

## Istruzioni per l'uso

# RealStar<sup>®</sup> SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

01/2023 IT



# RealStar<sup>®</sup>

## SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0

Solo per uso di ricerca!

(RUO)



821005



384



01 2023



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

## Indice

<b>1.</b>	<b>Applicazione .....</b>	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Componenti del kit.....</b>	<b>5</b>
<b>3.</b>	<b>Conservazione.....</b>	<b>6</b>
<b>4.</b>	<b>Informazioni generali .....</b>	<b>6</b>
<b>5.</b>	<b>Descrizione del prodotto .....</b>	<b>7</b>
5.1	Strumenti per PCR in tempo reale .....	8
<b>6.</b>	<b>Procedura .....</b>	<b>9</b>
6.1	Preparazione del campione .....	9
6.2	Preparazione della Master Mix.....	10
6.3	Preparazione della reazione .....	12
<b>7.</b>	<b>Programmazione dello strumento per PCR in tempo reale .....</b>	<b>13</b>
7.1	Impostazioni .....	13
7.2	Sonde fluorescenti (coloranti) .....	13
7.3	Profilo termico e acquisizione dei coloranti .....	14
<b>8.</b>	<b>Analisi dei dati.....</b>	<b>14</b>
8.1	Interpretazione dei risultati .....	15
8.1.1	Analisi qualitativa .....	15
<b>9.</b>	<b>Assistenza tecnica .....</b>	<b>16</b>
<b>10.</b>	<b>Marchi e brevetti.....</b>	<b>16</b>
<b>11.</b>	<b>Spiegazione dei simboli .....</b>	<b>17</b>

## 1. Applicazione

Il kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è un sistema di reagenti, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale, per il rilevamento qualitativo dell'RNA specifico di betacoronavirus di lignaggio B (B-βCoV) e di sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2).

**Solo per uso ricerca! Uso non previsto in procedure diagnostiche.**

## 2. Componenti del kit

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

\* Il Positive Control (controllo positivo) contiene entrambi i target, lignaggio B-βCoV e SARS-CoV-2

Internal Control = controllo interno

Positive Control = controllo positivo

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

### 3. Conservazione

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

### 4. 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.

## 5. Descrizione del prodotto

Il kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 è un sistema di reagenti, basato sulla tecnologia PCR in tempo reale, per il rilevamento qualitativo dell'RNA specifico di betacoronavirus di lignaggio B (B-βCoV) e di sindrome respiratoria acuta grave coronavirus 2 (SARS-CoV-2).

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

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

La sonda specifica per l'RNA di lignaggio B-βCoV (gene target E) è marcata con il fluoroforo FAM™ mentre la sonda specifica per l'RNA di SARS-CoV-2 (gene target S) è marcata con il fluoroforo Cy5. La sonda specifica per il controllo interno (IC) è marcata con il fluoroforo JOE™.

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

Il test comprende tre processi in un'unica provetta:

- Trascrittasi inversa dell'RNA target e del controllo interno in cDNA
- Amplificazione per PCR del cDNA target e del controllo interno
- Rilevamento simultaneo dei prodotti di PCR mediante sonde marcate con colorante fluorescente

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

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

Internal Control = controllo interno

Positive Control = controllo positivo

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

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

### 5.1 Strumenti per PCR in tempo reale

Il kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 può essere utilizzato con i seguenti strumenti di PCR in tempo reale:

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



**NOTA**



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

## 6. Procedura

### 6.1 Preparazione del campione

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

La qualità dell'RNA estratto ha un profondo impatto sulle prestazioni dell'intero sistema di test. È necessario garantire che il sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico sia compatibile con la tecnologia PCR in tempo reale. I seguenti kit e sistemi sono indicati per l'estrazione dell'acido nucleico:

- AltoStar® Automation System AM16 (Altona Diagnostics)
- QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)
- QIASymphony® (QIAGEN)
- NucliSENS® easyMAG® (bioMérieux)
- MagNA Pure 96 System (Roche)
- m2000sp (Abbott)
- Maxwell® 16 IVD Instrument (Promega)
- VERSANT® kPCR Molecular System SP (Siemens Healthcare)

Potrebbero anche essere appropriati sistemi e kit di estrazione di acidi nucleici alternativi.

