

# DIAGNOVITAL

## Kit di Rilevamento Mutazione SARS-CoV-2 P681H

Rilevamento Qualitativo Basato su RT-PCR della Mutazione  
SARS-CoV-2 P681H

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

**RUO**

**REF**



090R17025 25 test

090R17025 50 test

090R17100 100 test

## Sommario

|   |    |
|---|----|
| Uso Previsto .....                      | 3  |
| Descrizione del Prodotto.....           | 3  |
| Materiali Forniti.....                  | 4  |
| Materiali Aggiuntivi Richiesti .....    | 4  |
| Magazzinaggio .....                     | 4  |
| Caratteristiche di Prestazione.....     | 5  |
| Considerazioni Prima di Iniziare.....   | 5  |
| Preparazione del Campione .....         | 7  |
| Configurazione della Reazione .....     | 7  |
| Analisi e Risoluzione dei Problemi..... | 9  |
| Limitazioni .....                       | 11 |
| Marchi Commerciali.....                 | 12 |
| Simboli .....                           | 13 |



Laboratori RTA

**Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.**  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Turchia **Phone:** +90 262 648 5300  
**Fax:** +90 262 751 0677 **E-mail:** [rt@rta labs.com.tr](mailto:rt@rta labs.com.tr)  
**Web:** [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
Data di Revisione/Numero di Revisione RTA: 0



## Uso Previsto

**DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 P681H** è un test in tempo reale basato su RT-PCR per il rilevamento e la discriminazione della mutazione P681H 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 P681H** rileva la mutazione P681H nell'RNA estratto di SARS-CoV-2, da campioni di tampone nasofaringeo e orofaringeo durante l'infezione. I risultati positivi indicano la presenza di RNA SARS-CoV-2 e consentono P681H nella proteina Spike. La proteina Spike di SARS-CoV-2 di tipo selvatico ha l'aminoacido prolina (P) nella posizione 681, mentre la variante di SARS-CoV-2 ha l'aminoacido istidina (H) nella posizione 681.

La mutazione P681H è stata scoperta in campioni provenienti da tutto il mondo già nel marzo 2020, tra cui Nigeria, Hawaii e, più recentemente, tre varianti indipendenti a New York, e caratterizza anche il VOC B.1.1.7 a diffusione globale. Si pensa che la mutazione P681H aumenti la trasmissibilità del virus facilitando un cambiamento conformazionale nella proteina S dopo l'attività della proteasi sulla membrana cellulare perché fa parte di un sito di scissione della proteasi furin e furinlike alla giunzione del legame del recettore della proteina spike (S1) e fusione (S2). Inoltre, la variante A.23.1, che è stata identificata come linea dominante in Uganda, e la famiglia di varianti B.1.617, che è stata identificata in India, hanno entrambe acquisito la mutazione P681R nella stessa posizione.

## Descrizione del Prodotto

**DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 P681H** è un sistema di rilevamento e discriminazione basato su RT-PCR in tempo reale per la mutazione SARS-CoV-2 P681H. **Questo kit è progettato per funzionare solo su campioni che in precedenza hanno dimostrato di essere positivi al SARS-CoV-2.**

**DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 P681H** rileva anche la presenza di un bersaglio umano specifico della sequenza (RNAseP) che funge da controllo dell'estrazione umana (HEC) oltre alle sequenze di tipo selvaggio (P681) e mutante (H681) in diversi canali.

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

Il primo passo nella rilevazione della mutazione SARS-CoV-2 P681H è la conversione dell'RNA virale in cDNA. Successivamente, le sequenze virali bersaglio e l'RNAseP (HEC) vengono amplificate contemporaneamente in un'unica reazione con amplificazione monitorata in tempo reale mediante l'uso di sonde marcate con fluorescenza: all'incorporazione nei filamenti di DNA appena amplificati, il fluoroforo viene rilasciato e un aumento della fluorescenza segnale può essere osservato.

