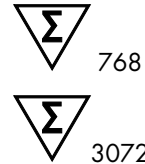


Luglio 2021

Istruzioni per l'uso (manuale) di *artus*[®] SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit



Versione 1

IVD

Per uso diagnostico in vitro

Per uso sugli strumenti Rotor-Gene[®] Q MDx 5plex HRM e ABI[®] 7500
Fast Dx



REF

4511460, 4511469



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA

R2

Contenuto

Uso previsto	4
Descrizione e principio.....	5
Informazioni sull'agente patogeno.....	5
Sommario e spiegazioni.....	6
Materiali in dotazione.....	9
Contenuto del kit.....	9
Componenti del kit.....	10
Piattaforme e software.....	11
Materiali necessari ma non in dotazione.....	12
Materiali di consumo.....	12
Strumentazione.....	12
Avvertenze e precauzioni.....	13
Informazioni sulla sicurezza.....	13
Precauzioni.....	14
Conservazione e manipolazione dei reagenti.....	15
Trasporto, conservazione e manipolazione dei campioni.....	15
Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni.....	15
Protocollo: Preparazione dei campioni e rilevazione del SARS-CoV-2 sull'RGQ MDx 5plex HRM.....	16
Protocollo: Preparazione dei campioni e rilevazione del SARS-CoV-2 su ABI 7500 Fast Dx.....	22
Risultati.....	27

Interpretazione dei risultati.....	29
Limitazioni	31
Prestazioni.....	32
Sensibilità analitica (limite di sensibilità).....	32
Studi di specificità analitica (inclusività ed esclusività/reattività crociata)	32
Sostanze interferenti	39
Precisione.....	40
Prestazioni cliniche.....	41
Bibliografia.....	45
Guida alla risoluzione dei problemi.....	46
Simboli.....	48
Informazioni di contatto.....	49
Informazioni per gli ordini	50
Cronologia delle revisioni del documento.....	51

Uso previsto

L'*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit è un test real-time RT-PCR previsto per la rilevazione qualitativa dell'acido nucleico da tamponi nasofaringei (Nasopharyngeal Swab, NPS), tamponi nasali e tamponi orofaringei per SARS-CoV-2 di individui con segni e sintomi di infezione oppure senza sintomi e altre ragioni per sospettare un'infezione da COVID-19.

È previsto come ausilio nella diagnosi di COVID-19 nella fase acuta dell'infezione in combinazione con le osservazioni cliniche, l'anamnesi e i dati epidemiologici.

Il *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit è previsto per l'uso in un ambiente di laboratorio di biologia molecolare da parte di professionisti, ad esempio personale di laboratorio appositamente istruito nelle tecniche di real-time PCR e procedure diagnostiche *in vitro*.

Risultati negativi non precludono la presenza dell'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per le decisioni sul trattamento del paziente.

L'*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit è previsto per l'uso con il Rotor-Gene Q (RGQ) MDx System o ABI 7500 Fast Dx come sistemi per real-time PCR.

Descrizione e principio

Informazioni sull'agente patogeno

I coronavirus, un genere della famiglia delle *Coronaviridae*, sono grandi virus a RNA a filamento positivo avvolto da capsidi che causano una malattia molto virulenta negli uomini e negli animali domestici (1). È noto che le infezioni umane da coronavirus sono un terzo delle comuni infezioni influenzali ed è anche ben noto che in neonati prematuri causano infezioni delle alte vie respiratorie che richiedono il ricovero ospedaliero (2).

Un nuovo membro della famiglia dei coronavirus ha causato un'epidemia della malattia respiratoria nella città di Wuhan in Cina (1, 3). Dapprima denominato nuovo coronavirus (2019-nCoV), il SARS-CoV-2 è diverso dal SARS-CoV (1, 3), che è stato responsabile dell'epidemia del 2003, e dal MERS-CoV, che sta circolando nel Medio Oriente dal 2012. Il SARS-CoV-2 è l'agente causativo della COVID-19. L'RNA del SARS-CoV-2 può essere rilevato nelle fasi precoci e acute dell'infezione da vari campioni delle vie respiratorie superiori (tamponi nasali, orofaringei e nasofaringei) (3).

Combinati con l'anamnesi del paziente l'epidemiologia del SARS-CoV-2, gli esami RT-PCR sono diventati lo standard d'elezione per la diagnosi del SARS-CoV-2. L'European Centre for Disease Prevention and Control (Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie, ECDC) ha proposto di combinare gli esami basati su RT-PCR con immunodosaggi per monitorare lo stato dell'infezione e valutare l'efficacia delle misure restrittive adottate per tenere sotto controllo l'epidemia (4, 5).

I target del SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Assay sono 2 geni virali (geni N1 e N2) rilevati con lo stesso canale di fluorescenza. I target dei due geni non sono differenziati e l'amplificazione di uno dei due o di entrambi produce un segnale di fluorescenza. Risultati positivi sono indicativi della presenza del virus SARS-CoV-2, ma non escludono una co-infezione con altri patogeni. D'altro canto, risultati negativi dei test RT-PCR non escludono la presenza dell'infezione.

Sommario e spiegazioni

Il *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit costituisce un sistema pronto all'uso con una fase di preparazione dei campioni semplice, seguita dal rilevamento dell'RNA del SARS-CoV-2 mediante RT-PCR sul sistema RGQ MDx o sulle piattaforme ABI 7500 Fast Dx (Figura 1). Il SARS-CoV-2 UM Amp Buffer contiene reagenti ed enzimi per l'amplificazione specifica di una sequenza di 72 bp e regioni di 67 bp del genoma dell'RNA del SARS-CoV-2 e per la loro rilevazione diretta nel canale di fluorescenza "Green" degli strumenti RGQ MDx e con il filtro fluorescente A/1 del ABI 7500 Fast Dx.

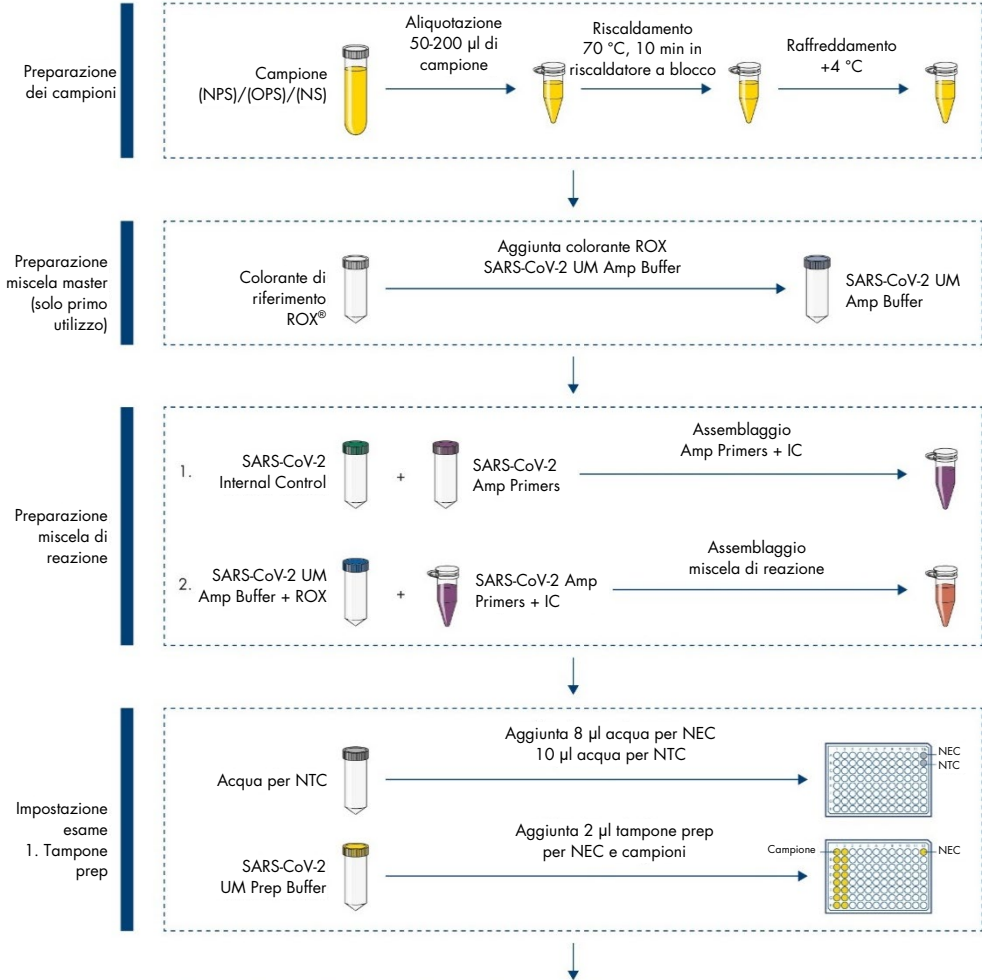
La miscela di primer e sonde del *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit contiene inoltre gli oligonucleotidi necessari per le amplificazioni dell'RNAse P. Se rilevati nel canale di fluorescenza "Yellow" dello strumento RGQ MDx o con il filtro fluorescente B/2 ABI 7500 Fast Dx, questi ampliconi assicurano che sul tampone è stato raccolto un campione biologico sufficiente. Questo controllo è fondamentale per assicurare la presenza di campioni biologici in campioni negativi a SARS-CoV-2. Deve essere sempre possibile rilevare un'amplificazione, altrimenti si dubita della qualità del campione.

L'*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit contiene inoltre un terzo sistema di amplificazione eterologo che consente di rivelare una possibile inibizione per la RT-PCR. Questa viene rilevata con un controllo interno (Internal Control, IC) dell'RNA nel canale di fluorescenza "Red" degli strumenti RGQ MDx e con il filtro di fluorescenza E/5 di ABI 7500 Fast Dx. Poiché il controllo interno (Internal Control, IC) è incluso nel SARS-CoV-2 Amp Primers Mix, la sua amplificazione dovrebbe essere costante, a meno che nel campione o nella reazione RT-PCR non sia presente un inibitore che ritarda o impedisce l'amplificazione.

