

## SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® Kit

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

REF RTS171ING



IVD



### SOMMARIO

USO PREVISTO  
PRINCIPIO DEL SAGGIO  
DESCRIZIONE DEL PRODOTTO  
MATERIALE INCLUSO NEL PRODOTTO  
MATERIALE RICHIESTO NON INCLUSO NEL PRODOTTO  
ALTRI PRODOTTI RICHIESTI  
AVVERTENZE E PRECAUZIONI  
CAMPIONI E CONTROLLI  
PROCEDURA  
CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI  
BIBLIOGRAFIA  
LIMITI DELLA PROCEDURA  
PROBLEMI E SOLUZIONI  
LEGENDA DEI SIMBOLI  
AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

pag. 1  
pag. 2  
pag. 3  
pag. 3  
pag. 3  
pag. 4  
pag. 4  
pag. 5  
pag. 6  
pag. 13  
pag. 20  
pag. 20  
pag. 21  
pag. 23  
pag. 24

### USO PREVISTO

Il prodotto «SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® Kit» è parte di un saggio multiplex qualitativo di trascrizione inversa / amplificazione degli acidi nucleici e analisi delle curve di melting, per la rilevazione e la tipizzazione delle mutazioni E484K, E484Q and N501Y del gene S del Coronavirus 2 da Sindrome Respiratoria Acuta Grave (SARS-CoV-2) in campioni clinici di soggetti con infezione in corso.

Il saggio permette di rilevare le mutazioni associate alle seguenti varianti: Alpha variant (UK) lineage B.1.1.7, Beta variant (South Africa) lineage B.1.351, Zeta variant (Brazil) lineage P2, Gamma variant (Japan) lineage P1, Eta variant (Nigeria) lineage B.1.525 e Kappa variant (India), lineage B.1.617.1.

Il saggio è stato validato partendo da campioni di tamponi respiratori (tamponi naso-faringei, tamponi nasali, tamponi oro-faringei).

Il prodotto trova impiego come test reflex per l'identificazione della eventuale presenza delle mutazioni N501Y, E484K and E484Q del gene S del SARS-CoV-2, in campioni già diagnosticati positivi per SARS-CoV-2.

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

REF

RTS171ING

### PRINCIPIO DEL SAGGIO

Il saggio consiste in una reazione multiplex di trascrizione inversa e di amplificazione real time (metodica one-step) effettuata con **ELITE InGenius®**, strumento automatico ed integrato per l'estrazione, la trascrizione inversa, l'amplificazione e la rilevazione degli acidi nucleici e l'interpretazione dei risultati.

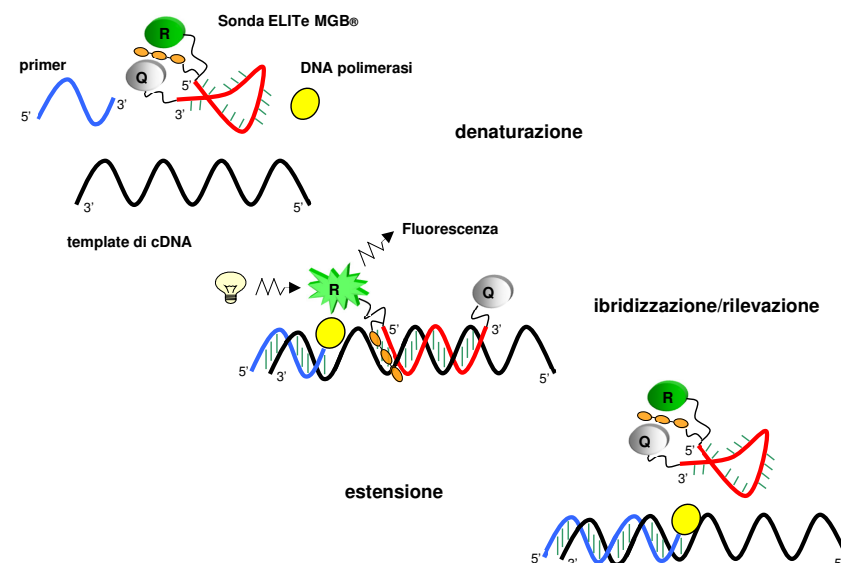
Partendo dal RNA estratto dal campione oggetto di analisi con l'ausilio di **ELITE InGenius®** e mediante il reagente **CoV-2 Variants PCR Mix** viene eseguita una reazione di trascrizione inversa ed amplificazione specifica per il gene S di SARS CoV-2 al fine di identificare i seguenti target:

- codone 484 rilevato dalla sonda specifica 484 (Canale 1)
- codone 501 rilevato dalla sonda specifica 501 (Canale 4),

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

Le sonde specifiche per i target 484 e 501, basate sulla tecnologia ELITE MGB®, e marcate con il fluoroforo FAM e AP593, sono attivate quando ibridano con lo specifico prodotto della reazione di amplificazione di SARS CoV-2. L'emissione della fluorescenza aumenta di pari passo con il prodotto specifico della reazione di amplificazione e viene misurata e registrata dallo strumento. L'elaborazione dei dati alla fine dell'amplificazione permette l'analisi della curva di dissociazione. I grafici della fluorescenza sono analizzati per identificare i cicli di soglia (Ct) e le temperature di melting (Tm). L'interpretazione dei risultati d permette di rilevare la presenza del RNA di SARS CoV-2 e delle mutazioni di interesse nel campione di partenza.

La figura seguente illustra in sintesi il meccanismo di attivazione e di emissione della fluorescenza delle sonde che con tecnologia ELITE MGB®. Si fa presente che la sonda non è idrolizzata durante il ciclo di amplificazione.



## DESCRIZIONE DEL PRODOTTO

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

### • CoV-2 Variants PCR Mix

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

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

- il codone **484** di SARS CoV-2. La sonda **484** (canale 1) è marcata con il fluoroforo FAM, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente.
- il codone **501**. La sonda **501** è marcata con il fluoroforo AP593, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente.

La CoV-2 Variants PCR Mix contiene anche gli oligonucleotidi specifici per, il gene umano RNasiP utilizzato come controllo interno (IC) endogeno. La sonda **IC** è marcata con il fluoroforo AP525, stabilizzata dal gruppo MGB® e inattivata da un quencher non fluorescente.

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

### • RT EnzymeMix

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

Il prodotto «SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB® Kit» consente di effettuare **96 test** in associazione al sistema **ELiTe InGenius®**, utilizzando **20 µL** per reazione.

## MATERIALI INCLUSI NEL PRODOTTO

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

## MATERIALI RICHIESTI NON INCLUSI NEL PRODOTTO

- Cappa a flusso laminare.
- Guanti senza polvere monouso in nitrile o simili.
- Miscelatore vortex.
- Microcentrifuga da banco (12.000 - 14.000 RPM).
- Micropipette e puntali sterili con filtro per aerosol o a dispensazione positiva (2-20 µL, 5-50 µL, 50-200 µL, 200-1000 µL).
- Tubi Sarstedt 2,0 mL con tappo a vite (Sarstedt ref. 72.694.005).
- Acqua per biologia molecolare.

