

Instrukcja użytkowania

FlexStar[®]

**SARS-CoV-2 Type & FLU
RT-PCR Detection Mix 1.5**

02/2022 PL

Respiratory

FlexStar®

SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5

Do stosowania z

LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)



FS0021515



384



02 2022



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

Spis treści

1.	Informacje na temat instrukcji użytkowania.....	6
2.	Przeznaczenie zestawu.....	6
3.	Zawartość wyrobu.....	7
4.	Przechowywanie	8
5.	Podstawowe informacje	9
6.	Opis wyrobu	10
6.1	Składniki	11
6.2	Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym.....	12
6.3	Rodzaje materiału do badań.....	12
7.	Materiały wymagane, ale nie dołączone	13
8.	Ostrzeżenia, środki ostrożności i ograniczenia	14
9.	Procedura	16
9.1	Pobieranie, obchodzenie się z i przechowywanie próbek	16
9.2	Przygotowanie próbki	17
9.3	Przygotowanie mieszaniny master mix	19
9.4	Konfiguracja reakcji	20
10.	Programowanie urządzeń PCR w czasie rzeczywistym	21
10.1	Ustawienia	22
10.2	Detektory fluorescencji (barwniki).....	22
10.3	Profil temperatury i badania barwnika	23
11.	Analiza danych	23
11.1	Prawidłowość badań diagnostycznych.....	24
11.1.1	Prawidłowe badanie diagnostyczne	24

11.1.2	Nieprawidłowe badanie diagnostyczne	24
11.2	Manualna analiza	24
11.2.1	Analiza jakościowa	25
12.	Charakterystyka działania testu	26
12.1	Wymazy z dróg oddechowych.....	26
12.1.1	Czułość analityczna.....	26
12.1.2	Swoistość analityczna	30
12.1.2.1	Próbki negatywne.....	31
12.1.2.2	Substancje zakłócające.....	31
12.1.2.3	Reaktywność krzyżowa	32
12.1.3	Inkluzywność	33
12.1.4	Precyzja.....	36
12.1.5	Całkowity odsetek nieudanych	38
12.1.6	Efekt przeniesienia	39
12.1.7	Parametry kliniczne	39
13.	Utylizacja.....	42
14.	Kontrola jakości	42
15.	Pomoc techniczna.....	43
16.	Literatura	43
17.	Znaki towarowe i zastrzeżenia	44
18.	Wyjaśnienie symboli.....	45
19.	Historia zmian.....	47

1. Informacje na temat instrukcji użytkowania

W niniejszej instrukcji, terminy OSTROŻNIE i UWAGA mają następujące znaczenie:

OSTROŻNIE



Wyróżnia instrukcje lub procedury operacyjne, których nieprzestrzeganie może stać się przyczyną obrażeń ciała lub może negatywnie wpływać na działanie wyrobu. Skontaktuj się z działem pomocy technicznej Altona Diagnostics, aby uzyskać pomoc.

UWAGA



Przydatne informacje dla użytkownika, które nie są kluczowe dla wykonywanego zadania.

Należy uważnie zapoznać się z treścią instrukcji użytkowania przed użyciem wyrobu.

2. Przeznaczenie zestawu

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 to test diagnostyczny *in vitro* oparty na technologii PCR w czasie rzeczywistym, służący do oznaczania jakościowego i rozróżniania RNA właściwego dla ciężkiego ostrego zespółu oddechowego koronawirusa 2 (SARS-CoV-2) i wirusa grypy w wymazach z dróg oddechowych. Detekcja wirusa SARS-CoV-2 jest oparta na równoległej detekcji genu E linii B-beta-koronawirusa (włącznie z SARS-CoV-2) oraz genu S SARS-CoV-2.

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 jest przeznaczony do stosowania jako pomoc w diagnozie SARS-CoV-2 oraz zakażeń wirusa grypy.

Wyniki wygenerowane przez zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 muszą być interpretowane w połączeniu z innymi danymi klinicznymi i laboratoryjnymi.

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 jest przeznaczony do użycia przez osoby wykwalifikowane, przeszkolone w technikach biologii molekularnej oraz procedurach diagnostyki *in vitro*.

3. Zawartość wyrobu

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 obejmuje następujące składniki:

Tabela 1: Składniki zestawu

Kolor zakrętki	Składnik	Liczba próbek	Objętość nominalna [μl/probówkę]
Niebieski	Detection Mix ¹⁾	8	240
Czerwony	PC ²⁾	2	250
Biały	NTC ³⁾	2	250

¹⁾ Zawiera materiał biologiczny pochodzenia zwierzęcego

²⁾ Kontrola pozytywna [RNA właściwe dla linii B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) i wirusa grypy]

³⁾ No Template Control (kontrola negatywna)

OSTROŻNIE



Przed pierwszym użyciem sprawdź kompletność zestawu i jego składników, jak również numer, typ i stopień napełnienia. Nie używaj wadliwego lub niekompletnego wyrobu, ponieważ może to negatywnie wpływać na jego działanie.

4. Przechowywanie

- Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 jest transportowany w suchym lodzie. Wyrób winien być dostarczony w stanie zamrożonym. W przypadku, gdy jeden lub więcej składników zestawu nie jest zamrożony podczas dostawy lub jeśli próbówki zostały uszkodzone podczas transportu, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej Altona Diagnostics (patrz rozdział 15. Pomoc techniczna).
- Po odbiorze wszystkie składniki należy przechowywać w temperaturze od -25 °C do -15 °C.
- Należy unikać wielokrotnego cyklu rozmrażania i zamrażania mieszaniny Detection Mix, ponieważ może to negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Należy unikać wielokrotnego cyklu rozmrażania i zamrażania kontroli pozytywnej (PC) i kontroli negatywnej (NTC) (więcej niż czterokrotnie), ponieważ może to negatywnie wpływać to na działanie wyrobu.
- Czas przechowywania w temperaturze pokojowej (maks. +30 °C) nie powinien przekraczać 2 godzin.
- Mieszaninę Detection Mix należy chronić przed światłem.

