



LumiraDx™  
*Fast Lab Solutions*

# Dual-Target SARS-CoV-2 **STAR Complete**

## Istruzioni per l'uso



L018180801096



## Sommario

1.	Uso previsto .....	4
2.	Riepilogo e spiegazione del test .....	4
3.	Principi della procedura .....	4
4.	Reagenti e materiali .....	5
4.1.	Materiali richiesti (forniti) .....	5
4.2.	Materiali richiesti (ma non forniti) .....	5
4.3.	Stoccaggio, manipolazione e stabilità dei reagenti .....	6
5.	Raccolta, manipolazione, conservazione e trasporto dei campioni .....	6
5.1.	Raccolta e trattamento dei campioni .....	7
5.2.	Conservazione dei campioni .....	7
5.3.	Trasporto di campioni .....	7
6.	Avvertenze e precauzioni .....	7
7.	Riepilogo dello strumento e del protocollo per PCR in tempo reale .....	8
8.	LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Workflow .....	11
8.1.	Controllo di qualità .....	11
8.1.1.	Controlli interni .....	11
8.1.2.	Controlli positivi e negativi .....	11
8.2.	Preparazione del campione .....	11
8.2.1.	Tampone a secco (formato standard) .....	12
8.2.2.	Tampone secco a (formato Deep Well) .....	12
8.2.3.	Tampone umido .....	12
8.3.	Preparazione del reagente qSTAR e configurazione della piastra .....	12
8.3.1.	Formato 96 pozzetti (volume di reazione 60 µl) .....	12
8.4.	Amplificazione .....	13
8.5.	Interpretazione e comunicazione dei risultati .....	13
8.5.1.	LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Controls .....	13
8.5.2.	Risultati del campione LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete .....	14
9.	Limitazioni .....	15
10.	Caratteristiche di performance .....	15
10.1.	Studi analitici .....	15
10.1.1.	Sensibilità analitica: (Matrice dei campioni arricchita) .....	15
10.1.2.	Sensibilità analitica: LoD (tampone arricchito) .....	16
10.1.3.	Sensibilità analitica: LoD (tampone a secco) .....	16

10.1.4.	Inclusività .....	16
10.1.5.	Inclusività (In Silico).....	16
10.1.6.	Specificità analitica: Esclusività e reattività incrociata.....	17
10.1.7.	Esclusività (In Silico) .....	18
10.1.8.	Sostanza potenzialmente interferente .....	18
10.1.9.	Ripetibilità .....	19
10.1.10.	Riproducibilità .....	19
10.2.	Studio clinico.....	19
10.3.	Studi di equivalenza.....	19
10.3.1.	Equivalenza del terreno di trasporto .....	19
10.3.2.	Equivalenza dello strumento (96 pozzetti) .....	20
11.	Informazioni di contatto, ordini e assistenza sul prodotto.....	20
12.	Glossario dei simboli.....	21
13.	Appendice A: Istruzioni dettagliate per la configurazione dello strumento (formato a 96 pozzetti) .....	22
13a.	Configurazione dello strumento per Applied Biosystems™ QuantStudio 5 (formato 96 pozzetti) .....	22
13a.1	Istruzioni di programmazione per strumento collegato a PC/Laptop .....	22
13a.2	Istruzioni per l'analisi.....	23
13b.	Configurazione dello strumento per Applied Biosystems QuantStudio 7 Flex (formato 96 pozzetti) .....	24
13b.1	Istruzioni di programmazione per strumento collegato a PC/Laptop .....	24
13b.2	Istruzioni per l'analisi.....	26
13c.	Configurazione dello strumento per Bio-Rad CFX OPUS (formato 96 pozzetti) .....	27
13c.1	Istruzioni di programmazione per strumento collegato a PC/Laptop .....	27
13c.2	Istruzioni per l'analisi .....	28
13d.	Configurazione dello strumento per l'analitica Jena qTOWER <sup>3</sup> (formato a 96 pozzetti) .....	29
13d.1	Istruzioni di programmazione per strumento collegato a PC/Laptop .....	29
13d.2	Istruzioni per l'analisi.....	31

## 1. Uso previsto

LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete è un test di amplificazione dell'acido nucleico (NAAT) rapido e non isotermico che utilizza la tecnologia qSTAR (quantitative Selective Temperature Amplification Reaction) per la rivelazione e la differenziazione dell'acido nucleico da due geni distinti (nsp1 & orf8) del genoma SARS-CoV-2 in campioni di tampone nasofaringeo o nasale anteriore raccolti a secco o in terreno di trasporto da individui sospettati di COVID-19.

I risultati servono per l'identificazione dell'acido nucleico SARS-CoV-2. L'acido nucleico SARS-CoV-2 è generalmente rivelabile nei campioni delle vie respiratorie superiori durante la fase acuta dell'infezione. I risultati positivi sono indicativi della presenza di acido nucleico SARS-CoV-2; la correlazione clinica con l'anamnesi del paziente e altre informazioni diagnostiche è necessaria per determinare lo stato di infezione del paziente. Risultati positivi non escludono infezioni batteriche o co-infezione con altri virus. L'agente rivelato potrebbe non essere la causa definitiva della malattia. I risultati negativi non precludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non dovrebbero essere utilizzati come unica base per le decisioni sulla gestione del paziente. I risultati negativi devono essere combinati con osservazioni cliniche, anamnesi del paziente e informazioni epidemiologiche.

LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete è destinato all'uso da parte di personale di laboratorio clinico qualificato, specificamente istruito e formato sulle tecniche della PCR in tempo reale e sulle procedure diagnostiche in vitro.

I laboratori possono essere tenuti a riferire tutti i risultati positivi alle autorità sanitarie competenti appropriate.

## 2. Riepilogo e spiegazione del test

Le infezioni delle vie respiratorie causate da virus respiratori sono una causa comune di malattie acute a livello globale. Una diagnosi tempestiva e accurata della causa delle infezioni delle vie respiratorie è importante poiché la gravità della malattia può aumentare nei soggetti giovani, immunocompromessi o anziani <sup>1</sup>.

### SARS-CoV-2

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha denominato la malattia causata dal virus SARS-CoV-2 malattia da coronavirus 2019 o COVID-19 <sup>2</sup>. I sintomi comuni della COVID-19 sono febbre, stanchezza e tosse secca. Alcuni pazienti possono avere dolore, congestione nasale, naso che cola, mal di gola o diarrea. Questi sintomi sono generalmente lievi e iniziano gradualmente. Alcune persone si infettano ma non sviluppano alcun sintomo e non accusano malessere (infezione asintomatica). Tuttavia, la malattia può svilupparsi rapidamente e presentare un'elevata morbilità in alcune popolazioni, in particolare quelle con patologie preesistenti. La malattia può diffondersi da persona a persona attraverso piccole goccioline dal naso o dalla bocca che si diffondono quando una persona con COVID-19 tossisce o espira. La maggior parte delle stime indica un periodo di incubazione per la COVID-19 compreso tra 2 e 14 giorni <sup>3</sup>.

## 3. Principi della procedura

LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete è un test di amplificazione dell'acido nucleico (NAAT) rapido e non isotermico che utilizza la tecnologia qSTAR (quantitative Selective Temperature Amplification Reaction), che rivela e differenzia l'acido nucleico da due geni distinti (nsp1 & orf8) da SARS-CoV-2 da tamponi a secco o tamponi in terreno di trasporto direttamente da campioni di tamponi nasali o nasofaringei anteriori raccolti a secco o in terreno di trasporto entro venticinque minuti, senza necessità di purificazione o estrazione anticipata del campione.

LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Mix controllo interno, primer e campione (IC/P) è progettato per la rivelazione qualitativa dell'acido nucleico da due geni distinti (nsp1 & orf8) di SARS-CoV-2 in tamponi nasofaringei raccolti da individui sospettati di COVID-19 dal proprio operatore sanitario.

I virioni target vengono lisati e amplificati da campioni respiratori in un'unica reazione. La lisi si ottiene utilizzando i detergenti presenti in LumiraDx Extraction Buffer. Gli acidi nucleici presenti dopo la lisi vengono trascritti inversamente e successivamente amplificati da qSTAR utilizzando primer specifici per ciascun target del test. L'amplificazione di qSTAR si ottiene ciclizzando tra due temperature e utilizzando due enzimi distinti, una polimerasi e un enzima nichelante. La polimerasi è relativamente favorita alla temperatura più alta mentre l'enzima nichelante è relativamente favorito alla temperatura più bassa. I beacon molecolari vengono utilizzati per legare e rivelare in modo specifico ciascun amplicone target utilizzando uno dei seguenti strumenti RT-PCR: 96 pozzetti: Applied Biosystems QuantStudio 5 (versione software 1.5.1), Applied Biosystems QuantStudio 7 Flex (versione software 1.3), Analytik Jena qTOWER<sup>3</sup> (versione software 4.1) o Bio-Rad CFX Opus System (versione software 2.2).

---

1 Couch, R.B. and Kasel, J.A. 1995. Influenza in Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections. 7a edizione. 431-446.

2 Organizzazione mondiale della Sanità: [www.who.int](http://www.who.int)

3 Centro per la prevenzione e il controllo delle malattie [www.cdc.org](http://www.cdc.org).

## 4. Reagenti e materiali

### 4.1. Materiali richiesti (forniti)

**Tabella 1. Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Kit Componenti e volumi -**

Componente	Volume 96 pozzetti (L018180801096)
Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Positive Control Media (PCM)	250 µl
Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Negative Control Media (NCM)	1,5 ml
Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Salt Mix	1,0 ml
Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Extraction Buffer	500 µl
Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Internal Control & Primer Mix (IC/P Mix)	200 µl
Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Master mix	2,0 ml

### 4.2. Materiali richiesti (ma non forniti)

**Tabella 2. Materiali di consumo necessari (non forniti)**

Materiali di consumo	Fonte	N. catalogo
Dispositivi di protezione individuale appropriati	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Puntali di pipettamento con barriera per aerosol con filtri	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Provette per microcentrifuga (prive di DNasi/RNasi), da 0,6 a 5 ml	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Guanto in nitrile senza polvere	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Piastre Deep Well a 96 pozzetti (fondo a U)	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Serbatoi per reagenti (per volume morto minimo)	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Sacchetto o contenitore per rifiuti sigillabile	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Salviettine da laboratorio a basso contenuto di pelucchi	Fornitore di laboratorio generale	N/D

**Tabella 3. Reagenti necessari (non forniti)**

Reagenti	Fonte	N. catalogo
Soluzione di ipoclorito di sodio (candeggina)	ThermoFisher Scientific	SS290-1
70% di isopropanolo (o 70% di etanolo)	Fornitore di laboratorio generale	N/D
DNAZap™ (o equivalente)	ThermoFisher Scientific	AM9890
RNaseZap™ (o equivalente)	ThermoFisher Scientific	AM9782
Tamponi compatibili e terreno di trasporto	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Soluzione salina, 0,85 o 0,90%	Hardy Diagnostics	U157 o U264
1x tampone fosfato salino (PBS), pH 7,4	ThermoFisher Scientific	10010023
Terreno di trasporto	Terreno di trasporto Corning*	25-500-CM

\*O un terreno di formulazione simile

**Tabella 4. Materiali di consumo e strumenti a 96 pozzetti (non forniti)**

Materiali di consumo e strumenti per PCR a 96 pozzetti	Fonte	N. catalogo
Applied Biosystems QuantStudio™ 5, blocco a 96 pozzetti (versione software 1-5.1)	ThermoFisher Scientific	A28574
Piastra ottica a 96 pozzetti MicroAmp di Applied Biosystems	ThermoFisher Scientific	4306737
Pellicola in polipropilene resistente al calore per piastre con bordo rialzato	VWR	89087-690
Applied Biosystems QuantStudio 7 Flex, blocco a 96 pozzetti (versione software 1,3)	ThermoFisher Scientific	4485698
Piastra ottica a 96 pozzetti MicroAmp di Applied Biosystems	ThermoFisher Scientific	4306737
Pellicola in polipropilene resistente al calore per piastre con bordo rialzato	VWR	89087-690
Strumento per PCR in tempo reale Bio-Rad CFX Opus 96 (versione software 2,2)	Bio-Rad	12011319
Piastra Eppendorf twin.tec Real-Time PCR con bordo a 96 pozzetti	Eppendorf	951022003
Pellicola in polipropilene resistente al calore per piastre con bordo rialzato	VWR	89087-690
qTOWER <sup>3</sup> o qTOWER <sup>3</sup> G (versione software 4,1)	Analytik Jena	844-00553-4 o 844-00554-4
Piastra Eppendorf twin.tec Real-Time PCR96 pozzetti con bordo basso	Eppendorf	951022043
Pellicola in polipropilene resistente al calore per piastre con bordo rialzato	VWR	89087-690

**Tabella 5. Materiali di consumo universali\* (non forniti)**

Materiali di consumo universali	Fonte	N. catalogo
ThermalSeal Pellicola sigillante	Prodotto di ricerca Internazionale	202545
Pellicola in polipropilene resistente al calore per piastre con bordo rialzato	VWR	89087-690
Pellicola sigillante per utilità		
Pellicola adesiva VWR per micropiastre	VWR	60941-070

**Tabella 6. Attrezzatura (non fornita)**

Attrezzatura	Fonte	N. catalogo
Congelatore da laboratorio -80 °C	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Congelatore da laboratorio da -15 °C a -25 °C	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Frigorifero da laboratorio da 2 °C a 8 °C	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Pipette multicanale regolabili (2-20 µl, 20-200 µl)	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Micropipette regolabili (0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Centrifughe (per provette da 0,6 a 5 ml e piastre da 96 pozzetti)	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Cappa per PCR	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Vorticatore	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Blocco/blocchi di raffreddamento	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Blocco di riscaldamento a secco (capace di riscaldare la piastra PCR a 65 °C +/- 1 °C per 5 minuti)	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Rack per PCR IsoFreeze®	Thomas Scientific	1148D61
Rack per provette per microcentrifuga	Fornitore di laboratorio generale	N/D
Chiavetta USB	Fornitore di laboratorio generale	N/D

### 4.3. Stoccaggio, manipolazione e stabilità dei reagenti

- Al ricevimento, conservare LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Kit tra -15 °C e -25 °C.
- Dopo l'uso iniziale, congelare i LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Reagents tra -15 °C e -25 °C.
- Controllare sempre la data di scadenza prima dell'uso. Non utilizzare reagenti scaduti.
- Proteggere le sonde fluorogeniche dalla luce: le sonde sono un componente di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Internal Control & Primer Mix (IC/P Mix).
- L'Extraction Buffer, l'Internal Control/Primer Mix e la Master Mix devono essere scongelati e tenuti sempre su un blocco di raffreddamento durante la preparazione e l'uso.
- I controlli esterni, PCM e NCM devono essere scongelati e mantenuti sempre freddi durante la preparazione e l'uso.
- Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti dei reagenti più di 3 volte, poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del prodotto.

