

Istruzioni per l'uso

AltoStar[®] SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5

10/2021 IT

AltoStar®

SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5

Per uso con

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)

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

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



AS0821547



1200



10 2021



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

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 Control (controllo positivo) e No Template Control (controllo negativo).....	13
5.	Descrizione del prodotto	13
5.1	Informazioni generali	14
5.2	Descrizione dei componenti	14
5.2.1	Master A e Master B	14
5.2.2	Positive Control (controllo positivo)	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.....	16
5.4	Campioni	17
5.4.1	Tipi di campioni.....	17
5.4.2	Raccolta e manipolazione del campione	17
6.	Avvertenze, precauzioni e limitazioni.....	19

7.	Utilizzo del kit AltoStar® SARS-CoV-2 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	41
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® SARS-CoV-2 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	68
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	71
9.	Dati sulle prestazioni	72
9.1	Tamponi respiratori	72
9.1.1	Sensibilità analitica	72
9.1.2	Specificità analitica	74
9.1.2.1	Campioni negativi	75
9.1.2.2	Sostanze interferenti	75
9.1.2.3	Inclusività	76
9.1.2.4	Reattività crociata	78
9.1.3	Precisione	80
9.1.4	Percentuale totale di guasti	81

9.1.5	Contaminazione da trasferimento.....	82
9.1.6	Prestazioni cliniche.....	82
10.	Smaltimento.....	84
11.	Controllo di qualità	84
12.	Assistenza tecnica	85
13.	Letteratura	85
14.	Marchi e brevetti.....	86
15.	Simboli	87
16.	Protocollo di test per l'AltoStar® Connect software e informazioni per l'integrazione LIMS.....	89
17.	Cronologia delle revisioni	91

1. Indicazioni sulle istruzioni per l'uso

Queste istruzioni per l'uso guidano l'utente nell'utilizzo del kit AltoStar® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 è un test diagnostico *in vitro* basato sulla tecnologia PCR in tempo reale, per il rilevamento qualitativo di RNA specifico di coronavirus 2 da sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2) in campione di tamponi respiratori umani. È destinato a essere utilizzato come aiuto per la diagnosi di un'infezione da SARS-CoV-2.

I risultati generati con il kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 devono essere interpretati in associazione ad altri risultati clinici e di laboratorio.

Il kit AltoStar® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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⁾	100	60 ²⁾
Viola	Master B ¹⁾	100	180 ³⁾
Rosso	Positive Control (E gene + S gene) ⁴⁾	10	250
Bianco	NTC ⁵⁾	10	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⁾ Positive Control (controllo positivo)

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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 contiene reagenti sufficienti per eseguire 1200 reazioni in un massimo di 100 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 sono soluzioni pronte all'uso.

4.1 Conservazione

Tutti i componenti del kit AltoStar® SARS-CoV-2 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

i

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 Control (controllo positivo) e No Template Control (controllo negativo)

1. Dopo lo scongelamento, Positive Control (PC, controllo positivo) 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: *Scongelo 1* → *Congelo 1* → *Scongelo 2* → *Congelo 2* → *Scongelo 3* → *Congelo 3* → *Scongelo 4*

5. Descrizione del prodotto

Il kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 è un test diagnostico *in vitro* per il rilevamento qualitativo di RNA specifico del sottogenere B dei betacoronavirus (gene E) e di SARS-CoV-2 (gene S) in campione di tamponi respiratori umani.

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 del sottogenere B dei betacoronavirus (sottogenere B-βCoV) e SARS-CoV-2 e sonde target specifiche marcate con un colorante fluorescente per il rilevamento del DNA amplificato.

Oltre al sistema di amplificazione e rilevamento di RNA specifico del gene E e del gene S, 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)].

La sonda specifica per l'RNA di gene E è marcata con il fluoroforo FAM™ e la sonda specifica per l'RNA di gene S è marcata con il fluoroforo Cy5. 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 del gene E e del gene S, nonché il rilevamento dell'IC nei corrispondenti canali di rilevamento dello strumento PCR in tempo reale.

5.1 Informazioni generali

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

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

Il virus SARS-CoV-2 è estremamente contagioso, viene trasmesso tramite aerosol e goccioline e causa infezioni respiratorie acute con sintomi simili a quelli influenzali. Soprattutto nelle persone anziane e in quelle con patologie preesistenti, ma non esclusivamente in esse, l'infezione da SARS-CoV-2 può causare una malattia grave e potenzialmente fatale. Sono stati riferiti casi sia di infezione asintomatica sia di malattia lieve, malattia grave e decesso [1,2].

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, trascrittasi inversa, DNA polimerasi, sale di magnesio, primer e sonde) per consentire la trascrizione inversa, oltre all'amplificazione mediata da PCR e il rilevamento target di RNA specifico di gene E e gene S e dell'IC in una singola reazione.

5.2.2 Positive Control (controllo positivo)

Il Positive Control (controllo positivo) (gene E + gene S) contiene concentrazioni standardizzate di RNA specifico di sottogenere B-βCoV e di SARS-CoV-2. Il PC è usato per verificare la funzionalità dei sistemi di amplificazione e rilevamento specifico di sottogenere B-βCoV e SARS-CoV-2 inclusi nel kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5.

5.2.3 No Template Control (controllo negativo)

L'NTC non contiene RNA specifico di sottogenere B-βCoV e di SARS-CoV-2 ma contiene il template dell'IC. L'NTC viene usato come controllo negativo dell'RNA specifico di sottogenere B-βCoV e di SARS-CoV-2 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 Workflow 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® SARS-CoV-2 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 workflow (flusso di lavoro), fare riferimento al capitolo 7. Utilizzo del kit AltoStar® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 è stato sviluppato e validato con i seguenti strumenti PCR in tempo reale:

- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5:

- Campioni da tampone respiratorio umano prelevati in terreno di trasporto universale

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

Per la raccolta del campione si devono usare tamponi con punta in dacron o poliestere e asta in plastica disponibili sul mercato. I tamponi secchi devono essere risospesi in terreno di trasporto universale (per es. UTM® di Copan). Non si devono usare tamponi in alginato di calcio, tamponi con asta di legno e/o punta in cotone e tamponi raccolti in gel di agar. Il trasporto deve avvenire seguendo le istruzioni locali e nazionali per il trasporto dei materiali biologici.

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

ATTENZIONE



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

NOTA



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

NOTA



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.

NOTA



L'uso di tamponi di alginato di calcio potrebbe portare a risultati errati o invalidi a causa dell'inibizione PCR.

NOTA



L'uso di tamponi con asta di legno e/o punta in cotone o tamponi con gel agar come terreno di trasporto può interferire con il trasferimento del campione sull'AltoStar® AM16 a causa dei residui di legno, cotone e/o agar, per cui i campioni non vengono 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 SARS-CoV-2 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 SARS-CoV-2 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 di SARS-CoV-2 coperte dai primer e/o dalle sonde utilizzate nel kit possono causare il mancato rilevamento della presenza del patogeno.

