



AVVERTENZA del 14/12/2020

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

**«SARS-CoV-2 ELITE MGB Kit»
Ref. RTS170ING**

A causa delle difficoltà nella fornitura dei materiali necessari per la produzione del prodotto «SARS-CoV-2 ELITE MGB Kit» ref. RTS170ING, dovuta alla pandemia in corso, e alla necessità di ridurre i tempi di attesa per la disponibilità dello stesso, è stata introdotta la seguente modifica di formato:

- Il tappo del tubo del componente RT EnzymeMix può essere:
 - tappo nero
 - tappo con inserto nero
 - tappo con inserto giallo-dorato

Il contenuto del tubo (RT EnzymeMix) è il medesimo in tutti i casi.

Utilizzo e prestazioni del prodotto restano del tutto invariate.

AVVERTENZA del 08/09/2021

IMPORTANTE PER GLI UTILIZZATORI DEL PRODOTTO:

«SARS-CoV-2 ELITE MGB Kit» Ref. RTS170ING / RTS170ING-96

Questa nuova revisione dell'IFU contiene le seguenti modifiche:

- *Estensione d'uso del prodotto in associazione con la matrice saliva e con gli strumenti 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems® Inc.) e CFX96™ Dx System (Bio-Rad Laboratories, Inc.).*

Composizione, utilizzo e prestazioni del prodotto restano del tutto invariate.

NOTA BENE

	LA REVISIONE DI QUESTO IFU E' COMPATIBILE ANCHE CON LA VERSIONE PRECEDENTE DEL KIT
	THE REVIEW OF THIS IFU IS ALSO COMPATIBLE WITH THE PREVIOUS VERSION OF THE KIT
	CET IFU MIS A JOUR ANNULE ET REMPLACE ET EST PARFAITEMENT COMPATIBLE AVEC LA VERSION PRECEDENTE DU KIT
	LA REVISIÓN DE ESTE IFU ES COMPATIBLE TAMBIÉN CON LA VERSIÓN ANTERIOR DEL KIT
	A REVISÃO DO ESTE IFU ÉTAMBÉM COMPATÍVEL COM A VERSÃO ANTERIOR DO KIT
	DIESE FASSUNG DER GEBRAUCHSANLEITUNG IST KOMPATIBEL MIT DER VORHERIGEN VERSION DES TESTKITS



SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit

reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTS170ING
RTS170ING-96



SOMMARIO

USO PREVISTO	pag. 1
PRINCIPIO DEL SAGGIO	pag. 2
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO	pag. 2
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO	pag. 3
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI	pag. 3
AVVERTENZE E PRECAUZIONI	pag. 4
ELITE INGENIUS®	
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 6
PROCEDURA	pag. 7
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 18
Applied Biosystems® 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument / Bio-Rad CFX96™ Dx System	
CAMPIONI E CONTROLLI	pag. 26
PROCEDURA	pag. 27
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI	pag. 35
BIBLIOGRAFIA	pag. 41
LIMITI DELLA PROCEDURA	pag. 42
PROBLEMI E SOLUZIONI	pag. 43
LEGENDA DEI SIMBOLI	pag. 46
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA	pag. 47

USO PREVISTO

Il prodotto «SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit» è parte di un saggio qualitativo e quantitativo di trascrizione inversa e amplificazione degli acidi nucleici per la rilevazione dell'RNA genomico del Coronavirus 2 da Sindrome Respiratoria Acuta Grave (SARS-CoV-2) in campioni clinici di soggetti con possibile infezione, sospetta infezione o infezione in corso.

Il saggio è in grado di rilevare l'RNA di due regioni genomiche specifiche di SARS-CoV-2: gene RdRp e gene ORF8. Grazie al suo design a doppio target, il saggio è in grado di rilevare e identificare anche i ceppi SARS-CoV-2 con delezione del gene ORF8, come il Δ382 (Y. C. F. Su et al., 2020, B. E. Young et al., 2020).

Il saggio è stato validato partendo da campioni di tamponi respiratori (tamponi naso-faringei, tamponi nasali, tamponi oro-faringei) per applicazione quantitativa e qualitativa, e campioni di saliva, per applicazione qualitativa.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF

RTS170ING
RTS170ING-96

Il prodotto trova impiego come supporto per lo screening, la diagnosi e il monitoraggio di infezioni da SARS-CoV-2 insieme ai dati clinici del soggetto e agli esiti di altri test.

PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio prevede l'esecuzione di una reazione di trascrizione inversa e di amplificazione real time (metodica one-step).

A partire dall'RNA estratto dai campioni in esame, nella cassetta di PCR o nel pozzetto della micropietra si effettuano diverse reazioni di trascrizione inversa e amplificazione dei target **RdRp** e **ORF8**, rilevati dalle sonde specifiche:

- nell'**applicazione Qualitativa** i due target sono rilevati nel Canale **RdRp**, e nel Canale **ORF8**,
- nell'**applicazione Quantitativa** in associazione allo strumento ELITE InGenius i due target sono rilevati insieme nel canale **SARSCoV-2**.

La miscela completa di reazione retrotrascrive e amplifica anche una regione del gene umano **RNasi P** (Controllo Interno endogeno per il monitoraggio della cellularità del campione, dell'estrazione e dell'inibizione della reazione) utilizzando la sonda specifica nel canale **IC**.

Le sonde con tecnologia TaqMan™ MGB® marcate con differenti fluorofori sono idrolizzate dalla DNA polimerasi dopo ibridazione con il prodotto specifico della reazione di amplificazione. L'emissione della fluorescenza aumenta con l'aumentare del prodotto specifico della reazione di amplificazione ed è misurata e registrata dallo strumento. Alla fine dell'amplificazione i grafici della fluorescenza sono analizzati per identificare i cicli di soglia (Ct). L'interpretazione dei risultati dei dati permette di rilevare la presenza ed il titolo del patogeno di interesse nel campione di partenza.

Il saggio è stato validato sugli strumenti riportati su questo manuale di istruzioni.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

Il prodotto «SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit» fornisce i seguenti componenti:

• CoV-2 PCR Mix

Miscela di oligonucleotidi per la trascrizione inversa e l'amplificazione real time in una soluzione stabilizzata, **prealiquotata in provette** (tappo NEUTRO senza inserto). Ogni provetta contiene **1200 µL** di soluzione, sufficiente per **48 test** (processando almeno 5 campioni per sessione).

La CoV-2 PCR Mix contiene gli oligonucleotidi specifici per:

- Il gene **RdRp** di SARS-CoV-2. La sonda **RdRp** è marcata con il fluoroforo AP593 (simile a ROX), stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente.
- Il gene **ORF8** di SARS-CoV-2. La sonda **ORF8** è marcata con il fluoroforo FAM, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente.
- Il controllo interno (IC) endogeno umano **RNasi P**. La sonda **IC** è marcata con il fluoroforo AP525 (simile a VIC), stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente.

La CoV-2 PCR Mix contiene anche il tampone, il magnesio cloruro, i nucleotidi trifosfati, gli stabilizzanti e l'enzima DNA polimerasi ad attivazione termica (hot start).

• RT EnzymeMix

Miscela ottimizzata di enzimi per la trascrizione inversa in una soluzione stabilizzata, **prealiquotata in provette** (tappo con inserto NERO). Ogni provetta contiene **20 µL** di soluzione, sufficiente per **48 test** (processando almeno 5 campioni per sessione).

La miscela fornisce gli enzimi per la trascrizione inversa.

Il prodotto «SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit» consente di effettuare:

- con il codice RTS170ING, 240 determinazioni, standard e controlli compresi,
- con il codice RTS170ING-96, 96 determinazioni, standard e controlli compresi.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTS170ING
RTS170ING-96

MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO

Componente	Descrizione	Quantità RTS170ING	Quantità RTS170ING-96	Classificazione dei pericoli
CoV-2 PCR Mix	miscela di reagenti per la trascrizione inversa e l'amplificazione real time Tappo NEUTRO	5 x 1200 µL	2 x 1200 µL	-
RT EnzymeMix	enzima trascrittasi inversa Tappo con inserto NERO	5 x 20 µL	2 x 20 µL	-

MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o simili.
- Miscelatore vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Tubi Sarstedt 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt ref. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.
- Termostato programmabile con sistema ottico di rilevamento della fluorescenza 7500 Fast Dx Real Time PCR Instrument (Applied Biosystems® Inc., Ref. 4406985) o CFX96™ Dx System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Thermal Cycler Ref. 1841000, Optical Reaction Module Ref. 1845097) calibrato come previsto dal fabbricante.

ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

I reagenti per l'estrazione dell'RNA dai campioni da analizzare, il controllo positivo di amplificazione, gli standard a DNA a titolo noto, e i consumabili **non** sono inclusi in questo prodotto.

Per l'esecuzione automatica dell'estrazione degli acidi nucleici, della trascrizione inversa, dell'amplificazione real time e dell'interpretazione dei risultati dei campioni da analizzare sono richiesti lo strumento «**ELITE InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT030) e i seguenti Assay protocols (ELITechGroup S.p.A.) specifici:

Applicazione Qualitativa:

- parametri per il controllo positivo di amplificazione «**SARS-CoV-2 ELITE_QL_PC**»,
- parametri per il controllo negativo di amplificazione «**SARS-CoV-2 ELITE_QL_NC**»,
- parametri per i campioni di tamponi respiratori in analisi «**SARS-CoV-2 ELITE_QL_RsS_200_100**»
- parametri per i campioni di saliva in analisi «**SARS-CoV-2 ELITE_QL_SA_200_100**».

Applicazione Qualitativa con utilizzo del «CPE - Internal Control»:

- parametri per i campioni di tamponi respiratori in analisi «**SARS-CoV-2 ELITE_QLIC_RsS_200_100**»
- parametri per i campioni di saliva in analisi «**SARS-CoV-2 ELITE_QLIC_SA_200_100**».

Applicazione Quantitativa:

- parametri per l'amplificazione dei calibratori «**SARS-CoV-2 ELITE_QT_STD**»,
- parametri per il controllo positivo di amplificazione «**SARS-CoV-2 ELITE_QT_PC**»,
- parametri per il controllo negativo di amplificazione «**SARS-CoV-2 ELITE_QT_NC**»,
- parametri per i campioni di tamponi respiratori in analisi «**SARS-CoV-2 ELITE_QT_RsS_200_100**».

Applicazione Quantitativa con utilizzo del «CPE - Internal Control»:

- parametri per i campioni di tamponi respiratori in analisi «**SARS-CoV-2 ELITE_QTIC_RsS_200_100**».

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTS170ING
RTS170ING-96

Per l'esecuzione automatica dei test con lo strumento «**ELITE InGenius**» sono inoltre richiesti i seguenti prodotti generici:

- cartucce di estrazione «**ELITE InGenius® SP 200**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032SP200),
- materiali di consumo per estrazione «**ELITE InGenius® SP 200 Consumable Set**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT032CS),
- cassette di amplificazione «**ELITE InGenius® PCR Cassette**» (ELITechGroup S.p.A., ref. INT035PCR),
- puntali «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S),
- raccoglitori «**ELITE InGenius® Waste Box**» (ELITechGroup S.p.A., ref. F2102-000).

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument, è richiesto il prodotto generico «**Q - PCR Microplates Fast**» (ELITechGroup S.p.A., codice RTSACC02) micropiastre con pozzetti da 0,1 mL e fogli adesivi per l'amplificazione real time. In alternativa, può essere utilizzato un prodotto equivalente.

Nel caso sia previsto l'uso di uno strumento CFX96™ Dx System, sono richiesti i prodotti generici: «**Hard-Shell 96-Well PCR Plates**» (Bio-Rad, code HSP9601), micropiastre con pozzetti da 0,2 mL in associazione a «**MICROSEAL B ADHES SEAL**» (Bio-Rad, code MSB1001), fogli adesivi per l'amplificazione real time. In alternativa, può essere utilizzato un prodotto equivalente.

Come curva standard di calibrazione per l'analisi quantitativa è richiesto l'impiego del prodotto «**SARS-CoV-2 ELITE Standard**» (ELITechGroup S.p.A. ref. STD170ING). Il prodotto fornisce quattro diluizioni stabilizzate di DNA plasmidico a concentrazione nota per ottenere la curva standard.

Come controllo positivo di amplificazione è richiesto l'impiego del prodotto «**SARS-CoV-2 - ELITE Positive Control**» (ELITechGroup S.p.A. ref. CTR170ING), soluzione stabilizzata di DNA plasmidici.

Nel caso lo stesso campione debba essere amplificato per la ricerca simultanea di diversi target, il prodotto generico «**CPE - Internal Control**» (ELITechGroup S.p.A., ref. CTRCPE) dovrebbe essere usato come controllo interno esogeno di estrazione e inibizione. Il prodotto è una soluzione stabilizzata contenente due DNA plasmidici e l'RNA genomico del fago MS2.

Per l'interpretazione automatica dei risultati dei campioni da analizzare in associazione a 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument e CFX96™ Dx System sono richiesti il software «**Results Manager™**» (Finbiosoft Oy) e il seguente dump file (ELITechGroup S.p.A.) specifici:

- parametri per i campioni di tamponi respiratori e di saliva in analisi con 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument e con CFX96™ Dx System «**SARS-CoV-2 ELITE_Closed**».

Come sistema di raccolta dei tamponi respiratori è richiesto l'impiego del prodotto generico «**UTM® kit**» (COPAN Italia S.p.A., ref. 360C o 305C), «**eSWAB® kit**» (COPAN Italia S.p.A., ref. 490CE02.A) o di dispositivi equivalenti.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Questo prodotto è riservato esclusivamente all'uso *in vitro*.

Avvertenze e precauzioni generali

Manipolare e smaltire tutti i campioni biologici come se fossero in grado di trasmettere agenti infettivi. Evitare il contatto diretto con i campioni biologici. Evitare di produrre schizzi o aerosol. Il materiale che viene a contatto con i campioni biologici deve essere trattato con ipoclorito di sodio al 3% per almeno 30 minuti oppure trattato in autoclave a 121 °C per un'ora prima di essere smaltito.

Manipolare e smaltire tutti i reagenti e tutti i materiali usati per effettuare il saggio come se fossero potenzialmente infettivi. Evitare il contatto diretto con i reagenti. Evitare di produrre schizzi o aerosol. I rifiuti devono essere trattati e smaltiti secondo le opportune regole di sicurezza. Il materiale monouso combustibile deve essere incenerito. I rifiuti liquidi contenenti acidi o basi devono essere neutralizzati prima dell'eliminazione.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTS170ING
RTS170ING-96

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi / la faccia.
Non pipettare a bocca alcuna soluzione.
Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici nelle aree di lavoro.
Lavarsi bene le mani dopo avere maneggiato i campioni e i reagenti.
Eliminare i reagenti avanzati ed i rifiuti secondo le norme vigenti.
Leggere attentamente tutte le istruzioni fornite nel prodotto prima di eseguire il saggio.
Attenersi alle istruzioni fornite nel prodotto durante l'esecuzione del saggio.
Rispettare la data di scadenza del prodotto.
Utilizzare solo i reagenti presenti nel prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.
Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.
Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

Le procedure di biologia molecolare richiedono personale addestrato per evitare il rischio di risultati errati, in particolare a causa della degradazione degli acidi nucleici dei campioni o della contaminazione dei campioni da parte di prodotti di amplificazione.

Per l'allestimento manuale è necessario disporre di aree separate per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione. Mai introdurre un prodotto di amplificazione nell'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.

Per l'allestimento manuale è necessario disporre di aree separate per i camici, guanti e strumenti dedicati per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione e per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione. Mai trasferire camici, guanti e strumenti dall'area per l'amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione all'area per l'estrazione / allestimento delle reazioni di amplificazione.

È necessario disporre di aree separate per i test di biologia molecolare e i test per colture di microbiologia. Mai manipolare colture solide o liquide nell'area dedicata alle sessioni di estrazione e amplificazione.

I campioni devono essere adatti e possibilmente dedicati a questo tipo di analisi. I campioni devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. Le pipette utilizzate per manipolare i campioni devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA ed RNA.

I reagenti devono essere manipolati sotto una cappa a flusso laminare. I reagenti necessari per la trascrizione inversa e l'amplificazione devono essere preparati in modo da essere utilizzati per un massimo di tre sessioni consecutive in associazione ad ELITE InGenius e in una singola sessione per gli altri sistemi. Le pipette utilizzate per manipolare i reagenti devono essere dedicate solo a questo uso. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per gli aerosol. I puntali utilizzati devono essere sterili, esenti da DNasi ed RNasi, esenti da DNA ed RNA.

Le "PCR cassette" e le micropiastre di PCR devono essere manipolate in modo da non disperdere nell'ambiente i prodotti di amplificazione per evitare la contaminazione di campioni e reagenti.

Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

CoV-2 PCR Mix

La **CoV-2 PCR Mix** deve essere conservata al buio a -20 °C.

La **CoV-2 PCR Mix** può essere congelata e scongelata per un massimo di **dieci volte**: ulteriori cicli di congelamento / scongelamento possono causare un calo delle prestazioni del prodotto.

RT EnzymeMix

L'**RT EnzymeMix** deve essere conservata a -20 °C.

