

Gebrauchsanweisung

FlexStar[®]

**Norovirus Type & Rotavirus
RT-PCR Detection Mix 1.5**

05/2022 DE

Gastrointestinal

FlexStar[®]

Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5

Zur Verwendung mit

CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

CFX96™ Dx System (Bio-Rad)

QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)



FS0071543



96



05 2022



altona Diagnostics GmbH • Mörkenstr. 12 • D-22767 Hamburg

Inhaltsverzeichnis

1.	Über diese Gebrauchsanweisung	6
2.	Zweckbestimmung	6
3.	Produktinhalt	7
4.	Lagerung	8
5.	Hintergrundinformationen	9
6.	Produktbeschreibung	10
6.1	Komponenten	12
6.2	Real-Time-PCR-Geräte	13
6.3	Probenarten	13
7.	Benötigtes, nicht mitgeliefertes Zubehör	14
8.	Warnungen, Vorsichtsmaßnahmen und Einschränkungen	15
9.	Verfahren	17
9.1	Probenentnahme, -handhabung und -lagerung	17
9.2	Probenvorbereitung	18
9.3	Master Mix Ansatz	19
9.4	Reaktionsansatz	21
10.	Programmierung des Real-Time-PCR-Gerätes	22
10.1	Einstellungen	22
10.2	Fluoreszenz-Detektionskanäle (Farbstoffe)	23
10.3	Temperaturprofil und Fluoreszenzmessung	23
11.	Datenanalyse	23
11.1	Gültigkeit diagnostischer Testläufe	24
11.1.1	Gültiger diagnostischer Testlauf	24

11.1.2	Ungültiger diagnostischer Testlauf.....	24
11.2	Interpretation der Ergebnisse	24
11.2.1	Qualitative Analyse	25
12.	Leistungsbewertung	26
12.1	Stuhl	26
12.1.1	Analytische Sensitivität.....	26
12.1.2	Analytische Spezifität	29
12.1.2.1	Negativproben	30
12.1.2.2	Störende Substanzen.....	30
12.1.2.3	Kreuzreaktionen	31
12.1.3	Präzision.....	32
12.1.4	Gesamtausfallrate	35
12.1.5	Verschleppung.....	35
12.1.6	Klinische Leistungsdaten.....	36
13.	Entsorgung	38
14.	Qualitätskontrolle.....	38
15.	Technischer Support	39
16.	Literatur	39
17.	Handelsmarken und Haftungsausschlüsse.....	40
18.	Erläuterung der Symbole	41
19.	Änderungshistorie	43

1. Über diese Gebrauchsanweisung

In diesem Handbuch ist den Begriffen VORSICHT und HINWEIS durchgängig folgende Bedeutung zugeordnet:

VORSICHT



Hebt Anweisungen und Verfahren hervor, deren Nichtbefolgung oder fehlerhafte Umsetzung zu Verletzungen führen und/oder die Funktion des Produkts beeinträchtigen kann. Wenden Sie sich an den technischen Support von altona Diagnostics, falls Sie Hilfe benötigen.

HINWEIS



Dieses Symbol steht neben Informationen, die für den Benutzer nützlich, für die Ausübung der Funktion jedoch nicht essenziell sind.

Lesen Sie die Gebrauchsanweisung vor Verwendung des Produkts sorgfältig durch.

2. Zweckbestimmung

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 ist ein in-vitro-diagnostischer Test auf Basis der Real-Time-PCR-Technologie für den qualitativen Nachweis und die Differenzierung von Norovirus-Genogruppe-I-(GI)-, Norovirus-Genogruppe-II-(GII)- und Rotavirus-spezifischer RNA in menschlichen Stuhlproben.

Er ist als Hilfsmittel für die Diagnose von Norovirus- und Rotavirus-Infektionen vorgesehen.

Die mit dem FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 generierten Ergebnisse müssen in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden interpretiert werden.

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 ist für die Verwendung durch professionelle Nutzer bestimmt, die in molekularbiologischen Techniken und in-vitro-diagnostischen Verfahren geschult sind.

3. Produktinhalt

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 enthält die folgenden Komponenten:

Tabelle 1: Kitkomponenten

Deckelfarbe	Komponente	Anzahl Röhrchen	Nominalvolumen [µl/Röhrchen]
Blau	Detection Mix ¹⁾	8	60
Rot	PC ²⁾	2	250
Weiß	NTC ³⁾	2	250

¹⁾ Enthält biologisches Material tierischen Ursprungs

²⁾ Positive Control (Positivkontrolle) (Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-spezifische RNA)

³⁾ No Template Control (Negativkontrolle)

VORSICHT



Überprüfen Sie das Produkt und seine Komponenten vor der ersten Verwendung auf Vollständigkeit in Bezug auf Anzahl, Typ und Abfüllvolumina. Benutzen Sie kein beschädigtes oder unvollständiges Produkt, da dies die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.

4. Lagerung

- Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 wird auf Trockeneis verschickt. Die Produktkomponenten sollten in gefrorenem Zustand ankommen. Sollten ein oder mehrere Komponenten bei Erhalt nicht gefroren sein, Gefäße beschädigt sein oder fehlen, kontaktieren Sie den technischen Support von Altona Diagnostics (siehe Kapitel 15. Technischer Support).
- Alle Komponenten sind nach Erhalt bei Temperaturen zwischen -25 °C und -15 °C zu lagern.
- Ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Komponente Detection Mix sollte vermieden werden, da es die Leistung des Produkts beeinträchtigen kann.
- Das wiederholte Auftauen und Einfrieren der Positive Control (PC, Positivkontrolle) und der No Template Control (NTC, Negativkontrolle) (mehr als 4-mal) ist zu vermeiden, da dies die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.
- Die Komponenten sollten nicht länger als 2 Stunden bei Raumtemperatur (max. +30 °C) aufbewahrt werden.
- Schützen Sie die Komponente Detection Mix vor Lichteinwirkung.

VORSICHT



Unsachgemäße Lagerung kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

VORSICHT



Überschreiten Sie weder die Anzahl der in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen Auftau-/Einfrierzyklen noch die angegebene Handhabungsdauer, da dies die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.

VORSICHT



Verwenden Sie keine Produkte über ihr Verfallsdatum hinaus. Bei Verwendung abgelaufener Produkte kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigt sein.