## ALTRI PRODOTTI RICHIESTI

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

Per l'estrazione automatica degli acidi nucleici, la trascrizione inversa, l'amplificazione real time e l'interpretazione dei risultati delle analisi eseguite sui campioni da analizzare, è richiesto l'impiego dello strumento «**ELiTe InGenius®**» (ELITechGroup S.p.A., EG SpA, cod. INT030) e dei seguenti protocolli analitici specifici (EG SpA):

- parametri per l'amplificazione per il controllo positivo «**SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_PC**»,
- parametri per l'amplificazione per il controllo negativo «**SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_NC**»,
- parametri per i campioni di tamponi respiratori da analizzare «**SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_RsS\_200\_100**»
- cartucce di estrazione «**ELiTe InGenius® SP 200**» (EG SpA., ref. INT032SP200),
- materiali di consumo per estrazione «**ELiTe InGenius® SP 200 Consumable Set**» (EG SpA, ref. INT032CS),
- cassette di amplificazione «**ELiTe InGenius® PCR Cassette**» (EG SpA, ref. INT035PCR),
- puntali «**300 µL Filter Tips Axygen**» (Axygen BioScience Inc., CA, USA, ref. TF-350-L-R-S),
- raccogliitore «**ELiTe InGenius® Waste Box**» (EG SpA, ref. F2102-000).

Come controllo positivo di amplificazione è richiesto l'impiego del prodotto «**SARS-CoV-2 Variants - ELiTe Positive Control**» (EG SpA ref. CTR171ING) soluzione stabilizzata di DNA plasmidici.

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

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

## AVVERTENZE E PRECAUZIONI

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

### Avvertenze e precauzioni generali

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

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

Indossare indumenti protettivi e guanti adatti a proteggersi gli occhi e il viso.

Non pipettare mai le soluzioni con la bocca.

Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici sul posto di lavoro.

Lavarsi accuratamente le mani dopo avere maneggiato campioni e reagenti.

Eliminare i reagenti avanzati e i rifiuti secondo le norme vigenti.

Prima di eseguire il saggio, leggere attentamente tutte le istruzioni fornite con il prodotto.

Durante l'esecuzione del saggio attenersi alle istruzioni fornite con il prodotto.

Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata.

Utilizzare solo i reagenti in dotazione con il prodotto e quelli consigliati dal fabbricante.

Non utilizzare reagenti provenienti da lotti diversi.

Non utilizzare reagenti di altri fabbricanti.

#### Avvertenze e precauzioni per la biologia molecolare

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

È necessario disporre di camici, guanti e strumenti dedicati all'allestimento delle sessioni di lavoro.

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

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

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

Manipolare i prodotti di estrazione in modo tale da ridurre quanto più possibile la dispersione nell'ambiente per prevenire il rischio di contaminazione.

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

#### Avvertenze e precauzioni specifiche per i componenti

##### • CoV-2 Variants PCR Mix

Conservare la miscela **CoV-2 Variants PCR Mix** al buio ad una temperatura inferiore a -20 °C.

Congelare e scongelare la miscela **CoV-2 Variants PCR Mix** per un massimo di **dieci volte** poiché un numero maggiore di cicli di congelamento e scongelamento potrebbe comprometterne le prestazioni.

##### • RT Enzyme

L'**RT EnzymeMix** deve essere conservata ad una temperatura inferiore a -20 °C.

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

### CAMPIONI E CONTROLLI

#### Campioni

Questo prodotto deve essere utilizzato con i seguenti campioni clinici:

#### Tamponi respiratori

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

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

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

**Nota Bene:** quando si esegue l'estrazione dell'RNA da campioni di tampone respiratorio con ELiTe InGenius e con ELiTe InGenius Software versione 1.3.0.16 (o versioni successive equivalenti) utilizzare l'Assay

Protocol **SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_RsS\_200\_100**. Questo protocollo processa 200 µL di campione e eluisce gli acidi nucleici in 100 µL.

#### Sostanze interferenti

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

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

#### Controlli di amplificazione

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

- come Controllo Positivo di amplificazione, utilizzare **SARS-CoV-2 Variants - ELiTe Positive Control** (non fornito con il kit), in associazione con l'Assay Protocol **SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_PC**,
- come Controllo Negativo di amplificazione, utilizzare l'acqua per biologia molecolare (non fornita con il kit) in associazione con l'Assay Protocol **SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_NC**.

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

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

Inoltre i controlli di amplificazione devono essere eseguiti nuovamente quando:

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

#### Controlli di qualità

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

### PROCEDURA

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

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

#### Verifica che il sistema sia pronto

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

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

Il protocollo del saggio disponibile per «**SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB® Kit**» è descritto nella tabella seguente.

Assay Protocol per SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB® Kit			
Nome	Matrice	Risultato	Caratteristiche
SARS-CoV-2 VAR ELiTe_RsS_200_100	Tamponi Respiratori	Positivo / Negativo Wild Type / Mutated	Volume d'Estrazione iniziale: 200 µL Volume Estratto dell'Eluato: 100 µL Controllo Interno: NO Sonicazione: NO Fattore di diluizione: 1 Volume PCR Mix: 20 µL Volume del campione in PCR: 10 µL

Se l'Assay Protocol d'interesse non è presente nel sistema, rivolgersi al Servizio Clienti ELiTechGroup competente per il proprio paese/la propria area geografica.

#### Impostazione della sessione

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

- Corsa integrata (Extract + PCR),
- Corsa di amplificazione (PCR only),
- Corsa di Amplificazione per il Controllo Positivo e il Controllo Negativo (PCR only).

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

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

Prima di iniziare la sessione è necessario:

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

**Nota Bene:** Scongelare la miscela CoV-2 Variants PCR Mix al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

- prelevare al momento dell'uso le provette di **RT EnzymeMix** (tappo con inserto NERO) necessarie per la sessione (il contenuto iniziale di ciascuna provetta è sufficiente per allestire **48 reazioni**). Agitare gentilmente le provette, centrifugarle per 5 secondi per riportare il contenuto sul fondo e tenerle in ghiaccio.

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

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

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

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

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

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

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

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

#### A. Sessione integrata

Per preparare una sessione integrata con estrazione e amplificazione del campione, procedere come segue, come risulta dalla GUI:

- Scongelare a temperatura ambiente (~+25 °C) le provette contenenti i campioni da analizzare e trattarle secondo le linee guida del laboratorio e secondo quanto disposto nel paragrafo "Campioni e controlli".
- Scongelare le provette di **CoV-2 Variants PCR Mix** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 48 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 4 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

**Nota Bene:** Scongelare la miscela **CoV-2 Variants PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

- prelevare al momento dell'uso le provette di **RT EnzymeMix** (tappo con inserto NERO) necessarie per la sessione. Il contenuto iniziale di ciascuna provetta è sufficiente per allestire 48 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 4 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e tenerle in ghiaccio.

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

- Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
- Verificare che l'"Extraction Input Volume" sia di 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia di 100 µL.
- Per ogni "Track" d'interesse compilare il "SampleID" (SID) digitando o scansionando il codice a barre.
- Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (es. SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_RsS\_200\_100).
- Verificare che il protocollo visualizzato sia: "Extract + PCR".
- Selezionare "Extraction tube" nella colonna "Sample Position". Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Nell' "Inventory Block" selezionato caricare il prodotto **CoV-2 Variants PCR Mix** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Nell' "Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Caricare le cassette PCR, le cartucce di estrazione "ELiTe InGenius SP 200", tutti i materiali di consumo necessari e i campioni da estrarre, seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
- Chiudere lo sportello dello strumento.
- Premere "Start" per avviare la sessione.

