

DIAGNOVITAL

Kit di Rilevamento Mutazione SARS-CoV-2 N501Y

Rilevamento Qualitativo Basato su RT-PCR delle Varianti SARS-CoV-2 N501Y

Solo per uso di ricerca. Non per l'uso in procedure diagnostiche.

RUO

REF



090R01025 25 test

090R01050 50 test

090R01100 100 test

Sommario

Uso Previsto	3
Descrizione del Prodotto	3
Materiali Forniti	4
Materiali Aggiuntivi Richiesti	4
Magazzinaggio	4
Caratteristiche prestazionali	6
Considerazioni Prima di Iniziare	7
Preparazione del Campione.....	8
Configurazione della Reazione.....	10
Analisi e Risoluzione dei Problemi	11
Risoluzione dei Problemi	12
Limitazioni	12
Marchi Commerciali	12
Simboli.....	13



Uso Previsto

DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y è un test in tempo reale basato su RT-PCR per il rilevamento e la discriminazione della mutazione N501Y di SARS-CoV-2 in campioni respiratori. **Questo kit è progettato per eseguire solo campioni che in precedenza hanno dimostrato di essere positivi al SARS-CoV-2.**

DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y rileva la mutazione N501Y nell'RNA di SARS-CoV-2 estratto da campioni di tampone nasofaringeo e orofaringeo durante l'infezione. Risultati positivi indicano la presenza di SARS-CoV-2. L'RNA rileva una singola mutazione puntiforme dovuta allo scambio dell'aminoacido Asparagina (N) con la tirosina (Y) nella proteina spike in posizione 501. La mutazione in posizione 501 si trova in un lignaggio variante. Tuttavia lo scambio con la tirosina è specifico per il lignaggio B.1.1.7 del Regno Unito e può aiutare la distinzione precisa dei diversi tipi di varianti di SARS-CoV-2, sia i tipi selvatici che quelli mutanti condividono quest'ultima sostituzione. La mutazione è nella proteina spike che si trova nel Receptor Binding Domain (RBD) ed è emersa in un lignaggio a rapida diffusione (B.1.1.7) che aumenta di 20 volte l'affinità per l'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) wild type. Questa mutazione sembra avere un impatto sulla risposta immunitaria del corpo e possibilmente sull'efficacia del vaccino. Gli anticorpi monoclonali e derivati dal siero sono riportati meno efficaci nella neutralizzazione del virus che porta la mutazione N501Y.

Descrizione del Prodotto

DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y è un sistema di rilevamento e discriminazione basato su RT-PCR in tempo reale per la variante SARS-CoV-2 N501Y. **Questo kit è progettato per eseguire solo campioni che in precedenza hanno dimostrato di essere positivi al SARS-CoV-2.**

DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y rileva la presenza di RNA umano specifico della sequenza che funge da controllo dell'estrazione umana (HEC) e rileva SNP 501N di tipo selvatico e SNP Y501 in due canali diversi.

RILEVAMENTO DI SARS-CoV-2 BASATO SU PCR IN TEMPO REALE

Il primo passo nella rilevazione della mutazione SARS-CoV-2 N501Y è la conversione dell'RNA virale in cDNA. Successivamente, le sequenze bersaglio virale e l'HEC vengono amplificate contemporaneamente in una reazione con amplificazione monitorata in tempo reale mediante l'uso di sonde marcate con fluorescenza: dopo l'incorporazione nei filamenti di DNA appena amplificati, il fluoroforo viene rilasciato e si può osservare un aumento del segnale di fluorescenza.

Con **DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y**, la discriminazione tra i bersagli virali viene ottenuta attraverso l'uso di due diversi fluorofori che vengono rilevati in due diversi canali: FAM™ per tipo selvaggio SARS-CoV-2 501N, HEX/VIC per la mutazione 501Y e l'HEC viene rilevato nel canale Cy5.

A causa del tasso di mutazione intrinseco dei virus, è possibile che si verifichino mutazioni nella sequenza bersaglio e si accumulino nel tempo. Ciò può portare a risultati falsi negativi con un approccio di rilevamento basato su PCR.



DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y è convalidato con Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx e compatibile con BioRad CFX96, Applied Biosystems Quant Studio 5 Real-Time PCR Systems calibrato FAM™, HEX/VIC e canali Cy5.

