

ISTRUZIONI PER L'USO

chemagic™ Viral DNA/RNA 300 H96

Numero di prodotto:	IVD-1033-S Reagenti per 960 estrazioni.
UDI-DI:	4260543364151
Versione:	V231023 IT  
Produttore:	Revvity chemagen Technologie GmbH Arnold-Sommerfeld-Ring 2 52499 Baesweiler, Germania www.revvity.com

CE

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

1. INDICE DEI CONTENUTI













1. Indice dei contenuti.....	1
2. Spiegazione delle parole di segnalazione in questa IFU	3
3. Simboli utilizzati nella IFU e sulle etichette	3
4. Applicazione	5
5. Riassunto e principio	5
6. Segnalazione degli incidenti	6
7. Informazioni generali e di conservazione.....	7
8. Istruzioni per l'uso elettroniche	8
9. Avvertenze e precauzioni	8
10. Reagenti del kit e informazioni sulla sicurezza	10
10.1 Magnetic Beads	10
10.2 Lysis Buffer 1	10
10.3 Binding Buffer 2	11
10.4 Wash Buffer 3	12
10.5 Wash Buffer 4	13
10.6 Wash Buffer 5	14
10.7 Elution Buffer 6	14
10.8 Proteinase K	15
10.9 Poly(A) RNA	16
10.10 Poly(A) RNA Buffer	16
10.11 Ulteriori componenti del kit.....	17
11. File dei protocolli richiesti.....	18
12. Materiale necessario ma non fornito con il kit.....	19
12.1 Articoli da Revvity chemagen Technologie GmbH.....	19
12.2 Articoli aggiuntivi richiesti.....	19
12.3 Ulteriori articoli opzionali di Revvity chemagen Technologie GmbH	19
12.4 Altri articoli opzionali aggiuntivi	19
13. Raccolta e manipolazione dei campioni.....	20
14. Descrizione dettagliata del protocollo di 60 minuti	21
14.1 Procedura Protocollo di 60 minuti (varie specie).....	21
14.2 Fasi di lavorazione	22
14.3 Breve descrizione/ Guida rapida	25
15. Caratteristiche delle prestazioni.....	28
15.1 Valore LOD ottenuto usando lo strumento chemagic 360-D per l'estrazione e il sistema Applied Biosystems™ 7500 PCR	28









15.2	Verifica del valore LOD ottenuto usando lo strumento chemagic 360-D per l'estrazione e il sistema Applied Biosystems 7500 PCR.....	30
15.3	Verifica del valore LOD ottenuto usando lo strumento chemagic 360-D e sistemi per PCR alternativi (equivalenza dei sistemi PCR)	31
15.4	Verifica del LoD su un fondo di matrice salivare	33
15.5	LoD - Sensibilità analitica su diversi sistemi per PCR.....	33
16.	Descrizione dettagliata del protocollo di 31 minuti	35
16.1	procedura protocollo di 31 minuti (testato solo con isolamento SARS-CoV-2)	35
16.2	Fasi di lavorazione	36
16.3	Breve descrizione/ Guida rapida	39
16.4	Note Protocollo di 31 minuti (testato solo con isolamento SARS-CoV-2)	42
17.	Descrizione dettagliata del protocollo di 18 minuti	43
17.1	Procedura Protocollo di 18 minuti (testato solo con isolamento SARS-CoV-2)	43
17.2	Fasi di lavorazione	44
17.3	Breve descrizione/ Guida rapida	47
17.4	Note sulle prestazioni Protocollo di 18 minuti (testato solo con isolamento SARS-CoV-2)	50
18.	Pulizia e manutenzione.....	51
19.	Applicazioni a valle	52
19.1	Applicazioni a valle testate con l'estrazione del SARS-CoV-2	52
19.2	applicazione a valle testata con SARS-CoV-2, Influenza A e B ed estrazione di RSV	54
20.	Altre domande	55
21.	Limitazioni della procedura	55
22.	Garanzia	56

2. SPIEGAZIONE DELLE PAROLE DI SEGNALAZIONE IN QUESTA IFU

Parola segnale	Descrizione
PRUDENZA!	Pericolo potenziale che potrebbe causare danni di lieve o media entità.
ATTENZIONE!	Un uso improprio può danneggiare lo strumento.
NOTA:	Gli errori commessi dall'operatore possono causare l'impossibilità di garantire le prestazioni ottimali del kit.

3. SIMBOLI UTILIZZATI NELLA IFU E SULLE ETICHETTE

Simbolo	Titolo del simbolo	Simbolo	Titolo del simbolo
	Marchio CE Conformità europea		Limite di temperatura
	Dispositivo medico <i>in vitro</i>		Contiene un numero sufficiente di <n> test
	Consultare le istruzioni per l'uso o le istruzioni elettroniche per l'uso		Quantità
	Produttore		Non riutilizzare
	Codice lotto		Traduzione
	Numero di catalogo		Data di scadenza

Simbolo	Titolo del simbolo	Simbolo	Titolo del simbolo
	Non utilizzare se la confezione è danneggiata e consultare le IFU		Da qui in su
	GHS02		GHS08
	GHS05		Merci pericolose: Classe 3 Liquido infiammabile
	GHS07		Merci pericolose: Classe 8 Sostanze corrosive

chemagic™ è un marchio di Revvity chemagen Technologie GmbH.

4. APPLICAZIONE

Il chemagic™ Viral DNA/RNA 300 Kit H96 è destinato all'estrazione e alla purificazione automatizzata del DNA e dell'RNA da campioni umani di plasma, saliva e tamponi naso-orofaringei usando lo strumento chemagic™ 360-D.

Il kit è progettato per essere utilizzato con le applicazioni downstream IVD che impiegano l'amplificazione enzimatica e la rilevazione di DNA e RNA (ad es. PCR, RT-PCR, NGS). Il prodotto è destinato al personale di laboratorio addestrato e appositamente addestrato per il kit chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 e lo strumento chemagic 360-D.

Per ulteriori informazioni, consultare le sezioni "REAGENTI DEL KIT E INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA" e "AVVERTENZE E PRECAUZIONI" in questo documento.

5. RIASSUNTO E PRINCIPIO

Il kit chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 si basa su una piattaforma tecnologica a microsfere magnetiche di proprietà di Revvity chemagen Technologie GmbH. Le cellule o altre fonti di DNA e RNA presenti nel plasma, nel siero e nei tamponi nasali o orofaringei vengono lisate durante il processo di estrazione. Gli acidi nucleici rilasciati si legano a piccole particelle magnetizzabili che vengono poi separate magneticamente dal materiale del campione. Nelle fasi successive vengono rimossi i contaminanti e gli acidi nucleici purificati vengono trasferiti in un tampone di eluizione. L'elaborazione automatizzata dei campioni viene eseguita utilizzando lo strumento chemagic 360-D con un chemagic 96 Rod Head Set o uno strumento equivalente.

Per ridurre al minimo le anomalie nei risultati diagnostici, il prodotto è concepito per l'uso con un controllo interno, oltre che con controlli positivi e controlli negativi, durante l'intero processo di preparazione, amplificazione e rilevazione dei campioni, in base al tipo di test eseguito a valle.

6. SEGNALAZIONE DEGLI INCIDENTI

Per un utente/ terzo nell'Unione Europea e nei paesi con un regime normativo identico (IVDR (EU) 2017/746); se, durante l'uso di questo dispositivo o in conseguenza del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, si prega di segnalarlo alla propria autorità nazionale e al produttore Revvity chemagen Technologie GmbH, +49 (0) 2401805500 o support.chemagen@revvity.com o ai suoi rappresentanti legali.

L'autorità competente in Germania è l'Istituto federale per i farmaci e i dispositivi medici (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM). Le informazioni di contatto aggiornate sono disponibili sul sito web del BfArM: <https://www.bfarm.de>.

7. INFORMAZIONI GENERALI E DI CONSERVAZIONE

Il kit contiene reagenti sufficienti per eseguire 960 estrazioni.

La data di scadenza del kit non aperto è riportata sull'etichetta esterna. Non utilizzare alcun componente oltre la data di scadenza. Conservare a una temperatura compresa tra +2 e +25 °C.

Una volta aperti, i componenti del kit hanno una stabilità limitata. La stabilità dopo l'apertura è indicata per ciascun componente separatamente nell'elenco dei reagenti (sezione "REAGENTI DEL KIT E INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA").

Se il Lysis Buffer 1 contiene precipitati (formatisi durante il trasferimento o la conservazione), la soluzione deve essere riscaldata a 50-60 °C e mescolata accuratamente fino a quando la soluzione risulta limpida. La limpidezza del Lysis Buffer 1 deve essere sempre confermata visivamente prima dell'uso.

NOTA: Dopo l'uso, risigillare immediatamente i flaconi con il tappo per prevenire l'eventuale evaporazione.

I flaconi possono scolorire durante la conservazione. Lo scolorimento dei flaconi non ha alcun effetto sulla funzionalità del test.

Talvolta potrebbe permanere qualche traccia di Magnetic Beads nell'eluato. Sebbene normalmente queste particelle non interferiscano con la PCR o con la maggior parte delle applicazioni a valle, si consiglia di eseguire un passaggio aggiuntivo di separazione tramite centrifugazione o separatore magnetico (chemagic Stand 96, incluso con chemagic 360 96 Rod Head Set) per separare qualsiasi traccia di particelle.

Il DNA/ RNA estratto dovrebbe essere utilizzato immediatamente dopo l'estrazione, eseguendo il test diagnostico *in vitro* desiderato.

In questo IFU si fa riferimento al Manuale d'uso del chemagic 360-D (chemagic 360-D User Manual). Questo manuale sarà fornito con lo strumento chemagic 360-D.

I file di protocollo relativi al kit sono disponibili sulla pagina web o saranno forniti dall'assistenza clienti (vedere la sezione "FILE DEI PROTOCOLLI RICHIESTI").

8. ISTRUZIONI PER L'USO ELETTRONICHE

Sul nostro sito web sono disponibili le istruzioni per l'uso elettroniche (eIFU) in varie lingue.

Per scaricare le istruzioni per l'uso elettroniche, visitare:

<https://chemagen.com/ivd-1033-s-chemagic-viral-dna-rna-300-kit-h96/>.

Le eIFU sono fornite almeno in inglese (EN), francese (FR), spagnolo (ES) e italiano (IT) e su richiesta anche in altre lingue richieste.

In caso di domande relative al download o alle Istruzioni per l'uso elettroniche, contattateci: support.chemagen@revvity.com, info.chemagen@revvity.com o +49 (0) 2401805500.

9. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*.

Il prodotto è destinato agli utenti professionisti addestrati all'uso dello strumento chemagic 360-D.

La comprensione approfondita di questo IFU e del manuale d'uso di chemagic 360-D è un prerequisito e un requisito necessario per l'uso efficace del kit chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96.

I reagenti forniti con questo kit sono destinati all'uso come un'unica unità. Non mescolare reagenti identici appartenenti a kit con numeri di lotto differenti.