L'**RT EnzymeMix** non deve rimanere esposta a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti e per un massimo di **dieci volte**: un'ulteriore esposizione può causare un calo delle prestazioni del prodotto.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTS170ING
RTS170ING-96

ELITE InGenius®

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

Tamponi respiratori

I campioni di tampone respiratorio destinati all'estrazione dell'RNA, devono essere raccolti in Universal Transport Medium (es. UTM®, COPAN Italia S.p.A.) o Amies (e.g. eSWAB®, COPAN Italia S.p.A.) secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati e conservati a temperatura ambiente (+18/+25°C) per un massimo di un giorno, o conservati a +2 / +8 °C per un massimo di cinque giorni, in alternativa devono essere conservati a -20 °C per un massimo di 1 mese, oppure a -70 °C per tempi più lunghi. I 200 µL di campione devono essere trasferiti nei "Extraction tube" forniti dal prodotto «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Si raccomanda di suddividere i campioni in aliquote prima del congelamento, al fine di evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione al fine di evitare una possibile degradazione dell'acido nucleico.

Nota Bene: Il trasferimento del campione dal tubo primario al "Extraction tube" potrebbe **causare contaminazioni**. Usare le pipette adeguate e seguire le indicazioni riportate nella sezione "Avvertenze e Precauzioni" di questo manuale.

Nota Bene: quando si esegue l'estrazione dell'RNA da campioni di tampone respiratorio con ELITE InGenius e con ELITE InGenius Software versione 1.3.0.16 (o versioni successive equivalenti) utilizzare l'Assay Protocol **SARS-CoV-2 ELITE_QL_RsS_200_100** o **SARS-CoV-2 ELITE_QLIC_RsS_200_100** per l'applicazione Qualitativa o **SARS-CoV-2 ELITE_QTIC_RsS_200_100** per l'applicazione Quantitativa. Questi protocolli processano 200 µL di campione e eluiscono gli acidi nucleici in 100 µL.

Saliva

I campioni di saliva destinati all'estrazione dell'RNA, devono essere raccolti in tubi sterili secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati e conservati a temperatura ambiente (+18/+25°C) per un massimo di due giorni, o conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni, in alternativa devono essere conservati a -20 °C per un massimo di 1 mese, oppure a -70 °C per tempi più lunghi. I 200 µL di campione devono essere trasferiti negli "Extraction tube" forniti dal prodotto «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Si raccomanda di suddividere i campioni in aliquote prima del congelamento, al fine di evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione al fine di evitare una possibile degradazione dell'acido nucleico.

Nota Bene: quando si esegue l'estrazione dell'RNA da campioni di tampone respiratorio con ELITE InGenius e con ELITE InGenius Software versione 1.3.0.16 (o versioni successive equivalenti) utilizzare l'Assay Protocol **SARS-CoV-2 ELITE_QL_SA_200_100** o **SARS-CoV-2 ELITE_QLIC_SA_200_100** per l'applicazione qualitativa. Questo protocollo processa 200 µL di campione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Sostanze interferenti

Quantità di DNA e/o RNA genomico umano maggiori di 1 µg per reazione possono inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione real time.

I dati disponibili relativi all'inibizione causata da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze interferenti" del capitolo "Caratteristiche delle prestazioni".

Amplificazione dei Controlli di amplificazione per l'applicazione Qualitativa

Prima di analizzare un campione, è necessario approvare i controlli di amplificazione relativi al lotto di reagente di amplificazione che si intende utilizzare:

- come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare **SARS-CoV-2 - ELITE Positive Control** (non fornito con il kit), in associazione con l'Assay Protocol **SARS-CoV-2 ELITE_QL_PC**,
- come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare l'acqua per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con l'Assay Protocol **SARS-CoV-2 ELITE_QL_NC**.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTS170ING
RTS170ING-96

Amplificazione dei Calibratori e dei Controlli di amplificazione per l'applicazione Quantitativa

Prima di analizzare un campione, è necessario approvare la curva di calibrazione ed i controlli di amplificazione relativi al lotto di reagenti di amplificazione che si intende utilizzare:

- come calibratori utilizzare i quattro livelli di concentrazione del **SARS-CoV-2 ELITE Standard** (non fornito con il kit), in associazione con l'Assay Protocol **SARS-CoV-2 ELITE QT STD**,
- come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare **SARS-CoV-2 - ELITE Positive Control** (non fornito con il kit), in associazione con l'Assay Protocol **SARS-CoV-2 ELITE QT_PC**,
- come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare l'acqua per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con l'Assay Protocol **SARS-CoV-2 ELITE QT_NC**.

Nota bene: il sistema **ELITE InGenius** richiede la presenza di risultati approvati e validi della curva di calibrazione e dei controlli di amplificazione per ogni lotto di reagente di amplificazione che è memorizzato nel suo database.

La curva di calibrazione, approvata e memorizzata nel database, scade **dopo 60 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'analisi degli standard Q-PCR con il lotto di reagente di amplificazione in uso.

I risultati dei controlli dell'amplificazione, approvati e memorizzati nel database, scadono **dopo 15 giorni**. Alla data di scadenza, è necessario eseguire nuovamente l'analisi dei controlli positivi e negativi con il lotto di reagente di amplificazione in uso.

Inoltre i controlli di amplificazione devono essere eseguiti nuovamente quando:

- si utilizza un nuovo lotto di reagenti di amplificazione,
- i risultati delle analisi di controllo di qualità (vedi paragrafo successivo) sono fuori dalle specifiche,
- è stato effettuato un intervento di manutenzione sullo strumento **ELITE InGenius**.

Controlli di qualità

Si raccomanda la validazione pianificata della procedura di estrazione e amplificazione. È possibile utilizzare campioni già testati o materiale di riferimento certificato. I controlli esterni devono essere utilizzati in conformità con le organizzazioni di accreditamento locali, statali e federali.

PROCEDURA

La procedura di utilizzo del prodotto «**SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit**» con il sistema **ELITE InGenius** comprende tre fasi:

- verifica che il sistema sia pronto,
- impostazione della sessione,
- esame e esportazione dei risultati.

Verifica che il sistema sia pronto

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere lo strumento **ELITE InGenius** e selezionare la modalità «**CLOSED**»;
- per l'**applicazione Quantitativa** verificare che i calibratori (**CoV-2 Q-PCR Standard**) siano presenti, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di reagente di amplificazione che si intende utilizzare. Se non sono presenti risultati dei calibratori approvati e validi, generare gli stessi come descritto nei prossimi paragrafi;
- verificare che i risultati dei controlli di amplificazione (**Controls, CoV-2 Positive Control, CoV-2 Negative Control**) siano presenti, approvati e non scaduti (Status) per il lotto di reagente di amplificazione che si intende utilizzare. Se non sono presenti risultati dei controlli di amplificazione approvati e validi, generare gli stessi come descritto nei prossimi paragrafi;
- scegliere il tipo di corsa, seguendo le istruzioni della Graphical User Interface (GUI) per impostare la sessione utilizzando gli Assay Protocol forniti da ELITechGroup S.p.A.. Questi protocolli IVD sono stati validati specificamente con i prodotti **ELITE MGB Kit**, le matrici e lo strumento **ELITE InGenius**.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF RTS170ING
RTS170ING-96

I protocolli dei saggi disponibili per l'**applicazione Qualitativa** con «**SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit**» sono descritti nella tabella seguente.

Assay Protocol per SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit in applicazione Qualitativa			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
SARS-CoV-2 ELITE_QL_RsS_200_100	Tamponi Respiratori	Positivo / Negativo	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: NO Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
SARS-CoV-2 ELITE_QL_SA_200_100	Saliva	Positivo / Negativo	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: NO Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL

Assay Protocol per SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit in applicazione Qualitativa con utilizzo del «CPE - Internal Control»			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
SARS-CoV-2 ELITE_QLIC_RsS_200_100	Tamponi Respiratori	Positivo / Negativo	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: SI Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL
SARS-CoV-2 ELITE_QLIC_SA_200_100	Saliva	Positivo / Negativo	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: SI Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL

I protocolli dei saggi disponibili per l'**applicazione Quantitativa** con «**SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit**» sono descritti nella tabella seguente.

Assay Protocol per SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit in applicazione Quantitativa			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
SARS-CoV-2 ELITE_QT_RsS_200_100	Tamponi respiratori	Positivo / copie/mL / Negativo	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: NO Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL

Assay Protocol per SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit in applicazione Quantitativa con utilizzo del «CPE - Internal Control»			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
SARS-CoV-2 ELITE_QTIC_RsS_200_100	Tamponi Respiratori	Positivo / copie/mL / Negativo	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: SI Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL

Se l'Assay Protocol di interesse, non è presente nel sistema, contattare il Servizio Clienti locale di ELITechGroup S.p.A..

Impostazione della sessione

Il prodotto **SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit** in associazione al sistema **ELITE InGenius** può essere utilizzato per eseguire:

- Corsa integrata (Extract + PCR),
- Corsa di amplificazione (PCR only),
- Corsa di calibrazione (PCR only, per l'**applicazione Quantitativa**)
- Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only).

Tutti i parametri necessari per l'esecuzione della sessione sono inclusi nell'Assay Protocol disponibile sullo strumento e sono richiamati automaticamente quando si seleziona l'Assay Protocol.

Nota bene: il sistema **ELITE InGenius** può essere collegato al "Laboratory Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile inviare le informazioni di impostazione della sessione. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Prima di iniziare la sessione è necessario:

- prelevare le provette con i campioni da analizzare. Se necessario, scongelare il contenuto a temperatura ambiente (+18 / 25 °C). Mescolare il reagente con vortex per 10 secondi, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare e scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (+18 / 25 °C) le provette di **CoV-2 PCR Mix** (tappo NEUTRO) necessarie per la sessione (il contenuto iniziale di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **48 reazioni**). Mescolare il reagente con vortex per 10 secondi per tre volte, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
- prelevare al momento dell'uso le provette di **RT EnzymeMix** (tappo con inserto NERO) necessarie per la sessione (il contenuto iniziale di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **48 reazioni**). Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio.

Nota bene: L' **RT EnzymeMix** non deve rimanere esposto a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

- preparare un tubo da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt Ref. 72.694.005, non fornito nel kit) per la **miscela completa di reazione** e marcarla in modo riconoscibile con un pennarello indelebile;
- calcolare i volumi dei due componenti forniti nel kit necessari per preparare la miscela completa di reazione in base al numero di campioni da analizzare come descritto nella tabella seguente;

Nota bene: Per il calcolo dei volumi dei due componenti da utilizzare per preparare la **miscela completa di reazione**, è necessario definire il numero di campioni (N) da testare nella sessione e seguire quanto riportato nella tabella seguente.

Numero di campioni (N)	CoV-2 PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0,3 µL
6 ≤ N ≤ 11	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0,3 µL
N = 12	290 µL	4.4 µL

- preparare la **miscela completa di reazione** trasferendo nel tubo dedicato i volumi calcolati dei due componenti;
- mescolare **con vortex a bassa velocità** per tre volte per circa 10 secondi, centrifugare la provetta per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenere in ghiaccio;

Nota bene: La **miscela completa di reazione** deve essere utilizzata entro **7 ore**, se lasciata nel blocco refrigerato dello strumento. Questo permette di eseguire 2 sessioni di lavoro da 3 ore ciascuna e iniziare una terza sessione.

Nota bene: La miscela completa di reazione **non** può essere conservata.

Le principali operazioni per l'impostazione dei quattro tipi di corsa sono descritte di seguito.

A Corsa integrata

Per impostare la corsa integrata per l'estrazione e amplificazione del campione, eseguire le seguenti indicazioni come da GUI:

- Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
- Assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
- Per ogni "Track" di interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre del campione.
- Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio SARS-CoV-2 ELITE_QL_RsS_200_100).
- Assicurarsi che il "Protocol" visualizzato sia: "Extract + PCR".
- Selezionare "Extraction tube" nella colonna "Sample Position": Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare il **CPE** (se richiesto) e la **miscela completa di reazione** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Caricare le **"PCR Cassette"**, le cartucce di estrazione "ELITE InGenius SP 200", tutti i consumabili e i campioni da estrarre nella posizione specificata al punto 8, seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" per avviare la corsa.

Dopo il completamento della sessione, il sistema **ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa il campione estratto rimasto nell'"Elution Tube" deve essere prelevato dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della corsa le **"PCR Cassette"** con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimossi dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: Alla fine della corsa, la **miscela completa di reazione** può essere conservata nel blocco refrigerato tenendo conto del tempo massimo di 7 ore.

B Corsa di amplificazione

Per impostare la corsa di amplificazione partendo dall'RNA estratto, eseguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
2. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
3. Per ogni Track di interesse compilare il SID digitando o scansionando il codice a barre del campione.
4. Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (ad esempio "SARS-CoV-2 ELITE_QL_RsS_200_100").
5. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
6. Assicurarsi che la posizione di caricamento del campione nella colonna "Sample Position" sia "Elution Tube (bottom row)". Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
7. Caricare la **miscela completa di reazione** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Caricare e controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionata seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare le **"PCR Cassette"** e i campioni degli acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Chiudere la porta dello strumento,
11. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della sessione, il sistema **ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa il campione rimasto nell'"Elution Tube" deve essere prelevato dallo strumento, tappato identificato e conservato a -20 °C per un mese. Evitare la fuoriuscita del campione estratto.

Nota bene: Alla fine della corsa le **"PCR Cassette"** con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimossi dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: Alla fine della corsa, la **miscela completa di reazione** può essere conservata nel blocco refrigerato tenendo conto del tempo massimo di 7 ore.

C. Corsa di calibrazione (per l'applicazione Quantitativa)

Per impostare la corsa di calibrazione seguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare i tubi di **CoV-2 Q – PCR Standard** (Cal1: CoV-2 Q-PCR Standards 10³, Cal2: CoV-2 Q-PCR Standards 10³, Cal3: CoV-2 Q-PCR Standards 10⁴, Cal4: CoV-2 Q-PCR Standards 10⁵) a temperatura ambiente (~+25°C) per 30 minuti. Ogni provetta è sufficiente per preparare 4 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
2. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
3. Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay"
4. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
5. Selezionare il protocollo da utilizzare "SARS-CoV-2 ELITE_QT_STD" nella Colonna "Assay" e compilare il numero di lotto e la data di scadenza per il **CoV-2 Q – PCR Standard**.
6. Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
7. Caricare la miscela completa di reazione nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
8. Caricare/controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" selezionato seguendo le istruzioni GUI. Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare le **"PCR Cassette"**, e i tubi di **CoV-2 Q – PCR Standard** seguendo le istruzioni GUI. Fare click su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Chiudere la porta dello strumento.
11. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della procedura, l'**ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota: alla fine della corsa il **Q – PCR Standard** rimasto può essere rimosso dallo strumento, tappato e conservato a -20 °C.

Nota: alla fine della corsa le **"PCR Cassette"** con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimossi dallo strumento ed eliminati senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota: La **miscela completa di reazione** può essere conservata nel blocco refrigerato per un massimo di 7 ore.

D. Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo

Per impostare la corsa di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo eseguire le seguenti indicazioni come da GUI:

1. Scongellare il tubo di **CoV-2 Positive Control** per la sessione. Ogni provetta è sufficiente per 4 sessioni. Mescolare con vortex, centrifugare il contenuto per 5 secondi.
2. Trasferire almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in un "Elution tube", fornito nell'ELITE InGeniusSP 200 Consumable Set.
3. Selezionare "Perform Run" dalla schermata "Home".
4. Nelle "Track" di interesse, selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay".
5. Anche se l'estrazione non sarà eseguita, assicurarsi che "Extraction Input Volume" sia impostato a 200 µL e che "Extracted Elute Volume" sia impostato a 100 µL.
6. Per il controllo positivo, selezionare l'Assay Protocol "SARS-CoV-2 ELITE_QL_PC" per l'applicazione Qualitativa o "SARS-CoV-2 ELITE_QT_PC" per l'applicazione Quantitativa nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza del **CoV-2 Positive Control**.
7. Per il controllo negativo, selezionare l'Assay Protocol del test "SARS-CoV-2 ELITE_QL_NC" per l'applicazione Qualitativa o "SARS-CoV-2 ELITE_QT_NC" per l'applicazione Quantitativa nella colonna "Assay" e inserire il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare.
8. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
9. Caricare la **miscela completa di reazione** nell'"Inventory Block" selezionato seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
10. Caricare / controllare i Rack dei puntali nell'"Inventory Area" seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic su "Next" per procedere con l'operazione successiva.
11. Caricare le **"PCR Cassette"**, il tubo di **CoV-2 Positive Control** e il tubo di controllo negativo seguendo le istruzioni della GUI. Fare clic sul pulsante "Next" per procedere con l'operazione successiva.
12. Chiudere la porta dello strumento,
13. Premere "Start" per iniziare la corsa.

Dopo il completamento della sessione, il sistema **ELITE InGenius** permette di visualizzare, approvare, memorizzare i risultati e di stampare e salvare il rapporto.

Nota bene: Alla fine della corsa il **Controllo Positivo** rimasto deve essere prelevato dallo strumento, tappato, identificato e conservato a -20 °C. Il controllo Negativo rimasto deve essere eliminato.

Nota bene: Alla fine della corsa le **"PCR Cassette"** con i prodotti di reazione e i consumabili devono essere rimossi dallo strumento ed eliminate senza produrre contaminazioni ambientali. Evitare la dispersione dei prodotti di reazione.

Nota bene: Alla fine della corsa, la **miscela completa di reazione** può essere conservata nel blocco refrigerato tenendo conto del tempo massimo di 7 ore.