5. Hintergrundinformationen

Norovirus

Die Gattung *Norovirus* (Norovirus) gehört zur Familie der *Caliciviridae* und war früher unter der Bezeichnung *Norwalk-like virus* („Norwalk-ähnliche Viren“) bekannt. Noroviren gehören zu den Einzelstrang-RNA-Viren und wurden 1972 durch Elektronenmikroskopie entdeckt. Charakteristisch für diese Viren ist ihr hoher Grad an genomischer Variabilität. Die Klassifikation der Noroviren umfasst zehn Genogruppen (GI bis GX), deren Unterscheidung auf der vergleichenden RNA-Sequenzanalyse der codierenden Genom-Regionen für RNA-Polymerase und das Capsidprotein basiert. Die Genogruppen I, II, und IV werden mit beim Menschen auftretenden Infektionen in Verbindung gebracht. Bisher besitzen die Genogruppen GI und GII die höchste klinische Relevanz. Sie werden weiter unterteilt in mindestens 9 bzw. 27 Genotypen.

Noroviren sind die Ursache für den Großteil aller nicht-bakteriellen akuten Erkrankungen an Gastroenteritis in Industrieländern. Die charakteristischen Symptome Erbrechen und Durchfall treten nach einer kurzen Inkubationszeit von 8 bis 72 Stunden auf. Noroviren sind ausgesprochen infektiös.

Norovirus-Infektionen können durch kontaminierte Nahrungsmittel und/oder kontaminiertes Wasser ausgelöst oder durch direkten Kontakt mit einer infizierten Person übertragen werden. Das Norovirus kann größere Ausbrüche in einem Umfeld auslösen, in dem viele Menschen in engen Kontakt miteinander geraten, etwa in Krankenhäusern, in Pflegeheimen und auf Kreuzfahrtschiffen [1,2,3].

Rotavirus

Rotaviren zählen zur Familie der *Reoviridae* und werden in die Spezies A–G unterteilt. Die Spezies A–C können Infektionen beim Menschen auslösen, wobei Spezies A (Taxonomie: *Rotavirus A*) die Gruppe darstellt, die > 90 % der Infektionen beim Menschen auslöst. Das segmentierte dsRNA-Genom besteht aus 11 Segmenten. Die Klassifizierung der Spezies erfolgt durch Vergleich der jeweiligen Sequenzen des Segments VP6. Das Rotavirus-Genom ist in allen Segmenten sehr heterogen. Die Spezies Rotavirus A ist in mehrere Genotypen unterteilt.

Rotaviren wurden als auslösender Erreger einer hohen Anzahl (> 500.000; WHO) an tödlich verlaufenden Durchfallerkrankungen bei Kindern unter 5 Jahren weltweit nachgewiesen, insbesondere in den Entwicklungsländern. Aber auch bei Kindern über 5 Jahren und Erwachsenen kann dieser Erreger schwere Krankheitsverläufe und sogar Todesfälle verursachen. Tödliche Verläufe sind meistens auf mangelnde medizinische Versorgung und schlechte hygienische Verhältnisse in Entwicklungsländern zurückzuführen. Zu Rotavirus-Ausbrüchen kommt es meist im Winter (CDC), mit einer Höchstzahl der Erkrankungen im März („Winterdurchfall“).

Typische Symptome sind Durchfall, Erbrechen, Fieber und Bauchkrämpfe. Die Inkubationszeit beträgt 1 bis 3 Tage, der weitere Krankheitsverlauf nimmt etwa 4 bis 7 Tage in Anspruch. Das Rotavirus wird durch Schmierinfektion oder über verunreinigtes Wasser oder verunreinigte Nahrungsmittel übertragen, wobei die Infektionsdosis gering ist (<100 Viruspartikel). Das Virus verfügt über eine hohe Tenazität, und die Viruslast kann bis zu 10^{10} Viruspartikel/g Stuhl betragen.

Mittel zur medizinischen Behandlung sind bislang nicht verfügbar, so dass sich die Folgen einer Erkrankung nur durch vorbeugende Behandlung abgemildert werden können [4,5].

HINWEIS



Aufgrund der relativ schnellen molekularen Evolution von RNA-Viren besteht bei RT-PCR-basierten Tests ein inhärentes Risiko, dass die Anhäufung von Mutationen im Laufe der Zeit zu falschnegativen Ergebnissen führt.

6. Produktbeschreibung

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 ist ein in-vitro-diagnostischer Test. Bei Verwendung in Kombination mit dem FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 ermöglicht er den qualitativen Nachweis und die Differenzierung von Norovirus-Genogruppe-I-(GI)-, Norovirus-Genogruppe-II-(GII)- und Rotavirus-spezifischer RNA in menschlichen Stuhlproben.

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 basiert auf der Real-Time-RT-PCR-Technologie und nutzt die Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT), um die RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuwandeln, die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation der spezifischen Zielsequenzen von Norovirus GI, Norovirus GII und Rotavirus sowie fluoreszenzmarkierte, zielsequenzspezifische Sonden für den Nachweis der vervielfältigten cDNA.

Zusätzlich zu den für Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-RNA spezifischen Amplifikations- und Nachweissystemen enthält der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 Oligonukleotide für die Amplifikation und den Nachweis der internen Kontrolle (IC, AltoStar® Internal Control 1.5). Die IC wird zu Beginn der Nukleinsäure-Aufreinigung auf dem AltoStar® Automation System AM16 (nachfolgend abgekürzt als AltoStar® AM16) automatisch hinzugefügt. Nähere Informationen finden Sie in der Gebrauchsanweisung der AltoStar® Internal Control 1.5.

Die für Norovirus-GI-RNA spezifischen Sonden sind mit dem Fluorophor Cy5 markiert, die für Norovirus-GII-RNA spezifischen Sonden mit dem Fluorophor ROX™ und die für Rotavirus-RNA spezifischen Sonden mit dem Fluorophor FAM™. Die für die IC spezifische Sonde ist mit dem Fluorophor JOE™ markiert.

Durch die Verwendung unterschiedlich markierter Sonden wird die gleichzeitige Detektion von Norovirus GI, Norovirus GII, Rotavirus sowie der IC in den entsprechenden Detektionskanälen des Real-Time-PCR-Geräts ermöglicht.

6.1 Komponenten

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 enthält ausreichende Mengen an Reagenzien, um 96 Reaktionen durchzuführen. Das Produkt besteht aus den nachstehenden Komponenten:

- Detection Mix¹⁾
- PC²⁾
- NTC³⁾

¹⁾ Enthält biologisches Material tierischen Ursprungs

²⁾ Positive Control (Positivkontrolle) (Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-spezifische RNA)

³⁾ No Template Control (Negativkontrolle)

Abgesehen von der DNA-Polymerase und der reversen Transkriptase, die Bestandteil des FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 sind, enthält die Komponente Detection Mix alle Reagenzien (PCR-Puffer, Magnesiumsalz, Primer und Sonden), die den Nachweis und die Differenzierung von Norovirus-GI- und Norovirus-GII- sowie den Nachweis von Rotavirus-spezifischer RNA und IC-spezifischer RNA ermöglichen.