7. Utilizzo del kit AltoStar® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 è validato per le purificazioni di acidi nucleici da un volume del campione di 500 µl con l'uso dell'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 (rosso)	VK000012
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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5
- Centrifuga per centrifugazione delle piastre di PCR

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® SARS-CoV-2 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	<ul style="list-style-type: none">• Accendere l'AltoStar® AM16.• Accendere il computer e il monitor.• Avviare il AltoStar® Connect software.
2. Effettuare la manutenzione	<ul style="list-style-type: none">• Nella barra dei menu fare clic su Application → Instrument Maintenance (Applicazione → Manutenzione dello strumento).<ul style="list-style-type: none">◦ 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)	<ul style="list-style-type: none"> 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: <ul style="list-style-type: none"> AltoStar® SARS-CoV-2 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	<ul style="list-style-type: none"> 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: <ul style="list-style-type: none"> 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 ($\leq +50^{\circ}\text{C}$) fino a che non si dissolvono completamente. Scongellare 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. <p>Il sistema effettuerà ora automaticamente il processo di purificazione.</p>

Passo	Azione
5. Finire il processo di purificazione	<ul style="list-style-type: none"> 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. <p>Gli eluati nella eluate plate (piastra degli eluati) non sigillata sono stabili a temperatura ambiente (max. +30°C) per un totale di 4 ore.</p> <ul style="list-style-type: none"> 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	<ul style="list-style-type: none"> 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: <ul style="list-style-type: none"> 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. <p>Il sistema effettuerà ora automaticamente il processo di preparazione PCR.</p>
7. Finire il processo di preparazione PCR	<ul style="list-style-type: none"> 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® SARS-CoV-2 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	<ul style="list-style-type: none"> Sigillare la piastra di PCR con una PCR Plate Sealing Foil (pellicola sigillante per piastra di PCR).
9. Avviare il processo PCR	<ul style="list-style-type: none"> 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. <p>Il CFX96™ DW Dx effettuerà ora automaticamente il processo PCR.</p>
10. Separare i test per l'analisi individuale	<ul style="list-style-type: none"> Separare tutti i test del processo PCR in gruppi pozzetto distinti.
11. Analizzare i dati e interpretare i risultati del processo PCR	<p>Individualmente per ciascun gruppo pozzetto:</p> <ul style="list-style-type: none"> 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 SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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

i

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. Scongellare 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® Automation System AM16 (sistema di automazione) 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).

i

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**i**

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.

- 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.

- 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.

- Conservare i reagenti per il riutilizzo come descritto nel capitolo 4.2 Manipolazione.
- Smaltire i materiali usati (vedere capitolo 10. Smaltimento).
- 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.

- 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)	<ul style="list-style-type: none"> 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)	<ul style="list-style-type: none"> L'eluato non è stato elaborato con successo. La rispettiva miscela RT-PCR sarà automaticamente omessa nell'analisi PCR seguente.

- 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



Aperto 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).

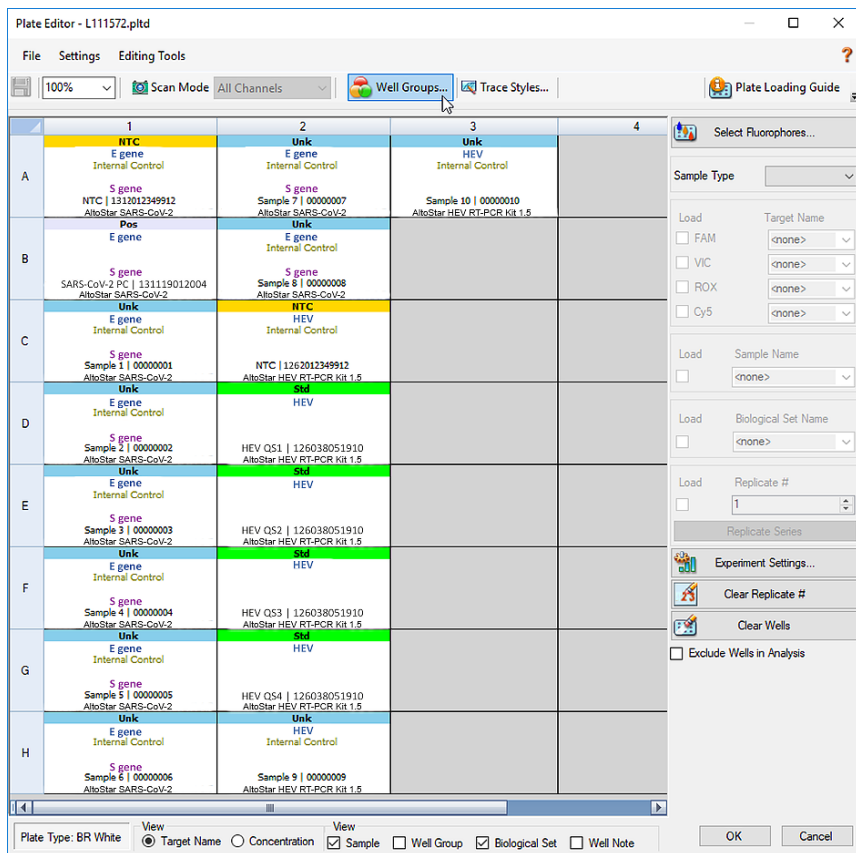


Figura 1: Finestra di dialogo Plate Editor (Editor piastra)

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).

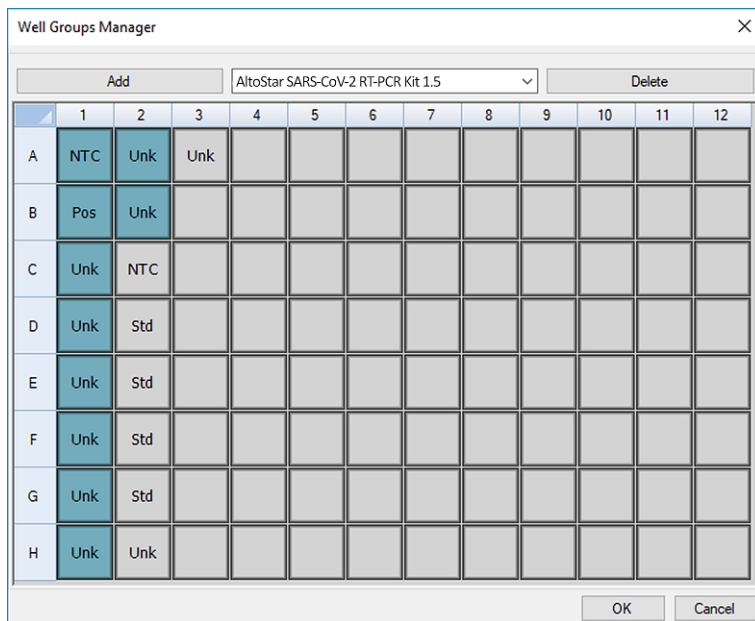


Figura 2: Finestra di dialogo Well Groups Manager (Manager gruppi pozzetto)

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.