Con **DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 P681H**, la differenziazione tra i bersagli virali è ottenuta attraverso l'uso di due diversi fluorofori che vengono rilevati in tre diversi canali: FAM™ per SARS-CoV-2 P681 di tipo selvaggio, HEX/VIC per la mutazione H681 e l'RNAseP (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 P681H** 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.



Laboratori RTA

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Turchia Phone: +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rt@rta labs.com.tr](mailto:rt@rta labs.com.tr)  
Web: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
Data di Revisione/Numero di Revisione RTA: 0



## Materiali Forniti

Tabella 1: Contenuto del kit DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 P681H Mutazione PCR

|   | 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 <sub>2</sub> O | 1 × 38 µl                   | 1 × 75 µl                   | 1 × 150 µl                   |



**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™ (Life Technologies), DNA Away™ (Fisher Scientific), RNase Away™ (Fisher Scientific), candeggina al 10% (diluizione 1:10 di ipoclorito di sodio commerciale 5,25-6,0%)
- Provette/strisce/piastre prive di nucleasi per la preparazione di diluizioni, master mix ecc.
- Provette/piastre/capillari di reazione per PCR in tempo reale

Per **BIO-RAD CFX96** Piastre PCR a 96 pozzetti con rivestimento rigido e pareti sottili con codici a barre (BIO-RAD, Cat#: HSP-9955), Piastre 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), striscia 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.



Laboratori RTA

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Turchia Phone: +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rt@rta labs.com.tr](mailto:rt@rta labs.com.tr)  
Web: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
Data di Revisione/Numero di Revisione RTA: 0



## Caratteristiche di Prestazione

### Sensibilità analitica

Il limite di rilevabilità per i test 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 (21MBC137002-R) per il canale wild type e VIRCELL AMPLIRUN® SARS-CoV-2 B.1.1.7 (21MBC138001-R) RNA CONTROL per 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 proibit è stata eseguita dal programma IBM SPSS Statistics 27. I risultati sono riportati nella tabella sottostante.

Tabella 2: DIAGNOVITAL P681H 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% |
|----------------|----------------------------------|--|--|
| P681           | 5460,957                         | 4443,903                               | 7453,119                               |
| H681           | 6085,187                         | 5343,253                               | 11423,383                              |

### Specificità diagnostica

Un totale di 24 campioni clinici raccolti da pazienti con sintomi di Covid sono stati analizzati con **DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 P681H** e i risultati sono stati confrontati con l'analisi di sequenziamento di nuova generazione. 24 di loro sono risultati positivi per la mutazione P681H. L'accordo percentuale positivo (PA) di DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 P681H Mutation Detection Kit rispetto a NGS è del 100%. Tutti i controlli interni (RNaseP) sono risultati positivi.

Tabella 3. DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 P681R – Studio di correlazione NGS qPCR

| Tampone NP   |        | Comparatore (NGS e qPCR) |                |
|--|--------|--------------------------|----------------|
|  |        | Mutante                  | Tipo Selvaggio |
| DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 P681H Kit di Rilevamento delle Mutazioni | R681   | 0                        | 0              |
|  | H681   | 0                        | 24             |
|  | Totale | 0                        | 24             |

## 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:



Laboratori RTA

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Turchia Phone: +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rta@rta labs.com.tr](mailto:rta@rta labs.com.tr)  
Web: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
Data di Revisione/Numero di Revisione RTA: 0



- 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/lab/guidelines-clinical-specimens.html>
- La sesta edizione della biosicurezza nei laboratori microbiologici e biomedici è disponibile all'indirizzo <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/>.
- L'uso di **DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 P681H** 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 compreso nasofaringeo/orofaringeo.
- 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 nel processo di 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.



Laboratori RTA

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Turchia Phone: +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rt@rta labs.com.tr](mailto:rt@rta labs.com.tr)  
Web: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
Data di Revisione/Numero di Revisione RTA: 0



## 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 P681H Kit di Rilevamento delle Mutazioni** è convalidato con il kit di isolamento dell'RNA virale RTA.
- **DIAGNOVITAL® SARS-CoV-2 P681H Kit di Rilevamento delle Mutazioni** è compatibile con il sistema di estrazione Tianlong Generotex96 e il kit QIAamp® MinElute Virus Spin.
- Sistemi di PCR in Tempo Reale Convalidati: Biosistemi applicati Quant Studio 5 Dx.
- Sistemi PCR Real Time compatibili BioRad CFX96, Applied Biosystems Quant Studio 5 Sistemi PCR Real Time.
- 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.