Esame ed Esportazione dei risultati

Al termine della sessione, viene visualizzata automaticamente la schermata "Results Display". In questa schermata sono visualizzati i risultati relativi a campione / controllo e le informazioni relative alla corsa. Da questa schermata è possibile approvare il risultato, stampare o salvare i rapporti ("Sample Report" o "Track Report"). Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Nota bene: il sistema **ELITE InGenius** può essere collegato al "Laboratory Information Server" (LIS) tramite il quale è possibile inviare le informazioni di impostazione della sessione. Per informazioni dettagliate consultare il manuale di istruzioni dello strumento.

Il sistema **ELITE InGenius** genera i risultati con il prodotto **SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit** attraverso questa procedura:

- A. Validazione della curva di calibrazione
- B. Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
- C. Validazione dei risultati del campione per l'applicazione Qualitativa
- D. Validazione dei risultati del campione per l'applicazione Quantitativa
- E. Refertazione dei risultati del campione.

A. Validazione della curva di calibrazione

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde per i geni di interesse (canale **"SARSCoV-2"**) nella reazione di amplificazione dei Calibratori sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nell' Assay Protocol "Q-SARS-CoV-2 ELITE_QTIC_STD".

La curva di Calibrazione, specifica per il lotto del reagente di amplificazione, è memorizzata nel database (Calibration) e può essere visualizzata e approvata da parte del personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni della GUI.

La curva di Calibrazione, specifica per il lotto del reagente di amplificazione, scade **dopo 60 giorni**.

Nota Bene: Quando il risultato dell'amplificazione della Curva Standard non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "Failed" nella schermata "Calibration" e non è possibile approvarlo. In questo caso la reazione di amplificazione della Curva Standard deve essere ripetuta.

Nota Bene: Se la Curva Standard è processata insieme ai campioni da analizzare ed il suo risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

B. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde per i geni di interesse (canale **RdRp** e canale **ORF8** oppure canale **SARSCoV-2** per l'applicazione quantitativa), nella reazione di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocols "SARS-CoV-2 ELITE_QL_PC" e "SARS-CoV-2 ELITE_QL_NC", per l'applicazione Qualitativa o "SARS-CoV-2 ELITE_QT_PC" e "SARS-CoV-2 ELITE_QT_NC" per l'applicazione Quantitativa.

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, sono memorizzati nel database (Controls) e possono essere visualizzati e approvati da parte del personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst", seguendo le istruzioni della GUI.

I risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione, specifici per il lotto del reagente di amplificazione, scadono **dopo 15 giorni**.

I risultati delle corse di amplificazione con Controllo Positivo e Controllo Negativo vengono utilizzati dal software dello strumento per calcolare l'impostazione delle "Control Charts" e monitorare le prestazioni della fase di amplificazione. Fare riferimento al manuale dello strumento per ulteriori dettagli.

Nota Bene: Per l'applicazione Quantitativa sono richiesti i risultati di quattro ottenuti da quattro sessioni differenti di Controllo Positivo e Controllo Negativo, per settare la "Control Chart".

Nota Bene: Quando un risultato dell'amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo non soddisfa i criteri di accettazione, lo strumento visualizza il messaggio "Failed" nella schermata "Controls" e non è possibile approvarlo. In questo caso la reazione di amplificazione del Controllo Positivo o del Controllo Negativo deve essere ripetuta.

Nota Bene: Se il Controllo Positivo o del Controllo Negativo è processato insieme ai campioni da analizzare ed il suo risultato non è valido, l'intera sessione non è valida. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

C. Validazione dei risultati del campione per l'applicazione Qualitativa

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda per i geni di interesse (canale **RdRp** e canale **ORF8**), e dalla sonda per il Controllo Interno (canale **IC**) nelle reazioni di amplificazione dei campioni sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nell'Assay Protocol "SARS-CoV-2 ELITE_QL_RsS_200_100", "SARS-CoV-2 ELITE_QLIC_RsS_200_100", "SARS-CoV-2 ELITE_QL_SA_200_100" oppure "SARS-CoV-2 ELITE_QLIC_SA_200_100".

I risultati sono visualizzati nei rapporti generati dallo strumento ("Result Display").

La corsa del campione può essere approvata quando le due condizioni riportate nella tabella sottostante sono soddisfatte.

1) Controllo Positivo	Status
CoV-2 Positive Control	APPROVATO
2) Controllo Negativo	Status
CoV-2 Negative Control	APPROVATO

Per ciascun campione il risultato del saggio è interpretato automaticamente dal sistema come stabilito dall'algoritmo del **software ELITE InGenius** e dai parametri dell'Assay Protocol.

I possibili messaggi relativi al risultato di un campione sono riportati nella tabella sottostante.

Risultato della sessione del campione	Interpretazione
RdRp: SARS CoV 2 RNA Rilevato.	L'RNA del gene RdRp di SARS-CoV-2 è stato rilevato nel campione.
ORF8: SARS CoV 2 RNA Rilevato.	L'RNA del gene ORF8 di SARS-CoV-2 è stato rilevato nel campione.
RdRp: SARS CoV 2 RNA non Rilevato o minore di LoD.	L'RNA del gene RdRp di SARS-CoV-2 non è rilevato nel campione. Se anche l'RNA del gene SARS-CoV-2 ORF8 non è stato rilevato , il campione è negativo o la sua concentrazione è inferiore al Limite di Rivelazione del saggio.
ORF8: SARS CoV 2 RNA non Rilevato o minore di LoD.	L'RNA del gene ORF8 di SARS-CoV-2 non è rilevato nel campione. Se anche l'RNA del gene SARS-CoV-2 RdRp non è stato rilevato , il campione è negativo o la sua concentrazione è inferiore al Limite di Rivelazione del saggio.
Invalido – Ripetere il campione	Risultato del saggio non valido a causa di un problema rilevato dal Controllo Interno (estrazione errata, presenza di un inibitore o errore di campionamento). Il test dovrebbe essere ripetuto.

Nota bene: Nel caso di campioni con titolo molto basso di SARS-CoV-2, vicino o sotto il limite di rilevazione, è possibile che uno dei due target del patogeno, il gene **RdRp** o il gene **ORF8**, possa risultare casualmente negativo a causa del basso numero di copie. In questo caso, ci si aspetta che il valore Ct rilevato sia superiore a 35. Poiché i due geni target, **RdRp** e **ORF8**, sono entrambi specifici per SARS-CoV-2, un risultato positivo per uno solo dei due target è sufficiente per attribuire la positività per SARS-CoV-2 al campione in test.

I campioni segnalati come "ORF8: SARS CoV 2 RNA non Rilevato o minore di LoD" e "RdRp: SARS CoV 2 RNA Rilevato" con un valore Ct inferiore o uguale a 35 da parte del **software ELITE InGenius**, sono positivi per SARS-CoV-2. In questo caso, la reazione specifica per la regione **ORF8** ha dato un risultato negativo a causa della delezione del gene **ORF8**, come nel ceppo SARS-CoV-2 Δ 382 (Y. C. F. Su et al., 2020, B. E. Young et al., 2020), ma poiché il test rileva due bersagli patogeni, la reazione specifica per la regione **RdRp** ha dato un risultato positivo e il virus è stato rilevato.

I campioni non idonei per l'interpretazione dei risultati sono segnalati come "Invalid - Retest Sample" dal **software ELITE InGenius**. In questo caso non è stato possibile rilevare in modo efficiente l'RNA del Controllo Interno perché si sono verificati problemi nella fase di trascrizione inversa, amplificazione o nella fase di estrazione (degradazione dell'RNA, perdita dell'RNA durante l'estrazione, presenza di inibitori nell'estratto) o numero non sufficiente di cellule a causa di un prelievo non corretto, che possono causare risultati non corretti.

Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato mediante amplificazione in modalità "PCR Only". Se si conferma il risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota utilizzando la modalità "Extract + PCR".

I campioni idonei in cui non è stato possibile rilevare l'RNA di **RdRp** o **ORF8** sono segnalati come "ORF8 RNA Not Detected or below LoD" o "RdRp RNA Not Detected or below LoD". In questo caso non si può escludere che l'RNA sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni").

Nella seguente tabella sono riportate le possibili combinazioni dei messaggi di risultato e gli esiti del test.

ORF8	RdRp	Risultato del saggio
+	+	SARS-CoV-2 positivo
-	+	SARS-CoV-2 positivo
+	-	SARS-CoV-2 positivo
-	-	SARS-CoV-2 negativo

Nota bene: I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e gli altri risultati degli esami di laboratorio relativi al paziente.

I risultati della corsa del campione sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Result Display) da parte di personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst" seguendo le istruzioni della GUI. Dalla finestra "Result Display" è possibile generare e salvare i risultati della sessione come "Sample Report" e "Track Report".

D. Validazione dei risultati del campione per l'applicazione Quantitativa

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda per i geni di interesse (canale **SARSCoV-2**), e dalla sonda per il Controllo Interno (canale **IC**) nelle reazioni di amplificazione dei campioni sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nell'Assay Protocol "SARS-CoV-2 ELITE_QTIC_RsS_200_100".

I risultati sono visualizzati nei rapporti generati dallo strumento ("Result Display").

La corsa del campione può essere approvata quando le tre condizioni riportate nella tabella sottostante sono soddisfatte.

1) Curva di Calibrazione	Status
CoV-2 Q-PCR Standards	APPROVATO
2) Controllo Positivo	Status
CoV-2 Positive Control-Q	APPROVATO
3) Controllo Negativo	Status
CoV-2 Negative Control-Q	APPROVATO

Per ciascun campione il risultato del saggio è interpretato automaticamente dal sistema come stabilito dall'algoritmo del **software ELITE InGenius** e dai parametri dell'Assay Protocol.

I possibili messaggi relativi al risultato di un campione sono riportati nella tabella sottostante

Risultato della sessione del campione	Interpretazione
SARSCoV-2: RNA Rilevato, quantità uguale a XXX copie / mL	L'RNA di SARS-CoV-2 è stato rilevato nel campione. nell'intervallo di misura del saggio, quantità come mostrato.
SARSCoV-2: RNA Rilevato, quantità sotto LLoQ copie / mL	L'RNA di SARS-CoV-2 è stato rilevato nel campione al di sotto del limite inferiore di quantificazione del saggio.
SARSCoV-2: RNA Rilevato, quantità al di sopra di ULoQ copie / mL	L'RNA di SARS-CoV-2 è stato rilevato nel campione al di sopra del limite inferiore di quantificazione del saggio..
SARSCoV-2: RNA Non Rilevato o minore di LoD copie / mL	L'RNA di SARS-CoV-2 non è stato rilevato nel campione. Il campione è negativo per SARS-CoV-2 o la sua concentrazione è inferiore al Limite di Rivelazione del saggio.
Invalido – ritestare il campione	Risultato del saggio non valido per problemi con il Controllo Interno (estrazione errata o carry-over di inibitori). Il test deve essere ripetuto

Note: A causa della dipendenza del titolo del campione respiratorio di SARS-CoV-2 dalla procedura di campionamento, il risultato quantitativo deve essere considerato solo come una indicazione della carica virale.

I campioni non idonei per l'interpretazione dei risultati sono segnalati come "Invalid - Retest Sample" dal **software ELITE InGenius**. In questo caso non è stato possibile rilevare in modo efficiente l'RNA del Controllo Interno perché si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o nella fase di estrazione (degradazione dell'RNA, perdita dell'RNA durante l'estrazione, presenza di inibitori nell'estratto o numero non sufficiente di cellule a causa di un prelievo non corretto) che possono causare risultati non corretti.

Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato mediante amplificazione in modalità "PCR Only". Se si conferma il risultato non valido, il campione deve essere ritestato a partire dall'estrazione di una nuova aliquota utilizzando la modalità "Extract + PCR".

I campioni segnalati come "SARSCoV-2: RNA Not Detected or below LoD" sono idonei per l'analisi ma non è stato possibile rilevare l'RNA di SARS-CoV-2. In questo caso non si può escludere che l'RNA sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni").

Nota bene: I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati tenendo conto di tutti i dati clinici e gli altri risultati degli esami di laboratorio relativi al paziente.

I risultati della corsa del campione sono memorizzati nel database e, se validi, possono essere approvati (Result Display) da parte di personale con la qualifica di "Administrator" o "Analyst" seguendo le istruzioni della GUI. Dalla finestra "Result Display" è possibile generare e salvare i risultati della sessione come "Sample Report" e "Track Report".

E. Esportazione dei risultati del campione

I risultati del campione sono memorizzati nel database e possono essere esportati come "Sample Report" e "Track Report".

Il "Sample Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per i campioni selezionati (SID).

Il "Track Report" mostra i dettagli di una sessione di lavoro per i Track selezionati.

I "Sample Report" e "Track Report" possono essere stampati e firmati dal personale autorizzato.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Limite di Rilevazione (LoD)

Il Limite di Rilevazione (Limit of Detection, LoD) del prodotto SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit, è stato definito in associazione a campioni di tamponi respiratori e al sistema ELITE InGenius.

Il valore di LoD è stato calcolato testando due diluizioni di tamponi respiratori raccolti in UTM e in eSWAB (COPAN Italia S.p.A.) positivamente con materiale di riferimento SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) a titolo noto. Le diluizioni sono state preparate al valore di LoD atteso di 100 genomi Equivalenti (gEq) / mL. Ciascun tipo di campione è stato processato in 20 replicati con ELITE InGenius nella modalità "Extract + PCR". Il valore di LoD è confermato quando almeno 18 replicati su 20 danno un risultato positivo come da linee guida del CLSI EP17-A. I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Limite di Rilevazione (LoD) per tamponi respiratori e ELITE InGenius					
Campioni	Titolo	Target	N	Positivi	Negativi
Tamponi raccolti in UTM	100 gEq / mL	RdRp o ORF8	20	20	0
Tamponi raccolti in eSWAB	100 gEq / mL	RdRp o ORF8	20	19	1

Il valore di LoD per i target RdRp e ORF8 è stata confermata a 100 gEq / mL per i tamponi respiratori raccolti in UTM e in eSWAB (COPAN Italia S.p.A.).

Il Limite di Rilevazione (Limit of Detection, LoD) del prodotto SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit, è stato definito in associazione a campioni di saliva e al sistema ELITE InGenius.

Il valore di LoD è stato calcolato testando un pannello di campioni di saliva positivamente con materiale di riferimento SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) a titolo noto. Sono stati preparati sei livelli di diluizioni, a partire da 1000 gEq / mL a 56 gEq / mL. Ciascuna diluizione è stata processata in 12 replicati con ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". L'analisi statistica è stata eseguita con la regressione Probit. Il limite di rilevazione è stato definito come la concentrazione alla quale la probabilità di ottenere un risultato positivo è il 95%.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Limite di rilevazione (gEq / mL) per campioni di saliva e ELITE InGenius			
Target	LoD	Intervallo di confidenza 95%	
		Valore inferiore	Valore superiore
SARS-CoV-2	714	513	1418

Il valore di LoD è stato verificato testando 20 replicati di campioni di saliva positivamente con materiale di riferimento SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) alla concentrazione calcolata. LoD è confermata quando almeno 18 replicati su 20 danno un risultato positivo come da linee guida del CLSI EP17-A.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Limite di Rilevazione (LoD) per campioni di saliva e ELITE InGenius					
Campioni	Titolo	Target	N	Positivi	Negativi
Campioni di saliva	714 gEq / mL	RdRp or ORF8	20	20	0

Intervallo di misurazione lineare

L'intervallo di misurazione lineare di SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit è stato determinato in associazione con tamponi respiratori ed il sistema ELITE InGenius.

L'intervallo di misurazione lineare stato determinato utilizzando un pannello di diluizioni del materiale di riferimento di SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) in campioni di tamponi respiratori negativi. Il pannello consiste in sette punti di diluizioni (1 Log tra una diluizione e la successiva) da 10⁸ copie / mL a 10² copie / mL. Ogni campione del pannello è stato testato in 3 replicati al fine di eseguire l'intera procedura di analisi con ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR" in associazione ai prodotti ELITEchGroup S.p.A.. L'analisi dei dati ottenuti, eseguita con la regressione polinomiale, ha dimostrato che il saggio presenta una risposta lineare per tutte le diluizioni.

Il limite inferiore dell'intervallo di misurazione lineare (LLOQ) è stato fissato alla più bassa concentrazione che presenti risultati quantitativi sufficientemente accurati e precisi all'interno del range $\pm 0,5$ Log: 250 copie / mL.

Il limite superiore dell'intervallo di misurazione lineare (ULOQ) è stato fissato alla più alta concentrazione che fornisce risultati quantitativi sufficientemente accurati e precisi all'interno del range $\pm 0,5$ Log: 250.000.000 copie / mL.

I risultati finali sono riportati nella tabella seguente.

Intervallo di misurazione lineare per campioni di tamponi respiratori con ELITE InGenius	
Limite inferiore	Limite superiore
250 copie / mL	250.000.000 copie / mL

Inclusività: Efficienza di rilevazione

L'efficienza di rilevazione su diversi isolati di SARS-CoV-2 è stata valutata *in silico* per confronto con le sequenze disponibili nelle banche dati nucleotidiche (sono state testate più di 30.000 sequenze genomiche di SARS-CoV-2).

L'esame delle regioni scelte per l'ibridazione degli oligonucleotidi di innesco e delle sonde fluorescenti sull'allineamento delle sequenze dei geni RdRp and ORF8 ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative e perciò la possibilità di rilevare in modo efficiente i diversi isolati di SARS-CoV-2.

In caso di isolati di SARS-CoV-2 riportanti delezione del gene ORF8 (e.g. $\Delta 382$), una efficiente rilevazione del virus è assicurata dai primers e dalle sonde fluorescenti specifiche per il gene RdRp.

