



GSD NovaPrime[®] TSP SARS-CoV-2

RT-PCR



Only for in-vitro diagnostic use

**Instructions for use / Gebrauchsanweisung / Notice d'utilisation / Istruzioni per l'uso /
Instrucciones de uso / Instruções de utilização**

English	2
Deutsch	9
Français	17
Italiano	25
Español	33
Português	41
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	49
Packaging materials / Verpackungsmaterialien / Matériels d'emballage / Materiali d'imballaggio / Materiales de embalaje / Materiais de embalagem	49
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	50

REF

PCOV6111
PCOV6113

(1 x 96 Determinations)
(3 x 96 Determinations)

ENGLISH

1. INTENDED USE

The GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 RT-PCR is intended for the qualitative determination of SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) genomic RNA extracted from human upper respiratory (nasal wash/swab, nasopharyngeal swab, oropharyngeal swab, saliva, and gargling solution) specimen types collected from individuals suspected of respiratory viral infection.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The qualitative determination of specific RNA is based on Real-Time reverse-transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technology. The kit contains specific primers and probes labelled with fluorescent reporter and quencher dyes for amplification and simultaneous detection of RNA sequences which represent two specific regions of the SARS-CoV-2 N gene. Furthermore, the assay contains a heterologous amplification target (Extraction Control, **EC**) to identify possible RT-PCR inhibition by interfering substances contained in the sample or failure of the preceding RNA extraction. Therefore, the **EC** is added to the specimen during RNA isolation.

The gene of interest specific probes are labelled with the fluorophore FAM™. The **EC** specific probe is labelled with the fluorophore Cy5™ thereby allowing parallel detection of both amplicons in the corresponding detection channels.

The GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 has been validated for following Real-Time PCR platforms:

- AriaDx™ (Agilent Technologies)
- AriaMx™ (Agilent Technologies)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems™) in Standard and Fast Mode
- CFX96 Touch™ (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 II (Roche)
- QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)

3. MATERIALS

3.1. Reagents Provided

Cap	Symbol	Component	Volume per Vial [µL]	Number of Vials PCOV6111 (PCOV6113)
green	POL 2x	Polymerase (hot-start DNA polymerase, nucleotides, magnesium, enhancers and stabilizers)	1060	1 (3)
green/white	RT 20x	reverse transcriptase with RNase inhibitor	106	1 (3)
blue	PP TSP	Primer-Probe-Mix	106	1 (3)
red	PC	Positive Control (plasmid DNA representing the N gene of SARS-CoV-2)	150	1 (3)
yellow	EC	Extraction Control (RNA-based internal lysis, extraction, and amplification control)	500	1 (3)
transparent	NFW	Nuclease Free Water	500	1 (3)

3.2. Materials and Equipment needed, but not provided

- Biological safety cabinet for sample handling
- Biohazard waste container
- Equipment and consumables for isolating virus RNA from respiratory specimens:
Appropriate nucleic acid extraction kits, e.g., Mag-Bind® Viral DNA/RNA Xpress Kit (Omega Bio-tek Inc., Cat. No. M6219-2304CEIVD) validated for Hangzhou Allsheng Instruments Co. Ltd. Auto-Pure96.
Use of other RNA extraction methods must be validated by the user.
- Real-Time PCR instrument (for already validated instruments refer to 2. PRINCIPLE OF THE ASSAY). Alternative Real-Time PCR instruments might also be appropriate. Their suitability for use with the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 has to be validated by the user.
- Appropriate Real-Time PCR consumables (e.g., disposable tubes, reaction plates, corresponding optical closing materials)
- Benchtop microcentrifuge
- Centrifuge with a rotor for microtiter plates
- Vortex mixer
- Adjustable pipettes in relation to reaction setup
- Disposable DNase/RNase free pipette tips with filters
- Disposable powder-free gloves

4. STABILITY AND STORAGE

The GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 kit is shipped on dry ice and all components should arrive frozen.

- All components have to be stored between -30 °C and -15 °C immediately after arrival.
- Repeated freeze thaw cycles (more than seven) of reagents should be avoided since this might affect the performance of the kit. Reagents should be frozen in aliquots if they are used intermittently.
- Keep unfrozen storage (e.g., storage on ice) as short as possible.
- [POL 2x], [RT 20x] and [PP TSP] should be stored frozen and protected from light until use.

5. SAMPLE PREPARATION

- Extracted RNA or total nucleic acid extracted from human upper respiratory (nasal wash/swab nasopharyngeal swab, oropharyngeal swab, saliva, and gargling solution) specimen types is the starting material for the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.
- The quality and the quantity of the extracted RNA has a crucial effect on the performance of the entire RT-PCR test system. Make sure that the nucleic acid extraction method is compatible with Real-Time PCR technology.
- Make sure that sampling conditions (time, method, sample storage and transport) are suitable, to avoid negative impact on the extraction and RT-PCR.
- For nucleic acid extraction a method suitable for extracting virus RNA from human respiratory specimen should be used.
- The [EC] can be used for monitoring both the RNA extraction procedure and any potential PCR inhibition. Therefore, the [EC] has to be added prior to the nucleic acid extraction procedure into the lysis buffer. Independent of the method / system used for nucleic acid extraction, the [EC] can be directly added to the specimen.
- About 5 µL [EC] may be suitable but should be carefully evaluated. Excess amounts of [EC] may lead to a reduced amplification of the SARS-CoV-2 specific sequences and might therefore result in increased FAM™ Ct values. Underestimation of the SARS-CoV-2 specific signal may occur.
- Since ethanol is a strong Real-Time PCR inhibitor, it is necessary to completely eliminate it prior to the elution of the nucleic acid during extraction. If using spin columns with washing buffers containing ethanol, it is highly recommended to perform an additional centrifugation step of 10 min at approximately 17000 x g (~ 13000 rpm) before eluting the RNA. For this additional centrifugation step, use a new collection tube.
Concentrations > 4 % ethanol (v/v) resulted in inhibition of the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 assay.

6. ASSAY PROCEDURE

6.1. Reaction Setup

- Please read the instructions for use carefully before performing the assay. Reliability of results depends on following strictly the instructions for use.
- Before use make sure that all samples and reagents are thawed completely, mixed by up and down pipetting or vortexing and centrifuged briefly.
- **Important:** [RT 20x] and [POL 2x] are viscous. Briefly spin down the tubes to ensure material has not lodged in the cap or side of tube. Be sure to pipette and dispense carefully and use pipette tips suitable for pipetting viscous liquids. Keep all components ([POL 2x], [RT 20x] and [PP TSP]) permanently on ice/cooling block during PCR setup. Prepare final reaction mix fresh each time and immediately before starting the Real-Time RT-PCR run.
- The use of [NFW] as no template control (NTC) is highly recommended.
- Define the positions (wells) for samples and controls ([PC], NTC) on the plate.

Reaction Setup	
Component	Volume
[POL 2x]	10 µL
[RT 20x]	1 µL
[PP TSP]	1 µL
Sample or [PC] or [NFW]	8 µL
Total volume	20 µL

- Close the optical reaction plate with corresponding optical closing material.
- Centrifuge the optical reaction plate in a centrifuge with a rotor for microtiter plates for 60 seconds at 4 °C at approximately 1000 x g (~ 3000 rpm).

6.2. Programming the Real-Time PCR Instrument

Regarding setup and programming of the Real-Time PCR instrument, please use the manual of the respective instrument.

For detailed programming instructions regarding the use of the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 on specific Real-Time PCR instruments please contact the manufacturer.

RT-PCR Run Settings	
Reaction Volume	20 µL
Passive Reference	ROX™

Detection Channels

Detection of the amplified viral nucleic acid fragments is performed in the following detection channels:

Target	Fluorophore (Quencher)	Detection Channel				
		AriaDx™ AriaMx™	CFX96 Touch™	LightCycler® 480 II	ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS	QuantStudio™ 5
SARS-CoV-2	FAM™ (BHQ1)	FAM	FAM	FAM (465-510)	FAM	x1-m1
EC	Cy5™ (BHQ2)	Cy5	Cy5	Cy5 (618-660)	Cy5	x5-m5

Temperature Profile and Data Collection

No. of Cycles	Temperature	Time (min)	Data Collection
1	45 °C	10:00	-
1	95 °C	02:00	-
40*	95 °C	00:05	-
	60 °C	00:30	Fluorescence measurement at the end of every cycle

* LC480 II: 45 cycles

Before starting the test run, please check the settings for cycles, temperature, and time.

7. RESULTS

Data analysis should be performed with the software of the used real-time PCR device according to the manufacturer's instructions.

Analysis settings

RT-PCR instrument	Analysis	Baseline
AriaDx™, AriaMx™ (Agilent Technologies)	Threshold 0.1	Select start and end cycle values so that possible initial signal noise is not included, and the baseline ends before significant fluorescence is detected.
ABI Prism® 7500 SDS Fast (Applied Biosystems™)		
QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)		
CFX96 Touch™ (Bio-Rad)	Auto Threshold	
LightCycler® 480 II (Roche)	Abs Quant/2 nd Derivative Max	

7.1. Interpretation of Results

The test run is valid only if RT-PCR run is complete.

The GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 test protocol dictates that the controls must be analyzed before patient sample results.

7.1.1. Controls

If kit control(s) fail, the test is invalid and needs to be repeated.

Sample data is analyzed and interpreted only after all the kit controls pass.

- NTC (no template control): must NOT have a detectable Ct for any target. If this control has a detectable Ct, this indicates contamination of the PCR run. It is considered invalid and must be repeated.
- PC**: FAM Ct ≤ 38
- EC**: all human samples should exhibit Cy5 Ct values ≤ 35

Failure to detect **EC** in any specimen may indicate:

- Improper extraction of nucleic acid from clinical materials resulting in loss of RNA and/or RNA degradation.
- (RT-) PCR inhibition.
- Improper assay set up and execution.
- Reagent or equipment malfunction.

If the **EC** assay does not produce a positive result for specimens, interpret as follows:

- If the SARS-CoV-2 target is positive even in the absence of a positive **EC** signal, the result should be considered valid. A negative **EC** signal does not preclude the presence of SARS-CoV-2 RNA in a specimen.
- If the SARS-CoV-2 target AND **EC** are negative for the specimen, the result should be considered invalid for the specimen. If residual specimen is available, repeat the extraction procedure and repeat the test. If all markers remain negative after re-test, report the results as invalid and a new specimen should be collected if possible.

7.1.2. Samples

If test run is valid interpretation of sample results is as follows:

- Positive (POS): Ct ≤ 38
- Negative (neg): Not detected (ND) or Ct > 38

Please refer to the following table for interpretation of signal combinations.

Detection Channel		Interpretation of Results
FAM (SARS-CoV-2 N gene)	Cy5 EC	
POS	POS	The sample contains SARS-CoV-2 specific RNA.
POS	neg	The sample contains SARS-CoV-2 specific RNA.
neg	POS	The sample does not contain detectable amounts of SARS-CoV-2 specific RNA.
neg	neg	PCR inhibition or reagent failure. A diagnostic statement must not be made. The RT-PCR run should be repeated, or a new sample must be analyzed.

8. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

8.1. Clinical Agreement

The determinations were performed on the AriaDx™, AriaMx™ (Agilent Technologies), ABI Prism® 7500 SDS Fast and QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™) Real-Time PCR instruments.

A total of 600 nasopharyngeal swab samples were tested. This comprised:

- 100 samples positive for SARS-CoV-2 RNA (including different variants)
- 500 samples negative for SARS-CoV-2

The results obtained with the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 were compared with the results of a CE marked reference RT-PCR assay.

		Reference (RT-PCR)	
		positive	negative
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positive	100	0
	negative	0	500

Positive Percent Agreement: 100 %

Negative Percent Agreement: 100 %

Overall Percent Agreement: 100 %

8.2. Precision

Repeatability was analyzed with three samples of different target analyte RNA concentrations (high: 10,000 cp/μL, medium: 500 cp/μL, and low: 3x LoD) measured in 5 replicates in two independent runs per day for 20 days. Reproducibility was determined by analyzing the three samples in 5 replicates by three operators at three sites for 5 days and one run per day. The inter-lot reproducibility was analyzed using the three samples with three GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 batches in two runs and nine replicates per lot.

Sample Concentration	SARS-CoV-2 (FAM)								
	Repeatability			Reproducibility			Inter-Lot Reproducibility		
	Mean [Ct]	SD [Ct]	% CV	Mean [Ct]	SD [Ct]	% CV	Mean [Ct]	SD [Ct]	% CV
High	20.97	0.54	2.6	21.12	0.97	4.6	22.09	0.33	1.5
Medium	24.48	0.43	1.8	25.31	1.24	4.9	26.17	0.47	1.8
Low	34.07	0.97	2.8	35.78	4.04	5.7	35.57	1.58	4.4

8.3. Analytical Sensitivity

The Limit of Detection (LoD) is defined as the lowest concentration of target analyte that can be detected with a defined level of confidence. The determinations were performed on the AriaDx™ (Agilent Technologies) Real-Time PCR instrument.

LoD of in-vitro transcribed RNA (IVT-RNA)

Pooled negative nasopharyngeal swab material was extracted and spiked with quantified SARS-CoV-2 N gene at different concentrations. The provisional LoD was established by the lowest concentration that gives 100 % positive results when tested in triplicates. The final LoD was determined using a dilution series around the provisional LoD (Probit Analysis) and was tested in three independent runs with 8 replicates each on 3 lots.

	LoD based on Probit analysis
AriaDx™ (Agilent Technologies)	1.75* copies/reaction

* Based on the Poisson distribution it should be assumed that less than 3 copies of target per PCR reaction cannot be reliably detected. Concentration value refers to the sample after RNA extraction.

LoD of WHO International Standard or inactivated full virus particles

Negative nasopharyngeal matrix was spiked with a dilution series (triplicates) of either First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code: 20/146) or chemically inactivated intact SARS-CoV-2 virus particles (NATtrol™ SARS-CoV-2). Extraction was performed using the GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1 kit. The provisional LoD was established by the lowest concentration that gives 100 % positive results when tested in triplicates. The final LoD was determined using a dilution series around the provisional LoD (Probit Analysis) and was tested in three independent runs with 8 replicates each.

Analyte	LoD based on Probit analysis**
WHO Standard (NIBSC code: 20/146)	52.33 IU/mL
NATtrol™ SARS-CoV-2	37.46 copies/mL

** Concentration values refer to the sample before RNA extraction

LoD on additional RT-PCR instruments

The LoD for additional RT-PCR instruments was performed by preparing three dilutions around the LoD. Therefore, nasopharyngeal swab material was extracted, spiked with quantified SARS-CoV-2 N gene IVT-RNA, and tested on the respective RT-PCR instrument with 24 replicates. LoD was confirmed (within 2-3-fold) on AriaMx™ (Agilent Technologies), ABI Prism® 7500 SDS Fast (Applied Biosystems™) in Standard and Fast Mode, QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™), CFX96 Touch™ (BioRad) and LightCycler® 480 II (Roche).

8.4. Inclusivity

The analytical sensitivity of the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 is first and foremost ensured by the thorough selection of the oligonucleotides. Inclusivity was evaluated by *in-silico* analysis using publicly available complete SARS-CoV-2 virus sequences from the Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) database on October 12th, 2023. Based on the current analysis, all of the analyzed SARS-CoV-2 virus variants are detectable by the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

The occurrence of single isolates that are not detected by the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 cannot be ruled out due to random mutations in the viral genomes. However, only if a mutation is dominant and replaces other virus variants, this is judged as critical for the performance of the assay.

8.5. Cross-Reactivity

Cross-reactivity was evaluated by *in-silico* analysis against normal flora or pathogens that cause similar symptoms or pathogens related to SARS-CoV-2 virus.

Human coronavirus 229E	Influenza A virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Human coronavirus OC43	Influenza B virus	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Human coronavirus HKU1	Enterovirus	<i>Bordetella pertussis</i>
Human coronavirus NL63	Respiratory syncytial virus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
SARS coronavirus	Rhinovirus	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
MERS coronavirus	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
Adenovirus	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Human Metapneumovirus (hMPV)	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>
Parainfluenza virus 1-4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>

From *in-silico* analysis, it was concluded that no cross-reactivity is to be expected for the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 primer and probe sequences.

In addition, wet testing was performed using the following clinical nasopharyngeal swab samples:

- 10 samples positive for RSV A
- 10 samples positive for RSV B
- 10 samples positive for human coronavirus 229E
- 20 samples positive for influenza B virus

No cross-reactivity was observed for the above-mentioned pathogens.

8.6. Matrix Comparison

8.6.1. Gargling Solution

Attention: Possible dilution effects and increased result variability when using gargling solution must be considered when evaluating the results. Likewise, the time of sampling (ideally directly after waking up without prior ingestion of liquids or food) and the duration of gargling with 4 mL of a 0.9 % NaCl solution (at least 30 seconds) are decisive for the result of the examination.

Method Comparison

The results obtained with the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 were compared with the results of a CE marked reference RT-PCR assay.

		Reference (RT-PCR)	
		positive	negative
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positive	75	0
	negative	0	92

100 % agreement was achieved for all 167 samples tested.

LoD of NATtrol

The determinations were performed on the AriaDx™ (Agilent Technologies) Real-Time PCR instrument.

Negative gargling matrix was spiked with a dilution series of chemically inactivated intact SARS-CoV-2 virus particles (NATtrol™ SARS-CoV-2). Each dilution was extracted in triplicates using the GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1 kit. The provisional LoD was established by the lowest concentration that gives 100 % positive results when tested in triplicates. The final LoD was determined using a dilution series around the provisional LoD and was tested in 20 replicates in one run. The LoD is the lowest concentration demonstrating a positive signal in ≥ 95 % of 20 replicates tested.

Analyte	LoD**
NATtrol™ SARS-CoV-2	80 copies/mL

** Concentration values refer to the sample before RNA extraction

8.6.2. Saliva Solution

Attention: Sampling should be done more than 30 minutes after last ingestion of a beverage, food, chewing gum, cigarette/e-cigarette, tooth brushing or mouth rinse. After collection the samples need to be heat inactivated for 30 minutes at 56 °C, and subsequently 1 mL of PBS is added to the sample.

The high viscosity of the saliva matrix and variability in sample collection could result in high variance in viral load.

Method Comparison

59 positive and 59 negative saliva samples, as defined by a CE marked reference RT-PCR assay, were tested with the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2. The results obtained with the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 were compared with the results of the reference RT-PCR assay.

		Reference (RT-PCR)	
		positive	negative
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positive	59	0
	negative	0	59

100 % agreement was achieved for all 118 samples tested.

Diagnostic Agreement

Matched pairs of nasopharyngeal swabs and saliva samples from 72 donors were tested using the GSD NovaPrime® RNA Extraction AE1 kit and the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

		Nasopharyngeal Swabs	
		positive	negative
Saliva	positive	44	4
	negative	5	19

Diagnostic Sensitivity: 89.8 % (95 % confidence interval: 81.6 % - 98.4 %)

Diagnostic Specificity: 82.6 % (95 % confidence interval: 67.7 % - 98.4 %)

LoD of NATtrol

The determinations were performed on the AriaDx™ (Agilent Technologies) Real-Time PCR instrument.

Negative saliva matrix was spiked with a dilution series of chemically inactivated intact SARS-CoV-2 virus particles (NATtrol™ SARS-CoV-2). Each dilution was extracted in triplicates using the GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1 kit. The provisional LoD was established by the lowest concentration that gives 100 % positive results when tested in triplicates. The final LoD was determined using a dilution series around the provisional LoD and was tested in 20 replicates in one run. The LoD is the lowest concentration demonstrating a positive signal in ≥ 95 % of 20 replicates tested.

Analyte	LoD**
NATtrol™ SARS-CoV-2	110 copies/mL

** Concentration values refer to the sample before RNA extraction

9. QUALITY CONTROL

In accordance with the manufacturer's ISO-certified Quality Management System, each lot of the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 has been tested against predetermined specifications to ensure consistent product quality.

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- Positive results indicate the presence of SARS-CoV-2, but do not rule out bacterial infection or co-infection with other pathogens not detected by the test.
- Very low levels of sample material may result in test runs with negative signals.
- Negative results do not exclude infection with SARS-CoV-2 and should not be used as the sole basis for treatment or other patient management decisions.
- Test results must be correlated with clinical observations, medical history, and/or epidemiologic information.

11. TRADEMARKS AND DISCLAIMERS

Registered names, trademarks, etc. used in this document are to be considered protected by law even if not specifically marked as such.

12. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the test kit with other analyzers than the ones mentioned in section 2. PRINCIPLE OF THE ASSAY has to be validated. Any change in design, composition, and test procedure as well as any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons.
- Only for in-vitro diagnostic use.
- All patient samples should be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Wear disposable powder-free gloves, a laboratory coat and eye protection when handling specimens.
- Always use DNase/RNase-free disposable reaction tubes and pipette tips with aerosol barriers.
- Avoid microbial and nuclease (DNase/RNase) contamination of the specimen and the components of the kit.
- In order to avoid contamination of working space with nucleic acids, reaction tubes/plates should not be opened after amplification.
- RT-PCR is highly sensitive to nucleic acid contamination. Therefore, positive / potentially positive material must be stored separately from all other components of the kit.
- Dedicate supplies and equipment to the separate working areas and do not move them from one area to another.
- This assay must not be used on the specimen directly.
- Prior to using this assay the nucleic acid has to be extracted with suitable extraction methods from the original specimen.
- Since ethanol is a strong Real-Time PCR inhibitor, it is necessary to completely eliminate it prior to the elution of the nucleic acid during extraction. If using spin columns with washing buffers containing ethanol, it is highly recommended to perform an additional centrifugation step of 10 min at approximately 17000 x g (~ 13000 rpm) before eluting the RNA. For this additional centrifugation step, use a new collection tube.
- Concentrations of > 4 % (v/v) ethanol resulted in inhibition of the GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 assay.
- The result of this RT-PCR kit may be influenced by potential mutations in the genome of the pathogen if they are located in the primer / probe binding region. Underestimation and/or failure to detect the pathogen may occur.
- RT-PCR inhibitors may also elicit underestimation, false negative results, or invalid runs. Therefore, only use nucleic acids extraction kits, which remove RT-PCR inhibitors, and which are dedicated for downstream RT-PCR processes.
- The Real-Time PCR is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice and trained in RT-PCR.
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

12.1. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

13. ORDERING INFORMATION

REF	PCOV6111	GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	(1 x 96 Determinations)
	PCOV6113	GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	(3 x 96 Determinations)

DEUTSCH

1. VERWENDUNGSZWECK

Die GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 RT-PCR ist für den qualitativen Nachweis von genomischer RNA von SARS-CoV-2 („Schweres Akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2“) bestimmt. Als Probenmaterial sollte extrahierte genomische RNA verwendet werden, die aus humanen Proben der oberen Atemwege (Nasenspülung/-abstrich, Nasopharyngealabstrich, Oropharyngealabstrich, Speichel und Gurgellösung/Rachen-Spülwasser) von Personen mit Verdacht auf eine respiratorische Virusinfektion stammt.

2. TESTPRINZIP

Die qualitative Bestimmung spezifischer RNA basiert auf der Real-Time Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktions-Technologie (RT-PCR). Der Kit enthält spezifische Primer und Sonden, die mit fluoreszierenden Reporterfarbstoffen und Quenchern markiert sind. Sie ermöglichen die Amplifikation und den gleichzeitigen Nachweis von RNA-Sequenzen, die zwei spezifische Regionen des SARS-CoV-2 N Gens repräsentieren. Darüber hinaus enthält der Assay ein heterologes Amplifikationstarget (Extraktionskontrolle, **EC**) zur Identifizierung einer möglichen RT-PCR-Inhibition durch in der Probe enthaltene Störsubstanzen oder ein Versagen der vorhergehenden RNA-Extraktion. Daher wird die **EC** während der RNA-Isolierung der Probe zugesetzt.

Die für das zu detektierende Gen spezifischen Sonden sind mit dem Fluorophor FAM™ markiert. Die für die **EC** spezifische Sonde ist mit dem Fluorophor Cy5™ markiert, wodurch die parallele Detektion beider Amplicons in den entsprechenden Detektionskanälen ermöglicht wird.

Die GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 wurde für folgende Real-Time PCR Plattformen validiert:

- AriaDx™ (Agilent Technologies)
- AriaMx™ (Agilent Technologies)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems™) in Standard und Fast Mode
- CFX96 Touch™ (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 II (Roche)
- QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)

3. MATERIALIEN

3.1. Mitgelieferte Reagenzien

Deckel	Symbol	Komponente	Volumen pro Röhrrchen [µL]	Anzahl Röhrrchen PCOV6111 (PCOV6113)
grün	POL 2x	Polymerase (Hot-Start DNA Polymerase, Nukleotide, Magnesium, Enhancern und Stabilisatoren)	1060	1 (3)
grün/weiß	RT 20x	Reverse Transkriptase mit RNase Inhibitor	106	1 (3)
blau	PP TSP	Primer-Probe-Mix (Mix aus Primern und Sonden)	106	1 (3)
rot	PC	Positivkontrolle (Plasmid-DNA, die das SARS-CoV-2 N Gen repräsentiert)	150	1 (3)
gelb	EC	Extraktionskontrolle (RNA-basierte interne Lyse-, Extraktions- und Amplifikationskontrolle)	500	1 (3)
transparent	NFW	Nukleasefreies Wasser	500	1 (3)

3.2. Erforderliche Materialien und Geräte, nicht mitgeliefert

- Biologische Sicherheitswerkbank für den Umgang mit Proben
- Behälter für biologischen Abfall
- Ausstattung und Verbrauchsmaterial für die Isolierung von Virus-RNA aus respiratorischen Proben:
Geeignete Nukleinsäure-Extraktions-Kits, z.B. Mag-Bind® Viral DNA/RNA Xpress Kit (Omega Bio-tek Inc., Cat. No. M6219-2304CEIVD) validiert für Hangzhou Allsheng Instruments Co. Ltd. Auto-Pure96.
Die Verwendung anderer RNA-Extraktionsmethoden muss vom Anwender validiert werden.
- Real-Time PCR-Gerät (für bereits validierte Geräte siehe 2. TESTPRINZIP)
Alternative Real-Time PCR Geräte sind möglicherweise ebenfalls geeignet; ihre Eignung für die Verwendung mit der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 muss vom Anwender validiert werden.
- Geeignete Real-Time PCR-Verbrauchsmaterialien (z.B. Plastikröhrrchen für den einmaligen Gebrauch, Reaktionsplatten, entsprechende optische Verschlussmaterialien)
- Tisch-Mikrozentrifuge
- Zentrifuge mit Rotor für Mikrotiterplatten
- Vortex-Mischer
- Einstellbare Pipetten abhängig vom Reaktions-Setup
- DNase/RNase-freie Einweg-Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einweghandschuhe

4. STABILITÄT UND LAGERUNG

Der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 Kit wird auf Trockeneis versandt und alle Komponenten sollten in gefrorenem Zustand ankommen.

- Alle Komponenten müssen unmittelbar nach Ankunft zwischen -30 °C und -15 °C gelagert werden.
- Wiederholte Einfrier-Auftauzyklen (mehr als sieben) der Reagenzien sollten vermieden werden, da dies die Leistung des Kits beeinträchtigen könnte. Reagenzien sollten aliquotiert eingefroren werden, wenn sie in Abständen verwendet werden.
- Lagerung in aufgetautem Zustand (z.B. Lagerung auf Eis) so kurz wie möglich halten.
- **POL 2x**, **RT 20x** und **PP TSP** bis zur Verwendung tiefgekühlt aufbewahren und vor Licht schützen.

5. VORBEREITUNG DER PROBEN

- Extrahierte RNA oder Gesamtnukleinsäure aus humanen Proben der oberen Atemwege (Nasenspülung/-abstrich, Nasopharyngealabstrich, Oropharyngealabstrich, Speichel und Gurgellösung/Rachen-Spülwasser), ist das Ausgangsmaterial für die GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.
- Die Qualität und Quantität der extrahierten RNA hat einen entscheidenden Einfluss auf die Leistung des gesamten RT-PCR-Testsystems. Stellen Sie sicher, dass die Nukleinsäureextraktionsmethode mit der Real-Time PCR-Technologie kompatibel ist.
- Stellen Sie sicher, dass die Bedingungen der Probenentnahme (Zeitpunkt, Verfahren, Probenaufbewahrung und -Transport) für den jeweiligen Probentypus geeignet sind, um eine negative Beeinflussung der Extraktion und der RT-PCR zu vermeiden.
- Für die Nukleinsäureextraktion sollte eine Methode verwendet werden, die für die Extraktion von Virus-RNA aus humanen respiratorischen Proben geeignet ist.
- Die **EC** kann sowohl zur Überwachung des RNA-Extraktionsverfahrens als auch zur Überwachung einer möglichen PCR-Inhibition verwendet werden. Daher muss die **EC** vor dem Nukleinsäureextraktionsverfahren in den Lysepuffer gegeben werden. Unabhängig von der Methode/dem System, das für die Nukleinsäureextraktion verwendet wird, kann die **EC** direkt der Probe zugesetzt werden.
- Etwa 5 µL **EC** können geeignet sein; dies sollte aber sorgfältig evaluiert werden. Ein Überschuss an **EC** kann zu einer verringerten Amplifikation der SARS-CoV-2-spezifischen Sequenzen und somit zu erhöhten FAM™ Ct-Werten führen. SARS-CoV-2 spezifische Signale könnten unterbewertet werden.
- Da Ethanol ein starker Inhibitor für die Real-Time PCR ist, muss es vor der Elution der Nukleinsäure während der Extraktion vollständig entfernt werden. Bei Verwendung von „Spin Column“ Kits, die Waschpuffer mit Ethanol enthalten, wird dringend empfohlen, vor der Elution der RNA einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt von 10 min bei ca. 17000 x g (~ 13000 U/min) durchzuführen. Für diesen zusätzlichen Zentrifugationsschritt ist ein neues Sammelröhrchen zu verwenden.
Konzentrationen von > 4 % (v/v) Ethanol führten zu einer Hemmung des GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 Assays.

6. TESTDURCHFÜHRUNG

6.1. Reaktions-Setup

- Bitte lesen Sie die Gebrauchsanweisung vor der Durchführung des Assays sorgfältig durch. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse hängt von der strikten Befolgung der Gebrauchsanweisung ab.
- Stellen Sie vor Gebrauch sicher, dass alle Proben und Reagenzien vollständig aufgetaut, durch Auf- und Abpipettieren oder Vortexen gemischt und kurz zentrifugiert worden sind.
- **Wichtig:** **RT 20x** und **POL 2x** sind zähflüssig. Zentrifugieren Sie die Röhrchen kurz ab, um sicherzustellen, dass sich kein Material im Deckel oder an der Seite des Röhrchens abgesetzt hat. Achten Sie darauf, vorsichtig zu pipettieren und zu dispensieren, und verwenden Sie Pipettenspitzen, die für das Pipettieren viskoser Flüssigkeiten geeignet sind. Lagern Sie alle Komponenten (**POL 2x**, **RT 20x** und **PP TSP**) während des Ansetzens des Reaktions-Setup ständig auf Eis/im Kühlblock. Bereiten Sie den fertigen Reaktions-Setup jedes Mal frisch und unmittelbar vor Beginn des Real-Time RT-PCR-Laufs zu.
- Die Verwendung von **NFW** als „No Template Control“ (NTC) wird dringend empfohlen.
- Definieren Sie die Positionen (Vertiefungen) für Proben und Kontrollen (**PC**, NTC) auf der Platte.

Reaktions-Setup	
Komponente	Volumen
POL 2x	10 µL
RT 20x	1 µL
PP TSP	1 µL
Probe oder PC oder NFW	8 µL
Gesamtvolumen	20 µL

- Verschließen Sie die optische Reaktionsplatte mit dem entsprechenden optischen Verschlussmaterial.
- Zentrifugieren Sie die optische Reaktionsplatte in einer Zentrifuge mit einem Rotor für Mikrotiterplatten für 60 Sekunden bei 4 °C und etwa 1000 x g (~ 3000 U/min).

6.2. Programmierung des Real-Time PCR-Geräts

Für die Konfiguration und Programmierung des Real-Time PCR-Geräts nehmen Sie bitte das jeweilige Handbuch zu Hilfe.

Für detaillierte Anweisungen zur Programmierung spezifischer Real-Time PCR-Geräte zur Verwendung der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2, wenden Sie sich bitte an den Hersteller.

Einstellungen RT-PCR Lauf	
Reaktionsvolumen	20 µL
Passive Referenz	ROX™

Detektionskanäle

Der Nachweis der amplifizierten viralen Nukleinsäurefragmente erfolgt in den folgenden Detektionskanälen:

Target	Fluorophore (Quencher)	Detektionskanal				
		AriaDx™ AriaMx™	CFX96 Touch™	LightCycler® 480 II	ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS	QuantStudio™ 5
SARS-CoV-2	FAM™ (BHQ1)	FAM	FAM	FAM (465-510)	FAM	x1-m1
EC	Cy5™ (BHQ2)	Cy5	Cy5	Cy5 (618-660)	Cy5	x5-m5

Temperaturprofil und Datenerfassung

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit (min)	Datenerfassung
1	45 °C	10:00	-
1	95 °C	02:00	-
40*	95 °C	00:05	-
	60 °C	00:30	Fluoreszenzmessung am Ende jedes Zyklus

* LC480 II: 45 Zyklen

Überprüfen Sie bitte die Einstellungen für Zyklen, Temperatur und Zeit bevor Sie den Testlauf starten.

7. ERGEBNISSE

Die Datenanalyse sollte mit der Software des verwendeten Real-Time PCR-Gerätes gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt werden.

Analyse-Einstellungen

RT-PCR-Gerät	Analyse	Basislinie
AriaDx™, AriaMx™ (Agilent Technologies)	Threshold 0,1	Wählen Sie Start- und Endzykluswerte so, dass ein mögliches anfängliches Signalrauschen nicht eingerechnet wird, und die Basislinie endet, bevor eine signifikante Fluoreszenz detektiert wird.
ABI Prism® 7500 SDS Fast (Applied Biosystems™)		
QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)		
CFX96 Touch™ (Bio-Rad)	Auto Threshold	
LightCycler® 480 II (Roche)	Abs Quant/2 nd Derivative Max	

7.1. Interpretation der Ergebnisse

Der Testlauf ist nur gültig, wenn der RT-PCR Testlauf abgeschlossen ist.

Das GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 Testprotokoll schreibt vor, dass die Kontrollen vor den Ergebnissen der Proben analysiert werden müssen.

7.1.1. Kontrollen

Wenn die Kit-Kontrolle(n) versagen, ist der Test ungültig und muss wiederholt werden.

Daten von Proben dürfen erst dann analysiert und interpretiert werden, wenn alle Kit-Kontrollen valide Ergebnisse zeigen.

- NTC (no template control): darf für KEIN Target einen nachweisbaren Ct aufweisen. Wenn diese Kontrolle einen nachweisbaren Ct-Wert aufweist, deutet dies auf eine Kontamination des PCR-Laufs hin. Er gilt als invalide und muss wiederholt werden.
- **PC**: FAM Ct ≤ 38
- **EC**: alle humanen Proben sollten Cy5 Ct Werte ≤ 35 aufweisen

Ein Fehlschlagen des **EC** Nachweises in einer Probe kann ein Hinweis sein auf:

- Unsachgemäße Nukleinsäure-Extraktion, was zu Verlust von RNA und/oder RNA Degradation führt.
- (RT-) PCR-Inhibition.
- Unsachgemäßes Reaktions-Setup und Ausführung.
- Fehlfunktion von Reagenzien oder Geräten.

Wenn die **EC** Reaktion kein positives Ergebnis für die Proben liefert, muss wie folgt interpretiert werden:

- Bei einem positiven SARS-CoV-2 Signal sollte das Ergebnis als valide angesehen werden auch wenn das **EC** Signal negativ ist. Ein negatives **EC** Signal schließt das Vorhandensein von SARS-CoV-2 RNA in einer Probe nicht aus.
- Zeigen SARS-CoV-2 UND **EC** für die Probe ein negatives Signal, sollte das Ergebnis für die Probe als invalide bewertet werden. Wenn eine Restprobe vorhanden ist, sollten das Extraktionsverfahren und der Test wiederholt werden. Wenn alle Marker nach dem erneuten Test negativ bleiben, ist das Ergebnis als invalide zu bewerten und es sollte nach Möglichkeit eine neue Probe entnommen werden.

7.1.2. Proben

Wenn der Testlauf gültig ist, werden die Probenergebnisse wie folgt interpretiert:

- Positiv (POS): Ct ≤ 38
- Negativ (neg): nicht detektiert (ND) oder Ct > 38

Die Interpretation der Signalkombinationen entnehmen Sie bitte der folgenden Tabelle.

Detektionskanal		Interpretation der Ergebnisse
FAM (SARS-CoV-2 N Gen)	Cy5 EC	
POS	POS	Die Probe enthält SARS-CoV-2 spezifische RNA.
POS	neg	Die Probe enthält SARS-CoV-2 spezifische RNA.
neg	POS	Die Probe enthält keine nachweisbaren Mengen an SARS-CoV-2 spezifischer RNA.
neg	neg	PCR-Inhibition oder Versagen der Reagenzien. Eine diagnostische Aussage darf nicht getroffen werden. Der Testlauf sollte wiederholt werden, oder es muss eine neue Probe analysiert werden.

8. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; dies sind keine garantierten Spezifikationen.

8.1. Klinische Übereinstimmung

Die Bestimmungen wurden mit dem AriaDx™, AriaMx™ (Agilent Technologies) ABI Prism® 7500 SDS Fast and QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™) Real-Time PCR Gerät durchgeführt.

Insgesamt wurden 600 Proben von Nasopharyngealabstrichen untersucht. Diese umfassten:

- 100 Proben, positiv für SARS-CoV-2-RNA (einschließlich verschiedener Varianten)
- 500 Proben negativ für SARS-CoV-2

Die mit der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 erzielten Resultate wurden mit den Ergebnissen eines CE-gekennzeichneten Referenz RT-PCR Tests verglichen.

		Referenz (RT-PCR)	
		positiv	negativ
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positiv	100	0
	negativ	0	500

Positive Prozentuale Übereinstimmung: 100 %

Negative Prozentuale Übereinstimmung: 100 %

Prozentuale Gesamtübereinstimmung: 100 %

8.2. Präzision

Die Wiederholbarkeit wurde anhand von drei Proben mit unterschiedlichen RSV RNA-Konzentrationen (10.000 cp/μL, 500 cp/μL und 3x LoD) analysiert, die in zwei unabhängigen Läufen pro Tag über 20 Tage hinweg in 5 Replikaten gemessen wurden. Die Reproduzierbarkeit wurde durch die Analyse der drei Proben in 5 Replikaten durch drei Anwender an drei Standorten über 5 Tage und einen Lauf pro Tag ermittelt. Die Inter-Lot Reproduzierbarkeit wurde anhand der drei Proben mit drei Lots der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 in zwei Läufen und neun Wiederholungen pro Lot analysiert.

Konzentration der Probe	SARS-CoV-2 (FAM)								
	Wiederholbarkeit			Reproduzierbarkeit			Inter-Lot Reproduzierbarkeit		
	Mittelwert [Ct]	SD [Ct]	% CV	Mittelwert [Ct]	SD [Ct]	% CV	Mittelwert [Ct]	SD [Ct]	% CV
hoch	20,97	0,54	2,6	21,12	0,97	4,6	22,09	0,33	1,5
mittel	24,48	0,43	1,8	25,31	1,24	4,9	26,17	0,47	1,8
niedrig	34,07	0,97	2,8	35,78	4,04	5,7	35,57	1,58	4,4

8.3. Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) ist definiert als die niedrigste Konzentration des Zielanalyten, die mit einem bestimmten Vertrauensniveau nachgewiesen werden kann. Die Bestimmungen wurden mit dem AriaDx™ (Agilent Technologies) Real-Time PCR-Gerät durchgeführt.

LoD unter Verwendung von *in vitro* transkribierter RNA (IVT-RNA)

Negative Nasopharyngealabstriche wurden gepoolt, extrahiert und mit quantifiziertem SARS-CoV-2 N Gen in verschiedenen Konzentrationen versetzt. Die vorläufige LoD wurde anhand der niedrigsten Konzentration ermittelt, die in Triplikaten zu 100 % positiven Ergebnissen führt. Die endgültige LoD wurde anhand einer Verdünnungsreihe um die vorläufige LoD (Probit-Analyse) ermittelt und in drei unabhängigen Läufen mit jeweils 8 Wiederholungen und 3 Chargen getestet.

	LoD basierend auf Probit-Analyse
AriaDx™ (Agilent Technologies)	1,75* Kopien/Reaktion

* Auf Basis der Poisson-Verteilung sollte davon ausgegangen werden, dass weniger als 3 Kopien des Targets pro PCR-Reaktion nicht zuverlässig nachgewiesen werden können. Der Konzentrationswert bezieht sich auf die Probe nach Extraktion.

LoD unter Verwendung des WHO International Standard oder inaktiver Viruspartikel

Negative Nasopharyngealmatrix wurde mit einer Verdünnungsreihe (Triplikate) entweder des ersten WHO International Standard für SARS-CoV-2-RNA (NIBSC-Code: 20/146) oder chemisch inaktiver intakter SARS-CoV-2-Viruspartikel (NATtrol™ SARS-CoV-2) versetzt. Die Extraktion wurde mit dem GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1 Kit durchgeführt. Der vorläufige LoD wurde anhand der niedrigsten Konzentration ermittelt, die bei der Prüfung von Triplikaten 100 % positive Ergebnisse liefert. Die endgültige LoD wurde anhand einer Verdünnungsreihe im Bereich der vorläufigen LoD bestimmt (Probit-Analyse) und in drei unabhängigen Läufen mit jeweils 8 Replikaten getestet.

Analyt	LoD basierend auf Probit-Analyse**
WHO Standard (NIBSC code: 20/146)	52,33 IU/mL
NATtrol™ SARS-CoV-2	37,46 copies/mL

** Die Konzentrationswerte beziehen sich auf die Probe vor der RNA-Extraktion.

LoD auf weiteren RT-PCR-Geräten

Die LoD für weitere RT-PCR-Geräte wurde bestimmt indem drei Verdünnungen im Bereich der LoD hergestellt wurden. Dazu wurde Nasopharyngealabstrich-Material extrahiert, mit quantifizierter SARS-CoV-2 N Gen IVT-RNA versetzt und auf dem jeweiligen RT-PCR-Gerät mit 24 Replikaten getestet. Die LoD wurde (innerhalb des 2-3-fachen Wertes) auf dem AriaMx™ (Agilent Technologies), dem ABI Prism® 7500 SDS Fast (Applied Biosystems™) in Standard und Fast Mode, dem QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™), dem CFX96 Touch™ (BioRad) und dem LightCycler® 480 II (Roche) bestätigt.