## Configurazione della Reazione

1. Assicurarsi 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. Scongellare tutti i componenti di **DIAGNOVITAL® Kit di Rilevamento delle Mutazioni SARS-CoV-2 P681H** 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 P681H** 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 (TPC).

| Componente          | Volume (µl) |
|---------------------|-------------|
| PCR Master Mix      | 15          |
| RNA Isolato/TPC/NTC | 5           |
| <b>Totale</b>       | <b>20</b>   |




6. Distribuire 15 µl di PCR Master Mix sulle strisce/piastra e aggiungere 5 µl sui campioni. (Un esempio di configurazione è fornito in Fig1).

|   |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|   | 1  | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
| A | S1 | S9  | S17 | S25 | S33 | S41 | S49 | S57 | S65 | S73 | S81 | TPC |
| 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:

**Tabella 4: Profilo termico del Kit di Rilevamento delle Mutazioni DIAGNOVITAL SARS-CoV-2 L452R**

| 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™** (Wild Type P681 SARS-CoV-2), **HEX/VIC** (H681 SARS-CoV-2 Mutation) e **Cy5** (HEC).

8. 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

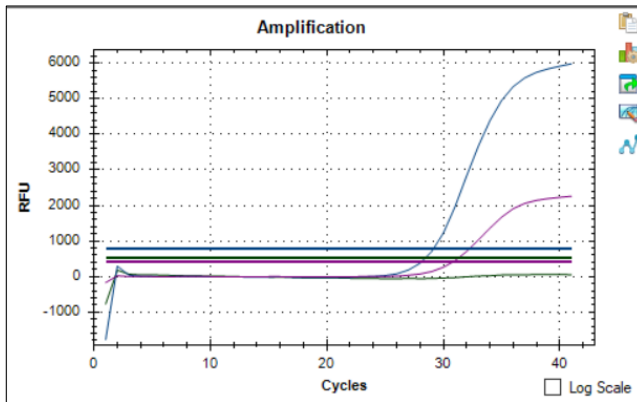


Figura 2: Curve Blu: P681 Campione Wild Type al canale FAM, Purple Curves: controllo interno al canale Cy5.

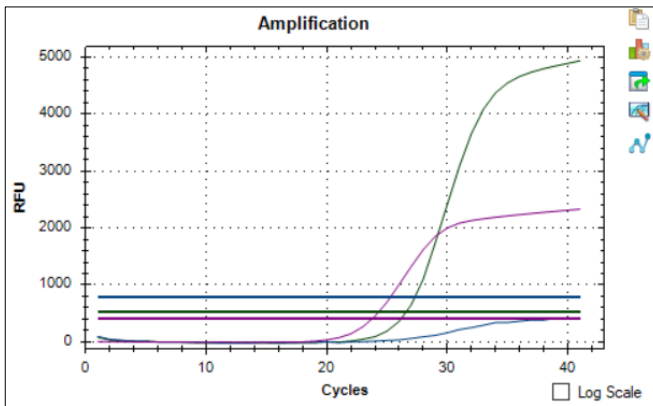


Figura 3: Curve Verdi: H681 Campione mutante positivo al canale HEX, Purple Curves: controllo interno al Cy5 canale.

- I controlli dH2O (NTC) non devono dare un Ct positivo per nessun dosaggio. Se lo fanno, la reazione è stata contaminata con il campione di RNA/DNA. Decontaminare l'attrezzatura e l'area di lavoro e ripetere le reazioni.
- Tutte le reazioni contenenti RNA isolato devono fornire valori Ct positivi per il test di controllo interno. I valori Ct dovrebbero essere  $\leq 38$  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 la mutazione P681H, i canali FAM™ e Cy5 devono fornire un valore Ct positivo  $\leq 38$  cicli. L'amplificazione dell'HEC nel canale Cy5 è prevista intorno a Ct 20-38.