Una volta completata la procedura, il sistema ELiTe InGenius consente all'operatore di visualizzare, approvare e salvare i risultati, come anche di stampare e salvare il report.

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

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



**Nota Bene:** La miscela completa di reazione può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 2 sessioni di lavoro di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario ad iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

## B. Sessione di amplificazione

Per allestire la sessione di amplificazione partendo dal RNA estratto, procedere come segue, come risulta dalla GUI:

1. Scongellare le provette di **CoV-2 Variants PCR Mix** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 48 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 4 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

**Nota Bene:** Scongellare la miscela **CoV-2 Variants PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. prelevare al momento dell'uso le provette di **RT EnzymeMix** (tappo con inserto NERO) necessarie per la sessione. Il contenuto iniziale di ciascuna provetta è sufficiente per allestire 48 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 4 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e tenerle in ghiaccio.

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

3. Nella schermata Home, selezionare "Perform Run".
4. Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che l'"Extraction Input Volume" sia di 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia di 100 µL.
5. Per ogni Track di interesse compilare il SID digitando o scansionando il codice a barre.
6. Selezionare l'Assay Protocol da utilizzare nella colonna "Assay" (es. SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_RsS\_200\_100).
7. Selezionare "PCR Only" nella colonna "Protocol".
8. Verificare che la posizione da cui caricare il campione riportata nella "Sample Position" sia "Elution Tube". Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
9. Nell' "Inventory Block" selezionato caricare la miscela **CoV-2 Variants PCR Mix** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
10. Nell' "Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Caricare le cassette di PCR e i campioni di acidi nucleici estratti seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
12. Chiudere lo sportello dello strumento.
13. Premere "Start" per avviare la sessione.

Una volta completata la procedura, il sistema **ELiTe InGenius** consente all'operatore di visualizzare, approvare e salvare i risultati, come anche di stampare e salvare il report.

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

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

**Nota Bene:** La miscela completa di reazione può essere conservata nel blocco refrigerato fino a 2 sessioni di lavoro di 3 ore ciascuna e per il tempo necessario ad iniziare una terza sessione di lavoro (7 ore in totale). Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

## C. Sessione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo

Per preparare la sessione di amplificazione per il controllo positivo e il controllo negativo procedere come segue, come risulta dalla GUI:

1. Scongellare le provette di **CoV-2 Variants PCR Mix** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti. Ogni provetta contiene un volume sufficiente per preparare 48 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 4 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.

**Nota Bene:** Scongellare la miscela **CoV-2 Variants PCR Mix** al riparo dalla luce perché il reagente è fotosensibile.

2. prelevare al momento dell'uso le provette di **RT EnzymeMix** (tappo con inserto NERO) necessarie per la sessione. Il contenuto iniziale di ciascuna provetta è sufficiente per allestire 48 reazioni in condizioni ottimali di utilizzo (almeno 4 test per sessione). Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi e tenerle in ghiaccio.

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

3. Scongellare la provetta di **CoV-2 Wild Type Positive** e di **Control CoV-2 Mutant Positive Control** a temperatura ambiente (~+25 °C) per 30 minuti per sessione. Ogni provetta consente un volume sufficiente per preparare 4 reazioni. Mescolare delicatamente, centrifugare le provette per 5 secondi.
4. Trasferire almeno 50 µL di acqua per biologia molecolare in una provetta con soluzione di eluizione, in dotazione con l'ELiTe InGenius SP 200 Consumable Set.
5. Nella schermata "Home", selezionare "Perform Run".
6. Anche se non si esegue alcuna estrazione, verificare che l'"Extraction Input Volume" sia di 200 µL e che l'"Extracted Elute Volume" sia di 10 µL.
7. Nella colonna "Assay", all'interno della "Track" d'interesse, selezionare l'Assay Protocol da utilizzare.
8. Per il controllo positivo selezionare nella colonna "Assay" l'Assay Protocol "SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_PC" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza del SARS-CoV-2 Variants - ELiTe Positive Control.
9. Per il controllo negativo selezionare l'Assay Protocol "SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_NC" e digitare il numero di lotto e la data di scadenza dell'acqua per biologia molecolare.
10. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
11. Nell' "Inventory Block" selezionato caricare la miscela **CoV-2 Variants PCR Mix** seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
12. Nell' "Inventory Area" selezionata caricare/controllare i rack puntali seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
13. Caricare le "PCR Cassette", la provetta per **CoV-2 Wild Type Positive** e di **Control CoV-2 Mutant Positive Control** e la provetta per Negative Control seguendo le istruzioni visualizzate sulla GUI. Fare clic su "Next" per proseguire la preparazione.
14. Chiudere lo sportello dello strumento.
15. Premere "Start" per avviare la sessione.

Una volta completata la procedura, il sistema **ELiTe InGenius** consente all'operatore di visualizzare, approvare e salvare i risultati, come anche di stampare e salvare il report.

**Nota Bene:** Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento il controllo positivo residuo, tappararlo e conservarlo a -20° C. Smaltire il controllo negativo residuo.

**Nota Bene:** Alla fine della sessione, rimuovere dallo strumento le cassette PCR contenenti i prodotti di reazione e altri materiali di consumo e smaltirle facendo attenzione a non contaminare l'ambiente. Attenzione a evitare la fuoriuscita accidentale dei prodotti di reazione.

**Nota Bene:** la miscela completa di reazione può essere conservata nel blocco refrigerato tenendo conto del tempo massimo di 7 ore. Mescolare delicatamente, centrifugare il contenuto per 5 secondi prima di iniziare la sessione successiva.

## Esame ed Esportazione dei risultati

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

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

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

- Validazione dei risultati di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo,
- Validazione dei risultati del campione
- Refertazione dei risultati del campione.

### A. Validazione dei risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo di amplificazione

I segnali di fluorescenza emessi dalle sonde per i target di interesse 484 e 501 (canale "484" e canale "501"), nella reazione di amplificazione del Controllo Positivo e del Controllo Negativo sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi negli Assay Protocols "SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_PC" e "SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_NC".

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

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

I risultati delle corse di amplificazione con Controllo Positivo e Controllo Negativo vengono utilizzati dal software dello strumento per calcolare l'impostazione delle "Control Charts". Sono richiesti i risultati di quattro Controlli Positivi e quattro Controlli Negativi, da quattro sessioni differenti, per impostare la "Control Chart". Dopo di ciò, i risultati del Controllo Positivo e del Controllo Negativo vengono utilizzati per monitorare le prestazioni dello step di amplificazione. Fare riferimento al manuale dello strumento per ulteriori dettagli.

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

**Nota Bene:** Se il Controllo Positivo o del Controllo Negativo è processato insieme ai campioni da analizzare ed il suo risultato non è valido, i campioni possono essere approvati ma i risultati non sono validati. In questo caso anche l'amplificazione dei campioni deve essere ripetuta.