Non utilizzare i reagenti del kit dopo la data di scadenza stampata sull'etichetta del kit. Dopo l'apertura, i reagenti possono essere utilizzati per il periodo di tempo indicato nella list dei reagenti fornita in queste istruzione per l'uso.

Qualsiasi deviazione dal protocollo potrebbe influenzare i risultati.

I reagenti vengono dispensati automaticamente in righe complete, pertanto anche i puntali monouso del chemagic Tips 96 Tray devono essere utilizzati in righe complete su ogni asta a contatto con la soluzione reagente.

Si noti inoltre che se si eseguono piastre parziali, le soluzioni potrebbero non bastare per 960 estrazioni.

Controllare che tutti i componenti del kit siano integri. Nel caso siano danneggiati, contattare il fornitore.

Maneggiare tutti i campioni come se fossero potenzialmente infettivi. I campioni

potenzialmente infettivi dovranno essere inattivati. Consultare la pubblicazione "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" del Department of Health and Human Services degli Stati Uniti o le normative locali o nazionali pertinenti.

Il Lysis Buffer 1 contiene guanidinio tiocianato ed è nocivo per ingestione, contatto con la pelle o inalazione. Il Binding Buffer 2 e il Wash Buffer 3 contengono perclorato di sodio ed etanolo e sono liquidi e vapori infiammabili e nocivi se ingeriti. Il Wash Buffer 4 contiene etanolo ed è un liquido e un vapore infiammabile. La Proteinase K contiene Tritirachium album serina proteinasi e provoca irritazione cutanea e grave irritazione oculare, può causare sintomi di allergia o asma o difficoltà respiratorie se inalata e irritazione respiratoria. Il Poly(A) RNA Buffer contiene guanidinio tiocianato ed è nocivo se ingerito o inalato. Vedere le precauzioni specifiche per tutti i componenti nella sezione "REAGENTI DEL KIT E INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA".

Per evitare di ferirsi quando si utilizzano i componenti del kit, indossare sempre occhiali di sicurezza, guanti monouso e indumenti protettivi. Per informazioni dettagliate, consultare le schede di dati di sicurezza (safety data sheets, SDS).

Seguire le normative locali per la manipolazione delle soluzioni etanoliche.

Lo smaltimento di tutti i rifiuti deve avvenire in conformità alle normative locali.

10. REAGENTI DEL KIT E INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA

Il kit chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 contiene i seguenti reagenti.

10.1 MAGNETIC BEADS

Componente	Quantità	Durata di conservazione e stoccaggio
Magnetic Beads	1 bottiglia (volume vedere etichetta)	Tra +2 e +25 °C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del bottiglia. Dopo l'apertura, è stabile per 60 giorni tra +2 e +25 °C.

Sospensione di particelle contenente nanoparticelle di ossido di ferro incapsulate in una matrice di alcol polivinilico. Le Magnetic Beads si legano al DNA/ RNA durante il processo di estrazione.

10.2 LYSIS BUFFER 1

Componente	Quantità	Durata di conservazione e stoccaggio
<p>Lysis Buffer 1</p> <p>PERICOLO</p>	1 bottiglia (volume vedere etichetta)	Tra +2 e +25 °C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del bottiglia. Conservare al riparo dalla luce. Dopo l'apertura, è stabile per 60 giorni tra +2 e +25 °C.

Soluzione tampone acquosa, pronta all'uso, contenente tiocianato di guanidinio (50-70%). Il Lysis Buffer 1 viene impiegato per lisare le cellule o le altre fonti di DNA/ RNA presenti nel campione, in modo da ottenere il DNA/ RNA in soluzione.

PRUDENZA! Il Lysis Buffer 1 contiene tiocianato di guanidinio.


Fraasi di pericolo, precauzione e EUH

H302+H312	Nocivo in caso di ingestione o contatto con la pelle.
-----------	---

Frasi di pericolo, precauzione e EUH

H314	Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari.
P101	In caso di consultazione di un medico, tenere a disposizione il contenitore o l'etichetta del prodotto.
P102	Tenere fuori dalla portata dei bambini.
P103	Leggere l'etichetta prima dell'uso.
P303+P361+P353	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): Togliere immediatamente gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle [o fare una doccia].
P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P310	Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/ un medico.
P321	Trattamento specifico (vedere su questa etichetta).
P405	Conservare sotto chiave.
P501	Smaltire il prodotto/ recipiente in conformità alla regolamentazione locale/ regionale/ nazionale/ internazionale.
EUH032	A contatto con acidi libera gas molto tossici.

10.3 BINDING BUFFER 2


Componente	Quantità	Durata di conservazione e stoccaggio
Binding Buffer 2  PERICOLO	1 tanica (volume vedere etichetta)	Tra +2 e +25 °C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del tanica. Dopo l'apertura, è stabile per 60 giorni tra +2 e +25 °C.

Soluzione tamponata con Tris-HCl (pH 5.2–6.1), pronta all'uso, con perclorato di sodio (20-40 %) ed etanolo (40-60 %). Il Binding Buffer 2 crea condizioni favorevoli al legame tra il DNA/ RNA e le Magnetic Beads.

PRUDENZA! Il Binding Buffer 2 contiene etanolo e perclorato di sodio.**Frasi di pericolo, di precauzione e EUH**

H225	Liquido e vapore facilmente infiammabili.
H302	Nocivo se ingerito.
P210	Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
P240	Mettere a terra e a massa il contenitore e il dispositivo ricevente.
P241	Utilizzare impianti [elettrici/ di ventilazione/ d'illuminazione] a prova di esplosione.
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi/ proteggere gli occhi/ proteggere il viso/ proteggere l'udito.
P303+P361+P353	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): Togliere immediatamente gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle [o fare una doccia].
P501	Smaltire il prodotto/ recipiente in conformità alla regolamentazione locale/ regionale/ nazionale/ internazionale.

10.4 WASH BUFFER 3

Componente	Quantità	Durata di conservazione e stoccaggio
Wash Buffer 3 	1 bottiglia (volume vedere etichetta)	Tra +2 e +25 °C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del bottiglia. Dopo l'apertura, è stabile per 60 giorni tra +2 e +25 °C.
PERICOLO		


Soluzione tamponata con Tris-HCl (pH 4.8-5.6) pronta all'uso, con perclorato di sodio (20-30 %) ed etanolo (20-40 %). Aiuta a rimuovere i contaminanti diversi dal DNA/ RNA durante il lavaggio.

PRUDENZA! Il Wash Buffer 3 contiene etanolo e perclorato di sodio.

Frasi di pericolo, di precauzione e EUH

H225	Liquido e vapori facilmente infiammabili.
P210	Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
P240	Mettere a terra e a massa il contenitore e il dispositivo ricevente.
P241	Utilizzare impianti [elettrici/ di ventilazione/ d'illuminazione] a prova di esplosione.
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi/ proteggere gli occhi/ proteggere il viso/ proteggere l'udito.
P303+P361+P353	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): Togliere immediatamente gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle [o fare una doccia].
P501	Smaltire il prodotto/ recipiente in conformità alla regolamentazione locale/ regionale/ nazionale/ internazionale.

10.5 WASH BUFFER 4

Componente	Quantità	Durata di conservazione e stoccaggio
Wash Buffer 4  PERICOLO	1 bottiglia (volume vedere etichetta)	Tra +2 e +25 °C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del bottiglia. Dopo l'apertura, è stabile per 60 giorni tra +2 e +25 °C.

Soluzione pronta all'uso contenente il 50-70 % di etanolo. Aiuta a rimuovere le ultime tracce di contaminanti diversi dal DNA/ RNA durante il lavaggio.

PRUDENZA! Il Wash Buffer 4 contiene etanolo.

Frasi di pericolo, di precauzione e EUH

H225	Liquido e vapori facilmente infiammabili.
P210	Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
P240	Mettere a terra e a massa il contenitore e il dispositivo ricevente.

Frasi di pericolo, di precauzione e EUH

P241	Utilizzare impianti [elettrici/ di ventilazione/ d'illuminazione] a prova di esplosione.
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi/ proteggere gli occhi/ proteggere il viso.
P303+P361+P353	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): Togliere immediatamente gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle [o fare una doccia].
P501	Smaltire il prodotto/ recipiente in conformità alla regolamentazione locale/ regionale/ nazionale/ internazionale.

10.6 WASH BUFFER 5

Componente	Quantità	Durata di conservazione e stoccaggio
Wash Buffer 5	1 bottiglia (volume vedere etichetta)	Tra +2 e +25 °C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del bottiglia. Dopo l'apertura, è stabile per 60 giorni tra +2 e +25 °C.



Soluzione pronta all'uso a base di acqua ultrafiltrata. Aiuta a rimuovere i possibili residui di etanolo.

10.7 ELUTION BUFFER 6

Componente	Quantità	Durata di conservazione e stoccaggio
Elution Buffer 6	1 bottiglia (volume vedere etichetta)	Tra +2 e +25 °C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del bottiglia. Dopo l'apertura, è stabile per 60 giorni tra +2 e +25 °C.

Soluzione tamponata 10 mM, pronta all'uso, a base di Tris-HCl (pH 7.8-8.4).

10.8 PROTEINASE K

Componente	Quantità	Durata di conservazione e stoccaggio
Proteinase K   PERICOLO	1 bottiglia (liofilizzato)	Tra +2 e +25 °C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del bottiglia. Dopo la ricostituzione, stabile per 28 giorni tra +2 e +8 °C.

La Proteinase K deve essere ricostituita con 11 mL di acqua purificata. La Proteinase K viene aggiunta per migliorare l'efficienza della lisi.

PRUDENZA! La Proteinase K contiene Proteinasi, serina di Tritirachium album e calcio acetato idrato.

Frasi di pericolo, precauzione e EUH


H315	Provoca irritazione cutanea.
H319	Provoca grave irritazione oculare.
H334	Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato.
H335	Può irritare le vie respiratorie.
P261	Evitare di respirare la polvere/ i fumi/i gas/ la nebbia/ i vapori/ gli aerosol.
P280	Indossare guanti/ proteggere gli occhi/ proteggere il viso.
P284	[Quando la ventilazione del locale è insufficiente] indossare un apparecchio di protezione respiratoria.
P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P405	Conservare sotto chiave.
P501	Smaltire il prodotto/ recipiente in conformità alla regolamentazione locale/ regionale/ nazionale/ internazionale.

10.9 POLY(A) RNA

Componente	Quantità	Durata di conservazione e stoccaggio
Poly(A) RNA	10 tubi (liofilizzato)	Tra +2 e +25 °C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta dei tubi. Dopo la ricostituzione, stabile per 30 giorni tra +2 e +8 °C.

Il Poly(A) RNA deve essere ricostituito con 440 µL di Poly(A) RNA Buffer. Il Poly(A) RNA funziona come un vettore di DNA/ RNA, migliorando l'efficienza del processo di estrazione.

10.10 POLY(A) RNA BUFFER

Componente	Quantità	Durata di conservazione e stoccaggio
 Poly(A) RNA Buffer	1 bottiglia (volume vedere etichetta)	Tra +2 e +25 °C fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta del bottiglia.