OSTROŻNIE



Nieprawidłowe warunki przechowywania mogą negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

OSTROŻNIE



Nie należy przekraczać liczby cykli rozmrażania/zamrażania oraz czasów przetwarzania podanych w niniejszej instrukcji użytkownika, ponieważ mogą one negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

OSTROŻNIE



Nie używaj wyrobów po terminie ważności. Użycie elementów zestawu po terminie ważności może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

5. Podstawowe informacje

SARS-CoV-2

Koronawirus 2 powodujący ciężki ostry zespół oddechowy (SARS-CoV-2) to jednoniciowy wirus RNA o dodatniej polarności należący do rodziny *Coronaviridae*, rodzaju beta-koronawirus, podrodzaj linia B.

SARS-CoV-2 pojawił się w regionie Wuhan w Chinach w grudniu 2019 roku i rozprzestrzenił się na skalę globalną w ciągu 2 miesięcy. Początkowo nazywany nowym koronawirusem 2019-nCoV, 11 lutego 2020 roku Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów zmienił jego nazwę na SARS-CoV-2. Równocześnie, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) nadała chorobie powodowanej przez wirusa SARS-CoV-2 nazwę COVID-19. Ze względu na gwałtowną eskalację i propagację COVID-19 na całym świecie, 12 marca 2020 roku, WHO sklasyfikowała tę epidemię jako pandemię.

SARS-CoV-2 jest wysoce zakaźny i przenoszony drogą kropelkową, powodując ostre zakażenie górnych dróg oddechowych z objawami zbliżonymi do grypy. Głównie, ale nie tylko, u osób starszych i osób z uprzednio istniejącymi chorobami, zakażenie SARS-CoV-2 może prowadzić do poważnej i zagrażającej życiu choroby. Zanotowano przypadki zakażeń bezobjawowych, o lekkim przebiegu, poważnych chorób i śmierci [1,2].

Wirus grypy

Grypa to choroba zakaźna powodowana przez wirusy RNA z rodziny *Orthomyxoviridae* (wirusy grypy) [3,4]. Wirusy grypy charakteryzują się ciągłymi zmianami głównych antygenów powierzchniowych: hemaglutyniny (H) i neuraminidazy (N) (dryft antygenowy) [5]. Wirus może powodować zakażenia u ptaków i ssaków drogą kropelkową [6]. Ludzkie wirusy grypy typu A i B powodują ciężkie zakażenia głównie górnych dróg oddechowych, które najczęściej objawiają się gorączką i kaszlem. W poważniejszych przypadkach, wirus grypy może powodować zapalenie płuc, które może być śmiertelne w szczególności u dzieci i osób starszych [7].

UWAGA



Względnie szybka ewolucja molekularna wirusów RNA wiąże się z ryzykiem akumulacji mutacji w czasie, co może prowadzić do fałszywie negatywnych wyników dla jakiegokolwiek systemu testowania opartego na technologii RT-PCR.

6. Opis wyrobu

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 to test do diagnostyki *in vitro*. Stosowany w połączeniu z mieszaniną FlexStar® (RT-) PCR Amplification Mix 1.5 umożliwia oznaczenie jakościowe i rozróżnienie RNA właściwego dla linii B-beta-koronawirusów (linia B-βCoV, gen E), SARS-CoV-2 (gen S) i wirusa grypy (typu A+B) w wymazach z górnych dróg oddechowych.

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 jest oparty na technologii RT-PCR w czasie rzeczywistym, wykorzystuje reakcję odwróconej transkrypcji (RT) w celu konwersji RNA do komplementarnego DNA (cDNA), reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) w celu amplifikacji sekwencji docelowych właściwych dla linii B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) i wirusa grypy (A+B) oraz oznakowane barwnikiem fluorescencyjnym sondy właściwe dla sekwencji docelowej, umożliwiające detekcję amplifikowanego cDNA.

Poza systemem detekcji i amplifikacji RNA właściwego dla linii B-βCoV, SARS-CoV-2 i wirusa grypy, zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 zawiera również oligonukleotydy umożliwiające amplifikację i detekcję kontroli wewnętrznej (IC, AltoStar® Internal Control 1.5). Kontrola wewnętrzna (IC) jest automatycznie dodawana na początku procedury oczyszczania kwasów nukleinowych przy użyciu systemu AltoStar® Automation System AM16 (zwanego w dalszej części instrukcji systemem AltoStar® AM16). Szczegółowe informacje znajdują się w instrukcji użytkownika AltoStar® Internal Control 1.5.

Sondy właściwe dla linii B-βCoV (gen E) RNA są oznakowane fluoroforem ROX™, sondy właściwe dla SARS-CoV-2 (gen S) RNA są oznakowane fluoroforem Cy5, natomiast sondy właściwe dla wirusa grypy (A+B) RNA są oznakowane fluoroforem FAM™. Sonda właściwa dla IC jest oznakowana fluoroforem JOE™.

Użycie sond powiązanych z różniącymi się od siebie barwnikami umożliwia równoległe wykrywanie linii B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S), wirusów grypy (A+B) oraz IC w odpowiednich kanałach detekcji urządzenia PCR w czasie rzeczywistym.

6.1 Składniki

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 zawiera wystarczającą liczbę odczynników na wykonanie 384 reakcji. Wyrób obejmuje następujące składniki:

- Detection Mix¹⁾
- PC²⁾
- NTC³⁾

¹⁾ Zawiera materiał biologiczny pochodzenia zwierzęcego

²⁾ Kontrola pozytywna [RNA właściwe dla linii B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) i wirusa grypy]

³⁾ No Template Control (kontrola negatywna)

Za wyjątkiem polimerazy DNA i odwrotnej transkryptazy, które stanowią część mieszaniny FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5, składniki mieszaniny Detection Mix zawierają wszystkie odczynniki (bufor PCR, sól magnezu, startery i sondy) umożliwiające detekcję i oznaczanie linii B-βCoV (gen E) i SARS-CoV-2 (gen S) oraz detekcję RNA właściwego dla wirusa grypy (A+B), jak również RNA właściwego dla IC.

PC zawiera RNA właściwe dla linii B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) oraz wirusa grypy. Służy do weryfikacji funkcjonalności systemów amplifikacji i detekcji wirusów linii B-βCoV, SARS-CoV-2 i grypy.