Marcatori potenzialmente interferenti: cross-reattività

La potenziale cross-reattività del saggio con organismi diversi da quello di interesse è stata valutata *in silico* per confronto con le sequenze disponibili nelle banche dati nucleotidiche.

Le regioni scelte per l'ibridizzazione dei primer e delle sonde fluorescenti sono state verificate rispetto all'allineamento delle sequenze di altri organismi. L'analisi delle regioni di ibridazione ha evidenziato l'assenza di omologie significative e non ha indicato potenziali interferenze.

L'assenza di cross-reattività con altri organismi potenzialmente presenti in campioni di tamponi respiratori è stata inoltre verificata mediante l'analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati.

I campioni di DNA o RNA genomico di altri organismi potenzialmente interferenti (ATCC, ZeptoMetrix e Qnostics) sono stati analizzati in tre replicati in associazione al sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only". Il DNA o RNA genomico di ciascun organismo è stato aggiunto con 0,4 ng/reazione di RNA totale umano (InVivoScribe) e di 500 ng/reazione di DNA genomico umano (Promega) per riprodurre il campione clinico estratto.

I risultati finali sono riportati nella seguente tabella.

Campioni	Esito
Influenza A virus (H1N1)	Nessuna cross-reattività
Influenza A virus (H3N2)	Nessuna cross-reattività
Influenza A virus (H3N2)	Nessuna cross-reattività
Influenza B virus (Florida)	Nessuna cross-reattività
Parainfluenza Virus 1	Nessuna cross-reattività
Parainfluenza Virus 2	Nessuna cross-reattività
Parainfluenza Virus 3	Nessuna cross-reattività
hMPV	Nessuna cross-reattività
Human Coronavirus OC43	Nessuna cross-reattività
Human Coronavirus 229E	Nessuna cross-reattività
SARS-CoV	Nessuna cross-reattività
RSVA	Nessuna cross-reattività

Continua nella prossima pagina.

Campioni	Esito
RSVB	Nessuna cross-reattività
Enterovirus	Nessuna cross-reattività
Rhinovirus	Nessuna cross-reattività
ADV	Nessuna cross-reattività
CMV	Nessuna cross-reattività
<i>Bordetella pertussis</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Bordetella parapertussis</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Haemophilus influenzae</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Legionella pneumophila</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Escherichia coli</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Aspergillus spp</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Candida albicans</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Nessuna cross-reattività

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti testati non hanno evidenziato cross-reattività per i target RdRp e ORF8 quando testati con SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit.

Marcatori potenzialmente interferenti: interferenza

L'assenza di interferenza con altri organismi potenzialmente presenti in campioni di tamponi respiratori è stata verificata mediante l'analisi di un pannello di materiali di riferimento certificati.

I campioni di DNA o RNA genomico di altri organismi potenzialmente interferenti (ATCC, ZeptoMetrix e Qnostics) sono stati aggiunti con materiale di riferimento SARS-CoV-2 certificato (bei Resources) a bassa concentrazione (circa 30 gEq / reazione). I campioni sono stati analizzati in tre replicati in associazione al sistema ELITE InGenius in modalità "PCR Only". Ciascun campione è stato aggiunto con 0,4 ng/reazione con RNA totale umano (InVivoScribe) and 500 ng/reazione con DNA genomico umano (Promega) per riprodurre il campione clinico estratto.

I risultati finali sono riportati nella seguente tabella.

Campioni	Esito
Influenza A virus (H1N1)	Nessuna interferenza
Influenza A virus (H3N2)	Nessuna interferenza
Influenza A virus (H3N2)	Nessuna interferenza
Influenza B virus (Florida)	Nessuna interferenza
Parainfluenza Virus 1	Nessuna interferenza
Parainfluenza Virus 2	Nessuna interferenza
Parainfluenza Virus 3	Nessuna interferenza
hMPV	Nessuna interferenza
Human Coronavirus OC43	Nessuna interferenza
Human Coronavirus 229E	Nessuna interferenza
SARS-CoV	Nessuna interferenza
RSVA	Nessuna interferenza

Continua nella prossima pagina

Campioni	Esito
RSVB	Nessuna interferenza
Enterovirus	Nessuna interferenza
Rhinovirus	Nessuna interferenza
ADV	Nessuna interferenza
CMV	Nessuna interferenza
<i>Bordetella pertussis</i>	Nessuna interferenza
<i>Bordetella parapertussis</i>	Nessuna interferenza
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nessuna interferenza
<i>Haemophilus influenzae</i>	Nessuna interferenza
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Nessuna interferenza
<i>Legionella pneumophila</i>	Nessuna interferenza
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Nessuna interferenza
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Nessuna interferenza
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nessuna interferenza
<i>Escherichia coli</i>	Nessuna interferenza
<i>Aspergillus spp</i>	Nessuna interferenza
<i>Candida albicans</i>	Nessuna interferenza
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Nessuna interferenza
RSVB	Nessuna interferenza
Enterovirus	Nessuna interferenza

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti non hanno mostrato alcun impatto sull'amplificazione dei target RdRp o ORF8 quando testati con SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit.

Sostanze potenzialmente interferenti

Un pannello di sostanze potenzialmente interferenti a concentrazioni rilevanti è stato testato con il prodotto SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit. Le sostanze testate per tamponi respiratori sono state sangue intero, mucina, antibiotici (Azitromicina), steroidi (Ambroxol), mucolitici (Beclometasone), antistaminici (Ebastina) and "CPE – Internal Control" (EG SpA, code CTCPE).

Le sostanze sono state aggiunte singolarmente a campioni di tamponi respiratori positivamente con il materiale di riferimento di SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) alla concentrazione di circa 30 gEq / reazione. I campioni sono stati testati in 3 replicati con il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct dei target RdRp e ORF8 e del Controllo Interno (campioni di riferimento e in test) sono stati usati per calcolare la percentuale del Coefficiente di Variabilità (%CV) al fine di valutare la possibile interferenza.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Test delle sostanze interferenti, %CV				
Campioni	Pos. / Rep.	RdRp	ORF8	IC
Sangue intero	6 / 6	1,170	0,736	1,810
Mucina	6 / 6	1,847	1,161	2,768
Azitromicina	6 / 6	1,035	0,762	1,116
Ambroxol	6 / 6	1,297	1,042	0,733
Beclometasone	6 / 6	0,900	0,722	0,893
Ebastina	6 / 6	0,955	0,669	0,632
CPE – Internal Control	6 / 6	1,315	0,802	0,404

Tutti i campioni sono risultati positivi per i target di interesse. I %CV dei valori di Ct sono tutti al di sotto del 3% e accettabili.

Le sostanze testate per saliva sono state sangue intero, mucina, antibiotici (Azitromicina), steroidi (Ambroxol), mucolitici (Beclometasone), antistaminici (Ebastina), "CPE – Internal Control" (EG SpA, code CTCPE), decongestionante (Fenilefrina cloridrato), nicotina e dentifricio.

Le sostanze sono state aggiunte singolarmente a campioni di saliva positivamente con il materiale di riferimento di SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) alla concentrazione di circa 3x LoD copies / mL. I campioni sono stati testati in 3 replicati con il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct dei target RdRp e ORF8 e del Controllo Interno (campioni di riferimento e in test) sono stati usati per calcolare la percentuale del Coefficiente di Variabilità (%CV) al fine di valutare la possibile interferenza.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Test delle sostanze interferenti, %CV				
Campioni	Pos. / Rep.	RdRp	ORF8	IC
Sangue intero	6	0,901	1,288	2,634
Mucina	6	1,536	1,755	2,070
Azitromicina	6	2,900	2,992	1,647
Ambroxol	6	3,483	2,739	1,608
Beclometasone	6	1,524	1,163	1,925
Ebastina	6	2,971	1,920	1,125
CPE – Internal Control	6	3,269	1,210	0,720
Fenilefrina cloridrato	6	3,052	2,375	2,106
Nicotina	6	1,838	1,127	2,247
Dentifricio	6	2,586	2,246	1,744

Tutti i campioni sono risultati positivi per i target di interesse. I %CV dei valori di Ct sono tutti al di sotto del 3,5% e accettabili.

Ripetibilità

La ripetibilità dei risultati ottenuti con il prodotto SARS-CoV-2 ELITE MGB Kit in associazione con il sistema ELITE InGenius è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di tamponi respiratori. Il pannello includeva un campione negativo e tre campioni positivamente con materiale di riferimento certificato SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) alle concentrazioni di circa 300 gEq / mL e circa 600 gEq / mL.

La ripetibilità è stata ottenuta mediante l'analisi dei campioni del pannello in tre replicati, due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto. Due lotti di prodotto sono stati usati in due giorni diversi sullo stesso strumento e dallo stesso operatore. I campioni sono stati processati con il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct dei target RdRp e ORF8 e del Controllo Interno sono stati usati per calcolare il CV% al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

RdRp, Ripetibilità Inter-Lotto			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	12 / 12	1,49	100%
300 gEq / mL	11 / 12	1,95	92%
Negativo	0 / 12	-	0%
ORF8, Ripetibilità Inter-Lotto			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	12 / 12	2,47	100%
300 gEq / mL	12 / 12	2,83	100%
Negativo	0 / 12	-	0%

Continua nella prossima pagina

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF

RTS170ING
RTS170ING-96

IC, Ripetibilità Inter-Lotto			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Validi
intero pannello	36 / 36	2,19	100%

Nel test di Ripetibilità, il saggio ha rilevato i target ORF8 e RdRp come atteso, e il CV% non ha superato il valore del 3%.

Riproducibilità

La riproducibilità dei risultati ottenuti con il prodotto SARS-COV-2 ELITE MGB Kit in associazione con il sistema ELITE InGenius è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di tamponi respiratori. Il pannello includeva un campione negativo e tre campioni positivamente con materiale di riferimento certificato SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) alle concentrazioni di circa 300 gEq / mL e circa 600 gEq / mL.

La riproducibilità è stata ottenuta mediante l'analisi dei campioni del pannello in tre replicati, in due sessioni al giorno. Sono stati testati due lotti diversi di prodotto, in due giorni diversi, su due strumenti diversi, e mediante due diversi operatori. I campioni sono stati processati con il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". I valori di Ct dei target RdRp e ORF8 e del Controllo Interno sono stati usati per calcolare il CV% al fine di valutare la Riproducibilità come imprecisione.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

RdRp, Riproducibilità			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	12 / 12	3,49	100%
300 gEq / mL	12 / 12	1,84	100%
Negativo	0 / 12	-	0%
ORF8, Riproducibilità			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	12 / 12	2,56	100%
300 gEq / mL	12 / 12	1,28	100%
Negativo	0 / 12	-	0%
IC, Riproducibilità			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Validi
intero pannello	36 / 36	1,59	100%

Nel test di Riproducibilità, il saggio ha rilevato i target ORF8 e RdRp come atteso e il CV% non ha superato il valore di 4%.

Proficiency Study

Il prodotto SARS-CoV-2 ELITE MGB Kit in associazione con il sistema ELITE InGenius è stato testato analizzando il pannello "QCMD 2020 Coronavirus Outbreak Preparedness (CVOP) EQA Pilot Study" (QCMD, UK).

Il pannello riproduce campioni di tamponi respiratori raccolti in mezzo di trasporto e include campioni negativi per SARS-CoV-2, campioni con organismi interferenti e campioni positivi per SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF

RTS170ING
RTS170ING-96

I campioni sono stati processati con il sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". I valori di Ct dei target RdRp e ORF8 sono stati analizzati. Il Controllo Interno non è stato rilevato a causa del basso contenuto di RNA e DNA umano nei campioni.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

Campioni	Contenuto	Titolo (Log c. / mL)	Ct ORF8	Ct RdRp	Risultato
CPO20S-01	SARS-CoV-2	4,30	30,65	30,63	Positivo
CPO20S-02	Coronavirus NL63	4,64	Undet,	Undet,	Negativo
CPO20S-03	SARS-CoV-2	3,30	33,78	34,25	Positivo
CPO20S-04	Coronavirus OC43	4,03	Undet,	Undet,	Negativo
CPO20S-05	Negativo	-	Undet,	Undet,	Negativo
CPO20S-06	SARS-CoV-2	4,30	31,09	31,05	Positivo
CPO20S-07	SARS-CoV-2	5,30	27,15	27,36	Positivo
CPO20S-08	SARS-CoV-2	2,30	Undet,	35,58	Positivo

Nel test EQA, il saggio ha rilevato correttamente tutti i campioni del pannello ed ha ottenuto il massimo punteggio QCMD.

Specificità Diagnostica: conferma dei campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici negativi, è stata valutata analizzando campioni di RNA estratto con il sistema ELITE InGenius da campioni clinici di tamponi respiratori raccolti in UTM e in eSWAB (COPAN Italia S.p.A.) e certificati negativi per SARS-CoV-2 mediante un saggio CE IVD.

I campioni di RNA sono stati testati con il saggio in associazione con il sistema ELITE InGenius. I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Tamponi respiratori negativi per SARS-CoV-2 raccolti in UTM	49	0	49	0
Tamponi respiratori negativi per SARS-CoV-2 raccolti in eSWAB	45	2	43	0

In questo test, tutti i campioni raccolti in UTM sono stati confermati validi e negativi. 43 su 45 campioni raccolti in eSWAB sono stati confermati validi e negativi e 2 campioni sono risultati discrepanti positivi.

In questo test, la specificità diagnostica del saggio è uguale al 100 % in associazione con UTM e 95,6% in associazione con eSWAB.

La specificità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici negativi, è stata valutata analizzando campioni di RNA estratto con il sistema ELITE InGenius da campioni clinici di saliva e certificati negativi per SARS-CoV-2 mediante un saggio CE IVD su tampone respiratorio.

I campioni di RNA sono stati testati con il saggio in associazione con il sistema ELITE InGenius. I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Saliva negativa per SARS-CoV-2	127	0	127	0

In questo test, tutti i campioni sono stati confermati validi e negativi.
In questo test, la specificità diagnostica del saggio è uguale al 100 %.

Sensibilità diagnostica: conferma dei campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando campioni di RNA estratto con il sistema ELITE InGenius da campioni clinici di tamponi respiratori raccolti in UTM e in eSWAB (COPAN Italia S.p.A.) e certificati positivi per SARS-CoV-2 mediante un saggio CE IVD.

I campioni di RNA sono stati testati con il saggio in associazione con il sistema ELITE InGenius.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF

RTS170ING
RTS170ING-96

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Tamponi respiratori positivi per SARS-CoV-2 raccolti in UTM	54	54	0	0
Tamponi respiratori positivi per SARS-CoV-2 raccolti in eSWAB	46	45	1	0

In questo test, tutti i campioni raccolti in UTM sono stati confermati positivi. 45 su 46 campioni raccolti in eSWAB sono stati confermati positivi, mentre 1 campione è risultato valido e negativo.

In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio è uguale al 100 % in associazione con UTM e 97,8% in associazione con eSWAB.

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando campioni di RNA estratto con il sistema ELITE InGenius da campioni clinici di saliva e certificati positivi per SARS-CoV-2 mediante un saggio CE IVD su tampone respiratorio.

I campioni di RNA sono stati testati con il saggio in associazione con il sistema ELITE InGenius.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Saliva positiva per SARS-CoV-2	64	59	5	0

In questo test, 59 su 64 campioni di saliva sono stati confermati positivi e 5 campioni sono risultati discrepanti negativi.

In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio è uguale al 92.2 %.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto di "SARS-CoV-2 ELITE MGB Kit", FTP 170ING.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF

RTS170ING
RTS170ING-96

ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument
CFX96™ Real-Time PCR Detection System-IVD

CAMPIONI E CONTROLLI

Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con **RNA estratto** dai seguenti campioni clinici:

Tamponi respiratori

I campioni di tampone respiratorio destinati all'estrazione dell'RNA, devono essere raccolti in Universal Transport Medium (es. UTM®, COPAN Italia S.p.A.). secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati e conservati a temperatura ambiente (+18/+25°C) per un massimo di un giorno, o conservati a +2 / +8 °C per un massimo di cinque giorni, in alternativa devono essere conservati a -20 °C per un massimo di 1 mese, oppure a -70 °C per tempi più lunghi. I 200 µL di campione devono essere trasferiti nel "Extraction tube" forniti dal prodotto «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Si raccomanda di suddividere i campioni in aliquote prima del congelamento, al fine di evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione al fine di evitare una possibile degradazione dell'acido nucleico.

Nota Bene: Il trasferimento del campione dal tubo primario al "Extraction tube" potrebbe **causare contaminazioni**. Usare le pipette adeguate e seguire le indicazioni riportate nella sezione "Avvertenze e Precauzioni" di questo manuale.

Nota Bene: quando si esegue l'estrazione dell'RNA da campioni di tampone respiratorio con ELITE InGenius e con ELITE InGenius Software versione 1.3 (o versioni successive equivalenti) utilizzare gli Assay Protocol **SARS-CoV-2 ELITE_QL_RsS_200_100** or **SARS-CoV-2 ELITE_QLIC_RsS_200_100** (modalità solo estrazione). Questi protocolli processano 200 µL di campione e eluiscono gli acidi nucleici in 100 µL.

Saliva

I campioni di saliva destinati all'estrazione dell'RNA, devono essere raccolti in tubi sterili secondo le indicazioni del laboratorio, trasportati e conservati a temperatura ambiente (+18/+25°C) per un massimo di due giorni, o conservati a +2 / +8 °C per un massimo di tre giorni, in alternativa devono essere conservati a -20 °C per un massimo di 1 mese, oppure a -70 °C per tempi più lunghi. I 200 µL di campione devono essere trasferiti negli "Extraction tube" forniti dal prodotto «ELITE InGenius SP 200 Consumable Set».