I controlli esterni positivi e negativi (rispettivamente SARS-CoV-2 Positive Control e acqua priva di nucleasi utilizzata come NTC) forniti nell'*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit permettono di attestare le prestazioni della fase PCR. Si raccomanda vivamente di utilizzare un controllo senza estrazione (SARS-CoV-2 UM Prep Buffer utilizzato come NEC) per verificare l'assenza di inibitori di RT-PCR nel tampone della preparazione.

Questi controlli monitorano insieme l'efficacia della trascrittasi inversa e le fasi della PCR.

Flusso di lavoro per *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit



(Continua alla pagina seguente)

(Continua dalla pagina precedente)

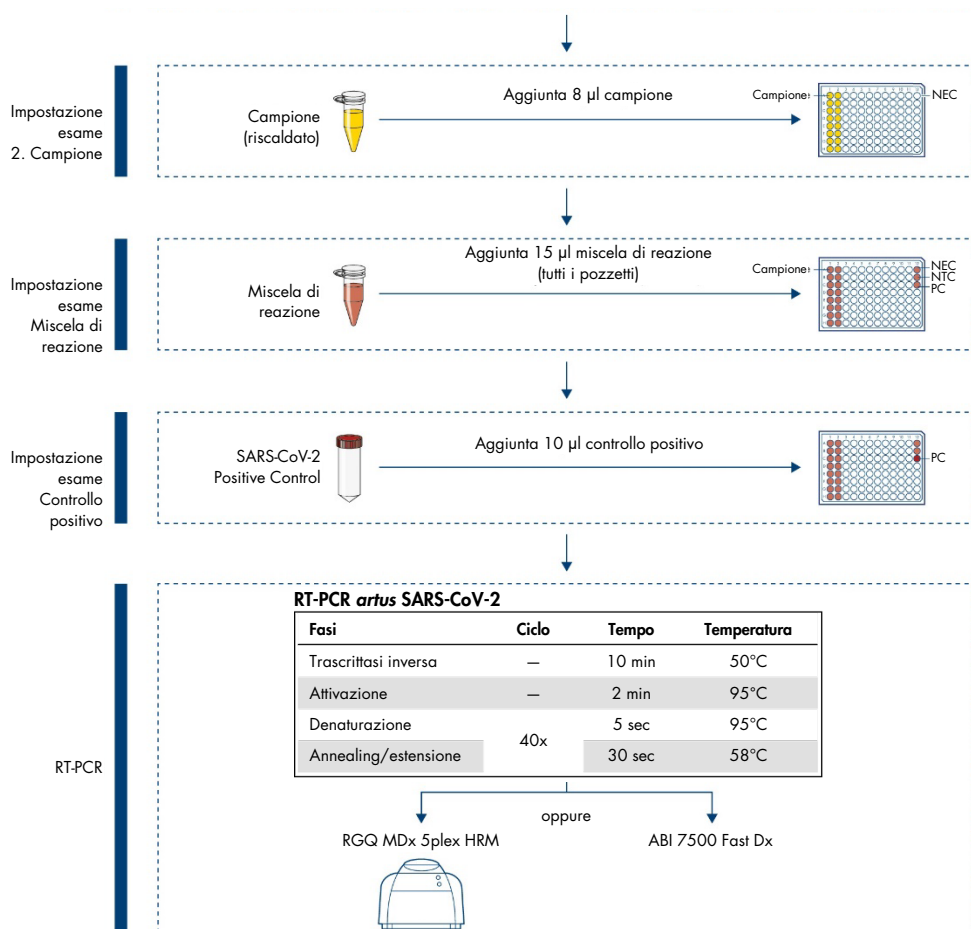


Figura 1 Flusso di lavoro con *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit					
N. catalogo				4511460	4511469
Numero di reazioni				768	3072
Colore provetta	Colore tappo	Identità	ID provetta	Volume (µl)	Volume (µl)
Trasparente	Giallo	SARS-CoV-2 UM Prep Buffer	Preparation Buffer (Tampone di preparazione)	2 x 930	8 x 930
Trasparente	Blu	SARS-CoV-2 UM Amp Buffer	Master Mix (Miscela master)	4 x 1440	16 x 1440
Trasparente	Viola	SARS-CoV-2 Amp Primers	Primers and Probes (Primer e sonde)	4 x 1680	16 x 1680
Trasparente	Verde	SARS-CoV-2 Internal Control	Internal Control (Controllo interno) (IC)	1 x 1390	4 x 1390
Trasparente	Rosso	SARS-CoV-2 Positive Control	Positive Control (Controllo positivo)	1 x 220	4 x 220
Trasparente	Trasparente	Water for NTC (Acqua per NTC)	Water (Acqua) (NTC)	1 x 1900	4 x 1900
Trasparente	Trasparente	ROX Reference Dye (Colorante di riferimento ROX)	ROX Dye (Colorante ROX)	1 x 210	4 x 210

Componenti del kit

Reagenti

In ogni provetta, i volumi di reagente sono stati ottimizzati per 8 lotti di 96 campioni (per il kit con 768 reazioni) oppure per 32 lotti di 96 reazioni (per il kit con 3072 reazioni), includendo un controllo positivo (Positive Control, PC), un controllo senza template (No Template Control, NTC) e un controllo senza estrazione (No Extraction Control, NEC).

Si può eseguire un numero minore o maggiore di campioni, ma in tali casi l'utilizzo dei reagenti sarà sub-ottimale. Si raccomanda di evitare più cicli di congelamento/scongelo. Per evitare più cicli di congelamento/scongelo è possibile aliquotare i reagenti.

Primer e sonde

I primer e le sonde che individuano le sequenze di SARS-CoV-2 sono basati sui primer e sulle sonde progettate dai Centers for Disease Control and Prevention (Centri per la prevenzione e il controllo delle malattie, CDC).

Controlli e calibratori

L'esame contiene 5 controlli per il monitoraggio dell'efficienza della RT-PCR.

Controllo interno (Internal Control, IC): Il controllo interno è un RNA IVT a filamento singolo che verifica la presenza di contaminanti che potrebbero inibire la trascrittasi inversa. Inoltre, il controllo interno monitora l'efficacia della trascrittasi inversa nel controllo senza template (No Template Control, NTC) e nel controllo senza estrazione (No Extraction Control, NEC).

Controllo senza template (No Template Control, NTC): Il controllo senza template è composto da acqua priva di nucleasi. Viene aggiunto alla piastra per PCR per verificare l'introduzione di contaminanti durante la preparazione della piastra stessa; la presenza di contaminanti potrebbe infatti causare interpretazioni errate dei target per SARS-CoV-2.

Controllo positivo (Positive Control, PC): Il controllo positivo è un DNA a doppio filamento amplificato con la miscela di SARS-CoV-2 Primers & Probes (P&P mix). La sua rilevazione verifica l'efficacia del reagente implicato nella fase di amplificazione mediante PCR.

Fase senza estrazione (No Extraction Control, NEC): Il controllo senza estrazione è composto dal SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Viene trattato in parallelo con i campioni clinici, al fine di verificare l'introduzione di contaminanti durante la preparazione dei campioni; a presenza di contaminanti potrebbe infatti causare interpretazioni errate dei target per SARS-CoV-2.

Controllo di campionamento: Il controllo di campionamento rileva il gene RNase P ed è fondamentale per assicurare la presenza di campioni biologici nei campioni negativi a SARS-CoV-2. L'amplificazione del controllo di campionamento deve essere sempre rilevabile, altrimenti è dubbia la qualità dei campioni.

Piattaforme e software

Prima dell'uso, assicurarsi che gli strumenti siano stati sottoposti a manutenzione e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore. Questo kit può essere utilizzato nei due flussi di lavoro che richiedono l'impiego degli strumenti Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM o ABI 7500 Fast Dx e il rispettivo software:

- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM: Software Rotor-Gene Q versione 2.3.1 o successiva
- ABI 7500 Fast Dx: SDS versione software 1.4.1 o successiva

Materiali necessari ma non in dotazione

Materiali di consumo

- Guanti monouso non talcati
- Puntali per pipette sterili e privi di nucleasi con filtri
- Provette prive di PCR da 1,5 ml o da 2 ml
- Provette per PCR da 0,1 ml per uso con Rotor-Gene® Q MDx (Strip Tubes and Caps, 0.1 ml, n. cat. 981103)
- 96-Well MicroAmp™ per uso con la piattaforma ABI 7500 Fast Dx qPCR (piastra a 96 pozzetti Applied Biosystems, n. cat. N8010560)
- MicroAmp Optical Adhesive Film per uso con la piattaforma ABI 7500 Fast Dx qPCR (Applied Biosystems, n. cat. 4360954)

Strumentazione*

- Centrifuga da banco con rotore per provette di reazione da 2 ml
- Pipette (regolabili)
- Miscelatore vortex
- Riscaldatore a blocco
- Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM (n. cat. 9002032) con versione software Rotor-Gene Q 2.3.1 o versione successiva
- Rotor-Disc 72 Rotor (n. cat. 9018899)
- Rotor-Disc 72 Locking Ring (n. cat. 9018900)
- Blocco di caricamento a 72 pozzetti (QIAGEN Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes, n. cat. 9018901)
- In alternativa: Piattaforma ABI 7500 Fast Dx qPCR (Thermo Fisher Scientific®, n. cat. 4406985) con versione software 1.4.1 o versione successiva e centrifuga con piastra a 96 pozzetti

* Prima dell'uso e se applicabile, assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

Avvertenze e precauzioni

Tenere presente che potrebbe essere richiesto di consultare le norme locali per la segnalazione al produttore e all'autorità di regolamentazione del Paese dell'utente e/o del paziente di gravi incidenti verificatisi in relazione al dispositivo.

Informazioni sulla sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS) appropriate. Le schede sono disponibili online nel formato PDF, pratico e compatto, sul sito www.qiagen.com/safety, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e di ogni componente dei kit QIAGEN.

Indossare sempre dispositivi di protezione personale adeguati, compresi, tra gli altri, guanti monouso senza polvere, camice da laboratorio e occhiali protettivi. Proteggere la pelle, gli occhi e le mucose. Cambiare spesso i guanti durante la manipolazione dei campioni.

Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi. Osservare sempre le precauzioni di sicurezza indicate nelle linee guida pertinenti, quale Clinical and Laboratory Standards Institute® (CLSI) *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline (M29)* o altri documenti appropriati.

I campioni sono potenzialmente infettivi. Smaltire campioni e materiali di scarto dell'esame nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.

Precauzioni

- Osservare le procedure standard di laboratorio per mantenere l'area di lavoro pulita e priva di contaminazioni. Dedicare un'area alla strumentazione specifica per la manipolazione dell'RNA.
- Attenersi alle prassi del laboratorio per minimizzare la contaminazione crociata.
- Prestare attenzione per evitare la contaminazione con RNAse durante l'esperimento e usare plastiche priva di RNAse.
- Assicurarsi di disporre di una buona tracciabilità mediante record, soprattutto per quanto riguarda l'identificazione dei campioni.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Prestare attenzione alle date di scadenza e alle condizioni di conservazione stampate sulla confezione e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.

Il *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit può essere conservato a temperature comprese tra $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 6 mesi o fino alla data di scadenza.

Trasporto, conservazione e manipolazione dei campioni

L'*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit è previsto per l'uso con tampone nasofaringei, nasali e orofaringei. Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi.

I Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e l'agenzia governativa Public Health England hanno fornito le linee guida per il prelievo, la manipolazione e i test di campioni clinici. Per ulteriori informazioni, fare riferimento a queste linee guida o ad altri protocolli di laboratorio di riferimento nazionali.

Prelievo, trasporto e conservazione dei campioni

Per il prelievo, la conservazione e il trasporto dei campioni, fare riferimento alle raccomandazioni del fornitore. I tamponi devono essere completamente immersi nel terreno di trasporto per garantire l'integrità dei campioni.

Protocollo: Preparazione dei campioni e rilevazione del SARS-CoV-2 sull'RGQ MDx 5plex HRM

Il presente protocollo descrive la preparazione dei campioni e della RT-PCR, per rilevare i target SARS-CoV-2 in tamponi nasali, nasofaringei o orofaringei umani conservati nel terreno di trasporto sul RGQ MDx 5plex HRM.

Punti importanti prima di iniziare

- Verificare che siano rispettate le date di scadenza e le condizioni per la conservazione stampate sulla confezione e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.
- Utilizzare strumentazione ben mantenuta e calibrata.
- Prestare attenzione a evitare la contaminazione con RNAsi durante l'esperimento e utilizzare plastica da laboratorio priva di nucleasi.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- I campioni possono essere conservati a temperatura ambiente durante le fasi di preparazione e impostazione della reazione, ma si raccomanda di conservarli su ghiaccio o a 4 °C su un rack di raffreddamento.
- Prima dell'uso, far scongelare completamente a temperatura ambiente (15–25 °C) SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, acqua per NTC e SARS-CoV-2 Positive Control. Conservare le provette a temperatura ambiente e al riparo dalla luce, fino al loro utilizzo.
- Prima dell'uso, omogeneizzare il SARS-CoV-2 UM Prep Buffer e il SARS-CoV-2 UM Amp Buffer capovolgendoli 2-3 volte (non agitare in vortex) e sottoponendoli poi a una veloce rotazione. Tutti gli altri singoli reagenti possono essere omogeneizzati con vortex a pulsazione per 3-5 secondi o capovolgendoli 2-3 volte e sottoponendoli poi a una veloce rotazione.

- Il SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inibisce le RNnasi presenti nei campioni clinici per la fase di configurazione, ma non è una soluzione inattivante del virus. Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi.
- Verificare che le condizioni di ciclaggio della piattaforma qPCR siano quelle specificate in questo protocollo.
- Per evitare più cicli di congelamento/scongelamento, è possibile aliquotare i reagenti.
- Preparare al momento la miscela di reazione (<2 h all'avvio della piastra per RT-PCR).
- Per minimizzare la contaminazione, le preparazioni dei campioni e della RT-PCR dovrebbero essere eseguite in zone distinte.

Procedura

1. Preparazione dei campioni
 - 1a. Agitare vigorosamente su vortex il tampone contenente il campione.
 - 1b. Aliquotare 50-200 µl di campione in provetti prive di PCR da 1,5 ml
 - 1c. Eseguire la fase di riscaldamento a 70 °C per 10 minuti su un riscaldatore a blocco. Raffreddare i campioni su ghiaccio per almeno 5 minuti, poi conservarli su ghiaccio o a 4 °C.
2. Dopo il primo utilizzo, completare il SARS-CoV-2 UM Amp Buffer con il colorante di riferimento ROX.
 - 2a. Aggiungere 32,8 µl del colorante ROX a 1 provetta di SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 2b. Chiudere il tappo della provetta che contiene il SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e il colorante ROX e capovolgere la provetta 3 volte.
 - 2c. Centrifugare il SARS-CoV-2 UM Amp Buffer contenente il colorante ROX sul fondo della provetta.
3. Per una piastra RGQ MDx completa (72 pozzetti), preparare una miscela di aliquote di SARS-CoV-2 Amp Primers con il SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 3a. Trasferire i volumi necessari di SARS-CoV-2 Amp Primers e SARS-CoV-2 Internal Control come indicato nella Tabella 1 in una nuova provetta da 1,5 ml priva di PCR.
 - 3b. Chiudere il tappo e rovesciare 3 volte la provetta o agitare su vortex a pulsazione la provetta per 3-5 s.
 - 3c. Centrifugare i SARS-CoV-2 Amp Primers contenenti l'IC sul fondo della provetta.

Tabella 1. Impostazione miscela SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Miscela SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			Numero di reazioni Volume (µl)	
Reagenti	Concentrazione stock	Concentrazione finale	1 rxn	72 rxn (+22% di volume extra*)
SARS-CoV-2 Amp Primers	3.45x	1x	7,25	638
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	132
Totale miscela SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	770

* **Nota:** Regolare i volumi di SARS-CoV-2 UM Amp Primers e SARS-CoV-2 Internal Control in base al numero di campioni da testare. Considerare un volume aggiuntivo per compensare il volume morto.

4. Preparare una miscela di reazione facendo riferimento alla Tabella 2 e miscelare con cura.

Tabella 2. Impostazione miscela di reazione

Miscela di reazione per RT-PCR			Numero di reazioni Volume (µl)	
Reagenti	Concentrazione stock	Concentrazione finale	1 rxn	72 rxn (+20% volume extra*)
SARS-CoV-2 UM Amp Buffer [†]	4x	1x	6,25	540
SARS-CoV-2 Amp Primers [‡]	2.9x	1x	8,75	756
Totale volume di reazione			15,00	1296

* **Nota:** Regolare i volumi di SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e SARS-CoV-2 Amp Primers in base al numero di campioni da testare. Considerare un volume aggiuntivo per compensare il volume morto.

[†] SARS-CoV-2 UM Amp Buffer completato con il colorante di riferimento ROX.

[‡] SARS-CoV-2 Amp Primers completati con il SARS-CoV-2 Internal Control.

5. Dispensare 8 µl di acqua priva di nucleasi alla provetta per PCR assegnata al NEC.
6. Caricare 10 µl di acqua priva di nucleasi nella provetta per PCR assegnata al NTC.
7. Dispensare 2 µl di SARS-CoV-2 UM Prep Buffer in ciascuna provetta PCR assegnata a NEC e ai campioni preparati.
8. Aggiungere 8 µl del campione preparato a una provetta per PCR contenente il SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Miscelare aspirando e rilasciando il liquido con la pipetta per 5 volte.

9. Aggiungere 15 µl della miscela di reazione preparata nella fase 4 alle provette dedicate a campioni e controlli (Figura 2 a titolo di esempio). Miscelare aspirando e rilasciando il liquido per 5 volte, quindi chiudere i tappi delle provette per PCR, tranne che per quella riservata al SARS-CoV-2 Positive Control.

Nota: Verificare che le provette siano ben chiuse per evitare la contaminazione crociata.

10. Caricare 10 µl del SARS-CoV-2 Positive Control nella provetta per PCR opportuna. Miscelare aspirando e rilasciando il liquido con la pipetta per 5 volte.

11. Impostare il programma RT-PCR del RGQ MDx 5plex HRM secondo le specifiche riportate nella Tabella 3.

Nota: L'acquisizione dei dati va effettuata durante la fase di annealing/estensione.

12. Posizionare le provette nel termociclatore in tempo reale (nella Figura 2 è illustrato un esempio di layout delle provette) e avviare il programma di ciclaggio come descritto nella Tabella 3.

Nota: Prestare attenzione a mantenere la stessa posizione e lo stesso ordine per le provette nell'impostazione dell'esame e nelle fasi nel termociclatore in tempo reale.

Tabella 3. Programma SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

Fasi	Tempo	Temperatura (°C)	Numero di cicli	Acquisizione
Trascrittasi inversa	10 min	50	1	No
Attivazione calore iniziale per PCR	2 min	95	1	No
Ciclaggio a 2 fasi				
Denaturazione	5 s	95	40	No
Annealing/Estensione	30 s	58		Green (FAM), Yellow (HEX) e Red (Atto)

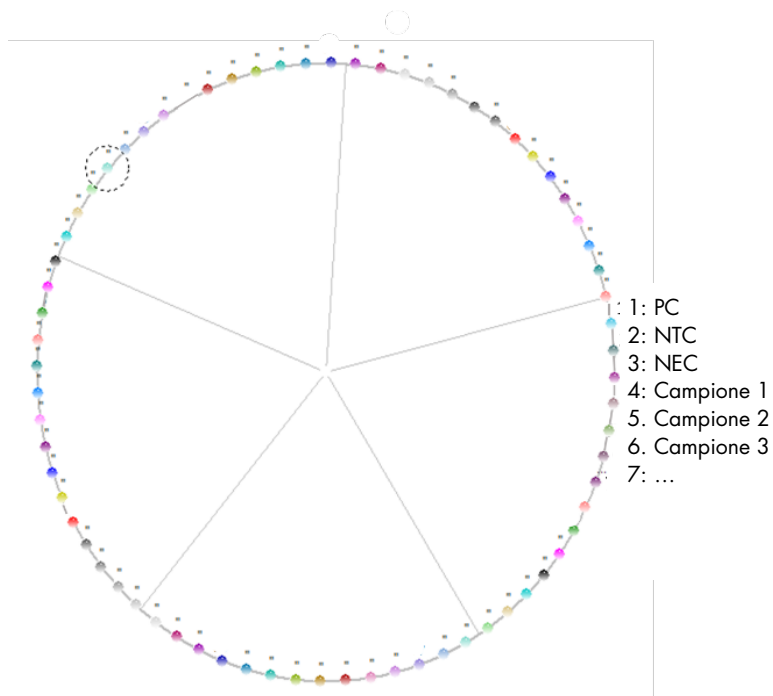


Figura 2. Esempio di layout delle provette sulla piattaforma RGQ MDx 5plex HRM

13. Fare clic su **Gain optimization** (Ottimizzazione guadagno) nella “New Run Wizard” (Procedura guidata nuovo ciclo), quindi aprire **Auto-gain Optimization Setup** (Configurazione ottimizzazione auto-guadagno).
14. Verificare che i canali di acquisizione siano impostati come descritto nella Tabella 4.

