collocare una PCR Plate Sealing Foil (pellicola sigillante per piastra di PCR) sulla piastra di PCR in modo che la dicitura 'THIS SIDE UP' (questo lato in alto) sia leggibile. Assicurarsi che tutti i pozzetti della piastra di PCR siano coperti con la pellicola e che nessun pozzetto sia oscurato dalla scritta.

NOTA

L'attivazione del sigillatore per piastre senza adattatore per piastre posto nel cassetto potrebbe causare il malfunzionamento del sigillatore. In tal caso, per ricevere assistenza contattare l'assistenza tecnica altona Diagnostics (vedere capitolo 12. Assistenza tecnica).

NOTA

Se la PCR Plate Sealing Foil (pellicola sigillante per piastra di PCR) o il telaio sono posizionati in modo errato, durante la sigillatura la pellicola potrebbe attaccarsi alla piastra di riscaldamento all'interno del sigillatore per piastre. Ciò causerà il malfunzionamento del sigillatore. In questo caso, o se la fase di sigillatura è stata avviata senza la pellicola di sigillatura piastra di PCR, lasciare raffreddare il sigillatore per piastre a temperatura ambiente e contattare l'assistenza tecnica altona Diagnostics per ricevere assistenza (vedere capitolo 12. Assistenza tecnica).

6. Assemblare il telaio di sigillatura sulla parte superiore per tenere ferma in posizione la pellicola di sigillatura.
7. Aprire il cassetto premendo il pulsante **Operate** (Esegui)*/ ⏏**.
8. Porre l'assieme costituito da adattatore per piastre, piastra di PCR, pellicola di sigillatura piastra di PCR e telaio di sigillatura nel sigillatore per piastre e premere il pulsante **Operate** (Esegui)*/ ⏏**.
9. Il cassetto si chiude automaticamente, sigilla per il periodo di tempo impostato e si riapre automaticamente.
10. Estrarre la piastra di PCR sigillata e l'adattatore per piastre dal sigillatore per piastre e chiuderlo premendo il pulsante **Close** (Chiudi)*/ ⏏**.

* AltoStar® Plate Sealer (sigillatore per piastre) [4s3™ Semi-Automatic Sheet Heat Sealer (4titude)]

**PX1 PCR Plate Sealer (Bio-Rad)

7.6.5.1 Stabilità della miscela PCR

Dopo il completamento del processo di preparazione 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.

7.6.6 Avvio di un processo PCR

Il processo PCR viene effettuato su un CFX96™ DW Dx controllato dal software CFX Manager™ Dx.

1. Accendere il CFX96™ DW Dx, il computer e il monitor collegati.
2. Avviare il software CFX Manager™ Dx.
3. Nella barra dei menu del software CFX Manager™ Dx selezionare **File** → **Open** → **LIMS File…** (File → Apri → file LIMS…) per aprire la finestra di dialogo Open LIMS File (Apri file LIMS).
4. Nella finestra di dialogo di apertura Open LIMS File (Apri file LIMS), assicurarsi che il cursore sia posizionato nel campo **File name** (Nome file) in basso. Se non lo è, fare clic nel campo **File name** (Nome file).
5. Scansionare il codice a barre della piastra di PCR con lo scanner di codici a barre portatile per selezionare e aprire automaticamente il file LIMS corretto. Viene visualizzata la finestra di dialogo Run Setup (Impostazioni processo).

NOTA

Tutti i parametri richiesti per l'avvio del processo PCR vengono trasferiti automaticamente dall'AltoStar® Connect software al CFX96™ DW Dx per mezzo del file del termociclatore.

6. Fare clic sul pulsante **Open Lid** (Apri coperchio) nella finestra di dialogo Run Setup (Impostazioni processo) per aprire il coperchio di CFX96™ DW Dx.
7. Centrifugare brevemente la piastra di PCR sigillata per assicurarsi che tutto il liquido sia sul fondo dei pozzetti.
8. Inserire la piastra di PCR sigillata nel blocco di riscaldamento del CFX96™ DW Dx con il pozzetto A1 sul lato sinistro.
9. Chiudere il CFX96™ DW Dx facendo clic sul pulsante **Close Lid** (Chiudi coperchio) nella finestra di dialogo Run Setup (Impostazioni processo).

10. Avviare il processo PCR facendo clic sul pulsante **Start Run** (Avvia processo) nella finestra di dialogo Run Setup (Impostazioni processo).

7.6.6.1 Durante il processo PCR

Non è necessaria nessuna interazione dell'utente fino alla fine del processo PCR. Viene visualizzata la finestra di dialogo Run details (Dettagli processo) che mostra lo stato del processo PCR e la stima del tempo rimanente.

NOTA

Aprendo il coperchio del CFX96™ DW Dx durante un processo PCR per mezzo del pulsante sulla parte frontale del coperchio o facendo clic su **Open Lid** (Apri coperchio) nella finestra di dialogo Run Details (Dettagli processo) si interrompe il processo e si invalidano tutti i risultati.

Al termine del processo PCR viene visualizzata la finestra Data Analysis (Analisi dei dati) che mostra le curve di amplificazione, la disposizione della piastra e i risultati.

7.6.6.2 Assegnazione test a gruppi pozzetto

L'AltoStar® Workflow (flusso di lavoro) elabora uno o più test PCR simultaneamente su una piastra di PCR. Tuttavia, ciascun test deve essere analizzato separatamente dall'utente seguendo le istruzioni per l'uso dei rispettivi test.

A tal fine, tutti i test su una piastra di PCR devono essere assegnati dall'utente a singoli gruppi pozzetto nel software CFX Manager™ Dx.

1. Nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) fare clic sul pulsante **Plate Setup** (Impostazione piastra) nella barra degli strumenti e selezionare **View/Edit Plate** (Visualizza/modifica piastra). Verrà visualizzata la finestra di dialogo Plate editor (Editor piastra) (vedere figura 1).

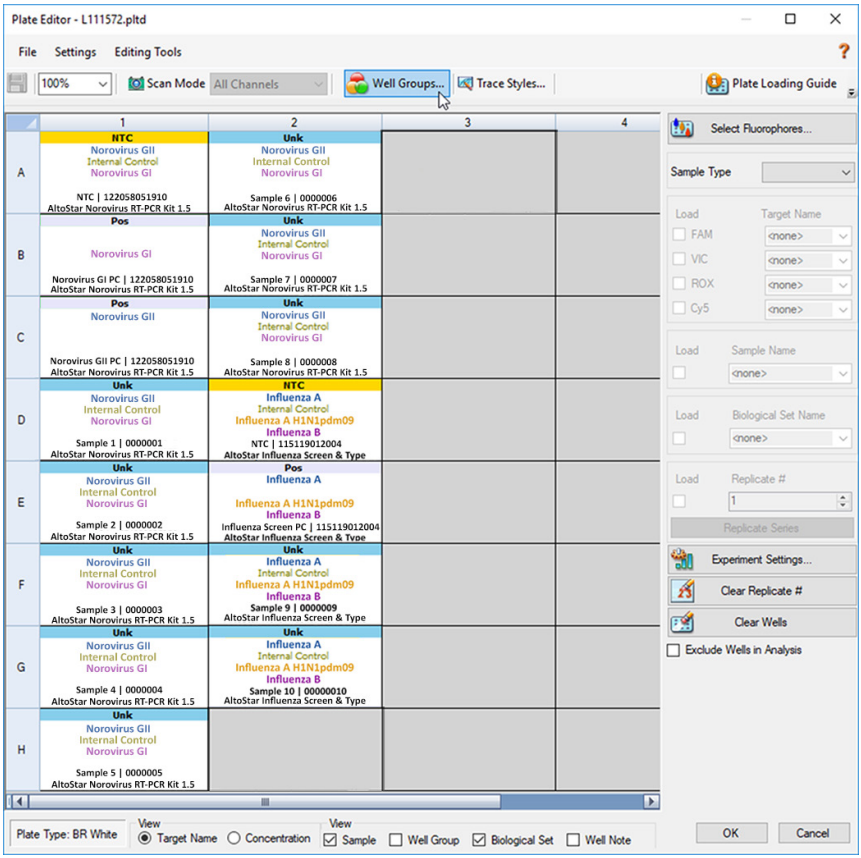

Figura 1: Finestra di dialogo Plate Editor (Editor piastra)

2. Nella finestra di dialogo Plate Editor (Editor piastra) fare clic su **Well Groups**… (Gruppi pozzetto...) nella barra degli strumenti. Verrà visualizzata la finestra di dialogo Well Groups Manager (Manager gruppi pozzetto) (vedere figura 2).
3. Fare clic sul pulsante **Add** (Aggiungi).
4. Immettere nella casella di testo il nome del primo test.

5. Selezionare tutti i pozzetti nell'area della piastra di PCR che appartengono al primo test (vedere figura 2). I pozzetti che appartengono a un singolo test possono essere identificati nella finestra di dialogo Plate Editor (Editor piastra) grazie alla voce immessa nel campo **Biological Set** (Set biologico).