NTC nie zawiera RNA właściwego dla linii B-βCoV, SARS-CoV-2 ani wirusa grypy (typu A+B), zawiera natomiast matrycę IC. NTC jest stosowany jako kontrola negatywna podczas badania PCR w czasie rzeczywistym dla linii B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) i wirusa grypy (A+B) oraz wskazuje ewentualne skażenie składników mieszaniny Detection Mix.

6.2 Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 został opracowany i zwalidowany do stosowania z następującymi urządzeniami PCR w czasie rzeczywistym:

- LightCycler® 480 Instrument II (Roche)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Dx System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad)

UWAGA



Należy upewnić się, że wszystkie użyte urządzenia zostały zainstalowane, skalibrowane, sprawdzone i są konserwowane zgodnie z instrukcjami i zaleceniami producenta.

6.3 Rodzaje materiału do badań

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 został zwalidowany do stosowania z następującymi typami próbek:

- Wymazy z górnych dróg oddechowych

OSTROŻNIE



Nie używać innych rodzajów materiału do badań! Użycie innych rodzajów materiału do badań może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

7. Materiały wymagane, ale nie dołączone

Następujące dodatkowe urządzenia i materiały zużywalne są wymagane do pracy z zestawem FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, ale nie są dołączane:

- Odpowiednie urządzenie do PCR w czasie rzeczywistym (patrz rozdział 6.2 Urządzenia PCR w czasie rzeczywistym)
- Odpowiedni system lub zestaw do izolacji kwasu nukleinowego (patrz rozdział 9.2 Przygotowanie próbki)
- Wytrząsarka
- Wirówka (np. wirówka stołowa) do odwirowania odczynników wchodzących w skład zestawu
- Wirówka do odwirowania płytek do PCR
- Odpowiednie płytki reakcyjne z 96 studzienkami lub probówki reakcyjne z odpowiednim zamknięciem (optycznym)
- Pipety (regulowane)
- Końcówki z filtrami do pipet do jednorazowego użytku
- Rękawiczki bezpudrowe do jednorazowego użytku

Odczynniki wymagane, ale niedołączane do zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5:

- FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 (numer katalogowy FS0011515)
- AltoStar® Internal Control 1.5 (numer katalogowy IC15-16/IC15-46)

8. Ostrzeżenia, środki ostrożności i ograniczenia

- Przed pierwszym użyciem sprawdź kompletność zestawu i jego składników, jak również numer, typ i stopień napełnienia. Nie używaj wadliwego lub niekompletnego wyrobu, ponieważ może to negatywnie wpływać na jego działanie.
- Nieprawidłowe warunki przechowywania mogą negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Nie należy przekraczać liczby cykli rozmrażania/zamrażania oraz czasów przetwarzania podanych w niniejszej instrukcji użytkowania, ponieważ mogą one negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Nie używaj wyrobów po terminie ważności. Użycie elementów zestawu po terminie ważności może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Nie używać innych rodzajów materiału do badań! Użycie innych rodzajów materiału do badań może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Nieprawidłowe stosowanie składników zestawu i próbek może stać się przyczyną kontaminacji i negatywnie wpływać na działanie wyrobu:
 - Nie zamieniać ze sobą zakrętek do fiolek lub butelek.
 - Materiał, dla którego stwierdzono wynik pozytywny lub potencjalnie pozytywny należy przechowywać osobno od składników zestawu.
 - Należy korzystać z oddzielnych obszarów roboczych do przygotowania próbki/konfiguracji reakcji oraz amplifikacji/detekcji.
 - Należy zawsze używać rękawiczki po kontakcie z materiałem pozytywnym lub potencjalnie pozytywnym.
 - Nie otwierać płytek do PCR i/lub probówek po amplifikacji.
- Nie mieszać składników z różnych numerów partii zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, ponieważ może to negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Probki należy zawsze traktować jako materiał zakaźny i stanowiący zagrożenie biologiczne, zgodnie z procedurami bezpieczeństwa i praktykami obowiązującymi w danym laboratorium. W przypadku rozlania materiału próbki, natychmiast użyć odpowiedniego środka dezynfekującego. Skażone materiały należy traktować jako zagrożenie biologiczne.
- Obecność inhibitorów PCR może powodować nieprawidłowe lub fałszywie negatywne wyniki.

- Odpady niebezpieczne i biologiczne należy utylizować zgodnie z obowiązującymi przepisami lokalnymi i krajowymi, aby uniknąć skażenia środowiska.
- Przechowywanie eluatów w nieprawidłowych warunkach może stać się przyczyną degradacji sekwencji docelowej linii B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) i/lub wirusa grypy i może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Brak odwirowania składników zestawu po rozmrożeniu może spowodować kontaminację pozostałościami odczynników na zakrętkach i negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Nie należy przekraczać czasu przechowywania mieszaniny PCR, ponieważ może to negatywnie wpływać na działanie wyrobu.
- Podobnie jak w przypadku innych badań diagnostycznych, wyniki należy interpretować z uwzględnieniem wszystkich danych klinicznych i laboratoryjnych.
- W przypadku próbki zawierającej patogeny inne niż linii B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) i/lub wirusa grypy, może występować konkurencja z amplifikowaną sekwencją docelową lub reaktywność krzyżowa, powodujące nieprawidłowe wyniki IVD.
- Potencjalne mutacje w obszarach sekwencji docelowej linii B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) i/lub genomu wirusa grypy objęte starterami i/lub sondami użytymi w zestawie, mogą powodować niewykrycie obecności patogenu.

9. Procedura

OSTROŻNIE

Nieprawidłowe stosowanie składników zestawu i próbek może stać się przyczyną kontaminacji i negatywnie wpływać na działanie wyrobu:

- Nie zamieniać ze sobą zakrętek do fiolek lub butelek.
- Materiał, dla którego stwierdzono wynik pozytywny lub potencjalnie pozytywny należy przechowywać osobno od składników zestawu.
- Należy korzystać z oddzielnych obszarów roboczych do przygotowania próbki/konfiguracji reakcji oraz amplifikacji/detekcji.
- Należy zawsze utylizować rękawiczki po kontakcie z materiałem pozytywnym lub potencjalnie pozytywnym.
- Nie otwierać płytek do PCR i/lub probówek po amplifikacji.



OSTROŻNIE

Nie mieszać składników z różnych numerów partii zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, ponieważ może to negatywnie wpływać na działanie wyrobu.