Laboratori RTA

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Turchia Phone: +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rt@rta labs.com.tr](mailto:rt@rta labs.com.tr)  
Web: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
Data di Revisione/Numero di Revisione RTA: 0



- **Affinché un campione possa essere considerato positivo per la mutazione di P681H, i canali HEX/VIC deve dare un valore Ct positivo ≤ 38 cicli. 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. Questo risultato è possibile quando si ha un titolo virale insolitamente alto, o il campione non era di origine umana, ma derivava da colture cellulari o analizzava la contaminazione superficiale.**
- **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.
- Se Ct è <38 per ciascuno dei canali FAM, HEX/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. <b>Questo kit è progettato per essere eseguito solo su campioni che in precedenza hanno dimostrato di essere positivi a SARS-CoV-2.</b><br>-Assicurarvi che il campione sia SARS-CoV-2 positivo.<br>-Si raccomandano variazioni nell'analisi della sequenza delle regioni di legame della sonda con un metodo diverso. |
| +   | -       | +   | Il campione è <b>negativo per la mutazione P681H.</b>   |
| -   | +       | +   | Il campione è <b>positivo fper la mutazione P681H.</b>  |
| -   | -       | -   | 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.<br>-L'RNA può essere degradato durante il trasporto, l'estrazione o la conservazione.  |
| +   | +       | -   | Risultato atteso per il <b>Controllo Positivo (TPC).</b>  |
| -   | -       | -   | Risultato atteso per il <b>Controllo Negativo (NTC).</b>  |

## 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.



Laboratori RTA

Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Turchia Phone: +90 262 648 5300  
Fax: +90 262 751 0677 E-mail: [rt@rta labs.com.tr](mailto:rt@rta labs.com.tr)  
Web: [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
Data di Revisione/Numero di Revisione RTA: 0



## 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 P681H** per i sistemi di rilevamento PCR. Se l'aumento di un campione in qualsiasi canale è inferiore al **10%** dell'aumento del **Controllo Positivo** 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  |
|--|---|--|
| <b>Risultato Negativo per il Controllo Interno</b> | 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 contenere un inibitore.                             | La fase di Tempo Reale PCR deve essere ripetuta diluendo l'isolato 1/10.   |
| <b>Risultato Positivo per NTC</b>                  | 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

NucliSens® (bioMérieux), QIAamp®, RNeasy® (QIAGEN), ChargeSwitch® (Invitrogen), FAM™ (Technologia della Vita), DNAZap™, 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.



**Laboratori RTA**

**Biyolojik Ürünler İlaç ve Makine San. Tic. A.Ş.**  
Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400  
Gebze /Kocaeli /Turchia **Phone:** +90 262 648 5300  
**Fax:** +90 262 751 0677 **E-mail:** [rt@rta labs.com.tr](mailto:rt@rta labs.com.tr)  
**Web:** [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)  
Data di Revisione/Numero di Revisione RTA: 0



## Simboli



Data di scadenza



Lotto/Parte



Numero di catalogo



Limite di temperatura



Attenzione



Produttore



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



Contiene una quantità sufficiente per (n)  
test di quantità



Solo per Uso di Ricerca.



**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](mailto:rta@rtalabs.com.tr)

Web: [www.rtalabs.com.tr](http://www.rtalabs.com.tr)



**Laboratori RTA**

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

Plastikçiler Organize Sanayi Bölgesi Cumhuriyet Cad. No:3 41400

Gebze /Kocaeli /Turchia **Phone:** +90 262 648 5300

**Fax:** +90 262 751 0677 **E-mail:** [rta@rtalabs.com.tr](mailto:rta@rtalabs.com.tr)

**Web:** [www.rta labs.com.tr](http://www.rta labs.com.tr)

**Data di Revisione/Numero di Revisione RTA:** 0