ATTENZIONE

Soluzione tampone acquosa, pronta all'uso, contenente tiocianato di guanidinio (20-40 %). Il Poly(A) RNA Buffer viene impiegato nella ricostituzione del Poly(A) RNA.

PRUDENZA! Il Poly(A) RNA Buffer contiene guanidinio tiocianato.

Fraasi di pericolo, precauzione e EUH

H302	Nocivo se ingerito.
P264	Lavare accuratamente dopo l'uso.
P270	Non mangiare, né bere, né fumare durante l'uso di questo prodotto.
P301+P312	IN CASO DI INGESTIONE: In presenza di malessere contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.

Frase di pericolo, precauzione e EUH

P330	Sciacquare la bocca.
P501	Smaltire il prodotto/ recipiente in conformità alla regolamentazione locale/ regionale/ nazionale/ internazionale.
EUH032	A contatto con acidi libera gas molto tossici.

10.11 ULTERIORI COMPONENTI DEL KIT

Il kit chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 contiene il seguente materiale plastico.

Componente	Quantità	Stoccaggio
chemagic Tips 96 Tray	10	Tra +2 e +25 °C
chemagic Deep Well Plate 2 mL	50	Tra +2 e +25 °C
chemagic Low Well Plate	10	Tra +2 e +25 °C

11. FILE DEI PROTOCOLLI RICHIESTI

I seguenti file di protocollo saranno forniti dall'assistenza clienti di Revvity chemagen Technologie GmbH e sono disponibili sulla pagina web.

Protocollo (file.che)	Tipo di protocollo/ scopo
chemagic Viral300 360 H96 prefilling VD200617.che	File di estrazione relativo al kit per lo strumento chemagic 360-D (protocollo di 60 minuti)
chemagic Viral300 360 H96 prefilling 31 min VD201008.che	File di estrazione relativo al kit per lo strumento chemagic 360-D (protocollo di 31 minuti)
chemagic Viral300 360 H96 prefilling 18 min VD210204.che	File di estrazione relativo al kit per lo strumento chemagic 360-D (protocollo di 18 minuti)
prime manifolds H96 all 360 V150116.che	Riempimento e adescamento del tubo dello strumento chemagic 360-D con i reagenti
check manifolds H96 all 360 V150116.che	Verifica della funzionalità delle pompe
regular cleaning procedure 96 dispenser 360 V150116.che	Pulizia regolare dello strumento chemagic 360-D (una volta alla settimana)
intensive cleaning procedure H96 dispenser 360 V150116.che	Pulizia intensiva dello strumento chemagic 360-D (una volta al mese)

12. MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO CON IL KIT

Il kit chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 richiede i seguenti elementi.

12.1 ARTICOLI DA REVVITY CHEMAGEN TECHNOLOGIE GMBH

Articolo	Prodotto n.
chemagic 360-D instrument	2024-0010
chemagic 96 Rod Head Set	CMG-370

12.2 ARTICOLI AGGIUNTIVI RICHIESTI

Articolo	Scopo
Pipette e puntali per pipette con barriere per l'aerosol	Riempimento preliminare delle Magnetic Beads, Elution Buffer 6, Proteinase K e Poly(A) RNA
Acqua per biologia molecolare	Ricostituzione della Proteinase K
70% di etanolo	Pulizia dello strumento chemagic 360-D

12.3 ULTERIORI ARTICOLI OPZIONALI DI REVVITY CHEMAGEN TECHNOLOGIE GMBH

Prodotto	Prodotto n.
chemagic Stand 96 (fornito con il chemagic 96 Rod Head Set)	CMG-301

12.4 ALTRI ARTICOLI OPZIONALI AGGIUNTIVI

Prodotto	Scopo
Soluzione salina isotonica, sterile	Liquefazione del materiale del tampone prima dell'uso
Provetta Sarstedt (n. cat. 72.693 o 72.694)	Provetta di reazione per l'inattivazione del materiale del campione

13. RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

Il chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 può essere usato con plasma umano fresco o congelato, stabilizzato con EDTA o citrato, raccolto con i comuni sistemi per prelievo ematico; con saliva stabilizzata (provette per prelievo Oragene™ e Spectrum™) e con i terreni di trasporto dei tamponi (ad es. eNAT™ Copan Diagnostics Inc.) come aliquote dirette da 300 µL per ogni isolamento.

Dopo il prelievo e la centrifugazione, il plasma può essere conservato a 2-8 °C fino a 6 ore. Per la conservazione a lungo termine, si consiglia il congelamento a -20 °C oppure a -80 °C in aliquote. I campioni di plasma o di siero congelati non devono essere scongelati più di una volta. Il ripetuto congelamento-scongelo porta alla denaturazione e alla precipitazione delle proteine, con conseguente riduzione della resa degli acidi nucleici.

Il materiale del campione proveniente da tamponi essiccati deve essere trasferito in una soluzione salina isotonica. A questo scopo, aggiungere 350 µL di soluzione fisiologica isotonica e incubare per 5 minuti a 15-25 °C prima dell'uso. Per ogni isolamento, è necessario utilizzare 300 µL del campione in soluzione fisiologica isotonica incubato.

NOTA: Non utilizzare tamponi contenenti fosfati per la risospensione.

Non è stata determinata l'efficienza dell'estrazione di materiale campione diverso dai tipi di campioni elencati sopra.

Per una manipolazione sicura, i campioni per i test virali (ad es. estrazione dell'RNA virale della SARS-CoV-2) devono essere inattivati prima dell'uso. A tal fine, pipettare 4 µL di Poly(A) RNA, 10 µL di Proteinase K e 300 µL di Lysis Buffer 1 in una provetta Sarstedt da 2 mL. Quando più di un campione verrà processato per l'inattivazione, è possibile preparare una soluzione madre di questa soluzione. Moltiplicare semplicemente i volumi necessari per un campione per il numero totale di campioni da trattare e includere un volume aggiuntivo per l'equivalente di 3 campioni extra. Capovolgere diverse volte la provetta per miscelare il contenuto e, per ogni campione, trasferire 314 µL in una provetta Sarstedt da 2 mL. Continuare aggiungendo 300 µL di campione in ogni provetta, chiudere il coperchio e agitare in vortex a impulsi per 10 secondi. Incubare la provetta a 68 °C per 15 minuti (± 2 minuti) per l'inattivazione. Trasferire completamente il lisato inattivato nella piastra a pozzetti profondi del campione al passaggio 11 del protocollo di estrazione e proseguire con il passaggio 12.

14. DESCRIZIONE DETTAGLIATA DEL PROTOCOLLO DI 60 MINUTI

14.1 PROCEDURA PROTOCOLLO DI 60 MINUTI (VARIE SPECIE)

La procedura che segue descrive la preparazione e l'esecuzione del protocollo di estrazione utilizzando lo strumento chemagic 360-D.

La durata del protocollo di estrazione automatica è di circa 60 minuti.

Il protocollo è adatto per elaborare fino a 96 campioni in parallelo (vedere "FASI DI LAVORAZIONE"). Per istruzioni dettagliate sull'uso dello strumento chemagic 360-D, consultare il Manuale d'uso chemagic 360-D.

NOTA: I campioni e i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (da +19 a +25 °C) prima dell'uso.

Collegare i flaconi dei reagenti allo strumento chemagic 360-D nel modo seguente:

Pompa	Tampone
Pompa 1	Nessun flacone collegato
Pompa 2	Binding Buffer 2
Pompa 3	Wash Buffer 3
Pompa 4	Wash Buffer 4
Pompa 5	Wash Buffer 5
Pompa 6	Nessun flacone collegato

NOTA: Richiudere bene i flaconi subito dopo l'uso o mantenere i flaconi collegati saldamente allo strumento chemagic 360-D. Il Binding Buffer 2, il Wash Buffer 3 e il Wash Buffer 4 contengono etanolo. Se l'etanolo evapora, non è possibile garantire la resa ottimale o la sensibilità di rilevamento.

14.2 FASI DI LAVORAZIONE

1. Controllare che tutti i componenti del kit siano integri. Nel caso siano danneggiati, contattare il fornitore.
2. Prima di riempire le piastre, contrassegnare ogni piastra con il materiale in posizione (campioni, Magnetic Beads e tamponi).
3. Ricostituire i componenti Proteinase K e del Poly(A) RNA:

Componente	Ricostituzione
Proteinase K	Aggiungere 11 mL di acqua per biologia molecolare nel flacone di Proteinase K, quindi miscelare delicatamente fino a completa dissoluzione.
Poly(A) RNA	Aggiungere 440 µL di Poly(A) RNA Buffer nella provetta Poly(A) RNA, quindi miscelare con cura fino a completa dissoluzione.

4. Se il Lysis Buffer 1 contiene un precipitato (formatosi durante il trasferimento o la conservazione), la soluzione dovrebbe essere riscaldata a 50-60 °C e miscelata con cura finché diventa limpida. La limpidezza del Lysis Buffer 1 dovrebbe essere confermata sempre visivamente prima dell'uso.
5. Riempire e adescare i tubi chemagic 360-D con i reagenti scegliendo il protocollo "**prime manifolds H96 all 360 V150116.che**". Premere [Insert IDs], seguire le istruzioni fornite dal software chemagic QA e avviare il priming premendo [OK]. Se le funzioni che consentono l'inserimento dei dati ID sono disattivate, avviare il priming direttamente premendo [Start].

NOTA: L'adescamento deve essere effettuato quando i flaconi di reagenti vengono collegati allo strumento chemagic 360-D per la prima volta o quando il tubo dello strumento non è già riempito con i reagenti sopra menzionati.

6. Se l'adescamento non è necessario, selezionare il protocollo "**check manifolds H96 all 360 V150116.che**" e premere [Insert IDs] o - se le funzioni avanzate sono disattivate - [Start]. Un piccolo volume di tampone verrà erogato da ciascuna pompa in sequenza, a partire dalla prima pompa utilizzata per questa applicazione. Se una delle pompe non mostra l'erogazione del tampone attraverso tutti gli ugelli, utilizzare il protocollo di adescamento corrispondente per questa pompa. Quando si eseguono più corse al giorno, è necessario controllare le pompe solo una volta all'inizio della giornata.

7. Selezionare il protocollo "**chemagic Viral300 360 H96 prefilling VD200617.che**" e premere [Insert IDs] e seguire le istruzioni fornite nel software chemagic QA.
8. Assicurarsi che il chemagic Tips 96 Tray contenga un numero sufficiente di puntali e sia allineato con le posizioni dei campioni e posizionare il chemagic Tips Tray 96 nella posizione 1 del tracking system.
9. Verificare il volume nei contenitori per il rifornimento dei tamponi e confermare premendo [OK].

NOTA: Assicurarsi che tutti i flaconi di tampone contengano una quantità sufficiente di tampone. Solo se il livello di liquido per tutti i tamponi è superiore a 125 mL 96 isolamenti possono essere eseguiti.