Si raccomanda di suddividere i campioni in aliquote prima del congelamento, al fine di evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento. Quando si utilizzano campioni congelati, scongelare i campioni immediatamente prima dell'estrazione al fine di evitare una possibile degradazione dell'acido nucleico.

Nota Bene: quando si esegue l'estrazione dell'RNA da campioni di tampone respiratorio con ELITE InGenius e con ELITE InGenius Software versione 1.3.0.16 (o versioni successive equivalenti) utilizzare l'Assay Protocol **SARS-CoV-2 ELITE_QL_SA_200_100** o **SARS-CoV-2 ELITE_QLIC_SA_200_100** (modalità solo estrazione). Questo protocollo processa 200 µL di campione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

Sostanze interferenti

Quantità di DNA e/o RNA genomico umano maggiori di 1 µg per reazione possono inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione real time.

I dati disponibili relativi all'inibizione causata da farmaci e altre sostanze sono riportati nel paragrafo "Sostanze interferenti" del capitolo "Caratteristiche delle prestazioni" dell'ELITE InGenius.

Controlli di amplificazione

È assolutamente necessario convalidare ciascuna sessione di amplificazione allestendo una reazione per il controllo negativo e una reazione per il controllo positivo.

Per il controllo negativo utilizzare acqua per biologia molecolare (non fornita nel prodotto) da aggiungere alla reazione al posto dell'RNA estratto dal campione.

Per il controllo positivo utilizzare il prodotto «**SARS-CoV-2 - ELITE Positive Control**».

Controlli di qualità

Si raccomanda la validazione pianificata della procedura di estrazione e amplificazione. È possibile utilizzare campioni già testati o materiale di riferimento certificato. I controlli esterni devono essere utilizzati in conformità con le organizzazioni di accreditamento locali, statali e federali.

PROCEDURA

Impostazione della sessione di amplificazione real time

(Da eseguire nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione)

Se si utilizza uno strumento **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument**:

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer di controllo, avviare il software dedicato e aprire una sessione "absolute quantification" e impostare "Run mode: Fast 7500";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per RdRp con il "reporter" = "ROX" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "RdRp";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per ORF8 con il "reporter" = "FAM" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "ORF8";
- impostare (Detector Manager) il "detector" per la sonda per Rnase P con il "reporter" = "VIC" e il "quencher" = "none" (non fluorescente) e chiamarlo "IC";
- per ciascun pozzetto in uso della micropietra, impostare (Well Inspector) i "detector" (tipo di fluorescenza da misurare), il "passive reference" = "none" e il tipo di reazione (campione, controllo negativo di amplificazione, controllo positivo di amplificazione o standard con la relativa quantità nota). Compilare il **Piano di lavoro** allegato al fondo di questo manuale di istruzioni per l'uso trascrivendo queste informazioni. Il Piano di lavoro dovrà essere seguito con attenzione durante il trasferimento nei pozzetti della miscela di reazione e dei campioni.

Riferendosi alla documentazione dello strumento, impostare sul software dedicato (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Thermal Profile) i parametri del **ciclo termico**:

- aggiungere nella fase di amplificazione il passaggio (Add Step) di **estensione a 72 °C**;

Nota bene: l'acquisizione della fluorescenza (Instrument > Thermal Cycler Protocol > Settings > Data Collection) deve rimanere impostata nel passaggio di **ibridazione a 60 °C**.

- modificare i tempi come indicato nella tabella "**Ciclo termico**";
- impostare un numero di cicli pari a **45**;
- impostare un volume per l'emulazione software del trasferimento termico alla reazione pari a **30 µL**;

Ciclo termico		
Fase	Temperature	Tempi
Retrotrascrizione	45 °C	20 min.
Denaturazione iniziale	95 °C	2 min.
Amplificazione e rilevazione (45 cicli)	95 °C	10 sec.
	60 °C (acquisizione della fluorescenza)	30 sec.
	72 °C	20 sec.

Se si utilizza uno strumento **CFX96™ Real-Time PCR Detection System-IVD**:

Prima di iniziare la sessione, riferendosi alla documentazione dello strumento, è necessario:

- accendere il thermal cycler per real time, accendere il computer di controllo, avviare il software dedicato;
- selezionare il tipo di corsa "User Defined" ed impostare i parametri del **ciclo termico** (Protocol > Create New):
- aggiungere l'acquisizione della fluorescenza ("Add Plate Read to Step") dopo la fase di **annealing a 60 °C**,
- aggiungere lo step ("Insert Step") di **estensione a 72 °C**,
- modificare le temperature e i tempi come indicato nella tabella "**Ciclo Termico**",
- impostare il numero di ripetizioni a **44**,
- impostare un volume per l'emulazione software del trasferimento termico alla reazione ("Sample volume") pari a **30 µL**.

Ciclo termico		
Fase	Temperature	Tempi
Retrotrascrizione	45 °C	20 min.
Denaturazione iniziale	95 °C	2 min.
Amplificazione e rilevazione (primo ciclo) Ripetere per 44 volte	95 °C	10 sec.
	60 °C	20 sec.
	60 °C (acquisizione della fluorescenza)	(10 sec.)
	72 °C	20 sec.

Dopo l'impostazione del ciclo termico, selezionare i parametri della corsa (Plate > Create New) e per ogni pozzetto in uso nella micropietra:

- selezionare i Fluorofori (Select Fluorophores) necessari: "FAM", "VIC" e "ROX",
- assegnare ai pozzetti utilizzati il "Sample Type" (Unknown sample, amplification Positive Control, amplification Negative Control),
- caricare per i pozzetti utilizzati il Fluoroforo assegnando i seguenti "Target Name":
 - "ORF8" per il Fluoroforo "FAM",
 - "IC" per il Fluoroforo "VIC",
 - "RdRp" per il Fluoroforo "ROX",
- caricare per i pozzetti utilizzati il "Sample Name",
- Aggiungere queste informazioni al **Piano di Lavoro** allegato alla fine di questo manuale o stampare la configurazione della micropietra. Il **Piano di Lavoro** deve essere seguito attentamente durante il trasferimento della miscela di reazione e dei campioni nei pozzetti.

Allestimento dell'amplificazione real time

(Da eseguire nell'area di estrazione / allestimento della reazione di amplificazione)

Prima di iniziare la sessione è necessario:

1. prelevare le provette con i campioni da analizzare. Se necessario, scongelare il contenuto a temperatura ambiente (+18 / 25 °C). Mescolare il reagente con vortex per 10 secondi, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
2. prelevare e scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (+18 / 25 °C) le provette di **CoV-2 PCR Mix** (tappo NEUTRO) necessarie per la sessione (il contenuto iniziale di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **48 reazioni**). Mescolare il reagente con vortex per 10 secondi per tre volte, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio;
3. prelevare al momento dell'uso le provette di **RT EnzymeMix** (tappo con inserto NERO) necessarie per la sessione (il contenuto iniziale di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **48 reazioni**). Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio.

Nota bene: L' **RT EnzymeMix** non deve rimanere esposto a temperature superiori a -20 °C per più di 10 minuti.

4. prelevare e scongelare per 30 minuti a temperatura ambiente (+18 / 25°C) la provetta di **CoV-2 Positive Control**. Mescolare il reagente con vortex per 10 secondi, centrifugare le provette per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo;
5. prelevare l'**Amplification microplate** che sarà utilizzata nella sessione facendo attenzione a maneggiarla con guanti senza polvere e a non danneggiare i pozzetti.
6. prelevare l'**Amplification Sealing Sheet** che sarà utilizzato nella sessione facendo attenzione a maneggiarlo con guanti senza polvere e a non danneggiarlo.
7. preparare un tubo da 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt Ref. 72.694.005, non fornito nel kit) per la **miscela completa di reazione** e marcarla in modo riconoscibile con un pennarello indelebile;
8. calcolare i volumi dei due componenti forniti nel kit necessari per preparare la **miscela completa di reazione** in base al numero di campioni da analizzare come descritto nella tabella seguente;

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF

RTS170ING
RTS170ING-96

Nota bene: Per il calcolo dei volumi dei due componenti da utilizzare per preparare la **miscela completa di reazione**, è necessario definire il numero di campioni (N) da testare nella sessione di lavoro sommando i campioni clinici da analizzare, il controllo positivo di amplificazione, il controllo negativo di amplificazione e seguire quanto riportato nella tabella seguente.

Sample Number (N)	CoV-2 PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0.3 µL
6 ≤ N ≤ 12	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0.3 µL
13 ≤ N ≤ 24	(N + 3) x 20 µL	(N + 3) x 0.3 µL
25 ≤ N ≤ 48	(N + 4) x 20 µL	(N + 4) x 0.3 µL

- preparare la **miscela completa di reazione** trasferendo nel tubo dedicato i volumi calcolati dei due componenti.
- mescolare con **vortex a bassa velocità** per tre volte per circa 10 secondi, centrifugare la provetta per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenere in ghiaccio.

Nota bene: La miscela completa di reazione deve essere utilizzata entro 30 minuti. La miscela completa di reazione **non** può essere conservata.

Allestire le reazioni come descritto di seguito:

- Trasferire, depositandoli accuratamente sul fondo senza creare bolle, **20 µL di miscela completa di reazione** nei pozzetti dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**.
- Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **10 µL di RNA estratto** del primo campione nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare energicamente il campione pipettando per tre volte l'**RNA estratto** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle sia sul fondo del pozzetto sia in superficie. Procedere allo stesso modo con tutti gli altri **RNA estratti**.
- Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **10 µL di Acqua per biologia molecolare** (non fornita nel prodotto) nel pozzetto dell'**Amplification microplate** del controllo negativo di amplificazione come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare energicamente il controllo negativo pipettando per tre volte l'**Acqua per biologia molecolare** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle sia sul fondo del pozzetto sia in superficie.
- Trasferire, depositandoli accuratamente nella miscela di reazione, **10 µL di CoV-2 Positive Control** nel corrispondente pozzetto dell'**Amplification microplate** come stabilito precedentemente sul **Piano di lavoro**. Mescolare bene il controllo positivo pipettando per tre volte il **CoV-2 Positive Control** nella miscela di reazione. Fare attenzione a non creare bolle sia sul fondo del pozzetto sia in superficie.
- Sigillare accuratamente l'**Amplification microplate** con l'**Amplification Sealing Sheet**.
- Trasferire l'**Amplification microplate** nel thermal cycler per real time nell'area di amplificazione / rilevazione dei prodotti di amplificazione ed avviare il ciclo termico di amplificazione salvando l'impostazione della sessione con un identificativo univoco e riconoscibile (per esempio, "anno-mese-giorno-SARS-CoV-2-EGSpA").

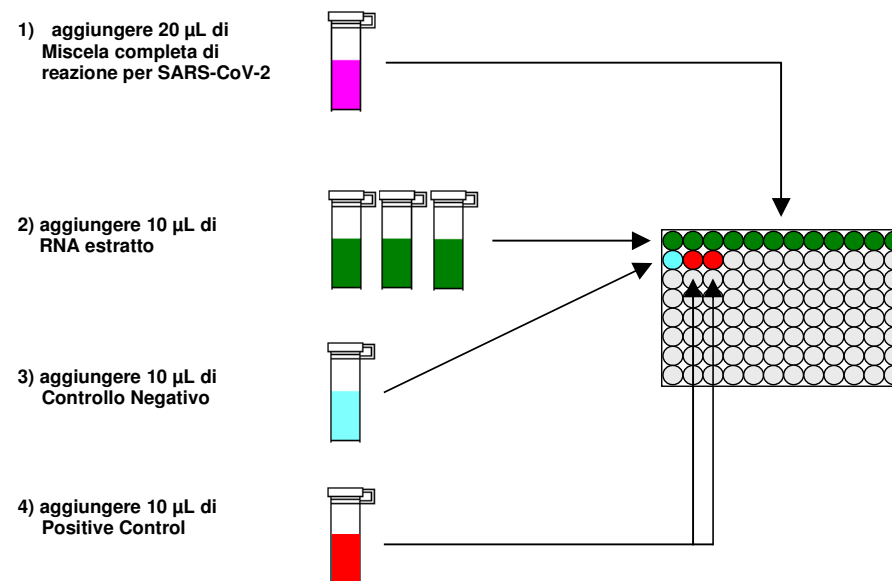
Nota bene: Al termine del ciclo termico l'**Amplification microplate** con i prodotti di reazione deve essere rimossa dallo strumento ed eliminata in modo da non generare contaminazioni ambientali. **Non sollevare mai l'Amplification Sealing Sheet dall'Amplification microplate** in modo da evitare la fuoriuscita dei prodotti di reazione.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF

RTS170ING
RTS170ING-96

Nella figura di seguito è illustrata in sintesi la procedura di allestimento delle reazioni di amplificazione per l'analisi quantitativa di 12 campioni.



Analisi dei risultati

I valori registrati della fluorescenza emessa dalla sonda specifica per RdRp (detector ROX "RdRp"), per ORF8 (detector FAM "ORF8") e dalla sonda specifica per il Controllo Interno (detector VIC "IC") nelle reazioni di amplificazione devono essere analizzati dal software dello strumento.

Prima di eseguire l'analisi, impostare i valori soglia (Threshold) e di fluorescenza di fondo (Baseline), come descritto di seguito. I valori della fluorescenza emessi dalle sonde specifiche durante la reazione di amplificazione e il valore **soglia** della fluorescenza consentono di determinare il **Threshold cycle (Ct)**, il ciclo in cui la fluorescenza ha raggiunto il valore **soglia**.

Quando si usa lo strumento **7500 Fast Dx Real-Time PCR**:

Target	Impostazione del valore "threshold"	Impostazione del valore "baseline"
RdRp	20.000	Auto Baseline
ORF8	40.000	Auto Baseline
IC	50.000	Auto Baseline

Nota bene: Nel caso di un grafico con un Livello di Fluorescenza di fondo irregolare, il calcolo della Baseline deve essere impostato su "Manual Baseline" e il suo intervallo deve essere adattato dal ciclo 3 al ciclo in cui la fluorescenza del campione positivo comincia a crescere come rilevato dal software dello strumento (Results > Component).

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e l'amplificazione Real Time del cDNA
--

REF RTS170ING
RTS170ING-96

Quando si usa CFX96™ Real-Time PCR Detection System–IVD:

Target	Impostazione del valore “threshold”	Impostazione del valore “baseline”
RdRp	100	Da 10 a 15
ORF8	250	Da 10 a 15
IC	1,000	Da 10 a 15

I valori di fluorescenza emessi dalle sonde specifiche nella reazione di amplificazione e il valore Soglia di fluorescenza sono utilizzati per determinare il Ciclo Soglia (Ct, Threshold cycle), cioè il ciclo in cui è stato raggiunto il valore Soglia di fluorescenza.

Interpretazione dei risultati

L'interpretazione dei risultati può essere effettuata dall'operatore seguendo le regole riportate qui di seguito oppure utilizzando il software “Results Manager™” in associazione al dump file “SARS-CoV-2 ELITE_Closed”.

Controllo Positivo

Nella reazione di amplificazione con il **Positive Control**, il valore del **Ct** per RdRp e ORF8 (Results > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Positive Control	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione	Results Manager
RdRp Ct ≤ 29	POSITIVO	CORRETTA	Valido
ORF8 Ct ≤ 29	POSITIVO	CORRETTA	Valido

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Positive Control** è **Ct > 29** o **Ct Non determinato (Undetermined)** per uno dei due target o per entrambi, non è stata rilevata in modo corretto la presenza di DNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione o di rilevazione (dispensazione errata della miscela di reazione o del controllo positivo, degradazione della miscela di reazione o del controllo positivo, impostazione errata della posizione del controllo positivo, impostazione errata del ciclo termico, vedi “Problemi e Soluzioni”) che possono causare risultati non corretti. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

Controllo Negativo

Nella reazione di amplificazione del **Controllo negativo**, il valore di **Ct** per RdRp ed ORF8 (Results > Report) è utilizzato per convalidare l'amplificazione e la rilevazione come descritto nella tabella seguente:

Reazione Controllo negativo	Risultato del saggio	Amplificazione / Rilevazione	Results Manager
RdRp Ct = Undetermined	NEGATIVO	CORRETTA	Valido
ORF8 Ct = Undetermined	NEGATIVO	CORRETTA	Valido

Se il risultato della reazione di amplificazione del **Controllo negativo** è diverso da **Ct Non determinato (Undetermined)** per uno dei due target, è stata rilevata la presenza di RNA bersaglio. Si sono verificati problemi nella fase di amplificazione (contaminazione, vedi “Problemi e Soluzioni”) che possono causare risultati non corretti e falsi positivi. La sessione non è valida e deve essere ripetuta dalla fase di amplificazione.

Nota: se il risultato della reazione di amplificazione per il **Controllo Negativo** è diverso da **Ct Non determinato (Undetermined)** o **Ct > 39** per il Controllo Interno, è stato rilevato il DNA genomico umano. Ciò significa che si sono verificati problemi durante la fase di amplificazione (contaminazione, vedere la sezione “Problemi e Soluzioni”), che possono portare a risultati errati. La sessione deve essere ripetuta a partire dalla fase di amplificazione.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e l'amplificazione Real Time del cDNA
--

REF RTS170ING
RTS170ING-96

Campioni

Nelle reazioni di amplificazione di ciascun **campione**, il valore di **Ct** per RdRp ed ORF8 è utilizzato per rilevare la presenza di RNA bersaglio, mentre il valore di **Ct** per il Controllo Interno è utilizzato per convalidare l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione.

