



## PlexPCR<sup>®</sup> SARS-CoV-2

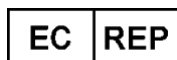
### Dosaggio RT-PCR multiplex in tempo reale per il rilevamento di SARS-CoV-2



Prodotto	Piattaforma	Capacità (reazioni)	N. catalogo
<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2	LC480 II CFX96 <sup>™</sup> Dx CFX96 Touch <sup>™</sup>	384	<b>REF</b> 1301384

#### Prodotti accessori – Software di analisi

<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (LC480)	<b>REF</b> 99021
<i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (CFX)	<b>REF</b> 99022



**MedEnvoy**  
Prinses Margrietplantsoen 33 – Suite 123  
2595 AM L'Aia  
Paesi Bassi



**SpeeDx Pty Ltd**  
Suite 102, National Innovation Centre  
4 Cornwallis Street, Eveleigh  
NSW 2015, Australia

#### ESCLUSIVAMENTE PER USO PROFESSIONALE

Non per la vendita negli Stati Uniti

## Contenuto

1	Descrizione del prodotto .....	4
2	Uso previsto .....	4
3	Informazioni sugli agenti patogeni.....	4
4	Contenuto del kit .....	4
5	Spedizione e conservazione .....	5
6	Avvertenze e precauzioni .....	5
6.1	Generalità.....	5
6.2	Laboratorio .....	5
6.3	Manipolazione dei campioni .....	5
6.4	Saggio .....	5
6.5	Precauzioni di sicurezza.....	5
6.6	Avvertimenti e precauzioni per il plug-in di dosaggio.....	5
7	Materiali necessari ma non forniti.....	6
8	Principi della tecnologia .....	8
9	La procedura in generale .....	9
10	La procedura nel dettaglio.....	10
10.1	Raccolta, trasporto e conservazione del campione .....	10
10.2	Trattamento dei campioni.....	10
10.2.1	Volumi dei reagenti per MGISP-960.....	11
10.2.2	Volumi dei reagenti per KingFisher Flex e PurePrep.....	11
10.3	Internal Control (controllo interno) (IC) .....	12
10.3.1	Controllo interno su MagNA Pure 96, KingFisher Flex e PurePrep 96 .....	12
10.4	Preparazione del PCR in tempo reale .....	12
10.4.1	Preparazione della miscela master.....	13
11	Programmazione e analisi.....	13
12	Interpretazione dei risultati .....	13
13	Limitazioni.....	14
14	Controllo della qualità.....	14
15	Istruzioni per REDx™ FLOQ SARS-CoV-2 Positive Control.....	14
15.1	Istruzioni per l'uso .....	14
16	Caratteristiche prestazionali.....	15
16.1	Prestazioni cliniche.....	15
16.1.1	Studio clinico 1 .....	15
16.2	Prestazioni analitiche .....	15
16.2.1	Ripetibilità e riproducibilità.....	15
16.2.1.1	LightCycler® 480 Instrument II .....	15
16.2.1.2	Per i sistemi di rilevamento CFX96™ Dx Real-Time PCR e CFX96 Touch™ Real-Time PCR.....	16
16.2.2	Sensibilità analitica.....	17
16.2.2.1	LightCycler® 480 Instrument II .....	17
16.2.2.2	Flusso di lavoro col MGISP-960 e LightCycler® 480 Instrument II.....	18
16.2.3	Specificità analitica .....	20
16.2.4	Analisi <i>in silico</i> .....	20
16.2.5	Inclusività .....	21



16.2.6	Sostanze potenzialmente interferenti .....	21
17	Assistenza clienti e assistenza tecnica.....	21
18	Bibliografia .....	21
19	Appendice 1: LightCycler® 480 Instrument II .....	22
19.1	Programmazione del LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II) .....	22
19.2	Impostare un modello Macro per il LightCycler® 480 Instrument II .....	27
19.3	Colour Compensation (compensazione del colore) per LightCycler® 480 Instrument II.....	34
19.4	Interpretazione dei risultati .....	34
20	Appendice 2: Bio-Rad CFX96™ Dx e CFX96 Touch™ sistema PCR in tempo reale .....	36
20.1	Programmare il CFX96™ Dx e il CFX96 Touch™ il sistema di rilevamento PCR in tempo reale (CFX96 Dx, CFX96 Touch) 36	
20.2	Interpretare i risultati usando il software integrato CFX .....	38
20.3	Esportare i risultati dall'analisi integrata .....	42
20.4	Interpretazione dei risultati .....	44
21	Appendice A: interpretazione dei risultati .....	45
21.1	Piattaforma FastFinder – Requisiti IT minimi .....	45
21.2	Device set up (impostazione del dispositivo) (nuovo utente o dispositivo) .....	46
21.2.1	Compensazione del colore .....	46
21.3	Plug-in di dosaggio (nuovo utente).....	47
21.4	Denominazione dei campioni .....	47
21.5	Aggiunta dei numeri di lotto delle miscele .....	48
21.6	Analisi.....	48
21.7	Risultati .....	49
21.8	Curva di riferimento .....	49
21.9	Panoramica dei risultati .....	50
21.10	Esportazione dei risultati .....	51
22	Glossario.....	52

## 1 Descrizione del prodotto

Il kit **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 è un multiplex qPCR a 1 pozzetto per il rilevamento del coronavirus 2 da sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV-2). Il dosaggio fornisce 3 letture. La lettura 1 indica la presenza o l'assenza di SARS-CoV-2 attraverso il rilevamento del gene Open Reading Frame (ORF1ab), (cornice di lettura aperta); la lettura 2 indica la presenza o assenza del SARS-CoV-2 attraverso il rilevamento del gene RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) (RNA polimerasi RNA-dipendenti); la lettura 3 è un controllo interno RNA (IC) per monitorare l'efficienza di estrazione e l'inibizione di qPCR. Il kit **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 utilizza la tecnologia **PlexZyme**<sup>®</sup> per la specificità e capacità di multiplexing superiore.

Il dosaggio viene verificato analizzando i campioni estratti utilizzando il MagNA Pure 96 System (Roche), PurePrep 96 (Molgen) e il sistema di purificazione KingFisher<sup>™</sup> Flex Sample (ThermoFisher). Per la manipolazione dei liquidi si usa **PlexPrep**<sup>™</sup> (SpeedX), mentre il rilevamento in tempo reale si avvale del LightCycler<sup>®</sup> 480 II Instrument (LC480 II, Roche), del sistema di rilevamento CFX96<sup>™</sup> Dx Real-Time PCR Detection System (CFX96 Dx, Bio-Rad), e del sistema di rilevamento CFX96 Touch<sup>™</sup> Real-Time PCR Detection System (CFX96 Touch, Bio-Rad).

## 2 Uso previsto

Il kit **PlexPCR**<sup>®</sup> è un test diagnostico PCR in tempo reale (RT-qPCR) *in vitro* a trascrittasi inversa per il rilevamento qualitativo di SARS-CoV-2.

Il kit **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 è previsto come ausilio nella diagnosi di SARS-CoV-2 e deve essere utilizzato insieme a informazioni cliniche e di laboratorio.

Il kit **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 può essere usato con il seguente tipo di campione: tamponi nasofaringei.

Il kit **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 è destinato all'uso in ambienti professionali come ospedali e laboratori di riferimento o statali. Non è indicato invece per test autodiagnostici, per l'uso domestico né per quello presso il punto di assistenza.

La popolazione target alla quale è destinato il kit **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 è costituita da pazienti sintomatici con sospetta sindrome respiratoria acuta grave da coronavirus (SARS-CoV2) sulla base dell'anamnesi e/o dei dati clinici raccolti dai professionisti sanitari.

## 3 Informazioni sugli agenti patogeni

Un focolaio di malattie respiratorie ad eziologia non nota nella città di Wuhan, provincia di Hubei, Cina, è stato inizialmente notificato all'Organizzazione mondiale della Sanità (OMS) il 31 dicembre 2019.<sup>1</sup> Un nuovo coronavirus è stato successivamente identificato e chiamato SARS-CoV-2 (coronavirus 2 da sindrome respiratoria acuta grave), causa della malattia trasmissibile COVID-19 (malattia da coronavirus 2019).<sup>2</sup> Il SARS-CoV-2 è stato da allora responsabile di una pandemia globale che ha provocato più di 75 milioni di casi confermati e oltre 1,5 milioni di decessi alla fine di settembre 2020.<sup>3</sup>

## 4 Contenuto del kit

Numero di test: 384 reazioni

Tabella 1. Contenuto del kit <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (N. cat 1301384)			
Colore del tappo	Contenuto	Descrizione	Quantità
Marrone	SARS-CoV-2 Mix (Miscela SARS-CoV-2), 20x	Miscela contenente oligonucleotidi <sup>^</sup> per l'amplificazione e il rilevamento di SARS-CoV-2 e il controllo interno per LC480 II e CFX	2 x 150 µL
Verde	<b>Plex</b> Mastermix (Miscela master <b>Plex</b> ), 2x	Miscela master contenente i componenti necessari per qPCR tra cui dNTP, MgCl <sub>2</sub> , DNA polimerasi e tampone	2 x 1,2 mL
Neutro	RTase, 100x	Enzima della trascrittasi inversa per la creazione di DNA complementare (cDNA) dal template di RNA	1 x 90 µL
Nero	RNase Inhibitor (Inibitore di Rnase), 50x	Inibitore di RNase	1 x 135 µL
Viola	Internal Control (controllo interno) (RNA) <sup>#</sup>	Le cellule di controllo interno contengono il template di RNA del controllo interno per monitorare efficienza di estrazione, trascrittasi inversa e amplificazione	1 x 200 µL
Blu	Nuclease free water (Acqua senza nucleasi)	Acqua, grado PCR	1 x 1 mL

<sup>#</sup> Conservare le provette del template separatamente dai mix di oligonucleotidi, ossia nella sala di manipolazione del template o degli acidi nucleici

<sup>^</sup> Gli oligonucleotidi sono coppie di primer PCR, enzimi **PlexZyme**<sup>®</sup> e sonda contrassegnata mediante fluorescenza

<sup>\*</sup> Sufficiente per 384 x 10 µL test. Volume aggiuntivo fornito per la compatibilità con la strumentazione di gestione dei liquidi, convalidata con **PlexPrep**<sup>™</sup> (SpeedX).

## 5 Spedizione e conservazione

- I componenti dei kit **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 vengono spediti in confezioni con blocchi di ghiaccio secco o di gel ghiacciato. Tutti i componenti vanno conservati tra -25 °C e -15 °C da quando vengono ricevuti. Si raccomanda che i cicli di congelamento/scongelo siano limitati a 10.
- Se conservato nelle condizioni consigliate e trattato correttamente, il kit rimane attivo fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta. Non utilizzare oltre la data di scadenza.

## 6 Avvertenze e precauzioni

### 6.1 Generalità

- Esclusivamente per uso diagnostico *in vitro*.
- Prima dell'uso, leggere attentamente le presenti Istruzioni per l'uso. Seguire rigorosamente le procedure come descritto al fine di garantire l'affidabilità dei risultati del test. Qualsiasi deviazione da queste procedure potrebbe compromettere la performance del test.
- Gli utenti devono essere adeguatamente addestrati all'uso del saggio **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2.
- Eventuali incidenti gravi dovranno essere segnalati al produttore e all'autorità competente dello Stato membro in cui l'utente e/o il paziente risiede.

### 6.2 Laboratorio

- Si consiglia di eseguire la preparazione/estrazione del campione, la preparazione del mastermix, l'aggiunta del campione e il ciclo termico in locali separati. Come minimo, lo strumento per PCR deve possibilmente trovarsi in una stanza separata dalle aree in cui vengono preparate le reazioni.
- Si raccomanda di seguire le normali precauzioni di laboratorio. Indossare dispositivi di protezione individuale adeguati come guanti, occhiali protettivi e camice da laboratorio durante la manipolazione dei reagenti.
- Nei campioni clinici potrebbero essere presenti organismi patogeni. Trattare tutti i campioni biologici come potenzialmente infetti e seguire le procedure di sicurezza del proprio istituto per la manipolazione di sostanze chimiche e campioni biologici.
- Seguire le procedure di smaltimento dei rifiuti pericolosi del proprio istituto per il corretto smaltimento di campioni, reagenti e altri materiali potenzialmente contaminati.

### 6.3 Manipolazione dei campioni

- I campioni devono essere raccolti, trasportati e conservati utilizzando tecniche di laboratorio standard o secondo le istruzioni del kit di raccolta.

### 6.4 Saggio

- Le precauzioni di base per prevenire la contaminazione delle reazioni di PCR includono l'uso di puntali per pipette con filtro sterili, l'uso di un nuovo puntale per pipette per ogni azione di pipettaggio e la separazione del flusso di lavoro.

### 6.5 Precauzioni di sicurezza

- Su richiesta sono disponibili le schede di sicurezza (SDS). Si prega di contattare il seguente indirizzo [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) per maggiori informazioni.

### 6.6 Avvertimenti e precauzioni per il plug-in di dosaggio

- Il software SpeedX può controllare l'analisi dei dati grezzi generati dal kit di test solo se utilizzato con il rispettivo strumento PCR. Il software non controlla la preparazione dei campioni, le reazioni, la programmazione dei dispositivi o la somministrazione del trattamento.
- Gli utenti devono essere adeguatamente formati sull'uso del software di analisi e l'accesso al software va circoscritto a ciascun singolo utente assegnato.
- Si raccomanda di implementare procedure di autenticazione dell'utente e controlli di sicurezza informatica come software antivirus o firewall all'interno del sistema informatico e dell'infrastruttura che utilizza il software.
- Qualora venisse rilevato un incidente tale da compromettere la sicurezza informatica, come un accesso non autorizzato o un attacco ransomware, si prega di contattare [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) per ulteriore supporto.

## 7 Materiali necessari ma non forniti

### *Materiali di controllo positivo*

- Controllo Positivo Tampone REDx™ FLOQ SARS-CoV-2 (Microbix, numero catalogo RED-S-19-01)

### *Materiali di consumo di laboratorio*

- Guanti e camici da laboratorio puliti
- Agitatore Vortex
- Centrifuga da banco per provette da 0,5 mL e 1,5 mL
- Micropipettatori
- Pipettatori multicanale
- Puntali di pipette sterili resistenti agli aerosol
- Provette da 0,5 mL e provette da 1,5 mL (grado PCR)
- Guarnizione adesiva della piastra
- Provette da 2,0 mL (per la pre-diluizione delle cellule di controllo interno)

### *Per MagNA Pure 96 Instrument*

- 1x Soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS)
- MagNA Pure 96 Internal Control Tube (provetta di controllo interno) (Roche, N. di cat. 00374905001)
- MagNA Pure 96 DNA e Viral NA Small Volume Kit (kit per piccoli volumi) (Roche, N. di cat. 06543588001)
- MagNA Pure 96 System Fluid (liquido di sistema, esterno) (Roche, N. di cat. 06640729001)
- MagNA Pure 96 Processing Cartridge (cartuccia di trattamento) (Roche, N. di cat. 06241603001)
- Puntali MagNA Pure 96 Pure (Roche, N. di cat. 6241620001)
- MagNA Pure 96 Output Plate (piastra di uscita) (Roche, N. di cat. 06241611001)
- MagNA Pure Sealing Foil (foglio di alluminio sigillante) (Roche, N. di cat. 06241638001)

### *Per lo strumento MGISP-960*

- Kit per l'estrazione dell'acido nucleico 96 prep (MGI, Numero di catalogo 1000022201(ARTG-IVD)) o kit per l'estrazione dell'acido nucleico 96 prep (MGI, Numero di catalogo 1000021042 (CE-IVD))
- 4 x 250 µL puntali automatici per filtro (MGI, Numero di catalogo 1000000723)
- 5 x 1,3 mL piastre a pozzetti profondi con fondo a U (MGI, numero di catalogo 1000004644)
- 1 x piastra PCR bordata a 96 pozzetti con parete sottile e guscio duro, guscio bianco/pozzetto trasparente (MGI, numero di catalogo 1000012059)
- Provetta da 50 mL, senza DNase, senza RNase
- Etanolo assoluto (100%)
- Centrifuga per la piastra

*Per PurePrep 96 Instrument*

- 1x Soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS)
- Acqua di grado molecolare
- PurePrep Deep well plate 2mL (Piastra a pozzetto profondo, 2ml) (Molgen N. di cat. MG96020050)
- PurePrep 96 Elution plate 200uL (Piastra di eluizione, 200 uL) (Molgen N. di cat. MG96010050)
- PurePrep 96 Tip combs (Pettini a punta) (Molgen N. di cat. MG96030050)
- Kit 1x96 Patogeni Molgen PurePrep (Molgen N. di Cat. OE00290096) OPPURE kit da 10x96 (Molgen N. di Cat. OE00290960)
- Agitatore micropiastra (velocità minima 1000 RPM)
- Bacino reagenti 50 mL per pipette 8 canali
- Falcon Tube 50 mL (provette, 50 mL)

*Per KingFisher Flex*

- 1x Soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS)
- ThermoFisher MagMAX Viral and Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Kit di isolamento acido nucleico dei patogeni e virus, ThermoFisher N. di cat. A42352)
- KingFisher 96 deep-well plate, v-bottom, polypropylene (Piastra a pozzetti profondi, fondo a v, in polipropilene, ThermoFisher N. di cat. 95040450)
- KingFisher 96 tip comb for deep-well magnets (Pettine a punte per magneti di pozzetto profondo, ThermoFisher N. di cat. 97002534)
- KingFisher 96 microplate (200µL) (Micropiastra 200µL, ThermoFisher N. di cat. 97002540)
- 80% etanolo
- Bacino reagenti 50 mL per pipette 8 canali
- Falcon Tube 50 mL (provette, 50 mL)

*Per lo strumento di gestione dei liquidi SpeedX PlexPrep™*

- Deck a 8 posizioni **PlexPrep™** dotato di 2 canali indipendenti e una testa a 8 sonde (N. del pezzo 6600200-01)
- 4x Moduli rastrelliera per puntali (N. di cat. HMT-6600533-01)
- 4x modulo per provette con 24 posizioni (N. di cat. HMT-6600555-01)
- 1x modulo per provette piccolo con 24 posizioni (N. di cat. HMT6600409-01)
- Puntali filtrati conduttivi da 50 uL (N. di cat. HMT-235948)
- Puntali filtrati conduttivi da 300 uL (N. di cat. HMT-235903)
- Puntali filtrati conduttivi da 1000 uL (N. di cat. HMT-235905)

*Per LightCycler® 480 Instrument II*

- **PlexPCR®** Colour Compensation (CC) Kit (compensazione del colore) (SpeedX, N. di cat. 90001)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 (piastra multipozzetto) (Roche, N. di cat. 04729692001)
- LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 (Roche, N. di cat. 04729749001)
- LightCycler® 480 Sealing Foil (foglio di alluminio sigillante) (Roche, N. di cat. 04729757001)

*Per i sistemi di rilevamento CFX96™ Dx Real-Time PCR e CFX96 Touch™ Real-Time PCR*