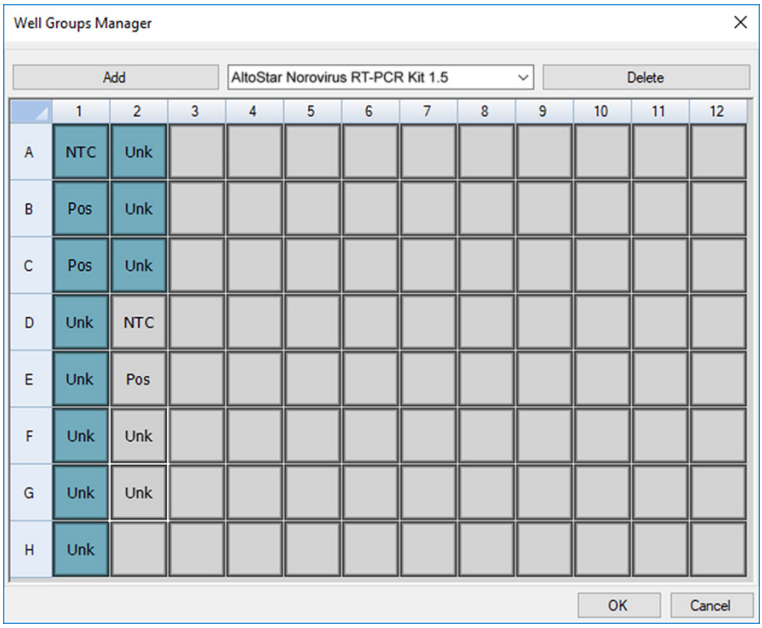

Figura 2: Finestra di dialogo Well Groups Manager (Manager gruppi pozzetto)

6. Ripetere i passi 3-5 per tutti i test sulla piastra di PCR.
7. Confermare l'assegnazione al gruppo pozzetto facendo clic su **OK**. La finestra di dialogo Well Groups Manager (Manager gruppi pozzetto) si chiude.
8. Chiudere la finestra di dialogo Plate Editor (Editor piastra) facendo clic su **OK**.
9. Per applicare le modifiche confermare facendo clic su **Yes** (Sì).

7.6.7 Analisi dei dati PCR

I risultati di tutti i test (gruppi pozzetto) sulla piastra di PCR devono essere analizzati seguendo la sequenza illustrata nella figura 3.

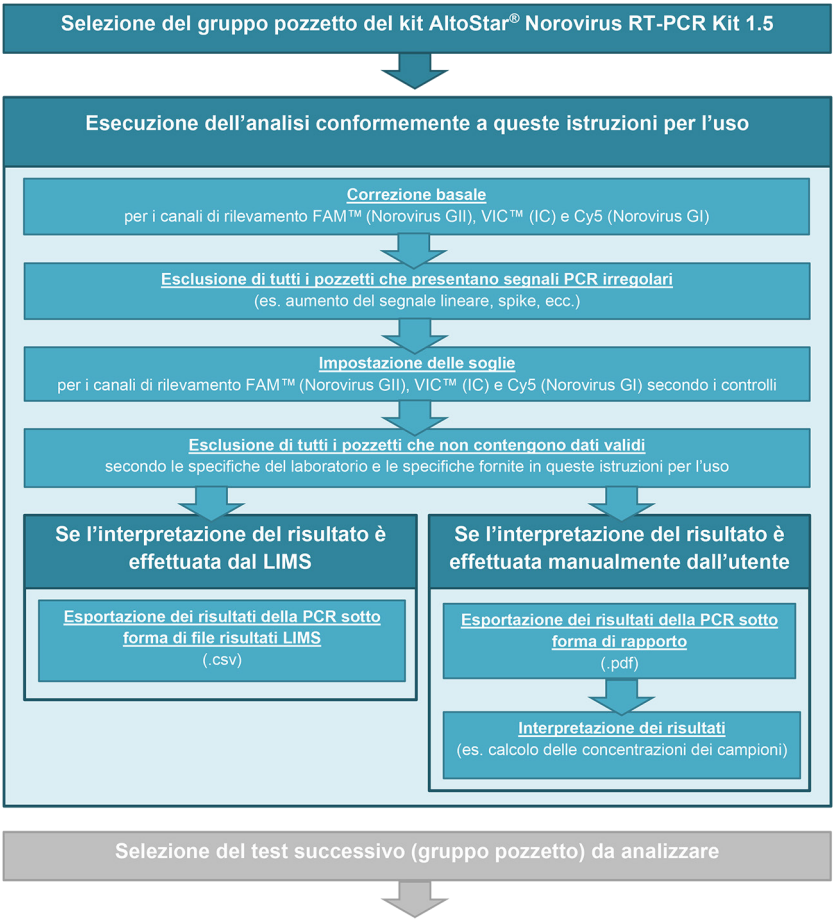

Figura 3: Processo di Analisi dei dati PCR

Nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) assicurarsi di selezionare il **Well Group** (Gruppo pozzetto) del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5. Quindi, fare clic sul menu a discesa **Well Group** (Gruppo pozzetto) vicino al pulsante **Well Group** (Gruppo pozzetto) (vedere figura 4) della barra degli strumenti. Non usare il **Well Group** (Gruppo pozzetto) *"All Wells"* ("Tutti i pozzetti"). La selezione nella figura 4 è riportata unicamente a titolo di esempio generico.

Prima di analizzare i risultati assicurarsi che il gruppo pozzetto del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 contenga tutti i pozzetti del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 e nessun pozzetto di altri test.

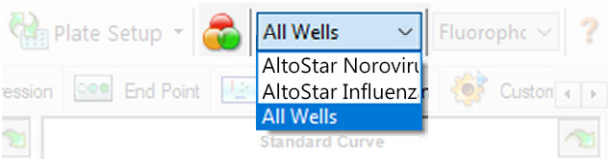

Figura 4: Pulsante Well Group (Gruppo pozzetto) e menu a discesa Well Group (Gruppo pozzetto)

NOTA

L'analisi combinata di più di un test può portare a risultati errati.

ATTENZIONE

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

7.6.7.1 Correzione basale

Le impostazioni basali usate dal software CFX Manager™ Dx possono dover essere corrette per i singoli pozzetti del test [**Well Group** (Gruppo pozzetto)] in corso di analisi.

1. Nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) assicurarsi di selezionare il **Well Group** (Gruppo pozzetto) del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5. Quindi, fare clic sul menu a discesa **Well Group** (Gruppo pozzetto) vicino al pulsante **Well Group** (Gruppo pozzetto) (vedere figura 4) della barra degli strumenti.
2. A sinistra della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) spuntare solo la casella di controllo **FAM** per il canale di rilevamento del target Norovirus GII.
3. Nella barra dei menu della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) fare clic su **Settings** → **Baseline Threshold…** (Impostazioni → Soglia basale…) per aprire la finestra di dialogo Baseline Threshold (Soglia basale) (vedere figura 5).
4. Fare clic sul simbolo ◊ nell'intestazione di colonna **Baseline End** (Fine basale) una volta per ordinare la tabella per valori **Baseline End** (Fine basale) ascendenti.

5. Selezionare tutte le righe che presentano dei valori **Baseline End** (Fine basale) da 1-9 (vedere figura 5).

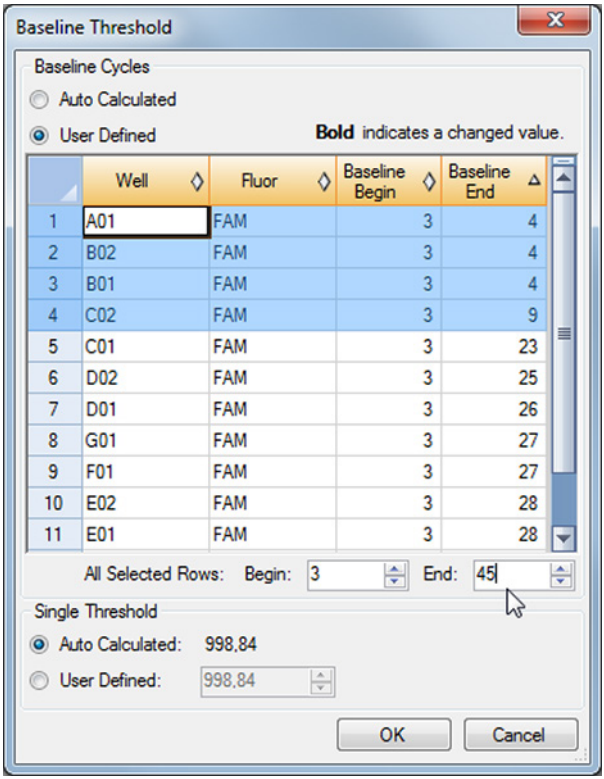

Figura 5: Finestra di dialogo Baseline Threshold (Soglia basale)

6. Impostare il valore nel campo **End:** (Fine:) a 45 per le righe selezionate (vedere figura 5).
7. Confermare le impostazioni facendo clic su **OK**.
8. Sul lato sinistro della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) togliere il segno di spunta dalla casella di controllo **FAM** e spuntare solo la casella di controllo **VIC** per il canale di rilevamento target IC.
9. Ripetere i passi 3-7 per il canale di rilevamento VIC™ (IC) e Cy5 (Norovirus GI target).