Tabella 4. Configurazione RGQ MDx 5plex HRM

Nome	Posizione provetta PC	Letture min (FI)	Letture max (FI)	Guadagno min	Guadagno max
Green	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Yellow	1*	5 FI	10 FI	-10	10
Red	1*	5 FI	10 FI	-10	10

* **Nota:** da modificare in base alla posizione della provetta con il SARS-CoV-2 Positive Control.

15. Selezionare **Perform optimization before the first acquisition**. (Esegui ottimizzazione prima della prima acquisizione).

16. Avviare il processo.

17. Al termine del processo, analizzare i risultati (vedere la sezione Risultati).

Protocollo: Preparazione dei campioni e rilevazione del SARS-CoV-2 su ABI 7500 Fast Dx

Questo protocollo è studiato per la preparazione e il rilevamento di target SARS-CoV-2 in tamponi nasali, nasofaringei o orofaringei umani conservati nel terreno di trasporto sullo strumento ABI 7500 Fast Dx qPCR.

Punti importanti prima di iniziare

- Verificare che siano rispettate le date di scadenza e le condizioni per la conservazione stampate sulla confezione e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.
- Utilizzare strumentazione ben mantenuta e calibrata.
- Prestare attenzione a evitare la contaminazione con RNAsi durante l'esperimento e utilizzare plastica da laboratorio priva di nucleasi.
- Quando si utilizza ABI 7500 Fast Dx, il colorante ROX deve essere aggiunto alla provetta della miscela master prima del primo utilizzo.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- I campioni possono essere conservati a temperatura ambiente durante le fasi di preparazione e impostazione della reazione, ma si raccomanda di conservarli su ghiaccio o a 4 °C su un rack di raffreddamento.
- Quando si utilizza ABI 7500 Fast Dx, è richiesto l'uso del colorante ROX.
- **I dati devono essere acquisiti con colorante ROX passivo.**
- Prima dell'uso, lasciare scongelare completamente a temperatura ambiente (15–25 °C) SARS-CoV-2 UM Prep Buffer, SARS-CoV-2 UM Amp Buffer, SARS-CoV-2 Amp Primers, SARS-CoV-2 IC, acqua per NTC e SARS-CoV-2 Positive Control. Conservare le provette a temperatura ambiente e al riparo dalla luce, fino al loro utilizzo.
- Prima dell'uso, omogeneizzare SARS-CoV-2 UM Prep Buffer e SARS-CoV-2 UM Amp Buffer capovolgendoli 2-3 volte (non agitare in vortex) e sottoponendoli poi a una veloce rotazione. Tutti gli altri singoli reagenti possono essere omogeneizzati con vortex a pulsazione per 3-5 secondi o capovolgendoli 2-3 volte e sottoponendoli poi a una veloce rotazione.

- Il SARS-CoV-2 UM Prep Buffer inibisce le RNAsi presenti nei campioni clinici per la fase di rilevazione, ma non è una soluzione inattivante per il virus. Tutti i campioni devono essere considerati potenzialmente pericolosi.
- Verificare che le condizioni di ciclaggio della piattaforma qPCR siano quelle specificate in questo protocollo.
- Per evitare più cicli di congelamento/scongelo, è possibile aliquotare i reagenti.
- Preparare al momento la miscela di reazione (<2 h all'avvio della piastra per RT-PCR).
- Per minimizzare la contaminazione, le preparazioni dei campioni e della RT-PCR dovrebbero essere eseguite in zone distinte.

Procedura

1. Preparazione dei campioni
 - 1a. Agitare vigorosamente su vortex il tampone contenente il campione.
 - 1b. Aliquotare 50-200 µl di campione in provette prive di PCR da 1,5 ml.
 - 1c. Eseguire una fase di riscaldamento a 70 °C per 10 min su un riscaldatore a blocco. Raffreddare i campioni su ghiaccio per almeno 5 min, quindi conservarli su ghiaccio o a 4 °C.
2. Al primo utilizzo, completare il SARS-CoV-2 UM Amp Buffer con il colorante di riferimento ROX.
 - 2a. Aggiungere 32,8 µl del colorante ROX a una provetta con il SARS-CoV-2 UM Amp Buffer.
 - 2b. Chiudere il tappo della provetta che contiene il SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e il colorante ROX e capovolgere la provetta 3 volte.
 - 2c. Centrifugare il SARS-CoV-2 UM Amp Buffer contenente il colorante ROX sul fondo della provetta.
3. Per una piastra ABI 7500 Fast Dx completa (96 pozzetti), preparare una miscela di aliquote dei SARS-CoV-2 Amp Primers con il SARS-CoV-2 Internal Control.
 - 3a. Trasferire il volume richiesto di SARS-CoV-2 Amp Primers e SARS-CoV-2 Internal Control secondo quanto indicato nella Tabella 5 in una nuova provetta priva di PCR da 1,5 ml.
 - 3b. Chiudere il tappo e rovesciare 3 volte la provetta o agitare su vortex a pulsazione la provetta per 3-5 s.

- 3c. Rallentare la rotazione dei SARS-CoV-2 Amp Primers contenenti l'IC per portare la soluzione sul fondo della provetta.

Tabella 5. Impostazione miscela SARS-CoV-2 Amp Primers + IC

Miscela SARS-CoV-2 Amp Primers + IC				Numero di reazioni Volume (µl)	
Reagenti	Concentrazione stock	Concentrazione finale	1 rxn	96 rxn (+ 21% volume extra*)	
SARS-CoV-2 Amp Primers	3.45x	1x	7,25	841	
SARS-CoV-2 Internal Control	166,67 cp/µl	10 cp/µl	1,5	174	
Totale miscela SARS-CoV-2 Amp Primers + IC			8,75	1015	

* **Nota:** Regolare i volumi di SARS-CoV-2 UM Amp Primers e SARS-CoV-2 Internal Control in base al numero di campioni da testare. Considerare un volume aggiuntivo per compensare il volume morto.

4. Preparare una miscela di reazione facendo riferimento alla Tabella 6 e miscelare con cura.

Tabella 6. Impostazione miscela di reazione

Miscela di reazione per RT-PCR				Numero di reazioni Volume (µl)	
Reagenti	Concentrazione stock	Concentrazione finale	1 rxn	96 rxn (+20% di volume extra*)	
SARS-CoV-2 UM Amp buffer [†]	4x	1x	6,25	720	
SARS-CoV-2 Amp Primers [‡]	2.9x	1x	8,75	1008	
Totale volume di reazione		–	15,00	1728	

* **Nota:** Regolare il volume di SARS-CoV-2 UM Amp Buffer e SARS-CoV-2 Amp Primers in base al numero di campioni da analizzare. Considerare un volume aggiuntivo per compensare il volume morto.

[†] SARS-CoV-2 UM Amp Buffer completato con il colorante di riferimento ROX

[‡] SARS-CoV-2 Amp Primers completati con il SARS-CoV-2 Internal Control

5. Dispensare 8 µl di acqua priva di nucleasi nel pozzetto assegnato al NEC.
6. Caricare 10 µl di acqua priva di nucleasi nel pozzetto assegnato al NTC.
7. Dispensare 2 µl di SARS-CoV-2 UM Prep Buffer in ciascun pozzetto assegnato al NEC e ai campioni preparati.

8. Aggiungere 8 μ l del campione preparato a un pozzetto contenente il SARS-CoV-2 UM Prep Buffer. Miscelare aspirando e rilasciando il liquido con la pipetta per 5 volte.
9. Aggiungere 15 μ l della miscela di reazione preparata nella fase 4 nei pozzetti dedicati ai campioni e ai controlli (vedere l'esempio nella Figura 3). Miscelare aspirando e rilasciando il liquido con la pipetta per 5 volte.
10. Caricare 10 μ l del SARS-CoV-2 Positive Control nel pozzetto opportuno. Miscelare aspirando e rilasciando il liquido con la pipetta per 5 volte.
11. Sigillare bene la piastra per PCR per evitare la contaminazione crociata. Assicurarsi di applicare la pressione in modo uniforme sull'intera piastra, al fine di ottenere una sigillatura stagna su tutti i singoli pozzetti.
12. Centrifugare brevemente la piastra per PCR in modo da raccogliere il liquido sul fondo del pozzetto.
13. Impostare il programma RT-PCR sulla modalità "Standard 7500" di ABI 7500 Fast Dx come indicato nella Tabella 7.
Nota: L'acquisizione dei dati va effettuata durante la fase di annealing/estensione.
Nota: Per ulteriori dettagli, fare riferimento alle *Istruzioni per l'uso di ABI 7500 Fast Dx*.
14. Collocare la piastra nel termociclatore in tempo reale (nella Figura 3 è illustrato un esempio di layout della piastra PCR) e avviare il programma di ciclaggio come descritto nella Tabella 7.
15. Selezionare i pozzetti utilizzati e applicare i report FAM, VIC e Cy5. I dati devono essere acquisiti con il colorante passivo ROX **ON** (attivato).
16. Verificare che la curva standard dell'ABI 7500 Fast Dx sia configurata su Absolute Quantitation (Quantificazione assoluta).
17. Avviare il processo.
18. Al termine del processo, analizzare i risultati (vedere la sezione Risultati).