Die PC enthält Norovirus-GI- und Norovirus-GII- sowie Rotavirus-spezifische RNA. Sie wird verwendet, um die Funktionalität der für Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-RNA spezifischen Amplifikations- und Nachweissysteme zu verifizieren.

Die NTC enthält weder Norovirus-GI- noch Norovirus-GII- noch Rotavirus-spezifische RNA, aber sie enthält das IC-Template. Die NTC wird als Negativkontrolle für die Norovirus-GI-, die Norovirus-GII- und die Rotavirus-RNA-spezifische Real-Time-PCR verwendet und zeigt eine mögliche Kontamination der Komponente Detection Mix an.

6.2 Real-Time-PCR-Geräte

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde für die Verwendung mit folgenden Real-Time-PCR-Geräten entwickelt und validiert:

- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)

HINWEIS



Stellen Sie sicher, dass alle verwendeten Geräte entsprechend der Herstellervorschriften aufgebaut, kalibriert, geprüft und gewartet sind.

6.3 Probenarten

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde für die Verwendung in Kombination mit der folgenden Probenart validiert:

- Menschlicher Stuhl

VORSICHT



Verwenden Sie keine anderen Probenarten! Die Verwendung anderer Probenarten kann die Leistungsfähigkeit des Produktes beeinträchtigen.

7. Benötigtes, nicht mitgeliefertes Zubehör

Folgende zusätzliche Geräte und Verbrauchsmaterialien werden für die Verwendung des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 benötigt, sind jedoch nicht im Lieferumfang des Produkts enthalten.

- Geeignetes Real-Time-PCR-Gerät (siehe Kapitel 6.2 Real-Time-PCR-Geräte)
- Geeignetes System oder Kit für die Nukleinsäure-Extraktion (siehe Kapitel 9.2 Probenvorbereitung)
- Labormixer (Vortex)
- Zentrifuge (z. B. Tischzentrifuge) zum Abzentrifugieren der Reagenzien des Kits
- Zentrifuge zum Abzentrifugieren der PCR-Platten
- Geeignete 96-Well-Reaktionsplatten oder Reaktionsgefäße mit passendem optisch klarem Verschlussmaterial
- Einstellbare Pipetten
- Einweg-Filterpipettenspitzen
- Puderfreie Einmalhandschuhe

Benötigte, aber nicht im FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 enthaltene Reagenzien:

- FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 (Bestellnr. FS0011515)
- AltoStar® Internal Control 1.5 (Bestellnr. IC15-46)

8. Warnungen, Vorsichtsmaßnahmen und Einschränkungen

- Überprüfen Sie das Produkt und seine Komponenten vor der ersten Verwendung auf Vollständigkeit in Bezug auf Anzahl, Typ und Abfüllvolumina. Benutzen Sie kein beschädigtes oder unvollständiges Produkt, da dies die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.
- Unsachgemäße Lagerung kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
- Überschreiten Sie weder die Anzahl der in dieser Gebrauchsanweisung angegebenen Auftau-/Einfrierzyklen noch die angegebene Handhabungsdauer, da dies die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.
- Verwenden Sie keine Produkte über ihr Verfallsdatum hinaus. Bei Verwendung abgelaufener Produkte kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigt sein.
- Verwenden Sie keine anderen Probenarten! Die Verwendung anderer Probenarten kann die Leistungsfähigkeit des Produktes beeinträchtigen.
- Die unsachgemäße Handhabung von Produktkomponenten und Proben kann zu Kontaminationen führen und die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen:
 - Vertauschen Sie nicht die Deckel von Reaktionsgefäßen und Flaschen.
 - Lagern Sie positives und/oder potentiell positives Material getrennt von den Kitkomponenten.
 - Nutzen Sie getrennte Arbeitsbereiche zur Probenvorbereitung, für den Reaktionsansatz und zur Amplifikation/Detektion.
 - Entsorgen Sie nach der Handhabung von positivem und/oder potentiell positivem Material grundsätzlich Ihre Handschuhe.
 - Öffnen Sie nach Abschluss der Amplifikation grundsätzlich keine PCR-Platten und/oder -Röhrchen.
- Vermischen Sie keine Komponenten aus verschiedenen FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 Lots. Dies kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
- Behandeln Sie Proben immer als infektiöse und (bio-)gefährdende Materialien gemäß den entsprechenden Anforderungen an sicheres Arbeiten im Labor. Verschüttetes Probenmaterial sollte sofort mithilfe eines geeigneten Desinfektionsmittels beseitigt werden. Behandeln Sie kontaminiertes Material als biogefährdend.

- Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren kann zu falschnegativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
- Die Entsorgung gefährlicher und biologischer Abfälle muss in Übereinstimmung mit den lokalen und nationalen Vorschriften erfolgen, um eine Kontamination der Umwelt zu vermeiden.
- Die Lagerung der Eluate unter falschen Bedingungen kann zum Abbau der Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und/oder Rotavirus-Zielsequenzen führen und die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
- Werden die Produktkomponenten nach dem Auftauen nicht oder nicht ausreichend zentrifugiert, kann es zu einer Kontamination der Komponenten mit Reagenzienrückständen am Deckel kommen, was die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.
- Überschreiten Sie nicht die maximale Aufbewahrungszeit für den PCR-Mix. Dies kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.
- Wie bei jedem diagnostischen Test sind die Ergebnisse unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde zu interpretieren.
- Sollten die Proben andere Erreger als Norovirus GI, Norovirus GII und/oder Rotavirus enthalten, kann es zu Kreuzreaktionen oder zu einer Konkurrenzreaktion zu Ungunsten der Amplifikation der Zielsequenz kommen, was zu fehlerhaften IVD-Ergebnissen führt.
- Möglicherweise auftretende Mutationen in den Zielregionen des Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und/oder Rotavirus-Genoms, die durch in diesem Kit verwendete Primer und/oder Sonden abgedeckt werden, können dazu führen, dass die Erreger nicht detektiert werden.

9. Verfahren

VORSICHT

Die unsachgemäße Handhabung von Produktkomponenten und Proben kann zu Kontaminationen führen und die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen:



- Vertauschen Sie nicht die Deckel von Reaktionsgefäßen und Flaschen.
- Lagern Sie positives und/oder potentiell positives Material getrennt von den Kitkomponenten.
- Nutzen Sie getrennte Arbeitsbereiche zur Probenvorbereitung, für den Reaktionsansatz und zur Amplifikation/Detektion.
- Entsorgen Sie nach der Handhabung von positivem und/oder potentiell positivem Material grundsätzlich Ihre Handschuhe.
- Öffnen Sie nach Abschluss der Amplifikation grundsätzlich keine PCR-Platten und/oder -Röhrchen.