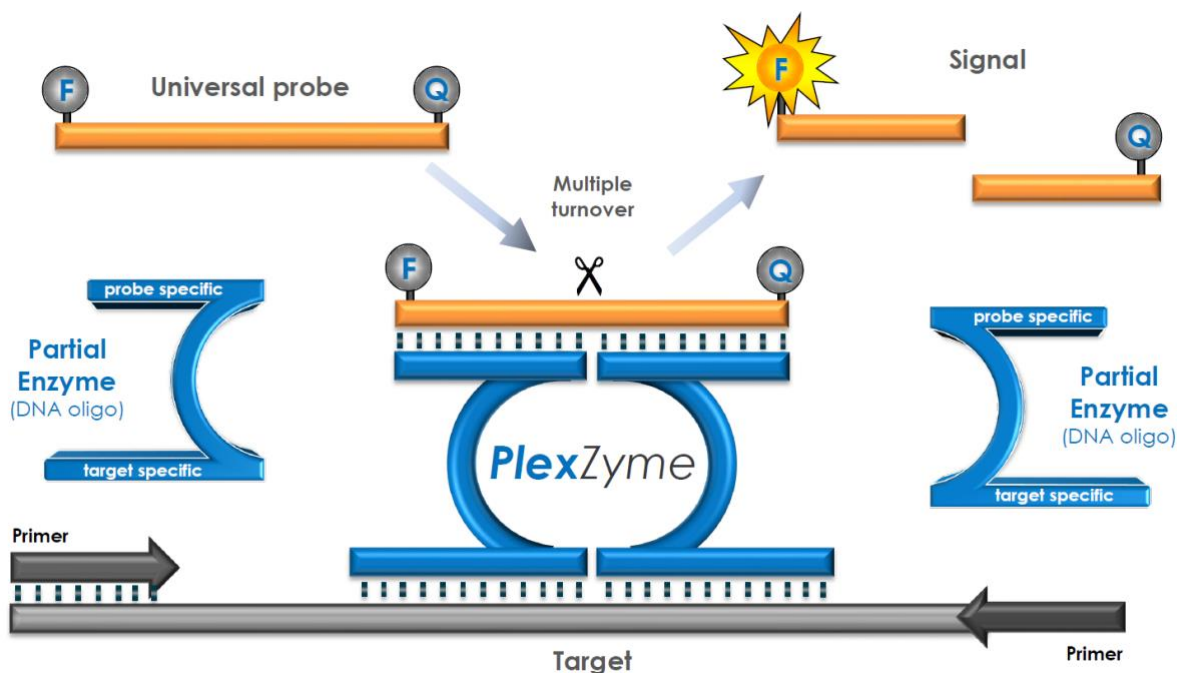
- Hard-Shell® 96-Well PCR Plates (Piastre PCR a involucro duro a 96 pozzetti), basso profilo, semi zoccolatura, trasparente involucro/trasparente pozzetti (Bio-Rad, N. di cat. HSL9901 oppure HSL9601)
- Microseal® 'B' PCR Plate Sealing Film (pellicola sigillante per piastra PCR), adesiva, ottica (Bio-Rad, N. di cat. MSB1001)

## 8 Principi della tecnologia

La PCR in tempo reale (qPCR) può essere utilizzata per amplificare e rilevare specifici acidi nucleici target da agenti patogeni. **PlexPCR®** è una tecnologia qPCR che utilizza enzimi **PlexZyme®** per rilevare e segnalare il prodotto amplificato attraverso la generazione di un segnale fluorescente (**Figura 1**).

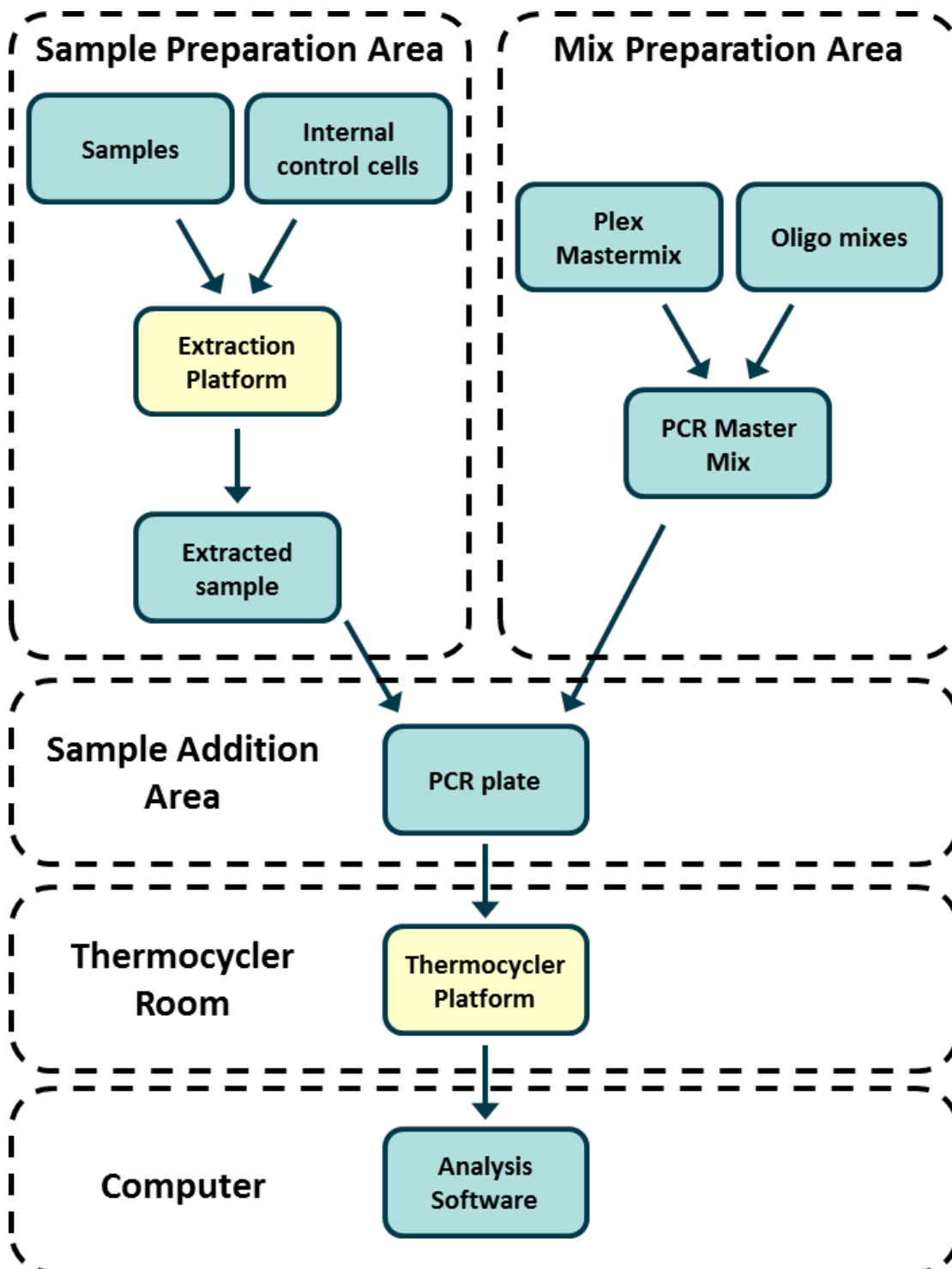
Gli enzimi **PlexZyme®** sono complessi di DNA catalitico composti da due oligonucleotidi di DNA denominati "Enzimi parziali". Ciascun enzima parziale è dotato di una regione target-specifica, un nucleo catalitico e una regione legata alla sonda universale. Quando è presente il prodotto target, i due enzimi parziali si legano in modo adiacente per formare il **PlexZyme®** attivo che è dotato di attività catalitica per scindere una sonda marcata. Il clivaggio separa i coloranti fluoroforo e quencher, producendo un segnale fluorescente che può essere monitorato in tempo reale. Gli enzimi **PlexZyme®** sono dotati di specificità aggiuntiva rispetto alle tecnologie di rilevamento alternative, poiché due enzimi parziali devono legarsi per poter essere rilevati. Gli enzimi **PlexZyme®** sono anche enzimi con turnover multipli. Sonde multiple possono essere scisse durante ciascun ciclo PCR dando luogo a un segnale forte e sensibile. I dosaggi **PlexZyme®** sono altamente sensibili e specifici, e sono ideali per il rilevamento multiplexato di agenti patogeni.

**Figura 1. Rappresentazione schematica del rilevamento e della segnalazione universale di *PlexZyme®***





## 9 La procedura in generale



## 10 La procedura nel dettaglio

**Nota:** i reagenti forniti sono indicati in corsivo seguiti dal colore del tappo della provetta tra parentesi.

### 10.1 Raccolta, trasporto e conservazione del campione

La raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni svolti in modo inadeguato o inadatto possono produrre falsi positivi. Si raccomanda di fornire un'adeguata formazione sulla raccolta, al fine di garantire la qualità e la stabilità dei campioni.

Seguire le istruzioni del dispositivo di raccolta fornite dal produttore, in modo da eseguire la procedura correttamente.

Prima di eseguire qualsiasi tipo di raccolta, assicurarsi che il personale addestrato abbia una corretta comprensione del dispositivo e della relativa metodologia. Si raccomanda di controllare la descrizione del test in relazione a quanto segue: tipo di campione, volume minimo, procedura/e, materiali di raccolta necessari, preparazione del paziente e istruzioni per eseguire una corretta gestione e conservazione.

I tamponi nasofaringei vanno raccolti e trasportati seguendo le istruzioni del kit di raccolta. Consigliamo di testare immediatamente i campioni o di conservarli al loro arrivo tra -25 °C e -15 °C. Durante l'uso è possibile congelarli e scongelarli, al massimo 3 volte.

### 10.2 Trattamento dei campioni

Il kit **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 è stato omologato sui seguenti strumenti di estrazione nella **Tabella 2**.

Consultare la **Sezione 10.3** per le istruzioni sull'uso di Internal Control (controllo interno).

Consultare la **Sezione 15** per le istruzioni sull'uso del kit REDx<sup>™</sup> FLOQ SARS-CoV-2 Swab Positive Control.

Tabella 2. Protocolli di estrazione validati				
Strumento	Kit di estrazione	Volume del campione	Protocollo	Volume di eluizione
MagNA Pure 96 <sup>a,b</sup>	MagNA Pure 96 DNA e Viral NA Small Volume Kit (kit per piccoli volumi)	200 µL	Pathogen Universal 200	50 µL
MGISP-960 <sup>a,b</sup>	Kit di estrazione dell'acido nucleico	180 µL	MGISP-960 Flusso di lavoro standard per l'estrazione automatizzata	30 µL
KingFisher Flex <sup>a,b</sup>	MagMAX Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit (Kit di isolamento acido nucleico patogeno/virale)	200 µL	MVP_Flex_200uL	50 µL
PurePrep 96 <sup>a,b</sup>	PurePrep Pathogen kit (Kit patogeni)	200 µL	PP v.3	50 µL

<sup>a</sup> Fare riferimento alla sezione 10.3.1 per maggiori indicazioni sull'uso del controllo interno su MagNA Pure 96, KingFisher Flex e PurePrep 96

<sup>b</sup> I campioni dovranno essere aggiunti al Mastermix entro 30 minuti dall'estrazione.

## 10.2.1 Volumi dei reagenti per MGISP-960

Tabella 3. MGISP-960 volumi di reagente per campione		
Reagente	Volume per campione	Piastra
Tampone MLB	160 µL	Piastra a pozzetti profondi con fondo a U (Miscela preparata per tampone)
Etanolo assoluto*	200 µL	Piastra a pozzetti profondi con fondo a U (Miscela preparata per tampone)
Microsfere magnetiche M	15 µL	Piastra a pozzetti profondi con fondo a U (Miscela preparata per tampone)
Tampone potenziatore	1 µL	Piastra a pozzetti profondi con fondo a U (Miscela preparata per tampone)
Acqua senza RNase	15 µL	Piastra a pozzetti profondi con fondo a U (Miscela preparata per tampone)
Acqua senza RNase	50 µL	Piastra a pozzetti profondi con fondo a U
Tampone MW1	170 µL	Piastra a pozzetti profondi con fondo a U
Tampone MW2	340 µL	Piastra a pozzetti profondi con fondo a U

\* Non fornito

## 10.2.2 Volumi dei reagenti per KingFisher Flex e PurePrep

Tabella 4. Volumi dei reagenti KingFisher		
Reagente	Volume per campione	Piastra
Soluzione legante MagMax	265µL	KingFisher 96 deep-well plate (piastra a pozzetti profondi) (piastra campione)
Perle leganti acido nucleico MagMax Total	10µL	KingFisher 96 deep-well plate (piastra a pozzetti profondi) (piastra campione)
Proteinasi K MagMax	5µL	KingFisher 96 deep-well plate (piastra a pozzetti profondi) (piastra campione)
Tampone di lavaggio MagMax	500µL	KingFisher 96 deep-well plate (piastra a pozzetto profondo)
Lavaggio 2* (80% Etanolo)	500µL	KingFisher 96 deep-well plate (piastra a pozzetto profondo)
Lavaggio 3* (80% Etanolo)	250µL	KingFisher 96 deep-well plate (piastra a pozzetto profondo)
Soluzione di eluizione MagMax	50uL	KingFisher 96 microplate 200µL (micropiastra, 200µL)

\* Non forniti

Tabella 5. Volumi reagente PurePrep 96

Reagente	Volume per campione	Piastra
Tampone lisi Molgen PA1	200µL	PurePrep Deep well plate 2mL (piastra a pozzetto profondo, 2mL) (piastra campione)
Soluzione Molgen Poly-A-RNA 2.5mg/mL	1µL	PurePrep Deep well plate 2mL (piastra a pozzetto profondo, 2mL) (piastra campione)
Soluzione Molgen Proteinasi K 20mg/mL	10µL	PurePrep Deep well plate 2mL (piastra a pozzetto profondo, 2mL) (piastra campione)
Molgen MagSi-PA VII (Perle magnetiche)	20µL	PurePrep Deep well plate 2mL (piastra a pozzetto profondo, 2mL) (piastra campione)
Tampone legante Molgen U1	400µL	PurePrep Deep well plate 2mL (piastra a pozzetto profondo, 2mL) (piastra campione)
Tampone lavaggio Molgen I	800µL	PurePrep Deep well plate 2mL (piastra a pozzetto profondo, 2mL)
Tampone lavaggio Molgen I	800µL	PurePrep Deep well plate 2mL (piastra a pozzetto profondo, 2mL)
Tampone lavaggio Molgen II	800µL	PurePrep Deep well plate 2mL (piastra a pozzetto profondo, 2mL)
Tampone di eluizione Molgen	50µL	PurePrep 96 Elution plate 200uL (Piastra di eluizione, 200uL)

### 10.3 Internal Control (controllo interno) (IC)

Il kit include un controllo interno per il monitoraggio dell'efficienza di estrazione e l'inibizione di qPCR. Il dosaggio di controllo interno è fornito come miscela di dosaggio e amplificherà l'*RNA di controllo interno* (VIOLA). L'*Internal Control RNA* (RNA di controllo interno) viene diluito e trattato nel modo sotto indicato per strumenti di estrazione specifici. Il template del controllo interno viene pertanto coestratto con il campione e coamplificato nella reazione.

#### 10.3.1 Controllo interno su MagNA Pure 96, KingFisher Flex e PurePrep 96

Diluire l'*Internal Control RNA* (RNA di controllo interno) (VIOLA) 1 a 100 in 1x PBS (Tabella 6). Regolare il volume secondo la necessità utilizzando lo stesso fattore di diluizione (consultare il manuale del kit di estrazione per il volume minimo per il numero di campioni richiesto). Le l'RNA di controllo interno viene caricato nella Internal Control Tube (provetta di controllo interno) sul MagNA Pure 96 e a ciascun campione vengono aggiunti automaticamente 20 µL (impostazione predefinita). Per le estrazioni su PurePrep 96 e KingFisher, aggiungere manualmente 20uL dell'RNA di controllo interno diluito alla piastra campione.

**Nota:** NON conservare l'Internal Control RNA (RNA di controllo interno) diluito

Tabella 6. Diluizione dell'Internal Control RNA (RNA di controllo interno) per MagNA Pure 96 (diluizione 1 a 100)

Internal Control RNA (RNA di controllo interno, VIOLA) (µL)	1x PBS (µL)	Volume totale (µL)	Volume aggiunto al campione (µL)
36	3564	3600	20

### 10.4 Preparazione del PCR in tempo reale

**Nota:** prima dell'uso dei reagenti, scongelare completamente e mescolare accuratamente e brevemente con il vortex.

Il kit *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2 viene testato a un volume finale pari a 10 µL su piastre a 96 pozzetti o 384 pozzetti sullo strumento LC480 II; a un volume finale pari a 10 µL su piastre a 96 pozzetti sul CFX96 Dx e sul CFX96 Touch. Il kit *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2 ha un volume morto appropriato per l'uso con i sistemi di gestione dei liquidi ed è stato validato con SpeedX *PlexPrep*<sup>™</sup>. Contattare [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au) per ricevere assistenza con i protocolli.

Per la descrizione del contenuto del kit, fare riferimento alla **Tabella 1**.

#### 10.4.1 Preparazione della miscela master

- Per un volume di reazione di 10 µL, sono necessari 7,5 µL di miscela master e 2,5 µL di estratto. Preparare la miscela master come descritto nella **Tabella 7**. Pipettare la miscela master nella piastra PCR e poi aggiungere il campione estratto alla reazione.
- È bene eseguire i controlli positivi e negativi su ciascuna piastra.
- Sigillare, quindi centrifugare la piastra e trasferire nel termociclatore.

Tabella 7. Miscela master		
Reagente	Concentrazione	Volume per reazione da 10 µL (µL)
Nuclease Free Water (acqua senza nucleasi) ( <b>BLU</b> )	N/D	1,7
<b>Plex</b> Mastermix (miscela master, <b>VERDE</b> )	2x	5,0
Miscela SARS-CoV-2 ( <b>MARRONE</b> )	20x	0,5
RTase ( <b>NEUTRA</b> )	100x	0,1
Inibitore di RNase ( <b>NERO</b> )	50x	0,2
Volume totale (µL)		7,5
Aggiungere 2,5 µL di campione per un volume finale di 10 µL		

## 11 Programmazione e analisi

I dettagli per la programmazione e l'analisi sono descritti nelle **Sezioni 19 - 21**.

Il kit **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 utilizza 3 canali per il rilevamento di SARS-CoV-2 attraverso i geni di Open Reading Frame (ORF1ab) (cornice di lettura aperta) e RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (RNA polimerasi RNA-dipendenti) e l'Internal Control (controllo interno) (**Tabella 8**).

Tabella 8. Canali per i target <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2			
Strumento qPCR	ORF1ab	Gene RdRp	Internal Control (controllo interno)
LC480 II	465-510	533-580	533-610
CFX96 Dx e CFX96 Touch	FAM	HEX	Texas Red

## 12 Interpretazione dei risultati

I dati si possono interpretare con il software integrato LC480 II, il software integrato CFX96<sup>™</sup> Dx e CFX96<sup>™</sup> Touch, o il software di analisi **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2. Il software di analisi **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 automatizza l'interpretazione dei dati dei risultati di amplificazione e semplifica il flusso di lavoro. Le istruzioni sulla modalità di utilizzo del software di analisi sono riportate nella **Sezione 21**.

Vedere la **Tabella 9** per il software di analisi idoneo per ciascuno strumento PCR in tempo reale. Il software di analisi è disponibile su richiesta. Per ulteriori informazioni contattare [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Tabella 9. Software di analisi <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2		
N. di cat.	Software di analisi*	Strumento PCR in tempo reale
99021	<b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (LC480)	LC480 II
99022	<b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (CFX)	CFX96 Dx e CFX96 Touch

\* Per assicurarsi di usare la versione più recente del software di analisi, fare riferimento al sito <https://plexpcr.com/products/respiratory-infections/plexpcr-sars-cov-2/>.