Materiali Forniti

	Reagenti	Quantità e Volume (25 test)	Quantità e Volume (50 test)	Quantità e Volume (100 test)
1	PCR Master Mix	1 × 375 µl	1 × 750 µl	1 × 1500 µl
2	Controllo Positivo	1 × 38 µl	1 × 75 µl	1 × 150 µl
3	Privo di Nucleasi dH ₂ O	1 × 38 µl	1 × 75 µl	1 × 150 µl

Tabella 1: Contenuto PCR del Kit delle Mutazioni di DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y



IMPORTANTE! La tabella sopra riflette la combinazione di colori del kit standard. A causa di problemi con i fornitori durante la crisi COVID-19, i singoli colori dei tappi delle provette possono essere sostituiti a causa della disponibilità. Controllare sempre l'etichettatura del reagente prima dell'uso.

Materiali Aggiuntivi Richiesti

- Mezzi e attrezzature adatti per l'estrazione degli acidi nucleici
- Sistema di rilevamento PCR in tempo reale dotato di rilevamento FAM™, HEX/VIC e CY5
- Pipette regolabili e puntali per pipette filtrati adatti
- Dispositivi di protezione individuale e spazi di lavoro adeguati per lavorare con campioni potenzialmente infetti
- Decontaminanti di superficie come DNAzap™ (Tecnologia della Vita), DNA Away™ (Fisher Scientific), RNAse Away™ (Fisher Scientific), 10% candeggina (diluizione 1:10 di ipoclorito di sodio commerciale 5,25-6,0%)
- Provette/strisce/piastrine prive di nucleasi per la preparazione di diluizioni, master mix ecc.
- Provette/piastrine/capillari di reazione per PCR in tempo reale

Per **BIO-RAD CFX96** Piastrine PCR a 96 pozzetti con rivestimento rigido e pareti sottili con codici a barre (BIO-RAD, Cat#: HSP-9955), Piastrine PCR a 96 pozzetti con rivestimento rigido a parete sottile (BIO-RAD, Cat#: HSP-9655), guarnizioni adesive Microseal 'B', otticamente trasparenti (BIO-RAD, Cat#: MSB-1001), singole provette per PCR, strisce per provette basse, striscia da 8 provette, profilo basso da 0,2 ml, bianco (BIO-RAD, Cat#: TLS0851), strisce a cappuccio piatto, otticamente trasparenti, striscia a 8 tappi, 0,2 ml (BIO-RAD, Cat#: TCS0803).

Per **Applied Biosystems Quant Studio 5 Dx- Sistema PCR** in tempo reale Quant Studio 5, piastra di reazione ottica a 96 pozzetti MicroAmp® (Thermo Fisher, Cat#: 4306737), pellicola adesiva ottica MicroAmp® (Thermo Fisher, Cat#: 4311971), striscia ottica a 8 tubi MicroAmp®, 0,2 mL (Thermo Fisher, Cat#: 4316567), strisce ottiche MicroAmp® a 8 cappucci (Thermo Fisher, Cat#: 4323032)

- Opzioni di conservazione adatte per reagenti e campioni (4°C, -20°C, -70°C)

Magazzinaggio

- Conservare tutti i componenti a -15°C /-25°C ed evitare più di 3 cicli di congelamento e scongelamento.



- Proteggere la miscela master qPCR dalla luce poiché l'esposizione prolungata può ridurre le prestazioni dei fluorofori.
- Se i componenti del kit sono stati danneggiati durante il trasporto, contattare i Laboratori RTA. Non utilizzare poiché le prestazioni potrebbero essere compromesse.
- Tenere i reagenti separati dal materiale del campione per evitare la contaminazione.
- Non utilizzare dopo la data di scadenza designata.



Caratteristiche prestazionali

Sensibilità Analitica

La sensibilità analitica o il limite di rilevazione per i saggi basati sull'acido nucleico deve essere espresso dal valore di cutoff positivo del 95%. Questa è la concentrazione dell'analita in cui il 95% dei test fornisce risultati positivi a seguito di diluizioni seriali utilizzando un materiale di riferimento. In questo studio la sensibilità analitica è stata analizzata mediante l'uso di una serie di diluizioni di VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 RNA CONTROL (MBC137-R) per il canale tipo selvaggio e VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.1.7 RNA CONTROL (MBC138-R) per il canale mutante. Le diluizioni sono state effettuate mediante campione di RNA clinico negativo. Ogni diluizione è stata testata con 23 repliche. QuantStudio 5-DX Tempo Reale Sistemi di PCR è stato utilizzato per l'amplificazione, il rilevamento del segnale e l'analisi dei risultati. L'analisi probit è stata eseguita dal programma IBM SPSS Statistics 27. I risultati sono riportati nella tabella sottostante.