9.1 Pobieranie, obchodzenie się z i przechowywanie próbek

Do pobierania próbek należy stosować dostępne komercyjnie wymazówki zakończone włóknem dacron lub poliestrowym, z plastikową pałeczką. Suche wymazówki należy umieścić w uniwersalnym medium transportowym (np. UTM® firmy Copan). Nie należy używać wymazówek z alginianem wapnia, wymazówek z patyczkami drewnianymi i/lub końcówkami bawełnianymi, jak również wymazówek zebranych w żelu agarowym. Materiał należy transportować zgodnie z przepisami lokalnymi i krajowymi dotyczącymi transportu materiału biologicznego.

Przed użyciem, wymazy z górnych dróg oddechowych zawieszane w UTM® można przechowywać nie dłużej niż 48 godzin w temperaturze pokojowej (+20 °C do +25 °C), 5 dni w temperaturze od +2 °C do +8 °C lub 2 miesiące w temperaturze od -25 °C do -15 °C.

OSTROŻNIE



Próbki należy zawsze traktować jako materiał zakaźny i stanowiący zagrożenie biologiczne, zgodnie z procedurami bezpieczeństwa i praktykami obowiązującymi w danym laboratorium. W przypadku rozlania materiału próbki, natychmiast użyć odpowiedniego środka dezynfekującego. Skażone materiały należy traktować jako zagrożenie biologiczne.

UWAGA



Przechowywanie zamrożonych próbek nie wpływa na właściwości użytkowe zestawu. W przypadku użycia próbek zamrożonych należy upewnić się, że próbki są całkowicie rozmrożone i prawidłowo wymieszane przed użyciem.

UWAGA



Użycie wymazówek z alginianem wapnia może powodować nieprawidłowe lub niewłaściwe wyniki ze względu na inhibicję PCR.

UWAGA



Użycie wymazówek z drewnianą pałeczką i/lub końcówkami bawełnianymi lub z żelazem agarowym jako medium transportowym może wpływać na przenoszenie próbek w systemie AltoStar® AM16 ze względu na pozostałości drewna, bawełny i/lub agaru oraz spowodować, że próbki nie zostaną przepracowane.

9.2 Przygotowanie próbki

Materiał startowy dla zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 stanowi wyizolowane RNA. Jakość wyizolowanego RNA ma istotny wpływ na właściwości użytkowe wyrobu.

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 został poddany walidacji z użyciem wymazów z górnych dróg oddechowych w połączeniu z systemem AltoStar® AM16 i zestawem AltoStar® Purification Kit 1.5.

Po zakończeniu izolacji kwasu nukleinowego z użyciem systemu AltoStar® AM16, eluaty w otwartej płytce na eluat zachowują stabilność w temperaturze pokojowej (maks. +30 °C) przez 4 godziny.

Eluaty w zamkniętej płytce na eluat mogą być przechowywane w temperaturze od +2 °C do +8 °C przez okres nieprzekraczający 24 godzin przed rozpoczęciem konfiguracji reakcji. Szczegółowe informacje dotyczące zamykania płytek z eluatem znajdują się w instrukcji użytkowania zestawu AltoStar® Purification Kit 1.5.

Użycie innych systemów i zestawów do izolacji kwasu nukleinowego może również być dozwolone. Jednakże, możliwość stosowania procedury izolacji kwasu nukleinowego z zestawem FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 wymaga dodatkowej walidacji przez użytkownika.

OSTROŻNIE



Nie używać innych rodzajów materiału do badań! Użycie innych rodzajów materiału do badań może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

OSTROŻNIE



Próbki należy zawsze traktować jako materiał zakaźny i stanowiący zagrożenie biologiczne, zgodnie z procedurami bezpieczeństwa i praktykami obowiązującymi w danym laboratorium. W przypadku rozlania materiału próbki, natychmiast użyć odpowiedniego środka dezynfekującego. Skażone materiały należy traktować jako zagrożenie biologiczne.

OSTROŻNIE



Obecność inhibitorów PCR może powodować nieprawidłowe lub fałszywie negatywne wyniki.

OSTROŻNIE



Odpady niebezpieczne i biologiczne należy utylizować zgodnie z obowiązującymi przepisami lokalnymi i krajowymi, aby uniknąć skażenia środowiska.

OSTROŻNIE



Przechowywanie eluatów w nieprawidłowych warunkach może stać się przyczyną degradacji sekwencji docelowej linii B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) i/lub wirusa grypy i może negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

Dodatkowe informacje i pomoc techniczną w zakresie wstępnej obróbki i przygotowania próbki można uzyskać w dziale pomocy technicznej Altona Diagnostics (patrz rozdział 15. Pomoc techniczna).

9.3 Przygotowanie mieszaniny master mix

Przed użyciem wszystkie odczynniki i próbki powinny być całkowicie rozmrożone, wymieszane (poprzez użycie pipety lub wytrząsanie) i krótko odwirowane.

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 jest przeznaczony do użycia z mieszaniną FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 oraz kontrolą wewnętrzną AltoStar® Internal Control 1.5, która umożliwia kontrolę procedury przygotowania próbki (izolacji kwasu nukleinowego) oraz dalszych badań RT-PCR.

- ▶ IC jest automatycznie dodawana na początku procedury oczyszczania kwasów nukleinowych w systemie AltoStar® AM16.
- ▶ W przypadku użycia innych metod izolacji kwasu nukleinowego, IC należy dodać na etapie lizy metodą manualną lub automatyczną z użyciem odpowiedniego urządzenia.
- ▶ Niezależnie od metody/systemu stosowanego do izolacji kwasu nukleinowego, nie należy dodawać IC bezpośrednio do próbki. IC należy zawsze dodawać do mieszaniny próbki i bufora lizującego. Objętość dodawanego IC zawsze zależy wyłącznie od objętości eluatu. Stanowi ona 50% objętości eluatu. Na przykład, jeśli kwas nukleinowy ma być eluowany w 60 µl bufora elucyjnego lub wody, do mieszaniny próbki i bufora lizującego należy dodać 30 µl IC na próbkę.