### B. Validazione dei risultati del campione

I segnali di fluorescenza emessi dalla sonda per i geni di interesse (canale 484 e canale 501), e dalla sonda per il Controllo Interno (canale IC) nelle reazioni di amplificazione dei campioni sono analizzati automaticamente e interpretati dal software dello strumento con i parametri inclusi nell'Assay Protocol "SARS-CoV-2 VAR ELiTe\_RsS\_200\_100".

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

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

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

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

I possibili messaggi relativi al risultato di un campione sono riportati nella tabella sottostante. Per ciascun campione il sistema riporta una combinazione dei seguenti messaggi specificando se i target sono rilevati o non rilevati

Risultato della sessione del campione	Interpretazione
CoV2 484: RNA Rilevato. 484E wild type.	L'RNA di SARS-CoV-2 gene S con codone 484E wild type è stato rilevato nel campione.
CoV2 484: RNA Rilevato. 484K mutante.	L'RNA di SARS-CoV-2 gene S con codone 484K mutante è stato rilevato nel campione.
CoV2 484: RNA Rilevato. 484Q mutante.	L'RNA di SARS-CoV-2 gene S con codone 484Q mutante è stato rilevato nel campione.
CoV2 484: RNA Rilevato.	L'RNA di SARS-CoV-2 gene S è stato rilevato nel campione.ma non è stato possibile effettuare l'analisi del codone 484 *
CoV2 501: RNA Rilevato. 501N wild type.	L'RNA di SARS-CoV-2 gene S con codone 501N wild type è stato rilevato nel campione.
CoV2 501: RNA Rilevato. 501Y mutante.	L'RNA di SARS-CoV-2 gene S con codone 501Y mutante è stato rilevato nel campione.
CoV2 501: RNA Rilevato.	L'RNA di SARS-CoV-2 gene S è stato rilevato nel campione.ma non è stato possibile effettuare l'analisi del codone 501 *
CoV2 484: RNA Non Rilevato o inferiore al LoD.	L'RNA di SARS-CoV-2 gene S non è stato rilevato dalla sonda 484 nel campione.
CoV2 501: RNA Non Rilevato o inferiore al LoD.	L'RNA di SARS-CoV-2 gene S non è stato rilevato dalla sonda 501 nel campione.
Invalido – Ripetere il campione	Risultato del saggio non valido a causa di un problema rilevato dal Controllo Interno (estrazione errata, presenza di un inibitore o errore di campionamento). Il test dovrebbe essere ripetuto.

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

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

I campioni idonei in cui non è stato possibile rilevare l'RNA sono segnalati come "RNA Non Rilevato o inferiore al LoD". In questo caso non si può escludere che l'RNA sia presente ad un titolo inferiore al limite di rilevazione del prodotto (vedi paragrafo "Caratteristiche delle prestazioni").

I campioni segnalati come "RNA Rilevato" senza nessuna indicazione relativa allo stato del codone 484 e/o 501 non sono idonei per la tipizzazione genetica dei risultati. In questo caso l'RNA del Gene S di SARS-CoV-2 è stato rilevato ma non è stato possibile calcolare una temperatura di melting (Tm) o il valore della Tm rilevata non rientra negli intervalli stabiliti per la tipizzazione. Ciò è dovuto alla presenza di mutazioni diverse da quelle di interesse o a problemi nelle fasi di amplificazione o estrazione (inibitori presenti negli eluati).

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

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

### C. Esportazione dei risultati del campione

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

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

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

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

## CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

### Limite di Rilevazione (LoD)

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

Il valore di LoD è stato calcolato testando un pannello di campioni di tamponi respiratori raccolti in UTM (COPAN Italia S.p.A.) negativi, positivizzati con materiale di riferimento SARS-CoV-2 (SARS-CoV-2, Culture Fluid ZeptoMetrix) a titolo noto. Sono stati preparati sei livelli di diluizioni, a partire da 562 genomi Equivalenti (gEq) / mL a 32 genomi Equivalenti (gEq) / mL. Ciascuna diluizione è stata processata in 12 replicati con ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". Il limite di rilevazione è stato definito per il target 484, attraverso l'analisi dei dati con modello di regressione Probit, come la concentrazione alla quale è possibile ottenere un risultato positivo pari al 95%.

In seguito, il valore di LoD è stato verificato testando 20 replicati di campioni positivizzati con materiale di riferimento (SARS-CoV-2 wild type e SARS-CoV-2 Variant B.1.1.7, ZeptoMetrix) alla concentrazione calcolata e processati con il sistema ELITE Ingenius in modalità "Extract + PCR". Il valore di LoD è stato confermato positivo come da linee guida del CLSI EP17-A (almeno 18 replicati positivi su 20 in esame).

I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti.

LoD	Intervallo di confidenza	
	Valore inferiore	Valore superiore
470 gEq / mL	296	1156

Limite di Rilevazione (LoD) per tamponi respiratori e ELITE InGenius					
Campioni	Titolo	Target	N	Positivi	Negativi
Tamponi raccolti in UTM	470 gEq / mL	484 target	20	18	2
		501 target	20	18	2

Il valore di LoD per i target 484 e 501 è stato confermato a 470 gEq / mL per i tamponi respiratori raccolti in UTM (COPAN Italia S.p.A.).

### Inclusività: Efficienza di rilevazione

L'efficienza di amplificazione e rilevazione per le diverse varianti di SARS-CoV-2 è stata valutata *in silico* per confronto con le sequenze disponibili nella banca dati nucleotidica EpiCoV di GISAID (

L'esame della regione scelta per l'ibridazione degli oligonucleotidi e delle sonde fluorescenti sull'allineamento delle sequenze per le posizioni 484 e 501 del gene S di SARS-CoV-2, ha dimostrato la loro conservazione e l'assenza di mutazioni significative e perciò la possibilità di rilevare in modo efficiente le diverse varianti di SARS-CoV-2.

L'inclusività del saggio, come efficienza di rilevazione per le diverse varianti, è stata verificata testando il SARS-CoV-2 ONBOARD Variant Swab kit, Microbix Biosystem.

Ciascun campione del pannello è stato diluito in UTM negativo (COPAN Italia S.p.A.) e testato con ELITE Ingenius in modalità "Extract + PCR".

I risultati sono riportati nella tabella seguente.

WHO Label	Pango lineage	Pos. / Rep.	484 outcome	501 outcome
(Wild type)	(Wild type)	3 / 3	484E wild type	501N wild type
Alpha	B.1.1.7	3 / 3	484E wild type	501Y mutated

WHO Label	Pango lineage	Pos. / Rep.	484 outcome	501 outcome
Beta	B.1.351	3 / 3	484K mutated	501Y mutated
Gamma	P.1	3 / 3	484K mutated	501Y mutated

Tutte le varianti di SARS-CoV-2 testate sono state rilevate correttamente e le mutazioni sui codoni 484 e 501 sono state correttamente identificate mediante utilizzo del prodotto SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB Kit in associazione con lo strumento ELITE InGenius.

### Marcatori potenzialmente interferenti: cross-reattività

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

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

L'assenza di cross-reattività con altri microrganismi che possono essere rilevati nei campioni di tamponi respiratori, è stata valutata anche mediante analisi di un pannello di materiale di riferimento certificati.

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

I risultati sono illustrati nella tabella seguente.