10. Selezionare il numero di campioni da pre-riempire utilizzando il menu a discesa. Lo schema per il posizionamento dei campioni verrà mostrato dopo la selezione. Assicurarsi di utilizzare le posizioni indicate. Confermare premendo [OK].
11. Riempire i pozzetti selezionati della piastra per campioni con 300 µL di campione. Per assicurare l'omogeneità dei campioni, miscelare delicatamente i campioni prima di pipettarli nei pozzetti della piastra per campioni.

NOTA: Il materiale campione ottenuto dai tamponi secchi deve essere liquefatto prima dell'uso.

12. Riempire l'Elution Buffer 6 e le Magnetic Beads accuratamente risospese pipettando manualmente in base a ciascun pozzetto corrispondente in uso.

Componente	Posizione della piastra su strumento chemagic 360-D	Volume/ pozzo
Magnetic Beads	2	150 µL
Elution Buffer 6	7	50-100 µL

NOTA: La sospensione di Magnetic Beads deve essere mescolata vigorosamente prima di essere dispensata; in caso contrario, la sospensione non è omogenea e la resa di DNA/ RNA potrebbe essere bassa.

13. Aggiungere i seguenti reagenti ai pozzetti contenenti il campione:

- 4 µL Poly(A) RNA,
- 10 µL Proteinase K e poi
- 300 µL Lysis Buffer 1.

È possibile pre-miscelare Poly(A) RNA, Proteinase K e Lysis Buffer 1 (scegliere il volume appropriato di Poly(A) RNA/ Proteinase K/ Lysis Buffer 1 per assicurarsi di avere un volume sufficiente per il numero di estrazioni).

NOTA: L'attività della Proteinase K tende a diminuire dopo un'incubazione di più 10 minuti nel Lysis Buffer 1. Assicurarsi che tutti i campioni siano miscelati con Poly(A) RNA/ Proteinase K/ Lysis Buffer 1 entro questo lasso di tempo.

14. Caricare le chemagic Deep Well Plate 2 mL sul tracking system in base alle istruzioni visualizzate dal software chemagic QA.
15. Caricare la piastra campione nella posizione 3 del tracking system.
16. Assicurarsi che tutte le piastre siano inserite e orientate correttamente.
17. Chiudere lo sportello anteriore e avviare il processo premendo [Start].
18. Viene avviato il processo di estrazione automatica del DNA/ RNA.
19. Al termine della procedura di isolamento, utilizzare il pulsante [Turn Table] per scaricare il tracking system. Ogni clic su [Turn Table] sposta il tracking system (tavolo) di una posizione in senso orario.

ATTENZIONE! Non spostare mai manualmente il tracking system (tavola). Questa operazione potrebbe danneggiare lo strumento. Tutti i movimenti devono essere eseguiti tramite la funzione [Turn Table].

NOTA: Aprendo lo sportello dello strumento chemagic 360-D mentre la seduta di estrazione automatizzata è in corso, la seduta verrà interrotta e i campioni in fase di trattamento potrebbero andare perduti.

Per informazioni sulla pulizia dello strumento, vedere la sezione "PULIZIA E MANUTENZIONE".

14.3 BREVE DESCRIZIONE/ GUIDA RAPIDA

Estrazione automatizzata di DNA/ RNA su strumento chemagic 360-D (protocollo di 60 minuti):

- Selezionare il protocollo "**check manifolds H96 all 360 V150116.che**" per lavare i tubi prima di avviare la corsa di estrazione automatica.
- Premere [Insert IDs], seguire le istruzioni fornite dal software chemagic QA e avviare il lavaggio premendo [OK].
- Quando si utilizzano le funzioni che consentono l'inserimento dei dati ID, selezionare il protocollo "**chemagic Viral300 360 H96 prefilling VD200617.che**" e premere [Insert IDs]. Seguire le istruzioni fornite dal software chemagic QA per inserire i dati richiesti.
- Caricare le piastre e il chemagic Tips 96 Tray sulle posizioni 1-7 del tracking system, come segue.

(I numeri sul tracking system si riferiscono al posizionamento della piastra sullo strumento chemagic 360-D.)

Posizione sul tracking system	Materiale in posizione	Passaggio del protocollo in dettaglio
1	chemagic Tips 96 Tray	Utilizzare i puntali monouso in base alla posizione dei campioni e posizionare il chemagic Tips 96 Tray sul tracking system. NOTA: Le punte devono essere presenti nel vassoio a righe intere.
2	Low Well Plate con Magnetic Beads da 150 µL	Pipettare 150 µL di Magnetic Beads accuratamente risospese in ciascun pozzetto in uso secondo la piastra di campionamento e posizionare la piastra sul tracking system.
3	Piastra per campioni (chemagic Deep Well Plate 2 mL)	Posizionare la piastra con i campioni preparati (300 µL di campione, 4 µL di Poly(A) RNA, 10 µL di Proteinase K e 300 µL di Lysis Buffer 1) sul tracking system. Il Binding Buffer 2 viene dispensato automaticamente nella piastra.
4	chemagic Deep Well Plate 2 mL	Posizionare la piastra vuota sul tracking system. Il Wash Buffer 3 viene dispensato automaticamente nella piastra.
5	chemagic Deep Well Plate 2 mL	Posizionare la piastra vuota sul tracking system. Il Wash Buffer 4 viene dispensato automaticamente nella piastra.
6	chemagic Deep Well Plate 2 mL	Posizionare la piastra vuota sul tracking system. Il Wash Buffer 5 viene dispensato automaticamente nella piastra.

Posizione sul tracking system	Materiale in posizione	Passaggio del protocollo in dettaglio
7	chemagic Deep Well Plate 2 mL con 50-100 µL di Elution Buffer 6	Pipettare (50-100 µL) di Elution Buffer 6 in ogni pozzetto in uso secondo le posizioni dei campioni e posizionare la piastra sul tracking system.

- Assicurarsi che tutte le piastre siano inserite e orientate correttamente.
- Una volta posizionate tutte le lastre, premere [OK].
- Chiudere lo sportello anteriore e avviare immediatamente il processo di estrazione del DNA/ RNA premendo [Start]. Successivamente, il lisato del campione verrà miscelato automaticamente.
- Se le funzioni che consentono l'inserimento dei dati ID sono disattivate, caricare le targhette sulle posizioni 1-7 del tracking system.
- Dopo aver posizionato tutte le piastre, selezionare il protocollo "**chemagic Viral300 360 H96 prefilling VD200617.che**", contrassegnare le colonne in uso sulla mappa delle piastre nella finestra di dialogo e avviare direttamente la corsa di estrazione premendo [Start].
- Al termine della procedura di isolamento, utilizzare il pulsante [Turn Table] per scaricare il tracking system. Ogni clic su [Turn Table] sposta il tracking system (tavolo) di una posizione in senso orario.

ATTENZIONE! Non spostare mai manualmente il tracking system (tavola). Questa operazione potrebbe danneggiare lo strumento. Tutti i movimenti devono essere eseguiti tramite la funzione [Turn Table].

NOTA: Aprendo lo sportello dello strumento chemagic 360-D mentre la seduta di estrazione automatizzata è in corso, la seduta verrà interrotta e i campioni in fase di trattamento potrebbero andare perduti.

15. CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Quando questo kit di estrazione è stato utilizzato con il saggio Revvity SARS-CoV-2 Real-time RT-PCR (n. di cat.: COVID-19-PCR-AUS-C), sono stati ottenuti i dati LoD riportati di seguito (dati generati da Suzhou Sym-Bio Lifescience Co., Ltd. No. 115, North Taiping Road, Taicang, provincia di Jiangsu, Cina).

Utilizzando questo kit di estrazione con il saggio EURORealTime SARS-CoV-2 Real-time RT-PCR Assay (REF MP 2606-0110), EUROIMMUN (società Revvity) ha riportato i seguenti dati di LoD (vedi sotto, sezione 15.5).

15.1 VALORE LOD OTTENUTO USANDO LO STRUMENTO CHEMAGIC 360-D PER L'ESTRAZIONE E IL SISTEMA APPLIED BIOSYSTEMS™ 7500 PCR

I campioni sono stati preparati utilizzando una matrice costituita da un pool di campioni clinici, ottenuti da tamponi orofaringei o da tamponi nasofaringei. La matrice in pool è stata analizzata con il saggio Revvity SARS-CoV-2 Real-time RT-PCR, che ne ha confermato la negatività. In totale, 6 diluizioni doppie di concentrazioni note del virus SARS-CoV-2 inattivato (Isolato 2/231/human/2020/CHN) sono state preparate nella matrice clinica negativa e sono state analizzate con il chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 (CMG-1033) sullo strumento chemagic 360-D. Sono state analizzate 6 repliche individuali dell'estrazione per ogni livello di diluizione. I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono.

Tabella 1: Studio preliminare del valore LoD con tamponi orofaringei sullo strumento chemagic 360-D.

Diluizione per	Tamponi orofaringei						
	N		ORF1ab		Ct medio		
	Conc. (copie/mL)	Tasso di rilevazione	Conc. (copie/mL)	Tasso di rilevazione	N	ORF1ab	IC
2.0E+04	137.00	6/6	41.85	6/6	36.48	36.82	32.18
4.0E+04	68.50	6/6	20.93	6/6	37.04	37.98	32.14
8.0E+04	34.25	6/6	10.46	6/6	39.10	38.88	32.21
1.6E+05	17.13	5/6	5.23	4/6	38.89	39.77	32.35
3.2E+05	8.56	3/6	2.62	2/6	39.35	39.85	32.28
6.4E+05	4.28	0/6	1.31	0/6	/	/	32.41
Negativa	0	0/6	0	0/6	/	/	32.23

Tabella 2: Tasso di rilevazione al 95% con metodo Probit, usando tamponi orofaringei arricchiti con SARS- CoV-2 (Isolato 2/231/human/2020/CHN) sullo strumento chemagic 360-D.

Tasso di rilevazione al 95% con metodo Probit (copie/mL)	
N	ORF1ab
19.08 (95% CI: 14.50 – 37.12)	7.14 (95% CI: 5.34 – 24.00)

Tabella 3: Studio preliminare del valore LoD con tamponi nasofaringei sullo strumento chemagic 360-D.

Tampone nasofaringeo							
Diluizione per	N		ORF1ab		Ct medio		
	Conc. (copie/mL)	Tasso di rilevazione	Conc. (copie/mL)	Tasso di rilevazione	N	ORF1ab	IC
2.0E+04	137.00	6/6	41.85	6/6	36.65	36.55	32.32
4.0E+04	68.50	6/6	20.93	6/6	38.17	36.78	32.38
8.0E+04	34.25	6/6	10.46	6/6	38.55	38.24	32.60
1.6E+05	17.13	4/6	5.23	6/6	39.40	40.50	32.59
3.2E+05	8.56	2/6	2.62	1/6	39.59	40.53	32.86
6.4E+05	4.28	2/6	1.31	2/6	39.50	39.70	32.28
Negativo	0	0/6	0	0/6	/	/	32.33

Tabella 4: Tasso di rilevazione al 95% con metodo Probit, usando tamponi nasofaringei arricchiti con SARS- CoV-2 (Isolato 2/231/human/2020/CHN) sullo strumento chemagic 360-D.