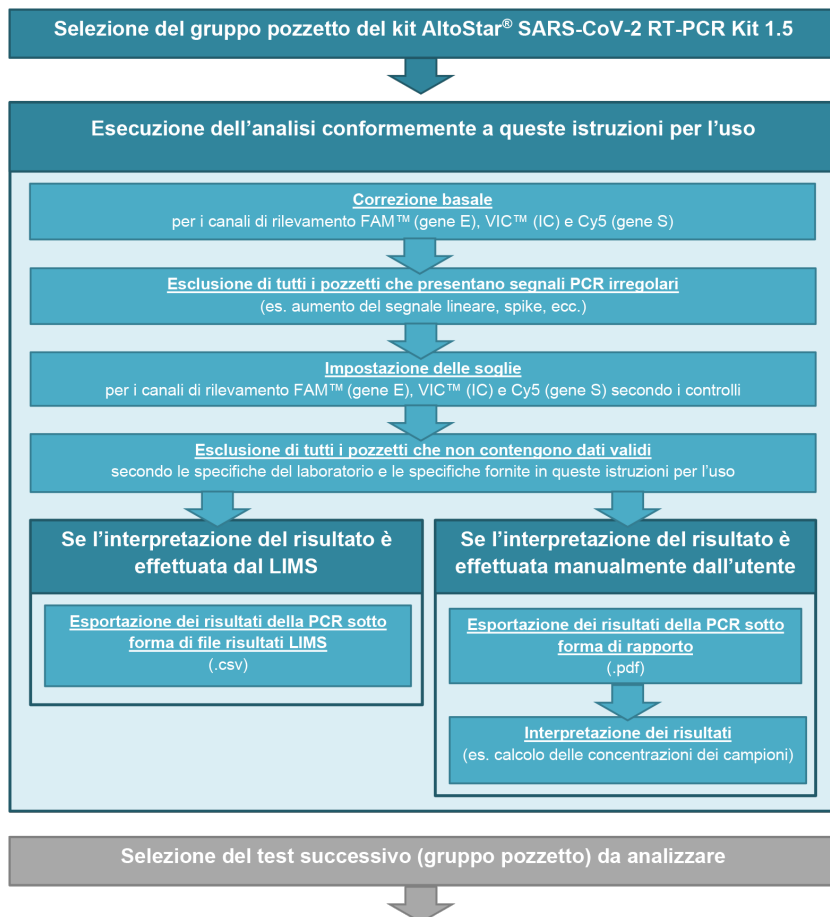


Figura 3: Processo di Analisi dei dati PCR

Nella finestra Data Analysis (Analisi dei dati) assicurarsi di selezionare il **Well Group** (Gruppo pozzetto) del kit AltoStar® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 contenga tutti i pozzetti del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 e nessun pozzetto di altri test.

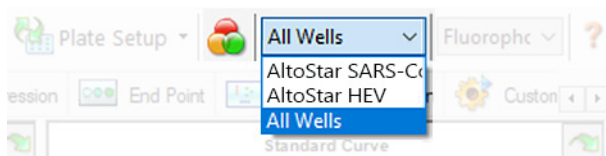


Figura 4: Pulsante Well Group (Gruppo pozzetto) e menu a discesa Well Group (Gruppo pozzetto)

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® SARS-CoV-2 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 gene E.
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).

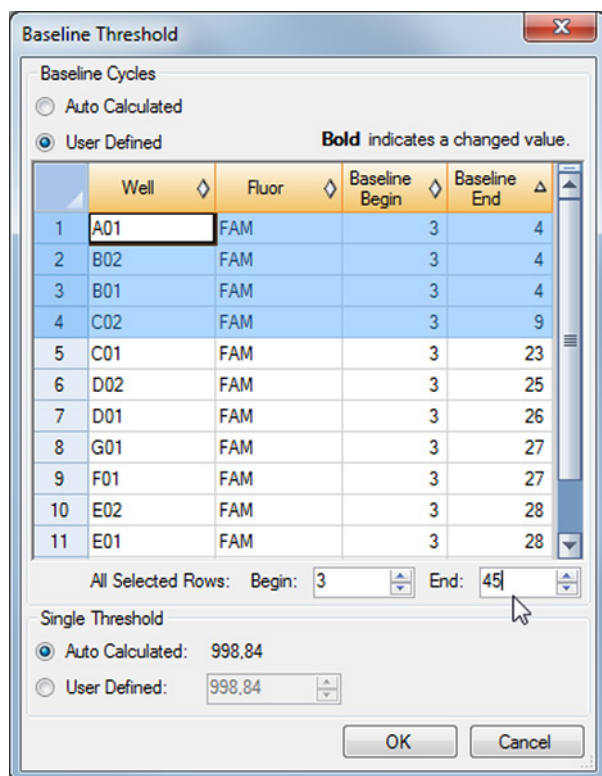


Figura 5: Finestra di dialogo Baseline Threshold (Soglia basale)

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 i canali di rilevamento VIC™ (IC) e Cy5 (gene S)

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® SARS-CoV-2 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.

- Identificare i pozzetti con segnali PCR irregolari (aumento del segnale lineare, picchi anomali, ecc.) in uno qualsiasi dei canali di rilevamento FAM™ (gene E), VIC™ (IC) o Cy5 (gene S) (vedere figura 6).

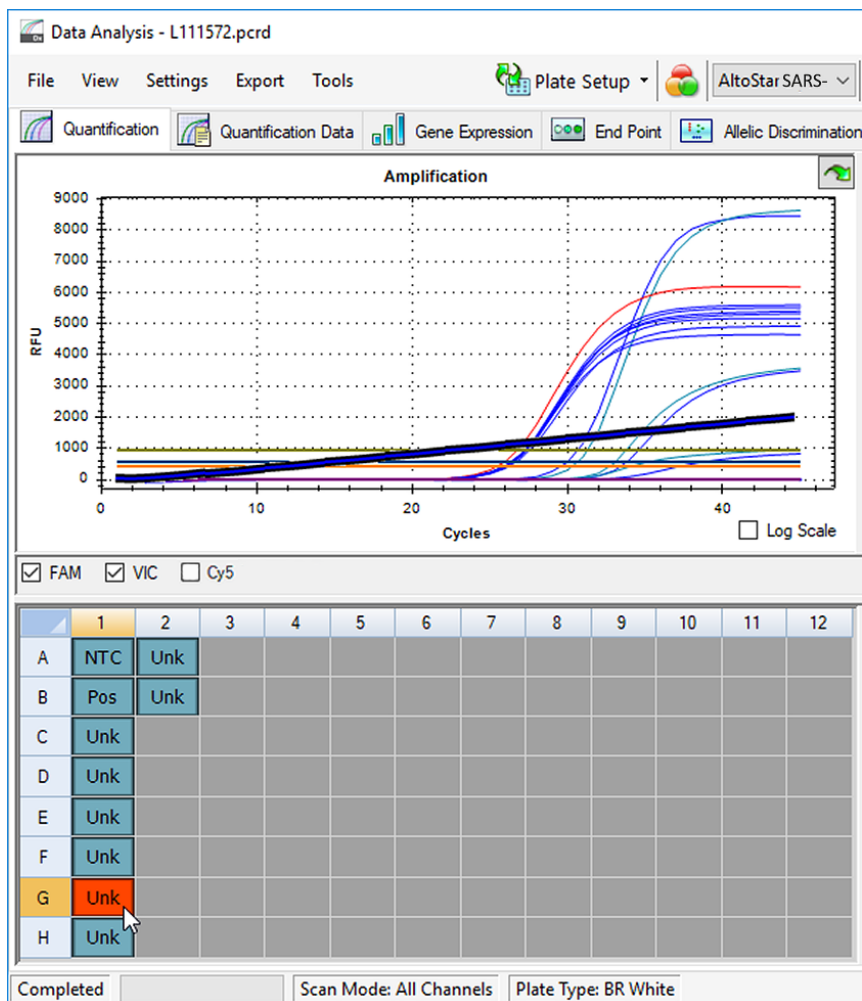


Figura 6: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): segnale PCR irregolare