7.6.7.2 Esclusione dei segnali PCR irregolari

È possibile derivare risultati validi solo da segnali PCR privi di artefatti, che potrebbero essere causati per es. da impurità o bolle nella miscela RT-PCR. I segnali PCR con artefatti devono essere esclusi dall'utente.

1. Nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) assicurarsi di selezionare il **Well Group** (Gruppo pozzetto) del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5. Quindi, fare clic sul menu a discesa **Well Group** (Gruppo pozzetto) vicino al pulsante **Well Group** (Gruppo pozzetto) (vedere figura 4) della barra degli strumenti.

2. Identificare i pozzetti con segnali PCR irregolari (aumento del segnale lineare, picchi anomali, ecc.) in uno qualsiasi dei canali di rilevamento FAM™ (Norovirus GII target), VIC™ (IC) o Cy5 (Norovirus GI target) (vedere figura 6).

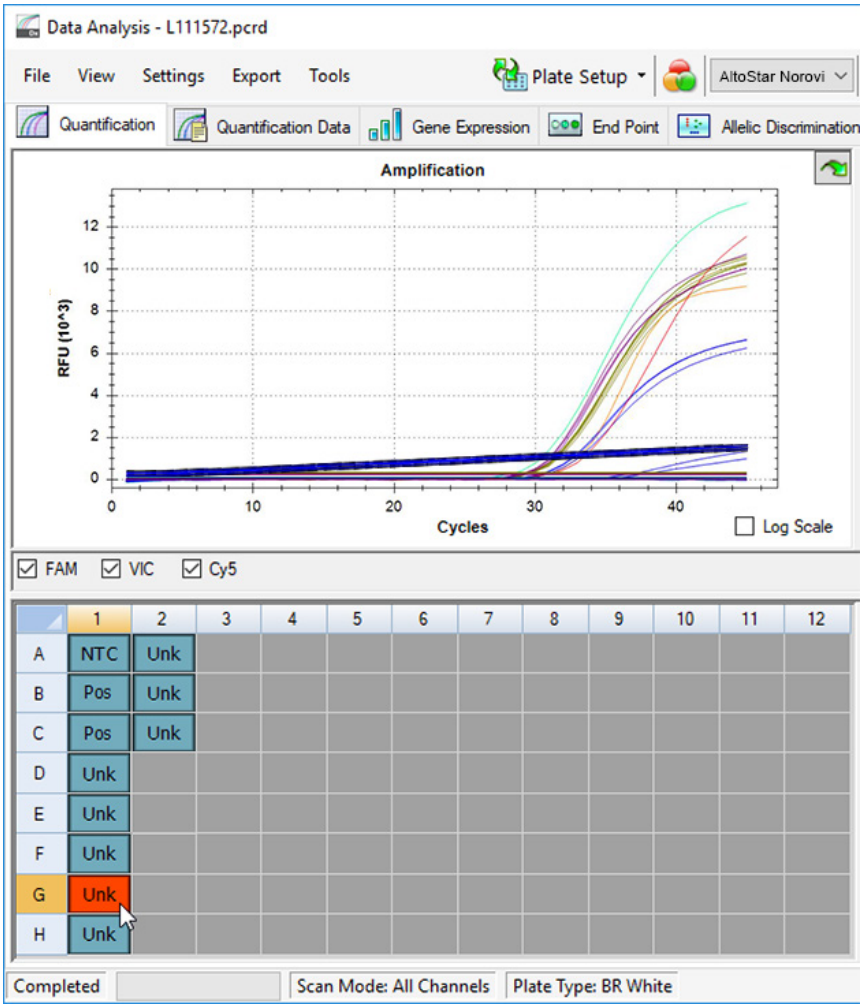

Figura 6: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): segnale PCR irregolare

3. Fare clic su ogni pozzetto interessato con il pulsante destro del mouse e selezionare **Well**... (Pozzetto...) → **Exclude from Analysis** (Escludi dall'analisi) (vedere figura 7).

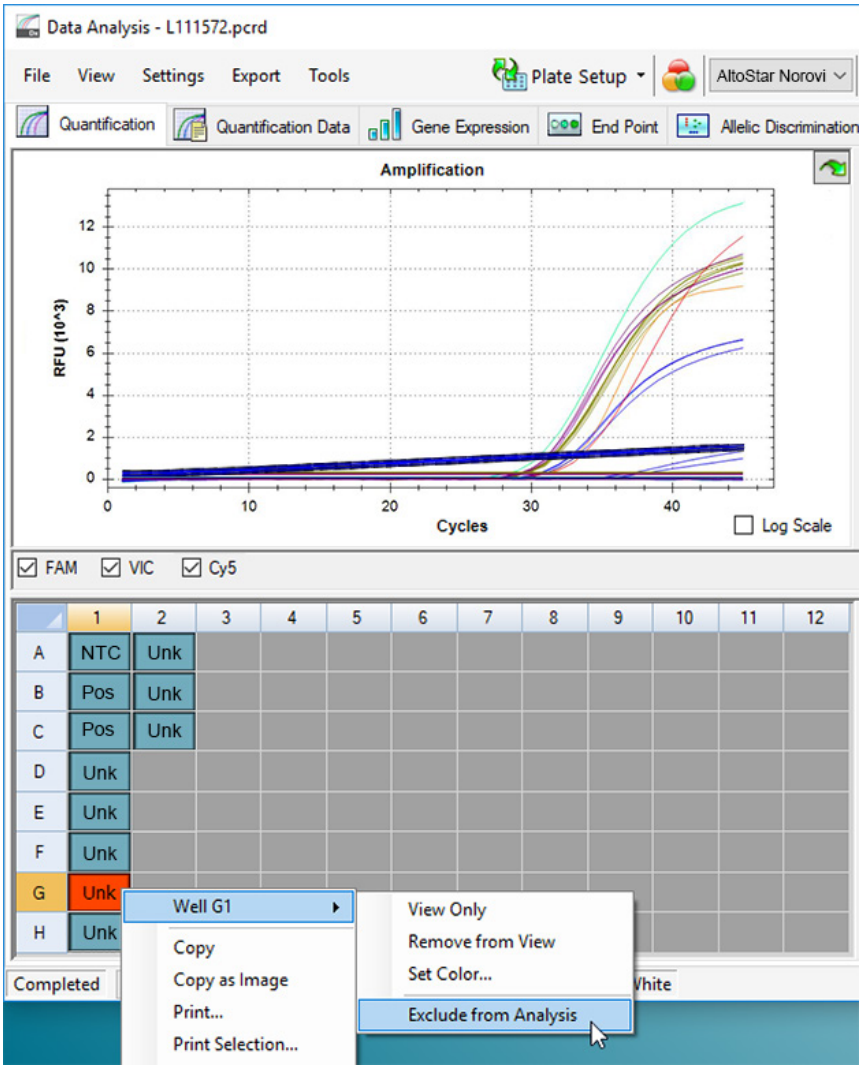

Figura 7: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): esclusione del pozzetto dall'analisi

4. Il pozzetto selezionato viene escluso dall'analisi. Da questo pozzetto non verrà generato alcun risultato (vedere figura 8).

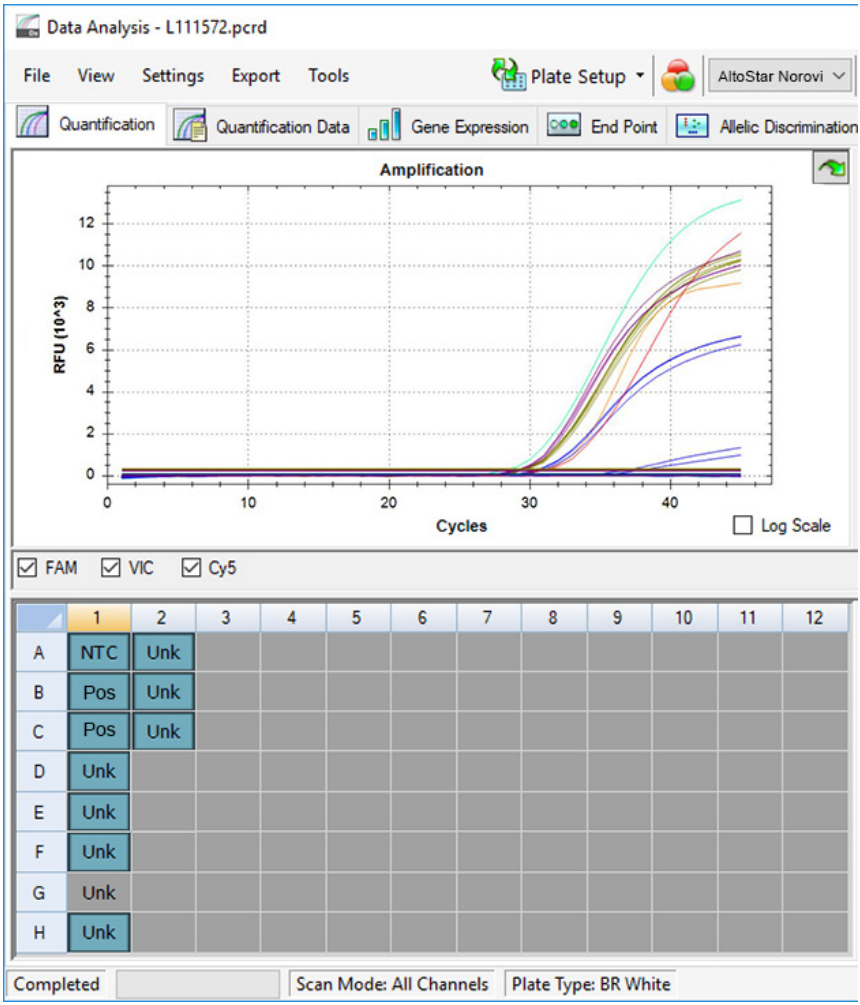

Figura 8: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): pozzetto escluso

7.6.7.3 Impostazione delle soglie

Le soglie per i canali di rilevamento FAM™ (Norovirus GII target), VIC™ (IC) e Cy5 (Norovirus GI target) devono essere impostate manualmente dall'utente a seconda dei segnali dei controlli.

1. Nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) assicurarsi di selezionare il **Well Group** (Gruppo pozzetto) del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5. Quindi, fare clic sul menu a discesa **Well Group** (Gruppo pozzetto) vicino al pulsante **Well Group** (Gruppo pozzetto) (vedere figura 4) della barra degli strumenti.

2. A sinistra della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) spuntare solo la casella di controllo **VIC** per il canale di rilevamento di IC (vedere figura 9).

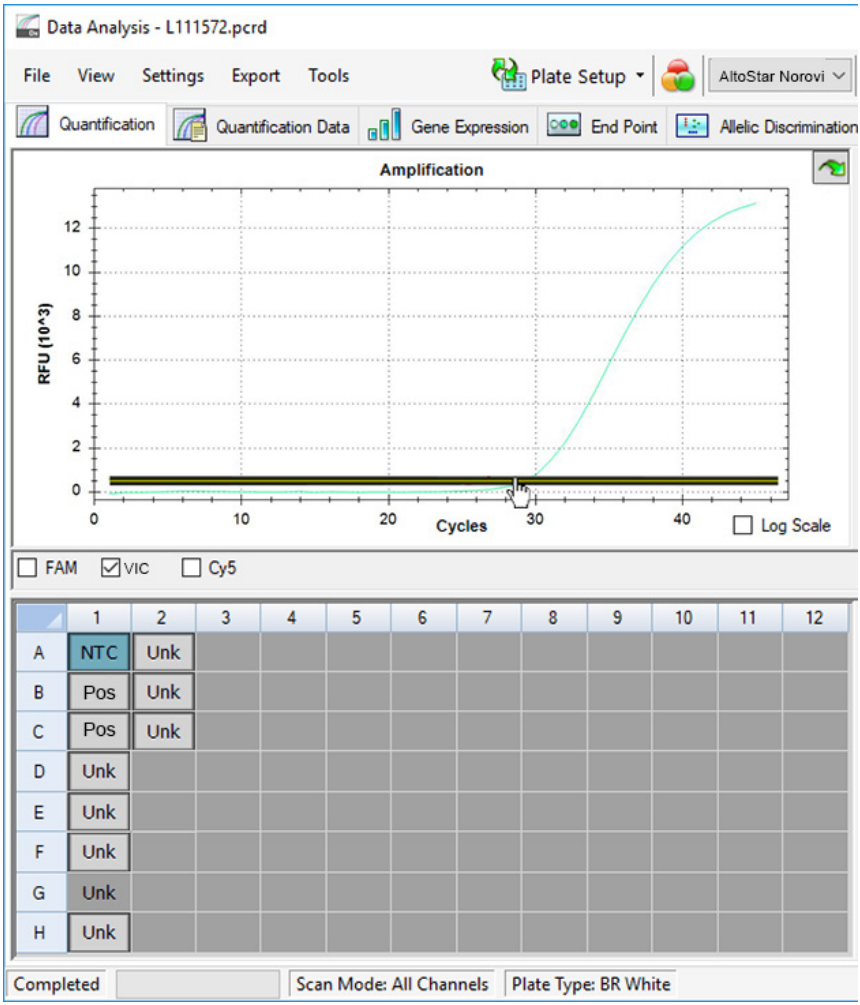

Figura 9: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): impostazione della soglia VIC™

3. Selezionare solamente il pozzetto NTC nella vista piastra della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) (vedere figura 9).
4. Trascinare la soglia nell'area esponenziale del segnale NTC (vedere figura 9).

NOTA

L'NTC contiene l'IC template (Template controllo interno), che porta a un segnale IC in un pozzetto NTC valido.

5. Sul lato sinistro della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) togliere il segno di spunta dalla casella di controllo **VIC** e spuntare solo la casella di controllo **FAM** per il canale di rilevamento del target Norovirus GII (vedere figura 10).

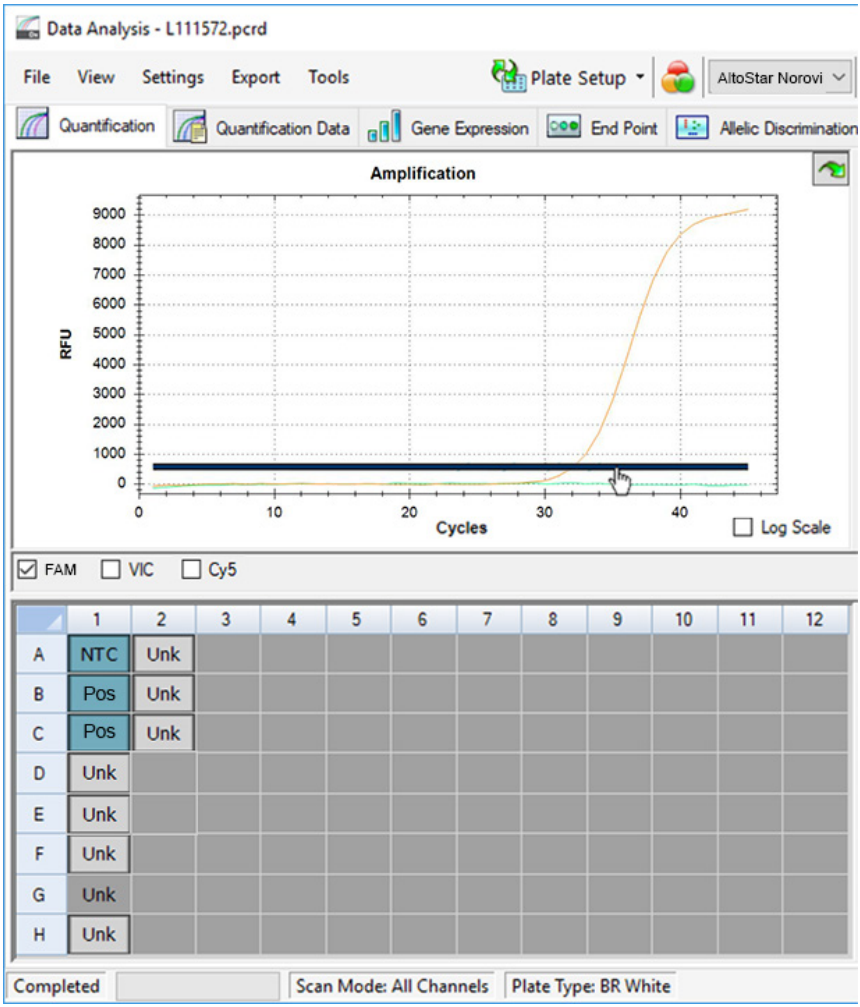

Figura 10: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): impostazione della soglia FAM™

6. Selezionare solo i pozzetti contenenti NTC e PC Norovirus GII nella vista piastra della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) (vedere figura 10).
7. Trascinare la soglia pozzetto sopra al segnale dell'NTC nell'area esponenziale del segnale PC (vedere figura 10).

8. Per il canale di rilevamento del target Norovirus GI togliere il segno di spunta dalla casella di controllo **FAM** a sinistra della finestra Data Analysis (Analisi dei dati), spuntare la casella di controllo **Cy5** e ripetere i passi 6 e 7 (vedere figura 10).

7.6.8 Validità dei risultati PCR

7.6.8.1 Esclusione dei pozzetti contenenti dati invalidi

I pozzetti che non contengono dati validi devono essere esclusi dalla generazione dei risultati dall'utente.

1. Nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) assicurarsi di selezionare il **Well Group** (Gruppo pozzetto) del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5. Quindi, fare clic sul menu a discesa **Well Group** (Gruppo pozzetto) vicino al pulsante **Well Group** (Gruppo pozzetto) (vedere figura 4) della barra degli strumenti.
2. Identificare tutti i pozzetti contenenti dati invalidi. Un pozzetto è invalido se è applicabile una qualsiasi delle condizioni che seguono:

   a) Il processo completo è invalido (vedere capitolo 7.6.8.2 Validità di un processo PCR diagnostico).

   b) I dati del pozzetto non rispettano le condizioni di controllo per un risultato valido (vedere capitolo 7.6.8.3 Validità dei risultati per un campione).