## 13 Limitazioni

- Il dosaggio **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 deve essere eseguito unicamente da personale addestrato alla procedura e in conformità alle presenti istruzioni per l'uso.
- L'affidabilità dei risultati dipende dall'adeguatezza delle procedure di raccolta, trasporto, conservazione ed elaborazione dei campioni. La mancata osservanza delle procedure corrette in uno qualsiasi di questi passaggi può portare a risultati errati.
- Il dosaggio **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 è un dosaggio qualitativo e NON fornisce valori quantitativi o informazioni sul carico di organismi.
- I risultati del test devono essere correlati ad anamnesi, dati epidemiologici, dati di laboratorio e altre informazioni in possesso del medico.
- La prevalenza dei target virali incide sui valori predittivi positivi e negativi del dosaggio.
- L'esito negativo non esclude la possibilità di infezione in seguito a raccolta errata dei campioni, errore tecnico, presenza di inibitori, scambio di campioni o basso numero di microrganismi nel campione clinico.
- Falsi esiti positivi possono verificarsi a causa della contaminazione incrociata da parte di organismi target, dei loro acidi nucleici o del prodotto amplificato.

Campioni clinici con valore Cq < 3 potrebbero non fornire un risultato valido. Questi campioni verranno contrassegnati dal software di analisi **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 con il seguente messaggio "Error: Abnormal change in fluorescence level" (Errore: cambiamento anomalo nel livello di fluorescenza). Questo indica un campione ad alta carica di SARS-CoV-2 oltre il limite di rilevamento, e tali campioni vanno diluiti e ripetuti.

Questi campioni verranno contrassegnati anche durante l'analisi con il software di analisi LC480 II con il seguente messaggio: "Some samples exceed the noiseband value in the background calculation region" (Alcuni campioni superano il valore di banda di rumore nella regione di calcolo di fondo). Questo indica un campione ad alta carica di SARS-CoV-2 oltre il limite di rilevamento, e tali campioni vanno diluiti e ripetuti.

Alcuni campioni clinici possono apparire come non validi se hanno un'alta carica virale. Ciò non viene contrassegnato dal software integrato CFX, quindi l'utente deve controllare tutte le curve prima di procedere. Quando un campione ad alta carica di SARS-CoV-2 supera il limite di rilevamento, i campioni vanno diluiti e ripetuti.

## 14 Controllo della qualità

Il kit **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 include un controllo interno per monitorare l'efficienza di estrazione e l'inibizione di qPCR (**Sezione 10.3**).

Il REDx<sup>™</sup> FLOQ SARS-CoV-2 Swab Positive Control (Microbix, N. di cat. RED-S-19-01) è raccomandato come materiale di controllo positivo per l'amplificazione degli acidi nucleici. Fare riferimento alla **Sezione 15** per le istruzioni per l'uso del controllo positivo REDx<sup>™</sup> FLOQ SARS-CoV-2 Swab Positive Control. Si consiglia di utilizzare un campione negativo noto come controllo negativo.

## 15 Istruzioni per REDx<sup>™</sup> FLOQ SARS-CoV-2 Positive Control

Il REDx<sup>™</sup> FLOQ SARS-CoV-2 Swab Positive Control (Microbix, N. di cat. RED-S-19-01) contiene materiali di controllo positivo per SARS-CoV-2.

Il REDx<sup>™</sup> SARS-CoV-2 Positive Control deve essere conservato a 2-8°C fino al momento dell'utilizzo. Una volta aperto, il REDx<sup>™</sup> SARS-CoV-2 Positive Control non deve essere riutilizzato.

Per ulteriori informazioni su conservazione e limitazioni, consultare il foglietto illustrativo di REDx<sup>™</sup> SARS-CoV-2 Positive Control.

### 15.1 Istruzioni per l'uso

Diluire il REDx<sup>™</sup> SARS-CoV-2 Positive Control in 3mL di Universal Transport Media (UTM, Mezzi di trasporto universale) o Viral Transport Media (VTM, Mezzi di trasporto virale).

Preparare le reazioni qPCR come descritto nella **Sezione 10.4** utilizzando il controllo positivo come campione.

## 16 Caratteristiche prestazionali

### 16.1 Prestazioni cliniche

#### 16.1.1 Studio clinico 1

Presso il Laboratorio Queensland Paediatric Infectious Diseases, South Brisbane, nello stato del Queensland in Australia, è stato condotto uno studio clinico retrospettivo su campioni di tamponi rinofaringei archiviati (n=165), precedentemente testati con il dosaggio di Abbott m2000 SARS-CoV-2. I campioni sono stati estratti sulla piattaforma MagNA Pure 96 (Roche) utilizzando il protocollo Pathogen Universal 200. Sono stati estratti 200 µL di campione, eluiti in 50 µL. I campioni sono stati esaminati con il kit **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 in reazioni da 10 µL su LightCycler 480 II.

Per il dosaggio **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2, è stato utilizzato, come metodo di riferimento, un approccio basato su risultati di riferimento compositi. Sono stati analizzati i risultati di due dosaggi PCR SARS-CoV-2 convalidati (dosaggio di Abbott m2000 SARS-CoV-2 e kit per rilevamento SARS-CoV-2 con test RT-PCR a fluorescenza in tempo reale (BGI)) e i campioni che hanno generato risultati concordanti nei due test sono stati considerati come SARS-CoV-2 positivi o negativi. Lo stato di SARS-CoV-2 dei campioni che hanno generato risultati discordanti tra i due dosaggi confrontati (n=22) non ha potuto essere stabilito in modo definitivo e questi campioni sono stati esclusi dall'analisi finale. La concordanza percentuale positiva e negativa tra **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 e riferimento composito è illustrata nella **Tabella 10**.

Tabella 10. Valutazione clinica del kit <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2			
		Risultati riferimento composito (n=142)	
		SARS-CoV-2	
		Positivo	Negativo
<b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 <sup>1</sup>	Positivo	83	2
	Negativo	6	51
Positive Percent Agreement (PPA, Concordanza percentuale positiva)		93,26% (95% CI 85,90 – 97,49%)	
Negative Percent Agreement (NPA, Concordanza percentuale negativa)		96,23% (95% CI 87,02 – 99,54%)	
Percentuale complessiva di concordanza (ORA)		94,37% (95% CI 89,20 – 97,54%)	

<sup>1</sup>Un campione è risultato ripetutamente non valido nel test **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 e non ha potuto essere valutato.

### 16.2 Prestazioni analitiche

#### 16.2.1 Ripetibilità e riproducibilità

##### 16.2.1.1 LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II

È stato condotto uno studio di riproducibilità tra lotti, operatori, giorni e strumenti LightCycler<sup>®</sup> 480 per il dosaggio **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2, utilizzando gruppi preparati in tamponi rinofaringei clinici negativi aggregati, raccolti in Viral Transport Media (VTM, Mezzi di trasporto virali). Gli elementi del gruppo erano costituiti da materiale di riferimento di ceppo SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 (ZeptoMetrix, NATrol<sup>™</sup> SARS-CoV-2 Stock, N. di cat. NATSARS(COV2)-ST), combinato con tamponi rinofaringei negativi raccolti in VTM a 5x LOD, 50x LOD e 100x LOD. Ciascun gruppo conteneva sei repliche di questi membri del gruppo.

I test sono stati eseguiti con due diversi lotti della miscela **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2. I gruppi sono stati testati due volte al giorno per tre giorni non consecutivi da due operatori sul posto, per un totale di 36 osservazioni per membro del gruppo (6 repliche x 2 esecuzioni x 3 giorni x 1 sito = 36 osservazioni).

Sono state valutate la ripetibilità tra lotti, tra giorni, tra strumenti e tra operatori e la riproducibilità totale. È stata calcolata la concordanza percentuale per ciascun membro del gruppo sulla base del risultato atteso nel componente di rilevamento SARS-CoV-2 del dosaggio. È stato calcolato il coefficiente percentuale di variazione (%CV) dal valore del ciclo di quantificazione (C<sub>q</sub>) riportato per il rilevamento SARS-CoV-2. I risultati dei test di ripetibilità e riproducibilità sono indicati nella **Tabella 11**.

**Tabella 11. Ripetibilità/Riproducibilità del componente di rilevamento del SARS-CoV-2 del dosaggio PlexPCR® SARS-CoV-2 sullo strumento LightCycler® 480 Instrument II**

SARS-CoV-2 – ORF1ab										
			Durante l'esecuzione		Tra un'esecuzione e l'altra		Tra un lotto e l'altro		Totale	
Membro del gruppo	N	C <sub>q</sub> medio	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
100x LOD	36	18,6	0,52	2,8	0,31	1,7	0,51	2,7	0,5	2,7
50x LOD	36	19,4	0,53	2,7	0,28	1,5	0,58	3	0,52	2,7
5x LOD	36	22,6	0,91	4	0,53	2,3	0,84	3,7	0,98	4,3
SARS-CoV-2 – RdRp										
			Durante l'esecuzione		Tra un'esecuzione e l'altra		Tra un lotto e l'altro		Totale	
ID campione	N	C <sub>q</sub> medio	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
100x LOD	36	19,1	0,4	2,1	0,24	1,3	0,31	1,6	0,36	1,9
50x LOD	36	19,9	0,41	2,1	0,19	1	0,36	1,8	0,36	1,8
5x LOD	36	23,2	0,51	2,2	0,31	1,3	0,39	1,7	0,57	2,5
Internal Control (controllo interno)										
			Durante l'esecuzione		Tra un'esecuzione e l'altra		Tra un lotto e l'altro		Totale	
ID campione	N	C <sub>q</sub> medio	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
100x LOD	36	19,3	0,36	1,9	0,45	2,3	0,3	1,6	0,51	2,6
50x LOD	36	19,5	0,42	2,2	0,41	2,1	0,4	1,8	0,52	2,7
5x LOD	36	19,5	0,67	3,4	0,54	2,7	0,5	2,2	0,69	3,4
Negativo	36	20,4	0,35	1,7	0,93	4,6	0,2	0,8	0,89	4,4

#### 16.2.1.2 Per i sistemi di rilevamento CFX96™ Dx Real-Time PCR e CFX96 Touch™ Real-Time PCR

È stato condotto uno studio di riproducibilità e ripetibilità tra lotti, operatori, giorni e cicli sui sistemi di rilevamento CFX96™ Touch Real-Time PCR per il dosaggio PlexPCR® SARS-CoV-2, utilizzando gruppi preparati in tamponi rinofaringei clinici negativi aggregati, raccolti in Viral Transport Media (VTM, Mezzi di trasporto virali). Gli elementi del gruppo erano costituiti da materiale di riferimento di ceppo SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 (ZepetoMetrix, NATrol™ SARS-CoV-2 Stock, N. di cat. NATSARS(COV2)-ST), combinato con tamponi rinofaringei negativi raccolti in VTM a 5x LOD, 50x LOD e 100x LOD. Ciascun gruppo conteneva sei repliche di questi membri del gruppo.

I test sono stati eseguiti con due diversi lotti della miscela PlexPCR® SARS-CoV-2. I gruppi sono stati testati tre volte al giorno per tre giorni non consecutivi da due operatori sul posto, per un totale di 108 osservazioni per membro del gruppo.

Durante l'esecuzione, fra un'esecuzione e l'altra, fra un lotto e l'altro, fra un operatore e l'altro, fra uno strumento e l'altro è stata valutata la riproducibilità totale. È stata calcolata la concordanza percentuale per ciascun membro del gruppo sulla base del risultato atteso nel componente di rilevamento SARS-CoV-2 del dosaggio. È stato calcolato il coefficiente percentuale di variazione (%CV) dal valore del ciclo di quantificazione (C<sub>q</sub>) riportato per il rilevamento SARS-CoV-2. I risultati dei test di ripetibilità e riproducibilità sono indicati nella **Tabella 12**.



**Tabella 12. Ripetibilità/Riproducibilità del componente di rilevamento di SARS-CoV-2 del dosaggio *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2 sul sistema di rilevamento CFX96 Touch<sup>™</sup> Real-Time PCR**

SARS-CoV-2 – ORF1ab														
			Durante l'esecuzione		Tra un'esecuzione e l'altra		Tra un lotto e l'altro		Tra un operatore e l'altro		Tra uno strumento e l'altro		Totale	
Membro del gruppo	N	C <sub>q</sub> medio	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
100x LOD	108	19,18	0,27	1,5	0,41	2,2	0,65	3,4	0,85	4,4	0,17	0,9	1,14	5,9
50x LOD	108	20,20	0,05	0,2	0,42	2,1	0,67	3,3	0,82	4,0	0,13	0,6	1,18	5,9
5x LOD	108	22,78	0,37	1,7	0,45	2,0	0,41	1,8	0,72	3,2	0,28	1,2	1,19	5,2
SARS-CoV-2 – RdRp														
			Durante l'esecuzione		Tra un'esecuzione e l'altra		Tra un lotto e l'altro		Tra un operatore e l'altro		Tra uno strumento e l'altro		Totale	
ID campione	N	C <sub>q</sub> medio	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
100x LOD	108	19,80	0,12	0,6	0,35	1,8	0,63	3,2	0,85	4,3	0,16	0,8	1,15	5,8
50x LOD	108	20,73	0,22	1,1	0,22	1,1	0,67	3,2	0,85	4,1	0,18	0,9	1,23	5,9
5x LOD	108	23,18	0,39	1,7	0,24	1,0	0,53	2,3	0,61	2,6	0,07	0,3	1,09	4,7
Internal Control (controllo interno)														
			Durante l'esecuzione		Tra un'esecuzione e l'altra		Tra un lotto e l'altro		Tra un operatore e l'altro		Tra uno strumento e l'altro		Totale	
ID campione	N	C <sub>q</sub> medio	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV	DS	%CV
100x LOD	108	20,34	0,24	1,2	0,51	2,5	0,28	1,4	0,23	1,1	0,06	0,3	0,79	3,9
50x LOD	108	20,75	0,29	1,4	0,75	3,6	0,20	0,9	0,18	0,9	0,01	0,0	0,74	3,6
5x LOD	108	20,98	0,26	1,2	0,76	3,6	0,11	0,5	0,12	0,6	0,05	0,2	0,69	3,3
Negativo	108	21,32	0,22	1,0	0,80	3,7	0,10	0,4	0,14	0,6	0,04	0,2	1,01	4,8

## 16.2.2 Sensibilità analitica

### 16.2.2.1 LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II

Il ceppo SARS-CoV-2 USA-WA1/2020 (ZeptoMetrix, NATrol<sup>™</sup> SARS-CoV-2 Stock, N. di cat. NATSARS(COV2)-ST) è stato utilizzato come ceppo rappresentativo per valutare il limit-of-detection (LoD, limite di rilevamento) del dosaggio *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2 sullo strumento LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II I preparati quantificati del materiale di riferimento positivo di SARS-CoV-2 sono stati diluiti in serie in tamponi rinofaringei negativi in VTm. Sono stati testati 7 livelli di concentrazione totali su più giorni utilizzando 2 lotti indipendenti di reagenti del dosaggio *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2, per un totale di 40 repliche per concentrazione. Il LoD è stato determinato utilizzando l'analisi di regressione logistica (modello Probit) come concentrazione più bassa (espressa in copie/mL) che genera un minimo di  $\geq 95\%$  repliche positive.

Il valore LoD (determinato dai dati indicati nella **Tabella 13**) è stato 764 copie/mL (95% IC: 565,69 – 1193,50 copie/mL).

Tabella 13. LoD del dosaggio *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2<sup>‡</sup>

Materiale di riferimento positivo	Ceppo	Conc. SARS-CoV-2 (genomi per mL)	Risultato <i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2		
			Positivo	Totale	% Positivo
SARS-CoV-2	USA-WA1/2020	2500	40	40	100,00
		1875	40	40	100,00
		1250	40	40	100,00
		625	36	40	90,00
		313	27	38*	71,05
		156	22	40	55,00
		78	10	40	25,00

<sup>‡</sup> Una sensibilità analitica equivalente è stata ottenuta utilizzando i sistemi CFX96

\* Per la concentrazione 312,5 copie/mL, 2 repliche sono state segnalate non valide dal software di analisi per un errore CI e quindi sono rimaste escluse dall'analisi.

#### 16.2.2.2 Flusso di lavoro col MGISP-960 e LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II

È stato condotto uno studio al laboratorio di malattie infettive pediatriche del Queensland (Queensland Paediatric Infectious Diseases Laboratory (QPID)), nello stato del Queensland in Australia, per dimostrare che le prestazioni analitiche del dosaggio *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2 quando i campioni sono estratti usando lo strumento MGISP-960 (MGI) con il kit di estrazione dell'acido nucleico MGIEasy (PID: 1000020471; MGI) sono equivalenti alle prestazioni analitiche del dosaggio quando i campioni sono estratti usando lo strumento MagNa Pure 96 (MP96) (Roche) con il MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (PID: 06543588001; Roche). Il materiale di riferimento negativo consisteva in tamponi nasofaringei (NP) negativi aggregati in mezzi di trasporto virali (VTM), raccolti da individui negativi al SARS-CoV-2 (**Autorizzazione FDA per l'uso di emergenza Modello diagnostico molecolare per il COVID-19 per produttori commerciali**). Il materiale di riferimento positivo consisteva nel SARS-CoV-2 ceppo USA-WA1/2020 (ZeptoMetrix, NATrol<sup>™</sup> SARS-CoV-2 Stock, Numero di catalogo NATSARS(COV2)-ST) aggiunto a una matrice negativa a 2x LoD.

Per ciascun kit MGIEasy di estrazione dell'acido nucleico testato, è stata calcolata la percentuale di campioni identificati correttamente. I risultati sono sintetizzati nella **Tabella 14**. Il valore medio di Cq, la deviazione standard, e il coefficiente di variazione (%) di ciascun target (ORF1ab, RdRp, e IC) per ciascun kit di estrazione sono esposti in dettaglio nella **Tabella 15**. L'IC era valido per tutti i campioni. Il tasso di completezza per ciascun kit MGIEasy di estrazione dell'acido nucleico era  $\geq 95\%$ , il che conferma il LoD del dosaggio *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2 quando usato con campioni estratti usando lo strumento MGISP-960 (MGI).