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

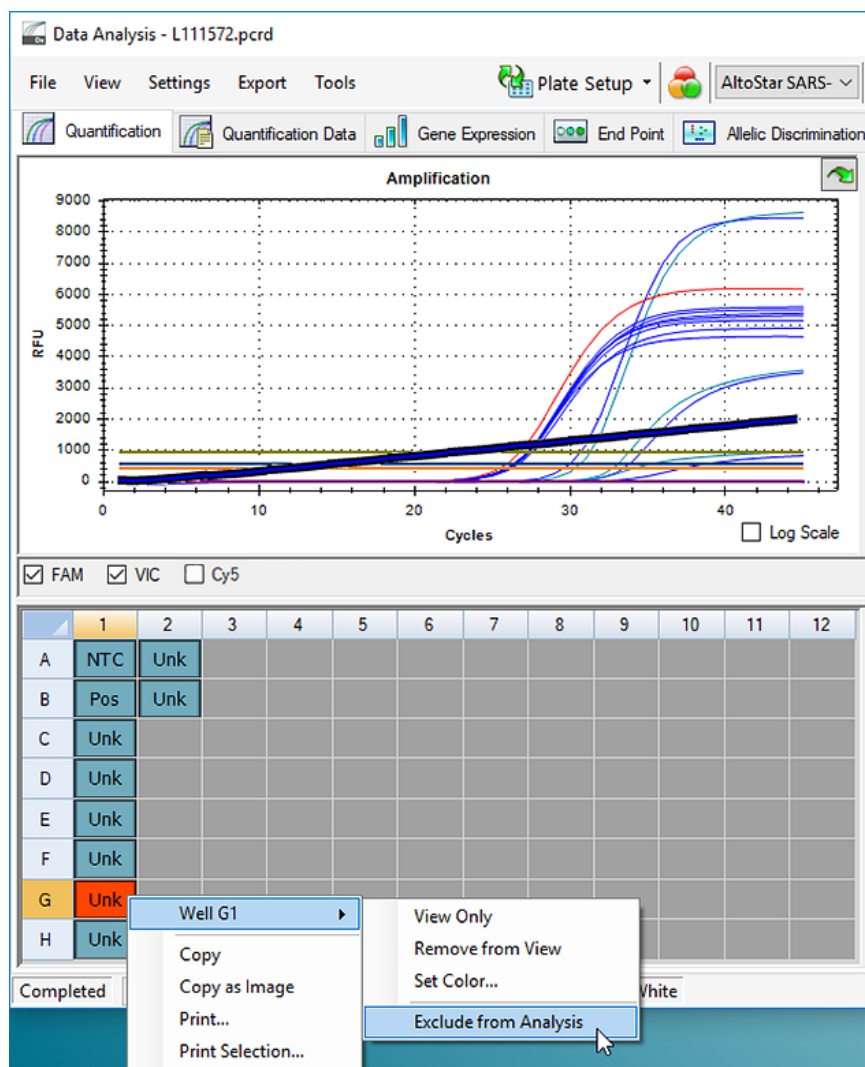


Figura 7: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): esclusione del pozzetto dall'analisi

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

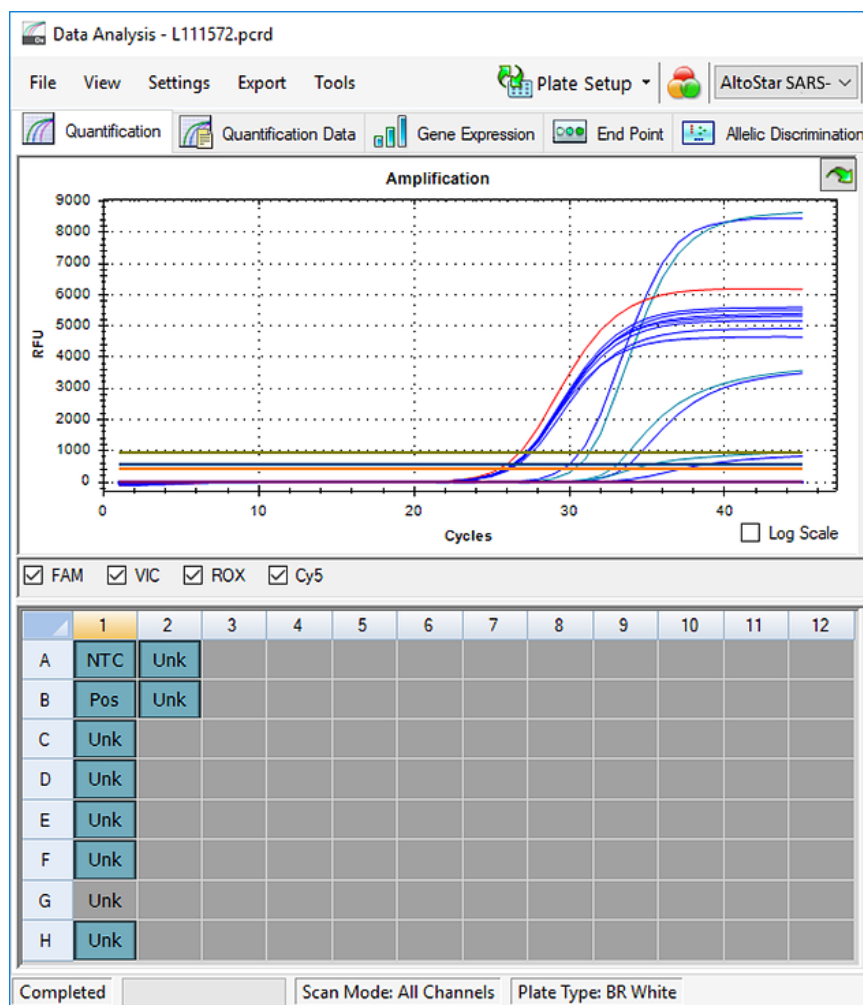


Figura 8: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): pozzetto escluso

7.6.7.3 Impostazione delle soglie

Le soglie per i canali di rilevamento FAM™ (gene E), VIC™ (IC) e Cy5 (gene S) 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® SARS-CoV-2 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).