## 5. Raccolta, manipolazione, conservazione e trasporto dei campioni

**La corretta raccolta e manipolazione dei campioni è fondamentale per la diagnosi di laboratorio delle malattie infettive. Un campione non raccolto correttamente può portare a risultati del test errati.** I test per i virus respiratori dovrebbero essere condotti in collaborazione con un operatore sanitario. I campioni devono essere raccolti il prima possibile una volta che è stata presa la decisione di proseguire il test, indipendentemente dal momento dell'insorgenza dei sintomi. La formazione nella raccolta dei campioni è altamente raccomandata a causa dell'importanza della qualità dei campioni.

## 5.1. Raccolta e trattamento dei campioni

- Seguire le istruzioni del dispositivo di raccolta del campione per le corrette procedure di raccolta e manipolazione.
- I campioni di tampone devono essere raccolti utilizzando solo tamponi con una punta sintetica, come nylon o Dacron®, e un gambo in alluminio o plastica. I tamponi di alginato di calcio sono inaccettabili e i tamponi di cotone con gambo in legno non sono raccomandati.
- **Tampone umido:** i campioni devono essere raccolti e collocati in un terreno di trasporto appropriato. Sono accettabili tamponi forniti in un massimo di 3 ml di terreno di trasporto compatibile, tuttavia, per prestazioni ottimali, si consiglia 1 ml di tampone.
- **Tampone a secco:** i campioni devono essere raccolti e collocati in una provetta sterile e a secco per il trasporto, come una provetta Falcon standard da 15 ml. Per l'eluizione di un campione su tampone a secco, aggiungere 1 ml di terreno di trasporto compatibile e chiudere la provetta. Vorticare la provetta contenente il tampone per 30 secondi con pulsazioni intermittenti. Incubare il tampone a temperatura ambiente per almeno 10 minuti. Rimuovere (attenzione alla contaminazione incrociata da schizzi) e gettare il tampone nei rifiuti a rischio biologico.
- Per ulteriori informazioni sulla raccolta, la conservazione e il trasporto di campioni sospettati di contenere SARS-CoV-2, fare riferimento alla guida sulla biosicurezza del laboratorio dell'Organizzazione mondiale della sanità relativa alla malattia da coronavirus (COVID-19): guida provvisoria, 28 gennaio 2021, <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-WPE-GIH-2021,1>

## 5.2. Conservazione dei campioni

- Seguire sempre le istruzioni del produttore per una corretta conservazione dei campioni.
- **Tampone a secco:** i campioni devono essere conservati come segue:
  - Temperatura ambiente (15-30 °C) fino a 72 ore
  - Refrigerato (2-8 °C) fino a 96 ore
- **Tampone umido:** i campioni devono essere conservati come segue:
  - Temperatura ambiente (15-30 °C) fino a 72 ore
  - Refrigerato (2-8 °C) fino a 96 ore
  - Congelato ( $\leq$ -20 °C) fino a 1 settimana
- Se si prevede un ritardo nel test, conservare i campioni a una temperatura di -20 °C o inferiore.
- Se non possono essere analizzati entro 72 ore dalla raccolta, i campioni devono essere congelati a  $\leq$ -20 °C e possono essere congelati a  $\leq$ -20 °C per un massimo di 1 settimana fino al test.
- Evitare lo scongelamento e il congelamento ripetuti dei tamponi, poiché ciò potrebbe influire sulle prestazioni del prodotto. I campioni possono essere congelati e scongelati fino a 3 volte.

## 5.3. Trasporto di campioni

- I campioni devono essere imballati, spediti e trasportati secondo l'edizione corrente del regolamento sulle merci pericolose dell'Associazione internazionale del trasporto aereo (IATA). Seguire le norme di spedizione per la sostanza biologica UN3373, categoria B quando si inviano potenziali campioni SARS-CoV-2.
- Mantenere le condizioni di conservazione dei campioni come descritto nella sezione Raccolta, manipolazione, conservazione e trasporto dei campioni di questo documento.
- I campioni devono essere spediti in conformità con le normative di trasporto locali, regionali, nazionali e internazionali applicabili.

## 6. Avvertenze e precauzioni

- Per uso diagnostico *in vitro* (IVD).
- La Salt Mix e la Master Mix contengono sieroalbumina bovina.
- LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete è destinato esclusivamente alla rivelazione dell'acido nucleico da SARS-CoV-2 e non per altri virus o agenti patogeni.
- Non mangiare, bere, fumare, applicare cosmetici o maneggiare lenti a contatto nelle aree in cui vengono manipolati reagenti e campioni umani.
- Maneggiare tutti i campioni come infetti utilizzando procedure di laboratorio sicure.
- Per ulteriori informazioni sulla raccolta, la conservazione e il trasporto dei campioni, fare riferimento alla guida alla biosicurezza del laboratorio dell'Organizzazione mondiale della sanità relativa alla malattia da coronavirus (COVID-19): guida provvisoria, 28 gennaio 2021. <https://www.who.int/publications/i/elemento/OMS-WPE-GIH-2021.1>
- Le caratteristiche prestazionali sono state determinate con campioni nasofaringei di individui con segni e sintomi di infezione sospettati di COVID-19.
- Utilizzare dispositivi di protezione individuale come, a titolo esemplificativo ma non esaustivo, guanti e camici da laboratorio quando si maneggiano i reagenti del kit durante l'esecuzione di questo test e si maneggiano materiali tra cui campioni, reagenti, pipette e altre apparecchiature e reagenti.
- Smaltire i reagenti del kit inutilizzati e i campioni umani secondo le normative locali, regionali, nazionali e internazionali.
- I risultati negativi non precludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non dovrebbero essere utilizzati come unica base per le decisioni sulla gestione del paziente. I risultati negativi devono essere combinati con osservazioni cliniche, anamnesi del paziente e informazioni epidemiologiche.
- Esiste il rischio di valori falsi positivi derivanti dalla contaminazione incrociata da parte di organismi target, dei loro acidi nucleici o di prodotto amplificato, o da segnali non specifici in questo test.
- Per evitare la contaminazione dell'ambiente e/o le reazioni del test con SARS-CoV-2, non aprire le reazioni dopo l'amplificazione.

- Riferire i risultati alle autorità sanitarie pubbliche competenti come richiesto dalle normative locali, regionali, nazionali e internazionali.
- I reagenti utilizzati con questo test includono materiali contenenti guanidina. Possono formarsi composti altamente reattivi e/o tossici se combinati con ipoclorito di sodio (candeggina).
- Utilizzare solo i componenti elencati forniti per LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete; altri prodotti LumiraDx potrebbero non contenere le stesse formulazioni necessarie per questo test.
- Deviazioni dai protocolli, parametri, componenti, strumenti e versioni software degli strumenti descritti in questo foglietto illustrativo possono dare risultati errati.

## 7. Riepilogo dello strumento e del protocollo per PCR in tempo reale

LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete contiene beacon molecolari etichettati con fluorofori per la rivelazione e la differenziazione degli acidi nucleici da due geni distinti da SARS-CoV-2, nonché un controllo interno. Un riepilogo dei fluorofori e delle loro lunghezze d'onda di eccitazione ed emissione si trova nella **Tabella 7. Target/fluorofori per LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete**. I profili di temperatura di amplificazione per gli strumenti sono forniti nella **Figura 1**, e nelle **Tabella 8a - Tabella 8d**. Le impostazioni ottiche e di analisi per gli strumenti sono fornite nella **Tabella 9 a** e nella **Tabella 9c**.

Istruzioni dettagliate per la configurazione degli strumenti si trovano

**nell'Appendice A.NOTA:** utilizzare coperchi riscaldati per tutte le reazioni di

ciclizzazione.

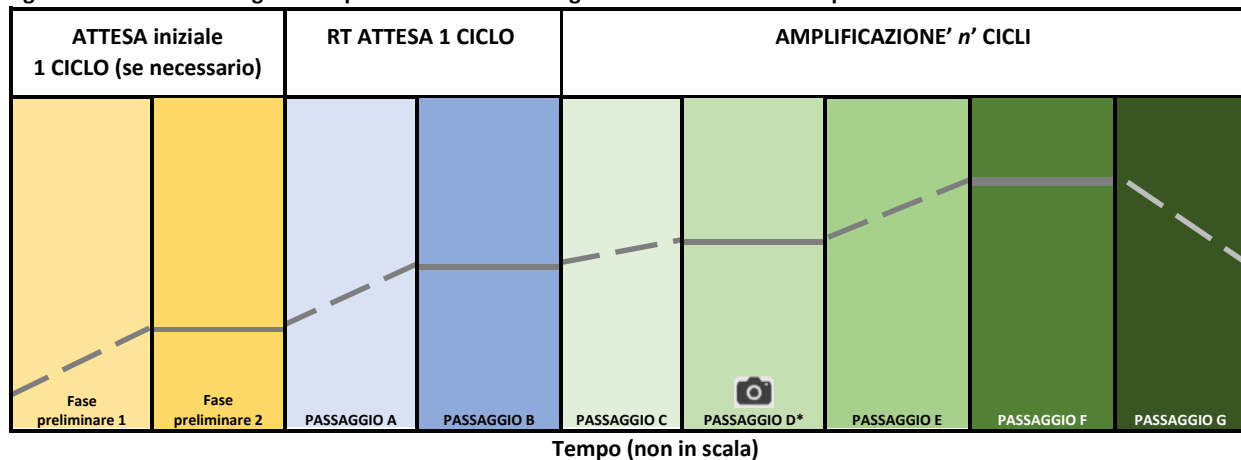
**NOTA:** Nessun colorante di riferimento passivo deve essere selezionato nelle impostazioni dello strumento.

**NOTA:** I termociclatori devono essere programmati e messi in coda prima della preparazione del reagente.

**Tabella 7. Target/fluorofori per LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete**

Target	Tintura	Quencher	Eccitazione	Emissione
SARS-CoV-2 Target 1	FAM	Quencher scuro	470	520
SARS-CoV-2 Target 2	Cy5/Mustang Purple™	Quencher scuro	648/640	668/682
Controllo interno	ROX	Quencher scuro	580	623


**Figura 1. Profilo termico generale per LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete**



\* Acquisizione di immagini.



Tabella 8a. Profilo termico per LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete: Biosistemi applicati QuantStudio 5 (96 pozzetti)

Strumento		Biosistemi applicati QS5	
Formato		96 pozzetti	
Impostazione del volume		60 µl	
Cicli di amplificazione		'20'	
Velocità di rampa	Fase preliminare 1 (fase di attesa 1)	2 °C/sec	
Temperatura/Tempo	Fase preliminare 2 (fase di attesa 1)	30 °C	1 min
Velocità di rampa	PASSAGGIO A (fase di attesa 2)	2 °C/sec	
Temperatura/Tempo	PASSAGGIO B (fase di attesa 2)	51 °C	3 min
Velocità di rampa	PASSAGGIO C	2 °C/sec	
Temperatura/Tempo	PASSAGGIO D* 	51 °C	25 sec
Velocità di rampa	PASSAGGIO E	2 °C/sec	
Temperatura/Tempo	PASSAGGIO F	61 °C	1 sec
Velocità di rampa	PASSAGGIO G	2 °C/sec	


\* Acquisire l'immagine durante la **PASSAGGIO D** del ciclo (51 °C).

**NOTA:** I coperchi riscaldati dovrebbero essere usati per tutte le reazioni di ciclizzazione.

**NOTA:** Nessun colorante di riferimento passivo deve essere selezionato nelle impostazioni dello strumento.

**NOTA:** I termociclatori devono essere programmati e messi in coda prima della preparazione del reagente.

Tabella 8 b. Profilo termico per LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete: Applied Biosystems QuantStudio 7 Flex (96 pozzetti)

Strumento		Applied Biosystems QS 7 Flex	
Formato		96 pozzetti	
Impostazione del volume		60 µl	
Cicli di amplificazione		'20'	
Velocità di rampa	Fase preliminare 1 (fase di attesa 1)	1,946 °C/sec	
Temperatura/Tempo	Fase preliminare 2 (fase di attesa 1)	30 °C	1 min
Velocità di rampa	PASSAGGIO A (fase di attesa 2)	1,946 °C/sec	
Temperatura/Tempo	PASSAGGIO B (fase di attesa 2)	51 °C	3 min
Velocità di rampa	PASSAGGIO C	1,645 °C/sec	
Temperatura/Tempo	PASSAGGIO D D* 	52 °C	25 sec
Velocità di rampa	PASSAGGIO E	1,946 °C/sec	
Temperatura/Tempo	PASSAGGIO F	61 °C	1 sec
Velocità di rampa	PASSAGGIO G	1,946 °C/sec	


\* Acquisire l'immagine durante la **PASSAGGIO D** del ciclo (52 °C).

**NOTA:** I coperchi riscaldati dovrebbero essere usati per tutte le reazioni di ciclizzazione.

**NOTA:** Nessun colorante di riferimento passivo deve essere selezionato nelle impostazioni dello strumento.

**NOTA:** I termociclatori devono essere programmati e messi in coda prima della preparazione del reagente.

Tabella 8 c. Profilo termico per LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete: Bio-Rad CFX OPUS (96 pozzetti)

	Strumento	OPUS CFX	
	Formato	96 pozzetti	
	Impostazione del volume	0 µl	
	Cicli di amplificazione	'26'	
Temperatura/Tempo	Fase preliminare 1	Strumento predefinito	
Temperatura/Tempo	Fase preliminare 2	45 °C	00:00 (Forever)**
Velocità di rampa	PASSAGGIO A	Strumento predefinito	
Temperatura/Tempo	PASSAGGIO B	49,5 °C	3 min
Velocità di rampa	PASSAGGIO C	Strumento predefinito	
Temperatura/Tempo	PASSAGGIO D* 	49 °C	12 sec
Velocità di rampa	PASSAGGIO E	Strumento predefinito	
Temperatura/Tempo	PASSAGGIO F	67,5 °C	1 sec
Velocità di rampa	PASSAGGIO G	Strumento predefinito	

\* Acquisire l'immagine durante la **PASSAGGIO D** del ciclo (49 °C).

\*\***PRE-PASSAGGIO** consiste nel far riscaldare il coperchio. Non caricare la piastra RT-PCR né continuare con il protocollo **PASSAGGIO A** fino a quando il coperchio non ha raggiunto i 70 °C. La piastra viene inserita una volta raggiunta la temperatura. Una volta caricata la piastra, è necessario saltare il passaggio **ATTESA** per procedere con il resto del protocollo

**NOTA:** Nessun colorante di riferimento passivo deve essere selezionato nelle impostazioni dello strumento.

**NOTA:** I termociclatori devono essere programmati e messi in coda prima della preparazione del reagente.

Tabella 8 d. Profilo termico per LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete: Analytik Jena qTOWER<sup>3</sup> (96 pozzetti)

	Strumento	qTORRE <sup>3</sup>	
	Formato	96 pozzetti	
	Impostazione del volume	60 µl	
	Cicli di amplificazione	'20'	
Velocità di rampa	PASSAGGIO A	2 °C/sec	
Temperatura/Tempo	PASSAGGIO B	51 °C	3 min
Velocità di rampa	PASSAGGIO C	2 °C/sec	
Temperatura/Tempo	PASSAGGIO D*	49 °C	10 sec
Velocità di rampa	PASSAGGIO E	2 °C/sec	
Temperatura/Tempo	PASSAGGIO F	61 °C	1 sec
Velocità di rampa	PASSAGGIO G	2 °C/sec	

**NOTA:** Preriscaldare il coperchio a 70 °C

\* Acquisire l'immagine durante la **PASSAGGIO D** del ciclo (49 °C).