8.4. Inklusivität

Die analytische Sensitivität der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 wird in erster Linie durch die sorgfältige Auswahl der Oligonukleotide gewährleistet. Die Inklusivität wurde durch eine *in silico*-Analyse unter Verwendung öffentlich verfügbarer SARS-CoV-2-Sequenzen aus der GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data) Datenbank am 12. Oktober 2023 bewertet. Basierend auf der aktuellen Analyse können alle analysierten SARS-CoV-2 Virusvarianten durch die GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 nachgewiesen werden.

Das Auftreten einzelner Isolate, die von der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 nicht erkannt werden, kann aufgrund zufälliger Mutationen im viralen Genom nicht ausgeschlossen werden. Erst wenn eine Mutation dominant wird und andere Virusvarianten verdrängt, wird dies als kritisch für die Leistungsfähigkeit des Assays gewertet.

8.5. Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität wurde durch *in silico*-Analyse gegen normale Flora oder Pathogene, die ähnliche Symptome verursachen, oder Pathogene, die mit SARS-CoV-2 verwandt sind, untersucht.

Humanes Coronavirus 229E	Influenza A-Virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Humanes Coronavirus OC43	Influenza B-Virus	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Humanes Coronavirus HKU1	Enterovirus	<i>Bordetella pertussis</i>
Humanes Coronavirus NL63	Respiratory syncytial virus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
SARS Coronavirus	Rhinovirus	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
MERS Coronavirus	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
Adenovirus	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Human Metapneumovirus (hMPV)	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Parainfluenzavirus 1-4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>

Aus der *in silico*-Analyse wurde abgeleitet, dass für die Primer- und Sondensequenzen der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 keine Kreuzreaktivität zu erwarten ist.

Darüber hinaus wurden die folgenden klinischen Nasopharyngealabstriche getestet:

- 10 Proben positiv für RSV A
- 10 Proben positiv für RSV B
- 10 Proben positiv für humanes Coronavirus 229E
- 20 Proben positiv für Influenza B-Virus

Für die oben genannten Erreger wurde keine Kreuzreaktivität beobachtet.

8.6. Matrix Vergleich

8.6.1. Gurgellösung

Achtung: Mögliche Verdünnungseffekte und eine erhöhte Variabilität der Ergebnisse bei Verwendung von Gurgellösung müssen bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Ebenso sind der Zeitpunkt der Probennahme (idealerweise direkt nach dem Aufwachen ohne vorherige Flüssigkeits- oder Nahrungsaufnahme) und die Dauer des Gurgelns mit 4 mL einer 0,9 %igen NaCl-Lösung (mindestens 30 Sekunden) entscheidend für das Ergebnis der Untersuchung.

Methodenvergleich

Die mit der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 erzielten Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen eines CE-gekennzeichneten Referenz RT-PCR-Tests verglichen.

		Referenz (RT-PCR)	
		positiv	negativ
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positiv	75	0
	negativ	0	92

Für alle 167 getesteten Proben wurde eine Übereinstimmung von 100 % erzielt.

LoD unter Verwendung von NATtrol

Die Bestimmungen wurden mit dem AriaDx™ (Agilent Technologies) Real-Time PCR-Gerät durchgeführt.

Negative Gurgellösung wurde mit einer Verdünnungsreihe chemisch inaktiverter intakter SARS-CoV-2 Viruspartikel (NATtrol™ SARS-CoV-2) versetzt. Jede Verdünnung wurde in Triplikaten mit dem GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1 Kit extrahiert. Die vorläufige LoD wurde anhand der niedrigsten Konzentration ermittelt, die in Triplikaten zu 100 % positiven Ergebnissen führt. Die endgültige LoD wurde anhand einer Verdünnungsreihe um die vorläufige LoD ermittelt und in 20 Replikaten innerhalb eines Laufs getestet. Die LoD ist die niedrigste Konzentration, die in ≥ 95 % von 20 Replikaten ein positives Signal zeigt.

Analyt	LoD**
NATtrol™ SARS-CoV-2	80 Kopien/mL

** Konzentrationenwerte beziehen sich auf die Probe vor der RNA Extraktion

8.6.2. Speichel

Achtung: Die Probenahme sollte mehr als 30 Minuten nach der letzten Einnahme von Getränken, Lebensmitteln, Kaugummi, Zigaretten/E-Zigaretten, Zahnbürsten oder Mundspülungen erfolgen. Nach der Entnahme müssen die Proben 30 Minuten lang bei 56 °C hitzeinaktiviert werden, anschließend wird der Probe 1 mL PBS zugesetzt.

Die hohe Viskosität der Speichelmatrix und die Variabilität bei der Probenentnahme können zu einer hohen Varianz der Viruslast führen.

Methodenvergleich

59 positive und 59 negative Speichelproben, definiert durch einen CE-gekennzeichneten Referenz RT-PCR-Assay, wurden mit der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 getestet. Die mit der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 erzielten Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen des Referenz RT-PCR-Assays verglichen.

		Referenz (RT-PCR)	
		positiv	negativ
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positiv	59	0
	negativ	0	59

Für alle 118 getesteten Proben wurde eine Übereinstimmung von 100 % erzielt.

Diagnostische Übereinstimmung

Paare von Nasopharyngealabstrichen und Speichelproben von 72 Spendern wurden mit dem GSD NovaPrime® RNA Extraction AE1 und der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 getestet.

		Nasopharyngealabstrich	
		positiv	negativ
Speichelprobe	positiv	44	4
	negativ	5	19

Diagnostische Sensitivität: 89,8 % (95 % Konfidenzintervall: 81,6 % - 98,4 %)

Diagnostische Spezifität: 82,6 % (95 % Konfidenzintervall: 67,7 % - 98,4 %)

LoD unter Verwendung von NATtrol

Die Bestimmungen wurden mit dem AriaDx™ (Agilent Technologies) Real-Time PCR-Gerät durchgeführt.

Negative Saliva-Matrix wurde mit einer Verdünnungsreihe chemisch inaktivierter intakter SARS-CoV-2 Viruspartikel (NATtrol™ SARS-CoV-2) versetzt. Jede Verdünnung wurde in Triplikaten mit dem GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1 Kit extrahiert. Die vorläufige LoD wurde anhand der niedrigsten Konzentration ermittelt, die in Triplikaten zu 100 % positiven Ergebnissen führt. Die endgültige LoD wurde anhand einer Verdünnungsreihe um die vorläufige LoD ermittelt und in 20 Replikaten innerhalb eines Laufs getestet. Die LoD ist die niedrigste Konzentration, die in ≥ 95 % von 20 Replikaten ein positives Signal zeigt.

Analyt	LoD**
NATtrol™ SARS-CoV-2	110 Kopien/mL

** Konzentrationenwerte beziehen sich auf die Probe vor der RNA Extraktion

9. QUALITÄTSKONTROLLE

In Übereinstimmung mit dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagementsystem des Herstellers ist jede Charge der GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 gegen vorgegebene Spezifikationen getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten.

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

- Positive Ergebnisse weisen auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2 hin, schließen aber eine bakterielle Infektion oder eine Koinfektion mit anderen Erregern, die mit dem Test nicht nachgewiesen werden, nicht aus.
- Sehr geringe Mengen an Ausgangsmaterial können zu Testläufen mit negativen Signalen führen.
- Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit SARS-CoV-2 nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Behandlungs- oder andere Patientenmanagemententscheidungen verwendet werden.
- Testergebnisse müssen mit klinischen Beobachtungen, der Krankengeschichte und/oder epidemiologischen Informationen korreliert werden.

11. MARKENZEICHEN UND HAFTUNGS AUSSCHLÜSSE

Die in diesem Dokument verwendeten eingetragenen Namen, Markenzeichen usw. sind als gesetzlich geschützt zu betrachten, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind.

12. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Arbeitsanleitung sind strikt zu befolgen. Die Verwendung des Testkits mit anderen als den unter 2. TESTPRINZIP genannten Geräten ist zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Patientenproben sollten als potenziell infektiös betrachtet und behandelt werden.
- Reagenzien verschiedener Produktionschargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Reagenzien nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Beim Umgang mit Proben puderfreie Einweghandschuhe, einen Laborkittel und einen Augenschutz tragen.
- Verwenden Sie immer DNase/RNase-freie Einwegreaktionsgefäße und Pipettenspitzen mit Aerosolbarrieren.
- Vermeiden Sie eine mikrobielle und Nuklease- (DNase/RNase) Kontamination der Probe und der Kit-Komponenten.
- Um eine Kontamination des Arbeitsbereichs mit Nukleinsäuren zu vermeiden, dürfen Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht geöffnet werden.
- Die RT-PCR ist hochempfindlich gegenüber Nukleinsäurekontaminationen. Daher muss positives/potenziell positives Material getrennt von allen anderen Komponenten des Kits gelagert werden.
- Belassen Sie Verbrauchsmaterial und Ausstattung in den eindeutig zugewiesenen, getrennten Arbeitsbereichen.
- Dieser Assay darf nicht direkt mit der respiratorischen Probe verwendet werden.
- Vor der Verwendung dieses Assays muss die Nukleinsäure mit geeigneten Extraktionsmethoden aus der Originalprobe extrahiert werden. Beachten Sie hierzu unbedingt die Angaben in der Gebrauchsanleitung des Extraktionskits v.a. in Bezug auf unterschiedliche Probenmaterialien!
- Da Ethanol ein starker Inhibitor der Real-Time PCR ist, muss es vor der Elution der Nukleinsäure während der Extraktion vollständig eliminiert werden. Bei Verwendung von Spin Columns mit Waschpuffern, die Ethanol enthalten, wird dringend empfohlen, vor der Elution der RNA einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt von 10 min bei ca. 17000 x g (~ 13000 U/min) durchzuführen. Für diesen zusätzlichen Zentrifugationsschritt ist ein neues Sammelröhrchen zu verwenden.
Konzentrationen von > 4 % (v/v) Ethanol führten zu einer Hemmung des GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 Assays.
- Das Ergebnis dieses RT-PCR-Kits kann durch potenzielle Mutationen im Genom des Erregers beeinflusst werden, wenn diese in der Primer-/Sondenbindungsregion liegen. Dies kann zu einer Fehleinschätzung führen und/oder den Erregernachweises erschweren.
- RT-PCR-Inhibitoren können eine zu niedrige Bewertung, falsch negative Ergebnisse oder ungültige Testläufe hervorrufen. Verwenden Sie daher nur Nukleinsäure-Extraktionskits, die RT-PCR-Inhibitoren entfernen und die für nachgeschaltete RT-PCR-Prozesse bestimmt sind.
- Die Real-Time PCR ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das mit der guten Laborpraxis vertraut und in RT-PCR geschult ist.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

12.1. Entsorgungshinweise

Chemikalien und Zubereitungen sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den nationalen abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen. Die zuständige Behörde informiert über die Entsorgung von Sonderabfällen.

Informationen zu den Verpackungsmaterialien finden Sie unter VERPACKUNGSMATERIALIEN.

13. BESTELLINFORMATIONEN

REF	PCOV6111	GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	(1 x 96 Bestimmungen)
	PCOV6113	GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	(3 x 96 Bestimmungen)

FRANÇAIS

1. INDICATION D'UTILISATION

Le GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 RT-PCR 2 est destiné à la détermination qualitative de l'ARN génomique du SARS-CoV-2 (coronavirus 2 du syndrome respiratoire aigu sévère) extrait de types d'échantillons des voies respiratoires supérieures humains (lavage/écouvillon nasal, écouvillon nasopharyngé, écouvillon oropharyngé, salive et solution de gargarisme) prélevés chez des personnes suspectées d'infection virale respiratoire.

2. PRINCIPE DU TEST

La détermination qualitative de l'ARN spécifique est basée sur la technologie de l'amplification en chaîne par polymérase (RT PCR) à transcription inverse en temps réel. Le kit contient des amorces et des sondes marquées avec des corapporteurs et extincteurs fluorescents pour l'amplification et la détection simultanée de séquences d'ARN qui représentent deux régions spécifiques du gène-N du SARS-CoV-2. En outre, le test contient une cible d'amplification hétérologue (Contrôle d'Extraction, **EC**) pour identifier une éventuelle inhibition de la RT-PCR par des substances interférentes contenues dans l'échantillon ou l'échec de l'extraction d'ARN précédente. Par conséquent, le **EC** est ajouté à l'échantillon pendant l'isolement de l'ARN.

Les sondes spécifiques du gène d'intérêt sont marquées avec le fluorophore FAM™. La sonde spécifique **EC** est marquée avec le fluorophore Cy5™, permettant ainsi la détection parallèle des deux amplicons dans les canaux de détection correspondants. La GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 est validée pour les plateformes PCR en temps réel suivantes

- AriaDx™ (Agilent Technologies)
- AriaMx™ (Agilent Technologies)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems™) in Standard and Fast Mode
- CFX96 Touch™ (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 II (Roche)
- QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)

3. MATERIEL

3.1. Réactifs fournis

Bouchon	Symbole	Composante	Volume par Flacon [µL]	Nombre de Flacon PCOV6111 (PCOV6113)
vert	POL 2x	Polymérase (à démarrage à chaud l'ADN polymérase, nucléotides, magnésium, activateurs et stabilisateurs)	1060	1 (3)
vert/blanc	RT 20x	Transcriptase inverse avec inhibiteur de RNase	106	1 (3)
bleu	PP TSP	Primer-Probe-Mix	106	1 (3)
rouge	PC	Contrôle positif (ADN plasmidique représentant le gène N du SARS-CoV-2)	150	1 (3)
jaune	EC	Contrôle d'Extraction (lyse interne basée sur l'ARN, extraction et contrôle de l'amplification)	500	1 (3)
transparent	NFW	Eau sans nucléase	500	1 (3)

3.2. Matériel et équipement nécessaires, mais non fournis

- Armoire de sécurité biologique pour la manipulation des échantillons
- Conteneur pour déchets à risque biologique
- Équipement et consommables pour isoler l'ARN du virus à partir des échantillons respiratoires :
Kits d'extraction d'acide nucléique appropriés, par exemple le kit Mag-Bind® Viral DNA/RNA Xpress (Omega Bio-tek Inc., Cat. No. M6219-2304CEIVD) validé pour Hangzhou Allsheng Instruments Co. Ltd. Auto-Pure96.
L'utilisation d'autres méthodes d'extraction de l'ARN doit être validée par l'utilisateur.
- Instrument PCR en temps réel (pour les instruments déjà validés, se référer à la section 2. PRINCIPE DU TEST. D'autres instruments de PCR en temps réel peuvent également être appropriés. Leur aptitude à être utilisés avec le GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 doit être validée par l'utilisateur.
- Matériel consommable appropriés pour la PCR en temps réel (par exemple, tubes jetables, plaques de réaction, matériaux de fermeture optique correspondants)
- Micro centrifugeuse de table
- Centrifugeuse avec rotor pour plaques de microtitration
- Mélangeur à vortex
- Pipettes réglables en fonction de la configuration de la réaction
- Embouts de pipette jetables sans DNase/RNase avec filtres
- Gants jetables sans poussière

4. STABILITÉ ET CONSERVATION

Le kit GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 est expédié sur glace sèche et tous les composants doivent arriver congelés.

- Tous les composants doivent être conservés entre -30 °C et -15 °C immédiatement après leur arrivée.
- Les cycles répétés de gel-dégel (plus de sept) des réactifs doivent être évités, car cela pourrait affecter les performances du kit. Les réactifs doivent être congelés en aliquotes s'ils sont utilisés de manière intermittente.
- La conservation non congelée (par exemple, le stockage sur glace) doit être aussi courte que possible.
- POL 2x**, **RT 20x** et **PP TSP** doivent être conservés congelés et protégés de la lumière jusqu'à leur utilisation.

5. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

- L'ARN extrait ou acide nucléique total extrait de types d'échantillons humains des voies respiratoires supérieures (lavage/écouvillon nasal, écouvillon nasopharyngé, écouvillon oropharyngé, salive et solution de gargarisme) constitue le matériel initial pour le kit GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.
- La qualité et la quantité de l'ARN extrait ont un effet crucial sur les performances de l'ensemble du système de test RT-PCR. Assurez-vous que la méthode d'extraction de l'acide nucléique est compatible avec la technologie PCR en temps réel.
- Assurez-vous que les conditions d'échantillonnage (temps, méthode, stockage et transport des échantillons) sont appropriées, afin d'éviter tout impact négatif sur l'extraction et la RT-PCR.
- Pour l'extraction des acides nucléiques, il convient d'utiliser une méthode adaptée à l'extraction de l'ARN du virus à partir d'un échantillon respiratoire ou de salive humaine.
- L'**EC** peut être utilisée pour contrôler à la fois la procédure d'extraction de l'ARN et toute inhibition potentielle de la PCR. Par conséquent, l'**EC** doit être ajoutée au tampon de lyse avant la procédure d'extraction de l'acide nucléique. Indépendamment de la méthode/du système utilisé pour l'extraction des acides nucléiques, l'**EC** peut être directement ajoutée à l'échantillon.
- Environ 5 µL d'**EC** peuvent convenir, mais doivent être soigneusement évalués. Des quantités excessives d'**EC** peuvent conduire à une amplification réduite des séquences spécifiques du SARS-CoV-2, et peuvent donc entraîner une augmentation des valeurs Ct de FAM™. Une sous-estimation du signal spécifique du SARS-CoV-2 peut se produire.
- L'éthanol étant un puissant inhibiteur de la PCR en temps réel, il est nécessaire de l'éliminer complètement avant l'élution de l'acide nucléique pendant l'extraction. Si vous utilisez des colonnes de spin avec des tampons de lavage contenant de l'éthanol, il est fortement recommandé d'effectuer une étape de centrifugation supplémentaire de 10 minutes à environ 17000 x g (~ 13000 rpm) avant d'éluer l'ARN. Pour cette étape de centrifugation supplémentaire, utilisez un nouveau tube de collecte.
Des concentrations > 4 % d'éthanol (v/v) ont entraîné une inhibition du test GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

6. PROCÉDE DE TEST

6.1. Préparation de la réaction

- Veillez lire attentivement le mode d'emploi avant de réaliser le test. La fiabilité des résultats dépend du respect strict des instructions d'utilisation.
- Avant l'utilisation, assurez-vous que tous les échantillons et réactifs sont complètement décongelés, mélangés par pipetage de haut en bas ou par vortex et brièvement centrifugés.
- Important :** **RT 20x** et **POL 2x** sont visqueux. Faites tourner brièvement les tubes pour vous assurer que le matériau ne s'est pas logé dans le bouchon ou sur le côté du tube. Veillez à pipeter et à distribuer avec soin, et utilisez des embouts de pipette adaptés au pipetage de liquides visqueux.
Garder tous les composants (**POL 2x**, **RT 20x** and **PP TSP**) en permanence sur la glace/le bloc réfrigérant pendant la préparation de la PCR. Préparer le mélange réactionnel final frais à chaque fois et immédiatement avant de commencer l'exécution de la RT-PCR en temps réel.
- L'utilisation du **NFW** comme contrôle sans gabarit (NTC) est fortement recommandée.
- Définir les positions (puits) pour les échantillons et les contrôles (**PC**, NTC) sur la plaque.

Préparation de la réaction	
Composante	Volume
POL 2x	10 µL
RT 20x	1 µL
PP TSP	1 µL
Échantillon ou PC ou NFW	8 µL
Volume total	20 µL

- Fermer la plaque de réaction optique avec le matériau de fermeture optique correspondant.
- Centrifuger la plaque de réaction optique dans une centrifugeuse avec un rotor pour plaques de microtitration pendant 60 secondes à 4 °C à environ 1000 x g (~ 3000 tr/min).

6.2. Programmation des instruments de PCR en temps réel

En ce qui concerne la configuration et la programmation de l'instrument PCR en temps réel, veuillez utiliser le manuel de l'instrument concerné.

Pour des instructions de programmation détaillées concernant l'utilisation du GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 sur des instruments spécifiques de PCR en temps réel, veuillez contacter le fabricant.

Paramètres d'exécution RT-PCR	
Volume des réactions	20 µL
Référence passive	ROX™

Canal de détection

La détection des fragments d'acide nucléique viral amplifiés est effectuée dans les canaux de détection suivants :

Cible (Target)	Fluorophore (Quencher)	Canal de détection				
		AriaDx™ AriaMx™	CFX96 Touch™	LightCycler® 480 II	ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS	QuantStudio™ 5
SARS-CoV-2	FAM™ (BHQ1)	FAM	FAM	FAM (465-510)	FAM	x1-m1
EC	Cy5™ (BHQ2)	Cy5	Cy5	Cy5 (618-660)	Cy5	x5-m5

Profil de température et collecte de données

No. de Cycles	Température	Durée (min)	Collecte de données
1	45 °C	10:00	-
1	95 °C	02:00	-
40*	95 °C	00:05	-
	60 °C	00:30	Mesure de la fluorescence à la fin de chaque cycle

* LC480 II: 45 cycles

Avant de commencer l'essai, veuillez vérifier les réglages des cycles, de la température et de la durée.

7. RESULTATS

L'analyse des données doit être effectuée avec le logiciel de l'appareil PCR en temps réel utilisé, conformément aux instructions du fabricant.