Tabella 7. Programma SARS-CoV-2 Prep&Amp UM

Fasi	Tempo	Temperatura (°C)	Numero di cicli	Acquisizione
Trascrittasi inversa	10 min	50	1	No
Attivazione calore iniziale per PCR	2 min	95	1	No
Ciclaggio a 2 fasi				
Denaturazione	5 s	95	40	No
Annealing/Estensione	30 s	58		Green (FAM), Yellow (VIC), e Red (Cy5)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC											
B	NTC											
C	NEC											
D	Sample 1											
E	Sample 2											
F	Sample 3											
G	...											
H												

Figura 3. Esempio di layout piastra su ABI 7500 Fast Dx

Risultati

Sul RGQ MDx 5plex HRM, i dati vengono analizzati con il software Rotor-Gene Q versione 2.3.1 (o versione successiva) nel rispetto delle istruzioni del produttore (Manuale utente di Rotor-Gene Q MDx, Revisione 7, settembre 2018). Per la coerenza tra analisi differenti servono i seguenti parametri di analisi (Tabella 8).

Tabella 8. Parametri di analisi per RGQ MDx 5plex HRM

Canali	Green	Red	Yellow
Soglia fluorescenza	0,03	0,03	0,03
Correzione pendenza	Si	Si	Si
Provetta dinamica	Si	Si	Si
Punto di takeoff	No	10-20	10-20
Rimozione valori anomali: soglia efficacia reazione	Si Abilitato 0%	No	No
Elimina cicli iniziali	5	5	5
Cicli di cut-off	Ct >38,00 è considerato come 40,00	No	Ct >35,00 è considerato come 40,00

Nel software RGQ, i risultati del ciclo sono disponibili nella griglia dei risultati della quantificazione aperta durante l'analisi. I dati ottenuti dai campioni selezionati sono riepilogati nella tabella e possono essere esportati come file Excel® facendo clic con il pulsante destro del mouse nella griglia e selezionando Export to Excel (Esporta in **Excel**). Assicurarsi di aver selezionato tutti i campioni prima di esportare i risultati.

Sull'ABI, i dati sono analizzati con il software 7500 Fast System, versione 1.4.1 (o successiva) nel rispetto delle istruzioni fornite dal produttore. Per la coerenza tra analisi differenti sono necessari i seguenti parametri (Tabella 9).

Tabella 9. Parametri di analisi per ABI 7500 Fast Dx

Canali	FAM*	VIC/HEX*	Cy5/Atto*
Colorante passivo	ROX	ROX	ROX
Soglia fluorescenza	0,13	0,05	0,025
Baseline impostata	Auto	Auto	Auto
Cicli di cut-off	Ct >39,00 è considerato come 40,00	No	Ct >35,00 è considerato come 40,00

* FAM = filtro A/1 nella piattaforma ABI, VIC/HEX = filtro B/2 nella piattaforma ABI, Cy5/Atto = filtro E/5 nella piattaforma ABI

Nel software ABI SDS, i valori Ct di un gruppo selezionato di pozzetti o dell'intera piastra sono disponibili nella scheda **Report** (Referto) della sezione principale **Results** (Risultati). I dati possono essere esportati nel formato di testo con valori separati da virgola (.csv) (consigliato): Nella finestra del software SDS, selezionare **File > Export** (Esporta) > **Results** (Risultati) (si può scegliere anche la voce di menu **Ct**). Selezionare il formato .csv del file esportato.

Interpretazione dei risultati

Il controllo positivo (Positive Control, PC) e i geni N1 e N2 sono rilevati nel canale di fluorescenza Green con il RGQ MDx 5plex HRM (o nel canale di fluorescenza FAM su ABI).

Il controllo di campionamento, composto da RNase P, è rilevato nel canale di fluorescenza Yellow con il RGQ MDx 5plex HRM (o nel canale di fluorescenza VIC/HEX con ABI). Tutti i campioni clinici dovrebbero visualizzare un'amplificazione del controllo di campionamento. Nel PC, potrebbe essere visualizzata un'amplificazione gialla nonostante l'assenza di sequenze umane. In questo caso è possibile ignorare un segnale nel canale giallo PC, poiché il segnale forte di fluorescenza nel canale verde potrebbe riversarsi nel canale giallo.

Il controllo interno (Internal Control, IC) è incluso nei SARS-CoV-2 Amp Primers. È rilevato nel controllo senza template (No Template Control, NTC), nel controllo senza estrazione (No Extraction Control, NEC), nel controllo positivo (Positive Control, PC) e nei campioni clinici con il canale di fluorescenza Red con il RGQ MDx 5plex HRM (o nel canale di fluorescenza Cy5/Atto con ABI).

Per convalidare i processi RT-PCR, i controlli PC, NTC e NEC devono essere amplificati e rilevati come previsto.

Tabella 10. Criteri di validità dei processi e interpretazione dei risultati per RGQ MDx 5plex HRM

Controllo	Rilevazione nel canale Green	Rilevazione nel canale Yellow	Rilevazione nel canale Red	Interpretazione
Controllo positivo (PC)	Ct ≤38,00	Indifferente	Indifferente	Il processo è convalidato.
	Ct >38,00 o No Ct	Indifferente	Indifferente	Il processo è invalidato.
Controllo senza template (NTC) o Controllo senza estrazione (NEC)	Ct >38,00 o No Ct	Ct >35,00 o No Ct	Sì	Il processo è convalidato.
	Qualsiasi altra combinazione con amplificazione in verde o giallo		Indifferente	Il processo è invalidato.

Tabella 11. Criteri di validità del processo e interpretazione dei risultati per ABI 7500 Fast Dx

Controllo	Rilevazione in colorante FAM*	Rilevazione in colorante VIC/HEX*	Rilevazione in colorante Cy5/Atto*	Interpretazione
Controllo positivo (PC)	Ct ≤39,00	Indifferente	Indifferente	Il processo è convalidato.
	Ct >39,00 o No Ct	Indifferente	Indifferente	Il processo è invalidato.
Controllo senza template (NTC) o	Ct >39,00 o No Ct	Ct >35,00 o No Ct	Si	Il processo è convalidato.
Controllo senza estrazione (NEC)	Qualsiasi altra combinazione con amplificazione in FAM o VIC/HEX		Indifferente	Il processo è invalidato.

* FAM = filtro A/1 nella piattaforma ABI, VIC/HEX = filtro B/2 nella piattaforma ABI, Cy5/Atto = filtro E/5 nella piattaforma ABI

Per validare i campioni analizzati, questi devono essere amplificati e rilevati come previsto.

Tabella 12. Criteri di validità dei campioni e interpretazione dei risultati per RGQ MDx 5plex HRM

Rilevazione nel canale Green	Rilevazione nel canale Yellow	Rilevazione nel canale Red	Interpretazione
Ct ≤38,00	Indifferente	Indifferente	Il campione è positivo a RNA SARS-CoV-2.
Ct >38,00 o No Ct	Ct ≤35,00	Indifferente	Il campione è negativo, RNA SARS-CoV-2 non rilevato.
Ct >38,00 o No Ct	Ct >35,00 o No Ct	Si	Campione non valido. Nessun materiale umano o materiale umano insufficiente rilevato. È richiesto il ri-campionamento.
Ct >38,00 o No Ct	Ct >35,00 o No Ct	No	Campione non valido. La reazione RT-qPCR è inibita. È richiesta la ripetizione del test.

Tabella 13. Criteri di validità dei campioni e interpretazione dei risultati per ABI 7500 Fast Dx

Rilevazione in colorante FAM*	Rilevazione in colorante VIC/HEX*	Rilevazione in colorante Cy5/Atto*	Interpretazione
Ct ≤39,00	Indifferente	Indifferente	Il campione è positivo.
Ct >39,00 o No Ct	Ct ≤35,00	Indifferente	Il campione è negativo, SARS-CoV-2 non rilevato.
Ct >39,00 o No Ct	Ct >35,00 o No Ct	Si	Campione non valido. Nessun materiale umano rilevato. È richiesto il ri-campionamento.
Ct >39,00 o No Ct	Ct >35,00 o No Ct	No	Campione non valido. La reazione RT-qPCR è inibita. È richiesta la ripetizione del test.

* FAM = filtro A/1 nella piattaforma ABI, VIC/HEX = filtro B/2 nella piattaforma ABI, Cy5/Atto = filtro E/5 nella piattaforma ABI

Limitazioni

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- I risultati del *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit non sono destinati a essere utilizzati come unica base per la diagnosi, il trattamento o altre decisioni sulla gestione del paziente. Risultati negativi non precludono la presenza di infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere utilizzati come unica base per una decisione sul trattamento del paziente.
- L'utilizzo del prodotto è consentito soltanto a personale dotato delle necessarie conoscenze e competenze in merito alle procedure diagnostiche *in vitro*.
- Per garantire risultati PCR ottimali, è richiesto il rigido rispetto delle istruzioni del manuale utente della piattaforma qPCR (Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx o ABI 7500 Fast Dx).
- Rispettare le date di scadenza dei singoli componenti, riportate sulla confezione e sulle etichette. Non utilizzare componenti scaduti.

Prestazioni

Sensibilità analitica (limite di sensibilità)

La sensibilità analitica, o il limite di sensibilità, si definisce come la concentrazione minima alla quale $\geq 95\%$ dei campioni testati genera un riscontro positivo.

Il limite di sensibilità (Limit of Detection, LOD) è stato valutato analizzando diluizioni seriali di campioni nasofaringei negativi preparati con stock ad alto titolo di particelle virali inattivate, ottenute da fornitori commerciali (ZepoMetrix®). Per confermare la concentrazione LOD stabilita, l'indice di rilevazione di tutti i replicati deve essere $\geq 95\%$ (almeno 19/20 replicati devono generare un segnale positivo). La concentrazione di LOD è stata confermata su entrambe le piattaforme di real-time PCR segnalate utilizzando due diversi lotti di reagenti.

Il limite di sensibilità segnalato per entrambe le piattaforme di real-time PCR per l'*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit è 950 cp/ml.