VORSICHT



Vermischen Sie keine Komponenten aus verschiedenen FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 Lots. Dies kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

9.1 Probenentnahme, -handhabung und -lagerung

Stuhlsuspensionsproben sind vor ihrer Verwendung nicht länger als 48 Stunden bei Raumtemperatur (+20 °C bis +25 °C), 72 Stunden bei +2 °C bis +8 °C oder 7 Tage bei -25 °C bis -15 °C aufzubewahren.

VORSICHT



Behandeln Sie Proben immer als infektiöse und (bio-)gefährdende Materialien gemäß den entsprechenden Anforderungen an sicheres Arbeiten im Labor. Verschüttetes Probenmaterial sollte sofort mithilfe eines geeigneten Desinfektionsmittels beseitigt werden. Behandeln Sie kontaminiertes Material als biogefährdend.

HINWEIS



Die gefrorene Lagerung der Proben beeinträchtigt nicht die Produktleistung. Vergewissern Sie sich bei Verwendung von gefrorenen Proben als Ausgangsmaterial, dass diese vor Gebrauch vollständig aufgetaut und ausreichend durchmischt sind.

9.2 Probenvorbereitung

Extrahierte RNA dient als Ausgangsmaterial für den FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5. Die Qualität der extrahierten RNA hat eine tiefgreifende Auswirkung auf die Leistungsfähigkeit des Produkts.

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde mit menschlichen Stuhlproben unter Verwendung des AltoStar® AM16 in Kombination mit dem AltoStar® Purification Kit 1.5 validiert.

Die Eluate sind nach Beendigung der Nukleinsäure-Extraktion mit dem AltoStar® AM16 in der unversiegelten Eluatplatte bei Raumtemperatur (maximal +30 °C) bis zu 4 Stunden lang stabil.

Die Eluate in der versiegelten Eluatplatte können bei +2 °C bis +8 °C bis zu 24 Stunden lang aufbewahrt werden, bevor der Reaktionsansatz pipettiert wird. Weiterführende Informationen zur Versiegelung der Eluatplatten finden Sie in der Gebrauchsanweisung des AltoStar® Purification Kit 1.5.

Alternative Systeme und Kits zur Nukleinsäure-Extraktion können ebenso geeignet sein. Der Anwender muss das Nukleinsäure-Extraktionsverfahren auf Verwendbarkeit mit dem FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 prüfen und validieren.

VORSICHT



Verwenden Sie keine anderen Probenarten! Die Verwendung anderer Probenarten kann die Leistungsfähigkeit des Produktes beeinträchtigen.

VORSICHT



Behandeln Sie Proben immer als infektiöse und (bio-)gefährdende Materialien gemäß den entsprechenden Anforderungen an sicheres Arbeiten im Labor. Verschüttetes Probenmaterial sollte sofort mithilfe eines geeigneten Desinfektionsmittels beseitigt werden. Behandeln Sie kontaminiertes Material als biogefährdend.

VORSICHT



Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren kann zu falschnegativen oder ungültigen Ergebnissen führen.

VORSICHT



Die Entsorgung gefährlicher und biologischer Abfälle muss in Übereinstimmung mit den lokalen und nationalen Vorschriften erfolgen, um eine Kontamination der Umwelt zu vermeiden.

VORSICHT



Die Lagerung der Eluate unter falschen Bedingungen kann zum Abbau der Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und/oder Rotavirus-Zielsequenzen führen und die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

Wenden Sie sich für zusätzliche Informationen und technischen Support bezüglich der Vorbehandlung und Probenaufbereitung an den technischen Support von altona Diagnostics (siehe Kapitel 15. Technischer Support).

9.3 Master Mix Ansatz

Alle Reagenzien und Proben müssen vollständig aufgetaut, gemischt (durch Auf- und Abpipettieren oder leichtes Vortexen) und vor der Verwendung kurz zentrifugiert werden.

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 ist auf die Verwendung in Kombination mit dem FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 und der AltoStar® Internal Control 1.5 ausgelegt, die als Kontrolle während des Probenvorbereitungsverfahrens (Nukleinsäure-Extraktion) und der nachfolgenden RT-PCR dient.

- ▶ Die IC wird zu Beginn der Nukleinsäure-Aufreinigung auf dem AltoStar® AM16 automatisch hinzugefügt.
- ▶ Wenn zur Nukleinsäure-Extraktion andere Methoden angewandt werden, muss die IC während des Lyseschritts entweder manuell oder automatisch durch das jeweilige Gerät zugegeben werden.
- ▶ Unabhängig davon, welche Methode/welches System zur Nukleinsäure-Extraktion verwendet wird, darf die IC niemals direkt der Probe zugegeben werden. Die IC ist immer dem Probe/Lysepuffer-Gemisch zuzugeben. Das hinzuzufügende Volumen an IC hängt immer und ausschließlich von dem jeweiligen Elutionsvolumen ab. Es beträgt immer 50 % des Elutionsvolumens. Soll zum Beispiel die Nukleinsäure mit 60 µl Elutionspuffer oder Wasser eluiert werden, sind je Probe 30 µl der IC zu dem Probe/Lysepuffer-Gemisch zuzugeben.
- ▶ Setzen Sie den Master Mix entsprechend dem folgenden Pipettierschema an:

Tabelle 2: Pipettierschema (Master Mix Ansatz)

Anzahl der Reaktionen (rxns)	1	12
Detection Mix	5 µl	60 µl
Amplification Mix	15 µl	180 µl
Master Mix Volumen	20 µl	240 µl

VORSICHT



Werden die Produktkomponenten nach dem Auftauen nicht oder nicht ausreichend zentrifugiert, kann es zu einer Kontamination der Komponenten mit Reagenzienrückständen am Deckel kommen, was die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen kann.

9.4 Reaktionsansatz

- ▶ Pipettieren Sie 20 µl des Master Mix in jedes erforderliche Well einer geeigneten optisch klaren 96-Well-PCR-Platte oder ein geeignetes optisch klares Reaktionsgefäß.
- ▶ Fügen Sie jeweils 10 µl der Probe (Eluat aus der Nukleinsäure-Extraktion) oder 10 µl der entsprechenden Kontrollen (PC oder NTC) hinzu.