3. Fare clic su ciascun pozzetto contenente dati invalidi secondo i capitoli da 7.6.8.2 Validità di un processo PCR diagnostico a 7.6.8.3 Validità dei risultati per un campione con il pulsante destro del mouse e selezionare **Well**... → **Exclude from Analysis** (Pozzetto... → Escludi dall'analisi) (vedere figure 11 e 12).

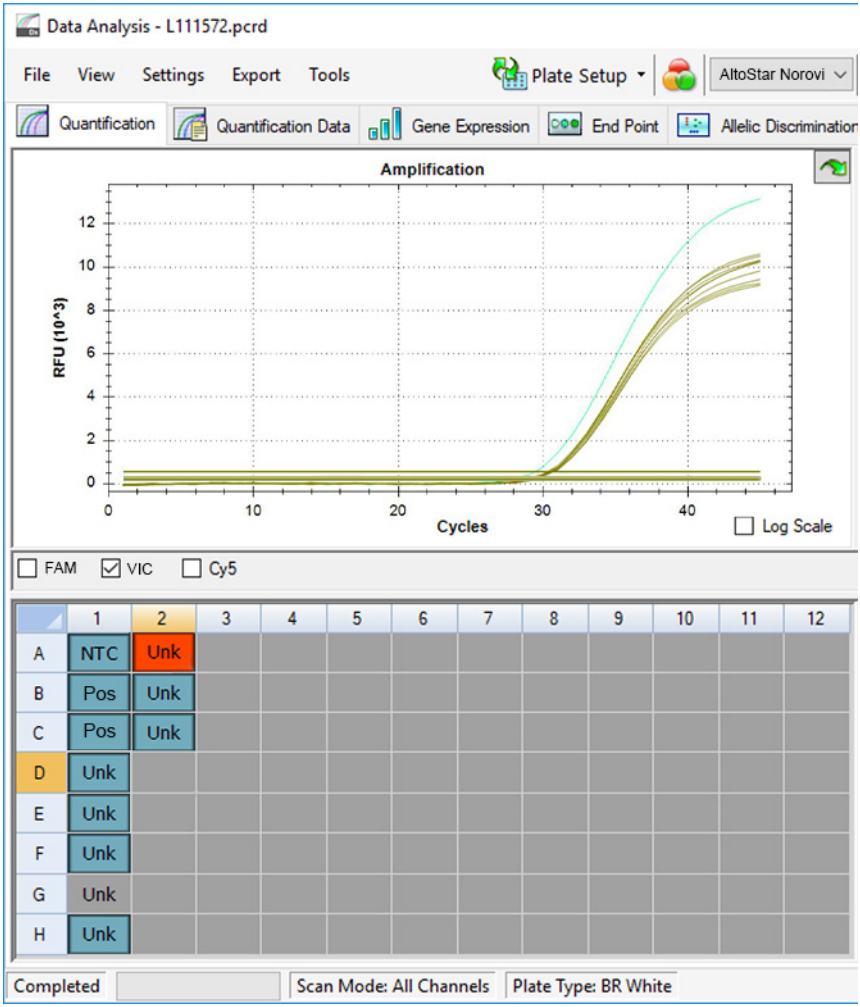

Figura 11: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): pozzetto invalido

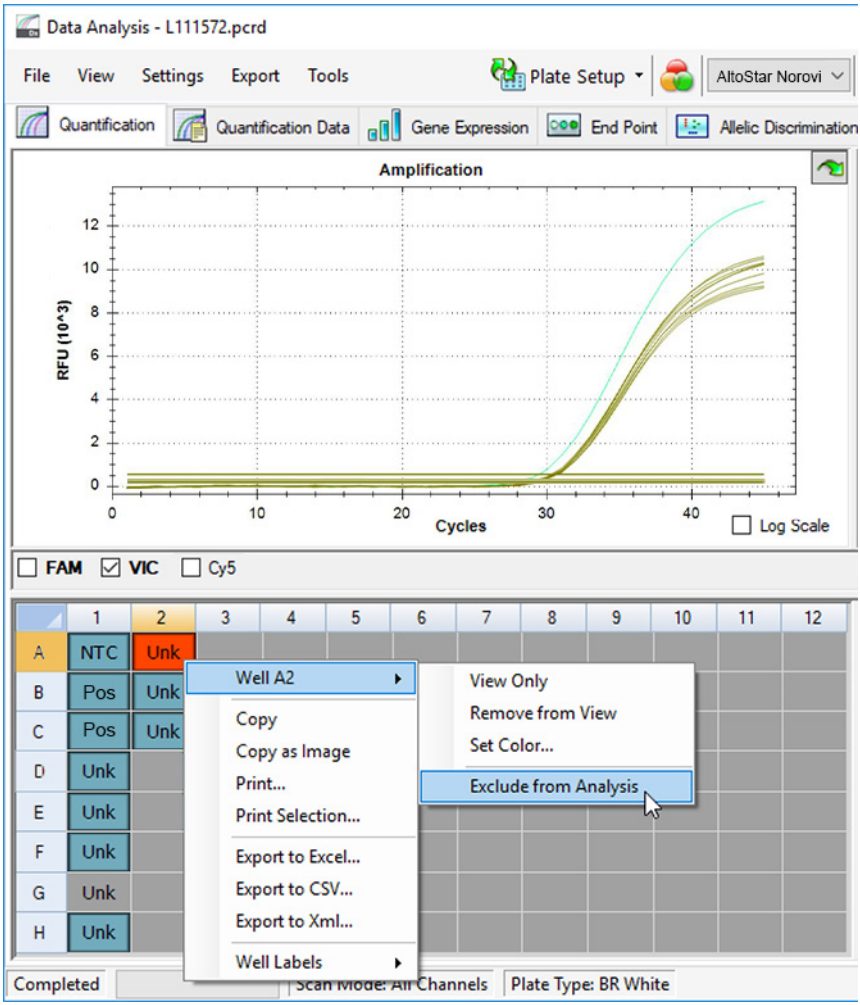

Figura 12: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): esclusione del pozzetto invalido dall'analisi

Il pozzetto selezionato viene escluso dall'analisi. Da questo pozzetto non verrà generato alcun risultato.

7.6.8.2 Validità di un processo PCR diagnostico

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

Tab. 7: Condizioni di controllo per un processo PCR valido

Controllo	Canale di rilevamento		
	Cy5 (Norovirus GI target)	FAM™ (Norovirus GII target)	VIC™ (IC)
Controllo positivo Norovirus GI	+	-	Non applicabile
Controllo positivo Norovirus GII	-	+	Non applicabile
NTC	-	-	+

Un processo PCR diagnostico è **invalido**, se:

- Il processo non è stato completato.
- Una qualsiasi delle condizioni di controllo per un processo PCR diagnostico valido non viene rispettata.

In caso di processo PCR diagnostico invalido, escludere tutti i pozzetti dall'analisi e ripetere l'AltoStar® run (processo) partendo dai campioni originari.

7.6.8.3 Validità dei risultati per un campione

Il risultato per un singolo campione è **invalido** se i segnali nei canali di rilevamento VIC™ (IC), FAM™ (Norovirus GII target) e Cy5 (Norovirus GI target) sono negativi (vedere tabella 8). In caso di risultato invalido per un campione, escludere il pozzetto dall'analisi e ripetere il test dal campione originale o raccogliere e analizzare un nuovo campione.

Tab. 8: Validità del risultato

Canale di rilevamento			Validità del risultato
Cy5 (Norovirus GI target)	FAM™ (Norovirus GII target)	VIC™ (IC)	
+	-	+/-*	Risultato valido
-	+	+/-*	Risultato valido
-	-	+	Risultato valido
-	-	-	**Risultato invalido**

* Il rilevamento dell'IC non è richiesto quando viene rilevato il target Norovirus GI e/o Norovirus GII. Una carica elevata di RNA di Norovirus GI e/o di Norovirus GII nel campione può portare a un segnale IC ridotto o assente.

7.6.9 Esportazione dei risultati della PCR per l'interpretazione automatizzata dei risultati

Per rendere disponibili i risultati del processo PCR a un LIMS collegato per l'interpretazione automatizzata dei risultati, questi ultimi devono essere esportati in formato file risultati LIMS (.csv).

1. Nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) assicurarsi di selezionare il **Well Group** (Gruppo pozzetto) del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5. Quindi, fare clic sul menu a discesa **Well Group** (Gruppo pozzetto) vicino al pulsante **Well Group** (Gruppo pozzetto) (vedere figura 4) della barra degli strumenti.
2. Assicurarsi che tutti i passi del processo di analisi (vedere i capitoli da 7.6.7.1 Correzione basale a 7.6.8.1 Esclusione dei pozzetti contenenti dati invalidi) siano stati completati per il gruppo pozzetto del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5.
3. Nella barra dei menu della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) fare clic su **Export** → **Export All Data Sheets** (Esportazione → Esporta tutte le Schede dati…) per aprire la finestra di dialogo Browse For Folder (Cerca cartella).
4. Nella finestra di dialogo Browse For Folder (Cerca cartella) specificare la posizione dei file risultati LIMS da generare e fare clic su **OK**.