Tabella 1: DIAGNOVITAL N501Y Rilevamento della mutazione - Valori del limite di rilevamento (LoD) e intervalli di confidenza del 95%

Gene bersaglio	Limite di Rilevamento (copie/ml)	Limite inferiore di confidenza del 95%	Limite superiore di confidenza del 95%
N501	4839.214	3429.205	8937.276
501Y	6092.285	4797.293	9125.916

Specificità diagnostica

Un totale di 168 campioni clinici raccolti da pazienti con sintomi di Covid sono stati analizzati con **DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y** e i risultati sono stati confrontati con l'analisi di sequenziamento di nuova generazione. 109 dei campioni sono risultati positivi e 58 di essi negativi con entrambi i metodi per la mutazione N501Y. Un campione N501Y negativo non ha fornito alcuna amplificazione per nessuno dei bersagli mutanti e di tipo selvatico a causa di un'altra mutazione nella regione bersaglio, quindi il risultato è stato inconcludente. L'accordo percentuale positivo (PPA) di DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni iSARS-CoV-2 N501Y rispetto a NGS è del 98,31% e l'accordo percentuale negativo (NPA) è 100%. Tutti i controlli interni (RNAseP) sono risultati positivi.

Tampone NP		Comparatore (NGS e qPCR)	
		Mutante	Tipo Selvaggio
DIAGNOVITALE SARS-CoV-2 N501Y Kit di Rilevamento delle Mutazioni	Y501	109	0
	N501	0	58
	Non Definito	0	1*
	Totale	109	59

Tabella 3: DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y – Studio di correlazione qPCR NGS



Reattività Crociata

Per esaminare la specificità di un dosaggio, devono essere eseguiti studi di reattività crociata per potenziali marcatori di reattività crociata. In questo studio, la specificità del dosaggio è stata valutata mediante test. 20 organismi di riferimento.

DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y non mostra alcuna reattività crociata con altri potenziali marcatori di cross-reattività indicati nella Tabella 3 di seguito:

Tabella 3: Potenziali marcatori cross-reattivi (reattività crociata) testati nello studio.

Campione	Fonte
Adenovirus umano	NIBSC (Cat. Nr.: 16/324)
Virus parainfluenzale	ATCC VR-93
Influenza A	ATCC VR-95
Influenza A H5N1	ATCC VR-1609
Influenza A H1N1	ATCC VR-1672
Influenza A H3N2	ATCC VR-822
Influenza A H7N7	ATCC VR-1641
Influenza B	ATCC VR-101
Parainfluenza 1	ATCC VR-94
Parainfluenza 2	ATCC VR-92

Campione	Fonte
Parainfluenza 3	ATCC VR-93
Parainfluenza 4	ATCC VR-579
Metapneumovirus umano (hMPV)	ATCC VR-3250SD
Enterovirus umano V71	ATCC VR-1432
Virus respiratorio sinciziale umano	ATCC VR-154
Coronavirus umano NL63	ATCC VR-3263SD
Coronavirus umano HKU1	ATCC VR-3262SD
Coronavirus umano 229E	ATCC VR-740
Betacoronavirus 1 OC43	ATCC VR-1558D
MERS Coronavirus	ATCC VR-3248SD

Considerazioni Prima di Iniziare

BIOSICUREZZA

- Indossare dispositivi di protezione individuale adeguati (ad es. camici, guanti senza polvere, protezione per gli occhi) quando si lavora con campioni clinici.
- L'elaborazione del campione deve essere eseguita in una cabina di sicurezza biologica certificata di classe II seguendo le linee guida di biosicurezza di livello 2 o superiore.
- Per ulteriori informazioni, fare riferimento a:



- Linee guida provvisorie per la raccolta, la manipolazione e l'analisi di campioni clinici da pazienti sotto indagine (PUI) per il nuovo coronavirus 2019 (SARS-COV-2) <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-nCoV/guidelines-clinical-specimens.html>
- La biosicurezza nei laboratori microbiologici e biomedici 6a edizione disponibile su http://www.cd.c.gov/bio_safety_publications/.
- L'uso di **DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y** e la valutazione dei dati sono limitati solo al personale di laboratorio addestrato.
- Una buona pratica di laboratorio è essenziale per prestazioni ottimali di questo dosaggio. Prestare particolare attenzione per evitare la contaminazione dei componenti del kit. Tutti i reagenti devono essere attentamente monitorati per impurità e contaminazione. Eliminare i reagenti sospetti secondo le linee guida e le normative locali.