Tabelle 3: Pipettierschema (Reaktionsansatz)

Reaktionsansatz	
Master Mix	20 µl
Probe oder Kontrolle	10 µl
Gesamtvolumen	30 µl

- ▶ Achten Sie darauf, dass bei jedem Lauf mindestens 1 PC sowie 1 NTC verwendet werden.
- ▶ Mischen Sie die Proben und die Kontrollen gründlich mit dem Master Mix, indem Sie auf- und abpipettieren.
- ▶ Verschließen Sie die 96-Well-PCR-Platte mit einer passenden optisch klaren Folie und die Reaktionsgefäße mit passenden Deckeln.
- ▶ Zentrifugieren Sie die 96-Well-PCR-Platte in einer Zentrifuge mit entsprechendem Rotor und die Reaktionsgefäße in einer geeigneten Zentrifuge 30 Sekunden lang bei etwa 1.000 x g (~ 3.000 upm).
- ▶ Die NTC enthält bereits das IC-Template in der richtigen Konzentration.

Nach Abschluss des PCR-Mix-Setups bleibt der RT-PCR-Mix in einer versiegelten PCR-Platte bei Raumtemperatur (max. +30 °C) noch max. 30 Minuten stabil.

VORSICHT



Überschreiten Sie nicht die maximale Aufbewahrungszeit für den PCR-Mix. Dies kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

10. Programmierung des Real-Time-PCR-Gerätes

Grundlegende Informationen zur Einrichtung und Programmierung der unterschiedlichen Real-Time-PCR-Geräte finden Sie in der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Geräts.

Für detaillierte Anweisungen zur Programmierung bezüglich der Verwendung des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 in Verbindung mit verschiedenen Real-Time PCR-Geräten kontaktieren Sie den technischen Support von altona Diagnostics (siehe Kapitel 15. Technischer Support).

10.1 Einstellungen

- ▶ Geben Sie die folgenden Einstellungen ein:

Tabelle 4: Einstellungen für den Lauf

Einstellungen	
Reaktionsvolumen	30 µl
Heizrate	Standard
Passive Referenz	Keine

10.2 Fluoreszenz-Detektionskanäle (Farbstoffe)

- Definieren Sie die Fluoreszenz-Detektionskanäle (Farbstoffe):

Tabelle 5: Fluoreszenz-Detektionskanäle

Ziel	Detektorname	Reporter	Quencher
Norovirus-GI-spezifische RNA	Norovirus GI	Cy5	(Ohne)
Norovirus-GII-spezifische RNA	Norovirus GII	ROX™	(Ohne)
Rotavirus-spezifische RNA	Rotavirus	FAM™	(Ohne)
Interne Kontrolle	Internal Control	JOE™	(Ohne)

10.3 Temperaturprofil und Fluoreszenzmessung

- Definieren Sie das Temperaturprofil und die Fluoreszenzmessung:

Tabelle 6: Temperaturprofil und Fluoreszenzmessung

	Phase	Wiederholungen	Messung	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]
Reverse Transkription	Halten	1	-	52	05:00
Denaturierung	Halten	1	-	95	00:05
Amplifikation	Cycling	45	-	95	00:05
			Ja	58	00:25

11. Datenanalyse

Grundlegende Informationen zur Datenanalyse auf den einzelnen Real-Time-PCR-Geräten finden Sie in der Gebrauchsanweisung des jeweiligen Real-Time-PCR-Geräts.

Detaillierte Anweisungen zur Analyse der mit dem FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 an den einzelnen Real-Time-PCR-Geräten generierten Daten erhalten Sie auf Anfrage beim technischen Support von Altona Diagnostics (siehe Kapitel 15. Technischer Support).

11.1 Gültigkeit diagnostischer Testläufe

11.1.1 Gültiger diagnostischer Testlauf

Ein diagnostischer Testlauf ist **gültig**, wenn die folgenden Kontrollbedingungen erfüllt sind:

Tabelle 7: Kontrollbedingungen für einen gültigen Testlauf

ID der Kontrolle	Detektionskanal			
	Cy5	ROX™	FAM™	JOE™
Positivkontrolle (Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-spezifische RNA)	+	+	+	Nicht anwendbar
Negativkontrolle	-	-	-	+

11.1.2 Ungültiger diagnostischer Testlauf

Ein diagnostischer Testlauf ist **ungültig**, (i) wenn der Lauf nicht abgeschlossen wurde, oder (ii) falls die Kontrollbedingungen für einen **gültigen** diagnostischen Testlauf nicht erfüllt sind.

Führen Sie die Testung im Fall eines **ungültigen** PCR-Laufs mit den Resten der aufgereinigten Nukleinsäuren erneut durch oder beginnen Sie nochmals mit den Originalproben.

11.2 Interpretation der Ergebnisse

VORSICHT



Wie bei jedem diagnostischen Test sind die Ergebnisse unter Berücksichtigung aller klinischen Befunde und Laborbefunde zu interpretieren.

11.2.1 Qualitative Analyse

Tabelle 8: Ergebnisinterpretation

Detektionskanal				Ergebnisinterpretation
Cy5 (Norovirus GI)	ROX™ (Norovirus GII)	FAM™ (Rotavirus)	JOE™ (IC)	
+	+	-	+/-*	Norovirus-GI- und Norovirus-GII-spezifische RNA detektiert.
+	-	-	+/-*	Nur Norovirus-GI-spezifische RNA detektiert.
-	+	-	+/-*	Nur Norovirus-GII-spezifische RNA detektiert.
-	-	+	+/-*	Nur Rotavirus-spezifische RNA detektiert.
+	-	+	+/-*	Norovirus-GI- und Rotavirus-spezifische RNA detektiert.
-	+	+	+/-*	Norovirus-GII- und Rotavirus-spezifische RNA detektiert.
+	+	+	+/-*	Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-spezifische RNA detektiert.
-	-	-	+	Es wurde weder Norovirus-GI- noch Norovirus-GII- noch Rotavirus-spezifische RNA detektiert. Die Probe enthält keine nachweisbaren Mengen an Norovirus-GI-, Norovirus-GII- oder Rotavirus-spezifischer RNA.
-	-	-	-	RT-PCR Inhibition- oder Reagenzversagen. Wiederholen Sie den Testlauf mit der Originalprobe oder entnehmen und testen Sie eine neue Probe.

- * Die Detektion der IC im Detektionskanal JOE™ ist bei einem positiven Ergebnis im Detektionskanal Cy5 und/oder im Detektionskanal ROX™ und/oder im Detektionskanal FAM™ nicht notwendig. Eine hohe Konzentration an Norovirus-GI- und/oder Norovirus-GII- und/oder Rotavirus-RNA in der Probe kann zu reduzierten oder ausbleibenden Signalen der IC führen.