**Tabella 9a. Impostazioni ottiche e di analisi:**

**Strumenti Applied Biosystems QuantStudio 5 and QuantStudio 7 Flex RT-PCR (96 pozzetti)**

Formato piastra	Target di sistema (Fluor)	Impostazioni di eccitazione/rivelazione dello strumento	Cicli di base	Soglia
QS5 96 pozzetti	SARS-CoV-2 Target 1 (FAM)	470/520	1-2	100000
	SARS-CoV-2 Target 2 (Cy5/Mustang Purple)	~640/~68	1-2	100.000
	Internal Control (ROX)	2 580/623	1-2	100000
QS7 Flex 96 pozzetti	SARS-CoV-2 Target 1 (FAM)	470/520	1-2	500000
	SARS-CoV-2 Target 2 (Cy5/Mustang Purple)	~640/~68	1-2	250000
	Internal Control (ROX)	2 580/623	1-2	500.000

**Tabella 9 b. Impostazioni ottiche e di analisi: Strumento Bio-Rad CFX OPUS RT-PCR**

Formato piastra	Target (Fluor)	Cicli di base	Soglia
96 pozzetti	SARS-CoV-2 Target 1 (FAM)	1-2	5.000
	SARS-CoV-2 Target 2 (Cy5) Internal Control (ROX)	1-2	5000
		1-2	5.000

**Tabella 9 c. Impostazioni ottiche e di analisi: strumento qTOWER<sup>3</sup> RT-PCR (96 pozzetti)**

Formato piastra	Target di sistema (Fluor)	Cicli di base	Soglia di monitoraggio
96 pozzetti	SARS-CoV-2 Target 1 (FAM)	1-6	1,5
	SARS-CoV-2 Target 2 (Cy5)	1-6	5
	Internal Control (ROX)	1-6	5

## 8. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Workflow

### 8.1. Controllo di qualità

Si consigliano controlli interni, positivi e negativi per monitorare la funzione del reagente e per dimostrare il corretto funzionamento del test.

#### 8.1.1. Controlli interni

- Un controllo interno è presente in ogni reazione del test LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete per la convalida della stabilità e delle prestazioni di enzimi, primer e sonda.

#### 8.1.2. Controlli positivi e negativi

- Testare tutti i terreni di controllo positivi e negativi durante l'esecuzione di campioni diagnostici e con ogni nuovo lotto di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Kit per garantire che tutti i reagenti e i componenti del kit funzionino correttamente.

### 8.2. Preparazione del campione

LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete elimina la purificazione e l'estrazione del campione combinando lisi e amplificazione in un unico passaggio. Questo test è compatibile con i tamponi conservati in una provetta vuota (a secco) o con i tamponi conservati nel terreno di trasporto.

**NOTA:** Si prega di maneggiare il PCM con cura in quanto può causare falsi positivi se versato accidentalmente o maneggiato con distrattamente. Per ridurre il rischio di contaminazione incrociata, maneggiare il PCM in un'area separata rispetto a quella in cui vengono elaborati i campioni e utilizzare puntali separati per tutti i materiali.

**NOTA:** Le tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, tra cui qSTAR, sono estremamente sensibili e l'introduzione accidentale del prodotto da precedenti reazioni di amplificazione può dare luogo a risultati falsi positivi. Possono verificarsi risultati errati se il campione o i reagenti qSTAR utilizzati nella fase di amplificazione vengono contaminati dall'introduzione accidentale dell'amplicone. Il flusso di lavoro in laboratorio dovrebbe sempre procedere in modo unidirezionale per ridurre al minimo il potenziale di tali eventi.

- Mantenere aree separate per l'impostazione del test e la manipolazione dei campioni.
- Sostituire i puntali delle pipette con barriera antiaerosol tra tutti i trasferimenti manuali di liquidi.
- Durante la preparazione dei campioni, il rispetto di buone tecniche di laboratorio è essenziale per ridurre al minimo

il rischio di contaminazione incrociata tra i campioni e l'introduzione involontaria di nucleasi nei campioni durante e dopo la procedura di estrazione. Quando si lavora con acidi nucleici, si dovrebbe sempre usare una tecnica asettica adeguata.

- Mantenere apparecchiature separate e dedicate (ad es. pipette, microcentrifughe) e forniture (ad es. provette per microcentrifuga, puntali per pipette filtrati) per l'impostazione del test e la manipolazione dei campioni.
- Indossare un camice da laboratorio pulito e guanti monouso privi di polvere (non indossati in precedenza) durante l'impostazione dei test.
- Cambiare i guanti spesso e ogni volta che si sospetta una contaminazione.
- Tenere le provette tappate e le piastre sigillate il più possibile.
- Si consiglia di utilizzare un blocco di raffreddamento per mantenere i materiali freddi in quanto le provette non sigillate su ghiaccio umido possono causare contaminazione.
- LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Extraction Buffer, LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete IC/P Mix e LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Master Mix devono essere scongelati e mantenuti costantemente su un blocco di refrigerazione equilibrato a 4 °C durante la preparazione e l'uso. Se i reagenti non vengono completamente consumati al primo utilizzo, possono essere ricongelati non più di tre volte.
- Le superfici di lavoro, le pipette e le centrifughe devono essere pulite e decontaminate con prodotti per la pulizia (ad es. candeggina al 10%, DNAZap™, RNaseZap® o RNase AWAY®, ecc.) per ridurre al minimo il rischio di contaminazione da acido nucleico. La candeggina residua deve essere rimossa utilizzando acqua priva di nucleasi ed etanolo al 70%.

#### 8.2.1. Tampone a secco (formato standard)

- a. Se il tampone viene fornito a secco, trasferire (1) ml di un terreno di trasporto compatibile nella provetta e ricoprire la provetta.
- b. Vorticare la provetta contenente il tampone per 30 secondi con pulsazioni intermittenti.
- c. Incubare il tampone a temperatura ambiente per almeno 10 minuti.
- d. Rimuovere e gettare il tampone nei rifiuti a rischio biologico.

**NOTA:** Un'aliquota di questo campione verrà caricata direttamente nella piastra RT-PCR.

#### 8.2.2. Tampone secco a (formato Deep Well)

- a. Dispensare 100 ml di un terreno di trasporto compatibile in un serbatoio di reagente adatto.
  - b. Utilizzando una pipetta multicanale, trasferire 1 ml di terreno in ciascuno dei 94 pozzetti del serbatoio deep well, lasciando A1 e A12 vuoti per i controlli esterni.
  - c. Mettere e immergere il tampone/i tamponi negli appositi pozzetti per almeno 10 minuti, quindi agitare accuratamente ruotando il tampone fino a 5 volte.
  - d. Spremere il liquido dal tampone ruotandolo contro il lato del pozzetto mentre si rimuove il tampone dal pozzetto. (Attenzione alla contaminazione incrociata da schizzi).
- a. Gettare il tampone nei rifiuti a rischio biologico.

**NOTA:** Un'aliquota di questo campione verrà caricata direttamente nella piastra RT-PCR.

#### 8.2.3. Tampone umido

- a. Non è richiesta alcuna preparazione aggiuntiva, tuttavia, i campioni in più di 3 ml di terreno di trasporto compatibile possono presentare una sensibilità ridotta a causa della minore concentrazione di virus nel terreno. Si consiglia un (1) ml di terreno di trasporto.

**NOTA:** Un'aliquota di questo campione verrà caricata direttamente nella piastra RT-PCR.

### 8.3. Preparazione del reagente qSTAR e configurazione della piastra

Leggere e comprendere a fondo le seguenti istruzioni prima di tentare di preparare la Reaction Mix e i controlli.

Tutti i componenti devono essere scongelati e mantenuti su un blocco di refrigerazione equilibrato tra 2 e 8 °C per mantenere l'integrità dei reagenti. Si consiglia di mettere in coda lo strumento RT-PCR convalidato prima di eseguire le istruzioni seguenti per garantire il mantenimento delle prestazioni di questo test.

#### 8.3.1. Formato 96 pozzetti (volume di reazione 60 µl)

1. Preparazione di controllo, campioni ed Extraction Buffer
  - a. Scongellare LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete PCM, NCM ed Extraction Buffer su un blocco di refrigerazione equilibrato tra 2 e 8 °C.
  - b. Vorticare le provette per 5 secondi.
  - c. Centrifugare le provette per 5 secondi per raccogliere i reagenti sul fondo di ciascuna provetta.
  - d. Trasferire direttamente 23,0 µl di PCM, 23,0 µl di NCM e 23,0 µl di campione/i nei pozzetti appropriati della piastra RT-PCR prerrefrigerata.
  - e. Aggiungere 5,0 µl di Extraction Buffer a ciascun pozzetto contenente controlli e campioni.  
**NOTA:** L'aggiunta di Extraction Buffer può essere semplificata utilizzando una pipetta multicanale.
  - f. Miscelare accuratamente i controlli e il/i campione/i per almeno 10 secondi. Evitare di creare bolle.

- g. Sigillare la piastra RT-PCR con pellicola sigillante e centrifugare per raccogliere il liquido sul fondo dei pozzetti per garantire che nessun reagente/campione venga trattenuto sulle pareti laterali dei pozzetti.
- h. Posizionare la piastra a 65 °C per 5 minuti, quindi riporre immediatamente la piastra RT-PCR sul blocco di refrigerazione.

**NOTA:** Il calore della piastra a 65 °C potrebbe potenzialmente aumentare la temperatura del blocco di refrigerazione oltre gli 8 °C. Si consiglia di sostituire il blocco di refrigerazione con un blocco nuovo (equilibrato a 2-8 °C) per ogni configurazione.

**NOTA:** Se è presente condensa, la piastra può essere centrifugata per raccogliere il liquido sul fondo dei pozzetti.

## 2. Preparazione della Reaction Mix

- a. Scongelare la LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Salt Mix, IC/P Mix e Master Mix su un blocco di refrigerazione equilibrato tra 2 e 8 °C.
- b. Ottenere una provetta sterile (senza RNasi/DNasi) e posizionarla su un blocco di refrigerazione.
- c. Determinare il numero di reazioni (*n*) da preparare per dosaggio:

**Tabella 10. Volumi della Reaction Mix (Reazioni da 60 µl)**

Reaction Mix	1 reazione	100 reazioni	<i>n</i> reazioni
Salt Mix	10,0 µl	1000,0 µl	<i>n</i> x 10,0 µl
Mix IC/P	2,0 µl	200,0 µl	<i>n</i> x 2,0 µl
Master mix	20,0 µl	2000,0 µl	<i>n</i> x 20,0 µl
<b>Volume totale</b>	<b>32,0 µl</b>	<b>3200,0 µl</b>	<b><i>n</i>x 32,0 µl</b>

- d. Vorticare vigorosamente la Salt Mix solo per 20 secondi, centrifugare per 5 secondi per raccogliere il reagente sul fondo della provetta e aggiungere **IMMEDIATAMENTE** il volume appropriato alla provetta prerrefrigerata.
- e. Capovolgere la IC/P Mix per miscelarla, quindi centrifugare per 5 secondi per raccogliere i reagenti sul fondo della provetta (non vorticare) e aggiungere **IMMEDIATAMENTE** il volume appropriato alla Salt Mix.
- f. Miscelare accuratamente per almeno 10 secondi (evitare che si creino bolle). Centrifugare brevemente (non vorticare e non centrifugare per un periodo di tempo eccessivo), quindi posizionare la provetta sul blocco di refrigerazione.
- g. Capovolgere la Master Mix per miscelarla, quindi centrifugare per 5 secondi per raccogliere i reagenti sul fondo della provetta (non vorticare i campioni) e aggiungere **IMMEDIATAMENTE** il volume appropriato per finalizzare la Reaction Mix.
- h. Miscelare accuratamente per almeno 10 secondi (evitare che si creino bolle). Centrifugare brevemente, quindi rimettere la provetta sul blocco di raffreddamento.
- i. Rimuovere con cautela la pellicola sigillante dalla piastra RT-PCR e aggiungere 32,0 µl di Reaction Mix a ciascun pozzetto con il controllo o il campione. Miscelare accuratamente per almeno 10 secondi (evitare che si creino bolle).
- j. Applicare la pellicola adesiva ottica appropriata. Centrifugare la piastra per almeno 20 secondi a 2000 giri/minuto per raccogliere la reazione sul fondo di ciascun pozzetto. Dopo la centrifugazione confermare che non persistono bolle. Se si osservano bolle, ripetere questo passaggio.
- k. Posizionare immediatamente la piastra a 96 pozzetti nello strumento RT-PCR pre-accodato.

## 8.4. Amplificazione

Dopo aver posizionato la piastra RT-PCR in uno strumento RT-PCR convalidato con il protocollo appropriato selezionato in base alla **Sezione 7 Strumento per PCR in tempo reale e Riepilogo protocollo** e avviare l'esecuzione.

## 8.5. Interpretazione e comunicazione dei risultati

Tutti i controlli del test devono essere esaminati prima dell'interpretazione dei risultati dei pazienti. Se i controlli non sono validi, i risultati non possono essere interpretati.

### 8.5.1. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Controls

LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Positive Control Media (PCM) è un controllo positivo esterno necessario per garantire che i reagenti del test rivelino correttamente entrambi i target di acido nucleico SARS-CoV-2. È composto da un modello SARS-CoV-2 quantificato. Il controllo è formulato in una matrice proprietaria con particelle virali intatte e purificate contenenti genoma a lunghezza intera, che sono state rese non infettive.

LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Negative Control Media (NCM) è un controllo negativo esterno necessario per verificare che la contaminazione incrociata o la contaminazione dei reagenti non si sia verificata durante l'elaborazione del campione o l'impostazione della reazione ed è composto da 1x tampone fosfato salino (PBS), pH7,4.

Un controllo interno (un componente di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Internal Control and Primer Mix) è costituito da un RNA sintetico – da cui i primer del test possono legarsi e amplificarsi – con una regione sonda unica per la rivelazione di segnali molecolari nel canale **ROX**. Il controllo interno funge da controllo per la rivelazione degli inibitori presenti nel campione, assicura che sia avvenuta un'adeguata amplificazione e che gli enzimi e i primer non siano stati danneggiati inavvertitamente durante la produzione, la spedizione e la conservazione.