Se si utilizza una procedura di preparazione del campione basata su colonna di centrifugazione che include tamponi di lavaggio contenenti etanolo, si consiglia di effettuare un'ulteriore fase di centrifugazione per 1 minuto a circa 17.000 x g (~13.000 rpm), usando una nuova provetta di raccolta, prima dell'eluizione dell'acido nucleico.

**ATTENZIONE**



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

**ATTENZIONE**



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

Per ricevere ulteriori informazioni e assistenza tecnica riguardanti pre-trattamento e preparazione dei campioni contattare il nostro servizio di assistenza tecnica (vedere il capitolo 9. Assistenza tecnica).

## 6.2 Preparazione della Master Mix

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

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

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

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

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

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

**ATTENZIONE**

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

**ATTENZIONE**

*Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione degli acidi nucleici, non aggiungere mai l'IC direttamente al campione.*

**6.3 Preparazione della reazione**

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

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

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

## 7. Programmazione dello strumento per PCR in tempo reale

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

Per istruzioni dettagliate sulla programmazione dell'utilizzo del kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 su specifici strumenti per PCR in tempo reale contattare la nostra assistenza tecnica (vedere il capitolo 9. Assistenza tecnica).

### 7.1 Impostazioni

- Definire i seguenti parametri:

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

### 7.2 Sonde fluorescenti (coloranti)

- Definire le seguenti sonde fluorescenti (coloranti):

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

### 7.3 Profilo termico e acquisizione dei coloranti

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

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

## 8. Analisi dei dati

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

Per istruzioni dettagliate sull'analisi dei dati generati con kit RealStar® SARS-CoV-2 RT-PCR Kit 1.0 su diversi strumenti PCR in tempo reale contattare la nostra assistenza tecnica (vedere il capitolo 9. Assistenza tecnica).

## 8.1 Interpretazione dei risultati

### 8.1.1 Analisi qualitativa

Canale			Interpretazione dei risultati
FAM™ (E gene)	Cy5 (S gene)	JOE™ (Controllo interno)	
+	+	+	Rilevato RNA specifico di lignaggio B-βCoV e SARS-CoV-2. Positivo per SARS-CoV-2.
+	-	+	Rilevato solo RNA specifico di lignaggio B-βCoV. Presunto positivo per SARS-CoV-2. <sup>1,2</sup>
-	+	+	Rilevato solo RNA specifico di SARS-CoV-2. Positivo per SARS-CoV-2. <sup>1</sup>
-	-	+	Non è stato rilevato RNA specifico né di lignaggio 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.

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

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

<sup>2</sup> Il campione può essere rianalizzato ripetendo l'estrazione e l'RT-PCR. Se il risultato ripetuto resta presunto positivo, è possibile condurre un ulteriore test di conferma.

## 9. Assistenza tecnica

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

**e-mail:**                **support@altona-diagnostics.com**

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

## 10. Marchi e brevetti

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














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



**Solo per uso ricerca! Uso non previsto in procedure diagnostiche.**

© 2023 altona Diagnostics GmbH; tutti i diritti riservati.



## 11. Spiegazione dei simboli

Simbolo	Spiegazione
	Solo per uso ricerca!
	Lotto
	Colore del tappo
	Numero di catalogo
	Contenuto
	Numero
	Componente
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Contiene sufficienti per "n" test / reazioni (rxns)
	Limite di temperatura
	Da usare entro
	Fornitore
	Attenzione: Evidenzia istruzioni per l'uso o procedure che, se non vengono seguite correttamente, potrebbero causare lesioni personali o influire sulle prestazioni del prodotto. Contattare l'assistenza tecnica di Altona Diagnostics per avere assistenza.

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



**always a drop ahead.**

altona Diagnostics GmbH  
Mörkenstr. 12  
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0  
fax +49 40 548 0676 10  
e-mail [info@altona-diagnostics.com](mailto:info@altona-diagnostics.com)

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