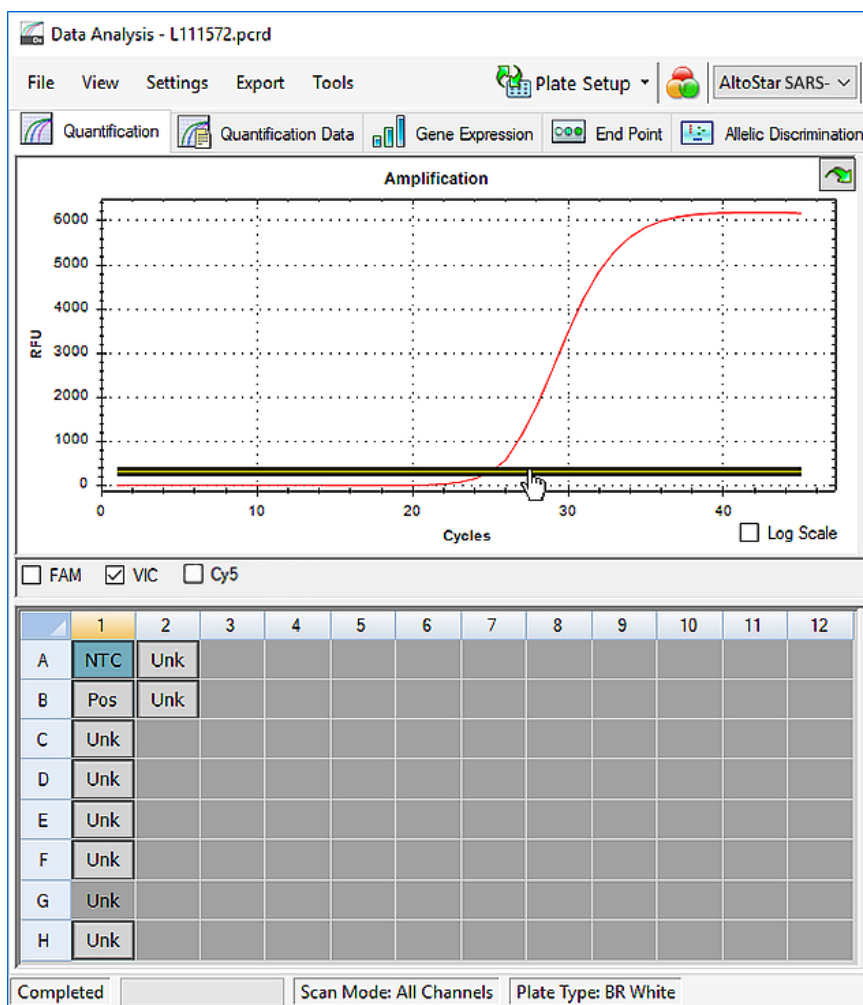


Figura 9: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): impostazione della soglia VIC™

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. A sinistra della finestra Data Analysis (Analisi dei dati) togliere il segno di spunta dalla casella di controllo **VIC** e spuntare la casella di controllo **FAM** per il canale di rilevamento del gene E (vedere figura 10).

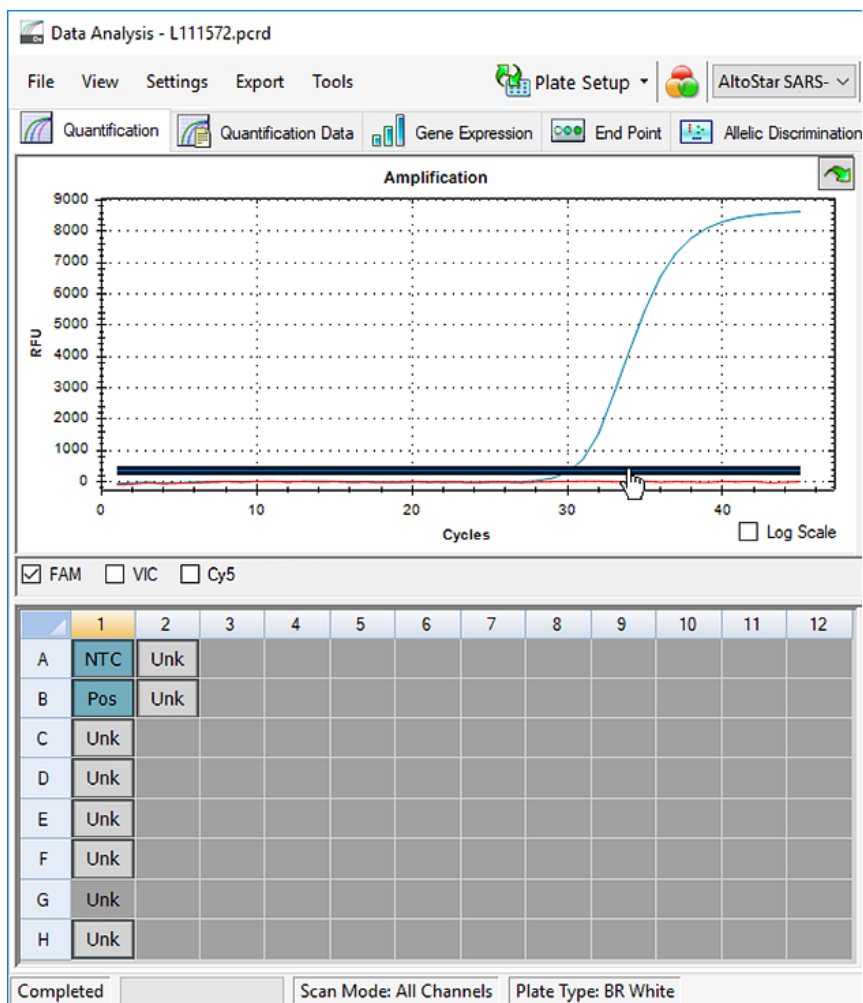


Figura 10: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): impostazione della soglia FAM™

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

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

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® SARS-CoV-2 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).

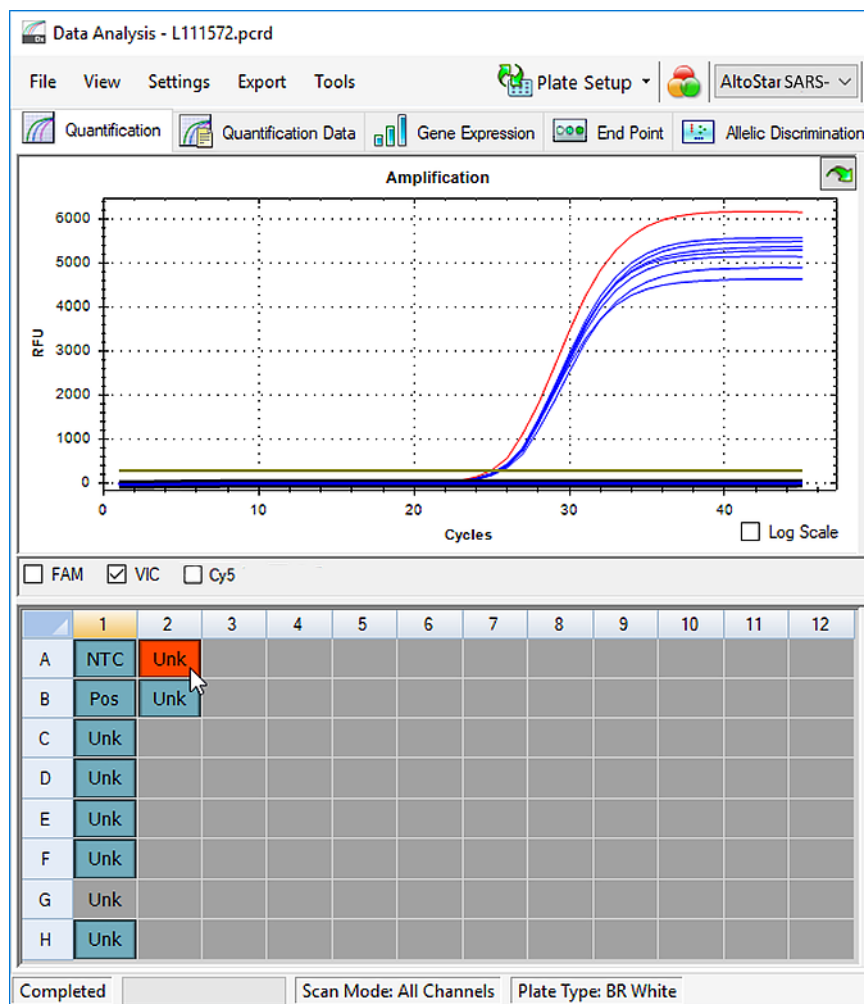


Figura 11: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): pozzetto invalido