Studi di specificità analitica (inclusività ed esclusività/reattività crociata)

Inclusività

L'inclusività di *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes è stata valutata con un'analisi *in silico* sulle sequenze disponibili nel database GISAID (www.gisaid.org). Sono state analizzate complessivamente 722.488 sequenze (disponibili al 23/03/2021) su COVID CG (<https://covidcg.org>), alimentate con metadati GISAID. Le sequenze sono state allineate alla sequenza di riferimento WIV04 (identica al 100% a Wuhan-Hu-1/NC_045512.2, tranne che per la lunghezza della coda poli(A)) e le variazioni dei singoli nucleotidi (Single Nucleotide Variation, SNV) sono state analizzate nella regione genomica individuata dai primer e dalle sonde del *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. La prevalenza degli SNV identificati è rimasta al di sotto dell'1%, così come la frequenza delle mutazioni concomitanti. Non è stata identificata nessuna variazione dei singoli nucleotidi (Single Nucleotide Variation, SNV) in corrispondenza degli ultimi 1 - 3 nucleotidi dell'estremità 3' nei rispettivi oligonucleotidi, cosa che si supporrebbe avere influenza sulle prestazioni. Il *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit è considerato capace di rilevare il 100% delle sequenze pubblicate.

Esclusività/reattività crociata

Analisi In silico

L'esclusività di *artus* SARS-CoV-2 Amp Primers and Probes è stata valutata con un'analisi *in silico* su sequenze archiviate nel database NCBI. L'analisi *in silico* ha mostrato che alcuni dei patogeni testati presenta un'omologia superiore all'80% con uno dei primer o una delle sonde *artus* SARS-CoV-2. Tra questi vi sono *Candida albicans*, SARS-CoV-1, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus salivarius*. *Pseudomonas aeruginosa* ha mostrato un'omologia inferiore all'80% con uno dei primer/una delle sonde dell'esame SARS-CoV-2. Tuttavia, i primer e le sonde *artus* per l'amplificazione di SARS-CoV-2 hanno mostrato che non è possibile ottenere l'amplificazione con le diverse sequenze archiviate nel database NCBI nr/nt.

Sono stati analizzati complessivamente 36 ceppi batterici, virali e fungini mediante PCR *in silico* con una limitata potenziale dimensione degli ampliconi pari a 500 bp. Le sequenze dei patogeni sono state rilevate dal database NCBI; tuttavia nessuno di questi patogeni ha mostrato amplificazione *in silico*.

Tabella 14. Elenco dei patogeni testati *in silico*.

Agenti patogeni	Ceppo/Tipo	ID tassonomia	Risultati PCR <i>in silico</i>
<i>Adenovirus</i> tipo 3	Tipo 3	45659	Nessuna corrispondenza
<i>Adenovirus</i> tipo 4	Tipo 4	28280	Nessuna corrispondenza
<i>Adenovirus</i> tipo 5	Tipo 5	28285	Nessuna corrispondenza
<i>Adenovirus</i> tipo 7A	Tipo 7A	85755	Nessuna corrispondenza
<i>Adenovirus</i> tipo 14	Tipo 14	10521	Nessuna corrispondenza
<i>Adenovirus</i> tipo 31	Tipo 31	10529	Nessuna corrispondenza
<i>Bordetella pertussis</i>	A639	520	Nessuna corrispondenza
<i>Candida albicans</i>	Z006 SC5314	5476	Amplificazione impossibile*†
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	CWL-029 TW-183	115713	Nessuna corrispondenza
Enterovirus	Tipo 68	42789	Nessuna corrispondenza

* La corrispondenza della sequenza con uno dei primer/una delle sonde ha mostrato un'omologia <80%.

† La corrispondenza della sequenza con uno dei primer/una delle sonde ha mostrato un'omologia ≥80%.

(Continua alla pagina seguente)

Tabella 14 (continua dalla pagina precedente)

Agenti patogeni	Ceppo/Tipo	ID tassonomia	Risultati PCR <i>in silico</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	KW20	727	Nessuna corrispondenza
Coronavirus umano	229E	11137	Nessuna corrispondenza
Coronavirus umano	NL63	277944	Nessuna corrispondenza
Coronavirus umano	HKU-1	290028	Nessuna corrispondenza
Coronavirus umano OC43	OC43	31631	Nessuna corrispondenza
Coronavirus umano	MERS-CoV	1335626	Nessuna corrispondenza
Metapneumovirus umano	n/d	162145	Nessuna corrispondenza
Influenza A	H1N1	114727	Nessuna corrispondenza
Influenza A	H3N2	119210	Nessuna corrispondenza
Influenza B	n/d	11520	Nessuna corrispondenza
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	M129 FH	272634	Nessuna corrispondenza
Virus della parainfluenza	Tipo 1	12730	Nessuna corrispondenza
Virus della parainfluenza	Tipo 2	2560525	Nessuna corrispondenza
Virus della parainfluenza	Tipo 3	11216	Nessuna corrispondenza
Virus della parainfluenza	Tipo 4	2560526	Nessuna corrispondenza
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	RU7	42068	Nessuna corrispondenza
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	287	Amplificazione impossibile*
Virus respiratorio sinciziale	Tipo A (RSV-A)	208893	Nessuna corrispondenza
Virus respiratorio sinciziale	Tipo B (RSV-B)	208895	Nessuna corrispondenza
Rhinovirus	Tipo A	147711	Nessuna corrispondenza
Rhinovirus	Tipo B	147712	Nessuna corrispondenza
SARS-coronavirus	Tor2	694009	Amplificazione impossibile†
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	n/d	1282	Nessuna corrispondenza
<i>Streptococcus pyogenes</i>	n/d	1314	Amplificazione impossibile†
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC® BAA-1024D-5 CCHSS3	1304	Amplificazione impossibile†
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 700669 NCTC11032	1313	Nessuna corrispondenza

* La corrispondenza della sequenza con uno dei primer/una delle sonde ha mostrato un'omologia <80%.

† La corrispondenza della sequenza con uno dei primer/una delle sonde ha mostrato un'omologia ≥80%.

Analisi in vitro

La reattività crociata è stata verificata in vitro con patogeni che mostravano un'omologia $\geq 80\%$ con i SARS-CoV-2 Amp Primers nell'analisi in silico. I campioni sono stati preparati aggiungendo potenziali organismi a reattività crociata nella matrice del tampone nasofaringeo a una concentrazione del 10^6 cp/ml, tranne che per SARS-CoV-1, che è stato testato non diluito secondo la raccomandazione del suo fornitore. Nessuno di questi patogeni ha evidenziato reattività crociata in vitro.

L'interferenza microbica dell'esame con il *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit è stata valutata in vitro su un pannello di patogeni raccomandati. I campioni sono stati preparati aggiungendo un massimo di 5 patogeni - a una concentrazione di 105 TCID₅₀/ml per target virali, 10^6 cp/mL per target batterici e fungini, o alla concentrazione massima possibile in base alla concentrazione dello stock - in tamponi nasofaringei negativi addizionati a 2,87 x LOD con particelle SARS-CoV-2 inattivate (Zeptomatrix). I pannelli NATrol™ e il SARS-CoV-1 sono stati addizionati direttamente con particelle virali SARS-CoV-2 inattivate (Zeptomatrix) al 2,87 x LOD. I risultati di ciascun pool di microrganismi testato e le rispettive concentrazioni sono riepilogati di seguito.

Tabella 15. Elenco dei patogeni testati *in vitro* in interferenza microbica.

ID pool / ID campione	Microorganismo	Origine	Concentrazione finale	Unità	Risultato
Pool 1	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Nessuna interferenza
	Coronavirus umano 229E	Zeptomatrix (0810229CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Coronavirus umano OC43	Zeptomatrix (0810024CFHI)	5,86E+04	TCID50/ml	
	Coronavirus umano NL63	Zeptomatrix (0810228CFHI)	2,84E+04	TCID50/ml	
	Adenovirus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Virus della parainfluenza 1	Zeptomatrix (0810014CFHI)	9,14E+06	TCID50/ml	
Pool 2	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Nessuna interferenza
	Adenovirus T3 1	Zeptomatrix (0810073CFHI)	1,67E+04	TCID50/ml	
	Virus della parainfluenza 2	Zeptomatrix (0810015CFHI)	4,29E+04	TCID50/ml	
	Influenza B Florida/02/2006	Zeptomatrix (0810037CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Rhinovirus T 1A	Zeptomatrix (0810012CFNHI)	2,86E+04	TCID50/ml	

(Continua alla pagina seguente)

Tabella 15 (continua dalla pagina precedente)

ID pool / ID campione	Microrganismo	Origine	Concentrazione finale	Unità	Risultato
Pool 3	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Nessuna interferenza
	Parainfluenza Virus T3	Zeptomatrix (0810016CFHI)	1,43E+07	TCID50/ml	
	<i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC (51907D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC (700669DQ)	3,30E+06	CFU/ml	
	<i>Candida albicans</i>	Zeptomatrix (0801504DNA)	1,00E+06	CFU/ml	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC (12228DQ)	4,60E+06	CFU/ml	
Pool 4	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Nessuna interferenza
	Adenovirus T7A	Zeptomatrix (0810021CFHI)	1,02E+06	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC (700294DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Zeptomatrix (0801579DNA)	1,00E+08	CFU/ml	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (47085DQ)	1,00E+07	CFU/ml	
Pool 5	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,72E+03	cp/ml	Nessuna interferenza
	Virus respiratorio sinciziale RSV A	Zeptomatrix (0810482CFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Influenza A H1N1 California	Zeptomatrix (0810165CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	Enterovirus Tipo 68 gruppo principale	Zeptomatrix (0810300CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Adenovirus T14	Zeptomatrix (0810108CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
Pool 6	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Nessuna interferenza
	MERS-coronavirus	Zeptomatrix (0810575CFHI)	1,43E+04	TCID50/ml	
	AdenoVirus T4	Zeptomatrix (0810070CFHI)	1,43E+05	TCID50/ml	
	Metapneumovirus umano (hMPV) tipo B	Zeptomatrix (0810156CFHI)	7,14E+03	TCID50/ml	
	Virus respiratorio sinciziale tipo B (RSV- B)	Zeptomatrix (0810040CFHI)	1,43E+03	TCID50/ml	