Campione	Esito
Influenza A virus (H1N1)	Nessuna cross-reattività
Influenza A virus (H3N2)	Nessuna cross-reattività
Influenza B virus (Florida)	Nessuna cross-reattività
Parainfluenza Virus 1	Nessuna cross-reattività
Parainfluenza Virus 2	Nessuna cross-reattività
Parainfluenza Virus 3	Nessuna cross-reattività
hMPV	Nessuna cross-reattività
Human Coronavirus OC43	Nessuna cross-reattività
Human Coronavirus 229E	Nessuna cross-reattività
SARS-CoV	Nessuna cross-reattività
RSV A	Nessuna cross-reattività
RSV B	Nessuna cross-reattività
Echovirus 4	Nessuna cross-reattività
Rhinovirus 1A	Nessuna cross-reattività
ADV	Nessuna cross-reattività
CMV	Nessuna cross-reattività
<i>Bordetella pertussis</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Bordetella parapertussis</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Haemophilus influenzae</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Legionella pneumophila</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nessuna cross-reattività

Campione	Esito
<i>Escherichia coli</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Aspergillus spp</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Candida albicans</i>	Nessuna cross-reattività
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Nessuna cross-reattività

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti non hanno mostrato alcuna cross-reattività per i target 484 e 501 quando testati con SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB Kit.

#### Marcatori potenzialmente interferenti: interferenza

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

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

I risultati finali sono riportati nella seguente tabella.

Campioni	Esito
Influenza A virus (H1N1)	Nessuna interferenza
Influenza A virus (H3N2)	Nessuna interferenza
Influenza B virus (Florida)	Nessuna interferenza
Parainfluenza Virus 1	Nessuna interferenza
Parainfluenza Virus 2	Nessuna interferenza
Parainfluenza Virus 3	Nessuna interferenza
hMPV	Nessuna interferenza
Human Coronavirus OC43	Nessuna interferenza
Human Coronavirus 229E	Nessuna interferenza
SARS-CoV	Nessuna interferenza
RSV A	Nessuna interferenza
RSV B	Nessuna interferenza
Echovirus 4	Nessuna interferenza
Rhinovirus 1A	Nessuna interferenza
ADV	Nessuna interferenza
CMV	Nessuna interferenza
<i>Bordetella pertussis</i>	Nessuna interferenza
<i>Bordetella parapertussis</i>	Nessuna interferenza
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nessuna interferenza
<i>Haemophilus influenzae</i>	Nessuna interferenza
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Nessuna interferenza
<i>Legionella pneumophila</i>	Nessuna interferenza
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Nessuna interferenza
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Nessuna interferenza
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Nessuna interferenza

Campioni	Esito
<i>Escherichia coli</i>	Nessuna interferenza
<i>Aspergillus spp</i>	Nessuna interferenza
<i>Candida albicans</i>	Nessuna interferenza
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	Nessuna interferenza

Tutti gli organismi potenzialmente interferenti non hanno mostrato alcun impatto sulla rilevazione e la tipizzazione dei target 484 e 501 quando testati con SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB® Kit.

#### Sostanze potenzialmente interferenti

Un pannello di sostanze potenzialmente interferenti a concentrazioni rilevanti è stato testato con il prodotto SARS-CoV-2 ELiTe MGB Kit.

Le sostanze sono state aggiunte singolarmente a campioni di tamponi respiratori positivamente con il materiale di riferimento di SARS-CoV-2 Variant B.1.1.7 (ZeptoMetrix) alla concentrazione di circa 3x LoD. I campioni sono stati testati in 3 replicati con il sistema ELiTe InGenius in modalità "Extract + PCR".

I valori di Ct dei target 484 e 501 e del Controllo Interno (campioni di riferimento e in test) sono stati usati per calcolare la percentuale del Coefficiente di Variabilità (%CV) al fine di valutare la possibile interferenza. La stessa analisi è stata condotta sui valori delle Tm dei target 484 e 501.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

Campioni	484 Ct %CV	501 Ct %CV	IC Ct %CV	484 Tm %CV	501 Tm %CV
Sangue intero	2.28	2.62	2.08	0.12	0.09
Mucina	1.52	2.40	2.20	0.08	0.13
Azithromicina	2.02	2.29	0.98	0.16	0.09
Ambroxolo	1.83	2.16	1.65	0.06	0.12
Beclometasone	2.83	3.24	0.77	0.11	0.33
Ebastina	1.83	2.58	0.65	0.06	0.09
CPE – Internal Control	1.33	1.46	0.70	0.09	0.12

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati e tipizzati per i target di interesse 484 e 501. Il %CV dei valori di Ct sono risultati inferiori al 3.5% e il CV% dei valori di Tm al di sotto del 0.5%.

#### Ripetibilità Inter-Sessione

La Ripetibilità Inter-Sessione dei risultati ottenuti con il prodotto SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB Kit in associazione con il sistema ELiTe InGenius è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di tamponi respiratori. Il pannello includeva un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento certificato SARS-CoV-2 Variant B.1.1.7, ZeptoMetrix alle concentrazioni di 3x LoD (1,410 gEq / mL) e 5x LoD (2,350 gEq / mL).

La Ripetibilità Inter-Sessione è stata valutata mediante l'analisi dei campioni del pannello in quattro replicati condotta dallo stesso operatore, in due sessioni al giorno, con lo stesso lotto di prodotto e utilizzando lo stesso strumento. I campioni sono stati processati con il sistema ELiTe InGenius in modalità "Extract + PCR". I valori di Ct dei target 484 e 501 e del Controllo Interno sono stati usati per calcolare il CV% al fine di valutare la Ripetibilità come imprecisione. La stessa analisi è stata condotta sui valori delle Tm dei target 484 e 501.

I risultati sono riportati nella seguente tabella.

484 target				
Campioni	Pos. / Rep.	Ct %CV	Typing	Tm % CV
3x LoD	16 / 16	2.57	484E	0.29
5x LoD	16 / 16	2.49	484E	0.09
Negativo	0 / 16	-	-	-



501 target				
Campioni	Pos. / Rep.	Ct %CV	Typing	Tm %CV
3x LoD	16 / 16	2.78	501Y	0.21
5x LoD	16 / 16	3.01	501Y	0.17
Negativo	0 / 16	-	-	-
Internal Control				
Campioni	Valid / Rep.	Ct %CV		
Pannello Intero	48 / 48	1.42		

Tutti i campioni sono stati correttamente rilevati e tipizzati per i target di interesse 484 e 501. Il CV% dei valori di Ct non ha superato il valore del 3.5% e il CV% dei valori di Tm è risultato inferiore allo 0.3%.

#### Riproducibilità Inter-Lotto

La Riproducibilità Inter-Lotto dei risultati ottenuti con il prodotto SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB Kit in associazione con il sistema ELiTe InGenius è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di tamponi respiratori. Il pannello includeva un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento certificato SARS-CoV-2 Variant B.1.1.7(ZeptoMetrix) alle concentrazioni di 3x LoD (1,410 gEq / mL) e 5x LoD (2,350 gEq / mL).