Tasso di rilevazione al 95% con metodo Probit (copie/mL)	
N	ORF1ab
26.44 (95% CI: 18.34 – 69.51)	8.32 (95% CI: 5.83 – 20.69)

15.2 VERIFICA DEL VALORE LOD OTTENUTO USADO LO STRUMENTO CEHAMGIC 360-D PER L'ESTRAZIONE E IL SYSTEMA APPLIED BIOSYSTEMS 7500 PCR

Per quanto riguarda lo studio di verifica del limite di rilevazione (LoD), la matrice negativa costituita da un pool di tamponi orofaringei e la matrice negativa costituita da un pool di tamponi nasofaringei sono state arricchite con il virus SARS-CoV-2 inattivato, alla concentrazione del LoD provvisorio per i due bersagli di SARS-CoV-2 per ogni matrice (7.14 copie/mL di ORF1ab per la matrice di tamponi orofaringei e 8.32 copie/mL di ORF1ab per la matrice di tamponi nasofaringei). Per ogni matrice di campioni sono state preparate 20 repliche, che successivamente sono state estratte con il chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 (CMG-1033) sullo strumento chemagic 360-D e analizzate con il saggio Revvity SARS-CoV-2 Real-time RT-PCR. Inoltre sono state analizzate altre 20 repliche preparate a una concentrazione pari a 1.5 volte il LoD provvisorio. I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono.

Tabella 5: Verifica dei risultati LoD ottenuti con lo strumento chemagic 360-D per i campioni orofaringei.

Concentrazione (copie/mL)			Tasso di rilevazione		Ct medio		
LoD	N	ORF1ab	N	ORF1ab	N	ORF1ab	IC
1X	23.38	7.14	95% (19/20)	95% (19/20)	38.44	38.76	33.13
1.5X	35.07	10.71	100% (20/20)	100% (20/20)	38.74	38.11	33.09

Tabella 6: Verifica dei risultati LoD ottenuti con lo strumento chemagic 360-D per i campioni nasofaringei.

Concentrazione (copie/mL)			Tasso di rilevazione		Ct medio		
LoD	N	ORF1ab	N	ORF1ab	N	ORF1ab	IC
1X	27.25	8.32	95% (19/20)	95% (19/20)	38.53	38.44	33.81
1.5X	40.87	12.49	100% (20/20)	100% (20/20)	38.50	37.79	32.72

15.3 VERIFICA DEL VALORE LOD OTTENUTO USANDO LO STRUMENTO CHEMAGIC 360-D E SISTEMI PER PCR ALTERNATIVI (EQUIVALENZA DEI SISTEMI PCR)

Per ampliare l'uso del test Revvity SARS-CoV-2 Real-time RT-PCR da utilizzare sui sistemi Applied Biosystems 7500 Fast / QuantStudio™ 3 / QuantStudio™ 5 Real-Time PCR e Analytik Jena qTOWER3 / qTower3 84 Real-Time PCR, è stato condotto uno studio con campioni artefatti preparati utilizzando tamponi nasofaringei clinici. Il pool negativo costituito da tamponi nasofaringei è stato arricchito con 2 o 3 concentrazioni note del pannello di verifica SeraCare RNA, contenente l'intero genoma virale di SARS-CoV-2 (<https://www.seracare.com/AccuPlex-SARSCoV2-Molecular-Controls-Kit--Full-Genome-0505-0159/>). Gli acidi nucleici sono stati estratti utilizzando il chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 (CMG-1033) sullo strumento chemagic 360-D e sono state analizzate fino a 20 repliche individuali di ogni estrazione su ciascuna piattaforma di strumenti per PCR, nel rispetto delle istruzioni per l'uso. I test eseguiti sul sistema Applied Biosystems 7500 PCR originale sono stati inclusi in questo studio per confrontare l'equivalenza. I risultati sono riassunti nelle tabelle che seguono. È stato confermato un valore LoD di 20 copie/mL per ABI7500, ABI 7500 Fast Dx, QuantStudio 3, QuantStudio 5 e qTower3 84 e di 10 copie/mL per qTower3. La sensibilità della rilevazione è equivalente tra tutti e 6 gli strumenti.

Tabella 7: Verifica del valore LoD con piattaforme per PCR alternative ad Applied Biosystems.

Strumento	Concentrazione (copie/mL)	Gene bersaglio	Ct medio	Tasso di rilevazione per il gene bersaglio	Tasso di rilevazione generale per l'algoritmo
ABI 7500	6.7	N	40.2	80% (16/20)	90% (18/20)
		ORF	39.4	75% (15/20)	
	20	N	37.8	95% (19/20)	100% (20/20)
		ORF	37.5	95% (19/20)	
ABI 7500 Fast Dx	6.7	N	38.1	45% (9/20)	90% (18/20)
		ORF	39.0	85% (17/20)	
	20	N	37.7	75% (15/20)	100% (20/20)
		ORF	37.5	100% (20/20)	
QS3	12	N	ND	0% (0/3)	67% (2/3)
		ORF	34.1	67% (2/3)	
	20	N	35.7	30% (6/20)	100% (20/20)
		ORF	35.3	95% (19/20)	
	60	N	35.8	45% (9/20)	95% (19/20)
		ORF	33.0	95% (19/20)	
QS5	12	N	ND	0% (0/3)	0% (0/3)
		ORF	ND	0% (0/3)	
	20	N	35.8	25% (5/20)	95% (19/20)
		ORF	37.0	95% (19/20)	
	60	N	36.3	55% (11/20)	100% (20/20)
		ORF	35.1	100% (20/20)	
qTower ³	6.7	N	39.3	30% (6/20)	75% (15/20)
		ORF	39.7	65% (13/20)	
	10	N	38.2	65% (13/20)	100% (20/20)
		ORF	37.8	95% (19/20)	
	20	N	38.5	75% (15/20)	100% (20/20)
		ORF	36.9	100% (20/20)	
	40	N	37.9	95% (19/20)	100% (20/20)
		ORF	36.1	100% (20/20)	
qTower ³ 84	10	N	38.5	35% (7/20)	90% (18/20)
		ORF	38.4	80% (16/20)	
	20	N	39.0	55% (11/20)	95% (19/20)
		ORF	37.3	85% (17/20)	
	40	N	38.0	80% (16/20)	100% (20/20)
		ORF	36.7	100% (20/20)	

15.4 VERIFICA DEL LOD SU UN FONDO DI MATRICE SALIVARE

Il LoD (20 copie/mL) determinato in QuantStudio 5 su una matrice costituita da tamponi nasofaringei (vedere la sezione precedente) è stato ulteriormente verificato usando un fondo di matrice salivare sullo stesso strumento. In sintesi, il pannello di verifica per SARS-CoV-2 è stato aggiunto a una matrice salivare negativa con l'obiettivo di preparare campioni positivi con una concentrazione di 20 copie/mL. In totale, 20 repliche dell'estrazione di questo campione positivo sono state estratte sullo strumento chemagic 360-D e amplificate su QuantStudio 5. I risultati sono riassunti nella tabella che segue; il LoD di 20 copie/mL è stato verificato con un tasso di rilevazione pari a 20/20 su un fondo di matrice salivare.

Tabella 8: Verifica dei risultati LoD ottenuti con lo strumento chemagic 360-D per i campioni di saliva.

Concentrazione (copie/mL)	Tasso di rilevazione		Ct medio		
	N	ORF1ab	N	ORF1ab	IC
20	100% (20/20)	100% (20/20)	35.53	35.14	30.70

15.5 LOD - SENSIBILITÀ ANALITICA SU DIVERSI SISTEMI PER PCR

Gli studi relativi al limite di rilevazione (*Limit of Detection*: LoD) determinano la concentrazione minima di SARS-CoV-2 rilevabile, alla quale il 95% circa di tutte le repliche (veri positivi) generano un risultato positivo al test.

È stato innanzitutto determinato un valore LoD provvisorio analizzando 5-7 diluizioni seriali, che erano state preparate aggiungendo un virus ricombinante contenente RNA di SARS-CoV-2 (Seracare, pannello di verifica AccuPlex™ SARS-CoV-2; 5000 copie/mL) nella matrice di tamponi orofaringei negativa per SARS-CoV-2. Ogni diluizione è stata analizzata con 3 repliche individuali dell'estrazione. È stato determinato un LoD provvisorio di 150 copie/mL.

Il LoD provvisorio è stato confermato analizzando 21 repliche della matrice negativa di tamponi orofaringei, arricchite indipendentemente con il pannello di verifica AccuPlex ed estratte con il CMG-1033 chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 sullo strumento chemagic 360-D. Le repliche sono state analizzate sullo strumento Roche LightCycler 480 II. Il LoD finale per tutti i metodi di estrazione è di 150 copie/mL. Il LoD di 150 copie/mL è stato quindi verificato sui termociclatori Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR, Bio-Rad CFX 96 Touch e Analytik Jena qTOWER³, applicando

la stessa procedura fin qui descritta. Il LoD è stato confermato analizzando 21 repliche dell'estrazione.

Tabella 9: Conferma del LoD nei campioni raccolti con tampone orofaringeo.

Strumento	Repliche valide	SARS-CoV-2		IC		Tasso di rilevazione dell'RNA di SARS-CoV-2
		n	Ct medio	n	Ct medio	
CMG-1033 chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96						
Roche LightCycler 480 II	21	20	37,68	21	30,39	95%
Applied Biosystems 7500 Fast	21	21	36,87	21	29,97	100%
Bio-Rad CFX 96 Touch	21	20	36,42	21	30,38	95%
Analytic Jena qTOWER ³	21	20	37,25	21	28,49	95%

16. DESCRIZIONE DETTAGLIATA DEL PROTOCOLLO DI 31 MINUTI

16.1 PROCEDURA PROTOCOLLO DI 31 MINUTI (TESTATO SOLO CON ISOLAMENTO SARS-COV-2)

La procedura che segue descrive la preparazione e l'esecuzione del protocollo di estrazione utilizzando lo strumento chemagic 360-D.

La durata del protocollo di estrazione automatica è di circa 31 minuti.

Il protocollo è adatto per elaborare fino a 96 campioni in parallelo (vedere "FASI DI LAVORAZIONE"). Per istruzioni dettagliate sull'uso dello strumento chemagic 360-D, consultare il Manuale d'uso chemagic 360-D.

NOTA: I campioni e i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (da +19 a +25 °C) prima dell'uso.

Collegare i flaconi dei reagenti allo strumento chemagic 360-D nel modo seguente:

Pompa	Tampone
Pompa 1	Nessun flacone collegato
Pompa 2	Binding Buffer 2
Pompa 3	Nessun flacone collegato
Pompa 4	Wash Buffer 4
Pompa 5	Wash Buffer 5
Pompa 6	Nessun flacone collegato

NOTA: Richiudere bene i flaconi subito dopo l'uso o mantenere i flaconi collegati saldamente allo strumento chemagic 360-D. Il Binding Buffer 2 e il Wash Buffer 4 contengono etanolo. Se l'etanolo evapora, non è possibile garantire la resa ottimale o la sensibilità di rilevamento.