Tabella 14. Tasso di completezza (%) Campioni estratti usando il MGISP-960

Campioni	Numero totale di replicati	Kit di estrazione 1		Kit di estrazione 2	
		Numero di replicati identificati correttamente	Tasso di completezza (%)	Numero di replicati identificati correttamente	Tasso di completezza (%)
Campioni positivi di SARS-CoV-2 (2X LOD)	30	30	100	30	100
Campioni negativi di SARS-CoV-2	60	60	100	60	100

**Tabella 15. Tavola riassuntiva per valori di Cq medi, Deviazioni standard e %CV per tutti i target.**

	Lotto di estrazione 1								
	ORF1ab (465-510)			RdRp (533-580)			IC (533-610)		
Tipo di campione	Cq medio	DS	%CV	Cq medio	DS	%CV	Cq medio	DS	%CV
SARS positivi	21,06	0,34	1,61	22,19	0,39	1,76	21,38	0,32	1,51
SARS negativi	--	--	--	--	--	--	21,62	0,44	2,05
	Lotto di estrazione 2								
	ORF1ab (465-510)			RdRp (533-580)			IC (533-610)		
Tipo di campione	Cq medio	DS	%CV	Cq medio	DS	%CV	Cq medio	DS	%CV
SARS positivi	22,20	0,38	1,70	23,27	0,41	1,76	21,44	0,34	1,60
SARS negativi	--	--	--	--	--	--	21,87	0,23	1,03

### 16.2.3 Specificità analitica

È stato valutato un gruppo di 20 microrganismi inclusi gli organismi comunemente riscontrati nelle vie respiratorie dell'uomo, oltre a quelli strettamente correlati al SARS-CoV-2, per evidenza di reattività incrociata nel dosaggio **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2. Lo studio è stato condotto sullo strumento LightCycler<sup>®</sup> 480 Instrument II. Un elenco degli organismi testati è indicato nella **Tabella 16**. Salvo diversa indicazione, gli organismi sono stati testati a  $1 \times 10^6$  cfu/mL,  $1 \times 10^5$  pfu/mL o  $10^5$  TCID<sub>50</sub> per mL con tutte le diluizioni preparate nei tamponi rinofaringei negativi in VTm. I test sono stati eseguiti in triplicato in assenza di materiale di riferimento positivo (SARS-CoV-2). Non sono stati generati segnali positivi nel dosaggio **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 in nessuno di questi esperimenti, in assenza del target, e non è stato osservato alcun impatto sulla prestazione del dosaggio in presenza di alte concentrazioni di qualsiasi microrganismo testato.

Tabella 16. Microrganismi testati per reattività incrociata	
Organismi	Concentrazione testata
Coronavirus umano 229E	5,00E+06 genomi/mL
Coronavirus umano OC43	5,00E+06 genomi/mL
Adenovirus 1	1,00E+05 TCID <sub>50</sub> /mL
Virus parainfluenza 3	1,00E+05 TCID <sub>50</sub> /mL
Virus influenza A	1,00E+05 PFU/mL
Virus influenza B	1,00E+05 PFU/mL
Enterovirus A71	1,00E+05 TCID <sub>50</sub> /mL
Virus respiratorio sinciziale A	1,00E+05 PFU/mL
Rhinovirus 17	1,00E+05 TCID <sub>50</sub> /mL
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Haemophilus influenzae</i>	5,00E+06 genomi/mL
<i>Streptococcus pneumoniae (R6)</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Bordetella pertussis</i>	1,45E+05 genomi/mL
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1,00E+06 CFU/mL
Lavaggio nasale umano aggregato	puro
<i>Candida albicans</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,00E+06 CFU/mL
<i>Streptococcus salivarius</i>	2,51E+08 genomi/mL

### 16.2.4 Analisi *in silico*

È stata eseguita un'analisi *in silico* per valutare il potenziale per la reattività incrociata di primer e sonde incluse nel dosaggio **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 con coronavirus aggiuntivi umani e non umani. Il dosaggio **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 non ha presentato nessuna reattività incrociata prevista con sequenze non coronavirus o altre sequenze di coronavirus umano sulla base di una soglia di omologia >80%.

#### Specificità rispetto a sequenze non coronavirus

Le sequenze di oligonucleotidi del dosaggio ORF1ab e RdRp sono state utilizzate per la ricerca di sequenze non coronavirus che si abbinavano fortemente alla regione target per valutarne la potenziale reattività incrociata. Non è stata osservata reattività incrociata significativa con organismi non coronavirus con nessuno degli oligonucleotidi del dosaggio.

#### Specificità rispetto ad altri coronavirus

L'esecuzione BLAST con l'amplicone nel dosaggio RdRp ha determinato 3.027 sequenze di coronavirus. Quando analizzate con la workbench principale CLC 20.0.4, le uniche sequenze nelle quali gli oligonucleotidi del dosaggio sono in grado di legarsi sono i costrutti sintetici SARS-CoV-2 e due sequenze di coronavirus di pipistrello (MN996532.1 e KP876546.1). Quindi, non è stata osservata alcuna reattività incrociata con altre sequenze di coronavirus umano.

L'esecuzione BLAST con l'amplicone nel dosaggio ORF1ab ha determinato 272 sequenze di coronavirus. Quando analizzate con la workbench principale CLC 20.0.4, le uniche sequenze nelle quali gli oligonucleotidi del dosaggio sono in grado di legarsi sono i costrutti sintetici SARS-CoV-2. Quindi, non è stata osservata alcuna reattività incrociata con altre sequenze di coronavirus umano.

#### 16.2.5 Inclusività

Il 1° giugno sono state eseguite query sul database GISAID EpiCoV. Il set di dati risultante conteneva sequenze del genoma 24462 SARS-CoV-2 per il dosaggio ORF1ab e il dosaggio RdRp.

Per dimostrare l'inclusività del dosaggio **PlexPCR**® SARS-CoV-2, il GISAID EpiCoV è stato interrogato in modo indipendente con ciascuna delle sonde e ciascuno dei primer di oligonucleotidi inclusi nel dosaggio. Un valore inferiore allo 0,2% delle sequenze SARS-CoV-2 nel database (n >24.000 al 1° giugno 2020) presentava più di 1 abbinamento errato con uno dei primer e delle sonde inclusi nel dosaggio **PlexPCR**® SARS-CoV-2. Condurre un monitoraggio costante per garantire inclusività continuata per ceppi attuali e varianti segnalate. Per ulteriori informazioni contattare [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

#### 16.2.6 Sostanze potenzialmente interferenti

Sono state esaminate le sostanze endogene ed esogene che possono potenzialmente interferire e che potrebbero essere presenti nei campioni delle vie respiratorie, per valutare il loro impatto sulla prestazione del dosaggio **PlexPCR**® SARS-CoV-2. Lo studio è stato condotto sullo strumento LightCycler® 480 Instrument II. Tutte le sostanze sono state testate in triplicato utilizzando tamponi rinofaringei negativi in VTM, in presenza e assenza del target. Non sono stati evidenziati impatti negativi sulla prestazione del dosaggio quando i campioni prodotti artificialmente, contenenti potenziali interferenti alle concentrazioni indicate, sono stati testati. I risultati sono sintetizzati nella **Tabella 17**.

Tabella 17. Sostanze che possono interferire con i campioni delle vie respiratorie	
Potenziale interferente	Concentrazione del test
Fenilefrina	15% w/v
Beclometasone dipropionato	5% v/v
Zanamivir	3,3 mg/mL
Ribavirina	2% w/v
Mupirocina	6,6 mg/mL
Tobramicina, antibiotico aminoglicoside	4,4 µg/mL
Mentolo	6,9 mg/mL

## 17 Assistenza clienti e assistenza tecnica

Per domande sulla configurazione delle reazioni, sulle condizioni dei cicli e qualsiasi altro chiarimento, contattare l'assistenza tecnica.

Tel.: +61 2 9209 4169, E-mail: [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au)

## 18 Bibliografia

1. Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report – 1, 21 January 2020. World Health Organisation. Disponibile all'indirizzo: <https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200121-sitrep-1-2019-ncov.pdf>.
2. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. World Health Organisation. Disponibile all'indirizzo: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it).
3. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University. Disponibile all'indirizzo: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.

## 19 Appendice 1: LightCycler® 480 Instrument II

Le seguenti informazioni si riferiscono al software LightCycler 480 (versione 1.5).

Il kit **PlexPCR® SARS-CoV-2** contiene coloranti per LightCycler® 480 Instrument II. Il kit **PlexPCR® Colour Compensation** (N. di cat. 90001) deve essere eseguito e applicato per l'analisi su LC480 II (consultare la **Sezione 19.3**). Questo kit è disponibile su richiesta.

### 19.1 Programmazione del LightCycler® 480 Instrument II (LC480 II)

#### Detection Format (formato di rilevamento)

Creare un **Detection Format** (formato di rilevamento) personalizzato

##### Open Tools (apri strumenti) > Detection Formats (formati di rilevamento)

Creare un nuovo formato di rilevamento e denominarlo '**SpeedX Plex PCR**' (può essere creato durante la generazione del file SpeedX Colour Compensation [compensazione del colore]) (vedere la **Figura 2**).

Per **Filter Combination Selection** (selezione combinazioni di filtri) selezionare la seguente combinazione (eccitazione-emissione):

Tabella 18. Combinazioni di filtri*						
LC480 II	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	618-660

\*Queste combinazioni di filtri sono i nomi predefiniti dei canali

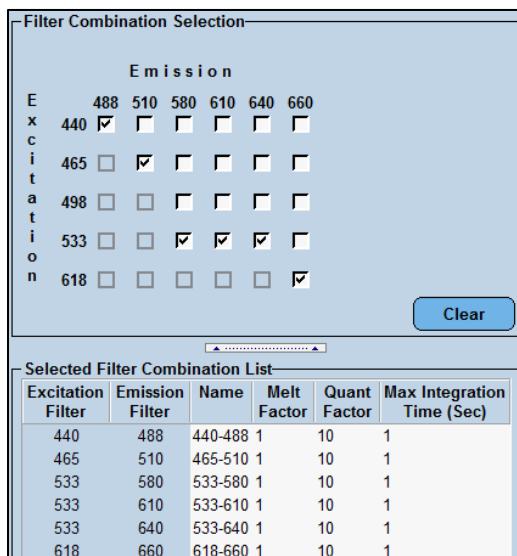
Impostare **Selected Filter Combination List** (elenco combinazioni filtri selezionati) per tutti i canali in questo modo:

Melt Factor (fattore di fusione): 1

Quant Factor (fattore di quantificazione): 10

Max Integration Time (tempo d'integrazione massimo) (sec): 1

**Figura 2. Formato di rilevamento personalizzato SpeedX**



Selected Filter Combination List						
Excitation Filter	Emission Filter	Name	Melt Factor	Quant Factor	Max Integration Time (Sec)	
440	488	440-488	1	10	1	
465	510	465-510	1	10	1	
533	580	533-580	1	10	1	
533	610	533-610	1	10	1	
533	640	533-640	1	10	1	
618	660	618-660	1	10	1	

### **Instrument Settings (impostazioni strumento)**

Creare un **Detection Format** (formato di rilevamento) personalizzato

**Open Tools (Apri strumenti) > Instruments (strumenti)**

Per **Instrument Settings** (impostazioni strumenti) > selezionare **Barcode Enabled** (codice a barra abilitato)

### **Experiment setup (configurazione dell'esperimento)**

Selezionare **New Experiment** (nuovo esperimento)

Nella scheda **Run Protocol** (esegui protocollo)

Per **Detection Format** (formato di rilevamento), selezionare il campo personalizzato '**SpeedX PlexPCR**' (**Figura 3**)

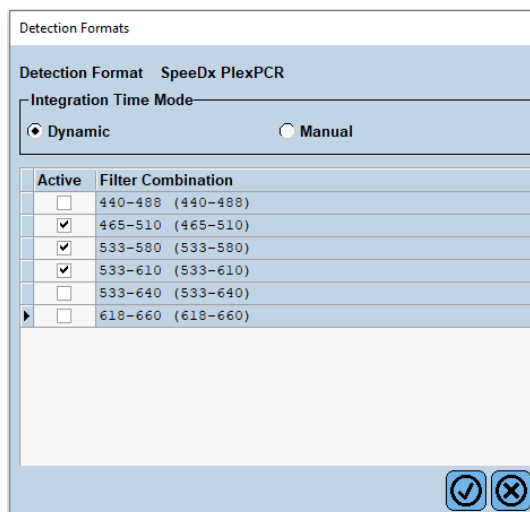
Selezionare **Customize** (personalizza) >

Selezionare **Integration Time Mode** (modalità tempo integrazione) > **Dynamic** (dinamica)

Selezionare le seguenti **Filter Combinations** (combinazioni di filtri) attive, mostrate nella **Tabella 19**

Tabella 19. Canali per i target <i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2			
Canale	465-510	533-580	533-610
SARS-CoV-2	ORF1ab	RdRp	Internal Control (controllo interno)

**Figura 3. Personalizzare formato di rilevamento**



Active	Filter Combination
<input type="checkbox"/>	440-488 (440-488)
<input checked="" type="checkbox"/>	465-510 (465-510)
<input checked="" type="checkbox"/>	533-580 (533-580)
<input checked="" type="checkbox"/>	533-610 (533-610)
<input type="checkbox"/>	533-640 (533-640)
<input type="checkbox"/>	618-660 (618-660)

Per consentire il rilevamento automatizzato del campione nel software di analisi, è necessario assegnare nominativi ai pozzetti sulla piastra (consultare la **Sezione 21.4**)

Aprire il modulo **Sample Editor** (editor campioni)

Selezionare il pozzetto

Modificare **Sample Name** (nome del campione) in modo che corrisponda al nominativo definito nel modulo dei dosaggi del software di analisi (consultare la **Sezione 21.4**)

I campioni sono etichettati come *Prefix\_Suffix* (come mostrato nella **Tabella 20** e nella **Figura 4**) per es. NEG\_CoV

**NOTA:** nei nominativi dei campioni si fa distinzione tra maiuscole e minuscole. Il nominativo deve coincidere esattamente con quelli assegnati nel file di esecuzione.

Tabella 20. Nominativi dei campioni per il software di analisi			
Tipo di campione	Prefisso_ (nel software di analisi)	Suffisso_ (nel software di analisi)	Nome del campione (nel software di analisi)
Campione regolare	Campione	_CoV	Sample_CoV
Controllo negativo	N	_CoV	N_CoV
Controllo positivo	Pa	_CoV	Pa_CoV

Figura 4. Editor campioni – Assegnazione di nominativi ai pozzetti

Pos	Filter combination	Color	Repl Of	Sample Name
A12	465-510 (465-510)	■		S_MG
A12	533-580 (533-580)	■		S_MG
A12	533-640 (533-640)	■		S_MG
B12	465-510 (465-510)	■		Pa_MG
B12	533-580 (533-580)	■		Pa_MG
B12	533-640 (533-640)	■		Pa_MG
C12	465-510 (465-510)	■		Pb_MG
C12	533-580 (533-580)	■		Pb_MG
C12	533-640 (533-640)	■		Pb_MG
G8	465-510 (465-510)	■		N_MG
G8	533-580 (533-580)	■		N_MG
G8	533-640 (533-640)	■		N_MG

Impostare **Reaction Volume** (volume di reazione) su > 10µL

Creare il seguente programma (mostrato con più dettagli in **Figura 5 - Figura 9**)

Tabella 21. Programma Thermocycling (termociclaggio)					
Program Name (nome del programma)	Cycles (cicli)	Target °C	Hold (mantenimento)	Ramp Rate (Velocità di rampa) (°C/s)*	Ramp Rate (velocità di rampa) (°C/s)§
Trascrittasi inversa	1	48°C	10 min	4,4	4,8
Polymerase activation (attivazione della polimerasi)	1	95°C	2 min	4,4	4,8
Touch down cycling (cicli di touchdown) <sup>§</sup> : Step down (riduzione) - 0,5°C/ciclo	10	95°C	5 s	4,4	4,8
		61°C – 56,5°C <sup>§</sup>	30 s	2,2	2,5
Quantification cycling (cicli di quantificazione) <sup>+</sup> : Acquisition/Detection (acquisizione/rilevamento)	40	95°C	5 s	4,4	4,8
		52°C <sup>+</sup>	50 s	2,2	2,5
Cooling (raffreddamento)	1	40°C	30 s	2,2	2,5

\* Velocità di rampa predefinita (piastra a 96 pozzetti)

§ Velocità di rampa predefinita (piastra a 384 pozzetti)

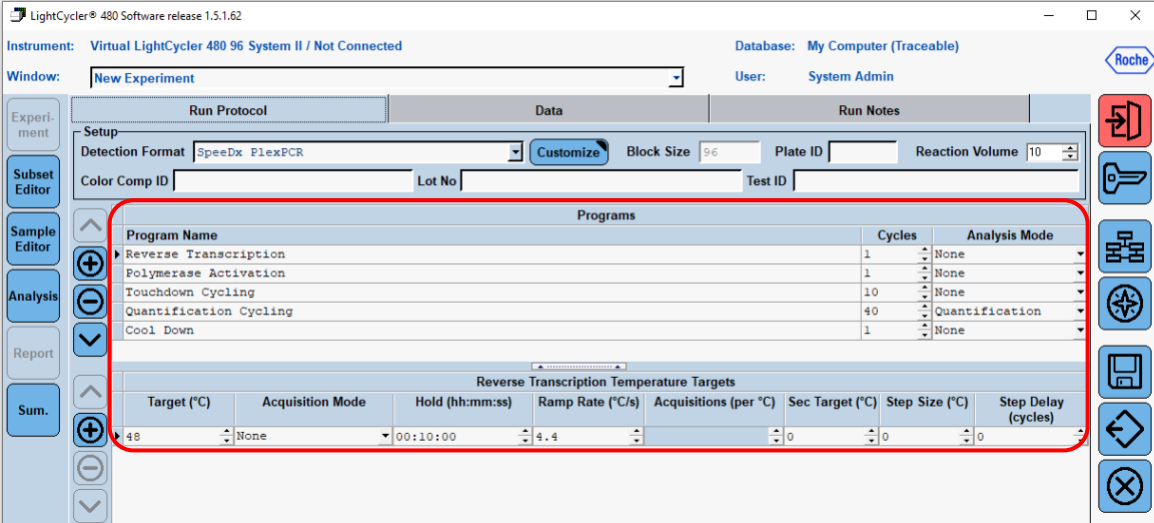
§ Step size (capacità step): -0,5°C/ciclo, Sec Target (target secondario): 56°C

+ Analysis mode (modalità di analisi): Quantification (quantificazione), Acquisition mode (modalità di acquisizione): Single (singola)



> Start Run (avvia esecuzione)

Figura 5. Programma di termociclaggio – Trascrittasi inversa



LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Traceable)

Window: New Experiment User: System Admin

Run Protocol Data Run Notes

Setup

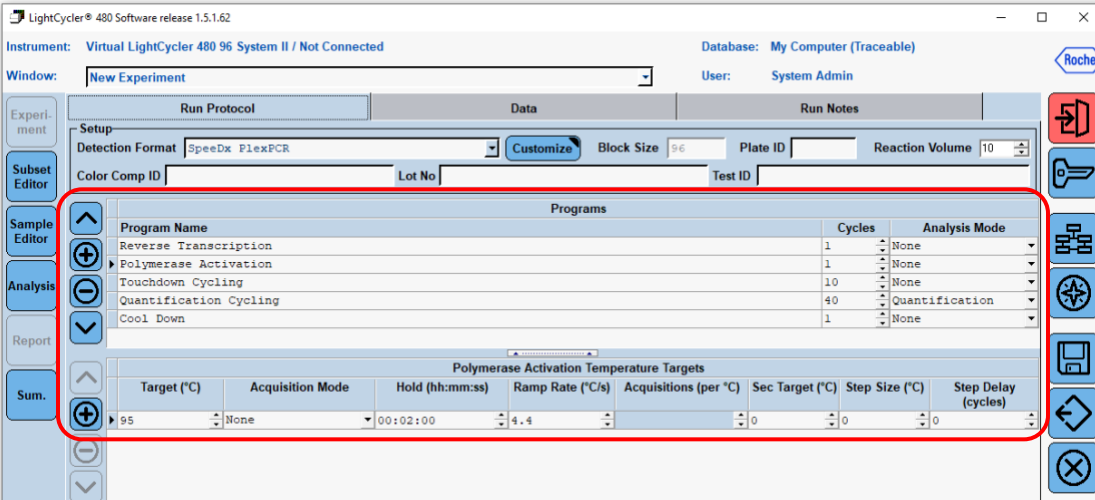
Detection Format: SpeedX FlexPCR Customize Block Size: 96 Plate ID: Reaction Volume: 10