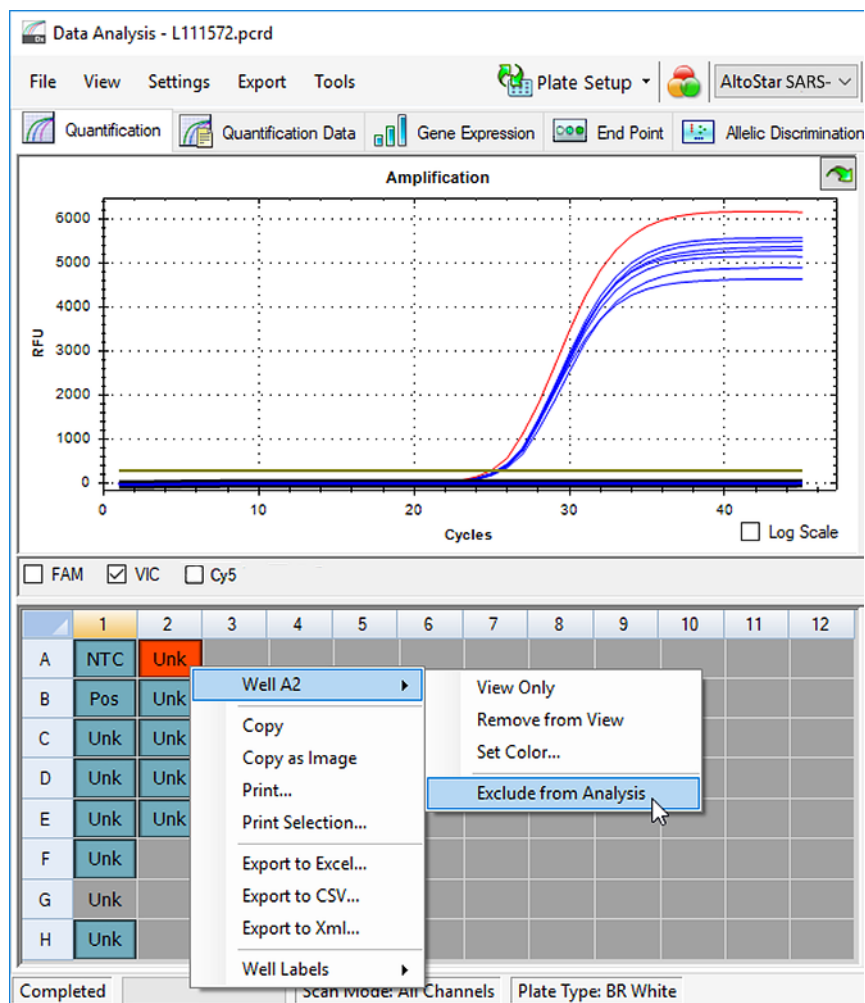


Figura 12: Finestra Data Analysis (Analisi dei dati): esclusione del pozzetto invalido dall'analisi

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		
	FAM™ (gene E)	Cy5 (gene S)	VIC™ (IC)
PC	+	+	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 di un singolo campione è **invalido**, se i segnali dei canali di rilevamento VIC™ (IC), FAM™ (gene E) e Cy5 (gene S) 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
FAM™ (gene E)	Cy5 (gene S)	VIC™ (IC)	
+	+	+/-*	Risultato valido
+	-	+/-*	Risultato valido
-	+	+/-*	Risultato valido
-	-	+	Risultato valido
-	-	-	Risultato invalido

* Il rilevamento dell'IC non è richiesto quando viene rilevato il target gene E e/o gene S. Una carica elevata di RNA di gene E e/o di gene S 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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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 altaDiagnostics. 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 altaDiagnostics (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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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):

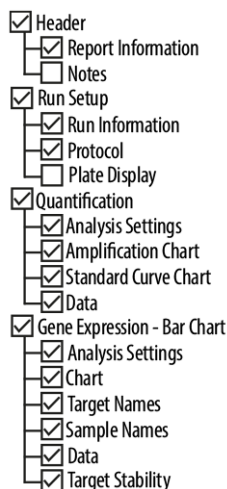


Figura 13: Finestra di dialogo Report (Report)

6. Selezionare o deselectare 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® SARS-CoV-2 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 ciascuna per il **Target gene E e gene S** 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	Cy5	S gene	NTC	NTC 131119012004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	
B01	Cy5	S gene	Pos Ctrl	SARS-CoV-2 PC 131119012004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	29.25	29.25	0.000	
B02	Cy5	S gene	Unkn	Sample 8 00000008	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
C01	Cy5	S gene	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
D01	Cy5	S gene	Unkn	Sample 2 00000002	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
E01	Cy5	S gene	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
F01	Cy5	S gene	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
H01	Cy5	S gene	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
A01	FAM	E gene	NTC	NTC 131119012004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	
B01	FAM	E gene	Pos Ctrl	SARS-CoV-2 PC 131119012004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	30.07	30.07	0.000	
B02	FAM	E gene	Unkn	Sample 8 00000008	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
C01	FAM	E gene	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	29.25	29.25	0.000	qualitative
D01	FAM	E gene	Unkn	Sample 2 00000002	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
E01	FAM	E gene	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
F01	FAM	E gene	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
H01	FAM	E gene	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	N/A	0.00	0.000	qualitative
A03	VIC	Internal Control	NTC	NTC 131119012004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	24.91	24.91	0.000	
B02	VIC	Internal Control	Unkn	SARS-CoV-2 PC 131119012004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	25.30	25.30	0.000	qualitative
C01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 1 00000001	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	25.34	25.34	0.000	qualitative
D01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 2 00000002	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	25.45	25.45	0.000	qualitative
E01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 3 00000003	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	25.27	25.27	0.000	qualitative
F01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 4 00000004	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	25.38	25.38	0.000	qualitative
H01	VIC	Internal Control	Unkn	Sample 6 00000006	AltoStar SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	25.40	25.40	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 Gene E e Gene S** e il termine *qualitative* (qualitativo) nella colonna **Well Note** (Nota pozzetto).
4. In queste righe, fare riferimento alla colonna **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

Canale di rilevamento			Interpretazione dei risultati
FAM™ (Gene E)	Cy5 (Gene S)	VIC™ (IC)	
+	+	+ ⁶⁾	Rilevato RNA specifico di sottogenere di B-βCoV e SARS-CoV-2. Positivo per SARS-CoV-2.
+	-	+ ⁶⁾	Rilevato solo RNA specifico di sottogenere di B-βCoV. Presunto positivo per SARS-CoV-2. ^{7),8)}
-	+	+ ⁶⁾	È stato rilevato solo RNA specifico di SARS-CoV-2. Positivo per SARS-CoV-2. ⁷⁾
-	-	+	Non rilevato RNA specifico né di sottogenere B-βCoV né di SARS-CoV-2. Il campione non contiene quantità rilevabili di RNA specifico di SARS-CoV-2.
-	-	-	Inibizione della RT-PCR o guasto del reagente. Ripetere i test dal campione originale o raccogliere e testare un nuovo campione.

⁶⁾ Il rilevamento dell'IC nel canale di rilevamento VIC™ non è necessario per i risultati positivi del canale di rilevamento FAM™ o del canale di rilevamento Cy5. Un'elevata carica di RNA di sottogenere B-βCoV (gene E target) e/o di SARS-CoV-2 (gene S target) nel campione può portare a segnali di controllo interni ridotti o assenti.