La Riproducibilità Inter-Lotto è stata valutata mediante l'analisi dei campioni del pannello in quattro replicati, in due sessioni al giorno in due giorni. Sono stati testati tre lotti diversi di prodotto, in sei giorni diversi, su uno stesso strumento da uno stesso operatore. I campioni sono stati processati con il sistema ELiTe InGenius in modalità "Extract + PCR". I valori di Ct dei target 484 e 501 e del Controllo Interno sono stati usati per calcolare il CV% al fine di valutare la Riproducibilità come imprecisione. La stessa analisi è stata condotta sui risultati delle Tm dei target 484 e 501.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

484 target				
Campioni	Pos. / Rep.	Ct %CV	Typing	Tm % CV
3x LoD	48 / 48	2.48	484E	0.25
5x LoD	48 / 48	2.05	484E	0.13
Negative	0 / 48	-	-	-
501 target				
Campioni	Pos. / Rep.	Ct %CV	Typing	Tm %CV
3x LoD	48 / 48	2.61	501Y	0.19
5x LoD	48 / 48	2.85	501Y	0.21
Negative	0 / 48	-	-	-
Internal Control				
Campioni	Valid / Rep.	Ct %CV		
Pannello Intero	144 / 144	1.61		

Nel test di Riproducibilità Inter-Lotto, tutti i campioni sono stati rilevati correttamente e tipizzati per i target 484 e 501 come atteso. Il CV% dei valori di Ct è risultato inferiore al 3% e il CV% dei valori di Tm è risultato inferiore allo 0.3%

#### Riproducibilità Inter-Strumento

La Riproducibilità Inter-Strumento dei risultati ottenuti con il prodotto SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB Kit in associazione con il sistema ELiTe InGenius è stata verificata mediante analisi di un pannello di campioni di tamponi respiratori. Il pannello includeva un campione negativo e due campioni positivamente con materiale di riferimento certificato SARS-CoV-2 Variant B.1.1.7(ZeptoMetrix) alle concentrazioni di 3 x LoD (1,410 gEq / mL) e 5 x LoD (2,350 gEq / mL).

La Riproducibilità Inter-Strumento è stata valutata mediante l'analisi dei campioni del pannello in quattro replicati, in una sessione al giorno. Sono stati testati tre lotti diversi di prodotto da tre operatori diversi, in sei giorni diversi, su tre strumenti diversi. I campioni sono stati processati con il sistema ELiTe InGenius in modalità "Extract + PCR". I valori di Ct dei target 484 e 501 e del Controllo Interno sono stati usati per calcolare il CV% al fine di valutare la Riproducibilità come imprecisione. La stessa analisi è stata condotta sui risultati delle Tm dei target 484 e 501.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

484 target				
Campioni	Pos. / Rep.	Ct %CV	Typing	Tm % CV
3x LoD	24 / 24	1.88	484E	0.16
5x LoD	24 / 24	2.11	484E	0.14
Negative	0 / 24	-	-	-
501 target				
Campioni	Pos. / Rep.	Ct %CV	Typing	Tm %CV
3x LoD	24 / 24	2.29	501Y	0.21
5x LoD	24 / 24	2.27	501Y	0.24
Negative	0 / 24	-	-	-
Internal Control				
Campioni	Valid / Rep.	Ct %CV		
Pannello Intero	72 / 72	1.73		

Nel test di Riproducibilità Inter-Strumento, tutti i campioni sono stati rilevati e tipizzati correttamente per i target 484 e 501 come atteso. Il CV% dei valori di Ct è risultato inferiore al 2.5% e il CV% dei valori di Tm è risultato inferiore allo 0.3%.

#### Proficiency Study

Il prodotto SARS-CoV-2 Variants ELiTe MGB Kit in associazione con il sistema ELiTe InGenius è stato valutato analizzando il pannello "QCMD 2020 Coronavirus Outbreak Preparedness (CVOP) EQA Pilot Study" (QCMD, UK). Il pannello riproduce campioni di tamponi respiratori raccolti in mezzo di trasporto e include campioni negativi per SARS-CoV-2, campioni con organismi interferenti e campioni positivi per SARS-CoV-2.

I campioni sono stati processati con il sistema ELiTe InGenius in modalità "Extract + PCR". I valori di Ct e di Tm dei target 484 e 501 sono stati analizzati.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

Campioni	Contenuto	Titolo (Log c. / mL)	Ct 484	Ct 501	Risultato
CPO20S-01	SARS-CoV-2	4.30	31.45	34.67	Positive 484 wt / 501 wt
CPO20S-02	Coronavirus NL63	4.64	undet	undet	Negative
CPO20S-03	SARS-CoV-2	3.3	34.49	38.46	Positive 484 wt / 501 wt
CPO20S-04	Coronavirus OC43	4.03	undet	undet	Negative
CPO20S-05	Negative	-	undet	undet	Negative
CPO20S-06	SARS-CoV-2	4.30	31.86	34.96	Positive 484 wt / 501 wt
CPO20S-07	SARS-CoV-2	5.30	28.47	31.1	Positive 484 wt / 501 wt
CPO20S-08	SARS-CoV-2	2.30	38.57	undet	Positive 484 wt / 501 n.a.

Tutti campioni sono stati correttamente identificati come positivi o negativi. I campioni positivi sono stati tipizzati correttamente per i target 484 e 501. Il target 501 non è stato rilevato, e di conseguenza non è stato tipizzato, per il campione CPO20S-08 a causa della concentrazione a basso titolo (circa 200 copie / mL).

#### Specificità Diagnostica: conferma dei campioni di SARS-CoV-2 wild type (484E e 501N)

La specificità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici positivi SARS-CoV-2 wild type (484E e 501N), è stata valutata analizzando campioni clinici di tamponi respiratori raccolti in UTM (COPAN Italia S.p.A.) certificati negativi per SARS-CoV-2 mediante un saggio commerciale marcato CE IVD e positivamente con materiale di riferimento certificato SARS-CoV-2 wild type (isolatoUSA-WA 1/2020), ZeptoMetrix.

I campioni sono stati testati con il sistema ELiTe InGenius in modalità "Extract+PCR".

I risultati sono riportati nelle seguenti tabelle.

Campioni Wild Type	N	Wild type 484E	Mutato 484K	Mutato 484Q	Negativi 484	Invalidi
Tamponi respiratori negativi positivizzati con SARS-CoV-2 WT	48	48	0	0	0	0

Campioni Wild Type	N	Wild type 501N	Mutato 501Y	Negativi 501	Invalidi
Tamponi respiratori negativi positivizzati con WT SARS-CoV-2 WT	48	48	0	0	0

Tutti i campioni sono risultati positivi per i target 484 e 501 e sono stati rilevati come wild type 484E e 501N. In questo test la specificità diagnostica del saggio è risultata uguale al 100%

#### Sensibilità diagnostica: conferma dei campioni di SARS-CoV-2 mutati(E484K,E484Q o N501Y)

La sensibilità diagnostica del saggio, come conferma dei campioni clinici positivi SARS-CoV-2 mutati (E484K,E484Q e N501Y), è stata valutata analizzando campioni clinici di tamponi respiratori raccolti in UTM (COPAN Italia S.p.A.) certificati negativi per SARS-CoV-2 mediante un saggio commerciale marcato CE IVD e positivizzati con:

- Beta Variant SARS-CoV-2 (E484K e N501Y) materiale di riferimento ZeptoMetrix (isolato South Africa/KRISP-K005325/2020),
- DNA plasmidico contenente la regione del gene S di SARS-CoV-2 portante la mutazione E484Q, caratteristica della SARS-CoV-2 Kappa Variant (Indiana), e la mutazione N501Y,
- Alfa Variant SARS-CoV-2 (484E e N501Y) materiale di riferimento ZeptoMetrix (isolato England/204820464/2020).