Instrument PCR-RT	Analyse	Ligne de base
AriaDx™, AriaMx™ (Agilent Technologies)	Threshold 0.1 (seuil 0,1)	Sélectionnez les valeurs de début et de fin de cycle de sorte que le bruit initial éventuel du signal ne soit pas inclus et que la ligne de base se termine avant qu'une fluorescence importante ne soit détectée.
ABI Prism® 7500 SDS Fast (Applied Biosystems™)		
QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)		
CFX96 Touch™ (Bio-Rad)	Auto Threshold (automatique)	
LightCycler® 480 II (Roche)	Abs Quant/2 nd Derivative Max	

7.1. Interprétation des résultats

Le test n'est valide que si le cycle RT-PCR est terminé.

Le protocole de test du GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 prévoit que les contrôles soient analysés avant les résultats des échantillons des patients.

7.1.1. Contrôles

Si le ou les contrôles du kit échouent, le test n'est pas valide et doit être répété.

Les données de l'échantillon ne sont analysées et interprétées que lorsque tous les contrôles du kit ont réussi.

- NTC (en anglais, no template control) : ne doit PAS avoir un Ct détectable pour aucune cible. Si ce contrôle a un Ct détectable, cela indique une contamination de l'exécution de la PCR. Il est considéré comme non valide et doit être répété.
- **PC** : FAM Ct ≤ 38
- **EC** : tous les échantillons humains doivent présenter des valeurs Cy5 Ct ≤ 35

La non-détection de la **EC** dans un échantillon peut indiquer :

- Extraction inadéquate de l'acide nucléique du matériel clinique, entraînant une perte d'ARN et/ou une dégradation de l'ARN.
- Une inhibition de la PCR (-RT).
- Configuration et exécution incorrectes du test.
- Un mauvais fonctionnement du réactif ou de l'équipement.

Si le test **EC** ne produit pas de résultat positif pour les échantillons, il faut l'interpréter comme suit :

- Si la cible du SARS-CoV-2 est positive même en l'absence d'un signal **EC** positif, le résultat doit être considéré comme valide. Un signal **EC** négatif n'exclut pas la présence d'ARN du SARS-CoV-2 dans un échantillon.
- Si la cible SARS-CoV-2 ET le signal **EC** sont négatifs pour l'échantillon, le résultat doit être considéré comme invalide pour cet échantillon. Si un échantillon résiduel est présent, la procédure d'extraction et le test devraient être répétés. Si tous les marqueurs restent négatifs après le nouveau test, le résultat doit être considéré comme invalide et un nouvel échantillon doit être prélevé si possible.

7.1.2. Échantillons

Si le test est valide, l'interprétation des résultats de l'échantillon est la suivante :

- Positif (POS) : Ct ≤ 38
- Négatif (neg) : Non détecté (ND) ou Ct > 38

Reportez-vous au tableau suivant pour l'interprétation des combinaisons de signaux.

Canal de détection		Interprétation des Résultats
FAM (gène-N du SARS-CoV-2)	Cy5 EC	
POS	POS	L'échantillon contient l'ARN spécifique du SARS-CoV-2.
POS	neg	L'échantillon contient l'ARN spécifique du SARS-CoV-2.
neg	POS	L'échantillon ne contient pas la quantité détectable d'ARN spécifique du SARS-CoV-2.
neg	neg	Inhibition de la PCR ou défaillance du réactif. Une déclaration de diagnostic ne doit pas être faite. Le cycle de RT-PCR doit être répété, ou un nouvel échantillon doit être analysé.

8. CARACTERISTIQUES SPÉCIFIQUES DE PERFORMANCE

Les résultats font référence aux groupes d'échantillons étudiés ; il ne s'agit pas de spécifications garanties.

8.1. Conformité clinique

Les déterminations ont été effectuées sur les instruments PCR en temps réel AriaDx™, AriaMx™ (Agilent Technologies), ABI Prism® 7500 SDS Fast and QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™).

Au total, 600 échantillons d'écouillons nasopharyngés ont été testés. Cela comprenait :

- 100 échantillons positifs pour l'ARN du SARS-CoV-2 RNA (y compris les différents variants).
- 500 échantillons négatifs pour le SARS-CoV-2

Les résultats obtenus avec le GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 ont été comparés aux résultats d'un test PCR-RT de référence marqué CE.

		Référence (RT-PCR)	
		positif	négatif
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positif	100	0
	négatif	0	500

Pourcentage de conformité positif : 100 %

Pourcentage de conformité négatif : 100 %

Pourcentage de conformité global : 100 %

8.2. Précision

La répétabilité a été analysée avec trois échantillons de différentes concentrations d'ARN de l'analyte cible (élevée : 10.000 cp/μL, moyenne : 500 cp/μL et faible : 3x LoD) mesurées en 5 répétitions dans deux passages indépendants par jour pendant 20 jours. La reproductibilité a été déterminée en analysant les trois échantillons dans 5 répétitions par trois opérateurs sur trois sites pendant 5 jours et un passage par jour. La reproductibilité inter-lots a été analysée en utilisant les trois échantillons avec trois lots GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 en deux séries et neuf répétitions par lot.

Concentration de l'échantillon	SARS-CoV-2 (FAM)								
	Répétabilité			Reproductibilité			Reproductibilité inter-lots		
	Moyenne [Ct]	SD [Ct]	% CV	Moyenne [Ct]	SD [Ct]	% CV	Moyenne [Ct]	SD [Ct]	% CV
Élevée	20,97	0,54	2,6	21,12	0,97	4,6	22,09	0,33	1,5
Moyenne	24,48	0,43	1,8	25,31	1,24	4,9	26,17	0,47	1,8
Faible	34,07	0,97	2,8	35,78	4,04	5,7	35,57	1,58	4,4

8.3. Sensibilité analytique

La limite de détection (en anglais, Limit of Detection (LoD) est définie comme la concentration la plus faible de l'analyte cible qui peut être détectée avec un niveau de confiance défini. Les déterminations ont été effectuées sur l'instrument AriaDx™ (Agilent Technologies) Real-Time PCR.

LoD de l'ARN transcrit in-vitro (ARN-IVT)

Des échantillons groupés d'écouvillons nasopharyngés négatifs ont été extraits et enrichis avec le gène N quantifié du SARS-CoV-2 à différentes concentrations. La LoD provisoire a été établie par la concentration la plus faible qui donne des résultats positifs à 100 % lorsqu'elle est testée en trois exemplaires. La LoD (limite de détection) finale a été déterminée en utilisant une série de dilutions autour de la LoD (limite de détection) provisoire (analyse Probit) et a été testée dans trois séries indépendantes de 8 répétitions chacune sur 3 lots.

	LoD basé sur l'analyse Probit
AriaDx™ (Agilent Technologies)	1,75* copies/réaction

* Sur la base de la distribution de Poisson, on peut supposer que moins de 3 copies de la cible par réaction PCR ne peuvent être détectées de manière fiable. La valeur de la concentration fait référence à l'échantillon après extraction de l'ARN.

LoD WHO International Standard ou particules virales entières inactivées

La matrice nasopharyngée négative a été multipliée par une série de dilutions (en trois exemplaires) de la First WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code: 20/146) ou de particules intactes du virus du SARS-CoV-2 chimiquement inactivées (NATtrol™ SARS CoV-2). L'extraction a été réalisée à l'aide du kit GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1. La LoD provisoire a été établie par la concentration la plus faible donnant des résultats positifs à 100 % lorsqu'elle a été testée en triplicats. La LoD (limite de détection) finale a été déterminée en utilisant une série de dilution autour de la LoD (limite de détection) provisoire (Analyse Probit) et a été testée dans trois séries indépendantes avec 8 répliques chacune.

Analyte	LoD basé sur l'analyse Probit**
WHO Standard (NIBSC code: 20/146)	52.33 IU/mL
NATtrol™ SARS-CoV-2	37.46 copies/mL

** Les valeurs de concentration se rapportent à l'échantillon avant l'extraction de l'ARN.

LoD sur des instruments PCR-RT supplémentaires

La LoD pour les instruments PCR-RT supplémentaires a été réalisée en préparant trois dilutions autour de la LoD. Par conséquent, le matériel d'écouvillonnage nasopharyngé a été extrait, enrichi avec de l'ARN IVT quantifié du gène N du SARS-CoV-2 et testé sur l'instrument RT-PCR respectif avec 24 répétitions. La LoD (limite de détection) a été confirmée (à 2-3 fois près) sur AriaMx™ (Agilent Technologies), ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems™) en mode standard et rapide, QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™), CFX96 Touch™ (BioRad) et LightCycler® 480 II (Roche).

8.4. Inclusivité

La sensibilité analytique du GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 est avant tout assurée par la sélection rigoureuse des oligonucléotides. L'inclusivité a été évaluée par une analyse *in-silico* en utilisant des séquences complètes du virus SARS-CoV-2 disponibles publiquement dans la base de données Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) le 12 octobre 2023. D'après l'analyse actuelle, tous les variants du virus SARS-CoV-2 publiés analysés sont détectables par le GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

On ne peut pas exclure la présence d'isolats uniques qui ne soient pas détectés par le GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 en raison de mutations aléatoires dans le génome viral. Toutefois, ce n'est que si une mutation est dominante et remplace d'autres variants du virus qu'elle est jugée critique pour la performance du test.

8.5. Réactivité croisée

La réactivité croisée a été évaluée par une analyse *in-silico* contre la flore normale ou des agents pathogènes qui provoquent des symptômes similaires ou les agents pathogènes liés au virus SARS-CoV-2.

Human coronavirus 229E	Influenza virus A	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Human coronavirus OC43	Influenza virus B	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Human coronavirus HKU1	Enterovirus	<i>Bordetella pertussis</i>
Human coronavirus NL63	Respiratory syncytial virus (VRS)	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
SARS coronavirus	Rhinovirus	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
MERS coronavirus	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
Adenovirus	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Human Metapneumovirus (hMPV)	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>
Parainfluenza virus 1-4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>

L'analyse *in-silico* a permis de conclure qu'aucune réactivité croisée n'est à prévoir pour les séquences d'amorce et de sonde GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

En conséquence, des tests par voie humide ont été réalisés à partir des échantillons cliniques suivants prélevés par écouvillonnage :

- 10 échantillons positifs pour le VRS A
- 10 échantillons positifs pour le VRS B
- 10 spécimens positifs pour le coronavirus humain 229E
- 20 échantillons positifs pour le virus de l'influenza B

Aucune réactivité croisée n'a été observée pour les agents pathogènes susmentionnés.

8.6. Comparaison des matrices

8.6.1. Solution de gargarisme

Attention : Les éventuels effets de dilution et la variabilité accrue des résultats lors de l'utilisation d'une solution de gargarisme doivent être pris en compte lors de l'évaluation des résultats. De même, le moment du prélèvement (idéalement directement après le réveil sans ingestion préalable de liquides ou d'aliments) et la durée du gargarisme avec 4 ml d'une solution de NaCl à 0,9 % (au moins 30 secondes) sont déterminants pour le résultat de l'examen.

Comparaison des méthodes

Les résultats obtenus avec le GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 ont été comparés aux résultats de référence d'un test PCR-RT marquage CE.

		Référence (RT-PCR)	
		Positif	Négatif
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	Positif	75	0
	Négatif	0	92

Une concordance de 100 % a été obtenue pour les 167 échantillons testés.

LoD de NATtrol

Les déterminations ont été effectuées sur l'instrument AriaDx™ (Agilent Technologies) PCR en temps réel. La matrice de gargarisme négative a été dopée avec une série de dilutions de particules virales intactes du SARS-CoV-2 inactivées chimiquement (NATtrol™ SARS CoV-2). Chaque dilution a été extraite en trois exemplaires à l'aide du kit GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1 kit. La limite de détection (LoD) provisoire a été établie par la concentration la plus faible qui donne des résultats positifs à 100 % lorsqu'elle est testée en triplicats. La limite de détection finale a été déterminée en utilisant une série de dilutions autour de la limite de détection provisoire et a été testée dans 20 répétitions en une seule fois. La LoD est la concentration la plus faible démontrant un signal positif dans ≥ 95 % des 20 réplicats testés.

Analyte	LoD**
NATtrol™ SARS-CoV-2	80 copies/mL

** Les valeurs de concentration se rapportent à l'échantillon avant extraction de l'ARN.

8.6.2. Solution pour la salive

Attention : Le prélèvement doit être effectué plus de 30 minutes après la dernière ingestion d'une boisson, d'un aliment, d'un chewing-gum, d'une cigarette/e-cigarette, le brossage des dents ou le rinçage de la bouche. Après le prélèvement, les échantillons doivent être inactivés par la chaleur pendant 30 minutes à 56 °C, puis 1 mL de PBS est ajouté à l'échantillon.

La viscosité élevée de la matrice salivaire et la variabilité du prélèvement des échantillons peuvent entraîner une forte variance de la charge virale.

Comparaison des méthodes

59 échantillons de salive positifs et 59 négatifs, tels que définis par un test RT-PCR de référence marqué CE, ont été testés avec le GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2. Les résultats obtenus avec le GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 ont été comparés aux résultats de référence d'un test PCR-RT marquage CE.

		Référence (RT-PCR)	
		positif	négatif
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positif	59	0
	négatif	0	59

Une concordance de 100 % a été obtenue pour les 118 échantillons testés.

Concordance diagnostique

Des paires appariées d'écouvillons nasopharyngés et d'échantillons de salive provenant de 72 donneurs ont été testées à l'aide du kit GSD NovaPrime® RNA Extraction AE1 et du kit GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

		Écouvillons nasopharyngés	
		positif	négatif
Salive	positif	44	4
	négatif	5	19

Sensibilité diagnostique : 89,8 % (95 % intervalle de confiance : 81,6 % - 98,4 %)

Spécificité diagnostique : 82,6 % (95 % intervalle de confiance : 67,7 % - 98,4 %)

LoD de NATtrol

Les déterminations ont été effectuées l'instrument AriaDx™ (Agilent Technologies) PCR en temps réel.

La matrice de salive négative a été dopée avec une série de dilutions de particules virales intactes du SARS-CoV-2 inactivées chimiquement (NATtrol™ SARS CoV-2). Chaque dilution a été extraite en trois exemplaires à l'aide du kit GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1 kit. La limite de détection (LoD) provisoire a été établie par la concentration la plus faible qui donne des résultats positifs à 100 % lorsqu'elle est testée en triplicats. La limite de détection finale a été déterminée en utilisant une série de dilutions autour de la limite de détection provisoire et a été testée dans 20 répétitions en une seule fois. La LoD est la concentration la plus faible démontrant un signal positif dans ≥ 95 % des 20 réplicats testés.

Analyte	LoD**
NATtrol™ SARS-CoV-2	110 copies/mL

** Les valeurs de concentration se rapportent à l'échantillon avant extraction de l'ARN.

9. CONTROLE DE LA QUALITE

Conformément au système de gestion de la qualité certifié du fabricant, chaque lot du GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 a été testé par rapport à des spécifications prédéterminées afin de garantir une qualité constante du produit.

10. LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Des résultats positifs indiquent la présence du SARS-CoV-2, mais n'excluent pas une infection bactérienne ou une co-infection avec d'autres agents pathogènes non détectés par le test.
- Des niveaux très faibles de matériel d'échantillon peuvent entraîner des tests avec des signaux négatifs.
- Des résultats négatifs n'excluent pas une infection par le SARS-CoV-2 et ne doivent pas servir de base unique pour le traitement ou d'autres décisions de prise en charge du patient.
- Les résultats des tests doivent être corrélés avec les observations cliniques, les antécédents médicaux et/ou les informations épidémiologiques.

11. MARQUES DE COMMERCE ET CLAUSES DE NON-RESPONSABILITÉ

Les noms déposés, marques déposées, etc. utilisés dans ce document doivent être considérés comme protégés par la loi, même s'ils ne sont pas spécifiquement marqués comme tels.

12. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de test, les informations, les précautions et les avertissements figurant dans le mode d'emploi doivent être strictement respectés. L'utilisation du kit de test avec d'autres analyseurs que ceux mentionnés dans la section 2. PRINCIPE DU TEST doit être validée. Toute modification de la conception, de la composition et de la procédure de test ainsi que toute utilisation en combinaison avec d'autres produits non approuvés par le fabricant ne sont pas autorisées ; l'utilisateur est lui-même responsable de ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et incidents pour ces raisons.
- Uniquement pour un usage de diagnostic in-vitro.
- Tous les échantillons de patients doivent être considérés et manipulés comme potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs de différents lots de production.
- Aucun réactif d'autres fabricants ne doit être utilisé avec les réactifs de ce kit de test.
- N'utilisez pas de réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Portez des gants jetables non poudrés, une blouse de laboratoire et une protection oculaire lors de la manipulation des échantillons.
- Utilisez toujours des tubes de réaction jetables DNase/RNase free et des embouts de pipette avec des barrières anti-aérosols.
- Évitez toute contamination microbienne et par les nucléases (DNase/RNase) de l'échantillon et des composants du kit.
- Afin d'éviter la contamination de l'espace de travail par des acides nucléiques, les tubes de réaction/ plaques ne doivent pas être ouverts après l'amplification.
- La RT-PCR est très sensible à la contamination par les acides nucléiques. Par conséquent, le matériel positif / potentiellement positif doit être stocké séparément de tous les autres composants du kit.
- Consacrez les fournitures et les équipements aux zones de travail séparées et ne les déplacez pas d'une zone à l'autre.
- Ce test ne doit pas être utilisé directement sur l'échantillon.
- Avant d'utiliser ce test, l'acide nucléique doit être extrait de l'échantillon original par des méthodes d'extraction appropriées. Il est essentiel de suivre les informations contenues dans le mode d'emploi du kit d'extraction, en particulier en ce qui concerne les différents matériaux d'échantillon !
- Comme l'éthanol est un puissant inhibiteur de la PCR en temps réel, il est nécessaire de l'éliminer complètement avant l'élution de l'acide nucléique lors de l'extraction. Si l'on utilise des colonnes d'essorage avec des tampons de lavage contenant de l'éthanol, il est fortement recommandé d'effectuer une étape de centrifugation supplémentaire de 10 min à environ 17000 x g (~ 13000 tr/min) avant d'éluer l'ARN. Pour cette étape de centrifugation supplémentaire, utilisez un nouveau tube de collecte.
- Des concentrations > 4 % d'éthanol (v/v) ont entraîné une inhibition du test GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.
- Le résultat de ce kit RT-PCR peut être influencé par des mutations potentielles du génome de l'agent pathogène si elles sont situées dans la région de liaison amorce/sonde. Il peut y avoir sous-estimation et/ou non-détection de l'agent pathogène.
- Les inhibiteurs de la RT-PCR peuvent également entraîner une sous-estimation, des résultats faussement négatifs ou des passages non valides. C'est pourquoi il convient de n'utiliser que des kits d'extraction d'acides nucléiques, qui éliminent les inhibiteurs de la RT-PCR et qui sont destinés aux processus RT-PCR en aval.

- La PCR en temps réel est uniquement conçue pour le personnel qualifié qui est familier avec les bonnes pratiques de laboratoire et formé à la RT-PCR.
- Pour un contrôle de qualité interne plus poussé, chaque laboratoire doit en outre utiliser des échantillons connus.

12.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contactez les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

Pour plus d'informations sur les matériaux d'emballage, reportez-vous à la section MATÉRIELS D'EMBALLAGE.

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

REF	PCOV6111	GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	(1 x 96 déterminations)
	PCOV6113	GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	(3 x 96 déterminations)

ITALIANO

1. USO PREVISTO

La GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 RT-PCR è destinata alla determinazione qualitativa dell'RNA genomico della SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) estratto da campioni delle vie respiratorie superiori umane (lavaggio/tampone nasale, tampone nasofaringeo, tampone orofaringeo, saliva e soluzione per gargarismi) raccolti da individui sospetti di infezione virale respiratoria.

2. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione qualitativa dell'RNA specifico si basa sulla tecnologia della reazione a catena della polimerasi con trascrizione inversa in tempo reale (RT PCR). Il kit contiene specifici primer e sonde etichettate con coloranti fluorescente reporter e quencher per l'amplificazione e la rilevazione simultanea di sequenze di RNA che rappresentano **due regioni specifiche del gene N della SARS-CoV-2**. Inoltre, il test contiene un target di amplificazione eterologo (Extraction Control, **EC**) per identificare la possibile inibizione della RT-PCR da parte di sostanze interferenti contenute nel campione o il fallimento della precedente estrazione dell'RNA. Pertanto **EC** viene aggiunto al campione durante l'isolamento dell'RNA.

Le sonde specifiche del gene d'interesse sono etichettate con il fluoroforo FAM™. La sonda specifica per l' **EC** è etichettata con il fluoroforo Cy5™, permettendo così la rilevazione parallela di entrambi gli ampliconi nei canali di rilevazione corrispondenti.

La GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 è stata convalidata per le seguenti piattaforme di PCR in tempo reale.