Nota bene: Verificare con il software dello strumento (Results > Amplification plot > delta Rn vs Cycle) che il **Ct** sia determinato da un rapido e regolare incremento dei valori di fluorescenza e non da fenomeni di picco o incremento graduale del segnale di fondo (fondo irregolare o elevato).

Questo prodotto è in grado di rilevare una quantità minima di 100 genomi Equivalenti (gEq) di RNA di SARS-CoV-2 per mL, (Limite di Rilevazione del prodotto, vedi “Caratteristiche delle prestazioni”).

I risultati come **Ct** delle reazioni di amplificazione di ciascun **campione di tampone respiratorio** (Results > Report) sono utilizzati come descritto nella tabella seguente:

Reazione del campione			Risultato del saggio	RNA di SARS-CoV-2	Results Manager
RdRp	ORF8	IC			
Ct Determinato	Ct Determinato	Ct Determinato o Ct Non determinato	valido, positivo	RILEVATO	COV2 +
Ct Determinato	Ct Non determinato	Ct Determinato o Ct Non determinato	valido, positivo	RILEVATO	COV2 +
Ct Non determinato	Ct Determinato	Ct Determinato o Ct Non determinato	valido, positivo	RILEVATO	COV2 +
Ct Non determinato	Ct Non determinato	Ct ≤ 35	valido, negativo	NON RILEVATO	COV2 -
Ct Non determinato	Ct Non determinato	Ct > 35 o Ct Non determinato	non valido	-	COV2 Δ

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per entrambi i target e **Ct > 35** o **Ct Non determinato** per il Controllo Interno, non è stato possibile rilevare in modo efficiente il Controllo Interno. In questo caso si sono verificati problemi nella fase di trascrizione inversa e amplificazione o nella fase di estrazione (degradazione dell'RNA, perdita dell'RNA durante l'estrazione, presenza di inibitori nell'estratto o numero non sufficiente di cellule a causa di un prelievo non corretto) che possono causare risultati errati e falsi negativi.

Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato, tal quale o diluito, tramite una corsa di amplificazione. In caso di secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato partendo dall'estrazione di una nuova aliquota.

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per entrambi i target e **Ct ≤ 35** per il Controllo Interno, l'RNA di SARS-CoV-2 non è stato rivelato nell'RNA estratto dal campione ma non si può escludere che l'RNA di SARS-CoV-2 sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

Nota bene: Quando nella reazione di amplificazione relativa ad un campione è stata rilevata la presenza di RNA di SARS-CoV-2, l'amplificazione del Controllo Interno può dare come risultato un **Ct > 35** o **Ct Non determinato**. Infatti la reazione di amplificazione a bassa efficienza del Controllo Interno può essere annullata dalla competizione con la reazione di amplificazione ad alta efficienza di SARS-CoV-2. In questo caso il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

Nota bene: Nel caso di campioni con titolo molto basso di SARS-CoV-2, vicino o sotto il limite di rilevazione, è possibile che uno dei due target del patogeno, il gene RdRp o il gene ORF8, possa risultare casualmente negativo a causa del basso numero di copie. In questo caso, ci si aspetta che il valore Ct rilevato sia superiore a 35. Poiché i due geni target, RdRp e ORF8, sono entrambi specifici per SARS-CoV-2, un risultato positivo per uno solo dei due target è sufficiente per attribuire la positività per SARS-CoV-2 al campione in test.

Nota bene: I campioni in cui il Ct di “ORF8” è **Non determinato** ed il Ct di “RdRp” è **determinato** con un valore Ct inferiore o uguale a 35, sono positivi per SARS-CoV-2. In questo caso, la reazione specifica per la regione ORF8 ha dato un risultato negativo a causa della delezione del gene ORF8, come nel ceppo SARS-CoV-2 Δ382 (Y. C. F. Su et al., 2020, B. E. Young et al., 2020), ma poiché il test rileva due bersagli patogeni, la reazione specifica per la regione RdRp ha dato un risultato positivo e il virus è stato rilevato.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF

RTS170ING
RTS170ING-96

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli esiti di altri esami di laboratorio relativi al paziente.

Quando si usa lo strumento **7500 Fast Dx Real-Time PCR** in associazione con campioni di saliva, i risultati come Ct delle reazioni di amplificazione di ciascun campione di saliva (Risultati > Report) vengono utilizzati come descritto nella tabella seguente:

Reazione del campione			Risultato del saggio	RNA di SARS-CoV-2	Results Manager
RdRp	ORF8	IC			
Ct Determinato	Ct Determinato	Ct Determinato o Ct Non determinato	valido, positivo	RILEVATO	COV2 +
Ct Determinato	Ct Non determinato	Ct Determinato o Ct Non determinato	valido, positivo	RILEVATO	COV2 +
Ct Non determinato	Ct Determinato	Ct Determinato o Ct Non determinato	valido, positivo	RILEVATO	COV2 +
Ct Non determinato	Ct Non determinato	Ct ≤ 27	valido, negativo	NON RILEVATO	COV2 -
Ct Non determinato	Ct Non determinato	Ct > 27 o Ct Non determinato	non valido	-	COV2 Δ

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per entrambi i target e **Ct > 27** o **Ct Non determinato** per il Controllo Interno, non è stato possibile rilevare in modo efficiente il Controllo Interno. In questo caso si sono verificati problemi nella fase di trascrizione inversa e amplificazione o nella fase di estrazione (degradazione dell'RNA, perdita dell'RNA durante l'estrazione, presenza di inibitori nell'estratto o numero non sufficiente di cellule a causa di un prelievo non corretto) che possono causare risultati errati e falsi negativi.

Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato, tal quale o diluito, tramite una corsa di amplificazione. In caso di secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato partendo dall'estrazione di una nuova aliquota.

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per entrambi i target e **Ct ≤ 27** per il Controllo Interno, l'RNA di SARS-CoV-2 non è stato rivelato nell'RNA estratto dal campione ma non si può escludere che l'RNA di SARS-CoV-2 sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

Nota bene: Quando nella reazione di amplificazione relativa ad un campione è stata rilevata la presenza di RNA di SARS-CoV-2, l'amplificazione del Controllo Interno può dare come risultato un Ct > 27 o Ct Non determinato. Infatti la reazione di amplificazione a bassa efficienza del Controllo Interno può essere annullata dalla competizione con la reazione di amplificazione ad alta efficienza di SARS-CoV-2. In questo caso il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

Nota bene: Nel caso di campioni con titolo molto basso di SARS-CoV-2, vicino o sotto il limite di rilevazione, è possibile che uno dei due target del patogeno, il gene RdRp o il gene ORF8, possa risultare casualmente negativo a causa del basso numero di copie. In questo caso, ci si aspetta che il valore Ct rilevato sia superiore a 35. Poiché i due geni target, RdRp e ORF8, sono entrambi specifici per SARS-CoV-2, un risultato positivo per uno solo dei due target è sufficiente per attribuire la positività per SARS-CoV-2 al campione in test.

Nota bene: I campioni in cui il Ct di "ORF8" è **Non determinato** ed il Ct di "RdRp" è **determinato** con un valore Ct inferiore o uguale a 35, sono positivi per SARS-CoV-2. In questo caso, la reazione specifica per la regione ORF8 ha dato un risultato negativo a causa della delezione del gene ORF8, come nel ceppo SARS-CoV-2 Δ382 (Y. C. F. Su et al., 2020, B. E. Young et al., 2020), ma poiché il test rileva due bersagli patogeni, la reazione specifica per la regione RdRp ha dato un risultato positivo e il virus è stato rilevato.

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli esiti di altri esami di laboratorio relativi al paziente.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit
reagenti per la trascrizione inversa dell'RNA e
l'amplificazione Real Time del cDNA

REF

RTS170ING
RTS170ING-96

Quando si usa lo strumento **CFX96™ Dx System** in associazione con campioni di saliva, i risultati come Ct delle reazioni di amplificazione di ciascun campione di saliva (Risultati > Report) vengono utilizzati come descritto nella tabella seguente:

Reazione del campione			Risultato del saggio	RNA di SARS-CoV-2	Results Manager
RdRp	ORF8	IC			
Ct Determinato	Ct Determinato	Ct Determinato o Ct Non determinato	valido, positivo	RILEVATO	COV2 +
Ct Determinato	Ct Non determinato	Ct Determinato o Ct Non determinato	valido, positivo	RILEVATO	COV2 +
Ct Non determinato	Ct Determinato	Ct Determinato o Ct Non determinato	valido, positivo	RILEVATO	COV2 +
Ct Non determinato	Ct Non determinato	Ct ≤ 30	valido, negativo	NON RILEVATO	COV2 -
Ct Non determinato	Ct Non determinato	Ct > 30 o Ct Non determinato	non valido	-	COV2 Δ

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per entrambi i target e **Ct > 30** o **Ct Non determinato** per il Controllo Interno, non è stato possibile rilevare in modo efficiente il Controllo Interno. In questo caso si sono verificati problemi nella fase di trascrizione inversa e amplificazione o nella fase di estrazione (degradazione dell'RNA, perdita dell'RNA durante l'estrazione, presenza di inibitori nell'estratto o numero non sufficiente di cellule a causa di un prelievo non corretto) che possono causare risultati errati e falsi negativi.

Quando il volume dell'eluato è sufficiente, il campione estratto può essere ritestato, tal quale o diluito, tramite una corsa di amplificazione. In caso di secondo risultato non valido, il campione deve essere ritestato partendo dall'estrazione di una nuova aliquota.

Se il risultato della reazione di amplificazione di un campione è **Ct Non determinato** per entrambi i target e **Ct ≤ 30** per il Controllo Interno, l'RNA di SARS-CoV-2 non è stato rivelato nell'RNA estratto dal campione ma non si può escludere che l'RNA di SARS-CoV-2 sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi Caratteristiche delle prestazioni). In questo caso il risultato sarebbe un falso negativo.

Nota bene: Quando nella reazione di amplificazione relativa ad un campione è stata rilevata la presenza di RNA di SARS-CoV-2, l'amplificazione del Controllo Interno può dare come risultato un Ct > 27 o Ct Non determinato. Infatti la reazione di amplificazione a bassa efficienza del Controllo Interno può essere annullata dalla competizione con la reazione di amplificazione ad alta efficienza di SARS-CoV-2. In questo caso il campione è comunque idoneo e il risultato positivo del saggio è valido.

Nota bene: Nel caso di campioni con titolo molto basso di SARS-CoV-2, vicino o sotto il limite di rilevazione, è possibile che uno dei due target del patogeno, il gene RdRp o il gene ORF8, possa risultare casualmente negativo a causa del basso numero di copie. In questo caso, ci si aspetta che il valore Ct rilevato sia superiore a 35. Poiché i due geni target, RdRp e ORF8, sono entrambi specifici per SARS-CoV-2, un risultato positivo per uno solo dei due target è sufficiente per attribuire la positività per SARS-CoV-2 al campione in test.

Nota bene: I campioni in cui il Ct di "ORF8" è **Non determinato** ed il Ct di "RdRp" è **determinato** con un valore Ct inferiore o uguale a 35, sono positivi per SARS-CoV-2. In questo caso, la reazione specifica per la regione ORF8 ha dato un risultato negativo a causa della delezione del gene ORF8, come nel ceppo SARS-CoV-2 Δ382 (Y. C. F. Su et al., 2020, B. E. Young et al., 2020), ma poiché il test rileva due bersagli patogeni, la reazione specifica per la regione RdRp ha dato un risultato positivo e il virus è stato rilevato.

I risultati ottenuti con questo saggio devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli esiti di altri esami di laboratorio relativi al paziente.

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Limite di Rilevazione (LoD)

Il Limite di Rilevazione (Limit of Detection, LoD) del prodotto SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit, è stato verificato in associazione a campioni di tamponi respiratori e ai sistemi ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument and CFX96™ Dx System.

Il valore di LoD è stato verificato testando un pannello di tamponi respiratori raccolti in UTM (COPAN Italia S.p.A.) positivizzati con materiale di riferimento SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) a 100 gEq / mL. Il campione è stato processato in 20 replicati con ELITE InGenius per l'estrazione e con ABI 7500 Fast Dx Real-time PCR Instrument e con CFX96™ Dx System per l'amplificazione. Il valore di LoD è confermato quando almeno 18 replicati su 20 danno un risultato positivo come da linee guida del CLSI EP17-A2.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Limite di Rilevazione (LoD) per tamponi respiratori e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument					
Campioni	Titolo	Target	N	Positivi	Negativi
Tamponi raccolti in UTM	100 gEq / mL	RdRp o ORF8	20	20	0

Limite di Rilevazione (LoD) per tamponi respiratori e CFX96™ Dx System					
Campioni	Titolo	Target	N	Positivi	Negativi
Tamponi raccolti in UTM	100 gEq / mL	RdRp o ORF8	20	19	1

Il valore di LoD per i target RdRp e ORF8 è stata confermata a 100 gEq / mL per i tamponi respiratori raccolti in UTM per entrambi gli strumenti.

Il Limite di Rilevazione (Limit of Detection, LoD) del prodotto SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit, è stato verificato in associazione a campioni di saliva e ai sistemi ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument and CFX96™ Dx System.

Il valore di LoD è stato verificato testando un campione di saliva positivizzato con materiale di riferimento SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) a 714 gEq / mL. Il campione è stato processato in 20 replicati con ELITE InGenius per l'estrazione e con ABI 7500 Fast Dx Real-time PCR Instrument e con CFX96™ Dx System per l'amplificazione. Il valore di LoD è confermato quando almeno 18 replicati su 20 danno un risultato positivo come da linee guida del CLSI EP17-A2.

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

Limite di Rilevazione (LoD) per saliva e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument					
Campioni	Titolo	Target	N	Positivi	Negativi
Saliva	714 gEq / mL	RdRp o ORF8	20	20	0

Il valore di LoD per i target RdRp e ORF8 è stato confermato a 714 gEq / mL per entrambi gli strumenti.

Ripetibilità intra sessione ed inter lotto

La ripetibilità dei risultati ottenuti con il prodotto SARS-CoV-2 ELITE MGB Kit in associazione con gli strumenti ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument e CFX96™ Dx System è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di tamponi respiratori. Il pannello includeva un campione negativo e tre campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) alle concentrazioni di circa 300 gEq / mL e circa 600 gEq / mL.

La ripetibilità è stata ottenuta mediante l'analisi dei campioni del pannello in sei replicati, in una sessione, con ciascun lotto di prodotto. I tre lotti di prodotto sono stati usati in una stessa sessione. I campioni sono stati processati con il sistema ELITE InGenius per l'estrazione e con ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument e CFX96™ Dx System per l'amplificazione. I valori di Ct dei target RdRp e ORF8 e del Controllo Interno sono stati usati per calcolare il CV% al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

Ripetibilità Inter-Lotto e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR instrument			
RdRp, Ripetibilità Inter-Lotto			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	18/18	1,44	100%
300 gEq / mL	17/18	2,38	94%
Negativo	0 / 18	-	0%
ORF8, Ripetibilità Inter-Lotto			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	18 / 18	1,79	100%
300 gEq / mL	18 / 18	2,65	100%
Negativo	0 / 18	-	0%
IC, Ripetibilità Inter-Lotto			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Validi
intero pannello	54 / 54	1,95	100%

Ripetibilità Inter-Lotto e CFX96™ Dx System			
RdRp, Ripetibilità Inter-Lotto			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	18/18	1,70	100%
300 gEq / mL	18/18	1,57	100%
Negativo	0 / 17	-	0%
ORF8, Ripetibilità Inter-Lotto			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	18 / 18	1,70	100%
300 gEq / mL	18 / 18	3,09	100%
Negativo	0 / 17	-	0%
IC, Ripetibilità Inter-Lotto			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Validi
intero pannello	53 / 53	2,45	100%

Nel test di Ripetibilità, il saggio ha rilevato i target ORF8 e RdRp come atteso ed il CV% non ha superato il valore del 3,5% per entrambi gli strumenti.

Ripetibilità Inter-sessione

La ripetibilità inter-sessione dei risultati ottenuti con il prodotto SARS-CoV-2 ELITE MGB Kit in associazione con gli strumenti ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument e CFX96™ Dx System è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di tamponi respiratori. Il pannello includeva un campione negativo e tre campioni positivizzati con materiale di riferimento certificato SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) alle concentrazioni di circa 300 gEq / mL e circa 600 gEq / mL.

La ripetibilità è stata ottenuta mediante l'analisi dei campioni del pannello in dodici replicati, in due sessione, con ciascun lotto di prodotto. Sono stati usati tre lotti di prodotto. I campioni sono stati processati con il sistema ELITE InGenius per l'estrazione e con ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument e CFX96™ Dx System per l'amplificazione. I valori di Ct dei target RdRp e ORF8 e del Controllo Interno sono stati usati per calcolare il CV% al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

Ripetibilità Inter-sessione e ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR instrument			
RdRp, Ripetibilità Inter-Lotto			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	12 / 12	1,29	100%
300 gEq / mL	12 / 12	3,23	100%
Negativo	0 / 12	-	0%
ORF8, Ripetibilità Inter- sessione			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	12 / 12	1,43	100%
300 gEq / mL	12 / 12	3,47	100%
Negativo	0 / 12	-	0%
IC, Ripetibilità Inter- sessione			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Validi
intero pannello	36 / 36	1,81	100%

Ripetibilità Inter- sessione e CFX96™ Dx System			
RdRp, Ripetibilità Inter- sessione			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	12 / 12	1,76	100%
300 gEq / mL	12 / 12	3,37	100%
Negativo	0 / 12	-	0%
ORF8, Ripetibilità Inter- sessione			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	12 / 12	3,66	100%
300 gEq / mL	11 / 12	2,42	92%
Negativo	0 / 12	-	0%
IC, Ripetibilità Inter- sessione			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Validi
intero pannello	36 / 36	2,89	100%

Nel test di Ripetibilità, il saggio ha rilevato i target ORF8 e RdRp come atteso ed il CV% non ha superato il valore del 4% per entrambi gli strumenti.