L'algoritmo di test per tutti gli strumenti si basa sulla pratica standard di determinare la fluorescenza di fondo e

chiamare un campione ben positivo se la variazione del segnale fluorescente supera una soglia stabilita. I livelli e le soglie di fluorescenza di fondo vengono calcolati e applicati a ciascuna esecuzione come mostrato nella **Tabella 9a - Tabella 9 c**. I risultati positivi e negativi si basano su un campione che supera ampiamente questa soglia. Per questo algoritmo di test non viene utilizzato alcun limite di soglia del ciclo (Ct) e si prevede che tutte le reazioni si verifichino tra un valore Ct compreso tra 3 e 25.

Il fallimento del PCM o dell'NCM invalida l'esecuzione qSTAR e i risultati non devono essere comunicati. Il test qSTAR deve essere ripetuto con aliquote fresche di controlli esterni e campioni. Se i risultati continuano a essere non validi, contattare il supporto tecnico. Se il controllo interno (IC) non si amplifica (in assenza di un segnale positivo), il test qSTAR deve essere ripetuto come descritto sopra.

**Tabella 11. Risultati attesi dai controlli esterni sugli strumenti Applied Biosystems QuantStudio5, QuantStudio 7 Flex, Analytik Jena qTOWER<sup>3</sup>, Bio-Rad CFX Opus 96 pozzetti**

Tipo/ Nome del controllo	Usato per monitorare	SARS-CoV-2 Target 1 (FAM) Valore Ct atteso (Risultato)	SARS-CoV-2 Target 2 (Cy5/Mustang Purple) Valore Ct atteso (Risultato)	CI (ROX) Valore Ct atteso (Risultato)
PCM	Guasto sostanziale del reagente incluso il primer e integrità della sonda	$3,0 \geq Ct \leq 25,0$ + (positivo)	$3,0 \geq Ct \leq 25,0$ + (positivo)*	$3,0 \geq Ct \leq 25,0$ + (positivo) OR - (negativo)*
NCM	Reagente e/o contaminazione ambientale	Ct non rivelato - (negativo)	Ct non rivelato - (negativo)	$3,0 \geq Ct \leq 25,0$ + (positivo)

\*Non è necessario amplificare il controllo interno o il target 2 affinché il PCM sia considerato positivo. Vedere la tabella 15.

#### 8.5.2. Risultati del campione LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete

La valutazione del risultato di un test campione deve essere eseguita dopo che il PCM e l'NCM sono stati esaminati e determinati come validi. Se i Controlli non sono validi, i risultati non possono essere interpretati.

**Tabella 12. Intervalli Ct per risultati positivi del test per LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete sugli strumenti Applied Biosystems QuantStudio5 e QuantStudio 7 Flex, Analytik Jena qTOWER<sup>3</sup>, Bio-Rad CFX Opus 96 pozzetti**

Campione o Controllo	Intervallo Ct positivo*	CI (ROX) Valore Ct	Interpretazione dei risultati
SARS-CoV-2 Target 1 (FAM)	$3,0 \geq Ct \leq 25,0$	$3,0 \geq Ct \leq 25,0$ + (positivo) OR - (negativo)**	SARS-CoV-2 rivelato
SARS-CoV-2 Target 2 (Cy5/Mustang Purple)	$3,0 \geq Ct \leq 25,0$	$3,0 \geq Ct \leq 25,0$ + (positivo) OR - (negativo)**	SARS-CoV-2 rivelato

\*Per i campioni che generano un valore Ct maggiore di 0 e minore di 3, eseguire una diluizione 1:100 e/o 1:10 utilizzando un terreno compatibile non inoculato e procedere e testare secondo la **Sezione 7**.

\*\* Non è necessario amplificare il controllo interno.

**Tabella 13. Interpretazione dei risultati per LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete sugli strumenti Applied Biosystems QuantStudio5 e QuantStudio 7 Flex, Analytik Jena qTOWER<sup>3</sup>, Bio-Rad CFX Opus 96 pozzetti**

Campione			Interpretazione e comunicazione dei risultati
SARS-CoV-2 Target 1 (FAM)	SARS-CoV-2 Target 2 (Cy5/Mustang Purple)	CI (ROX)	
+ (positivo)	+ (positivo)	+ (positivo) OR - (negativo)*	SARS-CoV-2 rivelato. Comunicare i risultati.
+ (positivo)	- (negativo)	+ (positivo) OR - (negativo)*	SARS-CoV-2 rivelato. Comunicare i risultati.
- (negativo)	+ (positivo)	+ (positivo) OR - (negativo)*	SARS-CoV-2 rivelato. Comunicare i risultati.
- (negativo)	- (negativo)	+ (positivo)	SARS-CoV-2 non rivelato. Comunicare i risultati. Prendere in considerazione il test per altri agenti patogeni respiratori.
- (negativo)	- (negativo)	- (negativo)	Non valido. Non riportare i risultati. Ritestare lo stesso campione elaborato. Se anche il nuovo test non è valido, procurarsi un nuovo campione e ripetere il test.

\* Non è necessario amplificare il controllo interno.

## 9. Limitazioni

- Solo per esportazione.
- Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.
- Questo test è qualitativo e non fornisce valori quantitativi per gli organismi target nel campione.
- La rivelazione degli acidi nucleici dipende dalla corretta raccolta, manipolazione, trasporto, conservazione e preparazione del campione. La raccolta, il trasporto o la conservazione impropri dei campioni possono ostacolare la capacità di questo test di rivelare le sequenze target.
- Questo test non può escludere malattie causate da altri agenti patogeni batterici o virali.
- I risultati negativi non precludono l'infezione con un organismo target e non dovrebbero essere l'unica base per il trattamento delle decisioni di gestione del paziente.
- Le prestazioni di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete sono state valutate utilizzando solo campioni di tampone nasofaringeo.
- Esiste il rischio di risultati falsi negativi a causa della presenza di varianti di sequenza nei target virali di questo test.
- Gli inibitori presenti nel campione e/o errori nel seguire la procedura del test possono portare a risultati falsi negativi.
- Un operatore sanitario qualificato dovrebbe interpretare i risultati del test insieme all'anamnesi del paziente, ai segni e sintomi clinici e ai risultati di altri test diagnostici.
- Gli analiti target (sequenze virali) possono persistere *in vivo*, indipendentemente dalla vitalità del virus. La rivelazione dei target dell'analita non implica che i virus corrispondenti siano infettivi, né che siano gli agenti causali dei sintomi clinici.
- Questa performance del test non è stata stabilita nei pazienti immunocompromessi.
- Le prestazioni cliniche di questo test non sono state stabilite in tutte le varianti circolanti, ma si prevede che riflettano le varianti prevalenti in circolazione al momento e al luogo della valutazione clinica. Le prestazioni al momento del test possono variare a seconda delle varianti in circolazione, compresi i nuovi ceppi emergenti di virus target e la loro prevalenza, che cambia nel tempo.

## 10. Caratteristiche di performance

### 10.1. Studi analitici

#### 10.1.1. Sensibilità analitica: (Matrice dei campioni arricchita)

La sensibilità analitica, o limite di rivelazione (LoD) di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete è stata determinata utilizzando il virus addizionato direttamente nella matrice del campione negativa costituita da un terreno per tampone rinofaringeo negativo in pool e testata su uno strumento RT-PCR convalidato.

Per determinare il LoD le diluizioni seriali erano di virus e addizionate nella matrice del campione negativa. È stato condotto uno studio di individuazione dell'intervallo con 5 repliche a ciascuna concentrazione per determinare il punto in cui almeno 1 delle 5 repliche non è stata rivelata. Sono quindi state eseguite 96 repliche per concentrazione in base allo studio di determinazione dell'intervallo. La concentrazione più bassa alla quale almeno il 95% delle repliche era positivo è stata determinata essere il LoD. Il LoD confermato per il virus addizionato nella matrice del campione negativo è mostrato nella **Tabella 14**.

**Tabella 14. Determinazione del LoD di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete (Matrice dei campioni arricchita)**

Organismo	Ceppo	Concentrazione LoD
SARS-CoV-2	USA-WA1/2020	1,54 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /ml

## 10.1.2. Sensibilità analitica: LoD (tamponi arricchiti)

La sensibilità analitica, o limite di rivelazione (LoD) di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete è stata determinata utilizzando il virus diluito in una matrice di campione negativa e addizionato su tamponi che sono stati quindi eluiti in 1x PBS, pH7,4 e testati in uno strumento RT-PCR convalidato.

Sulla base del LoD stabilito, sono state eseguite 96 repliche per concentrazione. La concentrazione più bassa alla quale almeno il 95% delle repliche era positiva è stata determinata essere il LoD. Il LoD confermato per i tamponi arricchiti di virus ed eluiti nella matrice del campione negativo è mostrato nella **Tabella 15**.

**Tabella 15. Determinazione del LoD di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete (Tamponi arricchiti)**

Organismo	Ceppo	Concentrazione LoD
SARS-CoV-2	USA-WA1/2020	3,07 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /ml

## 10.1.3. Sensibilità analitica: LoD (tamponi a secco)

La sensibilità analitica, o limite di rivelazione (LoD) di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete è stata determinata utilizzando tamponi arricchiti di virus, **essiccati** ed eluiti in una matrice di campione negativa e testati su uno strumento RT-PCR convalidato.

Sulla base del LoD stabilito, sono state eseguite 96 repliche per concentrazione. La concentrazione più bassa alla quale almeno il 95% delle repliche era positivo è stata determinata essere il LoD. Il LoD confermato per i tamponi arricchiti di virus, essiccati ed eluiti nella matrice del campione negativo è mostrato nella **Tabella 16**.

**Tabella 16. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Determinazione LOD completa (tamponi a secco)**

Organismo	Ceppo	Concentrazione LoD
SARS-CoV-2	USA-WA1/2020	3,07 x 10 <sup>1</sup> TCID <sub>50</sub> /ml

## 10.1.4. Inclusività

L'inclusività di LumiraDx SARS-CoV-2 STAR Complete è stata valutata testando basse concentrazioni (~3x LoD) di virus (reso non infettivo) utilizzando 3 repliche ciascuno per diversi ceppi di SARS-CoV-2, comprese importanti varianti testate su uno strumento RT-PCR validato. Una sintesi dei risultati del test di inclusività è mostrata nella **Tabella 17**. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete ha rivelato con successo tutti i ceppi di inclusività alle concentrazioni testate.

**Tabella 17. Inclusività completa LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR**

Organismo	Ceppo	Concentrazione di prova	Rivelazione percentuale (Pos/Tot)
SARS-CoV-2	Variante B.1.1.7 (Alfa)	3x LoD	100%
	Variante B.1.351 (Beta)	3x LoD	100%
	Variante B.1.617.2 (Delta)	3x LoD	100%
	Variante B.1.1/529 (Omicron)	3x LoD	100%

## 10.1.5. Inclusività (In Silico)

Un campionamento di circa 1.000.000 di sequenze dal database GISAID SARS-CoV-19 è stato estratto in modo casuale ed elaborato per la qualità e la completezza nel maggio del 2022. Nell'analisi sono state utilizzate sequenze ad alta copertura e a lunghezza intera. Una sintesi dei risultati dell'analisi di inclusività in silico per target e per variante è mostrata nella **Tabella 18** e nella **Tabella 19**. Questi dati indicano che si prevede che LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete riveli circa il 99,82% di tutte le sequenze valutate al momento dell'analisi.

**Tabella 18. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Completo Inclusività in Silico per Target**

Target del test	Omologia alle sequenze analizzate
Target 1	>99%
Target 1	>99%*
Target 1, Target 2 combinato	99,8%

\*Con uno o meno disallineamenti

**Tabella 19. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Completo Inclusività in silico per variante**

Variante	Omologia oligonucleotidica del target 1 alle sequenze analizzate	Omologia oligonucleotidica del target 2 alle sequenze analizzate
Omicron (BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5, XE)	>99%*	>99%
Delta (B.1.617.2)	>99%*	>99%

\*Con uno o meno disallineamenti



### 10.1.6. Specificità analitica: Esclusività e reattività incrociata

L'esclusività e la reattività crociata per LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete sono state valutate testando un pannello di 43 microrganismi comunemente presenti nel tratto respiratorio superiore o che sono geneticamente simili a SARS-CoV-2 a titoli elevati, come indicato nella **Tabella 20**. Ciascun microrganismo è stato diluito in una matrice campione negativa e testato in triplicato. Il test è stato eseguito per ciascuno degli organismi fuori pannello da solo e in presenza di ciascuno degli organismi presenti sul pannello a 3x LoD su uno strumento RT-PCR convalidato. I risultati di questo studio sono riportati nella **Tabella 20**. Nessuno degli organismi ha prodotto risultati falsi positivi alle concentrazioni testate e tutte le repliche di ciascun target SARS-CoV-2 sono state rivelate a 3x LOD in presenza di livelli elevati di organismi fuori pannello.

**NOTA:** Le concentrazioni sono riportate in TCID<sub>50</sub> (Median Tissue Culture Infectious Dose), CFU (Colony Forming Units), CCU (Colony Changing Units), Copie (copie genomiche o equivalenti genomici) e IFU (Inclusion Forming Units).

**Tabella 20. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Esclusività e reattività incrociata**

Organismo fuori campo	Ceppo	Organismo off-panel Concentrazione testata	Organismo off-panel Risultato del test	SARS-CoV-2 Risultato del test
Adenovirus	Tipo 1	1,00 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Adenovirus	Tipo 5	1,00 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Adenovirus	Tipo 7	1,00 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Citomegalovirus		2,00 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Enterovirus	Digitare D68	6,20 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Virus di Epstein-Barr		1,00 x 10 <sup>5</sup> copie/ml	Non rivelato	Rivelato
Coronavirus umano	229 E	1,70 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Coronavirus umano	HKU1	2,70 x 10 <sup>4</sup> copie/ml	Non rivelato	Rivelato
Coronavirus umano	NL63	5,00 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Coronavirus umano	OC43	1,00 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Metapneumovirus umano (hMPV)		1,00 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Influenza A	Denver/1/57	1,00 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Influenza B	GL/1739/54	1,00 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Morbillo		2,00 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Coronavirus MERS		2,00 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Parotite		1,00 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Virus parainfluenzale	Tipo 1	6,20 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Virus parainfluenzale	Tipo 2	7,50 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Virus parainfluenzale	Tipo 3	1,00 x 10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Virus parainfluenzale	Digitare 4a	2,70 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Virus respiratorio sinciziale (RSV)		1,70 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Rinovirus	Tipo 1A	8,00 x 10 <sup>3</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
Coronavirus SARS		2,60 x 10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> /ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Bordetella pertosse</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Chlamydia pneumoniae</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> IFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Escherichia coli</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Haemophilus influenzae</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Lactobacillus salivarius</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Legionella pneumofila</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Moraxella catarrhalis</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CCU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Neisseria meningitidis</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Pneumocystis jirovecii</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Staphylococcus aureus</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Streptococcus pyogenes</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Streptococcus salivarius</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato
<i>Candida albicans</i>		1,00 x 10 <sup>6</sup> CFU/ml	Non rivelato	Rivelato

### 10.1.7. Esclusività (In Silico)

L'esclusività per LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete è stata valutata in silico valutando sequenze di agenti patogeni potenzialmente presenti in campioni respiratori e/o con somiglianze genetiche con organismi target. Un riassunto degli organismi valutati per l'esclusività è riportato nella **Tabella 21**. Nessuna reattività crociata è prevista sulla base dell'analisi in silico.