CAMPIONI

Utilizzare solo campioni appropriati per i test, come ad esempio:

- Campioni respiratori inclusi tamponi nasofaringei/orofaringei e lavaggio broncoalveolare.
- I campioni di tamponi devono essere raccolti solo su tamponi con punta sintetica (come poliestere o Dacron®) con aste in plastica. Non sono ammessi tamponi con alginato di calcio o punte di cotone con aste di legno.

CAMPIONI - MANIPOLAZIONE E CONSERVAZIONE

- I campioni possono essere conservati a 2-8°C fino a 72 ore dopo il prelievo.
- Se si prevede un ritardo nell'estrazione, conservare i campioni a -20°C o a una temperatura inferiore.
- Gli acidi nucleici estratti devono essere conservati a -20°C o meno.

Non utilizzare i campioni se

- non sono stati conservati a 2-8°C (≤ 4 giorni) o congelati a -20°C o meno.
- non sono sufficientemente etichettati o mancano di documentazione.
- non sono adatti a questo scopo (vedi sopra per materiale campione adatto).
- il volume del campione è insufficiente.

Preparazione del Campione

- Le prestazioni dei test RT-PCR dipendono fortemente dalla quantità e dalla qualità dell'RNA modello campione. Si raccomanda vivamente di qualificare e convalidare le procedure di estrazione dell'RNA per il recupero e la purezza prima di testare i campioni.
- **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Kit di Rilevamento delle Mutazioni** è convalidato con il kit di isolamento dell'RNA virale RTA.
- **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 N501Y Kit di Rilevamento delle Mutazioni** è compatibile con Tianlong Genotex96 Extraction System e QIAamp® MinElute Virus Spin Kit, VERSANT® Sample Preparation 1.0 Reagents.
- Sistemi di PCR in Tempo Reale Convalidati: Biosistemi applicati Quant Studio 5 Dx.
- Sistemi di PCR Real Time Compatibili: BioRad CFX96, sistemi di PCR in tempo reale Quant Studio 5 di Applied Biosystems.
- Immagazzinare e conservare i campioni residui e gli acidi nucleici estratti a -20°C o -80°C.
- Scongellare solo il numero di estratti di campione che verranno testati in un solo giorno.
- Non congelare/scongellare l'estratto più di una volta prima del test poiché ogni ciclo di congelamento/scongellamento ridurrà la qualità dell'RNA.
- Potrebbe essere possibile utilizzare direttamente i campioni dei pazienti, a seconda del tipo di campione. Tuttavia,



ciò può richiedere una precedente fase di lisi e la titolazione della quantità sul campione che può essere utilizzata senza inibire la reazione. Questa procedura non è stata convalidata, si raccomanda l'uso di RNA isolato.



Laboratori RTA

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.

Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400

Gebze /Kocaeli /Turchia

Tel: +90 262 648 5300

Fax: +90 262 751 0677

E-mail: rtalabs.com.tr

Web: www.rtalabs.com.tr

Data di Revisione/Numero di Revisione: -/-



Configurazione della Reazione

1. Assicurati che tutte le attrezzature e i dispositivi necessari siano idonei, calibrati e funzionanti prima di iniziare gli esperimenti.
2. Decontaminare le apparecchiature e l'area di lavoro e preparare tutto il necessario per il seguente esperimento per mantenere il flusso di lavoro breve e ripetibile.
3. Accendere il sistema di rilevamento PCR e programmarlo per evitare ritardi dopo aver impostato le reazioni.
4. Scongela tutti i componenti di **DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y** su ghiaccio e mescolare delicatamente ma accuratamente per garantire una distribuzione uniforme dei componenti. Raccogliere il liquido sul fondo della provetta con una rapida rotazione (tramite microcentrifuga).
5. La **PCR Master Mix** fornita con **DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y** è pronta per l'uso. Verrà preparata una reazione per ogni campione. Preparare una reazione separata per il controllo negativo (NTC) e il controllo positivo (PC).