NOTA

L'integrazione LIMS deve essere implementata secondo le specifiche di altona Diagnostics. Per informazioni sull'integrazione LIMS, vedere capitolo 16. Protocollo di test per l'AltoStar® Connect software e informazioni per l'integrazione LIMS e/o contattare l'assistenza tecnica altona Diagnostics (vedere capitolo 12. Assistenza tecnica).

NOTA

Il salvataggio dei risultati di più di un test (gruppo pozzetto) da un processo PCR nella stessa cartella porta alla sostituzione dei file risultati LIMS del primo test (gruppo pozzetto) con i file risultati LIMS del secondo test (gruppo pozzetto). In questo caso è possibile esportare nuovamente i file risultati LIMS del primo test (gruppo pozzetto).

7.6.10 Esportazione dei risultati della PCR per l'interpretazione manuale dei risultati

Se i risultati non vengono passati a un LIMS per l'interpretazione automatica, l'interpretazione dei risultati deve essere effettuata manualmente dall'utente. A tal fine i risultati dell'analisi di ciascun test (gruppo pozzetto) devono essere esportati sotto forma di report.

1. Nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) assicurarsi di selezionare il **Well Group** (Gruppo pozzetto) del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5. Quindi, fare clic sul menu a discesa **Well Group** (Gruppo pozzetto) vicino al pulsante **Well Group** (Gruppo pozzetto) (vedere figura 4) della barra degli strumenti.
2. Sul lato sinistro della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) spuntare sia la casella di controllo **VIC** che le caselle di controllo **FAM** e **Cy5**.
3. Assicurarsi che tutti i passi del processo di analisi (vedere i capitoli da 7.6.7.1 Correzione basale a 7.6.8.1 Esclusione dei pozzetti contenenti dati invalidi) siano stati completati per il gruppo pozzetto del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5.
4. Nella barra dei menu della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) fare clic su **Tools** → **Reports...** (Strumenti → Rapporti…) per aprire la finestra di dialogo Report (Report).

5. Assicurarsi che almeno i contenuti che seguono siano selezionati per la generazione del report nella parte superiore sinistra della finestra di dialogo Report (Report) (vedere figura 13):

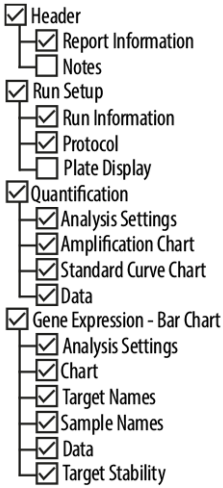

Figura 13: Finestra di dialogo Report (Report)

6. Selezionare o deselezionare i contenuti aggiuntivi del report spuntando le rispettive caselle di controllo, come necessario.

7. Nella barra dei menu della finestra di dialogo Report (Report) fare clic su **File → Save As...** (File → Salva con nome...) per aprire la finestra di dialogo Save Report (Salva report).

8. Nella finestra di dialogo Save Report (Salva report) specificare nome e posizione per il file di report da generare e fare clic su **Save** (Salva).

7.6.10.1 Interpretazione manuale dei risultati

1. Aprire il file report generato per il gruppo pozzetto del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 (vedere capitolo 7.6.10 Esportazione dei risultati della PCR per l'interpretazione manuale dei risultati).
2. Fare riferimento alla tabella Quantification Data (Dati quantitativi) nel report (vedere figura 14). La tabella è costituita da 3 righe per ciascun **Sample** (Campione): una per il **Target** *Norovirus GI* e *Norovirus GII* e una per il **Target** *Internal Control* (controllo interno).

Quantification Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Biological Set Name	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Well Note
A01	FAM	Norovirus GII	NTC	NTC | 122208051910	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	
G01	FAM	Norovirus GII	Unkn	Sample 4 | 00000004	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
B01	Cy5	Norovirus GI	Pos	Norovirus G I 122038051910	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	23.97	23.97	0.000	
H01	FAM	Norovirus GII	Unkn	Sample 5 | 00000005	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	34.65	34.65	0.000	qualitative
C01	FAM	Norovirus GII	Pos	Norovirus G II 122048051910	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	27.28	27.28	0.000	
A02	FAM	Norovirus GII	Unkn	Sample 6 | 00000006	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
D01	FAM	Norovirus GII	Unkn	Sample 1 | 00000001	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	30.54	30.54	0.000	qualitative
F01	FAM	Norovirus GII	Unkn	Sample 3 | 00000003	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	33.56	33.56	0.000	qualitative
C02	FAM	Norovirus GII	Unkn	Sample 8 | 00000008	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	28.22	28.22	0.000	qualitative
D01	Cy5	Norovirus GI	Unkn	Sample 1 | 00000001	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
F01	Cy5	Norovirus GI	Unkn	Sample 3 | 00000003	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
A01	VIC	Internal Control	NTC	NTC | 122208051910	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	25.27	25.27	0.000	
G01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 4 | 00000004	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	26.08	26.08	0.000	qualitative
H01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 5 | 00000005	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	25.46	25.46	0.000	qualitative
A02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 6 | 00000006	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	25.33	25.33	0.000	qualitative
C02	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 8 | 00000008	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	26.25	26.25	0.000	qualitative
D01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 1 | 00000001	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	25.45	25.45	0.000	qualitative
F01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 3 | 00000003	AltoStar Norovirus RT–PCR Kit 1.5	25.70	25.70	0.000	qualitative

Figura 14: Report (Rapporto): dati di quantificazione

I risultati qualitativi sarebbero contrassegnati dal termine *qualitative* (qualitativo) nella colonna **Well Note** (Nota pozzetto) della tabella Quantification Data (Dati di quantificazione).

3. Identificare ciascuna riga con il **Target** *Norovirus GI* o *Norovirus GII* e il termine *qualitative* (qualitativo) nella colonna **Well Note** (Nota pozzetto).
4. In queste righe, fare riferimento alla colonna $\mathbf{C_q}$ per il risultato del rispettivo **Sample** (Campione).
5. Fare riferimento alla tabella 9 per l'interpretazione dei risultati.

Tab. 9: Interpretazione dei risultati

Ciclo soglia (C_q) dei target Norovirus GI o Norovirus GII	Interpretazione dei risultati
1-45	Rilevato RNA specifico di Norovirus GI o di Norovirus GII.
N/A	Nessun RNA specifico di Norovirus GI o di Norovirus GII rilevato. Il campione non contiene quantità rilevabili di RNA specifico di Norovirus GI o di Norovirus GII.

8. Utilizzo di AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 con strumenti PCR in tempo reale diversi da CFX96™ Deep Well Dx System

Oltre al CFX96™ DW Dx, il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 è stato validato con altri strumenti PCR in tempo reale (vedere capitolo 5.3.2.2 Strumenti PCR in tempo reale). I capitoli che seguono, 8.1 Materiale e dispositivi richiesti e non forniti e 8.2 Procedura, descrivono come utilizzare il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 con questi strumenti.

8.1 Materiale e dispositivi richiesti e non forniti

Sono necessari gli strumenti e i materiali seguenti:

- Materiali e dispositivi generali (vedere capitolo 7.5 Materiali e dispositivi generali)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
  - Piastre di PCR a 96 pozzetti e pellicola di sigillatura (vedere i dettagli nella tabella 2)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
  - Piastre di PCR a 96 pozzetti e pellicola di sigillatura (vedere i dettagli nella tabella 2)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
  - Provette strip da 0,1 ml e coperchi [Provette STRIP da 0,1 ml per termociclatori Rotor-Gene® (LTF Labortechnik) o equivalenti]
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System e ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
  - Piastre di PCR a 96 pozzetti e pellicola di sigillatura [MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate e MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems) o equivalenti]

- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
  - Piastre di PCR a 96 pozzetti e pellicola di sigillatura [LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, bianco, e LightCycler® 480 Sealing Foil (Roche) o equivalenti]

NOTA

Non è consigliato utilizzare materiali o dispositivi diversi da quanto specificato in queste istruzioni per l'uso.

8.2 Procedura

8.2.1 Preparazione del campione

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 è stato validato con l'uso di AltoStar® AM16 in combinazione con il kit AltoStar® Purification Kit 1.5.

Potrebbero anche essere appropriati sistemi e kit di estrazione di acidi nucleici alternativi. L'idoneità della procedura di estrazione degli acidi nucleici per l'uso con il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 deve essere validata dall'utente.

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 deve essere utilizzato con un IC eterologo [AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno)], che permette di controllare la procedura di preparazione del campione (estrazione degli acidi nucleici) e la successiva PCR.

- Quando per l'estrazione degli acidi nucleici si utilizzano metodi diversi da AltoStar® AM16 in combinazione con il kit AltoStar® Purification Kit 1.5 l'IC deve essere aggiunto durante la fase di lisi della procedura di estrazione degli acidi nucleici.
- 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.