(Continua alla pagina seguente)

Tabella 15 (continua dalla pagina precedente)

ID pool / ID campione	Microrganismo	Origine	Concentrazione finale	Unità	Risultato
Pool 7	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Nessuna interferenza
	Adenovirus T5	Zeptomatrix (0810020CFHI)	6,43E+05	TCID50/ml	
	Virus della parainfluenza 4B	Zeptomatrix (0810060BCFHI)	7,14E+04	TCID50/ml	
	Influenza A H3N2 Svizzera/9715293/13	Zeptomatrix (0810511CFHI)	2,86E+04	TCID50/ml	
	<i>Streptococcus salivarius</i>	Zeptomatrix (BAA-1024D-5)	1,00E+06	CFU/ml	
Pool 8	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Nessuna interferenza
	Pannello RP1 NATrol (Influenza A H3N2 (Brisbane/10/07), Influenza A H1N1 (NY/02/2009), Rhinovirus (tipo 1A), Adenovirus T3, Parainfluenza T1, Virus della parainfluenza T4, Metapneumovirus (Peru 6-2003) <i>C. pneumoniae</i> (CWL-029), <i>M. pneumoniae</i> (M129), Coxsackievirus (tipo A1))	Zeptomatrix (MDZ001)	Sconosciuto*	N/D	
Pool 9	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Nessuna interferenza
	Pannello RP2 NATrol (Influenza A H1 (New Caledonia/20/99), Influenza B (Florida/02/06), RSV-A, Parainfluenza T2, Parainfluenza T3, Coronavirus HKU recombinant, Coronaviruses (OC43, NL63, 229E), <i>Bordetella pertussis</i> (A639))	Zeptomatrix (MDZ001)	Sconosciuto*	N/D	
Pool 10	SARS-CoV-2	Zeptomatrix (NATSARS(COV2)-ERC)	2,73E+03	cp/ml	Nessuna interferenza
	SARS-CoV-1	Zeptomatrix (NATSARS-ST)	Sconosciuto*	N/D	

* Concentrazione non comunicata dal fornitore.

Sostanze interferenti

È stato valutato l'effetto di sostanze interferenti putative (per le sostanze elencate nella Tabella 16) sulle prestazioni del *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit. I test sono stati eseguiti in 3 pool di tamponi nasofaringei negativi e in 3 pool di tamponi nasofaringei positivi addizionati a 4 x LOD con particelle virali SARS-CoV-2 inattivate (Zeptomatrix). Gli esperimenti sono stati eseguiti sulla piattaforma RGQ MDx 5plex HRM (su 4 strumenti) da 1 operatore con 1 kit pilota.

Ciascun pool è stato suddiviso in 2 per testare la sostanza interferente dissolta in un solvente (campione di analisi) o il solvente da solo (campione di controllo). Le percentuali di successo nei canali di fluorescenza verde e rosso sono state confrontate tra il test e i suoi campioni di controllo corrispondenti. In assenza di interferenza, il test e i suoi campioni di controllo corrispondenti hanno la stessa percentuale di successo.

Nella Tabella 16 è mostrato che nessuna delle sostanze testate interferisce con le prestazioni del *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit nel canale di fluorescenza verde.

Tabella 16. Elenco delle sostanze interferenti.

Sostanze interferenti	Funzione	Concentrazione testata	Risultati nel tampone nasofaringeo negativo	Risultati nel tampone nasofaringeo positivo (4 x LOD)
Tobramicina	Antibiotico sistemico	1 mg/ml	Nessuna interferenza 0/15	Nessuna interferenza 0/15
Mupirocina	Unguento nasale antibiotico	6,6 mg/ml	Nessuna interferenza 0/15	Nessuna interferenza 0/15
Fluticasone	Corticosteroide nasale	5% (v/v)	Nessuna interferenza 0/15	Nessuna interferenza 0/15
Mentolo (pastiglie contro il mal di gola)	Anestetico e analgesico orale	0,5 mg/ml	Nessuna interferenza 0/15	Nessuna interferenza 0/15

(Continua alla pagina seguente)

Tabella 16. (Continua dalla pagina precedente)

Sostanze interferenti	Funzione	Concentrazione testata	Risultati nel tampone nasofaringeo negativo	Risultati nel tampone nasofaringeo positivo (4 x LOD)
Ossimetazolina	Spray nasale	10% (v/v)	Nessuna interferenza (0/15)	Nessuna interferenza (0/15)
Osetamivir	Farmaco antivirale	3,3 mg/ml	Nessuna interferenza (0/15)	Nessuna interferenza (0/15)
Mucina (ghiandola submascellare bovina tipo I-S)		2,5 mg/ml	Nessuna interferenza (0/15)	Nessuna interferenza (0/15)
Sangue intero		4% (v/v)	Nessuna interferenza (1/15*)	Nessuna interferenza (0/15)

* È stata rilevata un'amplificazione corrispondente a un artefatto.

Precisione

Lo studio di precisione ha valutato la riproducibilità (stesso campione ripetuto in processi e condizioni differenti): 5 giorni, 3 lotti del kit, 3 operatori e 2 strumenti) e la ripetibilità (stesso campione ripetuto nello stesso processo e nella stessa condizione). I test sono stati eseguiti su campioni nasofaringei negativi e campioni nasofaringei negativi addizionati a 5 x LOD sul RGQ MDx.

Per ogni livello di diluizione sono stati raccolti 204 punti dati. I dati di ripetibilità e riproducibilità sono stati utilizzati per determinare la deviazione standard (Standard Deviation, SD) e il coefficiente di variazione (% CV) per i target SARS-CoV-2 nei canali verde, giallo e rosso. La Tabella 17 mostra che l'*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit ha una precisione generale pari a 0,63 SD (2,03% CV) nel canale verde, pari a 0,54 SD (2,22% CV) nel canale giallo e pari a 1,28 SD (4,10% CV) nel canale rosso.

Tabella 17. Deviazione standard e coefficiente di variazione del *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Campioni e canale di rilevazione	Totale	Da giorno a giorno	Da lotto a lotto	Da operatore a operatore	Da strumento a strumento	Da ciclo a ciclo	Intra-sessione
Deviazione standard (Standard Deviation, SD) (Coefficiente di variazione (%CV))							
NPS negativo Canale Yellow	0,54 (2,22)	0,09 (0,37)	0,10 (0,42)	0,06 (0,27)	0,11 (0,47)	0,09 (0,36)	0,50 (2,05)
NPS negativo Canale Red	1,15 (3,68)	0,0 (0,00)	0,55 (1,76)	0,00 (0,00)	0,12 (0,40)	0,39 (1,26)	0,92 (2,96)
NPS addizionato Canale Green	0,63 (2,03)	0,18 (0,59)	0,31 (1,00)	0,00 (0,00)	0,08 (0,25)	0,00 (0,00)	0,51 (1,64)
NPS addizionato Canale Yellow	0,47 (1,93)	0,13 (0,53)	0,24 (0,98)	0,05 (0,20)	0,18 (0,73)	0,00 (0,00)	0,33 (1,38)
NPS addizionato Canale Red	1,28 (4,10)	0,12 (0,37)	0,58 (1,84)	0,11 (0,34)	0,00 (0,00)	0,49 (1,57)	1,02 (3,27)

Prestazioni cliniche

Le prestazioni cliniche dell'esame *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp sono state valutate utilizzando campioni di tampone nasofaringeo retrospettivi nel terreno di trasporto, includendo:

- 98 campioni negativi a RNA SARS-CoV-2
- 52 campioni positivi a RNA SARS-CoV-2

Tutti i campioni sono stati prelevati da pazienti con segni e sintomi di infezione COVID-19 e sono stati conservati congelati fino all'utilizzo.

La convalida clinica è stata eseguita sull'ABI 7500 Fast Dx. Nella Tabella 18 sono riportate le prestazioni dell'*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit rispetto a un metodo di riferimento, espresso come concordanza percentuale di positività (Positive Percent Agreement, PPA) e concordanza percentuale di negatività (Negative Percent Agreement, NPA).

Tabella 18. Prestazioni cliniche dell'artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit rispetto a un metodo di riferimento

Tipo di campione	N	% positivi	IC 95%	% negativi	IC 95%
Positivo	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	5,1 (5/98)	
Negativo	98	1,9 (1/52)		94,9 (93/98)	88,7–97,8

I risultati discordanti sono stati nuovamente valutati mediante un terzo metodo e ri-analizzati con una tabella di contingenza. I risultati delle prestazioni cliniche generali sono espressi come concordanza percentuale di positività (Positive Percent Agreement, PPA) e concordanza percentuale di negatività (Negative Percent Agreement, NPA) e sono illustrati nella Tabella 19.

Tabella 19. Prestazioni cliniche del artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Tipo di campione	N	% positivi	IC 95%	% negativi	IC 95%
Positivo	52	98,1 (51/52)	89,9–99,7	5,1 (5/98)	
Negativo	98	1,9 (1/52)		94,9 (93/98)	88,7–97,8

Di seguito è elencata la frazione di campioni in concordanza percentuale di positività e negatività (rispettivamente PPA e NPA) con gli stati previsti dei campioni:

Concordanza percentuale di positività
(Positive Percent Agreement, PPA%): $51/52 = 98,1\%$ (IC 95%: 89,9%–99,7%)
Concordanza percentuale di negatività
(Negative Percent Agreement, NPA%): $93/98 = 94,9\%$ (IC 95%: 88,6%–97,8%)

Prestazioni cliniche, compresi gli individui asintomatici

Le prestazioni cliniche dell'esame *artus* SARS-CoV-2 UM Prep&Amp sono state valutate utilizzando campioni di tampone nasofaringeo retrospettivi nel terreno di trasporto, includendo:

- 100 campioni negativi a RNA SARS-CoV-2
- 53 campioni positivi a RNA SARS-CoV-2

Tutti i campioni sono stati prelevati da pazienti senza sintomi o altre ragioni per sospettare un'infezione da COVID-19.