Riproducibilità

La riproducibilità dei risultati ottenuti con il prodotto SARS-COV-2 ELITE MGB Kit in associazione con il ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di tamponi respiratori. Il pannello includeva un campione negativo e 2 campioni positivamente con materiale di riferimento certificato SARS-CoV-2 (ZeptoMetrix) alle concentrazioni di circa 300 gEq / mL e circa 600 gEq / mL.

La riproducibilità è stata ottenuta mediante l'analisi dei campioni del pannello in trentasei replicati, in una sessione al giorno, con ogni lotto di prodotto. Sono state effettuate due sessioni di amplificazione, in due giorni diversi, su due strumenti diversi, e mediante due diversi operatori. Sono stati testati tre lotti diversi di prodotto. I campioni sono stati processati con il sistema ELITE InGenius per l'estrazione e con lo strumento ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument per l'amplificazione. I valori di Ct dei target RdRp e ORF8 e del Controllo Interno sono stati usati per calcolare il CV% al fine di valutare la Riproducibilità come imprecisione.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

RdRp, Riproducibilità			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	36 / 36	2,33	100%
300 gEq / mL	35 / 36	2,40	97%
Negativo	0 / 36	-	0%
ORF8, Riproducibilità			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Positivi
600 gEq / mL	36 / 36	3,90	100%
300 gEq / mL	36 / 36	2,67	100%
Negativo	0 / 36	-	0%
IC, Riproducibilità			
Campioni	Pos. / Rep.	%CV	% Validi
intero pannello	108/108	5,65	100%

Nel test di Riproducibilità, il saggio ha rilevato i target ORF8 e RdRp come atteso e il CV% non ha superato il valore di 6%.

Riproducibilità con pannello per Proficiency Study

Il prodotto SARS-CoV-2 ELITE MGB Kit in associazione con ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument and CFX96™ Dx System è stato testato analizzando il pannello "QCMD 2020 Coronavirus Outbreak Preparedness (CVOP) EQA Pilot Study" (QCMD, UK).

Il pannello riproduce campioni di tamponi respiratori raccolti in mezzo di trasporto e include campioni negativi per SARS-CoV-2, campioni con organismi interferenti e campioni positivi per SARS-CoV-2.

I campioni sono stati processati in duplicato con il sistema ELITE InGenius per l'estrazione e con i sistemi ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument e CFX96™ Dx System per l'amplificazione. I valori di Ct dei target RdRp e ORF8 sono stati analizzati. Il Controllo Interno non è stato rilevato a causa del basso contenuto di RNA e DNA umano nei campioni.

A summary of results is shown in the tables below.

Proficiency Study in associazione a ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument					
Sample ID	Content	dPCR Log Copies/ml	ORF8 Ct	RdRp Ct	Outcome
CPO20S-01	SARS-CoV-2	4,30	30,39	29,94	Positive
CPO20S-02	Coronavirus NL63	4,64	Undet.	Undet.	Negative
CPO20S-03	SARS-CoV-2	3,30	33,99	33,14	Positive
CPO20S-04	Coronavirus OC43	4,03	Undet.	Undet.	Negative
CPO20S-05	Negative	-	Undet.	Undet.	Negative
CPO20S-06	SARS-CoV-2	4,30	30,47	29,89	Positive
CPO20S-07	SARS-CoV-2	5,30	27,00	26,36	Positive
CPO20S-08	SARS-CoV-2	2,30	36,99	35,65	Positive

Proficiency Study in associazione a CFX96™ Dx System					
Sample ID	Content	dPCR Log Copies/ml	ORF8 Ct	RdRp Ct	Outcome
CPO20S-01	SARS-CoV-2	4,30	30,46	30,00	Positive
CPO20S-02	Coronavirus NL63	4,64	Undet.	Undet.	Negative
CPO20S-03	SARS-CoV-2	3,30	33,76	32,85	Positive
CPO20S-04	Coronavirus OC43	4,03	Undet.	Undet.	Negative
CPO20S-05	Negative	-	Undet.	Undet.	Negative
CPO20S-06	SARS-CoV-2	4,30	30,30	29,86	Positive
CPO20S-07	SARS-CoV-2	5,30	26,98	26,42	Positive
CPO20S-08	SARS-CoV-2	2,30	36,92	36,35	Positive

Nel test EQA, il saggio ha rilevato correttamente tutti i campioni del pannello ed ha ottenuto il massimo punteggio QCMD, in associazione a entrambi gli strumenti.

Specificità diagnostica: conferma di campioni negativi

La specificità diagnostica del saggio in associazione a tamponi respiratori, come conferma dei campioni clinici negativi, è stata valutata analizzando campioni di RNA estratto con il sistema ELITE InGenius da campioni clinici di tamponi respiratori raccolti in UTM e in eSWAB (COPAN Italia S.p.A.) e certificati negativi per SARS-CoV-2 mediante un saggio CE IVD.

La specificità diagnostica del saggio in associazione a saliva, come conferma dei campioni clinici negativi, è stata valutata analizzando campioni di RNA estratto con il sistema ELITE InGenius da campioni clinici di saliva e certificati negativi per SARS-CoV-2 mediante un saggio CE IVD su tampone respiratorio.

I campioni di RNA sono stati testati con il saggio in associazione con ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument e CFX96™ Dx System..

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Specificità Diagnostica in associazione a ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument				
Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Tamponi respiratori negativi per SARS-CoV-2 raccolti in UTM	40	1	39	0
Saliva negativa per SARS-CoV-2	45	0	45	0

In questo test, 39 su 40 campioni raccolti in UTM sono stati confermati validi e negativi e 1 campione è risultato discrepante positivo.

Tutti i campioni di saliva sono stati confermati validi e negativi.

In questo test, la specificità diagnostica del saggio in associazione ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument è uguale al 97.5 % per tamponi respiratori e 100% per campioni di saliva.

Specificità Diagnostica in associazione a CFX96™ Dx System				
Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Tamponi respiratori negativi per SARS-CoV-2 raccolti in UTM	40	1	39	0
Saliva negativa per SARS-CoV-2	45	1	44	0

In questo test, 39 su 40 campioni raccolti in UTM sono stati confermati validi e negativi e 1 campione è risultato discrepante positivo.

44 su 45 campioni di saliva sono stati confermati validi e negativi e 1 campione è risultato discrepante positivo

In questo test, la specificità diagnostica del saggio in associazione CFX96™ Dx System è uguale al 97.5 % per tamponi respiratori e 97.8 % per campioni di saliva.

Sensibilità diagnostica: conferma di campioni positivi

La sensibilità diagnostica del saggio in associazione a tamponi respiratori, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando campioni di RNA estratto con il sistema ELITE InGenius da campioni clinici di tamponi respiratori raccolti in UTM (COPAN Italia S.p.A.) e certificati positivi per SARS-CoV-2 mediante un saggio CE IVD.

La sensibilità diagnostica del saggio in associazione a saliva, come conferma dei campioni clinici positivi, è stata valutata analizzando campioni di RNA estratto con il sistema ELITE InGenius da campioni clinici di saliva e certificati positivi per SARS-CoV-2 mediante un saggio CE IVD su tampone respiratorio.

I campioni di RNA sono stati testati con il saggio in associazione con i sistemi ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument and CFX96™ Dx System.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Sensibilità Diagnostica in associazione a ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument				
Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Tamponi respiratori positivi per SARS-CoV-2 raccolti in UTM	63	61	2	0
Saliva positive per SARS-CoV-2	40	40	0	0

In questo test, 61 su 63 campioni raccolti in UTM sono stati confermati positivi e 2 campioni sono risultati discrepanti negativi.

Tutti i campioni di saliva si sono confermati positivi.

In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio in associazione con ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument è uguale al 96.8 % per tamponi respiratori e 100 % per campioni di saliva.

Sensibilità Diagnostica in associazione a CFX96™ Dx System				
Campioni	N	positivi	negativi	invalidi
Tamponi respiratori positivi per SARS-CoV-2 raccolti in UTM	63	60	3	0
Saliva positive per SARS-CoV-2	40	38	2	0

In questo test, 60 su 63 campioni raccolti in UTM sono stati confermati positivi e 3 campioni sono risultati discrepanti negativi.

38 su 40 campioni di saliva sono stati confermati positivi e 2 campioni sono risultati discrepanti negativi.

In questo test, la sensibilità diagnostica del saggio in associazione con CFX96™ Dx System è uguale al 95.2 % per tamponi respiratori e 95 % per campioni di saliva.

Nota bene: I dati e i risultati completi delle prove eseguite per la valutazione delle caratteristiche prestazionali del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto" di "SARS-CoV-2 ELITE MGB Kit", FTP 170ING.

BIBLIOGRAFIA

P. Zhou et al. (2020) *Nature* **579**: 270 – 273

Y. C. F. Su et al. (2020) *Mbio* **11**: e01610 - 20

B. E. Young et al. (2020) *The Lancet* **396**: 603 - 611

Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases,
WHO interim guidance 19 March 2020

Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens for COVID-19,
CDC 6 January 2021

C. W. Ku et al. (2021) *Int J Infect Dis* **104**: 255 - 261.

R. A. Lee et al. (2021) *J Clin Microbiol* doi: 10.1128/JCM.02881-20.

LIMITI DELLA PROCEDURA

Questo prodotto è esclusivamente destinato per uso *in-vitro*.

Utilizzare questo prodotto con i seguenti campioni clinici: tamponi respiratori (tamponi naso-faringei, tamponi nasali o tamponi oro-faringei) e saliva.

Al momento non sono disponibili dati riguardo le performance del prodotto con i seguenti campioni clinici: lavaggi bronco-alveolari (BAL), escreato, aspirati naso-faringei e surnatante di colture cellulari.

Non utilizzare questo prodotto con quantità di DNA o RNA estratto superiori a 1 µg per reazione: alte quantità di acidi nucleici possono inibire la reazione di trascrizione inversa e di amplificazione degli acidi nucleici e possono causare risultati invalidi.

I risultati ottenuti con questo prodotto dipendono dalla corretta identificazione, raccolta, trasporto, conservazione e preparazione dei campioni; per evitare risultati errati è quindi necessario porre particolare cura durante queste fasi e seguire attentamente le istruzioni fornite con i prodotti per l'estrazione degli acidi nucleici.

La metodica di amplificazione real time degli acidi nucleici utilizzata in questo prodotto, a causa della sua elevata sensibilità analitica, è soggetta a contaminazione da parte di campioni positivi, dei controlli positivi e degli stessi prodotti della reazione di amplificazione. Le contaminazioni portano a risultati falsi positivi. Le modalità di realizzazione del prodotto sono in grado di limitare le contaminazioni; tuttavia questi fenomeni possono essere evitati solo con una buona pratica delle tecniche di laboratorio e seguendo attentamente le istruzioni fornite in questo manuale.

Questo prodotto richiede personale competente e addestrato alla manipolazione di campioni biologici in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati pericolosi per evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede indumenti di lavoro e aree di lavoro adeguate alla manipolazione di campioni biologici in grado di trasmettere agenti infettivi e di preparati chimici classificati pericolosi per evitare incidenti con conseguenze potenzialmente gravi per l'utilizzatore o altre persone.

Questo prodotto richiede aree separate per i test di biologia molecolare e i test per colture di microbiologia per evitare risultati falsi positivi.

Questo prodotto richiede l'utilizzo di indumenti speciali e strumenti dedicati all'allestimento delle sessioni di lavoro per evitare risultati falsi positivi.

Un risultato negativo ottenuto con questo prodotto indica che l'RNA target del saggio non è stato rilevato nell'RNA estratto dal campione, ma non si può escludere che l'RNA target sia presente ad un titolo inferiore al limite di rivelazione del prodotto (vedi "Caratteristiche delle prestazioni"). In questo caso il risultato potrebbe essere un falso negativo.

Ricerche nella letteratura scientifica suggeriscono che al fine di confermare l'esito negativo del test molecolare su saliva è consigliabile ripetere il prelievo ed il test stesso utilizzando il tampone respiratorio.

Ricerche nella letteratura scientifica riportano che la percentuale di positività su saliva è complessivamente superiore se il test viene effettuato entro 7 giorni dopo l'insorgenza dei sintomi.

Ricerche nella letteratura scientifica non forniscono informazioni esaustive circa le prestazioni dell'analisi molecolare di SARS-CoV-2 su popolazione pediatrica.

Un risultato non valido ottenuto con questo prodotto indica che non è stato possibile rilevare in modo efficiente l'RNA del Controllo Interno. In questo caso il campione dovrebbe essere ritestato, a partire dall'estrazione, portando ad un ritardo nell'ottenimento del risultato finale.

Eventuali polimorfismi, inserzioni o delezioni nelle regioni del genoma del patogeno in cui ibridano gli oligonucleotidi di innesco e la sonda del prodotto potrebbero compromettere la rilevazione dell'RNA target.

Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, i risultati ottenuti con questo prodotto devono essere interpretati considerando tutti i dati clinici e gli altri esami di laboratorio relativi al paziente.

Come per qualunque altro dispositivo diagnostico, esiste un rischio residuo di ottenere risultati non validi, falsi positivi e falsi negativi con questo prodotto. Questo rischio residuo non può essere eliminato o ridotto ulteriormente. Questo rischio residuo in situazioni particolari, come le diagnosi prenatali e di urgenza, può contribuire a decisioni errate con conseguenze potenzialmente gravi per il paziente.

PROBLEMI E SOLUZIONI

Reazione del Q-PCR Standard o del Positive Control non valida	
Curva Standard non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nell'impostazione della sessione.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione, del Q-PCR Standard e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione, del Q-PCR Standard e del Controllo Positivo.
Errore nella preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi di reagenti dispensati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Errore nella dispensazione nella micropietra.	Dispensare con cura i reagenti nella micropietra seguendo il piano di lavoro. Controllare i volumi di miscela completa di reazione dispensati. Controllare i volumi di standard dispensati.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione per più di tre sessioni (7 ore nel Blocco dell'Inventory Area). Non esporre la miscela completa di reazione a temperatura ambiente per oltre 30 minuti. Ripreparare la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Degradazione del controllo positivo o standard.	Utilizzare una nuova aliquota del Q-PCR Standard e del Positive Control.
Errore nell'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione delle reazioni degli standard impostata sullo strumento. Controllare il ciclo termico impostato sullo strumento.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica ELITechGroup S.p.A.

Reazione del Negative Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione nella micropietra.	Evitare di spargere il contenuto delle provette dei campioni. Cambiare sempre puntale tra un campione e l'altro. Dispensare con cura campioni, controllo negativo e standard nella micropietra seguendo il piano di lavoro.
Errore nell'impostazione della sessione con ELITE InGenius.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione e del controllo negativo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione e del controllo negativo.
Errore durante l'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione di campioni, controllo negativo e standard impostata sullo strumento.
Micropietra sigillata male.	Sigillare con attenzione la micropietra.
Contaminazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Ripreparare la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Contaminazione del Negative Control.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione dell'Extraction Area, dei Rack o del Blocco dell'Inventory Area.	Pulire superfici con detergenti acquosi, lavare camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica ELITechGroup S.p.A.

Anomala quantità di campioni positivi nella stessa sessione (reazioni con valore di Ct simili)	
Possible Causes	Solutions
Contaminazione tra campioni durante l'allestimento della sessione	Evitare contatti tra pipetta e parete del tubo. Pulire le pipette con ipoclorito di sodio al 3% o DNA/RNA cleaner dopo aver dispensato ciascun campione. Non usare pipette Pasteur. Le pipette devono essere del tipo a dispensazione positiva o utilizzare puntali con filtro per aerosol (vedi Sezione "Avvertenze e Precauzioni"). Caricare i campioni nelle ultime posizioni dello strumento come indicato dalla GUI dello strumento ELITE InGenius. Seguire l'ordine di caricamento indicato dal software.
Contaminazione ambientale	Pulire tutte le superfici a contatto con l'operatore e il campione (incluse le pipette) con ipoclorito di sodio al 3% o DNA/RNA cleaner. Eseguiere un ciclo di decontaminazione con gli U.V. Usare un nuovo tubo di PCR Mix.

Reazione dei campioni non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nell'impostazione della sessione.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione e del campione. Controllare i volumi della miscela completa di reazione e del campione.
Errore nella preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi di reagenti dispensati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Errore nella dispensazione nella micropietra.	Dispensare con cura i reagenti nella micropietra seguendo il piano di lavoro. Controllare i volumi di miscela completa di reazione dispensati. Controllare i volumi di campioni dispensati.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione per più di tre sessioni (7 ore nel Blocco dell'Inventory Area). Non esporre la miscela completa di reazione a temperatura ambiente per oltre 30 minuti. Non esporre l'RT EnzymeMix a temperature superiori a -20 °C per tempi superiori ai 10 minuti. Ripreparare la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Inibizione causata da sostanze interferenti estratte con il campione.	Ripetere l'amplificazione diluendo il campione estratto 1 : 2 in acqua per biologia molecolare, impostando la sessione "PCR only". Ripetere l'estrazione diluendo il campione primario 1 : 2 in acqua per biologia molecolare, impostando la sessione "Extract + PCR".
Degradazione del campione.	Ripetere l'estrazione con una nuova aliquota di campione.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica ELITechGroup S.p.A.