⁷⁾ Il rilevamento in uno solo dei due rispettivi canali di rilevamento per il gene E e per il gene S potrebbe essere dovuto a una bassa concentrazione di RNA virale vicina al limite di rilevabilità o alla mutazione di una delle due sequenze target.

⁸⁾ Il campione può essere rianalizzato ripetendo estrazione e RT-PCR. Se il risultato ripetuto resta presunto positivo, è allora possibile effettuare un ulteriore test di conferma.

8. Utilizzo di AltoStar® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 deve essere validata dall'utente.

Il kit AltoStar® SARS-CoV-2 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 SARS-CoV-2 e compromettere le prestazioni del prodotto.

8.2.2 Preparazione della master mix

Tutti i componenti del kit AltoStar® SARS-CoV-2 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 pipettaggio che segue:

Tab. 10: Schema di pipettaggio (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 (PC o NTC).

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

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

- Assicurarsi che siano utilizzati almeno 1 PC e 1 NTC per ciascun processo.
- Miscelare accuratamente i campioni e i controlli con la master mix pipettando su e giù.
- 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).
- 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® SARS-CoV-2 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
Gene E	E gene	FAM™	(Nessuno)
Gene S	S gene	Cy5	(Nessuno)
Controllo interno	IC	JOE™	(Nessuno)

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

Tab. 14: Profilo termico e acquisizione dei fluorofori

	Stadio	Ripeti- zioni 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® SARS-CoV-2 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

La valutazione della performance del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 è stata effettuata usando coltura cellulare di SARS-CoV-2 in surnatante inattivata termicamente (*BetaCoV/Munich/ChVir984/2020* fornita dall'Institute of Virology, Charité, Berlino; Germania).

9.1 Tamponi respiratori

9.1.1 Sensibilità analitica

Per la determinazione del limite di rilevabilità (LoD) è stata generata una serie di diluizioni di coltura cellulare di SARS-CoV-2 in surnatante inattivata termicamente (*BetaCoV/Munich/ChVir984/2020* fornita dall'Institute of Virology, Charité, Berlino; Germania) diluita in terreno di trasporto universale (UTM®, Copan) contenente matrice nasale simulata [5% p/v Mucina, 5% v/v Sangue, 0,8% v/v NaCl (soluzione salina al 95%) e 0,00002% p/v DNA genomico umano (richiesta di 510k per test BD MAX™ MRSA XT; numero di accesso: K133605)] nell'intervallo da 1,00E+00 a 1,00E-04 UFP/ml.

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

- 3 lotti di AltoStar® SARS-CoV-2 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 per il gene E

Concentrazione [UFP/ml]	N [totale]	N [positivo]	Tasso di successo [%]
1,00E+00	24	24	100
3,16E-01	24	24	100
1,00E-01	24	24	100
3,16E-02	24	24	100
1,00E-02	24	21	88
3,16E-03	24	12	50
1,00E-03	24	4	17
3,16E-04	24	1	4
1,00E-04	24	2	8

Il LoD del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 per il rilevamento di SARS-CoV-2 in UTM® è 0,025 UFP/ml (intervallo di confidenza del 95%: 0,014-0,060 UFP/ml).

Tab. 16: Risultati PCR utilizzati per il calcolo della sensibilità analitica del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 per il gene S

Concentrazione [UFP/ml]	N [totale]	N [positivo]	Tasso di successo [%]
1,00E+00	24	24	100
3,16E-01	24	24	100
1,00E-01	24	24	100
3,16E-02	24	24	100
1,00E-02	24	23	96
3,16E-03	24	15	63
1,00E-03	24	4	17
3,16E-04	24	2	8
1,00E-04	24	1	4

Il LoD del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 per il rilevamento di SARS-CoV-2 in UTM® è 0,014 UFP/ml (intervallo di confidenza del 95%: 0,008-0,032 UFP/ml).

9.1.2 Specificità analitica

La specificità analitica del kit AltoStar® SARS-CoV-2 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 SARS-CoV-2 fossero rilevati.

Per la verifica della specificità analitica del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 sono stati effettuati gli esperimenti che seguono (vedere i capitoli da 9.1.2.1 Campioni negativi a 9.1.2.4 Reattività crociata).

9.1.2.1 Campioni negativi

35 campioni di tampone respiratorio negativi per SARS-CoV-2 da singoli donatori sono stati testati con il kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5. Tutti i campioni (35 su 35) sono risultati negativi per il RNA specifico di SARS-CoV-2 e positivi per l'IC. La specificità analitica del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 per i campioni da tamponi respiratori è $\geq 95\%$.

9.1.2.2 Sostanze interferenti

Per valutare l'influenza delle sostanze potenzialmente interferenti esogene sulle prestazioni del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5, sostanze selezionate sono state aggiunte al terreno UTM® contenente matrice nasale simulata. Questi campioni contenevano rispettivamente SARS-CoV-2 in una concentrazione di $3 \times \text{LoD}$ (0,075 UFP/ml) e zero SARS-CoV-2.

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

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

- Sostanze esogene
 - Spray nasale decongestionante: Xilometazolina cloridrato e dexpantenolo (nasic® Nasenspray)
 - Spray nasale antiallergico: Beclometasone dipropionato (ratioAllerg® Heuschnupfenspray)

ATTENZIONE



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

9.1.2.3 Inclusività

L'inclusività del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 è stata valutata per diversi isolati di SARS-CoV-2 per via umida o *in silico*. I risultati vengono mostrati nelle tabelle 17 e 18.

Tab. 17: Inclusività (per via umida) di AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5

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

* Per la determinazione del LoD del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 è stato usato il ceppo *BetaCoV/Munich/ChVir984/2020*

Tab. 18: Inclusività [analisi *in silico* per 2.993.884 sequenze di genoma intero di SARS-CoV-2 pubblicate in GISAID e.V. (www.gisaid.org) alla data 10 ottobre 2021 e 518.615 sequenze di genoma intero pubblicate nel National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) alla data del 10 ottobre 2021 per gene E e gene S target: Kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5]

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

* La sequenza (ID di accesso EPI_ISL_415593, GISAID) presentava 4 mismatch nel sito di legame della sonda per il gene S. Questa sequenza è stata pubblicata il 10 marzo 2020 ed è originaria di Washington, Stati Uniti. Da allora, nessuna delle sequenze pubblicate ha presentato un numero così alto di mismatch. La sequenza è stata commentata dagli autori nel modo seguente: "Attenzione. La presenza di alcuni segmenti di NNN (1,74% della sequenza complessiva)" indica una qualità non ideale del sequenziamento; di conseguenza non è stato studiato l'impatto degli oligonucleotidi specifici del gene S.

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

In base alla posizione, è estremamente improbabile che gli eventi di mutazione che portano a ≤ 2 mismatch in un'unica sequenza di oligonucleotidi abbiano un impatto negativo significativo sulle prestazioni del test. Tutte le sequenze simili (≤ 2 mismatch) analizzate per via umida in esperimenti di laboratorio per scopi di sorveglianza post-market dei kit RealStar®, FlexStar® e AltoStar® per il rilevamento di SARS-CoV-2 hanno finora confermato che le prestazioni non sono state compromesse da tali mutazioni. Con l'eccezione di un'unica sequenza, nessuna delle altre sequenze analizzate ha presentato mismatch in più di un oligonucleotide e nessuna delle sequenze disallineate ha presentato mismatch con entrambi i sistemi di rilevamento specifici (gene E e gene S), pertanto non ci si attende che la reattività degli specifici oligonucleotidi inclusi nei kit RealStar®, FlexStar® e AltoStar® per il rilevamento del SARS-CoV-2 ne sia compromessa.