- AriaDx™ (Agilent Technologies)
- AriaMx™ (Agilent Technologies)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems™) in Standard and Fast Mode
- CFX96 Touch™ (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 II (Roche)
- QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)

3. MATERIALI

3.1. Reagenti forniti

Tappo	Simbolo	Componente	Volume per flacone [μL]	Numero di Flaconi PCOV6111 (PCOV6113)
verde	POL 2x	Polimerasi (hot-start DNA polimerasi, nucleotidi, magnesio, potenziatori e stabilizzatori)	1060	1 (3)
verde/bianco	RT 20x	Trascrittasi inversa con inibitore della RNasi	106	1 (3)
blu	PP TSP	Primer-Probe-Mix	106	1 (3)
rosso	PC	Controllo positivo (DNA plasmidico che rappresenta il gene N della SARS-CoV-2)	150	1 (3)
giallo	EC	Controllo d'estrazione (controllo interno di lisi, estrazione e amplificazione dell'RNA)	500	1 (3)
trasparente	NFW	Acqua priva di nucleasi	500	1 (3)

3.2. Materiali e Attrezzature necessari, ma non forniti

- Cabina di sicurezza biologica per la manipolazione dei campioni
- Contenitore per rifiuti a rischio biologico
- Attrezzatura e materiali di consumo per l'isolamento dell'RNA del virus da campioni respiratori:
Kit appropriati per l'estrazione dell'acido nucleico, ad esempio, Mag-Bind® Viral DNA/RNA Xpress Kit (Omega Bio-tek Inc., Cat. No. M6219-2304CEIVD) validato per for Hangzhou Allsheng Instruments Co. Ltd. Auto-Pure96.
L'uso di altri metodi di estrazione dell'RNA deve essere convalidato dall'utente.
- Strumento di RT-PCR (per gli strumenti già convalidati fare riferimento al punto 2. PRINCIPIO DEL TEST). Potrebbero essere appropriati anche strumenti RT-PCR alternativi. La loro idoneità all'uso con il GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 deve essere convalidata dall'utente.
- Materiali di consumo appropriati per la RT-PCR (ad es. provette monouso, piastre di reazione, materiali di chiusura ottica corrispondenti)
- Microcentrifuga da tavolo
- Centrifuga con rotore per piastre di microtitolazione
- Miscelatore a vortice
- Pipette regolabili in relazione al setup della reazione
- Puntali per pipette monouso privi di DNase/RNase con filtri
- Guanti monouso senza polvere

4. STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Il kit GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 kit viene spedito su ghiaccio secco e tutti i componenti dovrebbero arrivare congelati.

- Tutti i componenti devono essere conservati tra -30 °C e -15 °C immediatamente dopo l'arrivo.
- Si devono evitare ripetuti cicli di congelamento e scongelamento (più di sette) dei reagenti, in quanto ciò potrebbe compromettere le prestazioni del kit. I reagenti devono essere congelati in aliquote se vengono utilizzati in modo intermittente.
- Mantenere la conservazione non congelata (ad es. conservazione su ghiaccio) il più breve possibile.
- [POL 2x]**, **[RT 20x]** e **[PP TSP]** devono essere conservati congelati e protetti dalla luce fino all'utilizzo.

5. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- L'RNA estratto o l'acido nucleico totale estratto dalle vie respiratorie superiori umani (lavaggio/tampone nasale, tampone nasofaringeo, tampone orofaringeo, saliva e soluzione per gargarismi) è il materiale di partenza per il GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.
- La qualità e la quantità dell'RNA estratto hanno un effetto cruciale sulle prestazioni dell'intero sistema di test RT-PCR. Assicurarsi che il metodo di estrazione dell'acido nucleico sia compatibile con la tecnologia RT-PCR.
- Assicurarsi che le condizioni di campionamento (tempo, metodo, conservazione e trasporto del campione) siano adeguate, per evitare un impatto negativo sull'estrazione e sulla RT-PCR.
- Per l'estrazione dell'acido nucleico deve essere utilizzato un metodo adatto all'estrazione dell'RNA del virus dal campione respiratorio umano.
- L' **[EC]** può essere utilizzata per monitorare sia la procedura di estrazione dell'RNA che qualsiasi potenziale inibizione della PCR. Pertanto, l' **[EC]** deve essere aggiunta prima della procedura di estrazione dell'acido nucleico nel tampone di lisi. Indipendentemente dal metodo/sistema utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico, l' **[EC]** può essere aggiunta direttamente al campione.
- Circa 5 µL di **[EC]** possono essere adatti, ma devono essere valutati attentamente. Quantità eccessive di **[EC]** possono portare a una ridotta amplificazione delle sequenze specifiche di SARS-CoV-2 e quindi potrebbero portare a un aumento dei valori Ct del FAM™. Potrebbe verificarsi una sottostima del segnale specifico di SARS-CoV-2.
- Poiché l'etanolo è un forte inibitore della Real-Time PCR, è necessario eliminarlo completamente prima dell'eluzione dell'acido nucleico durante l'estrazione. Se si utilizzano colonne di spin con **tamponi di lavaggio contenenti etanolo**, si raccomanda vivamente di eseguire un ulteriore passaggio di centrifugazione di 10 minuti a circa 17000 x g (~ 13000 rpm) prima di eluire l'RNA. Per questa ulteriore fase di centrifugazione, utilizzare una nuova provetta di raccolta. Concentrazioni > 4 % (v/v) di etanolo hanno portato all'inibizione del test GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Impostazione della Reazione

- Leggere attentamente le istruzioni per l'uso **prima** di eseguire il test. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta osservanza delle istruzioni per l'uso.
- Prima dell'uso assicurarsi che tutti i campioni e i reagenti siano scongelati completamente, miscelare mediante pipettaggio o passaggio delicato su un agitatore vortex.
- Importante:** **[RT 20x]** e **[POL 2x]** sono viscosi. Centrifugare brevemente le provette per assicurarsi che il materiale non sia rimasto nel tappo o nel lato della provetta. Assicurarsi di pipettare e dispensare con attenzione e utilizzare puntali per pipette adatti al pipettaggio di liquidi viscosi. Tenere tutti i componenti (**[POL 2x]**, **[RT 20x]** e **[PP TSP]**) permanentemente su ghiaccio/blocco di raffreddamento durante il setup della PCR. Preparare la miscela di reazione finale fresca ogni volta e immediatamente prima di iniziare la corsa RT-PCR in tempo reale.
- L'uso di **[NFW]** come controllo senza template (NTC, in inglese no template control) è altamente raccomandato.
- Definire le posizioni (pozzetti) per i campioni e i controlli (**[PC]**, NTC) sulla piastra.

Impostazione della Reazione	
Componente	Volume
[POL 2x]	10 µL
[RT 20x]	1 µL
[PP TSP]	1 µL
Campione o [PC] o [NFW]	8 µL
Volume totale	20 µL

- Chiudere la piastra di reazione ottica con il materiale di chiusura ottica corrispondente.
- Centrifugare la piastra di reazione ottica in una centrifuga con un rotore per piastre per microtitolazione per 60 secondi a 4 °C a circa 1000 x g (~ 3000 rpm).

6.2. Strumento di PCR in Tempo Reale

Per quanto riguarda l'impostazione e la programmazione dello strumento di PCR in tempo reale, si prega di utilizzare il manuale del rispettivo strumento.

Per istruzioni dettagliate sulla programmazione relative all'uso del GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 su specifici strumenti di PCR in tempo reale, contattare il fabbricante.

Impostazione d'Esecuzione RT-PCR	
Volume della reazione	20 µL
Riferimento passivo	ROX™

Canale di rilevamento

Il rilevamento dei frammenti di acido nucleico virale amplificato viene eseguito nei seguenti canali di rilevamento:

Target	Fluoroforo (Quencher)	Canale di rilevamento				
		AriaDx™, AriaMx™	CFX96 Touch™	LightCycler® 480 II	ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS	QuantStudio™ 5
SARS-CoV-2	FAM™ (BHQ1)	FAM	FAM	FAM (465-510)	FAM	x1-m1
EC	Cy5™ (BHQ2)	Cy5	Cy5	Cy5 (618-660)	Cy5	x5-m5

Profilo della Temperatura e Raccolta di Dati

No. di Cicli	Temperatura	Durata (min)	Raccolta di Dati
1	45 °C	10:00	-
1	95 °C	02:00	-
40*	95 °C	00:05	-
	60 °C	00:30	Rilevamento della fluorescenza alla fine di ogni ciclo

* LC480 II: 45 cicli

Prima di iniziare l'esecuzione del test, si prega di controllare le impostazioni dei cicli, della temperatura e del tempo.

7. RISULTATI

L'analisi dei dati deve essere eseguita con il software del dispositivo di RT-PCR utilizzato secondo le istruzioni del produttore.

Impostazioni per l'analisi

Strumento RT-PCR	Analise	Linea di Base
AriaDx™, AriaMx™ (Agilent Technologies)	Soglia 0,1 (Threshold 0.1)	Selezionare i valori di inizio e fine ciclo in modo da non includere il possibile rumore iniziale del segnale e che la linea di base finisca prima che venga rilevata una fluorescenza significativa.
ABI Prism® 7500 SDS Fast (Applied Biosystems™)		
QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)		
CFX96 Touch™ (Bio-Rad)	Soglia automatica (Auto Threshold)	
LightCycler® 480 II (Roche)	Abs Quant/2 nd Derivative Max	

7.1. Interpretazione dei Risultati

Il test è valido solo se l'esecuzione della RT-PCR è completa.

Il protocollo del test GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 prevede che i controlli vengano analizzati prima dei risultati dei campioni dei pazienti.

7.1.1. Controlli

Se i controlli del kit falliscono, il test non è valido e deve essere ripetuto.

I dati dei campioni vengono analizzati e interpretati solo dopo che tutti i controlli del kit sono stati completati.

- NTC (in inglese, no template control): NON deve avere un Ct rilevabile per nessun target. Se questo controllo ha un Ct rilevabile, ciò indica una contaminazione della corsa PCR ed è considerato non valido e deve essere ripetuto.
- PC**: FAM Ct ≤ 38
- EC**: tutti i campioni umani devono mostrare valori Ct ≤ 35 per Cy5.

La mancata rilevazione del **EC** in qualsiasi campione può indicare:

- Estrazione impropria di acido nucleico da materiali clinici con conseguente perdita di RNA e/o degradazione dell'RNA.
- Inibizione della (RT-) PCR.
- Impostazione ed esecuzione impropria del test.
- Malfunzionamento del reagente o dell'attrezzatura.

Se nel test l' **EC** non produce un risultato positivo per i campioni, interpretare come segue:

- Se il target SARS-CoV-2 è positivo anche in assenza di un segnale **EC** positivo, il risultato dovrebbe essere considerato valido. Un segnale **EC** negativo non esclude la presenza di SARS-CoV-2 RNA in un campione.
- Se il target SARS-CoV-2 e **EC** sono negativi per il campione, il risultato dovrebbe essere considerato non valido per il campione. Se è disponibile un campione residuo, ripetere la procedura di estrazione e ripetere il test. Se tutti i marcatori rimangono negativi dopo la ripetizione del test, riportare i risultati come non validi e raccogliere un nuovo campione, se possibile.

7.1.2. Campione

Se il test è valido, l'interpretazione dei risultati del campione è la seguente:

- Positivo (POS): Ct ≤ 38
- Negativo (neg): Non rilevato (ND) o Ct > 38

Si prega di fare riferimento alla seguente tabella per l'interpretazione delle combinazioni di segnali.

Canale di rilevamento		Interpretazione dei Risultati
FAM (SARS-CoV-2 N gene)	Cy5 EC	
POS	POS	Il campione contiene RNA specifico di SARS-CoV-2.
POS	neg	Il campione contiene RNA specifico di SARS-CoV-2.
neg	POS	Il campione non contiene quantità rilevabili di RNA specifico di SARS-CoV-2.
neg	neg	Inibizione della PCR o fallimento del reagente. Non deve essere fatta una dichiarazione diagnostica. Il test RT-PCR deve essere ripetuto o deve essere analizzato un nuovo campione.

8. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PRESTAZIONI

I risultati si riferiscono ai gruppi di campioni analizzati; non si tratta di specificazioni garantite.

8.1. Conformità Clinica

Le determinazioni sono state eseguite sugli strumenti AriaDx™, AriaMx™ (Agilent Technologies), ABI Prism® 7500 SDS Fast e QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™) Real-Time PCR.

Sono stati analizzati un totale di 600 campioni di tamponi nasofaringei. Questo comprendeva:

- 100 campioni positivi per SARS-CoV-2 RNA (incluse diverse varianti)
- 500 campioni negativi per SARS-CoV-2

I risultati ottenuti con il GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 sono stati confrontati con i risultati di un test RT-PCR di riferimento marcato CE.

		Riferimento (RT-PCR)	
		positivo	negativo
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positivo	100	0
	negativo	0	500

Percentuale di concordanza positiva: 100 %

Percentuale di concordanza negativa: 100 %

Percentuale di concordanza complessiva: 100 %

8.2. Precisione

La ripetibilità è stata analizzata con tre campioni di diverse concentrazioni di RNA dell'analita target (alta: 10.000 cp/μL, media: 500 cp/μL, e bassa: 3x LoD) misurate in 5 repliche in due corse indipendenti al giorno per 20 giorni. La riproducibilità è stata determinata analizzando i tre campioni in 5 repliche da tre operatori in tre siti per 5 giorni e una corsa al giorno. La riproducibilità inter-lotto è stata analizzata utilizzando i tre campioni con tre lotti GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 in due corse e nove repliche per lotto.

Concentrazione del campione	SARS-CoV-2 (FAM)								
	Ripetibilità			Riproducibilità			Riproducibilità interlotti		
	Media [Ct]	SD [Ct]	% CV	Media [Ct]	SD [Ct]	% CV	Media [Ct]	SD [Ct]	% CV
Alta	20,97	0,54	2,6	21,12	0,97	4,6	22,09	0,33	1,5
Media	24,48	0,43	1,8	25,31	1,24	4,9	26,17	0,47	1,8
Bassa	34,07	0,97	2,8	35,78	4,04	5,7	35,57	1,58	4,4

8.3. Sensitività Analitica

Il limite di rilevazione (LoD, dall'inglese Limit of Detection) è definito come la più bassa concentrazione di analita target che può essere rilevata con un livello di confidenza definito. Le determinazioni sono state eseguite sullo strumento AriaDx™ (Agilent Technologies) Real-Time PCR.

LoD di RNA trascritto in vitro (IVT-RNA)

Il materiale del tampone nasofaringeo negativo è stato estratto e addizionato con il gene N quantificato della SARS-CoV-2 a diverse concentrazioni. Il LoD provvisorio è stato determinato dalla concentrazione più bassa che dà il 100 % di risultati positivi quando testata in triplicato. Il LoD finale è stato determinato utilizzando una serie di diluizioni intorno al LoD provvisorio (analisi Probit) ed è stato testato in tre prove indipendenti con 8 repliche ciascuna su 3 lotti.

	LoD basato sull'analisi probit
AriaDx™ (Agilent Technologies)	1,75* copie/reazione

* Sulla base della distribuzione die Poisson, si dovrebbe presumere che meno di 3 copie di target per reazione PCR non possono essere rilevate in modo affidabile. Il valore di concentrazione si riferisce al campione dopo l'estrazione dell'RNA.

LoD dello standard internazionale dell'OMS o delle particelle virali complete inattivate

La matrice nasofaringea negativa è stata dosata con una serie di diluizioni (triplicati) del primo standard internazionale OMS per l'RNA della SARS-CoV-2 (codice NIBSC: 20/146) o di particelle virali intatte della SARS-CoV-2 inattivate chimicamente (NATrol™ SARS-CoV-2). L'estrazione è stata eseguita utilizzando il kit GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1. Il LoD provvisorio è stato stabilito dalla concentrazione più bassa che dà il 100 % di risultati positivi quando testata in triplicato. Il LoD finale è stato determinato utilizzando una serie di diluizioni intorno al LoD provvisorio (analisi Probit) ed è stato testato in tre corse indipendenti con 8 repliche ciascuna.

Analita	LoD basato sull'analisi Probit**
Standard OMS (codice NIBSC: 20/146)	52,33 IU/mL
NATrol™ SARS-CoV-2	37,46 copie/mL

** I valori di concentrazione si riferiscono al campione prima dell'estrazione dell'RNA

LoD su strumenti PCR-RT aggiuntivi

Il LoD per gli strumenti RT-PCR aggiuntivi è stato eseguito preparando tre diluizioni intorno al LoD. Pertanto, il materiale del tampone nasofaringeo è stato estratto, addizionato di IVT-RNA del gene N di SARS-CoV-2 quantificato e testato sul rispettivo strumento RT-PCR con 24 repliche. Il LoD è stato confermato (entro 2-3 volte) su AriaMx™ (Agilent Technologies), ABI Prism® 7500 SDS Fast (Applied Biosystems™) in modalità standard e veloce, QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™), CFX96 Touch™ (BioRad) e LightCycler® 480 II (Roche).

8.4. Inclusività

La sensibilità analitica del GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 è garantita innanzitutto dalla selezione accurata degli oligonucleotidi. L'inclusività è stata valutata mediante un'analisi *in silico* utilizzando le sequenze complete del virus SARS-CoV-2 disponibili al pubblico dal database Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) il 12 ottobre 2023. In base all'analisi attuale, tutte le varianti virali SARS-CoV-2 pubblicate sono rilevabili dal GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

La presenza di singoli isolati che non vengono rilevati dal GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 non può essere esclusa a causa di mutazioni casuali nei genomi virali. Tuttavia, solo se una mutazione è dominante e sostituisce altre varianti del virus, questa viene giudicata come critica per le prestazioni del test.

8.5. Reattività Crociata

La cross-reattività è stata valutata mediante analisi *in silico* contro la flora normale o gli agenti patogeni che causano sintomi simili o agenti patogeni correlati alla SARS-CoV-2.

Human coronavirus 229E	Influenza virus A	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Human coronavirus OC43	Influenza virus B	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Human coronavirus HKU1	Enterovirus	<i>Bordetella pertussis</i>
Human coronavirus NL63	Respiratory syncytial virus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
SARS coronavirus	Rhinovirus	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
MERS coronavirus	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
Adenovirus	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Human Metapneumovirus (hMPV)	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>
Parainfluenza virus 1-4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>

Dall'analisi *in silico* si è concluso che non ci si deve aspettare alcuna reattività crociata per le sequenze di primer e GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

Inoltre, sono stati analizzati i seguenti campioni clinici di tamponi nasofaringei:

- 10 campioni positivi per RSV A
- 10 campioni positivi per RSV B
- 10 campioni positivi per il coronavirus umano 229E
- 20 campioni positivi per il virus dell'influenza B

Non è stata osservata alcuna reattività crociata per i suddetti patogeni.

8.6. Confronto della matrice

8.6.1. Soluzione per gargarismi

Attenzione: Possibili effetti di diluizione e una maggiore variabilità dei risultati quando si usa una soluzione per gargarismi devono essere considerati quando nella valutazione dei risultati. Allo stesso modo, il momento del prelievo (idealmente subito dopo il risveglio senza ingestione di liquidi o cibo) e la durata dei gargarismi con 4 mL di una soluzione di NaCl allo 0,9 % (almeno 30 secondi) sono determinanti per il risultato dell'esame.

Confronto dei metodi

I risultati ottenuti con il GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 sono stati confrontati con i risultati di un test RT-PCR di riferimento marcato CE.

		Riferimento (RT-PCR)	
		positivo	negativo
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positivo	75	0
	negativo	0	92

La concordanza del 100 % è stata raggiunta per tutti i 167 campioni testati.

LoD di NATtrol

Le determinazioni sono state eseguite sullo strumento AriaDx™ (Agilent Technologies) Real-Time PCR.

La matrice negativa dei gargarismi è stata sottoposta a una serie di diluizioni di particelle virali intatte di SARS-CoV-2 inattivate chimicamente (NATtrol™ SARS-CoV-2). Ogni diluizione è stata estratta in triplicato usando il kit GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1. Il LoD provvisorio è stato stabilito dalla concentrazione più bassa che dà il 100 % di risultati positivi quando testata in triplicati. Il LoD finale è stato determinato utilizzando una serie di diluizioni intorno al LoD provvisorio ed è stata testata in 20 replicati in un'analisi. Il LoD è la concentrazione più bassa che dimostra un segnale positivo in ≥ 95 % delle 20 repliche testate.

Analita	LoD**
NATtrol™ SARS-CoV-2	80 copie/mL

** I valori di concentrazione si riferiscono al campione prima dell'estrazione dell'RNA

8.6.2. Soluzione di Saliva

Attenzione: Il prelievo dei campioni deve essere fatto più di 30 minuti dopo l'ultima ingestione di una bevanda, cibo, gomma da masticare, sigaretta/e-sigaretta, spazzolamento dei denti o risciacquo della bocca. Dopo il prelievo i campioni devono essere inattivati termicamente per 30 minuti a 56 °C, e successivamente al campione viene aggiunto 1 mL di PBS.

L'alta viscosità della matrice della saliva e la variabilità nella raccolta dei campioni potrebbero comportare un'elevata varianza della carica virale.

Confronto dei metodi

59 campioni di saliva positivi e 59 negativi, definiti da un test RT-PCR di riferimento marcato CE, sono stati testati con il GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2. I risultati ottenuti con il GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 sono stati confrontati con i risultati del test RT-PCR di riferimento.

		Riferimento (RT-PCR)	
		positivo	negativo
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positivo	59	0
	negativo	0	59

La concordanza del 100 % è stata raggiunta per tutti i 118 campioni testati.

Accordo diagnostico

Coppie appaiate di tamponi nasofaringei e campioni di saliva di 72 donatori sono stati analizzati utilizzando il kit GSD NovaPrime® RNA Extraction AE1 e il GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

		Tamponi nasofaringei	
		positivo	negativo
Saliva	positivo	44	4
	negativo	5	19

Sensibilità diagnostica: 89,8 % (95 % intervallo di confidenza: 81,6 % - 98,4 %)

Specificità diagnostica: 82,6 % (95 % intervallo di confidenza: 67,7 % - 98,4 %)

LoD di NATtrol

Le determinazioni sono state eseguite sullo strumento AriaDx™ (Agilent Technologies) Real-Time PCR.