- ▶ Mieszaninę master mix należy przygotować zgodnie z następującym schematem pipetowania:

Tabela 2: Procedura schematu pipetowania (przygotowanie mieszaniny master mix)

Liczba reakcji (rxns)	1	12
Detection Mix	5 µl	60 µl
Amplification Mix	15 µl	180 µl
Objętość mieszaniny master mix	20 µl	240 µl

OSTROŻNIE



Brak odwirowania składników zestawu po rozmrożeniu może spowodować kontaminację pozostałością odczynników na zakrętkach i negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

9.4 Konfiguracja reakcji

- ▶ Przenieś pipetą 20 µl mieszaniny master mix do odpowiednich studzienek w 96-studzienkowej płytce lub do odpowiedniej optycznej probówki reakcyjnej.
- ▶ Dodaj 10 µl próbki (eluat z izolacji kwasu nukleinowego) lub 10 µl roztworu kontrolnego (PC lub NTC).

Tabela 3: Schemat pipetowania (konfiguracja reakcji)

Konfiguracja reakcji	
Mieszanina master mix	20 µl
Próbka lub kontrola	10 µl
Objętość całkowita	30 µl

- ▶ Upewnić się, że dla każdego badania stosowana jest co najmniej jedna PC i co najmniej jedna NTC.
- ▶ Dokładnie wymieszaj próbki i kontrole z mieszaniną master mix poprzez pipetowanie w górę i w dół.
- ▶ Zamknij 96-studzienkową płytkę, używając odpowiednich pokrywek lub optycznej folii do zamykania płytek oraz zamknij probówki reakcyjne, używając odpowiednich pokrywek.
- ▶ Odwiruj 96-studzienkową płytkę w wirówce z kompatybilnej z mikroplótką oraz probówki reakcyjne w odpowiedniej wirówce przez 30 sekund z prędkością około 1000 x g (~ 3000 obr./min).
- ▶ NTC zawiera matrycę IC o odpowiednim stężeniu.

Po zakończeniu, konfiguracji mieszanina RT-PCR w zamkniętej płytce do PCR zachowuje stabilność w temperaturze pokojowej (maks. +30 °C) przez 30 minut.

OSTROŻNIE



Nie należy przekraczać czasu przechowywania mieszaniny PCR, ponieważ może to negatywnie wpływać na działanie wyrobu.

10. Programowanie urządzeń PCR w czasie rzeczywistym

Szczegółowe informacje dotyczące konfiguracji i programowania różnych urządzeń PCR w czasie rzeczywistym znajdują się w instrukcji używania danego urządzenia.

Szczegółowe instrukcje dotyczące programowania zestawów FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 do użycia z określonymi urządzeniami PCR w czasie rzeczywistym można uzyskać w dziale pomocy technicznej altona Diagnostics (patrz rozdział 15. Pomoc techniczna).

10.1 Ustawienia

- Wybierz następujące ustawienia:

Tabela 4: Ustawienia badania

Ustawienia	
Objętość reakcji	30 µl
Szybkość zmiany	Domyślna
Wzorzec pasywny	Brak

10.2 Detektory fluorescencji (barwniki)

- Wybierz następujące detektory fluorescencji (barwniki):

Tabela 5: Detektory fluorescencji

Sekwencja docelowa	Nazwa detektora	Barwnik reporterowy	Barwnik tłumiący
RNA właściwe dla linii B-βCoV	E gene	ROX™	(Brak)
RNA właściwe dla SARS-CoV-2	S gene	Cy5	(Brak)
RNA właściwe dla wirusa grypy (A+B)	Flu	FAM™	(Brak)
Internal Control	IC	JOE™	(Brak)

10.3 Profil temperatury i badania barwnika

- Wybierz następujący profil temperatury i pomiaru barwnika:

Tabela 6: Profil temperatury i pomiar barwnika

	Etap	Liczba cykli	Pomiar	Temperatura [°C]	Czas [min:s]
Odwrotna transkrypcja	Utrzymywanie temperatury	1	-	52	05:00
Denaturacja	Utrzymywanie temperatury	1	-	95	00:05
Amplifikacja	Zmiany cykliczne	45	-	95	00:05
			Tak	58	00:25

11. Analiza danych

Szczegółowe informacje dotyczące analizy danych dla określonych urządzeń PCR w czasie rzeczywistym znajdują się w instrukcji użytkownika danego urządzenia.

Szczegółowe instrukcje dotyczące analizy danych generowanych przez zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 dla różnych urządzeń PCR w czasie rzeczywistym można uzyskać w dziale pomocy technicznej Altona Diagnostics (patrz rozdział 15. Pomoc techniczna).

11.1 Prawdliwość badań diagnostycznych

11.1.1 Prawidłowe badanie diagnostyczne

Badanie diagnostyczne jest **prawidłowe**, jeśli zostały spełnione są następujące warunki kontrolne:

Tabela 7: Warunki kontrolne dla prawidłowego badania

ID kontroli	Kanał detekcji			
	ROX™	Cy5	FAM™	JOE™
Kontrola pozytywna [linia B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) i wirus grypy]	+	+	+	Nie dotyczy
Kontrola negatywna	-	-	-	+

11.1.2 Nieprawidłowe badanie diagnostyczne

Badanie diagnostyczne jest **nieprawidłowe**, jeśli (i) nie zostało ukończone lub (ii) jakiegokolwiek warunki kontrolne dla **prawidłowego** badania diagnostycznego nie zostały spełnione.

W przypadku **nieprawidłowego** badania diagnostycznego, badania należy powtórzyć z użyciem pozostałych oczyszczonych kwasów nukleinowych lub rozpocząć ponownie z użyciem pierwotnych próbek.

11.2 Manualna analiza

OSTROŻNIE



Podobnie jak w przypadku innych badań diagnostycznych, wyniki należy interpretować z uwzględnieniem wszystkich danych klinicznych i laboratoryjnych.