ATTENZIONE

Errate condizioni di conservazione degli eluati possono causare la degradazione della sequenza target di norovirus GI e/o di norovirus GII e compromettere le prestazioni del prodotto.

8.2.2 Preparazione della master mix

Tutti i componenti del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 e i campioni devono essere completamente scongelati, miscelati (mediante pipettaggio o vortice delicato) e centrifugati brevemente prima dell'uso. Preparare la master mix secondo lo schema di pipettagio che segue:

Tab. 10: Schema di pipettagio (preparazione della master mix)

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

Non utilizzare volumi diversi di Master A e Master B per la preparazione della master mix rispetto a quanto specificato in queste istruzioni per l'uso, in quanto le prestazioni del prodotto potrebbero risultare compromesse.

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.

8.2.3 Preparazione della reazione

1. Pipettare 20 µl di master mix in ciascuno dei pozzetti richiesti di un'appropriata piastra di PCR ottica a 96 pozzetti o di un'appropriata provetta di reazione ottica.
2. Aggiungere 10 µl di campione (eluato dall'estrazione degli acidi nucleici) o 10 µl dei controlli (PCs o NTC).

Tab. 11: Schema di pipettagio (preparazione della reazione)

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

3. Assicurarsi che siano utilizzati almeno 1 PC per ogni genogruppo di norovirus (norovirus GI e norovirus GII) e 1 NTC per ciascun processo.
4. Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con la master mix pipettando su e giù.
5. Chiudere la piastra di PCR a 96 pozzetti con una pellicola di sigillatura piastra di PCR e le provette di reazione con i coperchi idonei (vedere capitolo 8.1 Materiale e dispositivi richiesti, ma non forniti).
6. Centrifugare la piastra di PCR 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 della preparazione PCR la miscela PCR è stabile a temperatura ambiente (max. +30°C) per 30 minuti.

ATTENZIONE

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

ATTENZIONE

Non mescolare i campioni o gli ID dei campioni durante la preparazione PCR o il trasferimento nello strumento PCR. Questo potrebbe portare a risultati falsi positivi o falsi negativi a causa di un'errata assegnazione dei campioni.

8.2.4 Processo PCR

8.2.4.1 Programmazione dello strumento PCR in tempo reale

Per informazioni di base sull'impostazione e la programmazione dei diversi strumenti PCR in tempo reale, consultare le istruzioni per l'uso del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sulla programmazione per l'utilizzo del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 su specifici strumenti PCR in tempo reale, contattare l'assistenza tecnica altona Diagnostics (vedere capitolo 12. Assistenza tecnica).

8.2.4.2 Impostazioni di processo

Definire i seguenti parametri di base:

Tab. 12: Impostazioni di processo

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

* Se applicabile

Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

Tab. 13: Sonde fluorescenti

Target	Nome sonda	Reporter	Quencher
Norovirus GI	Norovirus GI	Cy5	(Nessuno)
Norovirus GII	Norovirus GII	FAM™	(Nessuno)
Controllo interno	Internal Control	JOE™	(Nessuno)

Impostare il profilo termico e l'acquisizione del colorante che seguono:

Tab. 14: Profilo termico e acquisizione dei fluorofori

	Stadio	Ripetizioni del ciclo	Acquisizione	Temperatura [°C]	Tempo [min:s]
Trascrizione inversa	Hold	1	-	55	20:00
Denaturazione	Hold	1	-	95	02:00
Amplificazione	Cycling	45	-	95	00:15
			Sì	55	00:45
			-	72	00:15

ATTENZIONE

Non utilizzare condizioni di cycling diverse da quelle specificate in queste istruzioni per l'uso, in quanto le prestazioni del prodotto potrebbero risultare compromesse.

8.2.5 Analisi dei dati

Per informazioni di base sull'analisi dei dati su specifici strumenti PCR in tempo reale, consultare le istruzioni per l'uso del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sull'analisi dei dati generati con il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 su diversi strumenti PCR in tempo reale, contattare l'assistenza tecnica altona Diagnostics (consultare il capitolo 12. Assistenza tecnica).

I criteri per la validità dei processi PCR diagnostici e l'interpretazione dei risultati indipendentemente dallo strumento PCR in tempo reale sono descritti nei capitoli da 7.6.8.2 Validità di un processo PCR diagnostico e 7.6.8.3 Validità dei risultati per un campione, nel capitolo 7.6.10.1 Interpretazione manuale dei risultati e nella tabella 9.

ATTENZIONE

Non utilizzare impostazioni di controllo diverse da quanto specificato in queste istruzioni per l'uso per l'analisi dei dati, in quanto potrebbero causare risultati dell'esame DIV errati.

ATTENZIONE

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

9. Dati sulle prestazioni

Le prestazioni del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 sono state valutate utilizzando materiale di norovirus GI e di norovirus GII disponibile sul mercato.

9.1 Feci

9.1.1 Sensibilità analitica

Per la determinazione del limite di rilevabilità (LoD) è stata generata una serie di diluizioni di materiale virale di norovirus GI e norovirus GII disponibile sul mercato in sospensione fecale artificiale.

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

- 3 lotti di AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5
- 3 lotti di AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lotti di AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno)
- 3 strumenti AltoStar® AM16
- 3 strumenti CFX96™ DW Dx

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

Tab. 15: Risultati PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 per norovirus GI in sospensione fecale artificiale

Concentrazione [copie/ml]	N [totale]	N [positivo]	Tasso di successo [%]
3,16E+05	24	24	100
1,00E+05	24	24	100
3,16E+04	24	24	100
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	20	83
3,16E+02	23*	14	61
1,00E+02	24	6	25
3,16E+01	24	0	0

* Un campione non è stato elaborato.

Il LoD del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 per il rilevamento di norovirus GI in sospensione fecale artificiale è 1.583 copie/ml (intervallo di confidenza del 95%: 959–3,592 copie/ml).

Tab. 16: Risultati PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 per norovirus GII in sospensione fecale artificiale

Concentrazione [copie/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	21	88
1,00E+02	24	14	58
3,16E+01	24	8	33
1,00E+01	24	4	17
3,16E+00	24	1	4
1,00E+00	24	0	0

Il LoD del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 per il rilevamento di norovirus GII in sospensione fecale artificiale è 644 copie/ml (intervallo di confidenza del 95%: 356–1.565 copie/ml).

9.1.2 Specificità analitica

La specificità analitica del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 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 norovirus fossero rilevati.

Per la verifica della specificità analitica del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 sono stati effettuati gli esperimenti che seguono (vedere i capitoli da 9.1.2.1 Campioni negativi a 9.1.2.3 Reattività crociata).

9.1.2.1 Campioni negativi

35 campioni di sospensione fecale artificiale negativi per norovirus da singoli donatori sono stati testati con il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5. Tutti i campioni (35 su 35) sono risultati negativi per l'RNA specifico di norovirus GI e positivi per l'IC. 34 campioni su 35 sono risultati negativi per RNA specifico di norovirus GII. La specificità analitica del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 per i campioni di feci è ≥ 95%.

9.1.2.2 Sostanze interferenti

Per valutare l'influenza delle sostanze potenzialmente interferenti endogene ed esogene sulle prestazioni del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5, sostanze selezionate sono state aggiunte ai campioni di sospensione fecale artificiale. Questi campioni contenevano rispettivamente norovirus GI o norovirus GII in una concentrazione di 3 x LoD (4,75E+03 copie/ml e 1,93E+03 copie/ml) e zero norovirus.

I risultati ottenuti per i campioni contenenti sostanze potenzialmente interferenti sono stati confrontati ai risultati generati con campioni di feci 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
  - Colesterolo
  - DNA genomico umano
  - Mucine
  - Trigliceridi
  - Sangue intero

- Sostanze esogene
  - Cloruro di benzalconio
  - Etanolo
  - Idrocortisone
  - Mesalazina
  - Naprossene sodico
  - Nistatina

ATTENZIONE

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

9.1.2.3 Reattività crociata

La specificità analitica del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 rispetto alla reattività crociata con altri patogeni diversi da norovirus è stata valutata analizzando:

- Patogeni correlati al norovirus
- Patogeni che causano sintomi simili all'infezione da norovirus
- Patogeni che è probabile si presentino nei pazienti affetti da un'infezione da norovirus

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 non ha presentato reattività crociata con nessuno dei patogeni che seguono:

- Astrovirus
- *Campylobacter coli*
- *Campylobacter jejuni*
- *Clostridium difficile*
- *Escherichia coli* enteroemorragica (EHEC)
- *Escherichia coli*
- Rotavirus
- *Salmonella enterica*
- Sapovirus
- *Vibrio cholerae*

Inoltre, sono stati analizzati norovirus GI e norovirus GII. Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 non ha generato segnali falsi positivi né nel canale di rilevamento specifico del norovirus GI (Cy5) durante l'analisi del norovirus GII, né nel canale di rilevamento specifico del norovirus GII (FAM™) durante l'analisi del norovirus GI.