La matrice di saliva negativa è stata dosata con una serie di diluizioni di particelle virali intatte di SARS-CoV-2 inattivate chimicamente (NATtrol™ SARS-CoV-2). Ogni diluizione è stata estratta in triplicato usando il kit GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1. Il LoD provvisorio è stato stabilito dalla concentrazione più bassa che dà il 100 % di risultati positivi quando testata in triplicati. Il LoD finale è stato determinato utilizzando una serie di diluizioni intorno al LoD provvisorio ed è stato testato in 20 replicati in un'analisi. Il LoD è la concentrazione più bassa che dimostra un segnale positivo in ≥ 95 % delle 20 repliche testate.

Analita	LoD**
NATtrol™ SARS-CoV-2	110 copie/mL

** I valori di concentrazione si riferiscono al campione prima dell'estrazione dell'RNA

9. CONTROLLO DI QUALITÀ

In conformità con il sistema di gestione della qualità certificato ISO del fabbricante, ogni lotto del test NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 è stato testato in base a specificazioni prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

10. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

- I risultati positivi indicano la presenza della SARS-CoV-2, ma non escludono un'infezione batterica o una coinfezione con altri agenti patogeni non rilevati dal test.
- Livelli molto bassi di materiale campione possono risultare in test con segnali negativi.
- I risultati negativi non escludono l'infezione da SARS-CoV-2 e non devono essere usati come unica base per il trattamento o per altre decisioni di gestione del paziente.
- I risultati del test devono essere correlati alle osservazioni cliniche, alla storia medica e/o alle informazioni epidemiologiche.

11. MARCHI E DICHIARAZIONI DI NON RESPONSABILITÀ

Nomi registrati, marchi di fabbrica, ecc. utilizzati in questo documento sono da considerarsi protetti dalla legge anche se non specificatamente contrassegnati come tali.

12. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- La procedura del test, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite rigorosamente. L'uso del kit di test con analizzatori diversi da quelli menzionati nella sezione 3. PRINCIPIO DEL TEST deve essere convalidato. Qualsiasi cambiamento nel design, nella composizione e nella procedura di test, così come qualsiasi uso in combinazione con altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utente stesso è responsabile di tali cambiamenti. Il produttore non è responsabile di falsi risultati e incidenti per questi motivi.
- Solo per uso diagnostico in vitro.
- Tutti i campioni dei pazienti devono essere considerati e trattati come potenzialmente infettivi.
- Non scambiare reagenti di diversi lotti di produzione.
- Nessun reagente di altri produttori deve essere usato insieme ai reagenti di questo kit per il test.
- Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sull'etichetta.
- Indossare guanti monouso senza polvere, un camice da laboratorio e una protezione per gli occhi quando si maneggiano i campioni.
- Usare sempre provette di reazione monouso DNase/RNase-free e puntali per pipette con barriere aerosol.
- Evitare la contaminazione microbica e da nucleasi (DNase/RNase) del campione e dei componenti del kit.
- Per evitare la contaminazione dello spazio di lavoro con acidi nucleici, le provette/piastre di reazione non devono essere aperte dopo l'amplificazione.
- RT-PCR è altamente sensibile alla contaminazione da acidi nucleici. Pertanto, il materiale positivo / potenzialmente positivo deve essere conservato separatamente da tutti gli altri componenti del kit.
- Dedicare forniture e attrezzature alle aree di lavoro separate e non spostarle da un'area all'altra.
- Questo test non deve essere usato direttamente sul campione.
- Prima di usare questo test, l'acido nucleico deve essere estratto con metodi di estrazione adeguati dal campione originale.
- È essenziale seguire le informazioni contenute nelle istruzioni per l'uso del kit di estrazione, soprattutto per quanto riguarda i diversi materiali del campione!
- Poiché l'etanolo è un forte inibitore della RT-PCR, è necessario eliminarlo completamente prima dell'eluizione dell'acido nucleico durante l'estrazione. Se si utilizzano colonne di centrifugazione con tamponi di lavaggio contenenti etanolo, si raccomanda vivamente di eseguire una fase di centrifugazione supplementare di 10 min. a circa 17000 x g (~ 13000 rpm) prima di eluire l'RNA. Per questa fase aggiuntiva di centrifugazione, utilizzare una nuova provetta di raccolta. Concentrazioni > 4 % (v/v) di etanolo hanno portato all'inibizione del test GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 assay.
- Il risultato di questo kit RT-PCR può essere influenzato da potenziali mutazioni nel genoma dell'agente patogeno se si trovano nella regione di legame primer / sonda. Può verificarsi una sottostima e/o il mancato rilevamento dell'agente patogeno.
- Gli inibitori RT-PCR possono anche provocare sottostima, risultati falsi negativi o esecuzioni non valide. Pertanto, utilizzare solo kit di estrazione degli acidi nucleici, che rimuovono gli inibitori RT-PCR e che sono dedicati ai processi RT-PCR a valle.
- La Real-Time PCR è progettata solo per personale qualificato che ha familiarità con la buona pratica di laboratorio e che è addestrato in RT-PCR.
- Per un ulteriore controllo di qualità interno ogni laboratorio dovrebbe inoltre utilizzare campioni noti.

12.1. Considerazioni sullo smaltimento

I residui di prodotti chimici e preparati sono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è regolato da leggi e regolamenti nazionali e regionali. Contattare le autorità locali o le società di gestione dei rifiuti che daranno consigli su come smaltire i rifiuti pericolosi.

Per informazioni sui materiali d'imballaggio fare riferimento a MATERIALI D'IMBALLAGGIO.

13. INFORMAZIONI PER L'ORDINAZIONE

REF	PCOV6111	GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	(1 x 96 Determinazioni)
	PCOV6113	GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	(3 x 96 Determinazioni)

ESPAÑOL

1. USO PREVISTO

La GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 RT-PCR está destinada a la determinación cualitativa del ARN genómico del SARS-CoV-2 (coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo 2) extraído de muestras de las vías respiratorias superiores humanas (lavado nasal/hisopo, hisopo nasofaríngeo, hisopo orofaríngeo, saliva y solución para hacer gárgaras) recogidas de individuos con sospechos de infección viral respiratoria.

2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

La determinación cualitativa del ARN específico se basa en la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa en Tiempo Real (RT-PCR). El ensayo contiene cebadores y sondas específicas marcadas con colorantes fluorescente reporteros y aceptores (quencher) para la amplificación y detección simultánea de secuencias del ARN viral que representan dos regiones específicas del gen N del SARS-CoV-2. Además, el ensayo contiene una diana de amplificación heterólogo (Control de Extracción, **EC**) para identificar la posible inhibición de la RT-PCR por sustancias interferentes contenidas en la muestra o el fallo de la extracción de ARN precedente. Por lo tanto, la **EC** se añade a la muestra durante el aislamiento del ARN.

Las sondas específicas de genes de interés están marcadas con el fluoróforo FAM™. La sonda específica de **EC** está marcada con el fluoróforo Cy5™, lo que permite la detección paralela de ambos amplicones en los canales de detección correspondientes.

La GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 RT-PCR ha sido validada para las siguientes plataformas de PCR en tiempo real:

- AriaDx™ (Agilent Technologies)
- AriaMx™ (Agilent Technologies)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems™) in Standard and Fast Mode
- CFX96 Touch™ (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 II (Roche)
- QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)

3. MATERIALES

3.1. Reactivos Suministrados

Tapa	Simbolo	Componente	Volume per Botella [μL]	Número de Botella PCOV6111 (PCOV6113)
verde	POL 2x	Polimerasa (ADN polimerasa de arranque en caliente, nucleótidos, magnesio, potenciadores y estabilizadores)	1060	1 (3)
verde/blanco	RT 20x	transcriptasa reversa con inhibidor de RNasa	106	1 (3)
azul	PP TSP	Primer-Probe-Mix	106	1 (3)
roja	PC	Control Positivo (ADN plasmídico que representa el gen N del SARS-CoV-2)	150	1 (3)
amarillo	EC	Control de Extracción (control interno de lisis, extracción y amplificación basado en el ARN)	500	1 (3)
transparente	NFW	Agua libre de nucleasas	500	1 (3)

3.2. Materiales y Equipos necesarios y no suministrados

- Cabina de seguridad biológica para la manipulación de muestras
- Contenedor de residuos de riesgo biológico
- Equipos y consumibles para el aislamiento de ARN de virus a partir de muestras respiratorias:
Kits de extracción de ácidos nucleicos adecuados, por ejemplo, Mag-Bind® Viral DNA/RNA Xpress Kit (Omega Bio-tek Inc., N° de cat. M6219-2304CEIVD) validado para Hangzhou Allsheng Instruments Co. Ltd. Auto-Pure96.
El uso de otros métodos de extracción de ARN debe ser validado por el usuario.
- Instrumento de PCR en tiempo real (para los instrumentos ya validados, véase 2. PRINCIPIO DEL ENSAYO. Otros instrumentos de PCR en tiempo real también pueden ser apropiados. El usuario deberá validar su idoneidad para el uso del GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.
- Consumibles apropiados para la PCR en tiempo real (por ejemplo, tubos de plástico desechables, placas de reacción, materiales de cierre óptico correspondientes)
- Microcentrífuga de mesa
- Centrifugadora con un rotor para placas de microtitulación
- Mezclador vortex
- Pipetas ajustables en relación con a la configuración de la reacción
- Puntas de pipeta desechables libres de DNasa/RNasa con filtros
- Guantes desechables sin polvo

4. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

El kit de GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 se envía en hielo seco y todos los componentes deben llegar congelados.

- Todos los componentes deben ser almacenados entre -30 °C y -15 °C inmediatamente después de su llegada.
- Deben evitarse los ciclos repetidos de congelación y descongelación (más de siete) de los reactivos, ya que esto podría afectar al rendimiento del kit. Los reactivos deberán ser congelados en alícuotas si van a ser utilizados de forma intermitente.
- Mantenga el almacenamiento sin congelar (por ejemplo, el almacenamiento en hielo) lo más breve posible.
- Mantener tanto [POL 2x], [RT 20x] como el [PP TSP] congelados e protegidos de la luz hasta su uso.

5. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- El ARN extraído o el ácido nucleico total del tracto respiratorio superior humano (lavado nasal/hisopo, hisopo nasofaríngeo, hisopo orofaríngeo, saliva y solución para hacer gárgaras) es el material de partida para el GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.
- La calidad y la cantidad del ARN extraído tienen un efecto crucial en el rendimiento de todo el sistema de prueba RT-PCR. Asegúrese de que el método de extracción de ácido nucleico sea compatible con la tecnología de PCR en tiempo real.
- Asegúrese de que las condiciones de muestreo (tiempo, método, almacenamiento y transporte de la muestra) son adecuadas para evitar un impacto negativo en la extracción y la RT-PCR.
- Para la extracción del ácido nucleico debe utilizarse un método adecuado para la extracción del ARN del virus a partir de la muestra respiratoria humana.
- La [EC] puede utilizarse para controlar tanto el procedimiento de extracción de ARN como cualquier posible inhibición de la PCR. Por lo tanto, la [EC] debe añadirse antes del procedimiento de extracción de ácido nucleico en el tampón de lisis. Independientemente del método/sistema utilizado para la extracción de ácidos nucleicos, la [EC] puede añadirse directamente a la muestra.
- Unos 5 µL de [EC] pueden ser adecuados, pero deben evaluarse cuidadosamente. Una cantidad excesiva de [EC] puede conducir a una menor amplificación de las secuencias específicas del SARS-CoV-2 y, por tanto, podría dar lugar a un aumento de los valores Ct de FAM™. Puede producirse una subestimación de la señal específica del SARS-CoV-2.
- Dado que el etanol es un fuerte inhibidor de la PCR en tiempo real, es necesario eliminarlo completamente antes de la elución del ácido nucleico durante la extracción. Si se utilizan columnas de centrifugación con tampones de lavado que contengan etanol, es altamente recomendable realizar un paso adicional de centrifugación de 10 minutos a aproximadamente 17000 x g (~ 13000 rpm) antes de eluir el ARN. Para este paso de centrifugación adicional, utilice un nuevo tubo de recogida.
Las concentraciones > 4 % de etanol (v/v) dieron lugar a la inhibición del ensayo GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

6. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1. Configuración de la reacción

- Por favor, lea atentamente las instrucciones de uso antes de realizar la prueba. La fiabilidad de los resultados depende de que se sigan estrictamente las instrucciones de uso.
- Antes de utilizarlo, asegúrese de que todas las muestras y los reactivos estén completamente descongelados, mezclados mediante pipeteo hacia arriba y hacia abajo o vórtice y centrifugados brevemente.
- **Importante:** [RT 20x] and [POL 2x] son viscosos. Centrifugue brevemente los tubos para asegurarse de que el material no se ha alojado en el tapón o en el lateral del tubo. Asegúrese de pipetear y dispensar con cuidado, y utilice puntas de pipeta adecuadas para pipetear líquidos viscosos. Mantenga todos los componentes ([POL 2x], [RT 20x] y [PP TSP]) permanentemente en hielo/bloque de refrigeración durante la preparación de la PCR. Prepare la mezcla de reacción final fresca cada vez e inmediatamente antes de iniciar la ejecución de la RT-PCR.
- Es muy recomendable el uso de [NFW] como “no template control” (NTC, control sin plantilla).
- Defina las posiciones (pozos) para las muestras y los controles ([PC], NTC) en la placa.

Configuración de la reacción	
Componente	Volume
[POL 2x]	10 µL
[RT 20x]	1 µL
[PP TSP]	1 µL
Sample or [PC] or [NFW]	8 µL
Total volume	20 µL

- Cierre la placa de reacción óptica con el correspondiente material de cierre óptico.
- Centrifugar la placa de reacción óptica en una centrífuga con un rotor para placa de microtitulación durante 60 segundos a 4 °C a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

6.2. Programación del Instrumento de PCR en Tiempo Real

Para la configuración y programación del instrumento de PCR en tiempo real, utilice por favor el manual del respectivo instrumento.

Para obtener instrucciones de programación detalladas sobre el uso del GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2, en instrumentos específicos de PCR en tiempo real (RT-PCR), póngase por favor en contacto con el fabricante.

Configuración de la ejecución de la RT- PCR	
Volumen de Reacción	20 µL
Referencia Pasiva	ROX™

Canales de Detección

La detección de los fragmentos amplificados de ácido nucleico viral se realiza en los siguientes canales de detección:

Diana	Fluoróforo (Quencher)	Canal de Detección				
		AriaDx™, AriaMx™	CFX96 Touch™	LightCycler® 480 II	ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS	QuantStudio™ 5
SARS-CoV-2	FAM™ (BHQ1)	FAM	FAM	FAM (465-510)	FAM	x1-m1
EC	Cy5™ (BHQ2)	Cy5	Cy5	Cy5 (618-660)	Cy5	x5-m5

Perfil de Temperatura y Recopilación de Datos

No. de Ciclos	Temperatura	Tiempo (min)	Recopilación de Datos
1	45 °C	10:00	-
1	95 °C	02:00	-
40*	95 °C	00:05	-
	60 °C	00:30	Medición de la fluorescencia al final de cada ciclo

* LC480 II: 45 ciclos

Antes de iniciar la prueba, verifique por favor los ajustes de los ciclos, la temperatura y el tiempo.

7. RESULTS

El análisis de los datos debe efectuarse con el software del dispositivo de PCR en tiempo real utilizado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Criterios de análisis

Instrumento de PCR en tiempo real	Análisis	Línea de base
AriaDx™, AriaMx™ (Agilent Technologies)	Umbral 0,1 (Threshold 0.1)	Seleccione los valores de inicio y final del ciclo para que no se incluya el posible ruido inicial de la señal y la línea de base termine antes de que se pueda detectarse una fluorescencia significativa.
ABI Prism® 7500 SDS Fast (Applied Biosystems™)		
QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)		
CFX96 Touch™ (Bio-Rad)	Umbral automático (Auto Threshold)	
LightCycler® 480 II (Roche)	Abs Quant/2nd Derivative Max	

7.1. Interpretación de los Resultados

El test es válido sólo si se completa la ejecución de la RT-PCR.

El protocolo de la prueba GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 dispone que los controles deben ser analizados con anterioridad a los resultados de la muestra.

7.1.1. Controles

Si los controles del kit fallan, la prueba no es válida y debe repetirse.

Los datos de la muestras se analizan e interpretan sólo después de haber realizado controles del kit hayan sido superados.

- NTC (en inglés, *No Template Control*): NO debe tener un Ct detectable en ninguna diana. Si estos controles detectan un Ct, esto indica contaminación del run de PCR y se considera inválido y debe repetirse.
- PC**: FAM Ct ≤ 38
- EC**: todas las muestras humanas deben presentar valores de Cy5 Ct ≤ 35

La no detección de **EC** en alguna muestra puede indicar:

- Extracción inadecuada del ácido nucleico de los materiales clínicos que resulta en la pérdida de ARN y/o la degradación del ARN.
- Inhibición de la (RT-) PCR.
- Preparación y ejecución inadecuadas del ensayo.
- Mal funcionamiento del reactivo o del equipo.

Si el ensayo de la **EC** no produce un resultado positivo para las muestras, interprete lo siguiente:

- Si el diana del SARS-CoV-2 es positivo incluso en ausencia del **EC** positivo, el resultado debe considerarse válido. Una señal negativo de la **EC** no excluye la presencia de ARN de SARS-CoV-2 en una muestra.
- Si el diana del SARS-CoV-2 y la **EC** son negativos para la muestra, el resultado debe considerarse inválido para la muestra. Si se dispone de una muestra residual, repita el procedimiento de extracción y repita la prueba. Si todos los marcadores siguen siendo negativos después de la repetición de la prueba, informe de los resultados como inválidos y, si es posible, se debe recoger una nueva muestra.

7.1.2. Muestras

Si la ejecución de la prueba es válida, la interpretación de los resultados de la muestra es la siguiente:

- Positivo (POS): $Cq \leq 38$
- Negativo (neg): No detectado (ND) o $Ct > 38$

Consulte la siguiente tabla para interpretar las combinaciones de señales.

Canal de Detección		Interpretación de los Resultados
FAM (gene N del SARS-CoV-2)	Cy5 EC	
POS	POS	La muestra contiene ARN específico del SARS-CoV-2.
POS	neg	La muestra contiene ARN específico del SARS-CoV-2.
neg	POS	La muestra no contiene cantidades detectables de ARN específico del SARS-CoV-2.
neg	neg	Inhibición de la PCR o fallo del reactivo. No se debe hacer una declaración de diagnóstico. Debe repetirse la ejecución de la RT-PCR o debe analizarse una nueva muestra.

8. CARACTERÍSTICA DEL ENSAYO

Los resultados están basados en el grupo de muestras investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

8.1. Concordancia Clínica

Las determinaciones se realizaron en los instrumentos de PCR en tiempo real AriaDx™, AriaMx™ (Agilent Technologies), ABI Prism® 7500 SDS Fast and QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™).

Se han analizado un total de 600 muestras de hisopos nasofaríngeos. Éstas comprendían:

- 100 muestras positivas para el ARN del SARS-CoV-2 (incluyendo diferentes variantes)
- 500 muestras negativas para el SARS-CoV-2

Los resultados obtenidos con el GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 se compararon con los resultados de un ensayo de RT-PCR de referencia marcado por la CE.

		Referencia (RT-PCR)	
		positivo	negativo
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positivo	100	0
	negativo	0	500

Porcentaje de concordancia positiva: 100 %

Porcentaje de concordancia negativa: 100 %

Porcentaje de concordancia global: 100 %

8.2. Precisión

La repetibilidad se analizó con tres muestras de diferentes concentraciones de ARN del analito diana (alta: 10.000 cp/μL, media: 500 cp/μL, y baja: 3x LoD) medidas en 5 réplicas en dos ciclos independientes por día durante 20 días. La reproducibilidad se determinó analizando las tres muestras en 5 réplicas por tres operadores en tres sitios durante 5 días y un ciclo por día. La reproducibilidad entre lotes se analizó utilizando las tres muestras con tres lotes de GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 en dos ciclos y nueve réplicas por lote.

Concentración de la muestra	SARS-CoV-2 (FAM)								
	Repetibilidad			Reproducibilidad			Reproducibilidad entre lotes		
	Media [Ct]	SD [Ct]	% CV	Media [Ct]	SD [Ct]	% CV	Media [Ct]	SD [Ct]	% CV
Alta	20,97	0,54	2,6	21,12	0,97	4,6	22,09	0,33	1,5
Media	24,48	0,43	1,8	25,31	1,24	4,9	26,17	0,47	1,8
Bajo	34,07	0,97	2,8	35,78	4,04	5,7	35,57	1,58	4,4

8.3. Sensibilidad Analítica

El límite de detección (LoD, en inglés Limit of Detection) se define como la concentración más baja del analito diana que puede detectarse con un nivel de confianza definido. Las determinaciones se realizaron en el instrumento de PCR en tiempo real AriaDx™ (Agilent Technologies).

LoD del ARN transcrito *in vitro* (IVT-ARN)

Se extrajo un conjunto de material de hisopo nasofaríngeo negativo y se le añadió el gen N del SARS-CoV-2 cuantificado en diferentes concentraciones. La LoD provisional se estableció mediante la concentración más baja que da un 100 % de resultados positivos cuando se analiza por triplicado. La LoD final se determinó utilizando una serie de diluciones en torno a la LoD provisional (análisis Probit) y se probó en tres series independientes con 8 réplicas cada una en 3 lotes.

	LoD basado en el análisis Probit
AriaDx™ (Agilent Technologies)	1,75* copias/reacción

* Basándose en la distribución de Poisson, debe asumirse que menos de 3 copias de la diana por reacción de PCR no pueden detectarse de forma fiable. El valor de la concentración se refiere a la muestra después de la extracción del ARN.