11.2.1 Analiza jakościowa

Tabela 8: Analiza wyników

Kanał detekcji				Analiza wyników
ROX™ (gen E)	Cy5 (gen S)	FAM™ [grypa (A+B)]	JOE™ (IC)	
+	+	-	+/-*	Wykryto RNA właściwe dla linii B-βCoV i SARS-CoV-2.
+	-	-	+/-*	Wykryto wyłącznie RNA właściwe dla linii B-βCoV.**
-	+	-	+/-*	Wykryto wyłącznie RNA właściwe dla SARS-CoV-2.**
-	-	+	+/-*	Wykryto wyłącznie RNA wirusa grypy (A i/lub B).
+	-	+	+/-*	Wykryto RNA właściwe dla linii B-βCoV i wirusa grypy (A i/lub B).
-	+	+	+/-*	Wykryto RNA właściwe dla SARS-CoV-2 i wirusa grypy (A i/lub B).
+	+	+	+/-*	Wykryto RNA właściwe dla linii B-βCoV, SARS-CoV-2 i wirusa grypy (A i/lub B).
-	-	-	+	Nie wykryto RNA właściwego dla linii B-βCoV, SARS-CoV-2 ani wirusa grypy (A i/lub B) Próbka nie zawiera wykrywalnych ilości RNA właściwego dla wirusa linii B-βCoV, SARS-CoV-2 ani grypy (A i/lub B).
-	-	-	-	Inhibicja RT-PCR lub brak działania odczynnika. Należy powtórzyć test z użyciem pierwotnej próbki lub pobrać i wykonać test na nowej próbce.

* Detekcja IC w kanale detekcji JOE™ nie jest wymagana dla wyników pozytywnych w kanale detekcji ROX™ i/lub Cy5 i/lub FAM™. Wysokie stężenie wirusa linii B-βCoV (sekwencja docelowa genu E) i/lub SARS-CoV-2 (sekwencja docelowa genu S) i/lub wirusa grypy (A+B) RNA może powodować osłabienie lub brak sygnałów IC.

** Detekcja w jednym z dwóch kanałów detekcji dla linii B-βCoV (gen E) i SARS-CoV-2 (gen S) może być spowodowana niskim stężeniem wirusowego RNA, zbliżonym do granicy wykrywalności lub mutacją jednej z dwóch sekwencji docelowych.

12. Charakterystyka działania testu

Charakterystyka działania zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 została oceniona na podstawie 1. międzynarodowego standardu Światowej Organizacji Zdrowia dla RNA SARS-CoV-2 (kod NIBSC: 20/146) oraz dostępnego komercyjnie materiału wirusa grypy typu A (szczep wirusa grypy typu A H3N2 Wisconsin/67/05) oraz materiału wirusa grypy typu B (szczep Florida/04/06).

12.1 Wymazy z dróg oddechowych

12.1.1 Czulość analityczna

W celu wyznaczenia granicy wykrywalności (LoD), utworzono serię rozcieńczeń 1. międzynarodowego standardu Światowej Organizacji Zdrowia dla RNA SARS-CoV-2, dostępnego komercyjnie materiału wirusa grypy typu A (szczep wirusa grypy typu A H3N2 Wisconsin/67/05) oraz materiału wirusa grypy typu B (szczep Florida/04/06) w uniwersalnym nośniku transportowym (UTM®, Copan) zawierającym symulowany wymaz z jamy nosowej [5% wag. mucyny, 5% obj. krwi, 0,8% obj. NaCl (95% solanki) oraz 0,00002% wag. ludzkiego genomowego DNA (510k złożone dla testu BD MAX™ MRSA XT; numer akcesyjny: K133605)].

Testom poddano serię rozcieńczeń 1. międzynarodowego standardu Światowej Organizacji Zdrowia dla RNA SARS-CoV-2 w zakresie stężeń od 1,00E+04 IU/ml do 5,00E-01 IU/ml. Testom poddano serię rozcieńczeń wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B w zakresie stężeń od 2,00E+03 kopii/ml do 1,00E+01 kopii/ml.

Każde rozcieńczenie badano przy użyciu 8 powtórzeń w 3 różnych seriach (całkowita liczba n = 24 na rozcieńczenie) z użyciem:

- 3 zestawów FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5
- 3 zestawów FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5
- 3 zestawów AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 zestawów AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 systemów AltoStar® AM16
- 3 urządzeń CFX96™ DW Dx

Dla każdego z wirusów dane ze wszystkich serii zostały zestawione i na ich podstawie wykonano analizę probit, która wykazała LoD na poziomie 95% wynoszące.

Tabela 9: Wyniki testu PCR stosowane do obliczenia czułości analitycznej zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 dla SARS-CoV-2 (gen S)

Stężenie [IU/ml]	N [całkowita]	N [pozytywne]	Odsetek pozytywnych wyników [%]
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	24	100
3,16E+01	24	10	42
1,00E+01	24	4	17
3,16E+00	24	5	21
1,00E+00	24	1	4
5,00E-01	24	1	4

Wartość LoD dla zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 do detekcji SARS-CoV-2 (gen S) w UTM® wynosi 201 IU/ml (przedział ufności 95%: 107–501 IU/ml).

Tabela 10: Wyniki testu PCR stosowane do obliczenia czułości analitycznej zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 dla SARS-CoV-2 (gen E)

Stężenie [IU/ml]	N [całkowita]	N [pozytywne]	Odsetek pozytywnych wyników [%]
1,00E+04	24	24	100
3,16E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
3,16E+02	24	24	100
1,00E+02	24	23	96
3,16E+01	24	10	42
1,00E+01	24	4	17
3,16E+00	24	2	8
1,00E+00	24	1	4
5,00E-01	24	1	4

Wartość LoD dla zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 do detekcji SARS-CoV-2 (gen E) w UTM® wynosi 226 IU/ml (przedział ufności 95%: 124–545 IU/ml).

Tabela 11: Wyniki testu PCR stosowane do obliczenia czułości analitycznej zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 dla wirusa grypy typu A

Stężenie [kopie/ml]	N [całkowita]	N [pozytywne]	Odsetek pozytywnych wyników [%]
2,00E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	23	96
2,50E+02	24	22	92
1,00E+02	24	17	71
5,00E+01	24	9	38
2,50E+01	24	6	25
1,00E+01	24	1	4

Wartość LoD dla zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 do detekcji wirusa grypy typu A w UTM® wynosi 341 kopii/ml (przedział ufności 95%: 230–611 kopii/ml).