Componente	Volume (µl)
PCR Master Mix	15
RNA Isolato/PC/NTC	5
Totale	20


6. Distribuire **15 µl** di PCR Master Mix sulle strisce/piastra e aggiungere **5 µl sui campioni**. (Un esempio di configurazione è fornito in Fig. 1)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	PC
B	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S89
C	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83	S90
D	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84	S91
E	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85	S92
F	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86	S93
G	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87	S94
H	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88	NTC

Figura 1: Esempio di schema di pipettaggio per la distribuzione di master mix con le singole miscele di analisi

7. Trasferire le reazioni al dispositivo PCR, quindi procedere secondo queste linee guida:



Passo	Cicli	Temperatura	Durata
Trascrizione Inversa	1	50°C	10 minuti
Denaturazione Iniziale	1	95°C	2 minuti
Amplificazione	40	95°C	5 secondi
		60°C* 	30 secondi



*Abilita la raccolta dati per **FAM™** (501N SARS-CoV-2), **HEX/VIC** (N501Y SARS-CoV-2 Mutazione) e Cy5 (HEC).

- Una volta terminata la corsa, non aprire le provette di reazione per evitare la contaminazione e smaltirle secondo le linee guida e le normative locali. Non sterilizzare in autoclave poiché ciò potrebbe contaminare le apparecchiature di laboratorio con ampliconi.

Analisi e Risoluzione dei Problemi

RISULTATI ESEMPLARI

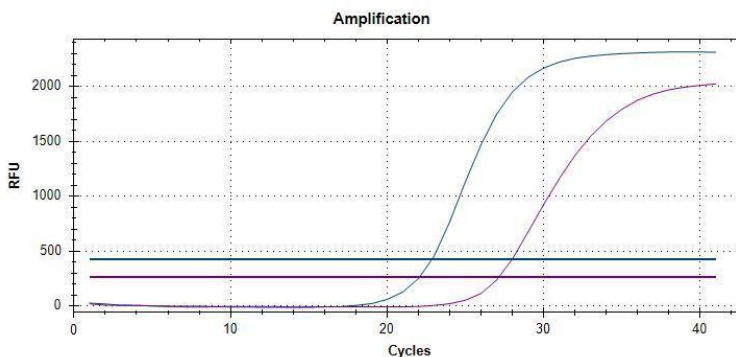


Figura 2: Curve Blu: N501 Campione Tipo Selvaggio sul canale **FAM**, Curve Viola: controllo interno sul canale **Cy5**.



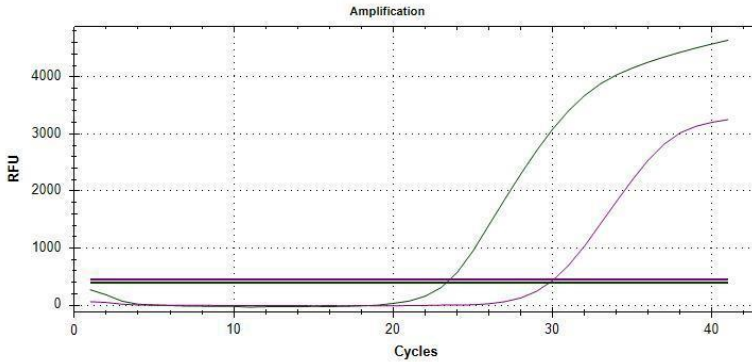


Figura 3: Curve Verdi: Y501 Campione mutante positivo sul canale **HEX**, curve viola: controllo interno presso il **Cy5** canale.

Per i Controlli

- Per il **controllo positivo**, deve essere osservato un **Ct positivo ai canali FAM e HEX/VIC**. Il valore Ct per il **controllo positivo dovrebbe essere 20±3**. Se il valore Ct non corrisponde al valore atteso o il **controllo positivo non è risultato positivo**, la PCR è stata compromessa. Controllare l'impostazione della reazione e le impostazioni del dispositivo PCR e ripetere le reazioni. Cicli ripetuti di congelamento e scongelamento del **controllo positivo** possono comprometterne la qualità con conseguenti valori di Ct tardivi.
- Non si dovrebbe osservare alcuna amplificazione sia nel canale FAM che nel canale HEX per il **controllo negativo (NTC)**. L'amplificazione nel controllo negativo indica che la reazione è contaminata da un campione di RNA/DNA. Le attrezzature e il luogo di lavoro devono essere decontaminati e le reazioni devono essere ripetute.