9.1.2.4 Reattività crociata

La specificità analitica del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 rispetto alla reattività crociata con altri patogeni diversi da SARS-CoV-2 è stata valutata analizzando:

- Patogeni correlati a SARS-CoV-2
- Patogeni che causano sintomi simili all'infezione da SARS-CoV-2
- Patogeni che è probabile si presentino nei pazienti affetti da un'infezione da SARS-CoV-2

Con l'eccezione di SARS-coronavirus* il kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 non ha presentato reattività crociata con nessuno dei patogeni che seguono:

- Adenovirus
- *Bordetella pertussis*
- *Candida albicans*
- *Chlamydia pneumoniae*
- Enterovirus
- *Haemophilus influenzae*
- Coronavirus umano 229E
- Coronavirus umano NL63
- Coronavirus umano OC43
- Metapneumovirus umano (hMPV)
- Influenzavirus A
- Influenzavirus B
- *Legionella pneumophila*
- MERS-coronavirus
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- Parainfluenza virus 1-4
- *Pneumocystis jirovecii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- Virus respiratorio sinciziale A
- Virus respiratorio sinciziale B
- Rhinovirus
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus salivarius*

* È stato ottenuto un risultato positivo per SARS-coronavirus con il kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 nel canale FAM™ in quanto il gene E target non è specifico di SARS-CoV-2, ma rileva tutti i betacoronavirus del sottogenere B, compreso il SARS-coronavirus.

ATTENZIONE



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

9.1.3 Precisione

La precisione del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 è stata valutata utilizzando un pannello costituito da:

- 1 campione fortemente positivo per SARS-CoV-2 [1,25 UFP/ml (50 x LoD)] in UTM®
- 1 campione debolmente positivo per SARS-CoV-2 [0,075 UFP/ml (3 x LoD)] in UTM®
- 1 campione UTM® negativo per SARS-CoV-2

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

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

- 3 lotti di AltoStar® SARS-CoV-2 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^*) nei campioni fortemente positivi per SARS-CoV-2 (vedere tabella 19)
- Valori di ciclo soglia (C_q^*) per l'IC nei campioni negativi per SARS-CoV-2 (vedere tabella 20)

* 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. 19: Dati di precisione [CV% (valori C_q)] per campioni UTM® fortemente positivi per SARS-CoV-2

	Campione fortemente positivo per SARS-CoV-2 (C_q nel canale FAM™, gene E target)	Campione fortemente positivo per SARS-CoV-2 (C_q nel canale Cy5, gene S target)
Variabilità intra-test	0,15-0,61	0,02-0,34
Variabilità inter-lotto	0,44	0,41
Variabilità totale	1,83	1,22

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

Tab. 20: Dati di precisione [CV% (valori C_q)] per l'IC nei campioni UTM® negativi per SARS-CoV-2

	IC
Variabilità intra-test	0,12-0,49
Variabilità inter-lotto	0,39
Variabilità totale	1,02

9.1.4 Percentuale totale di guasti

La robustezza del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 è stata valutata testando 35 campioni di tampone respiratorio umano negativi per SARS-CoV-2 da singoli donatori con aggiunta di SARS-CoV-2 fino a una concentrazione finale di 3 x LoD (0,075 UFP/ml). Tutti i campioni (35 su 35) hanno dato risultati positivi nei canali di rilevamento fluorescenti specifici di SARS-CoV-2 (FAM™ e Cy5).

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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 è stato valutato in uno studio comparativo con il kit marcato CE Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks). Retrospectivamente, 110 campioni di tampone respiratorio sono stati testati in parallelo con il kit Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks) e con il kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5.

Il kit Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks) è stato usato in combinazione con il sistema *mSample Preparation Systems RNA* (Abbott) e lo strumento *m2000sp Instrument* (Abbott).

Il kit AltoStar® SARS-CoV-2 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 104 campioni sono mostrati in tabella 21.

Tab. 21: Risultati della valutazione della sensibilità e specificità diagnostica per SARS-CoV-2 nei campioni da tamponi respiratori

		Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks)	
		POSITIVO	NEGATIVO
AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5	POSITIVO	51	2
	NEGATIVO	0	51

Sensibilità e specificità diagnostica del kit AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 rispetto al kit Bosphore Novel Coronavirus (2019-nCoV) Detection Kit (Anatolia Geneworks) erano rispettivamente del 100% e del 96%.

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® SARS-CoV-2 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] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise e David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10ª Edizione. ASM Press, 2011.
- [2] Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Terza Edizione. Mosby, 2010.

14. Marchi e brevetti

4s3™ (4titude); AltoStar® (altona Diagnostics); ABI Prism®, QuantStudio™ (Applied Biosystems); BD MAX™ (BD); CFX96™, CFX Manager™ (Bio-Rad); Universal Transport Medium™, UTM® (Copan); nasic® (Klosterfrau Healthcare Group); Rotor-Gene® (QIAGEN); ratioAllerg® (ratiopharm); 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® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5 è un kit diagnostico marcato CE secondo la direttiva diagnostica *in vitro* europea 98/79/CE.



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

Non disponibile in tutti i paesi.

© 2021 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.

15. Simboli

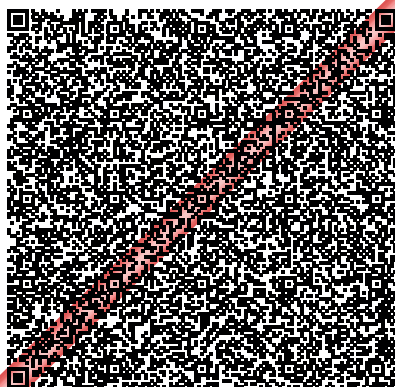
Simbolo	Spiegazione
	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
	Global Trade Item Number
	Codice lotto
	Indice
	Colore del tappo
	Numero di catalogo
	Numero
	Componente
	Istruzioni per l'uso
	Contiene sufficienti per “n” test / reazioni (rxns)
	Limite di temperatura
	Da usare entro
	Fabbricante
	Attenzione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

Simbolo	Spiegazione
	Nota
	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® SARS-CoV-2 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 23.

AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5



Protocol Version:

Checksum: 5687248E75F8BFED894A31601106219CB09EDEFD

1

Figura 15: Codice a barre del protocollo di test per AltoStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.5

Tab. 22: Changelog per il protocollo di test

Versione protocollo	Aggiornamenti della release
1	Versione iniziale

Tab. 23: Informazioni per l'integrazione LIMS

Utilizzo	Dati
Ordine test (LIMS → AltoStar® AM16)	AltoStar® SARS-CoV-2 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	E gene
Risultato del test (CFX96™ DW Dx → LIMS), canale 2	Internal Control
Risultato del test (CFX96™ DW Dx → LIMS), canale 4	S gene

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. 24: Cronologia delle revisioni

Identificativo	Data di emissione [mese/anno]	Modifiche
MAN-AS0821547- IT-S01	10/2021	Release iniziale

pagina lasciata vuota volontariamente

pagina lasciata vuota volontariamente

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