Tabela 12: Wyniki testu PCR stosowane do obliczenia czułości analitycznej zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 dla wirusa grypy typu B

Stężenie [kopie/ml]	N [całkowita]	N [pozytywne]	Odsetek pozytywnych wyników [%]
2,00E+03	24	24	100
1,00E+03	24	24	100
7,50E+02	24	24	100
5,00E+02	24	24	100
2,50E+02	24	19	79
1,00E+02	24	3	13
5,00E+01	24	6	25
2,50E+01	24	5	21
1,00E+01	24	1	4

Wartość LoD dla zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 do detekcji wirusa grypy typu B w UTM® wynosi 432 kopii/ml (przedział ufności 95%: 286–780 kopii/ml).

12.1.2 Swoistość analityczna

Swoistość analityczna zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 jest zapewniona poprzez precyzyjny wybór oligonukleotydów (starterów i sond). Oligonukleotydy zostały sprawdzone poprzez porównanie ich sekwencji do sekwencji dostępnych publicznie w celu zapewnienia wykrywania wszystkich istotnych genotypów SARS-CoV-2 i wirusa grypy.

W celu weryfikacji swoistości analitycznej zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 wykonano następujące doświadczenia (patrz rozdział od 12.1.2.1 Próbkę negatywne do 12.1.2.3 Reaktywność krzyżowa).

12.1.2.1 Próbki negatywne

30 wymazów z górnych dróg oddechowych z wynikiem negatywnym dla SARS-CoV-2, wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B zostało poddane testom z użyciem zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5. Wszystkie (30 z 30) próbki dały wynik negatywny dla RNA właściwego dla SARS-CoV-2, wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B i pozytywny dla IC. Swoistość analityczna zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 dla wymazów z górnych dróg oddechowych wynosi $\geq 95\%$.

12.1.2.2 Substancje zakłócające

W celu oceny wpływu potencjalnie zakłócających substancji endogennych i egzogennych na właściwości użytkowe zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5, wybrane substancje zostały dodane do UTM® zawierającego SARS-CoV-2, wirus grypy typu A oraz wirus grypy typu B o stężeniu końcowym 3 x LoD (odpowiednio $6,03E+02$ IU/ml, $1,02E+03$ kopii/ml oraz $1,29E+03$ kopii/ml) oraz do UTM® niezawierającego SARS-CoV-2, wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B.

Wyniki uzyskane dla próbek zawierających potencjalnie zakłócające substancje zostały porównane z wynikami uzyskanymi dla UTM® niezawierających substancji zakłócających. Każdą próbkę oznaczano w 3 powtórzeniach.

Nie stwierdzono zakłóceń dla próbek zawierających podwyższone poziomy:

- Substancji endogennych
 - Ludzkiego genomowego DNA
 - Krwi pełnej ludzkiej
 - Mucyny
- Substancji egzogennych
 - Aeroszoli antyalergicznycy do nosa (zawierających dipropionian beklometazonu)
 - Aeroszoli do nosa zmniejszających przekrwienie (zawierających chlorowoderek ksylometazoliny i deksipantenol)

- Mupirocyny
- Zanamiwiru

OSTROŻNIE



Obecność inhibitorów PCR może powodować nieprawidłowe lub fałszywie negatywne wyniki.

12.1.2.3 Reaktywność krzyżowa

Swoistość analityczna zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 w odniesieniu do reaktywności krzyżowej z patogenami innymi niż SARS-CoV-2, wirus grypy typu A i wirus grypy typu B została oceniona poprzez testy:

- Patogeny spokrewnione z SARS-CoV-2 i wirusami grypy
- Patogeny powodujące podobne objawy, co zakażenie SARS-CoV-2 lub wirusami grypy

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 nie podlega reakcji krzyżowej z następującymi patogenami:

- Adenowirus
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Chlamydia pneumoniae*
- Enterowirus
- *Haemophilus influenzae*
- Ludzki koronawirus 229E
- Ludzki koronawirus NL63
- Ludzki koronawirus OC43
- Ludzki metapneumowirus (hMPV)
- *Legionella pneumophila*
- MERS-koronawirus
- *Moraxella catarrhalis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- Wirus paragrypy 1–4
- *Pneumocystis jirovecii*
- Syncytialny wirus oddechowy typu A
- Syncytialny wirus oddechowy typu B
- Rynowirus
- *Streptococcus pneumoniae*

OSTROŻNIE

W przypadku próbki zawierającej patogeny inne niż linii B-βCoV (gen E), SARS-CoV-2 (gen S) i/lub wirusa grypy, może występować konkurencja z amplifikowaną sekwencją docelową lub reaktywność krzyżowa, powodujące nieprawidłowe wyniki IVD.

12.1.3 Inkluzywność

Swoistość zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 do detekcji różnych wariantów SARS-CoV-2 i różnych szczepów wirusa grypy jest zapewniana przede wszystkim przez wybór starterów i sond. W celu weryfikacji, czy zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 umożliwia detekcję różnych wariantów SARS-CoV-2 i różnych szczepów wirusa grypy, testom poddano następujące warianty/szczepy (patrz tabele 13 i 15).

Tabela 13: Testowane linie SARS-CoV-2

Wariant (linia)	Kanał ROX™ (gen E)	Kanał Cy5 (gen S)	Kanał VIC™ (IC)
BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 (typ dziki)	+	+	+
2019-nCoV/Italy-INMI1 (typ dziki)	+	+	+
Alpha (B.1.1.7)	+	+	+
Beta (B.1.351)	+	+	+
Delta (B.1.617.2)	+	+	+
Gamma (P.1)	+	+	+

Tabela 14: Inkluzywność [analiza *in silico* 2 993 884 sekwencji pełnego genomu SARS-CoV-2 opublikowana przez GISAID e.V. (www.gisaid.org) 10 października 2021 oraz analiza 518 615 sekwencji pełnego genomu opublikowana przez National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) 10 października 2021 dla sekwencji docelowej genu E i genu S: FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5]

3 512 499 sekwencji pełnego genomu		Sekwencje wykazujące 100% homologię	Sekwencje wykazujące błędne sparowania (liczba niedopasowań)
Gen E	Starter typu forward	3 505 942	6549 (1) 8 (2)
	Starter typu reverse	3 509 461	3032 (1) 5 (2) 1 (3)**
	Sonda	3 510 308	2183 (1) 4 (2)
Gen S	Starter typu forward	3 491 594	20 728 (1) 160 (2)
	Starter typu reverse	3 490 361	22 061 (1) 77 (2)
	Sonda	3 498 798	13 653 (1) 44 (2) 3 (3) 1 (4)*

* Sekwencja (ID akcesji EPI_ISL_415593, GISAID) wykazała 4 niedopasowania w miejscu wiązania sondy dla genu S. Sekwencja została opublikowana 10 marca 2020 roku i pochodziła z Waszyngtonu w Stanach Zjednoczonych. Od tego czasu, żadne z publikowanych sekwencji nie wykazywały tak dużej liczby niedopasowań. Sekwencja została opatrzona uwagą autorów „Uwaga, fragmenty NNN (1,74% całkowitej sekwencji)” wskazującą na niedoskonałą jakość sekwencjonowania; tym samym, wpływ na oligonukleotydy właściwe dla genu S nie był analizowany.