Color Comp ID: Lot No: Test ID:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Reverse Transcription	1	None
Polymerase Activation	1	None
Touchdown Cycling	10	None
Quantification Cycling	40	Quantification
Cool Down	1	None

Reverse Transcription Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
48	None	00:10:00	4.4	0	0	0	0

Figura 6. Programma termociclaggio - Attivazione della polimerasi



LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Traceable)

Window: New Experiment User: System Admin

Run Protocol Data Run Notes

Setup

Detection Format: SpeedX FlexPCR Customize Block Size: 96 Plate ID: Reaction Volume: 10

Color Comp ID: Lot No: Test ID:

Program Name	Cycles	Analysis Mode
Reverse Transcription	1	None
Polymerase Activation	1	None
Touchdown Cycling	10	None
Quantification Cycling	40	Quantification
Cool Down	1	None

Polymerase Activation Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:02:00	4.4	0	0	0	0

Figura 7. Programma di termociclaggio – Cicli di Touchdown

LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Traceable)

Window: New Experiment User: System Admin

Roche

Run Protocol Data Run Notes

Setup

Detection Format SpeedX FlexPCR Customize Block Size 96 Plate ID Reaction Volume 10

Color Comp ID Lot No Test ID

Programs		
Program Name	Cycles	Analysis Mode
Reverse Transcription	1	None
Polymerase Activation	1	None
Touchdown Cycling	10	None
Quantification Cycling	40	Quantification
Cool Down	1	None

Touchdown Cycling Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
61	None	00:00:30	2.2	56	0.5	0	0

Figura 8. Programma di termociclaggio – Cicli di quantificazione

LightCycler® 480 Software release 1.5.1.62

Instrument: Virtual LightCycler 480 96 System II / Not Connected Database: My Computer (Traceable)

Window: New Experiment User: System Admin

Roche

Run Protocol Data Run Notes

Setup

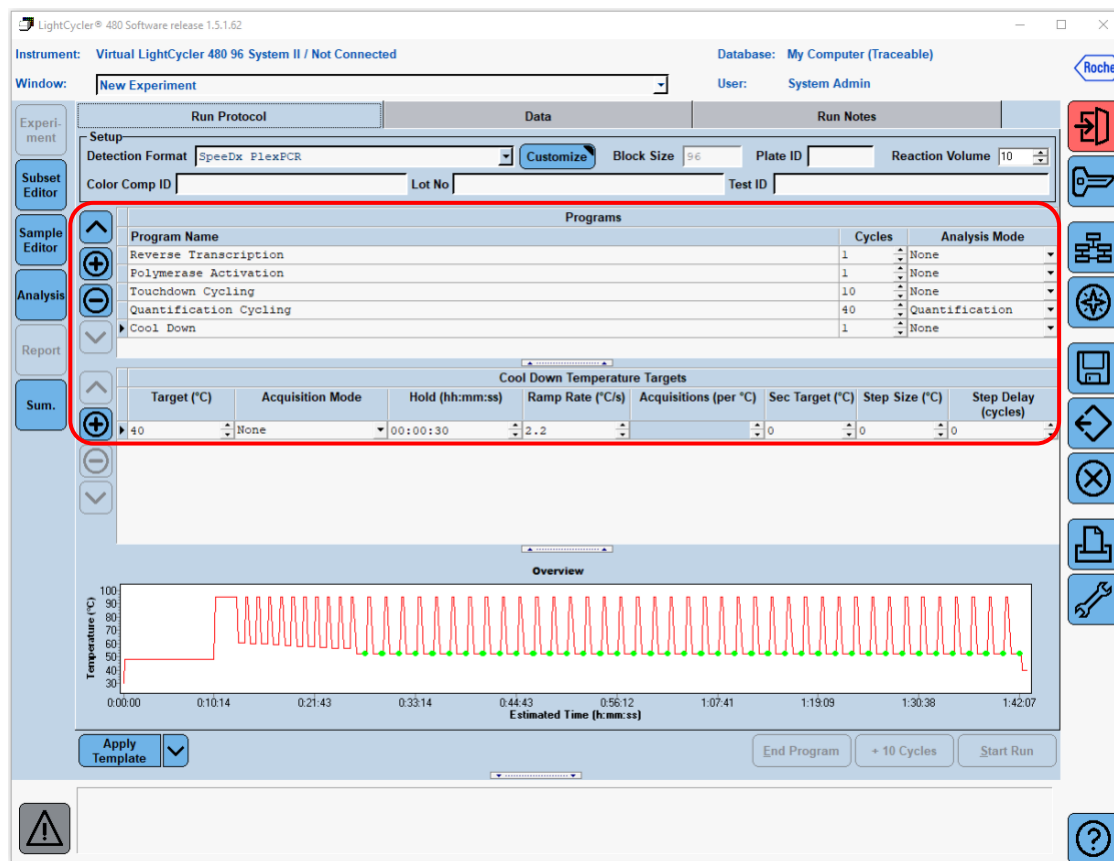
Detection Format SpeedX FlexPCR Customize Block Size 96 Plate ID Reaction Volume 10

Color Comp ID Lot No Test ID

Programs		
Program Name	Cycles	Analysis Mode
Reverse Transcription	1	None
Polymerase Activation	1	None
Touchdown Cycling	10	None
Quantification Cycling	40	Quantification
Cool Down	1	None

Quantification Cycling Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4	0	0	0	0
52	Single	00:00:50	2.2	0	0	0	0

Figura 9. Programma termociclaggio – Raffreddamento



Quando il programma di ciclaggio ha terminato la procedura, esportare un file .ixo per l'analisi nel software di analisi **PlexPCR®** SARS-CoV-2 (LC480).

#### Selezionare **Export (esporta)**

Salvare in una posizione facilmente identificabile

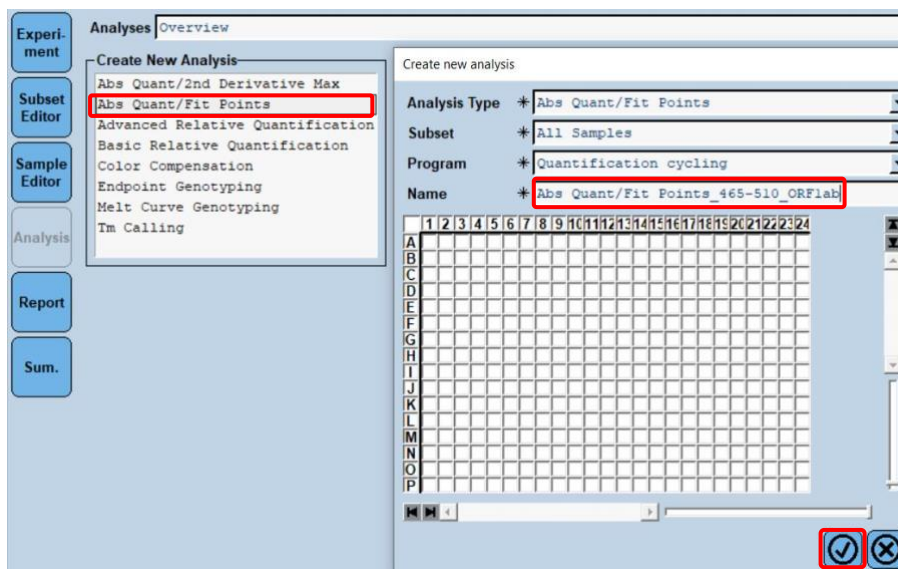
## 19.2 Impostare un modello Macro per il LightCycler® 480 Instrument II

I dati si possono interpretare usando il software integrato dell'LC480 II usando un modello macro con i parametri validati forniti di seguito. Per ulteriori informazioni, contattare [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

### Impostazioni modello macro

Selezionare un file di esecuzione coi parametri di ciclo **SpeedX PlexPCR**

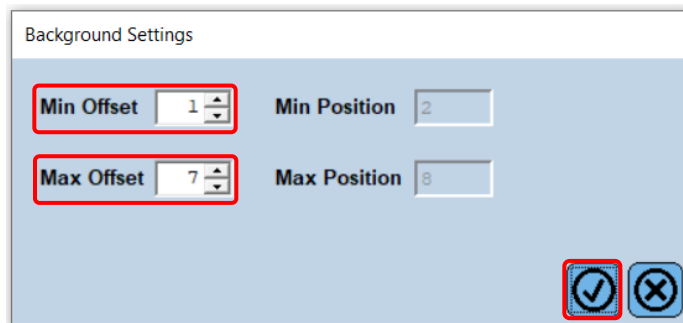
Selezionare **Analysis (Analisi)** > **Abs Quant/Fit Points** (quantità assoluta/punti di adattamento) > rinominare in **Abs Quant/Fit Points\_465-510\_ORF1ab** > **Ok**

**Figura 10. Abs Quant/Fit Points (quantità assoluta/Punti di adattamento) - 465-510 ORF1ab**


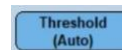
Selezionare **Filter Comb 465 – 510** (combinazione filtri 465 – 510)

Applicare la **Compensazione del colore** per tutti i canali > **Ok**

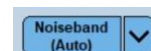
Selezionare la scheda **Cycle Range** (intervallo cicli) > **Background settings** (impostazioni sfondo) > modificare **Min Offset** e **Max Offset** > **Ok**

**Figura 11. Background settings (impostazioni sfondo) - 465-510 ORF1ab**


Selezionare la scheda **Analysis** (analisi) e verificare che siano selezionate le seguenti impostazioni

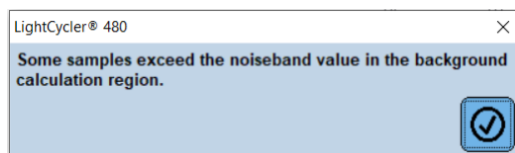


Selezionare la scheda **Noise Band** (banda rumore) e verificare che siano selezionate le seguenti impostazioni



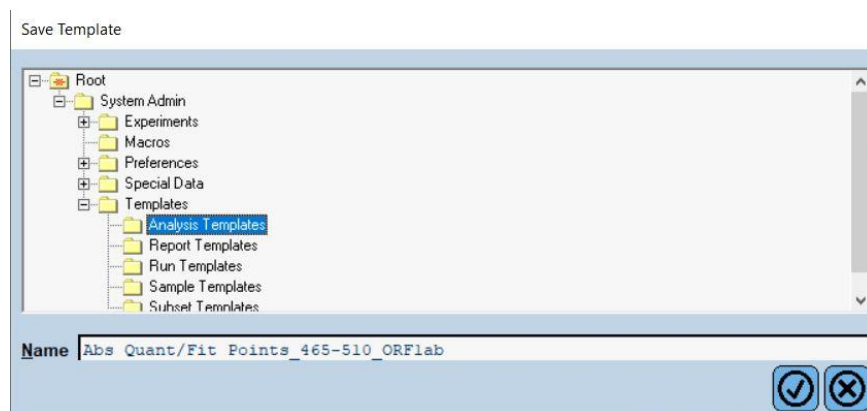
Fare clic su **Calculate** (calcola) (se la curva di un campione ha attraversato la regione di sfondo apparirà un messaggio indicante che l'utente deve diluire e testare nuovamente il campione (**Figura 12**)) > **Ok** per continuare l'analisi


**Figura 12. Messaggio di avvertimento banda di rumore**



Selezionare **Save As Template** (salva come modello) usando la cartella **Templates** (modelli) > **Analysis Templates** (modelli di analisi) e includere il canale e il target nel formato del nome > **Ok**

**Figura 13. Salvare il modello di analisi Abs Quant/Fit Points - 465-510 ORF1ab (quantità assoluta/Punti di adattamento - 465-510 ORF1ab)**

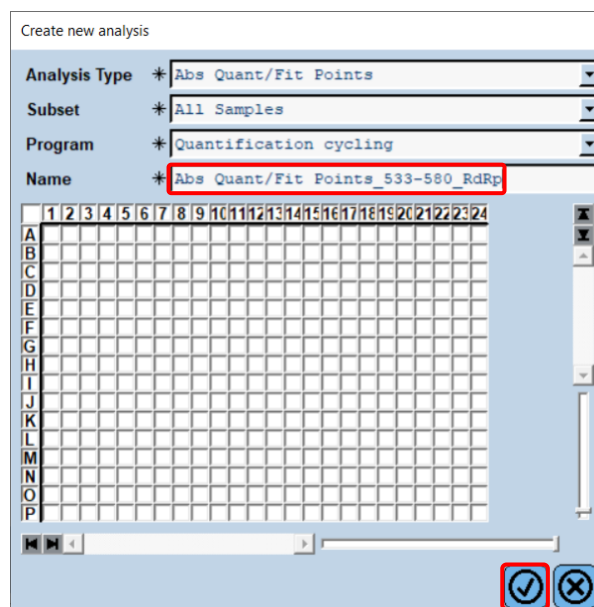


Fare clic sull'icona  per salvare i parametri di analisi impostati per il canale

Fare clic sull'icona  per creare una **nuova analisi**

Selezionare **Abs Quant/Fit Points** (quantità assoluta/punti di adattamento) > rinominare in **Abs Quant/Fit Points\_533-580\_RdRp** > **Ok**

**Figura 14. Abs Quant/Fit Points 533-580 RdRp (quantità assoluta/punti di adattamento 533-580 RdRp)**

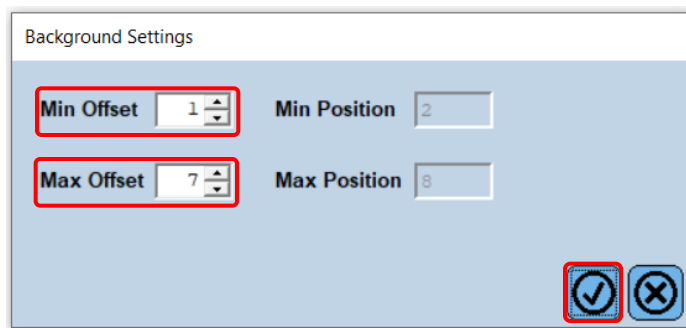


Selezionare **Filter Comb 533 – 580** (combinazione filtri 533 – 580)

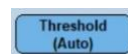
Applicare la **Compensazione del colore** per tutti i canali > **Ok**

Selezionare la scheda **Cycle Range** (intervallo cicli) > **Background settings** (impostazioni sfondo) > modificare **Min Offset** e **Max Offset** > **Ok**

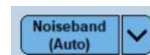
**Figura 15** Impostazioni sfondo - 533-6580 RdRp



Selezionare la scheda **Analysis** (analisi) e verificare che siano selezionate le seguenti impostazioni

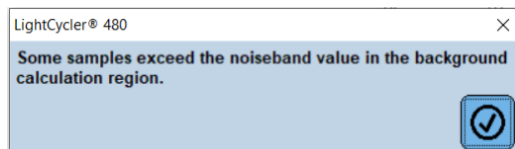


Selezionare la scheda **Noise Band** (banda rumore) e verificare che siano selezionate le seguenti impostazioni



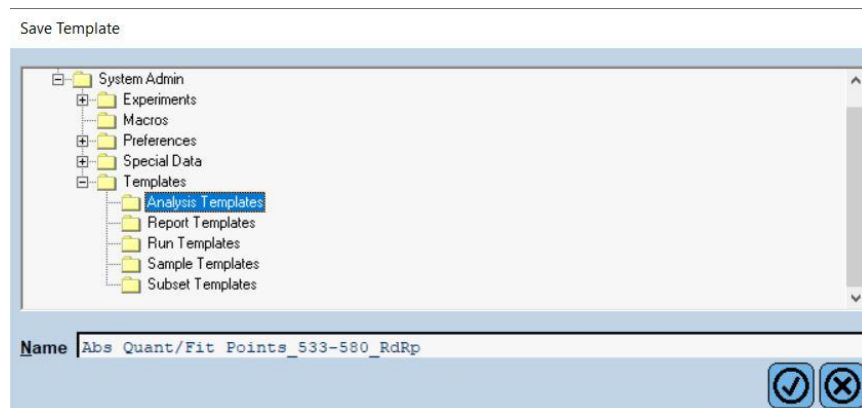
Fare clic su **Calculate** (calcola) (se la curva di un campione ha attraversato la regione di sfondo apparirà un messaggio indicante che l'utente deve diluire e testare nuovamente il campione (**Figura 16**)) > **Ok** per continuare l'analisi


**Figura 16.** Messaggio di avvertimento banda di rumore



Selezionare **Save As Template** (salva come modello) usando la cartella **Templates** (modelli) > **Analysis Templates** (modelli di analisi) e includere il canale e il target nel formato del nome > **Ok**

**Figura 17.** Salvare il modello di analisi Abs Quant/Fit Points – 533-580 RdRp (quantità assoluta/punti di adattamento – 533-580 RdRp)

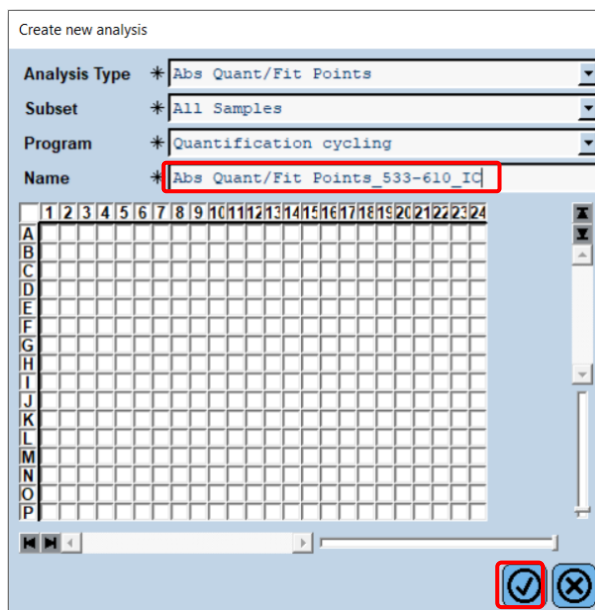


Fare clic sull'icona  per salvare i parametri di analisi impostati per il canale

Fare clic sull'icona  per creare una **nuova analisi**

Selezionare **Abs Quant/Fit Points** (quantità assoluta/punti di adattamento) > rinominare in **Abs Quant/Fit Points\_533-610\_IC** > **Ok**

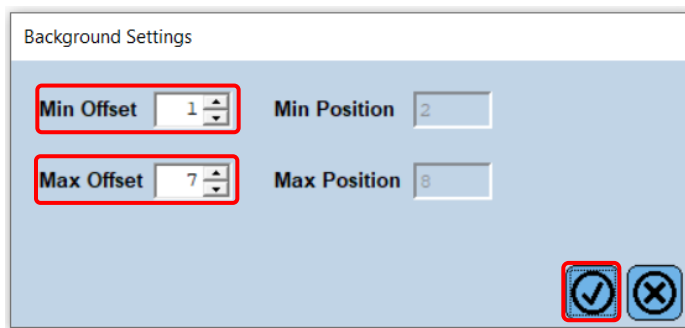
**Figura 18. Abs Quant/Fit Points 533-610 Internal Control (controllo interno quantità assoluta/punti di adattamento 533-610)**



Selezionare **Filter Comb 533 – 610** (combinazione filtri 533 – 610)