LoD del Estándar Internacional de la OMS o de partículas de virus completamente inactivadas

La matriz nasofaríngea negativa se enriqueció con una serie de diluciones (por triplicado) del First WHO International Standard de la (WHO) OMS para el ARN del CoV-2 del SARS (NIBSC: 20/146) o de partículas de virus del SARS-CoV-2 intactas e inactivadas químicamente (NATrol™ SARS CoV-2). La extracción se realizó con el kit GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1. La LoD provisional se estableció mediante la concentración más baja que da un 100 % de resultados positivos cuando se analiza por triplicado. La LoD final se determinó utilizando una serie de diluciones alrededor de la LoD provisional (Análisis Probit) y se probó en tres corridas independientes con 8 réplicas cada una.

Analito	LoD basado en el análisis Probit**
WHO Standard (NIBSC code: 20/146)	52,33 IU/mL
NATrol™ SARS-CoV-2	37,46 copias/mL

** Los valores de concentración se refieren a la muestra antes de la extracción del ARN

LoD en instrumentos adicionales de RT-PCR

La LoD para instrumentos adicionales de RT-PCR se realizó preparando tres diluciones alrededor de la LoD. Por lo tanto, se extrajo material de hisopo nasofaríngeo, se le añadió ARN-IVT cuantificado del gen del SARS-CoV-2 y se probó en el instrumento de RT-PCR respectivo con 24 réplicas. La LoD se confirmó (dentro de 2-3 veces) en AriaMx™ (Agilent Technologies), ABI Prism® 7500 SDS Fast (Applied Biosystems™) en modo estándar y rápido, QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™), CFX96 Touch™ (BioRad) and LightCycler® 480 II (Roche).

8.4. Inclusividad

La sensibilidad analítica del GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 está garantizada en primer lugar por la minuciosa selección de los oligonucleótidos. La inclusividad se evaluó mediante un análisis *in silico* utilizando secuencias completas del virus de SARS-CoV-2 disponibles públicamente de la base de datos de la Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) el 12 de octubre de 2023. Según el análisis actual, todas las variantes analizadas del virus SARS-CoV-2 son detectables por el GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

No se puede descartar la aparición de aislados que no sean detectados por la GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 debido a mutaciones aleatorias en el genoma viral. Sin embargo, sólo si una mutación es dominante y sustituyera a otras variantes del virus, sería considerada crítica para el rendimiento del ensayo.

8.5. Reactividad Cruzada

La reactividad cruzada se evaluó mediante un análisis *in silico* contra la flora normal o los patógenos que causan síntomas similares o patógenos relacionados con el SARS-CoV-2.

Human coronavirus 229E	Influenza virus A	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Human coronavirus OC43	Influenza virus B	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Human coronavirus HKU1	Enterovirus	<i>Bordetella pertussis</i>
Human coronavirus NL63	Respiratory syncytial virus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
SARS coronavirus	Rhinovirus	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
MERS coronavirus	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
Adenovirus	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Human Metapneumovirus (hMPV)	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Staphylococcus epidermis</i>
Parainfluenza virus 1-4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>

A partir del análisis *in silico* se concluyó que no es de esperar una reactividad cruzada para las secuencias de cebadores y sondas GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

Además, se realizaron pruebas en húmedo utilizando las siguientes muestras clínicas de hisopos nasofaríngeos:

- 10 muestras positivas para el VRS A
- 10 muestras positivas para el VRS B
- 10 muestras positivas para el coronavirus humano 229E
- 20 muestras positivas para el virus de la gripe B

No se observó ninguna reactividad cruzada para los patógenos mencionados.

8.6. Comparación de Matrices

8.6.1. Solución de Gárgaras

Atención: Al evaluar los resultados deben tenerse en cuenta los posibles efectos de dilución y el posible aumento de la variabilidad de los resultados al utilizar la solución de gárgaras. Asimismo, el tiempo de muestreo (idealmente directamente después de despertarse sin haber ingerido previamente líquidos o alimentos) y la duración de las gárgaras con 4 mL de una solución de NaCl al 0,9 % (por lo menos 30 segundos) son decisivos para el resultado del examen.

Comparación de métodos

Los resultados obtenidos con el GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 se compararon con los resultados de una prueba de PCR-RT de referencia marcado por la CE.

		Referencia (RT-PCR)	
		positivo	negativo
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positivo	75	0
	negativo	0	92

Se alcanzó una concordancia del 100% en las 167 muestras analizadas.

LoD de NATtrol

Las determinaciones se realizaron en el instrumento de PCR en tiempo real AriaDx™ (Agilent Technologies).

La matriz negativa de gárgaras se sometió a una serie de diluciones de partículas intactas de virus SARS-CoV-2 e inactivadas químicamente (NATtrol™ SARS-CoV-2). Cada dilución se extrajo por triplicado utilizando el kit GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1. La LoD provisional se estableció a partir de la concentración más baja que dio un 100 % de resultados positivos cuando se analizó por triplicado. La LoD final se determinó utilizando una serie de diluciones en torno a la LoD provisional y se probó en 20 réplicas en un ensayo. El LoD es la concentración más baja que demuestra una señal positiva en ≥ 95 % de las 20 réplicas probadas.

Analito	LoD**
NATtrol™ SARS-CoV-2	80 copias/mL

** Los valores de concentración se refieren a la muestra antes de la extracción del ARN

8.6.2. Saliva

Atención: La recolección de muestras debe realizarse más de 30 minutos después de la última ingesta de una bebida, comida, goma de mascar, cigarrillo/cigarrillo electrónico, cepillado de dientes o enjuague bucal. Después de la recogida, las muestras deben ser inactivadas térmicamente durante 30 minutos a 56 °C, y luego se añade 1 mL de PBS a la muestra.

La alta viscosidad de la matriz de la saliva y la variabilidad en la recogida de muestras pueden dar lugar a una alta variación en la carga viral.

Comparación de métodos

Se analizaron 59 muestras de saliva positivas y 59 negativas, definidas por una prueba PCR-RT de referencia marcada con la CE, con el GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2. Los resultados obtenidos con el GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 se compararon con los resultados de la prueba PCR-RT de referencia.

		Referencia (RT-PCR)	
		positivo	negativo
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positivo	59	0
	negativo	0	59

Se alcanzó una concordancia del 100 % en las 118 muestras analizadas.

Acuerdo diagnóstico

Los pares de hisopos nasofaríngeos y muestras de saliva de 72 donantes se analizaron con el kit GSD NovaPrime® RNA Extraction AE1 e il GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

		Hisopos nasofaríngeos	
		positivo	negativo
Saliva	positivo	44	4
	negativo	5	19

Sensibilidad diagnóstica: 89,8 % (95 % intervalo de confianza del: 81,6 % - 98,4 %)

Especificidad diagnóstica: 82,6 % (95 % intervalo de confianza del: 67,7 % - 98,4 %)

LoD del NATtrol

Las determinaciones se realizaron en el instrumento de PCR en tiempo real AriaDx™ (Agilent Technologies).

La matriz de saliva negativa se ensayó con una serie de diluciones de partículas virales de SARS-CoV-2 intactas e inactivadas químicamente (NATtrol™ SARS-CoV-2). Cada dilución se extrajo por triplicado utilizando el GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1. La LoD provisional se determinó a partir de la concentración más baja que dio un 100 % de resultados positivos cuando se probó por triplicado. La LoD final se determinó utilizando una serie de diluciones en torno a la LoD provisional y se probó en 20 réplicas en un ensayo. El LoD es la concentración más baja que demuestra una señal positiva en ≥ 95 % de las 20 réplicas probadas.

Analito	LoD**
NATtrol™ SARS-CoV-2	110 copia/mL

** Los valores de concentración se refieren a la muestra antes de la extracción del ARN

9. CONTROL DE CALIDAD

De acuerdo con el sistema de gestión de la calidad del fabricante, que cuenta con la certificación ISO, cada lote de GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 se ha sometido a pruebas con respecto a especificaciones predeterminadas para garantizar la calidad constante del producto.

10. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los resultados positivos indican la presencia de SARS-CoV-2, pero no descartan la infección bacteriana o la coinfección con otros patógenos no detectados por la muestra.
- Cantidades bajas de material de partida pueden dar lugar a ejecuciones de la prueba con señales negativas.
- Los resultados negativos no excluyen la infección por el SARS-CoV-2 y no deben utilizarse como base exclusiva para el tratamiento u otras medidas de gestión del paciente.
- Los resultados de las pruebas deben estar relacionados con los estudios clínicos, la historia de la enfermedad y/o la información epidemiológica.

11. MARCAS COMERCIALES Y CLÁUSULAS DE EXENCIÓN DE RESPONSABILIDAD

Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento deben considerarse protegidos por la ley, aunque no estén marcados específicamente como tales.

12. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento de prueba, la información, las precauciones y las advertencias de las instrucciones de uso deben seguirse estrictamente. El uso del kit de prueba con otros analizadores distintos de los mencionados en la sección 2. PRINCIPIO DEL ENSAYO tiene que ser validado. Cualquier cambio en el diseño, la composición y el procedimiento de prueba, así como cualquier uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante, no está autorizado; el propio usuario es responsable de tales cambios. El fabricante no se hace responsable de los resultados falsos e incidentes por estos motivos.
- Sólo para uso de diagnóstico in vitro.
- Todas las muestras de paciente deben ser consideradas y manipuladas como potencialmente infecciosas.
- No intercambie reactivos de diferentes lotes de producción.
- No deben utilizarse reactivos de otros fabricantes junto con los reactivos de este kit de pruebas.
- No utilice reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Utilice guantes desechables sin polvo, una bata de laboratorio y protección ocular cuando manipule las muestras.
- Utilice siempre tubos de reacción y puntas de pipeta desechables libres de DNasa/RNasa con barreras de aerosol.

- Evite la contaminación microbiana y por nucleasas (DNasa/RNasa) de la muestra y de los componentes del kit.
- Para evitar la contaminación del espacio de trabajo con ácidos nucleicos, los tubos/placas de reacción no deben abrirse después de la amplificación.
- La RT-PCR es muy sensible a la contaminación por ácidos nucleicos. Por lo tanto, el material positivo/potencialmente positivo debe almacenarse por separado de todos los demás componentes del kit.
- Dedique los suministros y el equipo a las áreas de trabajo separadas y no muévalas de un área a otra.
- Este ensayo no debe utilizarse directamente sobre la muestra.
- Antes de utilizar esta prueba, se extraerá el ácido nucleico con métodos de extracción adecuados de la muestra original. Es esencial seguir la información que figura en las instrucciones de uso del equipo de extracción, especialmente en lo que respecta a los diferentes materiales de muestra.
- Dado que el etanol es un fuerte inhibidor de la PCR en tiempo real, es necesario eliminarlo completamente antes de la elución del ácido nucleico durante la extracción. Si se utilizan columnas de centrifugación con tampones de lavado que contengan etanol, es altamente recomendable realizar un paso adicional de centrifugación de 10 minutos a aproximadamente 17000 x g (~ 13000 rpm) antes de eluir el ARN. Para este paso de centrifugación adicional, utilice un nuevo tubo de recogida.
- Las concentraciones > 4 % de etanol (v/v) dieron lugar a la inhibición del ensayo GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.
- El resultado de este kit de RT-PCR puede verse influenciado por potenciales mutaciones en el genoma del patógeno si se localizan en la región de unión del cebador/sonda. Puede producirse una subestimación y/o un fallo en la detección del patógeno.
- Los inhibidores de la RT-PCR también pueden provocar subestimación, resultados negativos falsos o ejecuciones inválidas. Por lo tanto, sólo se deben utilizar kits de extracción de ácidos nucleicos que eliminen los inhibidores de la RT-PCR y que estén dedicados a procesos posteriores de RT-PCR.
- La PCR en tiempo real sólo está diseñada para personal cualificado que esté familiarizado con las buenas prácticas de laboratorio y capacitado en RT-PCR.
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

12.1. Indicaciones para la Eliminación de Residuos

Por regla general, los productos químicos y las preparaciones son residuos peligrosos. Su eliminación está sometida a las leyes y los decretos nacionales sobre la eliminación de residuos. Las autoridades informan sobre la eliminación de residuos peligroso.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte Materiales de embalaje.

13. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

REF	PCOV6111	GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	(1 x 96 determinaciones)
	PCOV6113	GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	(3 x 96 determinaciones)

PORTUGUÊS

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 RT-PCR destina-se à determinação qualitativa do RNA genômico do SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda severa coronavírus 2) extraído das amostras das vias respiratórias superiores humanas (lavagem nasal/swab, swab nasofaríngeo, swab orofaríngeo, saliva e solução de gargarejo) coletados de indivíduos suspeitos de infecção viral respiratória.

2. PRINCÍPIO DO TESTE

A determinação qualitativa do RNA específico é baseada na tecnologia PCR-RT (Real-Time Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction). O kit contém primers e sondas específicas rotuladas com corantes fluorescente repórter e Quencher para amplificação e detecção simultânea de seqüências de RNA que representam duas regiões específicas do gene N do SARS-CoV-2. Além disso, o test contém um alvo heterólogo de amplificação (Controle de Extração, **EC**) para identificar uma possível inibição de PCR-RT por interferência de substâncias contidas na amostra ou falha da extração do RNA anterior. Portanto, o **EC** é adicionado a amostra durante o isolamento do RNA.

As sondas específicas do gene de interesse são rotuladas com o fluoróforo FAM™. A sonda específica **EC** é rotulada com o fluoróforo Cy5™, permitindo assim a detecção paralela de ambos os amplicons nos canais de detecção correspondentes.

O GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 foi validado para seguir plataformas de PCR em tempo real:

- AriaDx™ (Agilent Technologies)
- AriaMx™ (Agilent Technologies)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems™) em Standard e Fast Mode
- CFX96 Touch™ (Bio-Rad)
- LightCycler® 480 II (Roche)
- QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes Fornecidos

Tampa	Símbolo	Componente	Volume por frasco [µL]	Numero de frascos PCOV6111 (PCOV6113)
verde	POL 2x	Polimerase (polimerase de DNA de arranque a quente, nucleotídeos, magnésio, melhoradores e estabilizadores)	1060	1 (3)
verde/branco	RT 20x	Transcriptase reversa com inibidor de RNase	106	1 (3)
azul	PP TSP	Primer-Probe-Mix	106	1 (3)
vermelho	PC	Controle Positivo (DNA plasmídeo representando o gene N do SARS-CoV-2)	150	1 (3)
amarelo	EC	Controle de Extração (lise interna baseada em RNA, controle de extração e amplificação)	500	1 (3)
transparente	NFW	Água isenta de Nuclease	500	1 (3)

3.2. Materiais e Equipamentos necessários, mas não fornecidos

- Armário de segurança biológica para manuseio de amostras
- Recipiente para resíduos biodegradáveis
- Equipamentos e consumíveis para isolar o RNA do vírus a partir de amostras respiratórias:
Kits apropriados de extração de ácido nucléico, por exemplo, Mag-Bind® Viral DNA/RNA Xpress Kit (Omega Bio-tek Inc., Cat. No. M6219-2304CEIVD) validado para Hangzhou Allsheng Instruments Co. Ltd. Auto-Pure96.
O uso de outros métodos de extração de RNA deve ser validado pelo usuário.
- Instrumento de PCR em tempo real (para instrumentos já validados, consulte 2. PRINCÍPIO DO TESTE). Instrumentos alternativos de PCR em tempo real também podem ser apropriados. Sua adequação para uso com GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 tem que ser validada pelo usuário.
- Consumíveis adequados para PCR em tempo real (por exemplo: tubos descartáveis, placas de reação, materiais de fechamento ótico correspondentes)
- Microcentrífuga de mesa
- Centrífuga com rotor para Placa de Microtitulação
- Misturador Vortex
- Pipetas ajustáveis em relação à configuração de reação
- Pontas de pipeta descartáveis com filtros sem DNase/RNase
- Luvas descartáveis sem pó

4. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

O kit GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 é enviado em gelo seco e todos os componentes do kit devem chegar congelados.

- Todos os componentes têm que ser armazenados entre -30 °C e -15 °C imediatamente após a chegada.
- Os ciclos repetidos de descongelamento (mais de sete) de reagentes devem ser evitados, uma vez que isto pode afetar o desempenho do kit. Os reagentes devem ser congelados em alíquotas se forem utilizados de forma intermitente.
- Manter o armazenamento não congelado (por exemplo, armazenamento em gelo) o mais curto possível.
- [POL 2x], [RT 20x] e [PP TSP] devem ser armazenados congelados e protegidos da luz até o uso.

5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- O RNA extraído ou ácido nucleico total extraído dos tipos de amostras das vias respiratórias superiores humanas (lavagem nasal/swab, swab nasofaríngeo, swab orofaríngeo, saliva e solução de gargarejo) é o material de partida para o GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.
- A qualidade e a quantidade do RNA extraído tem um efeito crucial sobre o desempenho de todo o sistema de teste RT-PCR. Certifique-se de que o método de extração do ácido nucléico seja compatível com a tecnologia de PCR em Tempo Real.
- Garantir que as condições de amostragem (tempo, método, armazenamento e transporte da amostra) sejam adequadas para evitar impacto negativo na extração e RT-PCR.
- Para a extração de ácido nucléico deve ser utilizado um método adequado para extrair o RNA do vírus a partir de uma amostra respiratória humana.
- O [EC] pode ser usado para monitorar tanto o procedimento de extração de RNA quanto qualquer potencial inibição de PCR. Portanto, o [EC] deve ser adicionado antes do procedimento de extração do ácido nucléico no tampão de lise. Independentemente do método/sistema usado para extração do ácido nucléico, o [EC] pode ser adicionado diretamente à amostra.
- Cerca de 5 µL de [EC] podem ser adequados, mas devem ser cuidadosamente avaliados. Quantidades excessivas de [EC] podem levar a uma amplificação reduzida das seqüências específicas do SARS-CoV-2 e podem, portanto, resultar em valores Ct de FAM™ aumentados. Pode ocorrer subestimação do sinal específico do SARS-CoV-2.
- Como o etanol é um forte inibidor de PCR em Tempo Real, é necessário eliminá-lo completamente antes da eluição do ácido nucléico durante a extração. Se utilizar colunas de centrifugação com **tampão de lavagem contendo etanol**, é altamente recomendado realizar uma etapa adicional de centrifugação de 10 min a aproximadamente 17000 x g (~ 13000 rpm) antes de eluir o RNA. Para esta etapa adicional de centrifugação, use um novo tubo de coleta. Concentrações > 4 % de etanol (v/v) resultaram na inibição do ensaio GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

6. ASSAY PROCEDURE

6.1. Configuração da Reação

- Leia atentamente as instruções de uso antes de realizar o ensaio. A confiabilidade dos resultados depende de seguir estritamente as instruções de uso.
- Antes de usar, certifique-se de que todas as amostras e reagentes estejam completamente descongeladas, misturadas por pipetagem delicadamente para cima e para baixo ou por vórtice e centrifugadas.
- **Importante:** [RT 20x] e [POL 2x] são viscosos. Girar brevemente os tubos para baixo para garantir que o material não tenha se alojado na tampa ou na lateral do tubo. Certifique-se de pipetar e distribuir cuidadosamente e use pontas de pipeta adequadas para pipetar líquidos viscosos. Mantenha todos os componentes ([POL 2x], [RT 20x] e [PP TSP]) permanentemente sobre gelo/bloco de resfriamento durante a configuração da PCR. Prepare a mistura de reação final fresca a cada vez e imediatamente antes de iniciar a execução do RT-PCR em tempo real.
- O uso de [NFW] como nenhum controle de modelo (NTC) é altamente recomendado.
- Definir as posições (poços) para amostras e controles ([PC], NTC) na placa.

Configuração da Reação	
Componente	Volume
[POL 2x]	10 µL
[RT 20x]	1 µL
[PP TSP]	1 µL
Amostra ou [PC] ou [NFW]	8 µL
Volume total	20 µL

- Feche a placa de reação óptica com o correspondente material de fechamento óptico.
- Centrifugar a placa de reação óptica em uma centrífuga com um rotor para placas de microtitulação durante 60 segundos a 4 °C a aproximadamente 1000 x g (~ 3000 rpm).

6.2. Programação do Instrumento de PCR em Tempo Real

Em relação à configuração e programação do instrumento de PCR em Tempo Real, por favor, use o manual do respectivo instrumento.

Para instruções detalhadas de programação relativas ao uso do GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 em instrumentos específicos de PCR em Tempo Real, favor contatar o fabricante.

Configurações de execução RT-PCR	
Reaction Volume	20 µL
Passive Reference	ROX™

Canais de detecção

A detecção dos fragmentos de ácido nucléico viral amplificado é realizada nos seguintes canais de detecção:

Alvo (Target)	Fluoróforo (Quencher)	Canais de detecção				
		AriaDx™, AriaMx™	CFX96 Touch™	LightCycler® 480 II	ABI Prism® 7500 SDS/Fast SDS	QuantStudio™ 5
SARS-CoV-2	FAM™ (BHQ1)	FAM	FAM	FAM (465-510)	FAM	x1-m1
EC	Cy5™ (BHQ2)	Cy5	Cy5	Cy5 (618-660)	Cy5	x5-m5

Perfil de temperatura e coleta de dados

No. de Ciclos	Temperatura	Tempo (min)	Data da Coleta
1	45 °C	10:00	-
1	95 °C	02:00	-
40*	95 °C	00:05	-
	60 °C	00:30	Medição da fluorescência no final de cada ciclo

* LC480 II: 45 ciclos

Antes de iniciar a execução do teste, verifique as configurações para ciclos, temperatura e tempo.