Interpretazione dei Risultati

- **Tutte le reazioni contenenti RNA isolato devono fornire valori Ct positivi per il test di controllo interno. I valori Ct devono essere < 38 cicli.** La mancata amplificazione del controllo interno indica un'estrazione dell'RNA difettosa o una perdita dell'isolato di RNA a causa della contaminazione da RNasi. Il campione non è sufficiente, i risultati non possono essere interpretati.
- **Affinché un campione possa essere considerato negativo per il Tipo Selvaggio N501 SARS-CoV-2, il canale FAM™ deve fornire un valore Ct positivo.** L'amplificazione dell'HEC nel canale **Cy5** è prevista intorno a Ct 20-38. Se l'HEC non si amplifica, il campione deve essere considerato comunque positivo. L'inibizione del controllo interno è possibile, ad esempio, se ha un'elevata carica virale o se il campione è derivato da colture cellulari anziché di origine umana. Se il valore Ct del campione è >38, il campione può essere valutato come negativo.
- **Affinché un campione possa essere considerato positivo per la Mutazione N501 SARS-CoV-2, il canale HEX/VIC deve fornire un valore Ct positivo.**



- Se Ct è <38 per ciascuno dei canali FAM, VIC e CY5, il risultato nel rispettivo canale deve essere considerato **POSITIVO**, se Ct è > 38 o non viene ricevuto alcun valore, il risultato nel relativo canale deve essere considerato come **NEGATIVO**.

FAM	HEX/VIC	Cy5	Risultato
-	-	+	Il campione è negativo per SARS-CoV-2. Questo kit è progettato per funzionare solo su campioni che in precedenza hanno dimostrato di essere positivi al SARS-CoV-2. -Assicurarvi che il campione sia SARS-CoV-2 positivo. -Si raccomandano variazioni nell'analisi della sequenza delle regioni di legame della sonda con un metodo diverso.
+	-	+	Il campione è positivo per il tipo selvaggio N501, SARS-CoV-2.
-	+	+	Il campione è positivo per la variazione Y501, SARS-CoV-2.
-	-	-	L'assenza di amplificazione in alcun canale indica un isolamento difettoso dell'RNA, la degradazione del campione o l'inibizione della PCR. I risultati non possono essere interpretati. -L'RNA può essere degradato durante il trasporto, l'estrazione o la conservazione.
+	+	-	Risultato atteso per il Controllo Positivo (TPC).
-	-	-	Risultato atteso per il Controllo Negativo (NTC).

Configurazione del Dispositivo

Per **QUANTSTUDIO5DX**, nella schermata Home, creare o aprire un modello. Nel riquadro Nuovo esperimento, fai clic sul pulsante Crea nuovo esperimento per creare un nuovo modello. Nella scheda Proprietà, inserisci le informazioni sul modello. Nella scheda Metodo, regolare il volume di reazione e impostare il profilo termico appropriato. Nella scheda Lastra (Configurazione Rapida), assegnare gli attributi della lastra selezionando il Riferimento passivo dall'elenco a discesa. Nella scheda Plate (Configurazione Rapida), definire e assegnare gli attributi dei pozzetti e selezionare i pozzetti nel Plate Layout o nella Well Table. Quindi assegnare campioni e target ai pozzetti selezionati.



Nota: I nuovi nomi di campioni o target immessi nella sottoscheda Quick Setup (Configurazione Rapida) vengono popolati automaticamente con i valori predefiniti per Reporter come FAM, per Quencher come NFQ-MGB e per Task come Sconosciuto. Modifica questi valori nella sottoscheda Configurazione avanzata. Per le sonde TaqMan, l'opzione NFQ-MGB deve essere utilizzata come quencher. Quindi avvia la corsa.

Per **BIORAD CFX 96**, nell'applicazione Software, aprire il protocollo dalla voce di menu File. Creare il protocollo appropriato per il kit che si intende utilizzare. Nella scheda Plate, definire e assegnare gli attributi dei pozzetti e selezionare i pozzetti nel Plate Layout o nella Well Table. Quindi assegnare campioni e target ai pozzetti selezionati. Quindi avvia la corsa.

Impostazioni di Base e Soglia

Dopo la corsa,

Per **QUANTSTUDIO5DX**, fare clic sul pulsante Show Plot Settings per modificare il tipo di grafico da scala logaritmica a scala lineare. Il target può essere modificato nella sezione Target. Quindi fare clic sul pulsante Impostazioni analisi per regolare la soglia della linea di base. Deselezionare la soglia automatica e deselezionare la linea di base automatica. Impostare il ciclo di inizio della linea di base su 7-8 e il ciclo di fine della linea di base su 20 per normalizzare la grafica.