I campioni sono stati processati con il Sistema ELITE InGenius in modalità "Extract + PCR". I valori dei Ct e i valori di Tm dei target 484 e 501 sono stati analizzati.

Si riporta di seguito una sintesi dei risultati.

Campioni E484K	N	Wild type 484E	Mutato 484K	Mutato 484Q	Negativi 484	Invalidi
Tamponi respiratori negativi positivizzati con Beta Variant SARS-CoV-2	48	1	47	0	0	0

Tutti i campioni sono risultati positivi per i target 484 e 501. Quarantasette (47) su 48 campioni sono stati rilevati come mutanti E484K. Uno è risultato Wild Type per la posizione 484 del gene S (484E) probabilmente dovuto ad un errore durante la fase di positivizzazione. In questo test la sensibilità Diagnostica per la mutazione E484K è risultata uguale al 97.6%

Campioni E484Q	N	Wild type 484E	Mutato 484K	Mutato 484Q	Negativi 484	Invalidi
Tamponi respiratori negativi positivizzati con DNA plasmidico	45	0	0	45	0	0

Tutti i campioni sono risultati positivi per i target 484 e 501 e sono stati identificati come mutanti E484Q. In questo test, la sensibilità Diagnostica per la mutazione E484Q è risultata uguale al 100%.

Campioni N501Y	N	Wild type 501N	Mutato 501Y	Negativi 501	Invalidi
Tamponi respiratori negativi positivizzati con Alfa Variant SARS-CoV-2, Beta Variant SARS-CoV-2 o DNA plasmidico	96	0	96	0	0

Tutti i campioni sono risultati positivi per i target 484 e 501 e sono stati identificati come mutanti N501Y. In questo test, la sensibilità Diagnostica per la mutazione N501Y è risultata uguale al 100%.

**Nota Bene:** I dati e i risultati completi dei test effettuati per valutare le caratteristiche prestazionali del prodotto con le matrici e gli strumenti sono registrati nel Fascicolo Tecnico di Prodotto "SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB Kit", FTP 171ING.

#### BIBLIOGRAFIA

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

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

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

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

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

#### LIMITI DELLA PROCEDURA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Questo prodotto richiede personale professionale, qualificato e formato sulle tecniche di biologia molecolare, come l'estrazione, l'amplificazione e la rilevazione dei prodotti di amplificazione, per evitare risultati non corretti.

Questo prodotto richiede aree separate per la preparazione della miscela completa di reazione, e l'estrazione/amplificazione/rilevazione dei prodotti di amplificazione, per evitare risultati falsi positivi.

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

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

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

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

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

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

## PROBLEMI E SOLUZIONI

Reazione del Positive Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nell'impostazione della sessione.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione e del Controllo Positivo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione e del Controllo Positivo.
Errore nella preparazione della miscela completa di reazione.	Controllare i volumi di reagenti dispensati durante la preparazione della miscela completa di reazione.
Degradazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Non utilizzare la miscela completa di reazione per più di tre sessioni (7 ore nel Blocco dell'Inventory Area). Non esporre la miscela completa di reazione a temperatura ambiente per oltre 30 minuti. Ripreparare la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Degradazione del controllo positivo.	Non utilizzare il Controllo Positivo per più di quattro sessioni indipendenti (3 ore nell'Area Estrazione). Utilizzare una nuova aliquota del Positive Control.
Errore nell'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione e del controllo positivo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione e del controllo positivo.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica ELITechGroup S.p.A.

Reazione del Negative Control non valida	
Possibili cause	Soluzioni
Errore nell'impostazione della sessione con ELITe InGenius.	Controllare la posizione della miscela completa di reazione e del controllo negativo. Controllare i volumi della miscela completa di reazione e del controllo negativo.
Errore durante l'impostazione dello strumento.	Controllare la posizione di campioni e controllo negativo impostata sullo strumento.
Contaminazione della miscela completa di reazione o dei suoi componenti.	Ripreparare la miscela completa di reazione. Utilizzare una nuova aliquota dei componenti.
Contaminazione del Negative Control.	Utilizzare una nuova aliquota di acqua per biologia molecolare.
Contaminazione dell'Extraction Area, dei Rack o del Blocco dell'Inventory Area.	Pulire superfici con detergenti acquosi, lavare camici, sostituire provette e puntali in uso.
Errore dello strumento.	Contattare l'assistenza tecnica ELITechGroup S.p.A.

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

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

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

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

### LEGENDA DEI SIMBOLI

REF

Numero di catalogo.



Limite superiore di temperatura.

LOT

Codice del lotto.



Da utilizzare prima del (ultimo giorno del mese)

IVD

Dispositivo medico diagnostico *in vitro*.



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



Contenuto sufficiente per "N" test.



Attenzione, consultare le istruzioni per l'uso.

CONT

Contenuto.



Tenere lontano dalla luce solare.



Fabbricante.

### AVVISO PER L'ACQUIRENTE: LICENZA LIMITATA

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

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

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

ELITe MGB®, il logo ELITe MGB® e ELITe InGenius® sono registrati come marchi commerciali nell'Unione Europea da ELITechGroup. TaqMan™ è un marchio Roche Molecular Systems, Inc. UTM® and eSWAB® sono registrati come marchi commerciali da COPAN Italia S.p.A.



# SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® KIT (Ref. RTS171ING) SARS-CoV-2 Variants - ELITE Positive Control (Ref. CTR171ING) used in association with ELITE InGenius®

ELITechGroup  
EMPOWERING IVD



Caution, this document is a simplified version of the official instruction for use. This document is available only in English.  
Please refer to the complete document before use: [www.elitechgroup.com](http://www.elitechgroup.com)

## A. Intended use

The «SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® Kit» product is part of a qualitative multiplex nucleic acids reverse transcription and amplification and melting curve analysis assay, for the detection and discrimination of the mutations E484K, E484Q and N501Y of the S gene of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in clinical samples from subjects infected by the virus.

The assay is able to detect the mutations associated with the following variants: Alpha variant (UK), lineage B.1.1.7, the Beta variant (South Africa), lineage B.1.351, the Gamma variant (Japanese), lineage P1, the Zeta variant (Brazil), lineage P2, the Eta variants (Nigeria), lineage B.1.525 and Kappa variant (India), lineage B.1617.1.

The assay is validated in association with «ELITE InGenius®» system and Respiratory Swab samples (nasopharyngeal, nasal or oropharyngeal swabs).

The product is used as a reflex test to identify the possible presence of the N501Y, E484K and E484Q mutations of the SARS-Cov-2 S gene, in samples already diagnosed as positive for SARS-CoV-2.