7. RESULTADOS

A análise dos dados deve ser realizada com o software do dispositivo de PCR em tempo real utilizado, de acordo com as instruções do fabricante.

Configurações de análise

Instrumentos RT-PCR	Análise	Linha de base
AriaDx™, AriaMx™ (Agilent Technologies)	Limiar (Threshold 0.1)	Selecionar valores de início e fim de ciclo para que o possível ruído de sinal inicial não seja incluído e a linha de base termine antes que seja detectada uma fluorescência significativa.
ABI Prism® 7500 SDS Fast (Applied Biosystems™)		
QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™)		
CFX96 Touch™ (Bio-Rad)	Auto Limiar (Auto Threshold)	
LightCycler® 480 II (Roche)	Abs Quant/2nd Derivative Max	

7.1. Interpretação dos Resultados

O teste é válido somente se o PCR-RT estiver completo.

O protocolo de teste GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 rege que os controles devam ser analisados antes dos resultados das amostras dos pacientes.

7.1.1. Controles

Se os controles do kit falharem, o teste é inválido e deve ser repetido.

Os dados da amostra são analisados e interpretados somente após todas as verificações do kit terem sido concluídas.

- NTC (em inglês, (no template control): NÃO deve ter um Ct detectável para nenhum alvo. Se este controle tiver um Ct detectável, isto indica contaminação da PCR e é considerado inválido e deve ser repetido.
- PC**: FAM Ct ≤ 38
- EC**: Todas as amostras humanas devem apresentar valores para Cy5 Ct ≤ 35.

A falha na detecção de **EC** em qualquer espécime pode indicar:

- Extração inadequada de ácido nucléico de materiais clínicos resultando em perda de RNA e/ou degradação do RNA.
- Inibição de PCR-RT.
- Configuração e execução impróprias do teste.
- Mau funcionamento do reagente ou do equipamento.

Se o teste **EC** não produzir um resultado positivo para as amostras, interprete da seguinte forma:

- Se o alvo SARS-CoV-2 for positivo mesmo na ausência de um sinal positivo de **EC**, o resultado deve ser considerado válido. Um sinal de CE negativo não exclui a presença de RNA SARS-CoV-2 em uma amostra.
- Se o alvo SARS-CoV-2 e o **EC** forem negativos para a amostra, o resultado deve ser considerado inválido para a amostra. Se o espécime residual estiver disponível, repetir o procedimento de extração e repetir o teste. Se todos os marcadores permanecerem negativos após o novo teste, informe os resultados como inválidos e uma nova amostra deve ser coletada, se possível.

7.1.2. Amostras

Se o teste for válido, a interpretação dos resultados da amostra é a seguinte:

- Positivo (POS): Ct ≤ 38
- Negativo (neg): Não detectado (ND) ou Ct > 38

Consulte as tabelas seguintes para a interpretação das diferentes combinações de sinais.

Canais de detecção		Interpretação dos Resultados
FAM (gene N do SARS-CoV-2)	Cy5 EC	
POS	POS	A amostra contém RNA específico para SARS-CoV-2.
POS	neg	A amostra contém RNA específico para SARS-CoV-2.
neg	POS	A amostra não contém quantidades detectáveis de RNA específico do SARS-CoV-2.
neg	neg	Inibição de PCR ou falha de reagente. Uma declaração de diagnóstico não deve ser feita. A execução da PCR-RT deve ser repetida, ou uma nova amostra deve ser analisada.

8. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

Os resultados referem-se aos grupos de amostras investigadas; estas não são especificações garantidas.

8.1. Concordância Clínica

As determinações foram realizadas nos instrumentos de PCR em tempo real AriaDx™, AriaMx™ (Agilent Technologies), ABI Prism® 7500 SDS e QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™).

Um total de 600 amostras de swab nasofaríngeo foram testadas. Isto compreendeu:

- 100 amostras positivas para SARS-CoV-2 RNA (incluindo diferentes variantes)
- 500 amostras negativas para SARS-CoV-2

Os resultados obtidos com o GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 foram comparados com os resultados de um ensaio RT-PCR de referência marcado pela CE.

		Referência (RT-PCR)	
		positivo	negativo
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positivo	100	0
	negativo	0	500

Percentual de concordância positiva: 100 %

Percentual de concordância negativa: 100 %

Percentual de concordância global: 100 %

8.2. Precisão

A repetibilidade foi analisada com três amostras de diferentes concentrações de RNA do analito alvo (alta: 10.000 cp/μL, média: 500 cp/μL e baixa: 3x LoD) medidas em 5 réplicas em duas séries independentes por dia durante 20 dias. A reprodutibilidade foi determinada analisando as três amostras em 5 réplicas por três operadores em três locais durante 5 dias e uma rodada por dia. A reprodutibilidade entre lotes foi analisada usando as três amostras com três lotes GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 em duas corridas e nove réplicas por lote.

Concentração das Amostras	SARS-CoV-2 (FAM)								
	Repetibilidade			Reprodutibilidade			Reprodutibilidade entre lotes		
	Média [Ct]	SD [Ct]	% CV	Média [Ct]	SD [Ct]	% CV	Média [Ct]	SD [Ct]	% CV
Alta	20.97	0.54	2.6	21.12	0.97	4.6	22.09	0.33	1.5
Média	24.48	0.43	1.8	25.31	1.24	4.9	26.17	0.47	1.8
Baixa	34.07	0.97	2.8	35.78	4.04	5.7	35.57	1.58	4.4

8.3. Sensibilidade Analítica

O Limite de Detecção (LoD, em inglês Limit of Detection) é definido como a menor concentração de analito alvo que pode ser detectada com um nível de confiança definido. As determinações foram realizadas no instrumento de PCR em tempo real AriaDx™ (Agilent Technologies).

LoD de RNA transcrito *in vitro* (IVT-RNA)

O material de swab nasofaríngeo negativo foi extraído e enriquecido com o gene N quantificado do SARS-CoV-2 em diferentes concentrações. O LoD provisório foi determinado a partir da menor concentração dando 100 % de resultados positivos quando testado em triplicata. O LoD final foi determinado usando uma série de diluições em torno do LoD provisório (análise Probit) e foi testado em três testes independentes com 8 réplicas cada um em 3 lotes.

	LoD baseado em análise de probit
AriaDx™ (Agilent Technologies)	1,75* cópias/reação

* Com base na distribuição de Poisson, deve ser presumido que menos de 3 cópias alvo por reação PCR não podem ser coletadas de forma confiável. O valor da concentração se refere à amostra após a extração do RNA.

LoD da norma internacional da OMS ou das partículas virais completas inativadas

A matriz nasofaríngea negativa foi testada com uma série de diluições (triplicações) da First WHO International Standard da (WHO) da OMS para o RNA do SARS-CoV-2 (código NIBSC: 20/146) ou partículas intactas do vírus SARS-CoV-2 quimicamente inativadas (NATtrol™ SARS-CoV-2). A extração foi realizada utilizando o kit GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1. O LoD provisório foi estabelecido a partir da concentração mais baixa dando 100 % de resultados positivos quando testado em triplicata. O LoD final foi determinado usando uma série de diluições em torno do LoD provisório (análise Probit) e foi testado em três séries independentes com 8 réplicas cada uma.

Analito	LoD baseado em análise de Probit**
WHO Standard (código NIBSC: 20/146)	52,33 IU/mL
NATtrol™ SARS-CoV-2	37,46 cópias/mL

** Os valores de concentração referem-se à amostra antes da extração do RNA

LoD em instrumentos adicionais de PCR-RT

O LoD para os instrumentos PCR-RT adicionais foi realizado preparando três diluições em torno do LoD. Portanto, foi extraído material de swab nasofaríngeo, IVT-RNA do gene N do SARS-CoV-2 quantificado e testado no respectivo instrumento PCR-RT com 24 réplicas. LoD foi confirmado (em 2-3 vezes) em AriaMx™ (Agilent Technologies), ABI Prism® 7500 SDS Fast (Applied Biosystems™) em modo padrão e rápido, QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™), CFX96 Touch™ (BioRad) e LightCycler® 480 II (Roche)

8.4. Inclusividade

A sensibilidade analítica do GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 é garantida antes de tudo pela seleção minuciosa dos oligonucleotídeos. A inclusão foi avaliada pela análise *in-silico* utilizando seqüências completas de vírus SARS-CoV-2 disponíveis publicamente pela Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID) em 12 de outubro de 2023. Com base na análise atual, todas as variantes do vírus SARS-CoV-2 analisadas são detectáveis pelo GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

A ocorrência de isolados únicos que não são detectados pelo GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 não pode ser descartada devido a mutações aleatórias nos genomas virais. Entretanto, somente se uma mutação for dominante e substituir outras variantes de vírus, isto é considerado crítico para o desempenho do ensaio.

8.5. Reação Cruzada

A reação cruzada foi avaliada em análise *in silicio* contra flora normal ou patógenos que causam sintomas similares ou patógenos relacionados ao vírus SARS-CoV-2.

Human coronavirus 229E	Influenza A virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Human coronavirus OC43	Influenza B virus	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Human coronavirus HKU1	Enterovirus	<i>Bordetella pertussis</i>
Human coronavirus NL63	Respiratory syncytial virus	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
SARS coronavirus	Rhinovirus	<i>Pneumocystis jirovecii</i>
MERS coronavirus	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
Adenovirus	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Human Metapneumovirus (hMPV)	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Parainfluenza virus 1-4	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>

A partir da análise *in-silico*, concluiu-se que não é de se esperar nenhuma reatividade cruzada para as seqüências de primer e sonda GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

Além disso, foram testadas as seguintes amostras clínicas de esfregaços nasofaríngeos ou fluido para cultura inativado por calor:

- 10 amostras positivas para RSV A
- 10 amostras positivas para RSV B
- 10 amostras positivas para o coronavírus humano 229E
- 20 amostras positivas para Influenza B

Não foi observada reatividade cruzada para os patógenos acima

8.6. Comparação de Matrizes

8.6.1. Solução de Gargarejo

Atenção: Os eventuais efeitos de diluição e possível aumento da variabilidade dos resultados ao usar uma solução de gargarejo devem ser considerados ao avaliar os resultados. Da mesma forma, o tempo de coleta (idealmente imediatamente após o despertar sem ingestão prévia de alimentos ou líquidos) e a duração do gargarejo com 4 mL de uma solução de NaCl 0,9 % (pelo menos 30 segundos) são decisivos para o resultado do teste.

Comparação de métodos

Os resultados obtidos com o GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 foram comparados com os resultados de um teste PCR-RT de referência marcado pela CE.

		Referência (RT-PCR)	
		positivo	negativo
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positivo	75	0
	negativo	0	92

Foi alcançada uma concordância de 100 % para todas as 167 amostras testadas.

LoD de NATtrol

As determinações foram realizadas no instrumento de PCR em tempo real AriaDx™ (Agilent Technologies).

A matriz de gargarejo negativo foi submetida a uma série de diluições de partículas intactas do vírus SARS-CoV-2 quimicamente inativadas (NATtrol™ SARS-CoV-2). Cada diluição foi extraída em triplicata usando o kit GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1. O LoD provisório foi estabelecido a partir da concentração mais baixa dando 100 % de resultados positivos quando testado em triplicatas. O LoD final foi determinado usando uma série de diluição em torno do LoD provisório e foi testado em 20 réplicas em um ensaio. O LoD é a concentração mais baixa demonstrando um sinal positivo em ≥ 95 % das 20 réplicas testadas.

Analito	LoD**
NATtrol™ SARS-CoV-2	80 cópias/mL

** Os valores de concentração referem-se à amostra antes da extração do RNA

8.6.2. Saliva

Atenção: As amostras devem ser colhidas mais de 30 minutos após a última ingestão de uma bebida, comida, chiclete, cigarro/e-cigarro, escovação de dentes ou enxágue bucal. Após a coleta, as amostras devem ser desativadas termicamente por 30 minutos a 56 °C, e então 1 mL de PBS é adicionado à amostra.

A alta viscosidade da matriz de saliva e a variabilidade na coleta de amostras pode resultar em alta variação na carga viral.

Comparação de métodos

59 amostras de saliva positivas e 59 negativas, definidas por um teste RT-PCR de referência com selo CE, foram testadas com o GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2. Os resultados obtidos com o GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 foram comparados com os resultados do teste PCR-RT de referência.

		Referência (RT-PCR)	
		positivo	negativo
GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	positivo	59	0
	negativo	0	59

Foi alcançada uma concordância de 100 % para todas as 118 amostras testadas.

Acordo de diagnóstico

Os pares emparelhados de esfregaços nasofaríngeos e amostras de saliva de 72 doadores foram analisados usando o kit GSD NovaPrime® RNA Extraction AE1 e o GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2.

		Esfregaços nasofaríngeos	
		positivo	negativo
Saliva	positivo	44	4
	negativo	5	19

Sensibilidade diagnóstica: 89,8 % (95 % intervalo de confiança: 81,6 % - 98,4 %)

Especificidade diagnóstica: 82,6 % (95 % intervalo de confiança: 67,7 % - 98,4 %)

LoD de NATtrol

As determinações foram realizadas no instrumento de PCR em tempo real AriaDx™ (Agilent Technologies).

A matriz negativa da saliva foi testada com uma série de diluições de partículas intactas do vírus SARS-CoV-2 quimicamente inativadas (NATtrol™ SARS-CoV-2). Cada diluição foi extraída em triplicata usando o kit GSD NovaPrime® IVD RNA Extraction AE1. O LoD provisório foi determinado a partir da concentração mais baixa dando 100 % de resultados positivos quando testado em triplicatas. O LoD final foi determinado usando uma série de diluições em torno do LoD provisório e foi testado em 20 réplicas em um ensaio. O LoD é a concentração mais baixa demonstrando um sinal positivo em ≥ 95 % das 20 réplicas testadas.

Analito	LoD**
NATtrol™ SARS-CoV-2	110 cópias/mL

** Os valores de concentração referem-se à amostra antes da extração do RNA

9. CONTROLE DE QUALIDADE

De acordo com o sistema de gerenciamento de qualidade do fabricante, com a certificado ISO, cada lote do teste NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 foi testado de acordo com especificações pré-definidas para garantir a qualidade consistente do produto.

10. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

- Resultados positivos indicam a presença do SARS-CoV-2, mas não descartam infecção bacteriana ou co-infecção com outros patógenos não detectados pelo teste.
- Níveis muito baixos de material de amostra podem resultar em testes com sinais negativos.
- Resultados negativos não excluem a infecção pelo SARS-CoV-2 e não devem ser usados como única base para o tratamento ou outras decisões de gerenciamento de pacientes.
- Os resultados dos testes devem ser correlacionados com observações clínicas, histórico médico e/ou informações epidemiológicas.

11. MARCAS REGISTRADAS E ISENÇÕES DE RESPONSABILIDADE

Os nomes registrados, marcas registradas, etc. utilizados neste documento devem ser considerados protegidos por lei, mesmo que não tenham sido especificamente marcados como tal.

12. PRECAUÇÕES E ADVERTÊNCIAS

- O procedimento de teste, as informações, as precauções e as advertências nas instruções de uso devem ser rigorosamente seguidas. O uso do kit de teste com outros analisadores que não os mencionados na seção 2. PRINCÍPIO DO TESTE tem que ser validado. Qualquer alteração no projeto, composição e procedimento de teste, bem como qualquer uso em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante não é autorizado; o próprio usuário é responsável por tais alterações. O fabricante não se responsabiliza por resultados falsos e incidentes por estes motivos.
- Somente para uso diagnóstico in-vitro.
- Todas as amostras de pacientes devem ser consideradas e tratadas como potencialmente infecciosas.
- Não trocar reagentes de diferentes lotes de produção.
- Nenhum reagente de outros fabricantes deve ser usado junto com os reagentes deste kit de teste.
- Não use reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
- Usar luvas descartáveis sem pó, uma bata de laboratório e proteção para os olhos ao manusear as amostras.
- Usar sempre tubos descartáveis de reação sem DNase/RNase e pontas de pipeta com barreiras de aerossol.
- Evitar a contaminação microbiana e nuclease (DNase/RNase) da amostra e dos componentes do kit.
- A fim de evitar a contaminação do espaço de trabalho com ácidos nucleicos, os tubos/placas de reação não devem ser abertos após a amplificação.
- RT-PCR é altamente sensível à contaminação com ácidos nucleicos. Portanto, o material positivo / potencialmente positivo deve ser armazenado separadamente de todos os outros componentes do kit.
- Dedique suprimentos e equipamentos às áreas de trabalho separadas e não os mova de uma área para outra.
- Este ensaio não deve ser usado diretamente sobre a amostra respiratória.
- Antes de usar este ensaio, o ácido nucleico deve ser extraído com métodos de extração adequados a partir da amostra original. É essencial seguir as informações nas instruções de uso do kit de extração, especialmente no que diz respeito aos diferentes materiais da amostra.
- Como o etanol é um forte inibidor de PCR em Tempo Real, é necessário eliminá-lo completamente antes da eluição do ácido nucleico durante a extração. Se utilizar colunas de centrifugação com tampão de lavagem contendo etanol, é altamente recomendado realizar uma etapa adicional de centrifugação de 10 min a aproximadamente 17000 x g (~ 13000 rpm) antes de eluir o RNA. Para esta etapa adicional de centrifugação, use um novo tubo de coleta. Concentrações de > 4 % (v/v) de etanol resultaram na inibição do ensaio GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2 assay.
- O resultado deste kit RT-PCR pode ser influenciado por mutações potenciais no genoma do patógeno, se elas estiverem localizadas na região de ligação do primer / sonda. Pode ocorrer subestimação e/ou falha na detecção do patógeno.
- Os inibidores de RT-PCR também podem provocar subestimação, resultados falsos negativos ou execuções inválidas. Portanto, use somente kits de extração de ácidos nucleicos, que removem os inibidores de RT-PCR e que são dedicados aos processos de RT-PCR a jusante.
- A PCR em Tempo Real é projetada apenas para pessoal qualificado que esteja familiarizado com as boas práticas de laboratório e treinado em RT-PCR.
- Para um controle de qualidade interno adicional cada laboratório deve utilizar amostras conhecidas.

12.1. Considerações de Eliminação

Resíduos de químicos e preparações são geralmente considerados como resíduos perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos está regulada por leis e normativas nacionais e regionais. Contactar as autoridades locais ou empresas de gestão de resíduos as quais podem aconselhar sobre como eliminar resíduos perigosos.

Para informações sobre os materiais de embalagem, consulte MATERIAIS DE EMBALAGEM.

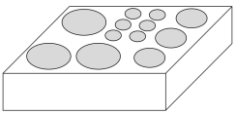
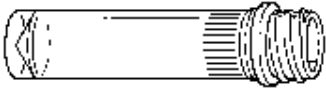
13. INFORMAÇÃO DE PEDIDO

REF	PCOV6111	GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	(1 x 96 Determinações)
	PCOV6113	GSD NovaPrime® TSP SARS-CoV-2	(3 x 96 Determinações)

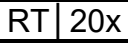
ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

Ct/Cq	Threshold cycle (Ct) or quantification cycle (Cq) is the cycle number at which the sample's reaction curve intersects the threshold line
NA	Not applicable
NAT	Nucleic acid Amplification Techniques
NTC	No Template Control

PACKAGING MATERIALS / VERPACKUNGSMATERIALIEN / MATÉRIELS D'EMBALLAGE / MATERIALI D'IMBALLAGGIO / MATERIALES DE EMBALAJE / MATERIAIS DE EMBALAGEM

		
PAP 21	PAP 21	PAP 22
POL 2x RT 20x PP TSP PC EC NFW		
		
PP 5	PP 5	

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device / <i>In-vitro</i> -Diagnostikum / Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Diagnostico <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico <i>In vitro</i> / Dispositivo Médico para Diagnóstico <i>In Vitro</i>
	CE marking / CE-Kennzeichnung / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE / Marca CE
	Unique Device Identifier / Eindeutige Produktidentifizierung / identification unique des dispositifs / identificazione unica del dispositivo / identificación única del producto / identificação única dos dispositivos
	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
	Keep away from sunlight / Vor Sonnenlicht schützen / Conserver à l'abri de la lumière / Conservare lontano dai raggi solari / Mantener alejado de la luz solar / Manter afastado da luz solar
	Catalogue Number / Katalognummer / Référence catalogue / Numero di catalogo / Número de catálogo / Número do catálogo
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso / Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
	Polymerase 2x / Polymerase 2x / Polymérase 2x / Polimerasi 2x / Polimerasa 2x / Polimerase 2x
	Reverse Transcriptase 20x / Reverse Transkriptase 20x / Transcriptase inverse 20x / DNA polimerasi (RNA-dipendente) 20x / Transcriptasa inversa 20x / Transcriptase inversa 20x
	Primer-Probe-Mix
	Positive Control / Positivkontrolle / Contrôle positif / Controllo positivo / Control positivo / Controle positivo
	Extraction Control / Extraktionskontrolle / Contrôle d'Extraction / Controllo d'estrazione / Control de Extracción / Controle de Extração
	Nuclease free water / Nukleasefreies Wasser / Eau sans nuclease / Acqua priva di nucleosi / Agua libre de nucleasas / Água isenta de Nuclease
	Contains sufficient for "n" tests / Ausreichend für "n" Tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenuto sufficiente per "n" saggi / Contenido suficiente para "n" tests / Conteúdo suficiente para "n" testes



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

PCOV611x_IFU_rev06_fromLot_020N