Per **BIORAD CFX 96**, la soglia può essere regolata in base al rapporto tra l'altezza del segnale FAM e HEX.

La linea di base della curva di amplificazione è uno dei parametri che possono influenzare i risultati della PCR. Nel caso in cui la linea di base sia impostata in modo errato, è possibile visualizzare un valore Ct anche se non si è verificata una reale amplificazione. La soglia automatica viene utilizzata con **DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 N501Y** per i sistemi di rilevamento PCR. Se l'aumento di un campione in qualsiasi canale è inferiore al **10% dell'aumento** del campione in aumento più alto nello stesso canale, tale aumento è considerato **NEGATIVO**. In alcuni casi, la soglia deve essere impostata manualmente per evitare la fluorescenza di fondo. Per ogni campione deve essere verificato il rapporto tra l'altezza del segnale FAM e HEX; il segnale che supera l'altro di 3 volte o più dovrebbe essere considerato positivo, poiché solo uno di essi dovrebbe amplificarsi.



Risoluzione dei Problemi

PROBLEMA	RAGIONI POTENZIALI	SOLUZIONE
Risultato Negativo per il Controllo Interno	La PCR Master Mix potrebbe non essere stata omogenea.	Il pipettaggio deve essere eseguito per la PCR Master Mix.
	L'isolamento dell'RNA potrebbe non essere eseguito correttamente.	Lo studio deve essere ripetuto dall'isolamento.
	L'isolato può includere un inibitore.	La fase di Tempo Reale PCR deve essere ripetuta diluendo l'isolato 1/10.
Sono stati osservati aumenti positivi dei campioni di NTC	Potrebbe essersi verificata una contaminazione.	Potrebbe essersi verificata una contaminazione dall'area di lavoro ai materiali di consumo su cui si sta lavorando. Si consiglia di smaltire i materiali di consumo e aprirne di nuovi e pulire l'ambiente prima con una soluzione di NaClO al 10% e poi con Alcol al 70%.

Limitazioni

- Questo kit è progettato per eseguire solo campioni che in precedenza hanno dimostrato di essere positivi al SARS-CoV-2.
- Per risultati affidabili, è essenziale attenersi alle linee guida fornite in questo manuale. Le modifiche alla configurazione della reazione o al protocollo di ciclo possono portare a esperimenti falliti.
- A seconda della matrice del campione, gli inibitori possono essere presenti nell'RNA isolato e disabilitare la trascrizione inversa e/o l'amplificazione PCR. In tal caso, può essere utile un altro tipo di campione o metodo di isolamento.
- Mutazioni spontanee all'interno della sequenza target possono causare il mancato rilevamento della sequenza bersaglio.
- I risultati devono essere sempre interpretati in considerazione di tutti gli altri dati raccolti da un campione. L'interpretazione deve essere eseguita da personale addestrato ed esperto in questo tipo di esperimento.

Marchi Commerciali

QIAamp® (QIAGEN, DNAZap™ (Tecnologia della Vita), DNA Away™, RNase Away™

Nomi registrati, marchi, ecc. utilizzati in questo documento, anche se non specificamente contrassegnati come tali, non sono da considerarsi non tutelati dalla legge.



Simboli



Data di Scadenza



Lotto



Numero di Catalogo



Limitazione della Temperatura



Causione



Produttore



Solo per Uso di Ricerca.



Consultare le istruzioni per l'uso o
consultare le istruzioni per l'uso
elettroniche



Contiene una quantità sufficiente per (n)
test di quantità



**RTA LABORATUVARLARI
BİYOLOJİK ÜRÜNLER İLAÇ VE**

MAKİNE SAN. TİC. A.Ş.

GEPOSB Cumhuriyet Cad. No:3

41400 Gebze / Kocaeli / Turchia

Tel: +90 262 648 5300

E-mail: rta@rtalabs.com.tr

Web: www.rtalabs.com.tr



Laboratori RTA

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.

Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. Nr:3 41400

Gebze /Kocaeli /Turchia

Tel: +90 262 648 5300

Fax: +90 262 751 0677

E-mail: rta@rtalabs.com.tr

Web: www.rtalabs.com.tr

Data di Revisione/Numero di Revisione: -/-