16.2 FASI DI LAVORAZIONE

1. Controllare che tutti i componenti del kit siano integri. Nel caso siano danneggiati, contattare il fornitore.
2. Prima di riempire le piastre, contrassegnare ogni piastra con il materiale in posizione (campioni, Magnetic Beads e tamponi).
3. Ricostituire i componenti della Proteinase K e del Poly(A) RNA:

Componente	Ricostituzione
Proteinase K	Aggiungere 11 mL di acqua per biologia molecolare nel flacone di Proteinase K, quindi miscelare delicatamente fino a completa dissoluzione.
Poly(A) RNA	Aggiungere 440 µL di Poly(A) RNA Buffer nella provetta Poly(A) RNA, quindi miscelare con cura fino a completa dissoluzione.

4. Se il Lysis Buffer 1 contiene un precipitato (formatosi durante il trasferimento o la conservazione), la soluzione dovrebbe essere riscaldata a 50-60 °C e miscelata con cura finché diventa limpida. La limpidezza del Lysis Buffer 1 dovrebbe essere confermata sempre visivamente prima dell'uso.
5. Riempire e adescare i tubi chemagic 360-D con i reagenti scegliendo il protocollo "**prime manifolds H96 all 360 V150116.che**". Premere [Insert IDs], seguire le istruzioni fornite dal software chemagic QA e avviare il priming premendo [OK]. Se le funzioni che consentono l'inserimento dei dati ID sono disattivate, avviare il priming direttamente premendo [Start].

NOTA: L'adescamento deve essere effettuato quando i flaconi di reagenti vengono collegati allo strumento chemagic 360-D per la prima volta o quando il tubo dello strumento non è già riempito con i reagenti sopra menzionati.

6. Se l'adescamento non è necessario, selezionare il protocollo "**check manifolds H96 all 360 V150116.che**" e premere [Insert IDs] o - se le funzioni avanzate sono disattivate - [Start]. Un piccolo volume di tampone verrà erogato da ciascuna pompa in sequenza, a partire dalla prima pompa utilizzata per questa applicazione. Se una delle pompe non mostra l'erogazione del tampone attraverso tutti gli ugelli, utilizzare il protocollo di adescamento corrispondente per questa pompa. Quando si eseguono più corse al giorno, è necessario controllare le pompe solo una volta all'inizio della giornata.

7. Selezionare il protocollo "**chemagic Viral300 360 H96 prefilling 31 min VD201008.che**" e premere [Insert IDs] e seguire le istruzioni fornite nel software chemagic QA.
8. Assicurarsi che il chemagic Tips 96 Tray contenga un numero sufficiente di puntali e sia allineato con le posizioni dei campioni e posizionare il chemagic Tips Tray 96 nella posizione 1 del tracking system.
9. Verificare il volume nei contenitori per il rifornimento dei tamponi e confermare premendo [OK].

NOTA: Assicurarsi che tutti i flaconi di tampone contengano una quantità sufficiente di tampone. Solo se il livello di liquido per tutti i tamponi è superiore a 125 mL 96 isolamenti possono essere eseguiti.

10. Selezionare il numero di campioni da pre-riempire utilizzando il menu a discesa. Lo schema per il posizionamento dei campioni verrà mostrato dopo la selezione. Assicurarsi di utilizzare le posizioni indicate. Confermare premendo [OK].
11. Riempire i pozzetti selezionati della piastra per campioni con 300 µL di campione. Per assicurare l'omogeneità dei campioni, miscelare delicatamente i campioni prima di pipettarli nei pozzetti della piastra per campioni.

NOTA: Il materiale campione ottenuto dai tamponi secchi deve essere liquefatto prima dell'uso.

12. Riempire l'Elution Buffer 6 e le Magnetic Beads accuratamente risospese pipettando manualmente in base a ciascun pozzetto corrispondente in uso.

Componente	Posizione della piastra su strumento chemagic 360-D	Volume/ pozzo
Magnetic Beads	2	150 µL
Elution Buffer 6	7	50-100 µL

NOTA: La sospensione di Magnetic Beads deve essere mescolata vigorosamente prima di essere dispensata; in caso contrario, la sospensione non è omogenea e la resa di DNA/ RNA potrebbe essere bassa.

13. Aggiungere i seguenti reagenti ai pozzetti contenenti il campione.

- 4 µL Poly(A) RNA,
- 10 µL Proteinase K e poi
- 300 µL Lysis Buffer 1.

È possibile pre-miscelare Poly(A) RNA, Proteinase K e Lysis Buffer 1 (scegliere il volume appropriato di Poly(A) RNA/ Proteinase K/ Lysis Buffer 1 per assicurarsi di avere un volume sufficiente per il numero di estrazioni).

NOTA: L'attività della Proteinase K tende a diminuire dopo un'incubazione di più 10 minuti nel Lysis Buffer 1. Assicurarsi che tutti i campioni siano miscelati con Poly(A) RNA/ Proteinase K/ Lysis Buffer 1 entro questo lasso di tempo.

14. Caricare le chemagic Deep Well Plate 2 mL sul tracking system in base alle istruzioni visualizzate dal software chemagic QA.

15. Caricare la piastra campione nella posizione 3 del tracking system.

16. Assicurarsi che tutte le piastre siano inserite e orientate correttamente.

17. Chiudere lo sportello anteriore e avviare il processo premendo [Start].

18. Viene avviato il processo di estrazione automatica del DNA/ RNA.

19. Al termine della procedura di isolamento, utilizzare il pulsante [Turn Table] per scaricare il tracking system. Ogni clic su [Turn Table] sposta il tracking system (tavolo) di una posizione in senso orario.

ATTENZIONE! Non spostare mai manualmente il tracking system (tavola). Questa operazione potrebbe danneggiare lo strumento. Tutti i movimenti devono essere eseguiti tramite la funzione [Turn Table].

NOTA: Aprendo lo sportello dello strumento chemagic 360-D mentre la seduta di estrazione automatizzata è in corso, la seduta verrà interrotta e i campioni in fase di trattamento potrebbero andare perduti.

Per informazioni sulla pulizia dello strumento, vedere la sezione "PULIZIA E MANUTENZIONE".

16.3 BREVE DESCRIZIONE/ GUIDA RAPIDA

Estrazione automatizzata di DNA/ RNA su strumento chemagic 360-D (protocollo di 31 minuti):

- Selezionare il protocollo "**check manifolds H96 all 360 V150116.che**" per lavare i tubi prima di avviare la corsa di estrazione automatica.
- Premere [Insert IDs], seguire le istruzioni fornite dal software chemagic QA e avviare il lavaggio premendo [OK].
- Quando si utilizzano le funzioni che consentono l'inserimento dei dati ID, selezionare il protocollo "**chemagic Viral300 360 H96 prefilling 31 min VD201008.che**" e premere [Insert IDs]. Seguire le istruzioni fornite dal software chemagic QA per inserire i dati richiesti.
- Caricare le piastre e il chemagic Tips 96 Tray sulle posizioni 1-7 del tracking system, come segue.

(I numeri sul tracking system si riferiscono al posizionamento della piastra sullo strumento chemagic 360-D).

Posizione sul tracking system	Materiale in posizione	Passaggio del protocollo in dettaglio
1	chemagic Tips 96 Tray	Utilizzare i puntali monouso in base alla posizione dei campioni e posizionare il chemagic Tips 96 Tray sul tracking system. NOTA: Le punte devono essere presenti nel vassoio a righe intere.
2	Low Well Plate con Magnetic Beads da 150 µL	Pipettare 150 µL di Magnetic Beads accuratamente risospese in ciascun pozzetto in uso secondo la piastra di campionamento e posizionare la piastra sul tracking system.
3	Piastra per campioni (chemagic Deep Well Plate 2 mL)	Posizionare la piastra con i campioni preparati (300 µL di campione, 4 µL di Poly(A) RNA, 10 µL di Proteinase K e 300 µL di Lysis Buffer 1) sul tracking system. Il Binding Buffer 2 viene dispensato automaticamente nella piastra.
4	vuoto	-
5	chemagic Deep Well Plate 2 mL	Posizionare la piastra vuota sul tracking system. Il Wash Buffer 4 viene dispensato automaticamente nella piastra.
6	chemagic Deep Well Plate 2 mL	Posizionare la piastra vuota sul tracking system. Il Wash Buffer 5 viene dispensato automaticamente nella piastra.

Posizione sul tracking system	Materiale in posizione	Passaggio del protocollo in dettaglio
7	chemagic Deep Well Plate 2 mL con 50-100 µL di Elution Buffer 6	Pipettare (50-100 µL) di Elution Buffer 6 in ogni pozzetto in uso secondo le posizioni dei campioni e posizionare la piastra sul tracking system.

- Assicurarsi che tutte le piastre siano inserite e orientate correttamente.
- Una volta posizionate tutte le lastre, premere [OK].
- Chiudere lo sportello anteriore e avviare immediatamente il processo di estrazione del DNA/ RNA premendo [Start]. Successivamente, il lisato del campione verrà miscelato automaticamente.
- Se le funzioni che consentono l'inserimento dei dati ID sono disattivate, caricare le targhette sulle posizioni 1-7 del tracking system.
- Dopo aver posizionato tutte le piastre, selezionare il protocollo "**chemagic Viral300 360 H96 prefilling 31 min VD201008.che**", contrassegnare le colonne in uso sulla mappa delle piastre nella finestra di dialogo e avviare direttamente la corsa di estrazione premendo [Start].
- Al termine della procedura di isolamento, utilizzare il pulsante [Turn Table] per scaricare il tracking system. Ogni clic su [Turn Table] sposta il tracking system (tavolo) di una posizione in senso orario.

ATTENZIONE! Non spostare mai manualmente il tracking system (tavola). Questa operazione potrebbe danneggiare lo strumento. Tutti i movimenti devono essere eseguiti tramite la funzione [Turn Table].

NOTA: Aprendo lo sportello dello strumento chemagic 360-D mentre la seduta di estrazione automatizzata è in corso, la seduta verrà interrotta e i campioni in fase di trattamento potrebbero andare perduti.