**Tabella 21. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Organismi di esclusività In Silico**

Virus	Batteri	Eucarioti
Adenovirus (Tipo 1)	<i>Bordetella pertosse</i>	<i>Candida albicans</i>
Adenovirus (Tipo 5)	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Genoma umano
Adenovirus (Tipo 7)	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	
Citomegalovirus	<i>Escherichia coli</i>	
Enterovirus D68	<i>Haemophilus influenzae</i>	
Virus di Epstein-Barr	<i>Lactobacillus salivarius</i>	
Coronavirus umano (229E)	<i>Legionella pneumofila</i>	
Coronavirus umano (HKU1)	<i>Moraxella catarrhalis</i>	
Coronavirus umano (NL63)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	
Coronavirus umano (OC43)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
Metapneumovirus umano (hMPV)	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
Influenza A (H1N1, H3N2)	<i>Neisseria meningitidis</i>	
Influenza B (Victoria, Yamagata)	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	
Morbillo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Coronavirus MERS	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Parotite	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Virus della parainfluenza (tipo 1)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
Virus della parainfluenza (tipo 2)	<i>Streptococcus pyogenes</i>	
Virus della parainfluenza (tipo 3)	<i>Streptococcus salivarius</i>	
Virus della parainfluenza (tipo 4a)		
Virus respiratorio sinciziale (RSV)		
Rinovirus (Tipo 1A)		
SARS Coronavirus		

### 10.1.8. Sostanza potenzialmente interferente

Le sostanze comunemente presenti nei campioni respiratori, le sostanze che potrebbero essere introdotte durante la raccolta dei campioni e i farmaci comunemente usati per trattare la congestione, le allergie o i sintomi dell'asma che potrebbero potenzialmente interferire con LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete sono stati valutati individualmente a concentrazioni clinicamente rilevanti contro il SARS-CoV-2 a basso titolo (3x LoD) in matrice clinica negativa su uno strumento RT-PCR convalidato. Un riepilogo delle sostanze testate è riportato nella **Tabella 22**. Nessuna inibizione è stata osservata da nessuna delle sostanze alle concentrazioni testate.

**Tabella 22. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Sostanze potenzialmente interferenti**

Sostanza potenzialmente interferente	Principio attivo	Concentrazione di prova
Beclometasone	Beclometasone	0,1 mg/ml
Budesonide	Budesonide	0,1 mg/ml
Cloraseptic® max	Fenolo (1,5%), Glicerina (33%)	5% (v/v) o 0,075% fenolo, 1,65% glicerina
Sciropo per la tosse contro il raffreddore e l'influenza	Acetaminofene (325 mg), Destrometorfano HBr (10 mg), Guaifenesin (200 mg), Fenilefrina (5 mg) per 15 ml	5% (v/v) o acetaminofene 1,08 mg/ml, destrometorfano 0,033 mg/ml, guaifenesina 0,667 mg/ml, fenilefrina 0,0167 mg/ml
Desametasone	Desametasone	0,1 mg/ml
Flonasi	Fluticasone propionato (50 mcg)	5% (v/v)
Flunisolide	Flunisolide (0,025%)	0,1 mg/ml
Mometasone furoato	Mometasone furoato	0,1 mg/ml
Mucina, tipo IS (bovino)	Proteina di mucina purificata	0,25 mg/ml
Mupirocina	Mupirocina	0,1 mg/ml
Nasacort	Triamcinolone acetoneide (55 mcg)	5% (v/v)
Spray nasale salino	Cloruro di sodio (0,65%)	5% (v/v) o 0,0325% di NaCl
Ossimetazolina spray nasale	Ossimetazolina cloridrato (0,05%)	5% (v/v) o 0,0025% di ossimetazolina cloridrato
Spray nasale alla fenilefrina	Fenilefrina cloridrato (1%)	5% (v/v) o 0,05% di fenilefrina cloridrato
Tobramicina	Tobramicina	0,033 mg/ml
Vicks® VapoCOOL™ (pastiglia per la gola)	Benzocaina, mentolo	15 mg/ml, 20 mg/ml

Zanamivir	Zanamivir	0,75 mg/ml
Zicam® (gel nasale, sollievo allergico omeopatico)	Galphimia glauca, Luffa operculata, Sabadilla	5% (v/v)
Sangue intero (umano)	N/D	2,5% (v/v)

### 10.1.9. Ripetibilità

Per valutare la ripetibilità di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete, il virus SARS-CoV-2 (reso non infettivo) è stato aggiunto alla matrice clinica negativa a concentrazioni positive basse e moderate (2x e 5x LoD) e testato in 6 giorni da due operatori con due lotti di reagenti distinti con quattro repliche per condizione insieme a controlli negativi su uno strumento RT-PCR convalidato. Il 100% delle repliche era in accordo con il risultato atteso dimostrando la ripetibilità di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete. Un riepilogo delle condizioni di prova di ripetibilità è riportato nella **Tabella 23**.

**Tabella 23. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Condizioni di ripetibilità**

Condizione	Repliche negative	2x repliche LoD	5x repliche LoD
Giorni	6	6	6
Lotti di reagenti	2	2	2
Operatori	2	2	2
Repliche/Condizione	4	4	4
<b>Totali</b>	<b>96</b>	<b>96</b>	<b>96</b>

### 10.1.10. Riproducibilità

Per valutare la riproducibilità di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete, il virus SARS-CoV-2 (reso non infettivo) è stato aggiunto alla matrice clinica negativa a concentrazioni positive basse e moderate (2x e 5x LoD) e testato per 6 giorni da due operatori in tre siti distinti con tre repliche per condizione insieme a controlli negativi utilizzando uno strumento RT-PCR convalidato. Il 100% delle repliche era in accordo con il risultato atteso, dimostrando la riproducibilità di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete. Un riepilogo delle condizioni dei test di riproducibilità è riportato nella **Tabella 24**.

**Tabella 24. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Condizioni di riproducibilità**

Condizione	Repliche negative	2x repliche LoD	5x repliche LoD
Numero di siti	3	3	3
Giorni	6	6	6
Operatori	2	2	2
Repliche/Condizione	3	3	3
<b>Totali</b>	<b>108</b>	<b>108</b>	<b>108</b>

## 10.2. Studio clinico

Per dimostrare la concordanza percentuale positiva e negativa di LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete rispetto a un test RT-PCR marcato CE altamente sensibile (comparatore), 378 campioni di tampone nasofaringeo sono stati preparati e testati in uno studio in cieco per entrambi i test. La concordanza percentuale positiva e negativa tra LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete e il test di confronto sono riepilogati nella **Tabella 25**.

**Tabella 25. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Percentuale di accordo positivi e negativi**

		Comparatore		
		Positivo	Negativo	Totale
LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR completo	Positivo	167	0	167
	Negativo	4*	207	211
	Totale	171	207	378
Percentuale di accordo		97,7% (pos)	100% (Negativo)	
Intervallo di confidenza 95%		94,1-99,4%	98,2-100%	

\*Dei quattro campioni falsi negativi, tutti sono stati testati su un ulteriore test RT-PCR marcato CE, uno era negativo e tre erano positivi per SARS-CoV-2.

## 10.3. Studi di equivalenza

### 10.3.1. Equivalenza del terreno di trasporto

È stato eseguito uno studio di equivalenza della matrice campione per dimostrare l'equivalenza tra quattro terreni di trasporto. Diversi terreni di trasporto sono stati arricchiti con virus inattivato al calore a 1x LoD (un minimo di 20 repliche) ed eseguiti su uno strumento RT-PCR convalidato. La rivelazione di  $\geq 95\%$  di campioni positivi a 1x LoD e la rivelazione del 100% di IC in campioni negativi senza risultati falsi positivi erano necessari per determinare l'equivalenza per ciascuno dei terreni testati. Un riepilogo dei terreni testati e determinati come equivalenti è riportato nella **Tabella 26**.

**Tabella 26. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Equivalenza dei terreni**

Terreni equivalenti
1X PBS, pH7,4
Soluzione salina (0,85%)
Soluzione salina (0,90%)
Terreno di trasporto*

\*Terreno di trasporto o terreno di formulazione simile

### 10.3.2. Equivalenza dello strumento (96 pozzetti)

È stato eseguito uno studio di equivalenza dello strumento per verificare le prestazioni equivalenti tra tre strumenti a 96 pozzetti rispetto allo strumento Bio-Rad Opus a 96 pozzetti su cui sono stati eseguiti gli studi sulle prestazioni analitiche. 20 repliche del virus SARS-CoV-2 inattivato termicamente sono state testate in una matrice di campioni negativi per verificare il LoD per ogni strumento. Tutti gli strumenti testati hanno dimostrato una rivelazione  $\geq 95\%$  a LoD e lo 0% di rivelazione di campioni negativi con LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete. Una sintesi degli strumenti equivalenti è riportata nella **Tabella 27**.

**Tabella 27. LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR 96-Well Equivalenza dello strumento**

Strumento	Produttore
CFX Opus	Bio-Rad
QuantStudio5 (96 pozzetti)	Biosistemi applicati
QuantStudio 7 Flex (96 pozzetti)	Biosistemi applicati
qTORRE <sup>3</sup> (96 pozzetti)	Analytik Jena

## 11. Informazioni di contatto, ordini e assistenza sul prodotto

### Per ordinare, contattare LumiraDx:

Sito web: [www.LumiraDx.com](http://www.LumiraDx.com).

E-mail (USA): [CustomerServices.US@LumiraDx.com](mailto:CustomerServices.US@LumiraDx.com).

E-mail (internazionale): [CustomerServices@LumiraDx.com](mailto:CustomerServices@LumiraDx.com).

### Per informazioni sul prodotto, contattare LumiraDx:

E-mail: [CustomerServices.US@LumiraDx.com](mailto:CustomerServices.US@LumiraDx.com) Includere "LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete" nella riga dell'oggetto.

Telefono: 1-888-586-4721.

### Per assistenza tecnica, contattare LumiraDx:

E-mail: [TechnicalServices@LumiraDx.com](mailto:TechnicalServices@LumiraDx.com). Includere "LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete" nella riga dell'oggetto.

### Per la politica di restituzione, contattare LumiraDx:

In caso di problemi con LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete, potrebbe essere richiesto di restituire l'articolo. Prima di restituire i test, richiedere un numero di autorizzazione alla restituzione all'Assistenza clienti LumiraDx ([CustomerServices.US@LumiraDx.com](mailto:CustomerServices.US@LumiraDx.com)). Questo numero di autorizzazione alla restituzione deve essere riportato sulla confezione per la restituzione. Per i resi ordinari dopo l'acquisto, contattare l'Assistenza Clienti LumiraDx per i termini e condizioni.

### Proprietà intellettuale

Il test LumiraDx e tutta la documentazione LumiraDx fornita ("Prodotti") sono protetti dalla legge. La proprietà intellettuale dei prodotti LumiraDx rimane a LumiraDx. I dettagli sulla proprietà intellettuale rilevante per quanto riguarda i nostri prodotti sono disponibili all'indirizzo [LumiraDx.com/IP](http://LumiraDx.com/IP).

### Note legali

Copyright © 2022 LumiraDx e affiliate. Tutti i diritti riservati. LumiraDx e il logo LumiraDx Flame sono marchi protetti di LumiraDx International LTD. I dettagli completi di queste e altre registrazioni di LumiraDx sono disponibili su [LumiraDx.com/IP](http://LumiraDx.com/IP). Tutti gli altri marchi appartengono ai rispettivi proprietari.















### Garanzia limitata

LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete – Secondo la durata di conservazione.

I reagenti devono essere conservati secondo le condizioni di conservazione richieste, come indicato nelle presenti Istruzioni per l'uso, e possono essere utilizzati solo fino alla data di scadenza riportata sulla scatola del kit. Per il periodo di garanzia applicabile, LumiraDx garantisce che ogni prodotto sarà (i) di buona qualità e privo di difetti materiali, (ii) funzionante in conformità alle specifiche dei materiali indicate nell'insero del prodotto e (iii) approvato dagli enti governativi competenti richiesti per la vendita di prodotti per l'uso previsto (la "garanzia limitata"). Se il prodotto non soddisfa i requisiti della garanzia limitata, come unico rimedio per il cliente, LumiraDx riparerà o sostituirà, a discrezione di LumiraDx. Fatta eccezione per la garanzia limitata indicata in questa sezione, LumiraDx non riconosce alcuna garanzia, esplicita o implicita, incluse, a titolo esemplificativo, le garanzie di commerciabilità, idoneità a uno scopo particolare e non violazione del prodotto. La responsabilità massima di LumiraDx per qualsiasi reclamo del cliente non supererà il prezzo netto del prodotto pagato dal cliente. Nessuna delle due parti sarà responsabile nei confronti dell'altra per danni speciali, incidentali o consequenziali, tra cui, a titolo esemplificativo, la perdita di affari, profitti, dati o entrate, anche nel caso in cui una parte riceva in anticipo la notifica che questo tipo di danni potrebbe verificarsi. La garanzia limitata di cui sopra non si applica se il cliente ha sottoposto il kit completo LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR ad abusi fisici, uso

improprio, uso anomalo, uso non coerente con le istruzioni per l'uso LumiraDx, frode, manomissione, stress fisico insolito, negligenza o incidenti. Qualsiasi richiesta di garanzia da parte del Cliente ai sensi della Garanzia Limitata deve essere presentata per iscritto entro il periodo di Garanzia Limitata applicabile.

## 12. Glossario dei simboli

	Limitazione di temperatura		Data di scadenza: la data trascorsa la quale il reagente non aperto non può essere utilizzato.
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Contiene una quantità di reagenti sufficiente per "n" reazioni
	Numero di riferimento del catalogo		Fare riferimento a <a href="http://www.lumiradx.com">www.lumiradx.com</a> per il formato elettronico delle istruzioni per l'uso.
	Numero di lotto/codice di lotto		Produttore
	Negative Control Media		Marchio di conformità CE
	Positive Control Media		Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea
	L'imballaggio a contenuto riciclato non contaminato, la scatola del kit e le Istruzioni per l'uso sono riciclabili se possono essere raccolti, separati o recuperati in altro modo dal flusso dei rifiuti attraverso un programma di riciclaggio stabilito.		Importatore Europeo



**Fabbricato negli USA**

LumiraDx UK Ltd. Unit 50, Yorkshire Way Doncaster DN3 3FT, UK  
N. registro delle società del Regno Unito: 09206123

LumiraDx AB Västra Vägen 5A16961 Solna, Svezia

LumiraDx BV Looskade 20 6041 LE Roermond, Paesi Bassi

LumiraDx 6650 Nancy Ridge Drive, San Diego, CA 92121, USA

## 13. Appendice A: Istruzioni dettagliate per la configurazione dello strumento (formato a 96 pozzetti)

Questa appendice ha lo scopo di assistere l'utente nella programmazione degli strumenti da utilizzare con LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete.