La convalida clinica è stata eseguita sull'ABI 7500 Fast Dx. Sedici campioni sono stati esclusi dall'analisi dopo il test con l'*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit a causa di uno stato non valido secondo i criteri di validità del campione (Tabella 13).

Nella Tabella 20 sono riportate le prestazioni dell'*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit rispetto a un metodo di riferimento, che viene espresso come concordanza percentuale di positività (Positive Percent Agreement, PPA) e concordanza percentuale di negatività (Negative Percent Agreement, NPA).

Tabella 20. Prestazioni cliniche dell'*artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit rispetto a un metodo di riferimento

Tipo di campione	N	% positivi	IC 95%	% negativi	IC 95%
Positivo	50	64,0 (32/50)	50,1–75,9	1,15 (1/87)	–
Negativo	87	36,0 (18/50)	–	98,85 (86/87)	93,8–99,8

Diciannove risultati discordanti sono stati nuovamente valutati mediante un terzo metodo e ri-analizzati con una tabella di contingenza. I risultati delle prestazioni cliniche generali sono espressi come concordanza percentuale di positività (Positive Percent Agreement, PPA) e concordanza percentuale di negatività (Negative Percent Agreement, NPA) e sono illustrati nella Tabella 21.

Tabella 21. Prestazioni cliniche del artus SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

Tipo di campione	N	% positivi	IC 95%	% negativi	IC 95%
Positivo	32	100,0 (32/32)	89,3–100,0	0,95 (1/105)	–
Negativo	105	–	–	99,05 (104/105)	94,8–99,8

Diciotto campioni falsi negativi sono stati riclassificati come veri negativi, mentre l'unico falso positivo è rimasto falso positivo.

Di seguito è elencata la frazione di campioni in concordanza percentuale di positività e negatività (rispettivamente PPA e NPA) con gli stati previsti dei campioni:

Concordanza percentuale di positività

(Positive Percent Agreement, PPA): $32/32 = 100,0\%$ (IC 95%: 89,3%–100,0%)

Concordanza percentuale di negatività

(Negative Percent Agreement, NPA): $104/105 = 99,05\%$ (IC 95%: 94,8%–99,8%)

Bibliografia

1. CUI J *et al.* (2019) Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol* **17**, 181-192
2. Gagneur *et al.* (2002) Infections nosocomiales à coronavirus humains chez le nouveau-né. *Arch Pédiatr* **9**, 61-69
3. HU *et al.* (2020) Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* **6**:1-14.
4. Mackay IM. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol. Infect* **10**(3), 190–212
5. European Commission. (2020) Current performance of COVID-19 test methods and devices and proposed performance criteria. 16 April 2020. <https://ec.europa.eu/docsroom/documents/40805/attachments/1/translations/en/renditions/native>

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali problemi che possano presentarsi. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (Frequently Asked Questions, FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx.

Commenti e suggerimenti

Segnale verde debole o assente (FAM) in controllo positivo (Positive Control, PC)

- | | |
|--|---|
| a) Il canale di fluorescenza selezionato per l'analisi dei dati RT-PCR non è conforme al protocollo. | Per l'analisi dei dati, selezionare il canale di fluorescenza FAM (Verde) per i target analitici per SARS-CoV-2 RT-PCR, il canale di fluorescenza HEX/VIC/JOE (Giallo) per il controllo di campionamento e il canale Cy5/Atto (Rosso) per il controllo interno. |
| b) Errata programmazione del profilo termico. | Confrontare il programma RT-PCR con il protocollo. |
| c) Errata configurazione della reazione PCR | Controllare le fasi operative eseguite per lo schema di pipettamento e ripetere la PCR, se necessario. |
| d) Le condizioni di conservazione per uno o più componenti del kit non corrispondevano alle istruzioni oppure l' <i>artus</i> SARS-CoV-2 RT-PCR Kit è scaduto. | Rispettare le condizioni di conservazione e verificare la data di scadenza dei reagenti; se necessario utilizzare un kit nuovo. |
| e) Errata configurazione della piattaforma qPCR durante la configurazione dei dati. | Applicare alla piattaforma qPCR le configurazioni consigliate descritte nel presente manuale. |
| f) La PCR è stata inibita. | Seguire le buone prassi di laboratorio di biologia molecolare per evitare l'introduzione di contaminanti. Assicurarsi che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari. Rispettare il protocollo menzionato nel presente manuale. Controllare la data di scadenza del reagente e, se necessario, utilizzare un kit nuovo. Ripetere l'esame con un altro campione. |

Segnale verde (FAM) nel controllo senza template o nel controllo senza estrazione

Si è verificata una contaminazione con le sequenze di SARS-CoV-2 durante la preparazione della piastra per RT-PCR.

Ripetere la RT-PCR con reagenti nuovi. Seguire le buone prassi di laboratorio di biologia molecolare per evitare l'introduzione di contaminanti. Rispettare il protocollo menzionato nel presente manuale. Assicurarsi che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.

Commenti e suggerimenti

Segnale rosso debole o assente (Cy5/Atto) dal controllo interno















- a) Nella reazione RT-PCR è stato introdotto un interferente. La PCR è inibita.
- Seguire le buone prassi di laboratorio di biologia molecolare per evitare l'introduzione di contaminanti.
- Assicurarsi che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.
- Rispettare il protocollo menzionato nel presente manuale.
- Ripetere l'esperimento con un campione prelevato recentemente.
- b) Il controllo interno è degradato.
- Rispettare le buone prassi di laboratorio di biologia molecolare per evitare l'introduzione di RNasi. Rispettare le raccomandazioni menzionate nel presente manuale.
- Assicurarsi che l'area di lavoro e gli strumenti vengano decontaminati a intervalli regolari.
- Rispettare le condizioni di conservazione e controllare la data di scadenza dei reagenti, se necessario, utilizzare un kit nuovo.
- c) Errata configurazione della piattaforma qPCR durante la configurazione dei dati.
- Applicare alla piattaforma qPCR le configurazioni consigliate descritte nel presente manuale.

Segnale giallo debole o assente (VIC/HEX) dal controllo di campionamento

- a) Il campione clinico è degradato.
- Rispettare le raccomandazioni di conservazione, manipolazione e trasporto fornite dal fornitore del dispositivo di prelievo.
- Rispettare il protocollo menzionato nel presente manuale, incluse le fasi di preparazione dei campioni con il SARS-CoV-2 UM Prep Buffer.
- Rispettare le condizioni di conservazione e controllare la data di scadenza dei reagenti, come ad es. il SARS-CoV-2 UM Prep Buffer; se necessario usare un kit nuovo.
- b) Il campione non è stato prelevato correttamente. Non sono state prelevate cellule umane sufficienti sul tampone, o tali cellule non sono state trasferite nel terreno di trasporto.
- Rispettare le raccomandazioni fornite dal fornitore del dispositivo di prelievo per il prelievo e la manipolazione del campione.
- c) Errata configurazione della piattaforma qPCR durante la configurazione dei dati.
- Applicare le configurazioni relative alla piattaforma qPCR utilizzata descritte nel presente manuale.

Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire nelle istruzioni per l'uso o su confezioni ed etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
	Contiene reagenti sufficienti per 768 o 3072 reazioni
	Data di scadenza
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Componenti
	Contenuto
	Numero
	Codice GTIN
Rn	"R" indica la revisione delle Istruzioni per l'uso (manuale) e "n" indica il numero della revisione
	Limite di temperatura
	Produttore
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Tenere al riparo dalla luce
	Avvertenza/Cautela

Informazioni di contatto

Per ottenere assistenza tecnica e altre informazioni, rivolgersi ai Servizi tecnici QIAGEN e alla pagina **support.qiagen.com**.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (768)	Per 768 reazioni: Tampone di preparazione, colorante ROX, miscela master, primer e sonde, controllo interno, acqua (NTC) e controllo positivo	4511460
<i>artus</i> SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit (3072)	Per 3072 reazioni: Tampone di preparazione, colorante ROX, miscela master, primer e sonde, controllo interno, acqua (NTC) e controllo positivo	4511469
Strumentazione e accessori		
PCR Tubes, 0.1 ml per Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Per uso con 72-Well Rotor, provette per strisce e tappi	981103
Software Rotor-Gene Q	Software Rotor-Gene Q v2.3.1 (o successiva)	
Rotor-Gene Q 5-plex HRM MDx	Termociclatore per real-time PCR a 5 canali, analizzatore per fusione ad alta risoluzione, notebook e accessori; 1 anno di garanzia su parti e materiali, installazione	9002032
Loading Block	72 provette da 0,1 ml	9018901

Per le informazioni aggiornate sulla licenza e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al proprio distributore locale.

Cronologia delle revisioni del documento

Revisione	Descrizione
R1, aprile 2021	Versione iniziale.
R2, luglio 2021	Estensione di segnalazione: Il test è stato stabilito per gli individui asintomatici. Uso previsto è stato aggiornato per includere individui senza sintomi o altre ragioni per sospettare un'infezione da COVID-19. La sezione su Prestazioni cliniche, compresi gli individui asintomatici è stata aggiunta ai dati di Prestazioni. Rimozione della dichiarazione "Le prestazioni di questo test non sono state determinate per pazienti senza segni e sintomi di infezione respiratoria" nella sezione Limitazioni. Modifiche editoriali e di formattazione minori.

Contratto di licenza limitata per *artus* SARS-CoV-2 Prep&Amp UM Kit

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del prodotto l'accettazione dei seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al presente manuale e soltanto con i componenti contenuti nel pannello. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo pannello con qualsiasi componente non incluso in questo pannello, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. Al di là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo pannello e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo pannello e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del pannello acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo pannello e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, *artus*®, Rotor-Gene® (QIAGEN Group); ATCC® (American Type Culture Collection); Clinical and Laboratory Standards Institute®, CLSI® (Clinical and Laboratory Standards Institute, Inc); Zeptomatrix®, NATrol™ (Cole-Parmer); Excel® (Microsoft Corporation); ABI®, MicroAmp™, Thermo Fisher Scientific® (Thermo Fisher Scientific o sue controllate). I marchi registrati, i marchi di fabbrica ecc. utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

07/2021 R2 HB-2850-002 © 2021 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Ordini www.qiagen.com/shop | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com