Selezionare la scheda **Cycle Range** (intervallo cicli) > **Background settings** (impostazioni sfondo) > modificare **Min Offset** e **Max Offset** > **Ok**

**Figura 19. Background Settings – 533-610 Internal Control (controllo interno impostazioni sfondo – 533-610)**



Selezionare la scheda **Analysis** (analisi) e verificare che siano selezionate le seguenti impostazioni

Threshold  
(Auto)

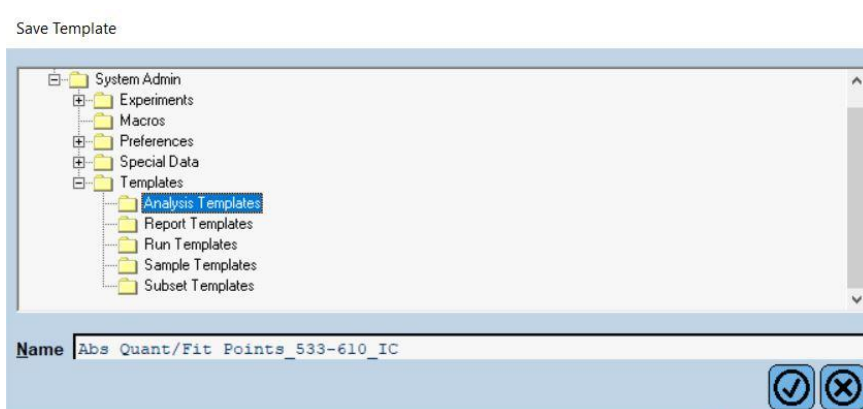
Selezionare la scheda **Noise Band** (banda rumore) e verificare che siano selezionate le seguenti impostazioni

Noiseband  
(Auto)

Fare clic su **Calculate** (calcola)

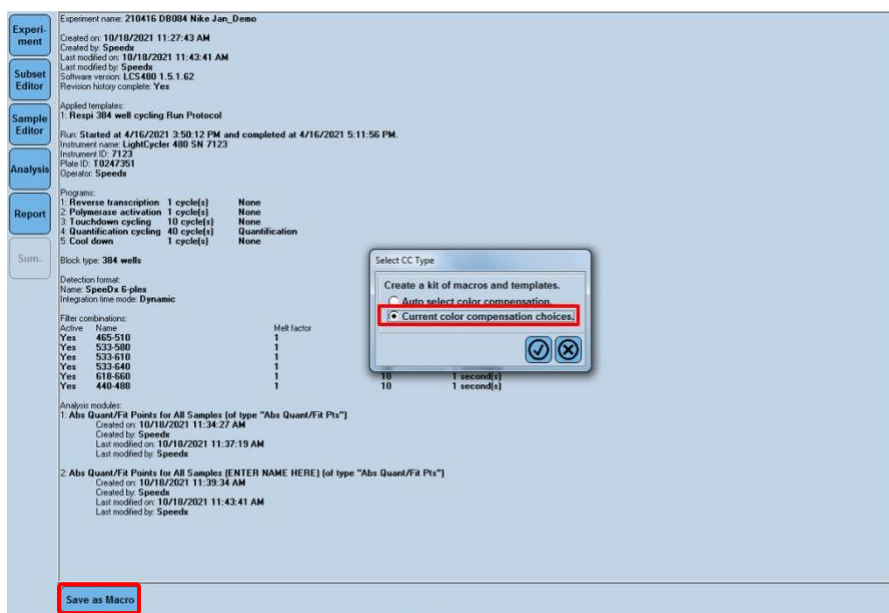
Selezionare **Save As Template** (salva come modello) usando la cartella **Templates** (modelli) > **Analysis Templates** (modelli di analisi) e includere il canale e il target nel formato del nome > **Ok**

**Figura 20. Salvare il modello di analisi Abs Quant/Fit Points – 533-610 Internal Control ( controllo interno quantità assoluta/punti di adattamento 533-610)**



Selezionare la scheda **Summary** (riassunto) > **Save As Macro** (salva come macro) > **Current colour compensation choices** (scelte attuali di compensazione del colore)

**Figura 21. Selezionare il tipo CC**



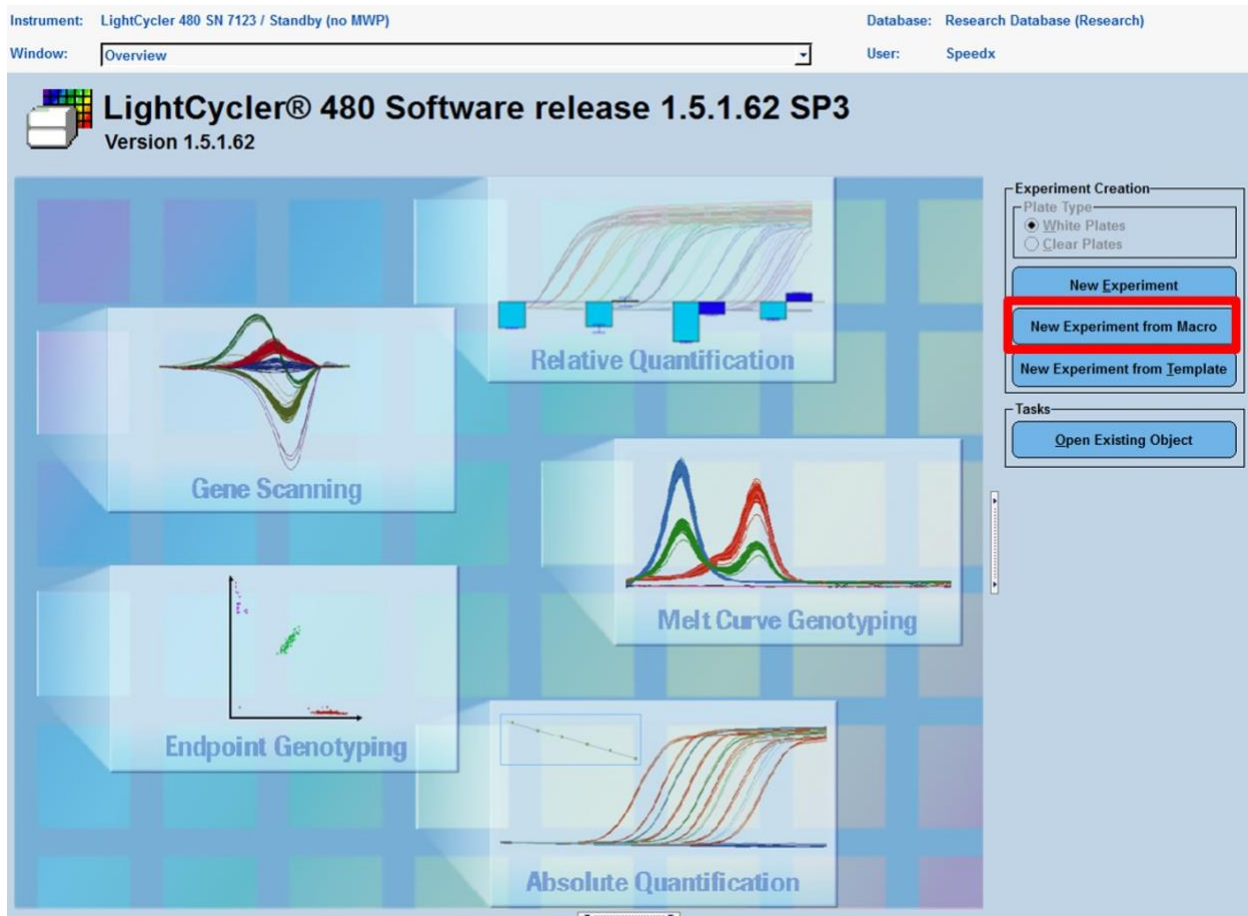
Questo **Macro template** (modello macro) sarà selezionabile quando ci si prepara per un'esecuzione.

### Impostare il modello macro

Selezionare **New Experiment from Macro** (nuovo esperimento da macro)

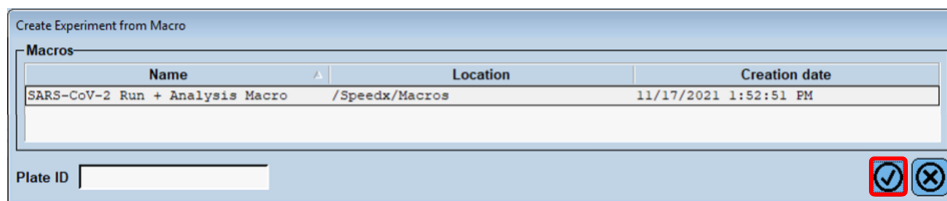


**Figura 22. Selezionare New Experiment from Macro (nuovo esperimento da macro)**



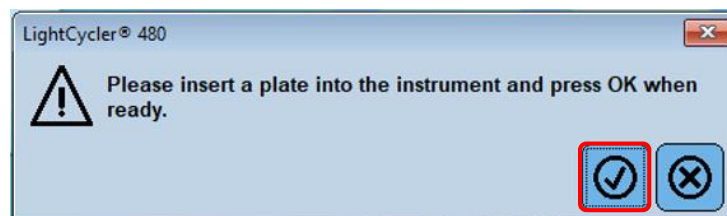
Selezionare il file dalla cartella **Macro** > **Ok**

**Figura 23. Selezionare il modello macro**



Inserire la piastra PCR preparata quando compare la seguente richiesta > **Ok** e l'esecuzione comincerà automaticamente

**Figura 24. Messaggio inserimento piastra**



Procedere usando l'**Editor sottogruppo** e l'**Editor campioni** per assicurarsi di dare le giuste etichette all'output dei risultati

### 19.3 Colour Compensation (compensazione del colore) per LightCycler® 480 Instrument II

**Nota:** il kit di compensazione del colore **PlexPCR®** (N. di cat. 90001) deve essere eseguito e applicato per l'analisi con LC480 II. Questo kit è disponibile su richiesta.

Perché sia possibile eseguire l'analisi, il nome del campione delle reazioni di compensazione del colore deve essere marcato come indicato nella **Tabella 22**.

Quando il programma di ciclaggio ha terminato la procedura, esportare un file .ixo per l'analisi nel software di analisi **PlexPCR®** SARS-CoV-2 (LC480).

Selezionare **Export (esporta)**

Salvare in una posizione facilmente identificabile

Tabella 22. Nome del campione per reazioni compensazione del colore per il software di analisi							
Reazioni							
	BLANK (VUOTO)	488 mix (miscela 488)	510 mix (miscela 510)	580 mix (miscela 580)	610 mix (miscela 610)	640 mix (miscela 640)	660 mix (miscela 660)
<b>Dominant Channel (canale dominante)</b>	Water (acqua)	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	610-660
<b>Nome del campione</b>	BLANK (VUOTO)	440-488	465-510	533-580	533-610	533-640	610-660

### 19.4 Interpretazione dei risultati

I dati si possono interpretare usando il software integrato dell'LC480 II o il software di analisi **PlexPCR®** SARS-CoV-2 (LC480). Il software di analisi **PlexPCR®** SARS-CoV-2 (LC480) può essere fornito su richiesta. Per ulteriori informazioni contattare [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Per interpretare i risultati senza il software di analisi **PlexPCR®** SARS-CoV-2 (LC480), ciascun campione va analizzato individualmente. Vedere la **Tabella 23** per come interpretare i segnali dalle varie combinazioni di filtri.

Qualunque Cp registrato entro il cut-off, con conferma visiva della curva di amplificazione, è un risultato positivo (**Tabella 23**). Esempi di curve di amplificazione sono mostrati nella **Figura 25**.

**Nota:** I campioni NTC non dovrebbero produrre un segnale in nessun pozzetto:

→ Il risultato è INVALIDO e la PCR va RIPETUTA.

#### **Internal Control (controllo interno)**

Il controllo interno controlla l'estrazione e l'inibizione della PCR. Il controllo interno è valido se il canale 533-610 registra un Cp all'interno del cut-off (**Tabella 23**). È però possibile avere un segnale positivo per qualunque dosaggio target (ORF1ab o RdRp) quando il controllo interno è negativo. Per tali campioni, la presenza del target viene ancora interpretata come risultato valido.

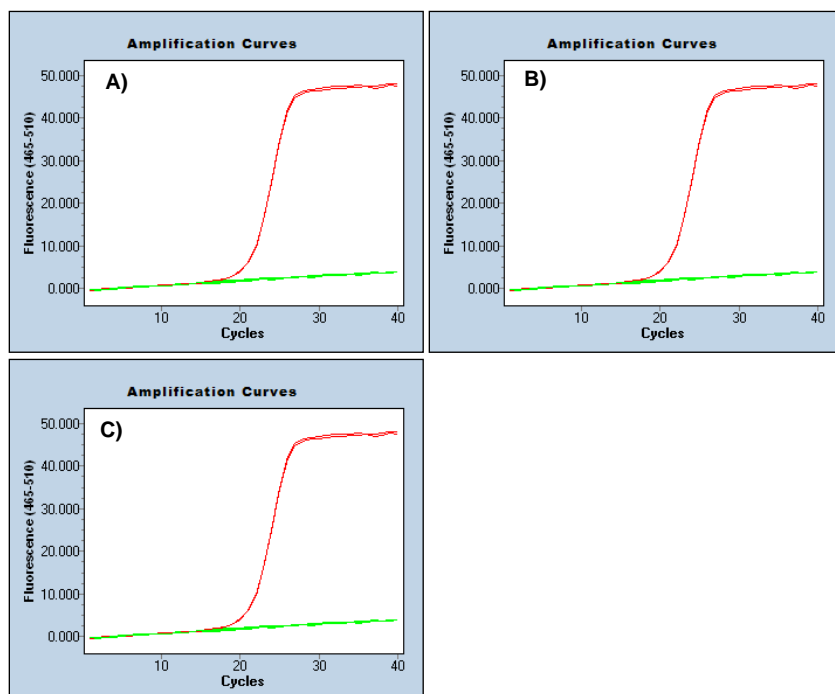
**Nota:** Per campioni dove i dosaggi target sono negativi, e anche il dosaggio di controllo interno è negativo:

→ Il risultato è INVALIDO e l'estrazione e la PCR va RIPETUTA.

Tabella 23. Interpretazione dei risultati (LC480 II)			
Interpretazione	Target		
	ORF1ab (465-510)	RdRp (533-580)	Controllo interno (533-610) <sup>^</sup>
SARS-CoV-2 rilevato	< 31	N/D	N/D
SARS-CoV-2 rilevato	N/D	< 31	N/D
SARS-CoV-2 non rilevato. IC valido.	≥ 31	≥ 31	≤ 26
IC non valido. Estrarre e ripetere di nuovo il test del campione.	≥ 31	≥ 31	≥ 26

<sup>^</sup>Se il controllo interno è negativo ma un dosaggio target è positivo, il risultato è valido lo stesso.

Figura 25. Esempio di curve di amplificazione per A) ORF1ab, B) RdRp, C) Controllo interno. (Positivo (rosso) e Negativo (verde)).



Fare riferimento a **Appendice A: interpretazione dei risultati** per le istruzioni sull'utilizzo del software di analisi *PlexPCR*<sup>®</sup> SARS-CoV-2 (LC480).

## 20 Appendice 2: Bio-Rad CFX96™ Dx e CFX96 Touch™ sistema PCR in tempo reale

Le seguenti informazioni si basano sul Software CFX Manager Dx (Versione 3.1).

Il kit **PlexPCR**® SARS-CoV-2 contiene coloranti per il sistema CFX96 Dx System. Per tutti i canali vengono utilizzate calibrature dei coloranti predefinite. La calibrazione personalizzata non è necessaria.

### 20.1 Programmare il CFX96™ Dx e il CFX96 Touch™ il sistema di rilevamento PCR in tempo reale (CFX96 Dx, CFX96 Touch)

Selezionare **View** (Visualizza) > Aprire **Run Setup** (Impostazione analisi)

In **Run Setup** (impostazione analisi) > Scheda **Protocol** (protocollo) > Selezionare **Create New** (crea nuovo)

In **Protocol Editor** (Editor protocollo) (vedere la **Figura 26**):

Impostare **Sample Volume** (volume campione) > 10 µL

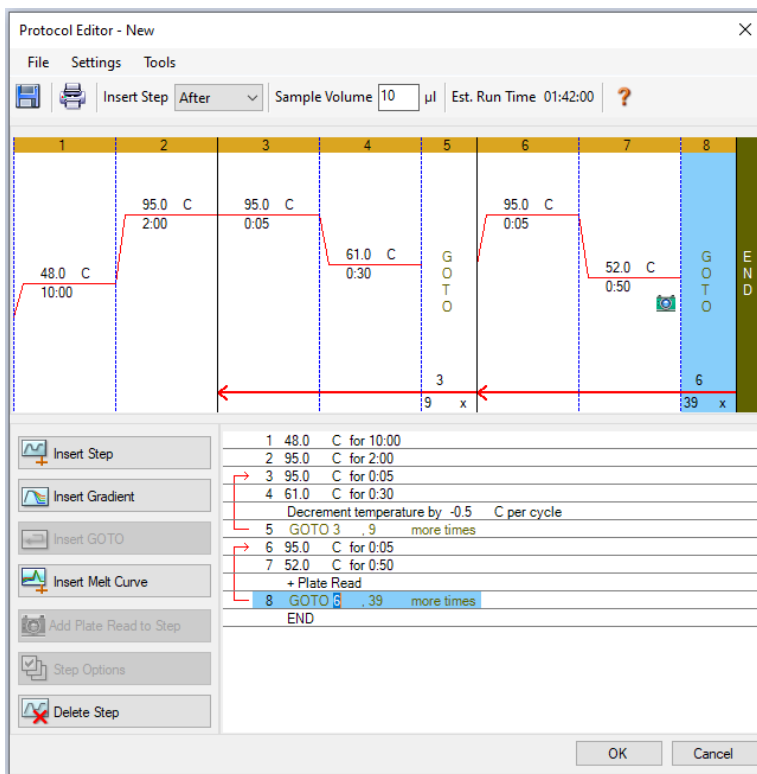
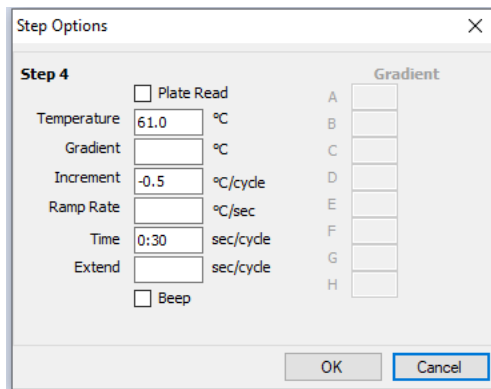
Creare il programma di termociclaggio seguente e salvarlo come '**SpeedX PCR**'. Questo protocollo potrà essere selezionato per analisi future.

Per Touch down cycling (cicli di touchdown), selezionare la Fase 3 e **Step options** (opzioni di fase) > Increment (incremento): -0,5°C/ciclo (mostrato più dettagliatamente nella **Figura 27**).