12. Leistungsbewertung

Die Leistung des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde unter Verwendung von handelsüblichem Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-Virus-Material bewertet.

12.1 Stuhl

12.1.1 Analytische Sensitivität

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze (limit of detection, LoD) für Norovirus GI und Norovirus GII wurde eine Verdünnungsreihe von handelsüblichem Virusmaterial in künstlichem Stuhl angesetzt. Zur Bestimmung der LoD für Rotavirus wurde eine Verdünnungsreihe von handelsüblichem Virusmaterial in Stuhlsuspension angesetzt.

Für jede Verdünnung wurden 8 Replikate in 3 separaten Läufen getestet (Gesamtanzahl n = 24 je Verdünnung), wofür Kombinationen aus folgenden Produkten eingesetzt wurden:

- 3 Lots FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5
- 3 Lots FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5
- 3 Lots AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 Lots AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 AltoStar® AM16 Geräte
- 3 CFX96™ DW Dx Geräte

Für jedes Virus wurden die Daten aus sämtlichen Läufen zusammengeführt und einer Probit-Analyse unterzogen, um den LoD-Wert von 95 % zu bestimmen.

Tabelle 9: PCR-Ergebnisse zur Berechnung der analytischen Sensitivität des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 für Norovirus GI in künstlicher Stuhlsuspension

Konzentration [Kopien/ml]	N [gesamt]	N [positiv]	Trefferquote [%]
1,00E+05	24	24	100
3,16E+04	24	24	100
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	21	88
1,00E+03	24	11	46
3,16E+02	24	0	0
1,00E+02	24	2	8
3,16E+01	24	0	0
1,00E+01	24	0	0

Die LoD des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 für den Nachweis von Norovirus GI in künstlicher Stuhlsuspension beträgt 5.939 Kopien/ml (95 % Vertrauensintervall: 3.673–12.942 Kopien/ml).

Tabelle 10: PCR-Ergebnisse zur Berechnung der analytischen Sensitivität des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 für Norovirus GII in künstlicher Stuhlsuspension

Konzentration [Kopien/ml]	N [gesamt]	N [positiv]	Trefferquote [%]
1,00E+05	24	24	100
3,16E+04	24	24	100
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	17	71
3,16E+02	24	6	25
1,00E+02	24	4	17
3,16E+01	24	4	17
1,00E+01	23*	1	4

* Eine Probe wurde nicht verarbeitet.

Die LoD des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 für den Nachweis von Norovirus GII in künstlicher Stuhlsuspension beträgt 5.228 Kopien/ml (95 % Vertrauensintervall: 2.790–13.337 Kopien/ml).

Tabelle 11: PCR-Ergebnisse zur Berechnung der analytischen Sensitivität des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 für Rotavirus in Stuhlsuspension

Konzentration [Kopien/ml]	N [gesamt]	N [positiv]	Trefferquote [%]
1,00E+05	24	24	100
3,16E+04	24	24	100
1,00E+04	24	23	96
3,16E+03	24	14	58
1,00E+03	24	3	13
3,16E+02	24	1	4
1,00E+02	24	0	0
3,16E+01	24	0	0

Die LoD des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 für den Nachweis von Rotavirus in Stuhlsuspension beträgt 11.133 Kopien/ml (95 % Vertrauensintervall: 7.126–23.522 Kopien/ml).

12.1.2 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 ist durch die sorgfältige Auswahl der Oligonukleotide (Primer und Sonden) gesichert. Die Oligonukleotide wurden mittels Sequenzabgleich gegen die veröffentlichten Sequenzen überprüft, um sicherzustellen, dass alle relevanten Norovirus- und Rotavirus-Genotypen detektiert werden.

Zur Überprüfung der analytischen Spezifität des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 wurden die folgenden Experimente durchgeführt (siehe Kapitel 12.1.2.1 Negativproben bis 12.1.2.3 Kreuzreaktionen).

12.1.2.1 Negativproben

32 Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-negative Stuhlproben von Einzelspendern wurden mit dem FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 getestet. Alle (32 von 32) Proben wurden negativ für Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-spezifische RNA und positiv für die IC getestet. Die analytische Spezifität des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 für Stuhlproben beträgt $\geq 95\%$.

12.1.2.2 Störende Substanzen

Zur Bewertung des Einflusses potentiell störender endogener und exogener Substanzen auf die Leistung des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 wurden ausgewählte Substanzen in künstlicher Stuhlsuspension mit Norovirus GI, Norovirus GII und Rotavirus in einer Konzentration von $3 \times \text{LoD}$ (17.817 Kopien/ml, 15.684 Kopien/ml bzw. 33.399 Kopien/ml) sowie in künstlicher Stuhlsuspension ohne Norovirus GI, Norovirus GII und Rotavirus angereichert.

Die Ergebnisse für Proben mit potentiell störenden Substanzen wurden mit den Ergebnissen für künstliche Stuhlsuspension verglichen, die nicht mit einer störenden Substanz angereichert war. Jede Probe wurde in 3 Replikaten verarbeitet.

Keine Beeinträchtigungen wurden bei Proben mit erhöhten Konzentrationen folgender Substanzen festgestellt:

- Endogene Substanzen
 - Cholesterol
 - Menschliche genomische DNA
 - Humanes Vollblut
 - Mucin
 - Triglyceride

- Exogene Substanzen
 - Benzalkoniumchlorid
 - Ethanol
 - Hydrocortison
 - Mesalazin
 - Natrium-Naproxen
 - Nystatin

VORSICHT



Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren kann zu falschnegativen oder ungültigen Ergebnissen führen.

12.1.2.3 Kreuzreaktionen

Die analytische Spezifität des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 in Bezug auf Kreuzreaktionen mit anderen Erregern als Norovirus GI, Norovirus GII und Rotavirus wurde durch Tests mit folgenden Erregern ermittelt:

- Mit Norovirus GI, Norovirus GII und/oder Rotavirus verwandte Erreger
- Erreger, die vergleichbare Symptome hervorrufen wie eine Infektion mit Norovirus GI, Norovirus GII oder Rotavirus
- Erreger, deren Vorhandensein im Organismus von Patienten mit einer Norovirus-GI-, Norovirus-GII- oder Rotavirus-Infektion wahrscheinlich ist

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 zeigte keine Kreuzreaktionen mit den folgenden Erregern:

- Astrovirus
- *Campylobacter coli*
- *Campylobacter jejuni*
- *Clostridium difficile*
- Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)
- *Escherichia coli*
- *Salmonella enterica*
- Sapovirus
- *Vibrio cholerae*

Zusätzlich wurden Norovirus GI, Norovirus GII und Rotavirus getestet. Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 verursachte keine falschpositiven Signale: weder im Norovirus-GI-spezifischen Detektionskanal (Cy5) beim Test auf Norovirus GII und Rotavirus noch im Norovirus-GII-spezifischen Detektionskanal (ROX™) beim Test auf Norovirus GI und Rotavirus noch im Rotavirus-spezifischen Detektionskanal (FAM™) beim Test auf Norovirus GI und Norovirus GII.