16.4 NOTE PROTOCOLLO DI 31 MINUTI (TESTATO SOLO CON ISOLAMENTO SARS-COV-2)

A scopo comparativo, sono state eseguite delle estrazioni con il protocollo di 60 minuti e con il protocollo di 31 minuti utilizzando il pannello di verifica AccuPlex SARS-CoV-2 (<https://www.seracare.com/AccuPlex-SARSCoV2-Reference-Material-Kit-0505-0126/>)

aggiunto al terreno di trasporto dei dispositivi per prelievo eNAT (Copan Italia S.p.A.) in qualità di materiale campione. Le prestazioni della qPCR sono state testate con la qPCR EURORealTime SARS-CoV-2 (EUROIMMUN, società Revvity; il kit è stato utilizzato secondo le istruzioni del produttore) eseguita su un sistema QuantStudio 5 Real-Time PCR (96 pozzetti, 0.2 mL, desktop, Applied Biosystems, A28574). Il protocollo di 31 minuti per il SARS-CoV-2 ("**chemagic Viral300 360 H96 prefilling 31 min VD201008.che**") offre agli utenti la possibilità di raddoppiare la capacità di analisi giornaliera del COVID. Questo protocollo più breve può essere usato senza nessuna modifica o calibrazione sullo strumento chemagic 360-D. Rispetto al protocollo standard di 60 minuti, si verifica solo uno spostamento del valore Ct di 0.5 - 1 Ct. In questo modo, la sensibilità non viene praticamente ridotta, ma i vantaggi in termini di tempo di esecuzione e di produttività sono enormi.

17. DESCRIZIONE DETTAGLIATA DEL PROTOCOLLO DI 18 MINUTI

17.1 PROCEDURA PROTOCOLLO DI 18 MINUTI (TESTATO SOLO CON ISOLAMENTO SARS-COV-2)

La procedura che segue descrive la preparazione e l'esecuzione del protocollo di estrazione utilizzando lo strumento chemagic 360-D.

La durata del protocollo di estrazione automatica è di circa 18 minuti.

Il protocollo è adatto per elaborare fino a 96 campioni in parallelo (vedere "FASI DI LAVORAZIONE"). Per istruzioni dettagliate sull'uso dello strumento chemagic 360-D, consultare il Manuale d'uso chemagic 360-D.

NOTA: I campioni e i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (da +19 a +25 °C) prima dell'uso.

Collegare i flaconi di reagenti allo strumento chemagic 360-D nel modo seguente:

Pompa	Tampone
Pompa 1	Nessun flacone collegato
Pompa 2	Binding Buffer 2
Pompa 3	Nessun flacone collegato
Pompa 4	Wash Buffer 4
Pompa 5	Wash Buffer 5
Pompa 6	Nessun flacone collegato

NOTA: Richiudere bene i flaconi subito dopo l'uso o mantenere i flaconi collegati saldamente allo strumento chemagic 360-D. Il Binding Buffer 2 e il Wash Buffer 4 contengono etanolo. Se l'etanolo evapora, non è possibile garantire la resa ottimale o la sensibilità di rilevamento.

17.2 FASI DI LAVORAZIONE

1. Controllare che tutti i componenti del kit siano integri. Nel caso siano danneggiati, contattare il fornitore.
2. Prima di riempire le piastre, contrassegnare ogni piastra con il materiale in posizione (campioni, Magnetic Beads e tamponi).
3. Ricostituire i componenti Proteinase K e del Poly(A) RNA:

Componente	Ricostituzione
Proteinase K	Aggiungere 11 mL di acqua per biologia molecolare nel flacone di Proteinase K, quindi miscelare delicatamente fino a completa dissoluzione.
Poly(A) RNA	Aggiungere 440 µL di Poly(A) RNA Buffer nella provetta Poly(A) RNA, quindi miscelare con cura fino a completa dissoluzione.

4. Se il Lysis Buffer 1 contiene un precipitato (formatosi durante il trasferimento o la conservazione), la soluzione dovrebbe essere riscaldata a 50-60 °C e miscelata con cura finché diventa limpida. La limpidezza del Lysis Buffer 1 dovrebbe essere confermata sempre visivamente prima dell'uso.
5. Riempire e adescare i tubi chemagic 360-D con i reagenti scegliendo il protocollo "**prime manifolds H96 all 360 V150116.che**". Premere [Insert IDs], seguire le istruzioni fornite dal software chemagic QA e avviare il priming premendo [OK]. Se le funzioni che consentono l'inserimento dei dati ID sono disattivate, avviare il priming direttamente premendo [Start].

NOTA: L'adescamento deve essere effettuato quando i flaconi di reagenti vengono collegati allo strumento chemagic 360-D per la prima volta o quando il tubo dello strumento non è già riempito con i reagenti sopra menzionati.

6. Se l'adescamento non è necessario, selezionare il protocollo "**check manifolds H96 all 360 V150116.che**" e premere [Insert IDs] o - se le funzioni avanzate sono disattivate - [Start]. Un piccolo volume di tampone verrà erogato da ciascuna pompa in sequenza, a partire dalla prima pompa utilizzata per questa applicazione. Se una delle pompe non mostra l'erogazione del tampone attraverso tutti gli ugelli, utilizzare il protocollo di adescamento corrispondente per questa pompa. Quando si eseguono più corse al giorno, è necessario controllare le pompe solo una volta all'inizio della giornata.

7. Selezionare il protocollo "**chemagic Viral300 360 H96 prefilling 18 min VD210204.che**" e premere [Insert IDs] e seguire le istruzioni fornite nel software chemagic QA.
8. Assicurarsi che il chemagic Tips 96 Tray contenga un numero sufficiente di puntali e sia allineato con le posizioni dei campioni e posizionare il chemagic Tips Tray 96 nella posizione 1 del tracking system.
9. Verificare il volume nei contenitori per il rifornimento dei tamponi e confermare premendo [OK].

NOTA: Assicurarsi che tutti i flaconi di tampone contengano una quantità sufficiente di tampone. Solo se il livello di liquido per tutti i tamponi è superiore a 125 mL 96 isolamenti possono essere eseguiti.

10. Selezionare il numero di campioni da pre-riempire utilizzando il menu a discesa. Lo schema per il posizionamento dei campioni verrà mostrato dopo la selezione. Assicurarsi di utilizzare le posizioni indicate. Confermare premendo [OK].
11. Riempire i pozzetti selezionati della piastra per campioni con 300 µL di campione. Per assicurare l'omogeneità dei campioni, miscelare delicatamente i campioni prima di pipettarli nei pozzetti della piastra per campioni.

NOTA: Il materiale campione ottenuto dai tamponi secchi deve essere liquefatto prima dell'uso.

12. Riempire l'Elution Buffer 6 e le Magnetic Beads accuratamente risospese pipettando manualmente in base a ciascun pozzetto corrispondente in uso.

Componente	Posizione della piastra su strumento chemagic 360-D	Volume/ pozzo
Magnetic Beads	2	150 µL
Elution Buffer 6	7	50-100 µL

NOTA: La sospensione di Magnetic Beads deve essere mescolata vigorosamente prima di essere dispensata; in caso contrario, la sospensione non è omogenea e la resa di DNA/ RNA potrebbe essere bassa.

13. Aggiungere i seguenti reagenti ai pozzetti contenenti il campione:

- 4 µL Poly(A) RNA,
- 10 µL Proteinase K e poi
- 300 µL Lysis Buffer 1.

È possibile pre-miscelare Poly(A) RNA, Proteinase K e Lysis Buffer 1 (scegliere il volume appropriato di Poly(A) RNA/ Proteinase K/ Lysis Buffer 1 per assicurarsi di avere un volume sufficiente per il numero di estrazioni).

NOTA: L'attività della Proteinase K tende a diminuire dopo un'incubazione di più 10 minuti nel Lysis Buffer 1. Assicurarsi che tutti i campioni siano miscelati con Poly(A) RNA/ Proteinase K/ Lysis Buffer 1 entro questo lasso di tempo.

14. Caricare le chemagic Deep Well Plate 2 mL sul tracking system in base alle istruzioni visualizzate dal software chemagic QA.

15. Caricare la piastra campione nella posizione 3 del tracking system.

16. Assicurarsi che tutte le piastre siano inserite e orientate correttamente.

17. Chiudere lo sportello anteriore e avviare il processo premendo [Start].

18. Viene avviato il processo di estrazione automatica del DNA/ RNA.

19. Al termine della procedura di isolamento, utilizzare il pulsante [Turn Table] per scaricare il tracking system. Ogni clic su [Turn Table] sposta il tracking system (tavolo) di una posizione in senso orario.

ATTENZIONE! Non spostare mai manualmente il tracking system (tavola). Questa operazione potrebbe danneggiare lo strumento. Tutti i movimenti devono essere eseguiti tramite la funzione [Turn Table].

NOTA: Aprendo lo sportello dello strumento chemagic 360-D mentre la seduta di estrazione automatizzata è in corso, la seduta verrà interrotta e i campioni in fase di trattamento potrebbero andare perduti.

Per informazioni sulla pulizia dello strumento, vedere la sezione "PULIZIA E MANUTENZIONE".

17.3 BREVE DESCRIZIONE/ GUIDA RAPIDA

Estrazione automatizzata di DNA/ RNA su strumento chemagic 360-D (protocollo di 18 minuti):

- Selezionare il protocollo "**check manifolds H96 all 360 V150116.che**" per lavare i tubi prima di avviare la corsa di estrazione automatica.
- Premere [Insert IDs], seguire le istruzioni fornite dal software chemagic QA e avviare il lavaggio premendo [OK].
- Quando si utilizzano le funzioni che consentono l'inserimento dei dati ID, selezionare il protocollo "**chemagic Viral300 360 H96 prefilling 18 min VD210204.che**" e premere [Insert IDs]. Seguire le istruzioni fornite dal software chemagic QA per inserire i dati richiesti.
- Caricare le piastre e il chemagic Tips 96 Tray sulle posizioni 1-7 del tracking system, come segue.

(I numeri sul tracking system si riferiscono al posizionamento della piastra sullo strumento chemagic 360-D).

Posizione sul tracking system	Materiale in posizione	Passaggio del protocollo in dettaglio
1	chemagic Tips 96 Tray	Utilizzare i puntali monouso in base alla posizione dei campioni e posizionare il chemagic Tips 96 Tray sul tracking system. NOTA: Le punte devono essere presenti nel vassoio a righe intere.
2	Low Well Plate con Magnetic Beads da 150 µL	Pipettare 150 µL di Magnetic Beads accuratamente risospese in ciascun pozzetto in uso secondo la piastra di campionamento e posizionare la piastra sul tracking system.
3	Piastra per campioni (chemagic Deep Well Plate 2 mL)	Posizionare la piastra con i campioni preparati (300 µL di campione, 4 µL di Poly(A) RNA, 10 µL di Proteinase K e 300 µL di Lysis Buffer 1) sul tracking system. Il Binding Buffer 2 viene dispensato automaticamente nella piastra.
4	vuoto	-
5	chemagic Deep Well Plate 2 mL	Posizionare la piastra vuota sul tracking system Il Wash Buffer 4 viene dispensato automaticamente nella piastra.
6	chemagic Deep Well Plate 2 mL	Posizionare la piastra vuota sul tracking system. Il Wash Buffer 5 viene dispensato automaticamente nella piastra.

Posizione sul tracking system	Materiale in posizione	Passaggio del protocollo in dettaglio
7	chemagic Deep Well Plate 2 mL con 50-100 µL di Elution Buffer 6	Pipettare (50-100 µL) di Elution Buffer 6 in ogni pozzetto in uso secondo le posizioni dei campioni e posizionare la piastra sul tracking system.