Tabella 24. Programma Thermocycling (termociclaggio)			
Program Name (nome del programma)	Cycles (cicli)	Target °C	Hold (mantenimento)
Trascrittasi inversa	1	48°C	10 min
Polymerase activation (attivazione della polimerasi)	1	95°C	2 min
Touch down cycling (cicli di touchdown)*: Step down (riduzione) -0,5°C/ciclo	10	95°C	5 s
		61°C – 56,5°C*	30 s
Quantification cycling (cicli di quantificazione)*: Acquisition/Detection (acquisizione/rilevamento)	40	95°C	5 s
		52°C*	50 s

\* **Step options** (opzioni di fase) > Incremento (incremento): -0,5°C/ciclo

\* **Add Plate Read to Step** (Aggiungi lettura piastra a fase)

**Figura 26. Thermocycling Protocol (Protocollo di termociclaggio) - Graphical view (Visualizzazione grafica)**

**Figura 27. Step Options (opzioni fase)**


In **Run Setup (impostazione analisi)** > scheda **Plate** (piastra)

Selezionare **Create New** (crea nuova)

Selezionare **Settings** (impostazioni) > **Plate Type** (tipo piastra) > Selezionare **BR Clear** (BR trasparente)

Impostare **Scan mode** (modalità scansione) > All channels (tutti i canali)

**Select Fluorophores** (Selezionare fluorofori) > FAM, HEX, Texas Red (vedere **Tabella 25**)

Selezionare i pozzetti contenenti i campioni, assegnare **Sample Type** (tipo di campione) e spuntare **Load** (carica) per fluorofori (FAM, HEX, Texas Red)

Salvare la piastra

Tabella 25. Canali per i target <i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2			
Canale	FAM	HEX	Texas Red
SARS-CoV-2	ORF1ab	RdRp	Internal Control (controllo interno)

In **Run Setup (impostazione analisi)** > scheda **Start Run (Avvia analisi)**

Selezionare blocco

**Start Run (avvia analisi)**

Per consentire il rilevamento automatizzato del campione nel software di analisi, è necessario assegnare nominativi ai pozzetti sulla piastra.

Aprire il modulo **Plate Setup** (impostazione piastra)

Selezionare il pozzetto

Modificare **Sample Name** (nome del campione) in modo che corrisponda al nominativo definito nel modulo dei **dosaggi** del software di analisi (consultare la **Sezione 21.4**)

I campioni sono etichettati come *Prefix\_Suffix* (come mostrato nella **Tabella 26** e in **Figura 28**) per es. NEG\_CoV

**NOTA:** nei nominativi dei campioni si fa distinzione tra maiuscole e minuscole. Il nominativo deve coincidere esattamente con quelli assegnati nel file di esecuzione.

Tabella 26. Nominativi dei campioni per il software di analisi			
Tipo di campione	Prefisso_ (nel software di analisi)	Suffisso_ (nel software di analisi)	Nome del campione (nel software di analisi)
Campione regolare	Campione	_CoV	Sample_CoV
Controllo negativo	N	_CoV	N_CoV
Controllo positivo	Pa	_CoV	Pa_CoV

**Figura 28. Sample Editor (editor campioni) – Assegnazione di nominativi ai pozzetti**

	1	2	3
A	Unk		
	FAM		
	HEX		
	Texas Red		
	S-CoV		
B	Unk		
	FAM		
	HEX		
	Texas Red		
	P_CoV		
C	Unk		
	FAM		
	HEX		
	Texas Red		
	N_CoV		

## 20.2 Interpretare i risultati usando il software integrato CFX

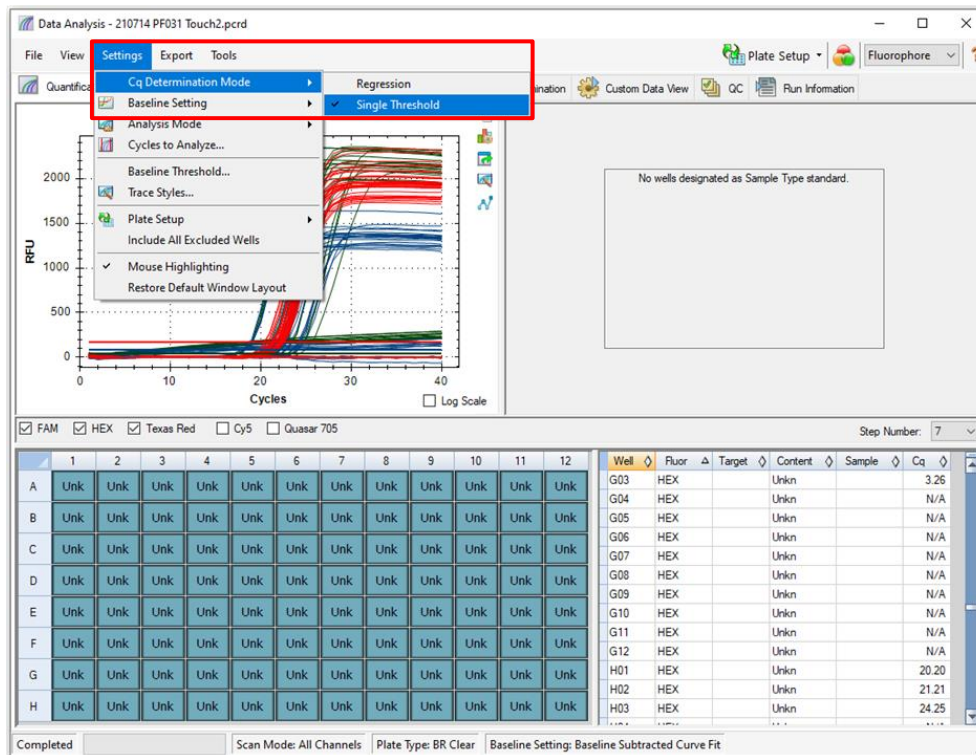
I dati si possono interpretare usando il software integrato CFX con i parametri validati forniti di seguito. Per ulteriori informazioni, contattare [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Selezionare un file di esecuzione coi parametri di ciclo **SpeedX PlexPCR**

Verificare che non siano stati selezionati altri canali oltre a quelli elencati nella **Tabella 25**.

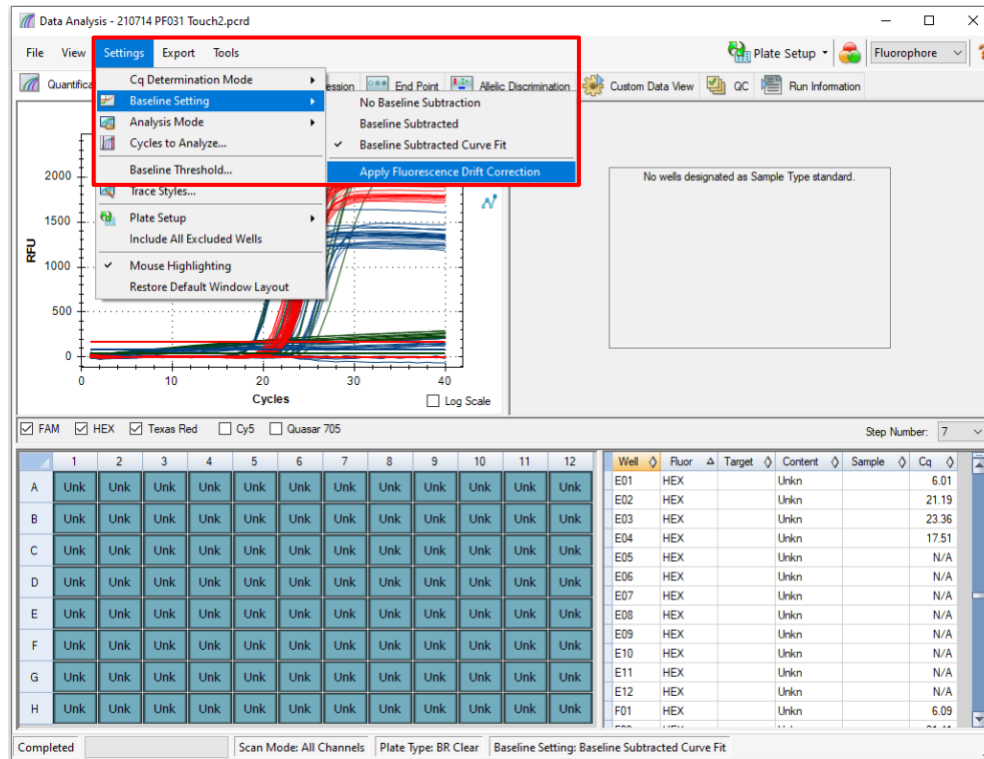
Fare clic su **Settings** (Impostazioni) > **Cq Determination Mode** (Modo di determinazione Cq) e selezionare **Single Threshold** (Soglia singola) (**Figura 29**)

**Figura 29. Impostazioni modo determinazione Cq**



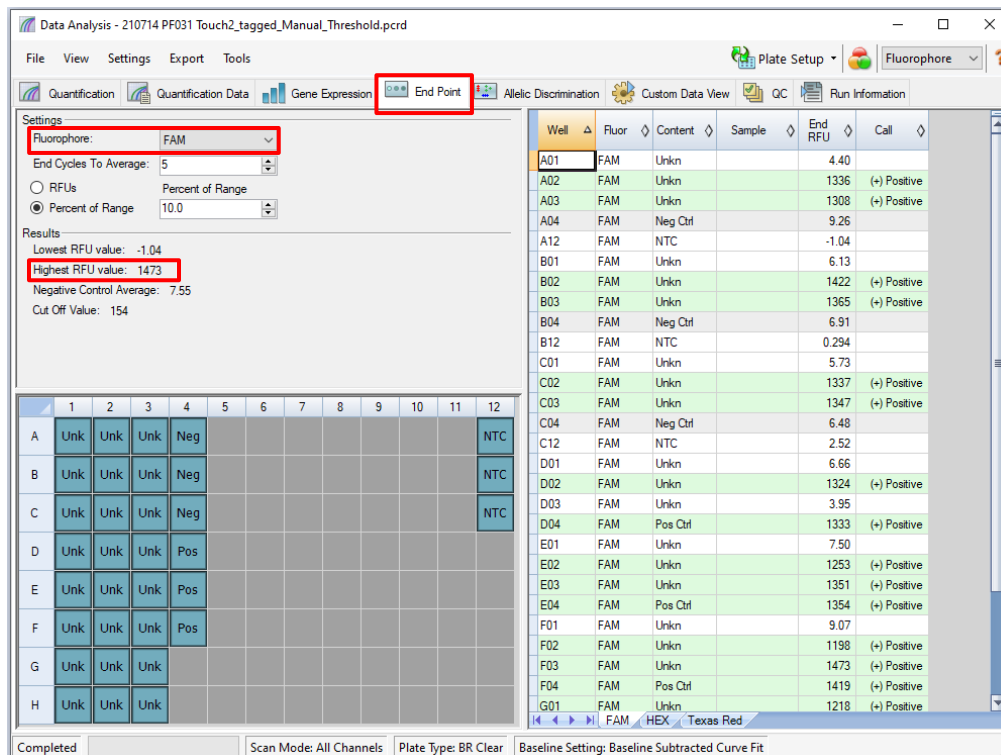
Fare clic su **Settings**(Impostazioni) > **Baseline Setting** (Impostazioni della linea di base) e selezionare **Baseline Subtracted Curve Fit** (Adattamento curva sottratta della linea di base) e abilita **Apply Fluorescence Drift Correction** (Applica correzione deviazione fluorescenza) (**Figura 30**)

Figura 30. Impostazioni linea di base



Selezionare la scheda **End Point** (Punto finale) per vedere i valori di fluorescenza del punto finale e selezionare **FAM fluorophore** (fluorocromo FAM) e notare il **'Highest RFU value'** (Massimo valore RFU) (Figura 31)

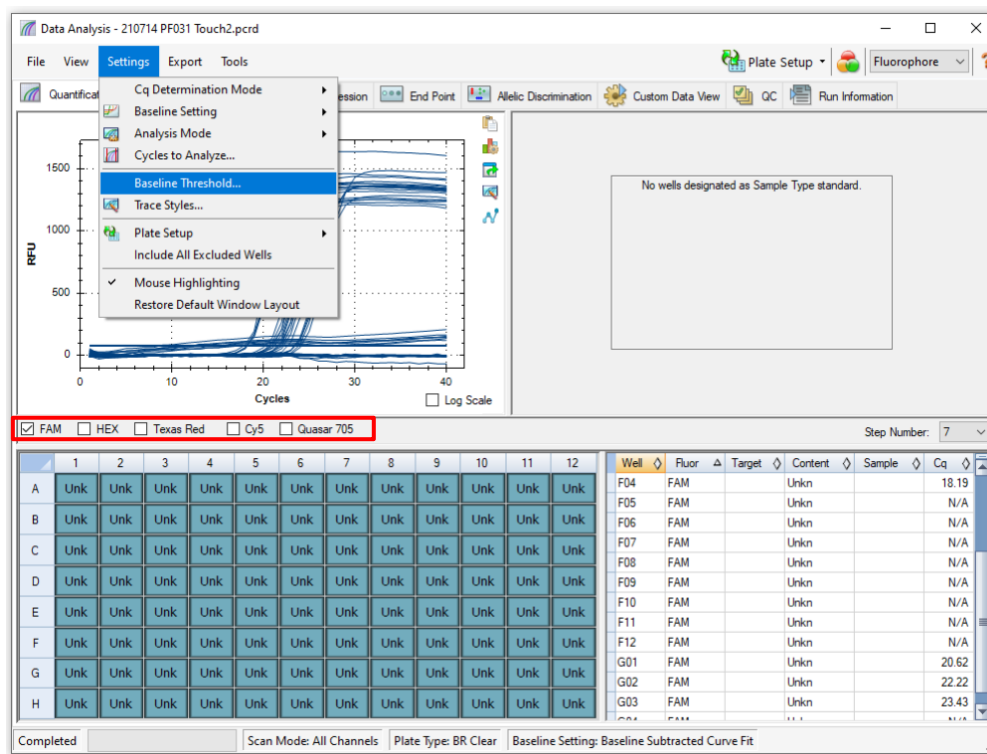
Figura 31. Notare il 'Highest RFU value' (Massimo valore RFU)





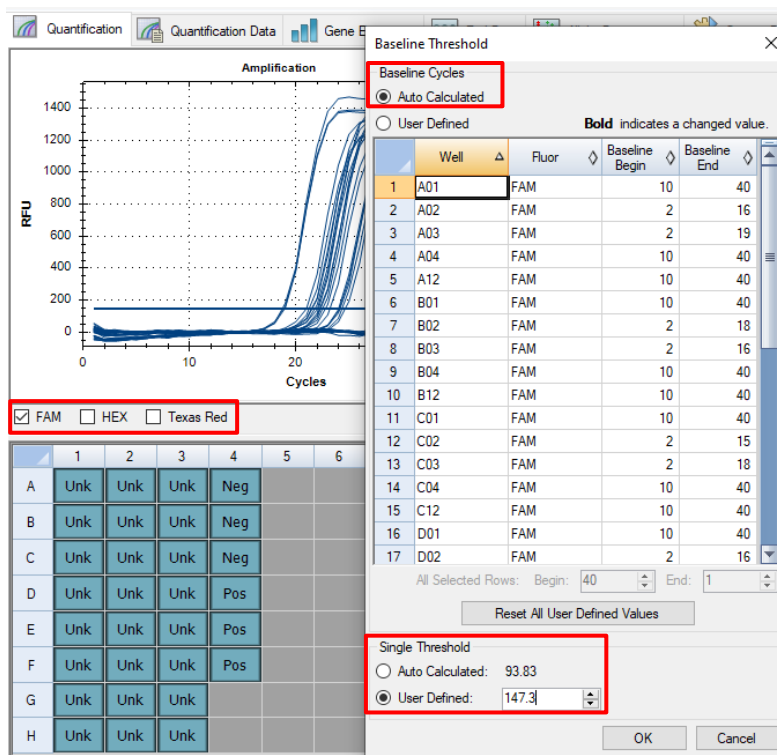
Tornare alla scheda **Quantification** (Quantificazione) e deselezionare i fluorocromi **HEX** e **Texas Red**. Poi selezionare **Settings** (Impostazioni) > **Baseline Threshold** (Soglia linea di base) (**Figura 32**)

**Figura 32. Controllare la soglia della linea di base per ciascun canale**



Abilitare **Baseline Cycles** (Cicli linea di base) > **Auto Calculated** (Calcolo automatico) per tutti i pozzetti e **Single Threshold** (Soglia singola) > **User Defined** (Definita dall'utente) > modificare il valore al **10%** del **'Highest RFU value'** (Massimo valore RFU) per quel canale, così come determinato con la **Figura 31**. Questo passaggio va eseguito selezionando un solo canale alla volta (**Figura 33**)

Figura 33. Impostazioni soglia linea di base



Ripetere i passaggi dalla **Figura 31** alla **Figura 33** per il canale **HEX** e per il canale **Texas Red**. *Tenere presente che questi passaggi vanno eseguiti selezionando un solo canale alla volta*

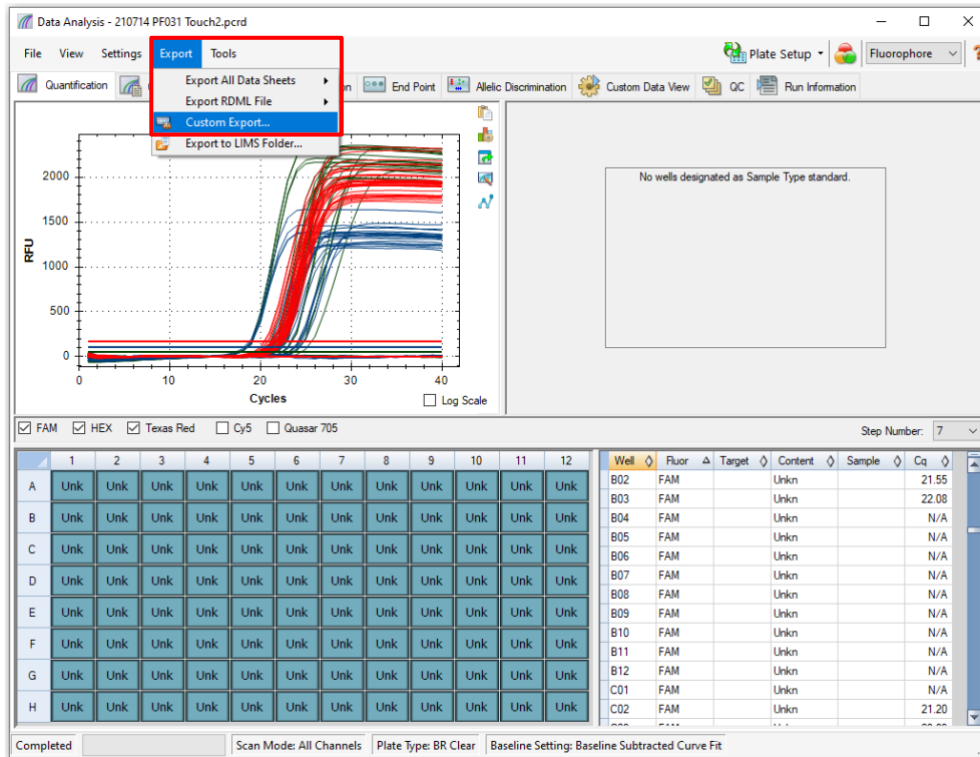
### 20.3 Esportare i risultati dall'analisi integrata

Selezionare **Export** (Esportazione) > **Custom Export** (Esportazione personalizzata) (**Figura 34**)

Per risultati come file di valori separati da virgola (.csv)

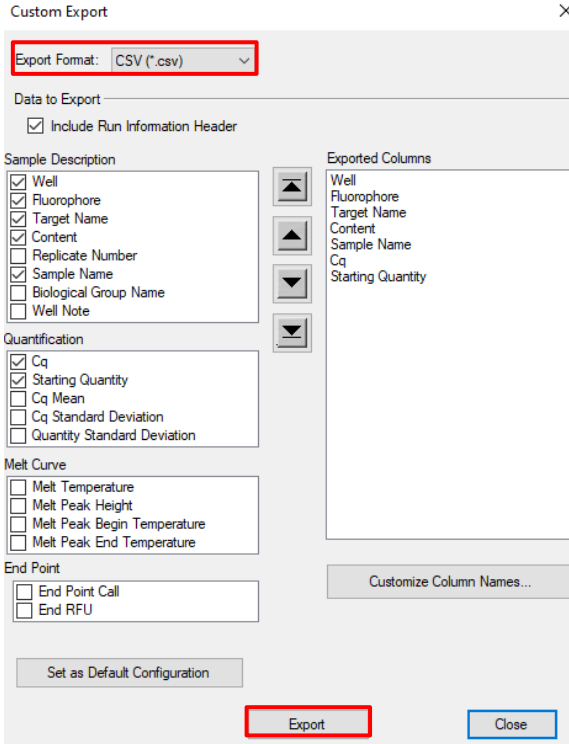
Per risultati come file di testo delimitato da tabulazione (.txt)

Figura 34. Esportazione dei risultati



Selezionare il formato in cui si desidera esportare (per es. .csv o .txt), selezionare i campi che si desidera esportare e fare clic su **Export** (Esportare) (Figura 35)

Figura 35. Impostazioni personalizzate per l'esportazione



The 'Custom Export' dialog box is shown. The 'Export Format' is set to 'CSV (\*.csv)'. The 'Data to Export' section has 'Include Run Information Header' checked. The 'Sample Description' section has 'Well', 'Fluorophore', 'Target Name', 'Content', 'Sample Name', and 'Biological Group Name' checked. The 'Quantification' section has 'Cq' and 'Starting Quantity' checked. The 'Melt Curve' section has 'Melt Temperature', 'Melt Peak Height', 'Melt Peak Begin Temperature', and 'Melt Peak End Temperature' unchecked. The 'End Point' section has 'End Point Call' and 'End RFU' unchecked. The 'Exported Columns' list includes 'Well', 'Fluorophore', 'Target Name', 'Content', 'Sample Name', 'Cq', and 'Starting Quantity'. The 'Export' button is highlighted with a red box.