## B. Amplified sequences

Target	Gene	Fluorophore	Channel
484	S gene, 484 target	FAM	484 (Ch1)
501	S gene, 501 target	AP593	501 (Ch4)
Internal Control (endogenous)	RNase P gene	AP525	IC (Ch3)

## C. Validated Matrixes



### › Respiratory Swabs

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



## D. Tube type collection

Copan Ref.	Description
360C or 305C	UTM kit

## E. SARS-CoV-2 Variants ELITE MGB® KIT (RTS171ING) content

CoV-2 Variants PCR Mix (Neutral cap)	RT EnzymeMix (Black cap)	Maximum shelf-life: 12 Months
 X 2	 X 2	Storage temp.: below -20 °C
2 tubes of 1200 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles	2 tubes of 20 µL 96 reactions per kit 10 freeze-thaw cycles	Prepare the complete reaction mixture in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005)

## F. SARS-CoV-2 Variants - ELITE Positive Control (CTR171ING) content

CoV-2 Wild Type Positive Control (black cap)	CoV-2 Mutant Positive Control (red cap)	Maximum Shelf-life: 24 Months
 X 2	 X 2	Storage temp.: below -20 °C
2 tubes of 160 µL 4 sessions / tube 4 freeze-thaw cycles	2 tubes of 160 µL 4 sessions / tube 4 freeze-thaw cycles	

## G. Material required not provided in the kit

› ELITE InGenius instrument:	INT030
› ELITE InGenius SP200 Extraction Kit:	INT032SP200
› ELITE InGenius PCR Cassette:	INT035PCR
› ELITE InGenius SP200 Consumable Set:	INT032CS
› ELITE InGenius Waste Box:	F2102-000
› 300 µL Filter Tips Axygen:	TF-350-L-R-S

## H. ELITE InGenius protocol

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

## I. Result Interpretation

### Sample results:

Result of sample run	Interpretation
CoV2 484: RNA Detected. 484E wild type.	The RNA of SARS-CoV-2 484E wild type was detected in the sample
CoV2 484: RNA Detected. 484K mutant.	The RNA of SARS-CoV-2 484K mutant was detected in the sample
CoV2 484: RNA Detected. 484Q mutant.	The RNA of SARS-CoV-2 484Q mutant was detected in the sample
CoV2 484: RNA Detected.	The RNA of SARS-CoV-2 was detected in the sample, but 484 typing was not feasible
CoV2 501: RNA Detected. 501N wild type.	The RNA of SARS-CoV-2 501N wild type was detected in the sample
CoV2 501: RNA Detected. 501Y mutant.	The RNA of SARS-CoV-2 501Y mutant was detected in the sample
CoV2 501: RNA Detected.	The RNA of SARS-CoV-2 was detected in the sample, but 501 typing was not feasible
CoV2 484: RNA Not Detected or below the LoD	The RNA of SARS-CoV-2 484 was not detected in the sample
CoV2 501: RNA Not Detected or below the LoD	The RNA of SARS-CoV-2 501 was not detected in the sample
Invalid – Retest sample.	Not valid result caused by Internal Control failure

### Sample Ct and Tm range:

Ct 484	Tm 484	Ct 501	Tm 501	Ct RNase P	Result
Det.	65.5 - 68.5	-	-	+/-	SARS-CoV-2 484E wild type
Det.	59.4 - 61.7	-	-	+/-	SARS-CoV-2 mutation E484K detected
Det.	57.1 - 59.3	-	-	+/-	SARS-CoV-2 mutation E484Q detected
-	-	Det.	55.6 - 58.6	+/-	SARS-CoV-2 501N wild type
-	-	Det.	62.6 - 65.6	+/-	SARS-CoV-2 mutation N501Y detected
Undet.	-	Undet.	-	Ct > 35	Invalid

### Positive Control Ct and Tm limits:

Controls	Target	Ct	Tm	Result
CoV-2 Wild Type Positive Control	484E WT	Ct < 35	65.5 - 68.5	Positive Control Valid
	501N WT	Ct < 38	55.6 - 58.6	
CoV-2 Mutant Positive Control	484K MUT	Ct < 37	59.4 - 61.7	Positive Control Valid
	501Y MUT	Ct < 36	62.6 - 65.6	
Negative Control	484	Ct > 45	-	Negative Control Valid
	501	Ct > 45	-	

## J. Samples

- Sample inactivation is not required as shown in WHO guideline. The sample can be pretreated with a denaturant solution under a Biosafety cabinet of class II (BSC2). In case of this procedure, dispense 200 µL of sample into the tubes and no more than 200 µL of buffer containing denaturants. Note: This procedure is an off-label protocol and needs to be validated before use as per WHO guidelines
- Handle and dispose of all biological samples as if they were able to transmit infectious agents even if the sample is inactivated.
- Eluates obtained with extraction in association with SARS-CoV-2 ELITE MGB KIT (Ref. RTS170ING) or SARS-CoV-2 PLUS ELITE MGB KIT (Ref. RTS180ING) can be used.
- High-medium viral titre for SARS- CoV-2 allows to obtain good results using this reflex kit.

## K. References

- ECDC Reference: "Rapid increase of a SARS-CoV-2 variant with multiple spike protein mutations observed in the United Kingdom" December 2020

## L. Procedures

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

### Before analysis

1. Switch on ELITE InGenius Login with username and password Select the mode "Closed"	2. Verify controls in the "Control menu": CoV-2 Wild Type Positive Control, CoV-2 Mutant Positive Control, negative control <b>Note:</b> All had to be run, approved and not expired	3. Thaw the CoV-2 VAR PCR Mix and RT Enzyme Mix tubes Mix gently and spin down 5 sec Reconstitute the complete reaction mixture in a 2 mL Sarstedt tube (Ref. 72694005) as shown in the table below
---	--	---

### Complete reaction mixture preparation:

Reagent	1 Reaction	Samples N	Total reactions
CoV-2 Variants PCR Mix	20 µL	1 to 5	N + 1
RT Enzyme Mix	0.3 µL	6 to 11	N + 2
		12	N + 2.5

### Procedure 1 - Complete run: Extraction + PCR

1. Select "Perform Run" on the touch screen	2. Verify the extraction volumes: Input: "200 µL", Elute: "100 µL"	3. Scan the sample barcodes with hand-held barcode reader or type the sample ID
4. Select the "Assay protocol" of interest	5. Select the sample position: "Extraction tube" <b>Note:</b> 200 µL of sample must be transferred into Extraction tube For samples see <b>C</b> and <b>D</b>	6. Load the complete reaction mixture in the inventory block
7. Load the PCR cassette, Extraction cartridge, Elution tube, Tip and Extraction tube racks	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

### Procedure 2 - PCR only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the mode: "PCR only" Set the sample position: "Elution tube"	6. Load the extracted nucleic acid tubes in the Elution tubes rack
7. Load the complete reaction mixture in the inventory block Load the PCR cassette, Elution tube, Tip racks	8. Close the door Start the run	9. View, approve and store the results

### Procedure 3 - Extraction only

1 to 4: Follow the Complete Run procedure described above	5. Select the mode: "Extraction Only" Set the sample position: "Extraction tube" <b>Note:</b> 200 µL of sample must be transferred into Extraction tube For samples see <b>C</b> and <b>D</b>	6. Load the Extraction cartridge, Elution tube, Tip and Extraction tube racks.
7. Close the door Start the run	8. Archive the eluted samples	