- Assicurarsi che tutte le piastre siano inserite e orientate correttamente
- Una volta posizionate tutte le lastre, premere [OK].
- Chiudere lo sportello anteriore e avviare immediatamente il processo di estrazione del DNA/ RNA premendo [Start]. Successivamente, il lisato del campione verrà miscelato automaticamente.
- Se le funzioni che consentono l'inserimento dei dati ID sono disattivate, caricare le targhette sulle posizioni 1-7 del tracking system.
- Dopo aver posizionato tutte le piastre, selezionare il protocollo "**chemagic Viral300 360 H96 prefilling VD200617.che**", contrassegnare le colonne in uso sulla mappa delle piastre nella finestra di dialogo e avviare direttamente la corsa di estrazione premendo [Start].
- Al termine della procedura di isolamento, utilizzare il pulsante [Turn Table] per scaricare il tracking system. Ogni clic su [Turn Table] sposta il tracking system (tavolo) di una posizione in senso orario.

ATTENZIONE! Non spostare mai manualmente il tracking system (tavola). Questa operazione potrebbe danneggiare lo strumento. Tutti i movimenti devono essere eseguiti tramite la funzione [Turn Table].

NOTA: Aprendo lo sportello dello strumento chemagic 360-D mentre la seduta di estrazione automatizzata è in corso, la seduta verrà interrotta e i campioni in fase di trattamento potrebbero andare perduti.

17.4 NOTE SULLE PRESTAZIONI PROTOCOLLO DI 18 MINUTI (TESTATO SOLO CON ISOLAMENTO SARS-COV-2)

A scopo comparativo, sono state eseguite delle estrazioni con il protocollo di 60 minuti e con il protocollo di 18 minuti utilizzando il pannello di verifica AccuPlex SARS-CoV-2 (<https://www.seracare.com/AccuPlex-SARSCoV2-Reference-Material-Kit-0505-0126/>) aggiunto al terreno di trasporto dei dispositivi per prelievo eNAT (Copan Italia S.p.A.) in qualità di materiale campione. Le prestazioni della qPCR sono state testate con la qPCR EURORealTime SARS-CoV-2 (EUROIMMUN, società Revvity; il kit è stato utilizzato secondo le istruzioni del produttore) eseguita su un sistema QuantStudio 5 Real-Time PCR (96 pozzetti, 0.2 mL, desktop, Applied Biosystems, A28574). Il protocollo di 18 minuti per il SARS-CoV-2 ("**chemagic Viral300 360 H96 prefilling 18 min VD210204.che**") offre agli utenti la possibilità di triplicare le capacità di analisi giornaliere del COVID. Questo protocollo più breve può essere usato senza modifiche o calibrazioni sullo strumento chemagic 360-D, tuttavia è necessario che un tecnico di Revvity intervenga sul software chemagic disabilitando l'opzione "X-offset Bead Collection" in "Parameter Settings". Se la raccolta di X-offset Bead Collection è abilitata, la durata della corsa di estrazione si allunga a 21 minuti. Si verifica solo uno spostamento del valore Ct di 0.5 - 1 Ct rispetto al protocollo standard di 60 minuti. Pertanto, la sensibilità è appena ridotta, sebbene i vantaggi in termini di tempo di esecuzione e di produttività siano enormi.

18. PULIZIA E MANUTENZIONE

La pulizia e la manutenzione principale del sistema sono descritte dettagliatamente nel Manuale d'uso del chemagic 360-D. La pulizia del sistema va eseguita una volta alla settimana. Pulire il dispenser chemagic come segue:

- Selezionare il protocollo "**regular cleaning procedure 96 dispenser 360 V150116.che**" e premere [Insert IDs] o [Start] se le funzioni avanzate sono disattivate. Seguire le istruzioni fornite dal software.
- Prima dell'uso successivo del chemagic Dispenser, eseguire il protocollo di priming appropriato.
- Si consiglia di pulire il chemagic Dispenser con etanolo al 70% una volta al mese. A tale scopo è sufficiente utilizzare la "**intensive cleaning procedure H96 dispenser 360 V150116.che**" al posto di quella normale.
- Se il chemagic Dispenser non viene utilizzato per un periodo di tempo prolungato, è obbligatorio eseguire la "procedura di pulizia regolare" per mantenere le prestazioni dello strumento quando lo si rimette in servizio.

19. APPLICAZIONI A VALLE

19.1 APPLICAZIONI A VALLE TESTATE CON L'ESTRAZIONE DEL SARS-COV-2

Le seguenti applicazioni a valle sono state eseguite correttamente e descritte in letteratura dopo l'isolamento dei campioni di SARS-CoV-2 con il chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 (CMG-1033-S).

Tabella 10: Applicazioni a valle testate con l'estrazione del SARS-CoV-2.

Applicazione a valle	Kit	Riferimento
RT-qPCR	TaqPath COVID-19 Combo Kit (Applied Biosystems™)	Barrett <i>et al.</i> BMC Infectious Diseases (2020) 20:853 https://doi.org/10.1186/s12879-020-05587-2
		Radbel <i>et al.</i> Journal of Molecular Diagnostics (2020) Volume 22, Numero 7, 871-875 https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.04.209
	SuperScript™ III One-Step RT-PCR System con Platinum™ TaqDNA Polymerase (ThermoFisher).	Streeck <i>et al.</i> Nat Commun (2020) 11 , 5829 https://doi.org/10.1038/s41467-020-19509-y
RT-qPCR	virella SARS-CoV-2 seqc rRT-PCR kit (Gerbion)	Wandernoth <i>et al.</i> Virus (2020) 12:849 https://doi:10.3390/v12080849
	2019-nCoV CDC EUA Kit (IDT)	Xie <i>et al.</i> Processes (2020) 8(11), 1425 https://doi.org/10.3390/pr8111425
	SARS-CoV-2 real-time RT-PCR assay CE-IVD (Revvity)	Klussmeier <i>et al.</i> Biospektrum (2020) 26 , 500-503 https://doi.org/10.1007/s12268-020-1431-1
	NeoPlex COVID-19 kit (Gene Matrix)	Senok <i>et al.</i> Infect Drug Resistance (2020) 13 , 3393-3399 https://doi.org/10.2147/IDR.S275152

Applicazione a valle	Kit	Riferimento
RT-qPCR	NxTAG® Respiratory Pathogen Panel (Luminex Corporation), Fast Virus 1-Step Master Mix (ThermoFisher)	Kanji <i>et al.</i> Journal of the Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada (2021) 1 , 10-15 https://doi.org/10.3138/jammi-2020-0035
	1) TRUPCR SARS-CoV-2 (Black Bio Biotech) 2) TaqPath RT-PCR COVID-19 Kit (ThermoFisher) 3) Allplex 2019-nCoV Assay (Seegene) 4) Patho detect COVID-19 qualitative PCR kit (My Lab) 5) LabGun COVID-19 RT-PCR Kit 6) Fosun COVID-19 RT-PCR detection kit (Fosun Ltd) 7) Realtime Fluorescent RT-PCR kit (BGI Genomics)	Garg <i>et al.</i> Journal of Medical Virology (2021) 93 , 2281-2286 https://doi.org/10.1002/jmv.26691
	Ligh™ix® Sarbeco V E-gene plus EAV control (TIB MolBiol) LightCycler® Multiplex RNA Virus Master (Roche)	Kriegshäuser <i>et al.</i> Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM) (2021) 9 , 351-353 https://doi.org/10.1515/cclm-2021-0078
Sequenziamento	ARTIC V3 protocol	Kanji <i>et al.</i> Journal of the Association of Medical Microbiology and Infectious Disease Canada (2021) 1 , 10-15 https://doi.org/10.3138/jammi-2020-0035
		Jonsson <i>et al.</i> Nature Communications (2021) 12 , 3633 https://doi.org/10.1038/s41467-021-23883-6

Applicazione a valle	Kit	Riferimento
Sequenziamento	ARTIC V3 protocol	Tegally <i>et al.</i> Nature Medicine (2021) 27 , 440-446 https://doi.org/10.1038/s41591-021-01255-3
	<p>Sintesi del cDNA: LunaScript RT Super Mix kit (New England Biolabs), SuperScriptIV (ThermoFisher)</p> <p>Preparazione delle librerie: SureSelectXT Low Input kit CoVHuman6X enrichment capture-based method (Agilent Technologies)</p> <p>ARTIC tiled amplicon multiplex PCR protocol (v3) + NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit (New England Biolabs)</p>	Ellingford <i>et al.</i> eLife (2021) 10 , 65453 https://doi.org/10.7554/eLife.65453

19.2 APPLICAZIONE A VALLE TESTATA CON SARS-COV-2, INFLUENZA A E B ED ESTRAZIONE DI RSV

La seguente applicazione a valle è stata eseguita con successo e descritta nelle IFU dopo l'isolamento di campioni di SARS-CoV-2, Influenza A e B e RSV con il kit chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96 (IVD-1033-S).

Tabella 11: Applicazione a valle testata con l'estrazione di SARS-CoV-2, Influenza A e B e RSV.

Applicazione a valle	Kit	Riferimento
RT-qPCR	res4plex RT-PCR <i>direct</i> , FRIZ Biochem	Istruzioni per l'uso, res4plex <i>direct</i> RT-PCR, FRIZ Biochem https://frizbiochem.de/wp-content/uploads/2022/07/FBC107_IFU_EN_V1.0.pdf

20. ALTRE DOMANDE

Per ulteriori applicazioni, domande tecniche o ulteriori informazioni su come sono stati generati i dati, si prega di contattare support.chemagen@revvity.com o +49 (0) 2401805500.

21. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

I seguenti dispositivi di raccolta **non sono consigliati** per l'uso con il kit chemagic Viral DNA/RNA 300 Kit H96; per ulteriori domande, contattare support.chemagen@revvity.com.

Tabella 12: Dispositivi di raccolta il cui uso è sconsigliato.

Descrizione	Marchio	Numero di riferimento
Provetta per il campionamento del virus inattivato (10 mL), contenente 3 mL di terreno di conservazione (inattivato), 1x tampone orofaringeo con materiale di rayon	Biocomma Limited	YMJ-TE
Sistema di raccolta e conservazione dei virus inattivati	Jiangsu Kangjian Medical Apparatus Co., Ltd.	KJ502-19C/D

Le caratteristiche di prestazione di questi prodotti non sono state stabilite.

Il kit IVD-1033-S è stato convalidato per l'estrazione di DNA e RNA da plasma umano, saliva e tamponi nasali o orofaringei. Altri materiali di campionamento possono essere compatibili ma non sono stati convalidati.



22. GARANZIA

Qualsiasi cambiamento o modifica della procedura non raccomandata dal produttore può influire sui risultati, nel qual caso Revvity chemagen Technologie GmbH e le sue affiliate declinano tutte le garanzie espresse, implicite o di legge, compresa la garanzia implicita di commerciabilità e idoneità all'uso.

Revvity chemagen Technologie GmbH, le sue affiliate e i suoi distributori autorizzati, in tal caso, non saranno responsabili per danni indiretti o conseguenti.

Novembre 2023

www.revvity.com

revvity