#### 20.4 Interpretazione dei risultati

I dati si possono interpretare con il software di analisi **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 (CFX). Il software di analisi è disponibile su richiesta. Per ulteriori informazioni contattare [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Fare riferimento a **Appendice A: interpretazione dei risultati** per le istruzioni sull'utilizzo del software di analisi **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2 (CFX).

## 21 Appendice A: interpretazione dei risultati

L'interpretazione dei dati richiede il software di analisi **PlexPCR**<sup>®</sup> SARS-CoV-2. Il software di analisi SARS-CoV-2 automatizza l'interpretazione dei dati dei risultati di amplificazione e semplifica il flusso di lavoro.

Per ulteriori istruzioni dettagliate sulla piattaforma **FastFinder**, consultare il **FastFinder Instructions For Use** (istruzioni per l'uso di FastFinder) accessibile dal menu **Help** (guida).

Vedere la **Tabella 27** per il software di analisi idoneo per ciascuno strumento PCR in tempo reale. Il software di analisi può essere fornito su richiesta. Per ulteriori informazioni contattare [tech@speedx.com.au](mailto:tech@speedx.com.au).

Tabella 27. Software di analisi <b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2		
N. di cat.	Software di analisi*	Strumento PCR in tempo reale
99021	<b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (LC480)	LC480 II
99022	<b>PlexPCR</b> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (CFX)	CFX96 Dx e CFX96 Touch

\* Per assicurarsi di usare la versione più recente del software di analisi, fare riferimento al sito <https://plexpcr.com/products/respiratory-infections/plexpcr-sars-cov-2/>.

**NOTA:** per impedire la perdita di informazioni sui campioni, attenersi alle ordinarie pratiche di laboratorio per il trasferimento, il reporting e l'archiviazione dei risultati.

### 21.1 Piattaforma FastFinder – Requisiti IT minimi

Il software di analisi è disponibile all'interno della piattaforma FastFinder (<https://www.ugentec.com/fastfinder/analysis>). Di seguito sono elencati i requisiti IT minimi per installare la piattaforma FastFinder.

#### Requisiti hardware

PC (i computer Mac non sono supportati)

Processore: 2 GHz, 2 GB RAM

Spazio sul disco: 10 Gb

Connessione internet Cavo o DSL, proxy non supportati

Risoluzione minima dello schermo: 1366x768 pixel

#### Sistema operativo del client supportato

Sistema operativo Edizioni supportate

Windows 10 32 bit e 64 bit

Windows 8.1 32 bit, 64 bit, e ARM

Windows 8 32 bit, 64 bit, e ARM

Windows 7 SP1 32 bit e 64 bit

Windows Vista SP2 32 bit e 64 bit

#### Browser supportati

Gli utenti di account di amministratore di FastFinder devono usare uno dei seguenti browser:

- Internet Explorer 11 o superiore
- Microsoft Edge 25 o superiore
- Firefox 45 o superiore
- Google Chrome 47 o superiore.

Può funzionare anche su versioni precedenti, ma queste non sono ufficialmente supportate.

## Requisiti software

Per usare il software FastFinder, serve almeno .NET 4.6.1. Per ulteriori informazioni sul framework .NET visitare le pagine di aiuto di Microsoft Windows.

## Impostazioni antivirus



Il vostro software antivirus potrebbe mettere in quarantena il file di installazione di FastFinder (UgenTec.FastFinder.Installer.exe). Aggiungere questo file alla lista di eccezioni dell'antivirus. Esempio: Symantec (Rischio: WS.Reputazione.1)

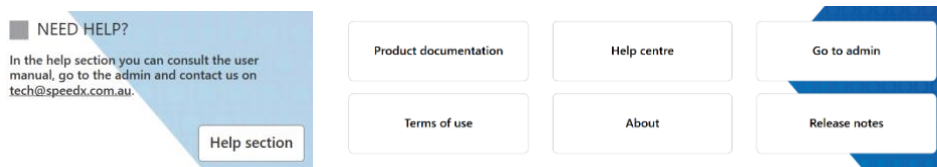
## Requisiti firewall

Vanno permesse le connessioni https a \*.fastfinderplatform.com:443

Per ulteriori istruzioni dettagliate sulla piattaforma **FastFinder**, consultare le **Istruzioni per l'uso di FastFinder**, accessibili dal menù **Guida**.

Per accedere al menu guida:

- Aprire il menu Start 
- Selezionare  o **Help section** (sezione guida), quindi **Product Documentation** (documentazione del prodotto) e poi **Instructions for Use** (istruzioni per l'uso)



### 21.2 Device set up (impostazione del dispositivo) (nuovo utente o dispositivo)

Consultare il documento **FastFinder Instructions For Use** (istruzioni per l'uso di FastFinder) per istruzioni dettagliate sulla configurazione del dispositivo. Il documento è accessibile dal menu **Help** (guida)


Aprire **FastFinder**

- Selezionare **Devices** (dispositivi) nella barra del flusso di lavoro
  - > Selezionare **Add** (aggiungi)
  - > Selezionare un file (file di esecuzione) per il nuovo dispositivo
- Per cambiare la **Current directory** (directory corrente)
  - > Selezionare **Browse** (sfoglia) e selezionare la cartella contenente i file del caso
  - > Selezionare **Next** (avanti)
- Aggiungere le informazioni sul dispositivo
  - > Selezionare **Save** (salva)

#### 21.2.1 Compensazione del colore

**NOTA:** per ulteriori informazioni, consultare la **Sezione 19.3** su Colour Compensation (Compensazione del colore)



Per i dispositivi **LC480 II**, è necessario aggiungere al dispositivo un file di compensazione del colore

- Selezionare il dispositivo LC480 II
  - > Nella sezione **Colour Compensation** (compensazione del colore), selezionare 
  - > Selezionare il file di compensazione del colore nella directory per il dispositivo
- Per cambiare la directory corrente

- > Selezionare **Browse** (sfoglia) e selezionare la cartella contenente i file del caso
- Selezionare **Next** (avanti)
- Selezionare **PlexPCR SARS-CoV-2 (LC480)** dall'elenco per collegarlo a questo dosaggio
- Selezionare **Save** (salva)

File di compensazione del colore nuovi o addizionali possono essere aggiunti a un dispositivo oppure disattivati, come necessario.

Nella sezione compensazione del colore del dispositivo

- Accanto al nome del file, selezionare 
- Selezionare  per attivare o disattivare un file compensazione del colore per un dosaggio
- Selezionare **Save** (salva)



### 21.3 Plug-in di dosaggio (nuovo utente)

Per istruzioni dettagliate sull'impostazione dei dosaggi, consultare il documento **FastFinder Instructions For Use** (istruzioni per l'uso di FastFinder), accessibile dal menu **Help** (guida)

Aprire **FastFinder**

- Selezionare **Assays** (dosaggi) nella barra del flusso di lavoro
- Selezionare **Add** (aggiungi)
  - > Per LC480 II > Selezionare **PlexPCR SARS-CoV-2 (LC480)** dall'elenco
  - > Per CFX96 Dx e CFX96 Touch > Selezionare dall'elenco **PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX)**
- Selezionare **Add** (aggiungi)



Per attivare o disattivare le versioni del plug-in di dosaggio



- In **General assay information** (informazioni generali sul dosaggio)
  - > Selezionare  **Versions** (versioni)
  - > Selezionare  per attivare o disattivare la versione del dosaggio
  - > Selezionare **Save** (salva)

### 21.4 Denominazione dei campioni

È possibile assegnare nominativi dei campioni a un plug-in di dosaggio per automatizzare il rilevamento dei pozzetti e dei tipi di campioni per l'analisi.

Selezionare **Assays** (dosaggi) nella barra del flusso di lavoro



- Sotto Sample type nametags (prefix) (nominativi dei tipi di campioni, prefisso) selezionare 
  - > Selezionare  per aggiungere un nominativo e definire i nominativi dei tipi di campioni (regolare, controllo/i positivo/i e controllo negativo)
  - > Aggiungere alla casella di testo la parola, l'acronimo o la lettera desiderati
  - > Selezionare **Save** (salva)

- Sotto Mix definition nametags (suffix) (nominativi di definizione delle miscele, suffisso) selezionare 
  - > Selezionare  per aggiungere un nominativo per definire il nome della miscela
  - > Aggiungere alla casella di testo la parola, l'acronimo o la lettera desiderati
  - > Selezionare **Save** (salva)
- Nel software dello strumento (prima o dopo il completamento dell'esecuzione), assegnare lo stesso nominativo ai pozzetti appropriati
  - > Per **LC480 II**, consultare la **Sezione 19** per istruzioni sulla programmazione dei nominativi dei campioni nel file di esecuzione
  - > Per **CFX96 DX** e **CFX96 Touch** consultare la **Sezione 20** per istruzioni sulla programmazione dei nominativi dei campioni nel file di esecuzione

**NOTA:** nei nominativi dei campioni si fa distinzione tra maiuscole e minuscole. Il nominativo deve coincidere esattamente con quelli assegnati nel file di esecuzione.

### 21.5 Aggiunta dei numeri di lotto delle miscele

È possibile assegnare al dosaggio numeri di lotto delle miscele per consentire la tracciabilità dei reagenti

- Selezionare **Assays** (dosaggi) nella barra del flusso di lavoro
  - > Sotto **Assay Lot**(lotto di dosaggio): selezionare  per aggiungere un nuovo lotto oppure  per modificare un lotto esistente
  - > Una volta aggiunti, i numeri di lotto diventano disponibili nel modulo di analisi

Selezionare  Show all lots  Show only active lots per mostrare tutti i numeri di lotto o solo i numeri di lotto attivi

### 21.6 Analisi

Selezionare **Analyses** (analisi) nella barra del flusso di lavoro per avviare una nuova analisi

#### 1 Select datafile

Cercare il file da caricare per l'analisi da una directory specificata

- Per cambiare la **directory corrente**
  - > Selezionare **Browse** (sfoglia) e selezionare la cartella contenente i file del caso
- Selezionare il file dati di esecuzione dall'elenco
  - > Selezionare **Next step** (fase successiva)

#### 2 Assign assay(s)


Se la denominazione dei campioni non è stata impostata nel modulo dei **dosaggi**, assegnare manualmente alla piastra le informazioni sul dosaggio

- Per **LC48 II** > Selezionare **PlexPCR SARS-CoV-2 (LC480)**
- Per **CFX96 Dx** e **CFX96 Touch** > Selezionare **PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX)**
- Selezionare i pozzetti e assegnarli come:
  - > Campione regolare (S)
  - > Controllo negativo (N)
  - > Controllo positivo (P)




- Selezionare **Next step** (fase successiva)

Per salvare il layout della piastra come modello per uso futuro

- Selezionare i pozzetti e assegnare i tipi di campioni
  - > Selezionare  per salvare il modello
- Specificare il nome del modello per uso futuro
  - > Selezionare **Save** (salva)

Per caricare un modello di piastra salvato in precedenza

- Selezionare  per caricare il modello piastra
  - > Selezionare il modello nel menu a discesa
  - > Spuntare la casella per caricare i tipi di campione specificati all'interno del modello di piastra
  - > Selezionare **Load** (carica)

### 3 Configure assay(s)

- Per **LC480 II** > Selezionare **PlexPCR SARS-CoV-2 (LC480)**
  - > Selezionare **Assay Lot** (lotto di dosaggio) nel menu a discesa
  - > Selezionare **Analyse** (analizza)
- Per **CFX96 Dx** e **CFX96 Touch** > Selezionare **PlexPCR SARS-CoV-2 (CFX)**
  - > Selezionare **Assay Lot** (lotto di dosaggio) nel menu a discesa
  - > Selezionare **Analyse** (analizza)

## 21.7 Risultati

Consultare la **Tabella 28** per un riepilogo dei possibili risultati dei campioni riportati.


**NOTA:** si raccomanda vivamente di confermare le curve di amplificazione di tutti i campioni positivi.

Per finalizzare l'analisi e prevenire ulteriori modifiche da parte dell'utente

- > Selezionare **Authorise Analysis** (autorizza analisi)
- > Selezionare **Yes** (sì) per confermare
- Per rifiutare o riavviare l'analisi
  - > Selezionare **Restart Analysis** (riavvia analisi) o **Reject Analysis** (rifiuta analisi)
  - > Selezionare l'opzione per confermare

## 21.8 Curva di riferimento

È possibile salvare una curva di riferimento e utilizzarla per confrontare campioni sulla stessa piastra o tra piastre differenti

- Selezionare il campione di interesse nel menu **Well Details** (dettagli pozzetto) o **Target Details** (dettagli target)
- Nel menu del grafico di amplificazione > selezionare 
  - > Selezionare la casella di spunta per il canale di interesse e aggiungere un'etichetta

- > Selezionare **Save** (salva) per aggiungere il segnale come curva di riferimento

Questa curva di riferimento viene quindi visualizzata come collegata al dosaggio nel menu dei **dosaggi** e può essere disattivata in qualsiasi momento.

## 21.9 Panoramica dei risultati

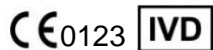
Tabella 28. Interpretazione dei risultati del software di analisi <i>PlexPCR</i> <sup>®</sup> SARS-CoV-2 (scheda Results Overview) (panoramica dei risultati)					
Pozzetto	Nome	Dosaggio	Risultato	Valori Cq	Risultati complessivi
A1	Campione 1_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positivo	RdRp: 25,94 IC:19,17	<b>Campione 1 - Positivo</b> SARS-CoV-2 rilevato.
A2	Campione 2_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Negativo	IC: 18,82	<b>Campione 2 - Negativo</b> SARS-CoV-2 non rilevato. IC valido
A3	N_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Negativo	IC: 18,63	<b>N - Negativo</b> Controllo negativo valido.
A4	Campione 3_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Non valido		<b>Campione 3 - Non valido</b> IC non valido. Estrarre e ripetere di nuovo il test del campione.
A5	Campione 4_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positivo	ORF1ab: 22,75 RdRp: 23,48 IC: 18,79	<b>Campione 4 - Positivo</b> SARS-CoV-2 rilevato.
A6	Campione 5_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positivo	ORF1ab: 22,75 RdRp: 23,48 IC: 18,79	<b>Campione 5 - Positivo</b> SARS-CoV-2 rilevato.
A7	N_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Non valido		<b>N – Non valido</b> Controllo negativo non valido.
A8	Campione 6_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positivo	ORF1ab: 23,08 RdRp: 24,34 IC: 19,42	<b>Campione 6 - Positivo</b> SARS-CoV-2 rilevato.
A9	P_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Positivo	ORF1ab: 18,98 RdRp: 19,97 IC: 18,39	<b>P – Positivo</b> Controllo positivo valido.
A10	P_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Non valido		<b>P – Non valido</b> Controllo positivo non valido
A11	Campione 7_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Non valido	IC: 18.83	<b>Campione 7_CoV – Non valido</b> Errore: Cambiamento anomalo nel livello di fluorescenza.
A12	Campione 8_CoV	PlexPCR SARS-CoV-2	Non valido		<b>Campione 8_CoV – Non valido</b> <b>Il campione è stato rifiutato</b>



### 21.10 Esportazione dei risultati

- Per esportare i risultati
  - > Selezionare **Exports** (esportazioni) nella barra del flusso di lavoro
  - > Esportare uno o più dei seguenti tipi di rapporto: **Cq values list (elenco valori Cq, CSV)**, **Results (risultati, CSV)**, **Generic Amplification CSV** (amplificazione generale, CSV) o il file di integrazione LIS appropriato.
  - > Selezionare **Exports** (esportazioni)
- Per scaricare le esportazioni
  - > Selezionare **Reports** (rapporti) nella barra del flusso di lavoro
  - > Selezionare i file e salvare
- In alternativa, esportare un rapporto personalizzato
  - > Esportare **Amplification Curve Analysis** (analisi curva di amplificazione, PDF)
  - > Selezionare le informazioni incluse desiderate (grafici, audit trail, panoramica dei risultati)
  - > Selezionare le impostazioni del rapporto desiderate per personalizzare l'ordine dei campioni
- Selezionare **Exports** (esportazioni)
  - > Aprire in **Report Viewer** (visualizzatore rapporti) per visualizzare, salvare e stampare

## 22 Glossario



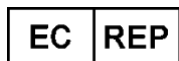
Conformità europea  
Per uso diagnostico *In Vitro*



Numero di catalogo



Numero di lotto



Rappresentante autorizzato  
Nella Comunità Europea



Produttore



Data di produzione



Limitazione di temperatura



Contenuto sufficiente per  
xxx determinazioni



Data di scadenza



Importatore



Conformità del Regno Unito

I prodotti SpeedX possono essere coperti da uno o più brevetti locali o stranieri. Visitare il sito [www.plexpcr.com/patents](http://www.plexpcr.com/patents) per le informazioni complete sui brevetti.

**PlexPCR**<sup>®</sup>, **PlexZyme**<sup>®</sup> e **PlexPrep**<sup>™</sup> sono marchi registrati di proprietà di SpeedX. Altri marchi di fabbrica e copyright sono di proprietà dei rispettivi titolari.

© Copyright 2023 SpeedX Pty. Ltd.