### 13a. Configurazione dello strumento per Applied Biosystems™ QuantStudio 5 (formato 96 pozzetti)

Per ulteriori informazioni, fare riferimento al Manuale dell'utente codice articolo MAN0010407. Le istruzioni di programmazione dello strumento sono destinate alla configurazione di un'intera piastra da 96 pozzetti.

#### 13a.1 Istruzioni di programmazione per strumento collegato a PC/Laptop

Si consiglia di impostare lo strumento fino al punto 12, di seguito, prima di preparare la mix di reagenti come definito nella **Sezione 8.3 Preparazione del reagente qSTAR e configurazione della piastra**. La piastra a 96 pozzetti deve essere centrifugata di recente per garantire che tutti i reagenti si trovino sul fondo della piastra e mantenuti su un blocco di raffreddamento. Utilizzare solo piastre e sigilli a 96 pozzetti compatibili con il produttore dello strumento.

**NOTA:** Se il touch-screen dello strumento è in modalità di sospensione (schermo scuro), toccare lo schermo in un punto qualsiasi per attivare lo strumento. La modalità Sleep abbassa la temperatura della copertura riscaldata. È importante che il coperchio riscaldato sia inattivo a 105 °C prima di caricare una piastra.

1. Avviare il software desktop "QuantStudio Design & Analysis" (versione v1.5.1)
2. Selezionare "Crea nuovo esperimento". Si aprirà una finestra con la scheda "Proprietà" selezionata.
3. Inserire le "Proprietà dell'esperimento" come segue:
  - a. Assegnare all'esperimento il nome "Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Template"
  - b. Impostare "Tipo di strumento" su "Sistema QuantStudio 5"
  - c. Impostare "Tipo di blocco" su "Blocco 96 pozzetti 0,2 ml"
  - d. Impostare "Tipo esperimento" su "Curva standard"
  - e. Impostare "Chimica" su "Altro"
  - f. Impostare "Modalità di esecuzione" su "Standard"
4. Passare alla scheda "Metodo".
  - a. Fare clic su "Azione"
  - b. Selezionare "Impostazioni filtro ottico" dal menu a discesa.
  - c. Nella tabella "Filtro PCR", deselezionare tutte le combinazioni di filtri tranne le seguenti:
    - x1(470±15), m1(520±15) FAM
    - x4(580±10), m4(623±14) ROX
    - x5(640±10), m5(682±14) Cy5/Mustang Purple
  - d. Fare clic su "Chiudi" per tornare alla scheda "Metodo".
  - e. Impostare il "Volume" su "60 µl".
5. Nella sezione "Fase di attesa", modificare le impostazioni di "Fase 1" come segue:
  - a. Imposta la velocità di rampa su "2 °C/s"
  - b. Impostare la temperatura su "30 °C"
  - c. Impostare l'ora su "01:00"
6. Nella sezione "Fase di attesa", modificare le impostazioni di "Fase 2" come segue:
  - d. Imposta la velocità di rampa su "2 °C/s"
  - e. Impostare la temperatura su "51 °C"
  - f. Impostare il tempo su "03:00"
7. Nella sezione "Fase PCR", modificare le impostazioni di "Fase 1" come segue:
  - a. Imposta la velocità di rampa su "2 °C/s"
  - b. Impostare la temperatura su "51 °C"
  - c. Impostare il tempo su "00:25"
  - d. Impostare la raccolta dei dati per questa fase assicurandosi che l'icona della telecamera sia attiva (non in grigio)
8. Nella sezione "Fase PCR", modificare le impostazioni di "Fase 2" come segue:
  - a. Imposta la velocità di rampa su "2 °C/s"
  - b. Impostare la temperatura su "61 °C"
  - c. Impostare il tempo su "00:01"
9. Nella parte inferiore della sezione "PCR Stage", impostare "Cicli" su "20".
10. Passare alla scheda "Piastra".
  - a. Cambiare "Riferimento passivo" in "Nessuno" nella finestra "Attributi piastra".
  - b. Selezionare tutti i pozzetti dal layout della piastra.
11. Passare alla scheda "Configurazione avanzata" per impostare i target e i controlli.

**COVID Target 1**

  - a. Nella sezione "Target", rinominare "Target 1" in "**COVID Target 1**".

- b. Cambiare il colore predefinito in blu.
- c. Selezionare "**FAM**" come "Reporter" (il "Quencher" viene inserito automaticamente come "NFQ-MGB").
- d. Selezionare la casella vuota a sinistra della casella colorata per applicarla ai pozzetti.

#### **COVID Target 2**

- a. "Aggiungi" un secondo target, quindi rinominare in "**COVID Target 2**"
- b. Cambiare il colore predefinito in viola
- c. Selezionare "**Mustang Purple**" come "Reporter" (il "Quencher" viene inserito automaticamente come "NFQ-MGB")
- d. Selezionare la casella vuota a sinistra della casella colorata per applicarla ai pozzetti.

#### **Controllo interno**

- a. "Aggiungi" un terzo target, quindi rinominare in "**IC**"
- b. Cambiare il colore predefinito in rosso
- c. Selezionare "**ROX**" come "Reporter" (il "Quencher" viene inserito automaticamente come "NFQ-MGB")
- d. Selezionare la casella vuota a sinistra della casella colorata per applicarla ai pozzetti.

**Opzionale:** Nella sezione "Campioni", il "Nome campione" può essere aggiunto individualmente o incollato nel layout della piastra a 96 pozzetti da un file Excel.

12. Passare alla scheda "Esegui".
  - a. Salvare l'esperimento come modello per le esecuzioni successive facendo clic sulla freccia in basso "Salva" e selezionando l'opzione "Salva con nome".
  - b. Assegnare all'esperimento il nome "Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete CE Template" e fare clic su "Salva".
13. Caricare la piastra come segue:
  - a. Premere l'icona "Espelli" sul touch-screen dello strumento QuantStudio 5 in alto a destra della finestra.
  - b. Posizionare la piastra del campione sul blocco di amplificazione. Assicurarsi di allineare A1 sulla piastra a 96 pozzetti con la posizione A1 definita sul cassetto dello strumento.
  - c. Premere l'icona "Espelli" sul touch-screen dello strumento per chiudere il cassetto.
14. Tornare alla scheda "Esegui" del software sul desktop e fare clic sul pulsante "AVVIA ESECUZIONE". Una volta effettuata la connessione allo strumento, il numero dello strumento apparirà in un menu a discesa sotto il pulsante "AVVIA ESECUZIONE"
15. Selezionare il numero dello strumento per avviare l'esecuzione.
16. Modificare il "Nome file" in "LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete [YYMMDD\_Plate#]" e fare clic su "Salva".
17. Dopo l'esecuzione, il touch-screen dello strumento indica quando l'esecuzione è "Completa". Chiudere la schermata di esecuzione premendo "Fatto".
18. Rimuovere il piatto e gettarlo in un sacchetto o contenitore per rifiuti sigillabile.  
**NOTA:** I pozzetti contenenti PCM e quelli positivi per un target conterranno livelli elevati di amplicone che possono causare risultati falsi positivi in test futuri se consentiti nell'ambiente di laboratorio. Non rimuovere mai il sigillo ottico dalla piastra dopo l'amplificazione.

#### 13a.2 Istruzioni per l'analisi

1. Modificare le impostazioni dell'analisi utilizzando la scheda "Risultati" del software desktop "QuantStudio Design & Analysis" (versione v1.5.1).
2. Selezionare i pozzetti desiderati per l'analisi nel layout della piastra, quindi fare clic sul simbolo dell'occhio sopra il "Plot di amplificazione" per configurare il grafico come segue:
  - a. Impostare "Tipo di plot" su " $\Delta R_n$  vs Ciclo"
  - b. Impostare "Tipo di grafico" su "Registro"
  - c. Impostare "Colore plot" su "Target"
  - d. Fare clic fuori dalla finestra per accettare le modifiche (tutti gli altri contenuti rimangono invariati)
3. Fare clic sull'icona "Ingranaggio" a destra del pulsante "Analizza" in alto a sinistra del software per aprire la finestra "Impostazioni di analisi".

#### **COVID Target 1**

- a. Nella scheda "Impostazioni Ct", deselezionare la casella "Impostazioni predefinite" nella sezione "Impostazioni Ct per COVID".
- b. Deselezionare la casella "Soglia automatica"
- c. Deselezionare la casella "Linea di base automatica"
- d. Immettere "100.000" per "Soglia"
- e. Impostare "Ciclo di avvio della linea di base" su "1"
- f. Impostare "Ciclo finale" su "2"
- g. Fare clic su "Applica"

#### **COVID Target 2**

- a. Nella scheda "Impostazioni Ct", deselezionare la casella "Impostazioni predefinite" nella sezione "Impostazioni Ct per COVID Target 2".

- b. Deselezionare la casella "Soglia automatica"
  - c. Deselezionare la casella "Linea di base automatica"
  - d. Immettere "100.000" per "Soglia"
  - e. Impostare "Ciclo di avvio della linea di base" su "1"
  - f. Impostare "Ciclo finale" su "2"
  - g. Fare clic su "Applica"
- Controllo interno**
- a. Selezionare la riga "IC"
  - b. Deselezionare la casella "Impostazioni predefinite"
  - c. Deselezionare la casella "Soglia automatica"
  - d. Deselezionare la casella "Linea di base automatica".
  - e. Immettere "100.000" per "Soglia"
  - f. Impostare "Ciclo di avvio della linea di base" su "1"
  - g. Impostare "Fine ciclo" su "2".
  - h. Fare clic su "Applica".
4. Passare alla scheda "Esportazione" per definire il "Nome file" del file esportato ("Doppio target SARS-CoV-2 STAR Complete [YYMMDD\_Plate#]").
  5. Definire il "Nome file"
    - a. Scegliere il "Tipo di file" (l'impostazione predefinita è QuantStudio come file .xlsx)
    - b. Scegliere la "Posizione" in cui esportare il file
    - c. Scegliere il "Contenuto" da esportare (la casella "Risultati" deve essere selezionata per i valori Ct).
    - d. Fare clic su "Personalizza" per procedere all'esportazione di ciascun contenuto.
  6. Andare alla scheda "Risultati"
    - a. Selezionare la casella "Tutti i campi" per deselezionare tutti i contenuti
    - b. Selezionare le caselle per i seguenti contenuti:
      - "Pozzetto"
      - "Posizione pozzetto"
      - "Nome campione"
      - "Nome target"
      - "Reporter"
      - "Ct"
      - "Soglia Ct"
      - "Inizio linea di base"
      - "Fine linea di base"
    - c. Fare clic su "Chiudi" per tornare alla schermata della scheda "Esportazione".
  7. Fare clic su "Salva" per salvare le impostazioni modificate.
  8. Fare clic sul pulsante "Esporta" per generare il file di dati di esportazione. Il file esportato includerà una sezione "Risultati" contenente i valori Ct del campione.
  9. Chiudere il software.

### 13b. Configurazione dello strumento per Applied Biosystems QuantStudio 7 Flex (formato 96 pozzetti)

Per ulteriori informazioni, fare riferimento al Manuale dell'utente codice componente 4489821. Le istruzioni di programmazione dello strumento sono destinate alla configurazione di un'intera piastra da 96 pozzetti.

#### 13b.1 Istruzioni di programmazione per strumento collegato a PC/Laptop

Si consiglia di impostare lo strumento fino al punto 18, di seguito, prima di preparare la mix di reagenti come definito nella **Sezione 8.3 Preparazione del reagente qSTAR e configurazione della piastra**. La piastra a 96 pozzetti deve essere centrifugata di recente per garantire che tutti i reagenti si trovino sul fondo della piastra e mantenuti su un blocco di raffreddamento. Utilizzare solo piastre e sigilli a 96 pozzetti compatibili con il produttore dello strumento.

**NOTA:** Se il touch-screen dello strumento è in modalità di sospensione (schermo scuro), toccare lo schermo in un punto qualsiasi per attivare lo strumento. La modalità Sospensione abbassa la temperatura della copertura riscaldata. È importante che il coperchio riscaldato sia inattivo a 105 °C prima di caricare una piastra.

1. Avviare il software desktop "QuantStudio Real-Time PCR Software" (versione v1.3).
2. Nella barra degli strumenti selezionare "Strumenti" e poi "Preferenze" per aprire la scheda "Predefiniti"
3. Confermare che il "Tipo di strumento:" sia impostato su "QuantStudio™ 7 Flex System"
4. Confermare che il "Tipo di blocco:" sia impostato su "Blocco da 96 pozzetti (0,2 ml)"
5. Confermare che "Posizioni decimali da mostrare:" sia impostato su "3".
6. Fare clic sulla casella accanto a "Mostra filtri ottici per il metodo di esecuzione" e fare clic su "OK".
7. Selezionare "Crea nuovo esperimento". Si aprirà una finestra con la scheda "Proprietà" selezionata.
8. Inserire le "Proprietà dell'esperimento" come segue:



- a. Assegnare all'esperimento il nome "Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Template"
  - b. Impostare "Tipo di strumento" su "QuantStudio™ 7 Flex System"
  - c. Impostare "Tipo blocco" su "Blocco 96 pozzetti 0,2 ml"
  - d. Impostare "Tipo esperimento" su "Curva standard"
  - e. Impostare i reagenti utilizzati per rivelare le sequenze target come "Altro"
  - f. Impostare le proprietà per l'esecuzione dello strumento come "Standard"
9. Passare alla scheda "Definisci" nella sezione "Target".
- COVID Target 1**
- a. Nella sezione "Target", rinominare "Target 1" in "COVID Target 1"
  - b. Selezionare "FAM" come segnalatore
  - c. Cambiare il colore predefinito in blu
  - d. Confermare che "Quencher" venga inserito automaticamente come "NFQ-MGB".
- COVID Target 2**
- a. Aggiungere un secondo target facendo clic su "Nuovo" (appena sopra il "Nome del target") e rinominarlo in "COVID Target 2"
  - b. Selezionare "Cy5" o "Mustang Purple" come segnalatore
  - c. Cambiare il colore predefinito in viola
  - e. Confermare che "Quencher" venga inserito automaticamente come "NFQ-MGB".
- Controllo interno**
- a. "Aggiungi" un terzo target, quindi rinominare in "IC"
  - b. Selezionare "ROX" come segnalatore
  - c. Cambiare il colore predefinito in rosso
  - d. Confermare che "Quencher" venga inserito automaticamente come "NFQ-MGB".
- Colorante di riferimento passivo:**
- a. Utilizzare il menu a discesa nella sezione "Riferimento passivo" per cambiare il colorante di riferimento passivo in "Nessuno"
- Opzionale:**
- a. Nella sezione "Campioni" è possibile aggiungere individualmente il "Nome campione".
10. Passare alla scheda "Assegnazione".
- a. Selezionare tutti i pozzetti dal layout della piastra facendo clic sulla casella tra "A" e "1".
  - b. Nella parte sinistra della schermata, nella sezione "Target", selezionare le caselle accanto a "COVID Target 1", "COVID Target 2" e "IC" per applicare questi target ai pozzetti.
  - c. Se per ogni pozzetto sono stati definiti dei "campioni", selezionare i singoli pozzetti e selezionare la casella accanto al "nome" appropriato nella sezione "Campioni".
11. Passare alla scheda "Metodo di analisi".
- a. Nella sezione "Metodo di analisi", definire il "Volume di reazione per pozzetto" a "60" (µL).
12. Modificare le impostazioni di Fase 1 della "Fase di attesa" come segue:
- a. Impostare la velocità di rampa su '1.946 °C/s'
  - b. Impostare la temperatura a "30,0 °C"
  - c. Impostare il tempo su "01:00".
13. Modificare le impostazioni di Fase 2 della "Fase di attesa" come segue:
- d. Impostare la velocità di rampa su '1.946 °C/s'
  - e. Impostare la temperatura a "51,0 °C"
  - f. Impostare il tempo su "03:00".
14. Modificare la "Fase 1" in "Fase PCR" come segue:
- a. Impostare la velocità di rampa (medio) su "1.645 °C/s"
  - b. Impostare la temperatura (in alto al centro) su "52 °C"
  - c. Impostare il tempo (in basso al centro) su "00:25".
15. Modificare la "Fase 2" in "Fase PCR" come segue:
- a. Imposta la velocità di rampa (a sinistra) su "1.946 °C/s"
  - b. Impostare la temperatura (in alto a destra) su "61 °C"
  - c. Impostare il tempo (in basso a destra) su "00:01"
16. La "Fase 1" della "Fase PCR" è la fase di raccolta dei dati. Nella parte superiore di "Fase PCR", impostare "Numero di cicli" su "20".
17. Nella parte superiore della finestra, nella scheda "Vista grafica", selezionare "Filtri ottici". Subito sotto, nella sezione "Filtro PCR", deselegionare tutte le combinazioni di "Filtro di emissione" tranne quanto segue:
- x1(470±15), m1(520±15) FAM
  - x4(580±10), m4(623±14) ROX
  - x5(640±10), m5(682±14) Cy5/Mustang Purple
18. Salvare l'esperimento come modello per le esecuzioni successive come segue:
- a. Fare clic sul menu a discesa "Salva" e selezionare "Salva come modello".
  - b. Assegnare all'esperimento il nome "Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Template" Fare clic su "Salva". L'esperimento deve essere salvato di nuovo per collegarsi allo strumento.

- c. Fare clic sul menu a discesa accanto a "Salva" e selezionare "Salva con nome".
  - d. Salvare il "Nome file" in "LumiraDx Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete [YYMMDD\_Plate#]" e fare clic su "Salva".
19. Caricare la piastra come segue:
- a. Premere l'icona rossa "Freccia" sul touch-screen dello strumento QuantStudio 7 Flex, in basso a destra della finestra.
  - b. Posizionare la piastra del campione sul blocco di amplificazione che si apre automaticamente. Assicurarsi di allineare A1 sulla piastra da 96 pozzetti con la posizione A1 definita sul cassetto dello strumento.
  - c. Premere l'icona rossa "Freccia" sul touch-screen dello strumento per chiudere il cassetto.
20. Iniziare l'esecuzione come segue:
- a. Tornare alla scheda "Esegui" del software sul desktop e fare clic sul pulsante "AVVIA ESECUZIONE". Il numero dello strumento viene visualizzato in un menu a discesa sotto il pulsante "AVVIA ESECUZIONE".
  - b. Selezionare il numero dello strumento per avviare l'esecuzione.
  - c. Potrebbe apparire una finestra a comparsa che indica che la velocità di rampa nelle fasi 1 e 2 è superiore al massimo.
  - d. Selezionare "Sì" per procedere.
21. Dopo l'esecuzione, il touch-screen dello strumento indica quando l'esecuzione è "Completata". Rimuovere il piatto e gettarlo in un sacchetto o contenitore per rifiuti sigillabile.
- NOTA:** I pozzetti contenenti PCM e quelli positivi per un target conterranno livelli elevati di amplicone che possono causare risultati falsi positivi in test futuri se consentiti nell'ambiente di laboratorio. Non rimuovere mai il sigillo ottico dalla piastra dopo l'amplificazione.

### 13b.2 Istruzioni per l'analisi

1. Modificare le impostazioni di analisi utilizzando la scheda "Analisi" "Plot di amplificazione" nel software desktop "QuantStudio Real-Time PCR Software" (versione v1.3).
2. Selezionare i pozzetti desiderati per l'analisi in "Layout della piastra"
3. Configurare la finestra "Plot di amplificazione" a sinistra come segue:
  - a. Impostare "Tipo di plot" su " $\Delta R_n$  vs Ciclo"
  - b. Impostare "Tipo di grafico" su "Registro"
  - c. Impostare "Colore plot" su "Target"
4. In alto a destra del software, a destra del pulsante "Analizza", fare clic su "Impostazioni di analisi" per aprire la finestra "Impostazioni di analisi".

#### COVID Target 1

- a. Nella scheda "Impostazioni Ct" della finestra in basso a destra "Impostazioni Ct per COVID", deselegionare la casella "Impostazioni Ct da utilizzare" accanto a "Impostazioni predefinite". (In questo modo le caselle "Soglia automatica" e "Linea di base automatica" saranno selezionate).
- b. Deselegionare la casella a sinistra di "Soglia automatica"
- c. Deselegionare la casella a sinistra di "Linea di base automatica"
- d. Definire la "Soglia" come "500.000"
- e. Impostare il "Ciclo di avvio della linea di base" su "1"
- f. Impostare "Fine ciclo" su "2".

#### COVID Target 2

- a. Nella scheda "Impostazioni Ct" della finestra in basso a destra "Impostazioni Ct per COVID Target 2", deselegionare la casella "Impostazioni Ct da utilizzare" accanto a "Impostazioni predefinite". (In questo modo le caselle "Soglia automatica" e "Linea di base automatica" saranno selezionate).
- b. Deselegionare la casella a sinistra di "Soglia automatica"
- c. Deselegionare la casella a sinistra di "Linea di base automatica"
- d. Definire la "Soglia" come "250.000"
- e. Impostare il "Ciclo di avvio della linea di base" su "1"
- f. Impostare "Fine ciclo" su "2".

#### Controllo interno

- a. Nella finestra "Seleziona un target" (in basso a sinistra), selezionare "IC"
  - b. In "Impostazioni CT per IC" deselegionare le "Impostazioni predefinite"
  - c. In "Impostazioni CT per IC" deselegionare la "Soglia automatica"
  - d. In "Impostazioni CT per IC" deselegionare "Linea di base automatica".
  - e. Definire la "Soglia" come "500.000"
  - f. Impostare "Ciclo di avvio della linea di base" su "1"
  - g. Impostare "Fine ciclo" su "2".
  - h. Nella parte inferiore della finestra, selezionare "Applica impostazioni di analisi" per chiudere la finestra a comparsa "Impostazioni di analisi".
5. A sinistra dello schermo, passare alla scheda "Esportazione":

- a. Definire il "Nome file di esportazione" come "Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete [YYMMDD\_Plate#]"
- b. Scegliere il "Tipo di file" (l'impostazione predefinita è QuantStudio come file .xls)
- c. Scegliere la "Posizione del file di esportazione" per esportare il file
- d. Selezionare le schede desiderate sotto "Posizione file di esportazione" per determinare quali dati vengono esportati.

**Nota:** La casella accanto alla scheda "Risultati" deve essere selezionata per esportare i valori CT.

6. Nella scheda "Risultati" selezionare quanto segue:
  - a. "Pozzetto"
  - b. "Posizione pozzetto"
  - c. "Nome campione"
  - d. "Nome target"
  - e. "Reporter"
  - f. "Quencher"
  - g. "CT"
  - h. "Soglia Ct"
  - i. "Inizio linea di base"
  - j. "Fine della linea di base"
  - k. Fare clic su "Avvia esportazione" nella parte inferiore della schermata per generare il file di dati di esportazione. (Il file esportato includerà una sezione "Risultati" contenente i valori Ct del ) campione.
7. Fare clic su "Salva" per salvare le impostazioni modificate.
8. Chiudere il software.

### 13c. Configurazione dello strumento per Bio-Rad CFX OPUS (formato 96 pozzetti)

Per ulteriori informazioni, fare riferimento al Manuale dell'utente codice componente 10000119983. Le istruzioni di programmazione dello strumento sono destinate alla configurazione di un'intera piastra da 96 pozzetti.

#### 13c.1 Istruzioni di programmazione per strumento collegato a PC/Laptop

Si consiglia di impostare lo strumento fino al punto 18, di seguito, prima di preparare la mix di reagenti come definito nella **Sezione 8.3 Preparazione del reagente qSTAR e configurazione della piastra**. La piastra a 96 pozzetti deve essere centrifugata di recente per garantire che tutti i reagenti si trovino sul fondo della piastra e mantenuti su un blocco di raffreddamento. Utilizzare solo piastre e sigilli a 96 pozzetti compatibili con il produttore dello strumento.

1. Avviare il software "Bio-Rad CFX TM" (versione v2.2). Nella finestra a comparsa "Avvio guidato", selezionare "Definito dall'utente" come tipo di esecuzione.
2. Nella finestra a comparsa "Esegui configurazione", selezionare "Modifica selezionati..." sulla destra della finestra sotto la scheda "Protocollo" per iniziare l'impostazione.
3. Si aprirà la finestra a comparsa "Editor di protocollo". Impostare il "Volume del campione" su "0" µl (il volume del campione non deve essere impostato più alto di così).
4. Impostare la temperatura del coperchio come segue:
  - a. Fare clic su "Impostazioni" dal menu in alto, quindi su "Impostazioni coperchio..." dal menu a discesa.
  - b. Modificare la temperatura "Definita dall'utente" in "70".
  - c. Fare clic su "OK"
5. Fare clic su "Inserisci passaggio" per aggiungere un totale di cinque fasi al protocollo.
6. Modificare i passaggi da "1" a "5" come segue:
  - a. Impostare la temperatura del passaggio "1" su "45,0" C
  - b. Impostare il tempo "1" su "0:00" (questo imposta il tempo su "Per sempre")
  - c. Impostare la temperatura del passaggio "2" su "49,5" C, impostare il tempo della fase "2" su "3:00"
  - d. Impostare la temperatura del passaggio "3" su "49,0" C, impostare il tempo "3" su "0: 12" e "Aggiungi lettura piastra" facendo clic sull'icona a sinistra.
  - e. Impostare la temperatura della fase "4" su "67,5" C, impostare il tempo "4" su "0:01"
  - f. Impostare il passaggio "5 VAI A" su "3" e "26" x (questo definisce che il passaggio da 3 a 4 verrà ripetuto per un totale di 25 volte).
  - g. Selezionare "OK" e quindi selezionare "Sì" per salvare le modifiche al file di protocollo.
  - h. Definire il "Nome file" come "Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Template.prcl" nel percorso file appropriato e selezionare "Salva".
7. Passare alla scheda "Piastra" selezionando il pulsante "Avanti" in basso a destra della finestra "Editor del protocollo".
8. Selezionare "Modifica selezionati..." sulla destra della finestra.
9. Selezionare l'intera piastra selezionando la casella grigia tra la posizione "A" e "1" sulla piastra.
10. Assicurarsi che "Modalità di scansione" sia impostata su "Tutti i canali" utilizzando il menu a discesa.
11. Impostare i fluorofori facendo clic su "Seleziona fluorofori..." all'estrema destra della finestra.
  - a. Assicurarsi che i soli fluorofori selezionati siano "FAM", "ROX", "HEX" e "Cy5".

- b. Cambiare il "Colore" di "FAM" in blu.
  - c. Cambiare il "Colore" di "ROX" in rosso.
  - d. Cambiare il "Colore" di "Cy5" in viola.
  - e. Selezionare "OK" per chiudere la finestra a comparsa.
12. Per definire i target, selezionare "Impostazioni esperimento" in basso a destra per aprire la finestra a comparsa "Impostazioni esperimento" e procedere come segue:
- a. Nella scheda "Target", aggiungere un nuovo target definendo "Nuovo" come "COVID" e selezionando "Aggiungi".
  - b. Aggiungere un quarto target e definire "Nuovo" come "COVID Target 2", quindi selezionare "Aggiungi".
  - c. Aggiungere un quarto target e definire "Nuovo" come "IC", quindi selezionare "Aggiungi".
  - d. In "Escludi i seguenti tipi di campioni dall'analisi dell'espressione genica", in fondo alla finestra a comparsa, deselegionare tutte le caselle di controllo e selezionare "OK" per chiudere la finestra a comparsa.
  - e. Selezionare nuovamente l'intera piastra selezionando la casella grigia tra la posizione "A" e "1" sulla piastra e assicurarsi che le caselle di controllo a sinistra della selezione "Carica" siano selezionate per "FAM", "ROX" e "Cy5".
  - f. Utilizzando il menu a discesa sotto "Nome target", definire il "Nome target" per "FAM" come "COVID Target 1".
  - g. Definire il "Nome target" per "Cy5" come "COVID Target 2".
  - h. Definire il "Nome target" per "ROX" come "IC".
13. Selezionare il tipo di piastra come segue:
- a. Fare clic su 'Impostazioni' dalla barra dei menu di "Editor piastra"
  - b. Selezionare "Tipo di piastra" dall'elenco a discesa.
  - c. Selezionare "BR White" dall'elenco secondario a discesa.
  - d. Selezionare "OK" e salvare le modifiche facendo clic su "Sì".
14. Definire il "Nome file" come "Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Template.pltd" nel percorso file appropriato e selezionare "Salva" per salvare il file piastra.
15. La finestra a comparsa "Editor piastra" si chiude e la nuova piastra viene caricata nella scheda "Piastra" della finestra "Esegui configurazione". Passare alla scheda "Avvia esecuzione" selezionando "Avanti >>" in basso a destra della finestra.
16. Nella scheda "Avvia esecuzione", fare clic su "Avvia esecuzione"
17. Salvare l'esperimento definendo il "Nome file" come "Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete [YYMMDD\_Plate#].pcrd" nel percorso file appropriato e selezionando "Salva". L'esecuzione inizierà a inicializzarsi e il coperchio inizierà a preriscaldarsi.

**NOTA:** L'esecuzione rimarrà in pausa nella fase 1 fino a quando non si farà clic sul pulsante "Salta passaggio". Quando la piastra del campione è pronta e il coperchio è preriscaldato, passare alla fase successiva per aggiungere la piastra del campione al blocco di amplificazione e iniziare l'esecuzione.