VORSICHT



Sollten die Proben andere Erreger als Norovirus GI, Norovirus GII und/oder Rotavirus enthalten, kann es zu Kreuzreaktionen oder zu einer Konkurrenzreaktion zu Ungunsten der Amplifikation der Zielsequenz kommen, was zu fehlerhaften IVD-Ergebnissen führt.

12.1.3 Präzision

Die Präzision des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde anhand eines Panels folgender Proben ermittelt:

- 1 hochpositive [50 x LoD (2,97E+05 Kopien/ml)] Norovirus-GI-Probe in künstlicher Stuhlsuspension
- 1 hochpositive [50 x LoD (2,61E+05 Kopien/ml)] Norovirus-GII-Probe in künstlicher Stuhlsuspension

- 1 hochpositive [50 x LoD (5,57E+05 Kopien/ml)] Rotavirus-Probe in künstlicher Stuhlsuspension
- 1 schwach positive [3 x LoD (1,78E+04 Kopien/ml)] Norovirus-GI-Probe in künstlicher Stuhlsuspension
- 1 schwach positive [3 x LoD (1,57E+04 Kopien/ml)] Norovirus-GII-Probe in künstlicher Stuhlsuspension
- 1 schwach positive [3 x LoD (3,34E+04 Kopien/ml)] Rotavirus-Probe in künstlicher Stuhlsuspension
- 1 Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-negative Probe in künstlicher Stuhlsuspension

Jede Probe des Panels wurde in mindestens 6 Replikaten pro Lauf getestet.

Es wurden 5 Läufe an 5 verschiedenen Tagen mit Kombinationen folgender Produkte durchgeführt:

- 3 Lots FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5
- 3 Lots FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5
- 3 Lots AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 Lots AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 AltoStar® AM16 Geräte
- 3 CFX96™ DW Dx Geräte

Wiederholbarkeit (laufinterne Variabilität), Variabilität zwischen Lots und Reproduzierbarkeit (Gesamtvariabilität) wurden auf der Grundlage folgender Werte ermittelt:

- Werte des Schwellenwertzyklus (C_q^*) für die hochpositiven Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-Proben (siehe Tabellen 12–14)
- Werte des Schwellenwertzyklus (C_q^*) für die IC in den Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-negativen Proben (siehe Tabelle 15)

* Beachten Sie, dass der gewählte Term C_q mit der Bezeichnung C_t äquivalent ist, die unter Umständen in anderen Cyclern als dem CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad) verwendet wird.

Tabelle 12: Präzisionsdaten (CV % basierend auf C_q -Werten) für Norovirus-GI-hochpositive Proben in künstlicher Stuhlsuspension

	Hochpositive Norovirus-GI-Probe (CV % basierend auf C_q -Werten)
Laufinterne Variabilität	0,26–0,78
Variabilität zwischen Lots	0,97
Gesamtvariabilität	0,81

Alle bei 3 x LoD getesteten Proben (schwach positive Proben) wurden positiv für Norovirus GI getestet.

Tabelle 13: Präzisionsdaten (CV % basierend auf C_q -Werten) für Norovirus-GII-hochpositive Proben in künstlicher Stuhlsuspension

	Hochpositive Norovirus-GII-Probe (CV % basierend auf C_q -Werten)
Laufinterne Variabilität	0,28–0,80
Variabilität zwischen Lots	2,26
Gesamtvariabilität	1,85

Alle bei 3 x LoD getesteten Proben (schwach positive Proben) wurden positiv für Norovirus GII getestet.

Tabelle 14: Präzisionsdaten (CV % basierend auf C_q -Werten) für Rotavirus-hochpositive Proben in künstlicher Stuhlsuspension

	Hochpositive Rotavirus-Probe (CV % basierend auf C_q -Werten)
Laufinterne Variabilität	0,43–0,64
Variabilität zwischen Lots	0,66
Gesamtvariabilität	1,61

Alle bei 3 x LoD getesteten Proben (schwach positive Proben) wurden positiv für Rotavirus getestet.

Tabelle 15: Präzisionsdaten (CV % basierend auf C_q -Werten) für die IC in Norovirus-GI-, Norovirus-GII- und Rotavirus-negativen Proben in künstlicher Stuhlsuspension

	IC
Laufinterne Variabilität	0,81–1,28
Variabilität zwischen Lots	1,48
Gesamtvariabilität	2,10

12.1.4 Gesamtausfallrate

Die Robustheit des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde durch das Testen von 33 Norovirus-GI- und Norovirus-GII- sowie 32 Rotavirus-negativen menschlichen Stuhlproben von Einzelspendern, angereichert mit Norovirus GI, Norovirus GII und Rotavirus bis zu einer Endkonzentration von 3 x LoD (1,78E+04 Kopien/ml, 1,57E+04 Kopien/ml bzw. 3,34E+04 Kopien/ml) bewertet. Alle (33 von 33 bzw. 32 von 32) Proben wurden im Norovirus-GI- und im Norovirus-GII-spezifischen Fluoreszenz-Detektionskanal (Cy5 bzw. ROX™) und im Rotavirus-spezifischen Fluoreszenz-Detektionskanal (FAM™) positiv getestet.

12.1.5 Verschleppung

Verschleppung ist in erster Linie ein Workflow-abhängiges Risiko und unabhängig vom verwendeten PCR-Assay. Für den AltoStar® Workflow wurde das AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5 als exemplarisches Modell eingesetzt. Eine mögliche Kreuzkontamination durch Verschleppung von hochpositiven Proben wurde evaluiert, indem abwechselnd hochpositive (1,00E+07 IU/ml) und negative Parvovirus-B19-Proben (n = 44 pro Lauf; 2 Läufe) mit dem AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5 getestet wurden. Es konnte keine Verschleppung beobachtet werden, d. h. alle Negativkontrollen für Parvovirus B19 wurden negativ getestet.

12.1.6 Klinische Leistungsdaten

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde in einer Studie mit dem CE-gekennzeichneten Allplex™ GI-Virus Assay (Seegene) verglichen. Nachträglich wurden 99 Einzelproben menschlichen Stuhls parallel getestet:

Der Allplex™ GI-Virus Assay (Seegene) wurde in Kombination mit dem STARMag 96 X 4 (Seegene) und dem NIMBUS (Seegene) verwendet.

Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde in Kombination mit dem FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5, dem AltoStar® Purification Kit 1.5 und der AltoStar® Internal Control 1.5 auf dem AltoStar® AM16 und dem CFX96™ DW Dx eingesetzt.

Für die qualitative Analyse wurden alle Proben mit einem ungültigen Ergebnis bei mindestens einem der beiden Assays ausgeschlossen.

Die Ergebnisse für die verbleibenden Proben (94 für Norovirus GI und Norovirus GII sowie 96 für Rotavirus) sind in den Tabellen 16 bzw. 17 aufgeführt.

Tabelle 16: Testergebnisse zur Bewertung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität für Norovirus GI und Norovirus GII in Stuhlproben

		Allplex™ GI-Virus Assay (Seegene)	
		POSITIV	NEGATIV
FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5	POSITIV	38	0
	NEGATIV	0	56

Die diagnostische Sensitivität und Spezifität des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 betragen verglichen mit dem Allplex™ GI-Virus Assay (Seegene) für Norovirus GI und Norovirus GII jeweils 100 % (Vertrauensintervalle 90,26 % bis 100 % bzw. 93,62 % bis 100 %).

Tabelle 17: Testergebnisse zur Bewertung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität für Rotavirus in Stuhlproben

		Allplex™ GI-Virus Assay (Seegene)	
		POSITIV	NEGATIV
FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5	POSITIV	22	0
	NEGATIV	0	74

Die diagnostische Sensitivität und Spezifität des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 betragen verglichen mit dem Allplex™ GI-Virus Assay (Seegene) für Rotavirus jeweils 100 % (Vertrauensintervalle 84,56 % bis 100 % bzw. 95,14 % bis 100 %).

13. Entsorgung

Entsorgen Sie gefährliche und biologische Abfälle in Übereinstimmung mit den lokalen und nationalen Vorschriften. Überschüssige Produktkomponenten und Abfälle dürfen nicht ins Abwasser, in Wasserläufe oder ins Erdreich gelangen.

VORSICHT



Behandeln Sie Proben immer als infektiöse und (bio-)gefährdende Materialien gemäß den entsprechenden Anforderungen an sicheres Arbeiten im Labor. Verschüttetes Probenmaterial sollte sofort mithilfe eines geeigneten Desinfektionsmittels beseitigt werden. Behandeln Sie kontaminiertes Material als biogefährdend.

VORSICHT



Die Entsorgung gefährlicher und biologischer Abfälle muss in Übereinstimmung mit den lokalen und nationalen Vorschriften erfolgen, um eine Kontamination der Umwelt zu vermeiden.

14. Qualitätskontrolle

In Übereinstimmung mit dem nach EN ISO 13485 zertifizierten Qualitätsmanagementsystem der Altona Diagnostics GmbH wird jedes Lot des FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 auf eine Reihe festgelegter Spezifikationen hin getestet, um eine gleichbleibende Produktqualität zu gewährleisten.

15. Technischer Support

Zur Inanspruchnahme von Kundenbetreuung kontaktieren Sie den technischen Support von altona Diagnostics:

E-Mail: support@altona-diagnostics.com

Telefon: +49-(0)40-5480676-0

HINWEIS



Alle gravierenden Zwischenfälle im Zusammenhang mit dem Produkt müssen altona Diagnostics und den zuständigen Behörden Ihres Landes gemeldet werden.

16. Literatur

- [1] Chhabra P, de Graaf M, Parra GI, Chan MC, Green K, Martella V, Wang Q, White PA, Katayama K, Vennema H, Koopmans MPG, Vinjé J. Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *Journal of General Virology*. Okt. 2019; Band 100(10):1393–1406. doi: 10.1099/jgv.0.001318. PMID: 31483239.
- [2] Ahmed SM, Hall AJ, Robinson AE, Verhoef L, Premkumar P, Parashar UD, Koopmans M, Lopman BA. Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. Jun. 2014; Band 14, Ausgabe 8, 725–730. doi: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70767-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4).
- [3] Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus. *Journal of Clinical Microbiology*. Jan. 2015; Band 53:373–381. doi: 10.1128/JCM.01535-14. PMID: 24989606.
- [4] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (Hrsg.). *Manual of Clinical Microbiology*. 10. Ausgabe. ASM Press, 2011.
- [5] Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. *Infectious Diseases*. 3. Ausgabe. Mosby, 2010.

17. Handelsmarken und Haftungsausschlüsse

AltoStar®, FlexStar® (altona Diagnostics); QuantStudio™ (Applied Biosystems); CFX96™ (Bio-Rad); JOE™ (Life Technologies); Rotor-Gene® (QIAGEN); Allplex™ (Seegene); FAM™, ROX™ (Thermo Fisher Scientific).

Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, sind, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, nicht als gesetzlich ungeschützt anzusehen.
















Der FlexStar® Norovirus Type & Rotavirus RT-PCR Detection Mix 1.5 ist ein gemäß der In-vitro-Diagnostikrichtlinie 98/79/EG des Europäischen Parlamentes und des Rates CE-geprüftes Produkt.




Das Produkt ist weder bei Health Canada noch bei der FDA registriert oder zugelassen.

Nicht in allen Ländern verfügbar.

© 2022 altona Diagnostics GmbH; alle Rechte vorbehalten.

18. Erläuterung der Symbole

Symbol	Erklärung
	In-vitro-Diagnostikum
	Global Trade Item Number
	Chargennummer
	Inhalt
	Deckelfarbe
	Produktnummer
	Nummer
	Komponente
	Gebrauchsanweisung beachten
	Enthält ausreichend Reagenzien für „n“ Tests/ Reaktionen (rxns)
	Lagertemperatur
	Verwendbar bis
	Hersteller
	Vorsicht
	Materialnummer

Symbol	Erklärung
	Version
	Hinweis
	Enthält biologisches Material tierischen Ursprungs

19. Änderungshistorie

Tabelle 18: Änderungshistorie

Kennung	Datum der Ausgabe [Monat/Jahr]	Änderungen
MAN-FS0071540-DE-S01	05/2022	Erste Veröffentlichung

Seite absichtlich frei gelassen

Seite absichtlich frei gelassen

Seite absichtlich frei gelassen

altona Diagnostics GmbH
Mörkenstr. 12
22767 Hamburg, Germany

phone +49 40 548 0676 0
fax +49 40 548 0676 10
e-mail info@altona-diagnostics.com

www.altona-diagnostics.com