Presenza di fluorescenza di fondo irregolare o elevata nelle reazioni	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nella dispensazione del campione.	Mescolare con cura, pipettando per tre volte, campioni, controllo negativo e standard nella miscela di reazione. Evitare di creare bolle sia sul fondo del pozzetto sia in superficie.
Errore nell'impostazione della "baseline".	Impostare l'intervallo di calcolo della "baseline" in un ambito di cicli in cui la fluorescenza di fondo sia già stabilizzata (controllare le registrazioni "Results", "Component") e la fluorescenza del segnale non abbia ancora cominciato a crescere, per esempio dal ciclo 6 al ciclo 15. Impostare il calcolo automatico della "baseline" selezionando l'opzione "Auto Baseline".

Errore 30103	
Possibili cause	Soluzioni
Elevata concentrazione del target nel campione.	Se si osserva nel grafico del plot di PCR una amplificazione significativa: - selezionare il track relativo al campione e approvare manualmente il risultato. Se è richiesto un valore di Ct: - ripetere l'amplificazione con il campione estratto diluito 1:10 in acqua per biologia molecolare, impostando la sessione "PCR only" o - ripetere l'estrazione diluendo il campione primario 1:10 in acqua per biologia molecolare, e impostando la sessione "Extract + PCR".

TH Error	
Possibili cause	Soluzioni
Campione con grafico del plot anomalo.	Se si osserva nel grafico del plot di PCR una amplificazione significativa con baseline negativa: - ripetere l'amplificazione diluendo il campione estratto 1:10 in acqua per biologia molecolare, impostando la sessione "PCR only" o - ripetere l'estrazione diluendo il campione primario 1:10 in acqua per biologia molecolare, e impostando la sessione "Extract + PCR".

LEGENDA DEI SIMBOLI

REF

Numero di catalogo.



Limite superiore di temperatura.

LOT

Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese)

IVD

Dispositivo medico diagnostico *in vitro*.



Conforme ai requisiti della Direttiva Europea 98/79/CE relativa ai dispositivi medici diagnostici *in vitro*.



Contenuto sufficiente per "N" test.



Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.

CONT

Contenuto.



Tenere lontano dalla luce solare.



Fabbricante.

AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

Questo prodotto contiene reagenti prodotti da Thermo-Fisher Scientific e sono venduti sotto accordo tra ELITechGroup S.p.A. e le sue filiali e Thermo-Fisher Scientific. Il costo di questo prodotto include il diritto limitato e non trasferibile di usare questa quantità di prodotto unicamente per le attività di acquisto che sono direttamente correlate alla diagnostica umana. Per informazioni sull'acquisto di una licenza per uso diverso da quello stabilito sopra, contattare il Dipartimento Licenze, Thermo-Fisher Scientific, Email: outlicensing@thermofisher.com.

I reagenti per la rivelazione ELITe MGB® sono coperti da uno o più brevetti USA, n. 6,127,121, 6,485,906, 6,660,845, 6,699,975, 6,727,356, 6,790,945, 6,949,367, 6,972,328, 7,045,610, 7,319,022, 7,368,549, 7,381,818, 7,662,942, 7,671,218, 7,715,989, 7,723,038, 7,759,126, 7,767,834, 7,897,736, 8,008,522, 8,067,177, 8,163,910, 8,389,745, 8,969,003, 8,980,855, 9,056,887, 9,085,800, 9,169,256 e brevetti EP n. 1068358, 1144429, 1232157, 1261616, 1430147, 1781675, 1789587, 1975256, 2714939 oltre a richieste attualmente in corso di approvazione.

Questa licenza limitata permette alla persona o all'entità legale alla quale il prodotto è stato fornito di usare il prodotto e i dati generati con l'uso del prodotto, solo per uso di ricerca. Né ELITechGroup S.p.A. né i suoi licenziatari concedono altre licenze, esplicite o implicite per altri scopi.

ELITe MGB®, il logo ELITe MGB® e ELITe InGenius® sono registrati come marchi commerciali nell'Unione Europea da ELITechGroup.

TaqMan™ è un marchio Roche Molecular Systems, Inc

UTM® and eSWAB® sono registrati come marchi commerciali da COPAN Italia S.p.A.

CFX96™ Dx System è un marchio Bio-Rad Laboratories, Inc.

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit used with ELITE InGenius®

Ref: RTS170ING or RTS170ING-96



 This document is a simplified version of the official instruction for use. Before use please refer to the complete instruction for use downloadable at: www.elitechgroup.com
This document is available only in English.

A. Intended use

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit is part of a qualitative and quantitative multiplex nucleic acids reverse transcription and amplification assay for the **detection** and **identification** of the RNA of **Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)**.

The assay is CE-IVD validated in combination with the **ELITE InGenius**.

B. Amplified sequence

Target for Qualitative Application	Gene	Fluorophore
Target 1	ORF8 gene	FAM (CH 1)
Target 2	RdRp gene	AP593 (CH 4)
Internal Control (endogenous)	RNase P gene	AP525 (CH 3)

Target for Quantitative Application	Gene	Fluorophore
SARSCoV2	ORF8 + RdRp gene	FAM (CH 1)
Internal Control (endogenous)	RNase P gene	AP525 (CH 3)

C. Validated Matrixes

- › **Respiratory Swabs**
- › **Saliva**

Note: Transfer 200 µL of sample from the Swab tube or saliva collection tube into the extraction tube. Do not insert the primary tube directly into the instrument to perform the run.

D. Tube type collection

Copan Ref.	Description
490CE02.A	eSwab
360C or 305C	UTM Kit

E. Kit content

CoV-2 PCR Mix (Neutral)	RT EnzymeMix (Black)	Maximum Shelf-life: 15 Months
 - X 5 (RTS170ING) - X 2 (RTS170ING-96)	 - X 5 (RTS170ING) - X 2 (RTS170ING-96)	Storage temp.: - 20 °C
tubes of 1,200 µL 240 reactions per kit (ref. RTS170ING) 96 reactions per kit (ref. RTS170ING-96) 10 freeze-thaw cycles	tubes of 20 µL 240 reactions per kit (ref. RTS170ING) 96 reactions per kit (ref. RTS170ING-96) 10 freeze-thaw cycles	Prepare the Master Mix in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005)

F. Master Mix Preparation

Reagent	1 Test
CoV-2 PCR Mix	20 µL
RT Enzyme Mix	0.3 µL

Samples N.	Total reactions
1 to 5	N + 1 rxn
6 to 11	N + 2 rxn
12	N + 2.5 rxn

G. Material required not provided in the kit

- › ELITE InGenius instrument: INT030
- › ELITE InGenius SP200 Extraction Cartridge: INT032SP200
- › ELITE InGenius PCR Cassette: INT035PCR
- › ELITE InGenius SP200 Consumable Set: INT032CS
- › ELITE InGenius Waste Box: F2102-000
- › 300 µL Filter Tips Axygen: TF-350-L-R-S
- › SARS-CoV-2 - ELITE Positive Control: CTR170ING
- › SARS-CoV-2 ELITE Standard: STD170ING
- › CPE - Internal Control: CTCRPE

H. ELITE InGenius® Protocol

Protocol	Volume
Sample	200 µL
Total eluate	100 µL
PCR eluate input	10 µL
Complete PCR Mix	20 µL
Control Frequency	15 days
Calibration Frequency	60 days

I. Result Interpretation (for Qualitative application)

RdRP	ORF8	Result
+	+	SARS-CoV-2 positive
+	-	
-	+	

J. Performance

LoD	Diagnostic Specificity	Diagnostic Sensitivity
Please refer to the IFU for RTS170ING / RTS170ING-96		

K. Procedures

The user is guided step-by-step by the ELITE InGenius software to prepare the run. All the steps: extraction, amplification, reverse transcription and result interpretation are automatically performed. Three operational mode are available: complete run, or extraction only, or PCR only.

Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius Identification with username and password Select the mode "Closed"	Verify standard and controls: CoV-2 Q PCR Standard in the "Calibration menu" CoV-2 positive and negative controls in the "Control menu" <i>NB: All had to be run, approved and not expired</i>	2. Thaw the CoV-2 PCR Mix and RT EnzymeMix tubes. Vortex gently and spin down 5 secs Prepare the complete Master Mix as shown in the section F
---	--	--

Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Elute: "100 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest	5. Select the sample position: extraction tube	6. Load the complete Master Mix in the inventory block
7. Load: PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip and sample collected into extraction tubes. For Swab use see D	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 2 - PCR only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "PCR only" and set the sample position "Extra tube"	6. Load the extracted nucleic acid tubes in the Elution tubes rack
7. Load the PCR cassette rack Load the Q-PCR Mix in the inventory block	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the protocol "Extraction Only" and set the sample position: extraction tube	6. Load: Extraction cartridge, Elution tube, Tip and sample collected into extraction tubes. For Swab use see D
7. Close the door Start the run	8. Archive the eluate sample	

L. References

- WHO Reference: "Laboratory testing for coronavirus disease (COVID-19) in suspected human cases, 19 March 2020"
- CDC Reference: "Interim Guidelines for Collecting, Handling, and Testing Clinical Specimens from Persons Under Investigation (PUIs) for Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)".
- Zhou P. et al., "A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin", Nature 2020; 579: 270 – 273

SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit used with Open Platforms

Code: RTS170ING or RTS170ING-96



This document is a simplified version of the official instruction for use. Before use please refer to the complete instruction for use downloadable at: www.elitechgroup.com This document is available only in English.

A. Intended use

The «SARS-CoV-2 ELITE MGB® Kit» product is part of a qualitative multiplex nucleic acids reverse transcription and amplification assay for the **detection** and **identification** of the genomic RNA of **Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)**. The assay is CE-IVD validated in combination with the **7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument** (Applied Biosystems® Inc.) and **CFX96™ Dx System** (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Amplified sequence

	Gene	Fluorophore
Target 1	RdRp	ROX
Target 2	ORF8	FAM
Internal Control	human RNase P	VIC

B. Validated matrix

- › Respiratory Swabs
- › Saliva

C. Kit content

CoV-2 PCR Mix (Neutral)	RT EnzymeMix (Black)	
 X 5 (RTS170ING) X 2 (RTS170ING-96)	 X 5 (RTS170ING) X 2 (RTS170ING-96)	› Maximum shelf-life: 15 months › Storage - 20°C
5 tube of 1,200 µL (RTS170ING) or 2 tube (RTS170ING-96) 96 - 240 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles	5 tube of 20 µL (RTS170ING) or 2 tube (RTS170ING-96) 96 - 240 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles	

D. Material required not provided in the kit

- › 7500 Fast Dx RT PCR Instrument ref: 4406985
- › Biorad CFX96: Ref.1845097
- › Copan UTM Swab: 360C or 305C
- › 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005)
- › SARS-CoV-2 ELITE Positive Control: CTR170ING
- › Molecular biology grade water
- › Q - PCR Microplates Fast: RTSACC02
- › Hard-Shell 96-Well PCR Plates: Bio-Rad, code HSP9601
- › Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film: Bio-Rad, code

E. Performance

System	Matrix	Limit of Detection	Diagnostic Sensitivity	Diagnostic Specificity
ABI 7500	Respiratory Swab in UTM	100 gEq / mL	96.8 % (61/63)*	97.5% (39/40)*
	Saliva	714 gEq / mL	100 % (40/40)*	100 % (45/45)*
CFX96	Respiratory Swab in UTM	100 gEq / mL	95.2% (60/63)*	97.5% (39/40)*
	Saliva	714 gEq / mL	95 % (38/40)*	97.8% (44/45)*

*confirmed samples/tested samples

F. Procedure

The procedure below summarized the main steps of the sample analysis with conventional PCR workflow: validated extraction systems, PCR instrument settings, PCR set-up and result interpretation.

Sample Preparation

Sample Number (N)	CoV-2 PCR Mix	RT EnzymeMix
1 ≤ N ≤ 5	(N + 1) x 20 µL	(N + 1) x 0.3 µL
6 ≤ N ≤ 12	(N + 2) x 20 µL	(N + 2) x 0.3 µL
13 ≤ N ≤ 24	(N + 3) x 20 µL	(N + 3) x 0.3 µL
25 ≤ N ≤ 48	(N + 4) x 20 µL	(N + 4) x 0.3 µL

Amplification - Settings of CFX96

1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "ORF8" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "RdRp" detector with "ROX" and quencher "none"
4. Set "IC" detector with "VIC" and quencher "none"
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C
6. Set the baseline as 10 to 15

Stage	Temperature	Timing
Retrotranscription	45°C	20 min
Denaturation	95°C	2 min
Amplification and detection 44 cycles	95°C	10 sec
	60°C	20 sec
	60°C	10 sec
	72°C	20 sec

Amplification - Settings of 7500 Fast Dx instrument

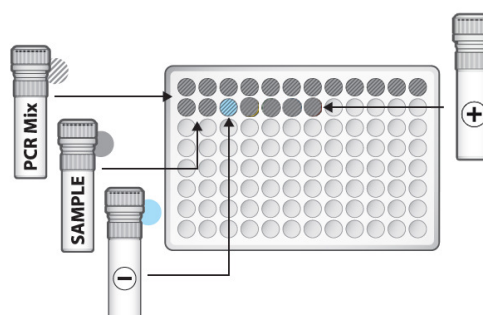
1. Switch on the thermal-cycler
2. Set "ORF8" detector with "FAM" and quencher "none"
3. Set "RdRp" detector with "ROX" and quencher "none"
4. Set "Internal Control" detector with "VIC" and quencher "none"
5. Set up the thermal profile as indicated. Fluorescence acquisition must be set during hybridization step at 60°C
6. Set the baseline as "Autobaseline"

Stage	Temperature	Timing
Retrotranscription	45°C	20 min
Denaturation	95°C	2 min
Amplification and detection 45 cycles	95°C	10 sec
	60°C	30 sec
	72°C	20 sec

***Note:** With AB 7500 Fast Dx in the case of irregular baseline plot, the Baseline calculation must be set to "Manual Baseline" and its range must be adapted from cycle 3 to the cycle in which the fluorescence of the positive samples begins to increase, as detected by the instrument software.

Amplification - PCR Set-up

1. Thaw complete reactions mix SARS-CoV-2
 2. Mix gently and spin-down
 3. Pipet **20 µL** of complete reactions mix SARS-CoV-2 in all microplate wells in use
 4. Add, **10 µL** of extracted RNA in sample wells, **10 µL** of molecular grade water in Negative Control well, and **10 µL** of positive control
- Each one has to be mixed by pipetting 3 times into the reaction mixture
5. Seal the microplate with the amplification sealing sheet
 6. Transfer the microplate in the thermocycler and start



Results Interpretations

Reaction Positive Control	Results	Detection
RdRp Ct ≤ 29	Positive	Correct
ORF8 Ct ≤ 29	Positive	Correct

Reaction Negative Control	Results	Detection
RdRp Ct = Undetermined	Negative	Correct
ORF8 Ct = Undetermined	Negative	Correct
IC Ct > 39 or Undetermined	Negative	Correct

Interpretation - Qualitative results (respiratory swab samples)

RdRp	ORF8	IC	Results	SARS-CoV-2 RNA
Ct Determined	Ct Determined	Ct Determined or Ct Undetermined	Valid, positive	Detected
Ct Determined	Ct Undetermined	Ct Determined or Ct Undetermined	Valid, positive	Detected
Ct Undetermined	Ct Determined	Ct Determined or Ct Undetermined	Valid, positive	Detected
Ct Undetermined	Ct Undetermined	Ct ≤ 35	Valid, negative	Undetected
Ct Undetermined	Ct Undetermined	Ct > 35 or Ct Undetermined	Invalid	-

Interpretation of CFX96 - Qualitative results (saliva samples)

RdRp	ORF8	IC	Results	SARS-CoV-2 RNA
Ct Determined	Ct Determined	Ct Determined or Ct Undetermined	Valid, positive	Detected
Ct Determined	Ct Undetermined	Ct Determined or Ct Undetermined	Valid, positive	Detected
Ct Undetermined	Ct Determined	Ct Determined or Ct Undetermined	Valid, positive	Detected
Ct Undetermined	Ct Undetermined	Ct ≤ 30	Valid, negative	Undetected
Ct Undetermined	Ct Undetermined	Ct > 30 or Ct Undetermined	Invalid	-

Interpretation of 7500 Fast Dx instrument - Qualitative results (saliva samples)

RdRp	ORF8	IC	Results	SARS-CoV-2 RNA
Ct Determined	Ct Determined	Ct Determined or Ct Undetermined	Valid, positive	Detected
Ct Determined	Ct Undetermined	Ct Determined or Ct Undetermined	Valid, positive	Detected
Ct Undetermined	Ct Determined	Ct Determined or Ct Undetermined	Valid, positive	Detected
Ct Undetermined	Ct Undetermined	Ct ≤ 27	Valid, negative	Undetected
Ct Undetermined	Ct Undetermined	Ct > 27 or Ct Undetermined	Invalid	-