18. Per caricare la piastra procedere come segue:
- a. In basso a sinistra dello schermo, selezionare "Aprire il coperchio". Potrebbe apparire una finestra a comparsa che indica che l'esecuzione verrà messa in pausa per aprire il coperchio.
  - b. Fare clic su "OK" per procedere. Il coperchio si aprirà automaticamente.
  - c. Posizionare la piastra del campione sul blocco di amplificazione
  - d. Selezionare "Chiudi coperchio" per chiudere il coperchio.
  - e. Una volta terminata la chiusura del coperchio, sarà disponibile il pulsante "Salta passaggio".
  - f. Selezionare "Salta passaggio" per avviare l'esecuzione.
19. Al termine dell'esecuzione, lo strumento diventa inattivo e viene visualizzata la finestra "Analisi dati".
20. Fare riferimento al software "Bio-Rad CFX Maestro" (versione v2.2) e selezionare "Aprire il coperchio". Il coperchio si aprirà automaticamente.
21. Rimuovere il piatto e gettarlo in un sacchetto o contenitore per rifiuti sigillabile. Selezionare "Chiudi coperchio" per chiudere il coperchio.

**NOTA:** I pozzetti contenenti PCM e quelli positivi per un target conterranno livelli elevati di amplicone che possono causare risultati falsi positivi in test futuri se consentiti nell'ambiente di laboratorio. Non rimuovere mai il sigillo ottico dalla piastra dopo l'amplificazione.

### 13c.2 Istruzioni per l'analisi

1. Nella finestra a comparsa "Analisi dei dati", sotto la scheda "Quantificazione", selezionare "Impostazioni" nel menu principale, quindi selezionare "Impostazione linea di base" e quindi "Adattamento curva sottratta linea di base".
2. Modificare le impostazioni della linea di base e della soglia del ciclo per **COVID Target 1** eseguendo le seguenti operazioni:
  - a. Nelle curve "Amplificazione", deselegionare tutte le caselle dei fluorofori **tranne "FAM"**.
  - b. Dal menu principale, selezionare "Impostazioni"
  - c. Selezionare "Soglia di base..." per aprire la finestra a comparsa "Soglia di base".
  - d. Nella sezione "Cicli di riferimento", selezionare "Definito dall'utente", quindi, immediatamente sotto, fare clic sul quadrato tra "Pozzetto" e "1" per selezionare tutti i pozzetti.

- e. Modificare "Tutte le righe selezionate: Inizio" su "1" e "Fine: " su "2".
  - f. Nella sezione "Soglia singola", selezionare "Definito dall'utente:" e impostarlo su "5000,00".
  - g. Fare clic su "OK" per procedere.
3. Modificare le impostazioni della linea di base e della soglia del ciclo per **COVID Target 2** eseguendo le seguenti operazioni:
    - a. Nelle curve "Amplificazione", deselegionare tutte le caselle dei fluorofori **tranne "Cy5"**.
    - b. Dal menu principale, selezionare "Impostazioni"
    - c. Selezionare "Soglia di base..." per aprire la finestra a comparsa "Soglia di base".
    - d. Nella sezione "Cicli di riferimento", selezionare "Definito dall'utente", quindi, immediatamente sotto, fare clic sul quadrato tra "Pozzetto" e "1" per selezionare tutti i pozzi.
    - e. Modificare "Tutte le righe selezionate: Inizio" su "1" e "Fine: " su "2".
    - f. Nella sezione "Soglia singola", selezionare "Definito dall'utente:" e impostarlo su "5000,00".
    - g. Fare clic su "OK" per procedere.
  4. Modificare le impostazioni della linea di base e della soglia del ciclo per **IC** eseguendo i seguenti passaggi:
    - a. Nelle curve "Amplificazione", deselegionare tutte le caselle dei fluorofori **tranne "ROX"**.
    - b. Dal menu principale, selezionare "Impostazioni"
    - c. Selezionare "Soglia di base..." per aprire la finestra a comparsa "Soglia di base".
    - d. Nella sezione "Cicli di riferimento", selezionare "Definito dall'utente", quindi, immediatamente sotto, fare clic sul quadrato tra "Pozzetto" e "1" per selezionare tutti i pozzi.
    - e. Modificare "Tutte le righe selezionate: Inizio" su "1" e "Fine: " su "2".
    - f. Nella sezione "Soglia singola", selezionare "Definito dall'utente:" e impostarlo su "5000,00".
    - g. Fare clic su "OK" per procedere.
  5. Dopo aver definito le impostazioni della linea di base e della soglia del ciclo per COVID Target 1, COVID Target 2 e IC, selezionare entrambe le caselle a sinistra di tutti i canali, quindi passare alla scheda "Dati di quantificazione".
  6. Fare clic con il pulsante destro del mouse sulla tabella "Risultati" e scegliere il metodo desiderato per l'esportazione dei dati (ad es. "Esporta in Excel...").
  7. Salvare il report definendo il "Nome file" come "Risultati Cq completi SARS-CoV-2 STAR Dual-Target [YYMMDD\_Plate#].xlsx" nel percorso del file appropriato, quindi selezionare "Salva".
  8. Chiudere il software. (Se richiesto, salvare le modifiche all'esperimento).

### 13d. Configurazione dello strumento per l'analitica Jena qTOWER<sup>3</sup> (formato a 96 pozzetti)

Per ulteriori informazioni, fare riferimento al Manuale dell'utente codice componente 10000119983. Le istruzioni di programmazione dello strumento sono destinate alla configurazione di un'intera piastra da 96 pozzetti.

#### 13d.1 Istruzioni di programmazione per strumento collegato a PC/Laptop

Si consiglia di impostare lo strumento fino al punto 11, di seguito, prima di preparare la mix di reagenti come definito nella **Sezione 8.3 Preparazione del reagente qSTAR e configurazione della piastra**. La piastra a 96 pozzetti deve essere centrifugata di recente per garantire che tutti i reagenti si trovino sul fondo della piastra e mantenuti su un blocco di raffreddamento. Utilizzare solo piastre e sigilli a 96 pozzetti compatibili con il produttore dello strumento.

1. Avvia il software "qPCRsoft" (versione v4.1).
2. Sulla barra degli strumenti selezionare "File" e poi "Nuovo". Si aprirà la scheda "Generale" della finestra "Progetto PCR in tempo reale-Senza nome".
3. Nella scheda "Generale", definire il "Titolo" come "Modello completo SARS-CoV-2 STAR a doppio target".
4. Selezionare la scheda "Ciclatore termico" ed eseguire le seguenti operazioni:
  - a. Confermare che l'opzione "Lid temp. °C" è impostata su "70"
  - b. Confermare che la casella di controllo "Preriscalda coperchio" è selezionata
  - c. Dal menu a discesa "Dispositivo", selezionare il tuo strumento (qTOWER<sup>3</sup> o qTOWER<sup>3</sup> G)
5. Impostare il profilo termico nella tabella fornita nel software come segue:
 

Passaggio 1:

  - a. Confermare che "scansione" è vuoto
  - b. Impostare "°C" su "51"
  - c. Impostare "m:s" su "03:00"
  - d. Confermare che "goto" è impostato su "--"
  - e. Confermare che "loop" è impostato su "---"
  - f. Confermare che "ΔT( °C)" è impostato su "--.-"
  - g. Confermare che "Δt(s)" è impostato su "---"
  - h. Impostare "↗( °C/s)" su "2"

Passaggio 2:

  - a. Impostare "scansione" su "◇" facendo clic nella casella vuota
  - b. Impostare "°C" su "49"

- c. Impostare "m:s" su "00:10"
- d. Confermare che "goto" è impostato su "--"
- e. Confermare che "loop" è impostato su "---"
- f. Conferma che " $\Delta T$  (°C)" è impostato su "---"
- g. Confermare che " $\Delta t$ (s)" è impostato su "---"
- h. Impostare " $\nearrow$  (°C/s)" su "2"

Passaggio 3:

- a. Confermare che "scansione" è vuoto
  - b. Impostare "C" su "61"
  - c. Impostare "m:s" su "00:01"
  - d. Confermare che "goto" è impostato su "2"
  - e. Confermare che "loop" è impostato su "19"
  - f. Confermare che " $\Delta T$  (°C)" è impostato su "--,-"
  - g. Confermare che " $\Delta t$ (s)" è impostato su "---"
  - h. Impostare " $\nearrow$  (°C/s)" su "2"
6. Selezionare la scheda "Scansione" e cambiare la "Pos." Impostazioni "1" come segue:
    - a. Confermare che "Canale" è impostato su "Blu"
    - b. Confermare che "Colorante" è impostato su "FAM"
    - c. Impostare "Guadagno" su "5"
    - d. Impostare "Misurazione" su "◊" facendo clic nella casella vuota
    - e. Confermare il passaggio. Rif. viene lasciato vuoto.
  7. Modificare la "Pos." Impostazioni "2" come segue:
    - a. Confermare che "Canale" è impostato su "Viola"
    - b. Confermare che "Tintura" sia impostato su "Cy5"
    - c. Impostare "Guadagno" su "5"
    - d. Impostare "Misurazione" su "◊" facendo clic nella casella vuota
    - e. Confermare che "Pass. Rif." viene lasciato vuoto
  8. Cambiare la scheda "Scansione" e cambia la "Pos." Impostazioni "3" come segue:
    - a. Confermare che "Canale" è impostato su "Rosso"
    - b. Confermare che "Colorante" è impostato su "ROX"
    - c. Impostare "Guadagno" su "5"
    - d. Impostare "Misurazione" su "◊" facendo clic nella casella vuota
    - e. Confermare il passaggio. Rif. viene lasciato vuoto.
    - f. Confermare "Mis. Ripeti:" è impostato su "3"
    - g. Confermare che "Compensazione colore" è impostato su "Standard 1".
    - h. Confermare che "Scansione regione in base al layout" sia selezionato.
  9. Assegnare target e fluorofori utilizzando la scheda "Campioni" dal layout della piastra
    - a. Selezionare tutti i 96 pozzi
    - b. Dal menu a discesa, cambiare "Tipo di campione:" in "Sconosciuto"
    - c. Nella tabella "Target:" sotto "Gene"
      - Inserire " **COVID Target 1** " nella casella a destra di " **FAM** " "Tintura"
      - Inserire " **COVID Target 2** " nella casella a destra di " **Cy5** " "Tintura"
      - Immettere " **IC** " nella casella a destra di " **ROX** " "Tintura"
    - d. Fare clic sull'icona di esecuzione per applicare le modifiche a tutti i 96 campioni
  10. Assegnare le posizioni di controllo positivo e negativo sulla piastra come segue:
    - a. Dal layout della lastra, selezionare la posizione " **A1** ", cambiare "Tipo campione:" in " **Controllo negativo** "
    - b. Dal menu a discesa, inserire " **NCM** " nella casella vuota accanto a "Nome del campione:"
    - c. Fare clic sull'icona di esecuzione per applicare le modifiche al campione.
    - d. Dal layout della piastra, selezionare la posizione " **A12** ", cambiare "Tipo di campione:" in " **Controllo positivo** "
    - e. Dal menu a discesa, inserire " **PCM** " nella casella vuota accanto a "Nome del campione:"
    - f. Fare clic sull'icona di esecuzione per applicare le modifiche al campione
  11. Salvare il modello per le esecuzioni successive facendo clic su "File" dalla barra dei menu in alto e selezionando "Salva modello" dal menu a discesa
  12. Sollevare il coperchio dello strumento e caricare la piastra.
  13. Nella finestra a comparsa "Salva con nome" accanto a "Nome file", denominare il modello "Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete Template" e fare clic su "Salva"
- NOTA:** Caricare il piatto in modo che la posizione A1 sul piatto sia la parte superiore, più a sinistra.
14. Chiudere e bloccare il coperchio.
  15. Dopo l'esecuzione, in una finestra a comparsa si leggerà "Esecuzione PCR completata con successo".
  16. Fare clic su "Salva" per salvare l'esecuzione del file
  17. Definire il "Nome file" come "Dual-Target SARS-CoV-2 STAR Complete [YYMMDD\_Plate#]" e fare clic su "Salva"

18. Rimuovere il piatto e gettarlo in un sacchetto o contenitore per rifiuti sigillabile. Selezionare "Chiudi coperchio" per chiudere il coperchio.

**NOTA:** I pozzetti contenenti PCM e quelli positivi per un target conterranno livelli elevati di amplicone che possono causare risultati falsi positivi in test futuri se consentiti nell'ambiente di laboratorio. Non rimuovere mai il sigillo ottico dalla piastra dopo l'amplificazione.

### 13d.2 Istruzioni per l'analisi

1. Selezionare i pozzetti desiderati per l'analisi utilizzando l'opzione di menu all'estrema sinistra denominata "Campioni".
2. Aprire l'opzione facendo clic sull'icona "più" (+). Apparirà un layout della piastra in cui è possibile selezionare i pozzetti desiderati.
3. Modificare le impostazioni di analisi utilizzando la scheda "Monitoraggio".
  - a. In "Misura", fare clic su "Calcola Ct" per aprire la finestra "Misura (Ct)".
  - b. Fare clic su "Monitoraggio" nella barra dei menu in alto e selezionare "Visualizza opzioni" dal menu a discesa. Apparirà una finestra a comparsa intitolata "Opzioni di visualizzazione".
  - c. Modificare le opzioni come segue:
    - In "Smussamento" cambiare il valore in "nessuno" accanto a "Punti"
    - In "Ridimensionamento, selezionare "logaritmico"
    - In "Correzione della linea di base" selezionare "Per tutti i campioni"
      - Cambiare "Dal ciclo" a "1"
      - Cambiare "A ciclo" in "6"
    - Confermare che "Intensità" in "Filtro" è disabilitato (deselezionato)
    - Fare clic su "Ok-Correggi Thr."
4. Applicare le soglie al set di dati come segue:
  - a. Nella scheda "Monitoraggio" in "Misurazione (Ct)", selezionare la scheda " **FAM** " sotto il grafico e cambia la "Soglia" in "1,5"
  - b. Selezionare la scheda " **Cy5** " e cambiare la "Soglia" in "5".
  - c. Selezionare la scheda " **ROX** " e cambiare la "Soglia" in "5".
  - d. Salvare l'analisi facendo clic su "File" dalla barra dei menu in alto e selezionando "Salva progetto" dal menu a discesa.
5. Esportare i valori Ct come segue:
  - a. Nella scheda "Monitoraggio" in "Misurazione (Ct)" selezionare la scheda "Tutti i colori" sotto il grafico
  - b. Fare clic con il pulsante destro del mouse sulla tabella sotto il grafico e salvare i dati in una delle opzioni fornite ("Salva tabella come file Excel", "Salva tabella come file Excel")
  - c. Aprire Excel e salvare la tabella come file CSV
  - d. Nella finestra a comparsa "Salva con nome", definire il "Nome file: " per il set di dati
  - e. Fare clic su "Salva"
  - f. Chiudere il software.