ATTENZIONE

Nel caso in cui il campione contenga altri patogeni diversi da norovirus GI e/o norovirus GII potrebbe presentarsi una competizione con l'amplificazione del target o reattività crociata, con conseguenti risultati errati dell'esame DIV.

9.1.3 Precisione

La precisione del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 è stata valutata utilizzando un pannello costituito da:

- 1 campione di sospensione fecale artificiale fortemente positivo per norovirus GI [7,91E+04 copie/ml (50 x LoD)]
- 1 campione di sospensione fecale artificiale fortemente positivo per norovirus GII [3,22E+04 copie/ml (50 x LoD)]
- 1 campione di sospensione fecale artificiale debolmente positivo per norovirus GI [4,75E+03 copie/ml (3 x LoD)]
- 1 campione di sospensione fecale artificiale debolmente positivo per norovirus GII [1,93E+03 copie/ml (3 x LoD)]
- 1 campione di feci negativo per norovirus

Ogni membro del pannello è stato testato in almeno 4 replicati per seduta.

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

- 3 lotti di AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5
- 3 lotti di AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 lotti di AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno)
- 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 norovirus GI e norovirus GII (vedere tabella 17)
- Valori di ciclo soglia (C_q*) per l'IC nei campioni negativi per norovirus (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. 17: Dati di precisione (CV% basato su valori C_q) per campioni fecali fortemente positivi per norovirus GI e norovirus GII

	Campione fortemente positivo per Norovirus GI [CV% basato su valori C_q]	Campione fortemente positivo [CV% basato su valori C_q]
Variabilità intra-test	0,28-0,56	0,06-0,60
Variabilità inter-lotto	1,10	0,37
Variabilità totale	1,24	1,55

Tutti i campioni analizzati a 3 x LoD (campioni debolmente positivi) sono risultati positivi.

Tab. 18: Dati di precisione (CV% basato su valori C_q) per l'IC nei campioni di sospensione fecale artificiale negativi per norovirus

	IC
Variabilità intra-test	0,38-1,44
Variabilità inter-lotto	1,41
Variabilità totale	1,60

9.1.4 Percentuale totale di guasti

La robustezza del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 è stata valutata testando 35 campioni di feci negativi per norovirus da singoli donatori con aggiunta di norovirus GI e norovirus GII fino a una concentrazione finale di 3 x LoD (rispettivamente 4,75E+03 copie/ml e 1,93E+03 copie/ml). Tutti i campioni (35 su 35) hanno dato risultati positivi nei canali di rilevamento fluorescente specifici di norovirus GI e norovirus GII (rispettivamente Cy5 e FAM™).

9.1.5 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 altamente positivi a parvovirus B19 (1,00E+07 UI/ml) e campioni negativi (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.

9.1.6 Prestazioni cliniche

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 è stato valutato in uno studio comparativo con il kit marcato CE RIDA®GENE Norovirus real-time RT-PCR kit (R-Biopharm AG). Retrospettivamente, 54 campioni di feci umane provenienti dal monitoraggio di routine del norovirus sono stati testati in parallelo:

Il kit RIDA®GENE Norovirus real-time RT-PCR kit (R-Biopharm AG) è stato utilizzato in combinazione con NucliSENS® easyMAG® Reagents (bioMérieux).

Il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 è stato usato in combinazione con il kit AltoStar® Purification Kit 1.5 e l'AltoStar® Internal Control 1.5 (controllo interno) 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 46 campioni sono mostrati in tabella 19.

Tab. 19: Risultati della valutazione della sensibilità e specificità diagnostica per norovirus nei campioni di feci

		RIDA®GENE Norovirus real-time RT-PCR kit (R-Biopharm AG)	
		POSITIVO	NEGATIVO
AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5	POSITIVO	24	0
	NEGATIVO	0	22

La sensibilità e la specificità diagnostiche del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 rispetto al kit RIDA®GENE Norovirus real-time RT-PCR kit (R-Biopharm AG) erano del 100%.

10. Smaltimento

Smaltire i rifiuti pericolosi e biologici conformemente alle normative locali e nazionali. I componenti residui del prodotto 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.

NOTA

La piastra di PCR deve essere smaltita sigillata, perché non è possibile rimuovere la PCR Plate Sealing Foil (pellicola sigillante per piastra di PCR).

11. Controllo di qualità

In conformità con il sistema di gestione della qualità di altona Diagnostics GmbH certificato EN ISO 13485, ogni lotto del kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 è testato in base a specifiche prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

12. Assistenza tecnica

Per l'assistenza ai clienti, contattare l'assistenza tecnica di altona Diagnostics:

e-mail: **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.

13. Letteratura

[1] Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MC, Green K, Martella V, Wang Q, White PA, Katayama K, Vennema H, Koopmans MPG, Vinjé J. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. Journal of General Virology. Ottobre 2019; Volume 100(10):1393–1406. doi: 10.1099/jgv.0.001318. PMID: 31483239.

[2] Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, Koopmans M, Lopman BA. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Infectious Diseases. Giugno 2014; Volume 14, Numero 8, 725–730. doi: https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4.

[3] Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. Journal of Clinical Microbiology. Gennaio 2015; Volume 53:373–381. doi: 10.1128/JCM.01535-14. PMID: 24989606.

14. Marchi e brevetti

4s3™ (4titude); AltoStar® (altona Diagnostics); ABI Prism®, QuantStudio™ (Applied Biosystems); NucliSENS®, easyMAG® (bioMérieux); CFX96™, CFX Manager™ (Bio-Rad); Rotor-Gene® (QIAGEN); RIDA®GENE (R-Biopharm AG); LOINC® (Regenstrief Institute, Inc.); LightCycler® (Roche); FAM™, JOE™, MicroAmp™, 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 kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 è un kit diagnostico marcato CE secondo la direttiva diagnostica *in vitro* europea 98/79/CE.

Prodotto non approvato o autorizzato dalla FDA.

Non disponibile in tutti i paesi.

© 2022 altona Diagnostics GmbH ; tous droits réservés.

15. Simboli

Simbolo	Spiegazione
IVD	Dispositivo diagnostico *in vitro*
GTIN	Global Trade Item Number
LOT	Codice lotto
CONT	Indice
CAP	Colore del tappo
REF	Numero di catalogo
NUM	Numero
COMP	Componente
	Istruzioni per l'uso
Σ	Contiene sufficienti per "n" test / reazioni (rxns)
	Limite di temperatura
	Da usare entro
	Fabbricante
	Attenzione
MAT	Numero materiale

Simbolo	Spiegazione
	Versione
	Nota
BIO	Contiene materiale biologico di origine animale

16. Protocollo di test per l'AltoStar® Connect software e informazioni per l'integrazione LIMS

Utilizzare il codice a barre 2D nella figura 15 per installare il protocollo di test più recente da utilizzare con il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5 su AltoStar® AM16. Il codice a barre può essere scansionato solo in formato stampato. È possibile scansionare il codice a barre direttamente dal manuale oppure stamparlo su un foglio a parte. Tenere presente che le dimensioni della stampa influiscono sulla leggibilità del codice a barre. Assicurarsi di applicare uno zoom del 100%. Per la scansione, puntare lo scanner sulla linea rossa del codice a barre. Per maggiori dettagli sulla gestione dei protocolli di test fare riferimento al rispettivo capitolo delle istruzioni per l'uso dell'AltoStar® Connect software. Per informazioni sull'integrazione LIMS vedere tabella 21.

AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5

Protocol Version: 1

Checksum: C385C735BC78787960E1E218AF77D90649D81482

Figura 15: Codice a barre del protocollo di test per il kit AltoStar® Norovirus RT-PCR Kit 1.5

Tab. 20: Changelog per il protocollo di test

Versione protocollo	Aggiornamenti della release
1	Versione iniziale

Tab. 21: Informazioni per l'integrazione LIMS

Utilizzo	Dati
Ordine test (LIMS → AltoStar® AM16)	AltoStar Norovirus RT-PCR Kit 1.5
Unità del risultato del test (CFX96™ DW Dx → LIMS)	N/A
Risultato del test (CFX96™ DW Dx → LIMS), canale 1	Norovirus GII
Risultato del test (CFX96™ DW Dx → LIMS), canale 2	Internal Control
Risultato del test (CFX96™ DW Dx → LIMS), canale 4	Norovirus GI

Per LOINC® (Logical Observation Identifiers Names and Codes) consultare il sito web di altona Diagnostics GmbH (www.altona-diagnostics.com) oppure contattare l'assistenza tecnica di altona Diagnostics (vedere capitolo 12. Assistenza tecnica).

17. Cronologia delle revisioni

Tab. 22: Cronologia delle revisioni

Identificativo	Data di emissione [mese/anno]	Modifiche
MAN-AS0051540-IT-S01	10/2021	Release iniziale
MAN-AS0051540-IT-S02	04/2022	• Capitolo 9: semplificazione della formulazione del testo • Capitolo 14: eliminazione delle parole “non concesso in licenza con Health Canada e” nella frase “Prodotto non concesso in licenza con Health Canada e non approvato o autorizzato dalla FDA.” • Ulteriori modifiche redazionali

pagina lasciata vuota volontariamente

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