** Sekwencja (akcesja MW584978.1) wykazała 3 niedopasowania w miejscu wiązania startera typu reverse dla genu E. Próbkę została pobrana 3 kwietnia 2020 roku, a dane opublikowane w lutym 2021 roku, pochodziła z Cleveland w Stanach Zjednoczonych. Od tego czasu, żadne z publikowanych sekwencji nie wykazywały tak dużej liczby niedopasowań.

W zależności od pozycji, mutacje powodujące ≤ 2 błędne sparowania w pojedynczej sekwencji oligonukleotydu z bardzo niskim prawdopodobieństwem będą miały istotny ujemny wpływ na właściwości użytkowe testu. Testy wszystkich tego typu sekwencji (≤ 2 błędnych sparowań) w doświadczeniach laboratoryjnych w ramach czynności kontrolnych po wprowadzeniu do obrotu zestawów RealStar®, FlexStar® i AltoStar® do detekcji wirusa SARS-CoV-2 potwierdziły, że tego typu mutacje nie miały wpływu na właściwości użytkowe. Z wyjątkiem jednej unikatowej sekwencji, żadna z pozostałych analizowanych sekwencji nie wykazała niedopasowań w więcej niż jednym oligonukleotydzie i żadna z niedopasowanych sekwencji nie wykazała niedopasowań w obu systemach detekcji (dla genu E i genu S), dlatego nie oczekuje się wpływu na reaktywność określonych oligonukleotydów wchodzących w skład zestawów RealStar®, FlexStar® i AltoStar® do detekcji obecności wirusa SARS-CoV-2.

Tabela 15: Analizowane szczepy wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B

Podtyp/szczep	Kanał FAM™ (wirus grypy typu A i wirus grypy typu B)	Kanał VIC™ (IC)
Wirus grypy typu A, podtyp H1N1 (New Caledonia/20/98)	+	+
Wirus grypy typu A, podtyp H1N1pdm09 (A/NY/02/2009)	+	+
Wirus grypy typu A, podtyp A/H3N2 wariant dryftujący (A/Sachsen/2/2015)	+	+
Wirus grypy typu A, podtyp H5N1 (A/Anhui/1/05)	+	+
Wirus grypy typu B (B/Colorado/6/2017, linia B-Victoria)	+	+
Wirus grypy typu B (linia B/Phuket/ 3073/2013, B/Yamagata 16/88)	+	+

12.1.4 Precyzja

Precyzja zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 została oceniona z użyciem panelu zawierającego:

- 1 próbka pozytywna o wysokim stężeniu SARS-CoV-2 [50 x LoD (1,00E+04 IU/ml)] w UTM® zawierającym symulowany wymaz z jamy nosowej
- 1 próbka pozytywna o wysokim stężeniu wirusa grypy typu A [50 x LoD (1,70E+04 kopii/ml)] w UTM® zawierającym symulowany wymaz z jamy nosowej
- 1 próbka pozytywna o wysokim stężeniu wirusa grypy typu B [50 x LoD (2,16E+04 kopii/ml)] w UTM® zawierającym symulowany wymaz z jamy nosowej
- 1 próbka pozytywna o niskim stężeniu SARS-CoV-2 [3 x LoD (6,03E+02 IU/ml)] w UTM® zawierającym symulowany wymaz z jamy nosowej
- 1 próbka pozytywna o niskim stężeniu wirusa grypy typu A [3 x LoD (1,02E+03 kopii/ml)] w UTM® zawierającym symulowany wymaz z jamy nosowej
- 1 próbka pozytywna o niskim stężeniu wirusa grypy typu B [3 x LoD (1,29E+03 kopii/ml)] w UTM® zawierającym symulowany wymaz z jamy nosowej
- 1 próbka z wynikiem negatywnym dla SARS-CoV-2, wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B (UTM® zawierający symulowany wymaz z jamy nosowej)

Każdy element panelu został poddany testom z użyciem co najmniej 6 powtórzeń na serię.

W ciągu 5-ciu dni wykonano 5 serii testów z użyciem kombinacji:

- 3 zestawów FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5
- 3 zestawów FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5
- 3 zestawów AltoStar® Purification Kit 1.5
- 3 zestawów AltoStar® Internal Control 1.5
- 3 systemów AltoStar® AM16
- 3 urządzeń CFX96™ DW Dx

Powtarzalność (zmiennosc międzyseryjna), zmienność wewnątrzseryjna i odtwarzalność (zmiennosc całkowita) zostały wyznaczone na podstawie:

- Wartości cyklu progowego (C_q^*) dla próbek pozytywnych o wysokim stężeniu SARS-CoV-2, wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B (patrz tabele 16 i 17)
- Wartości cyklu progowego (C_q^*) dla IC w próbkach negatywnych SARS-CoV-2, wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B (patrz tabela 18)

* Oznaczenie C_q jest równoważne oznaczeniu C_t , które może być stosowane w cyklerach innych niż CFX96™ Deep Well Dx System (Bio-Rad).

Tabela 16: Dane precyzji (CV% określone na podstawie wartości C_q) dla próbek pozytywnych o wysokim stężeniu SARS-CoV-2

	Próbka pozytywna o wysokim stężeniu SARS-CoV-2 (C_q w kanale ROX™, sekwencja docelowa gen E)	Próbka pozytywna o wysokim stężeniu SARS-CoV-2 (C_q w kanale Cy5, sekwencja docelowa gen S)
Zmienność międzyseryjna	0,21–0,42	0,44–0,60
Zmienność wewnątrzseryjna	0,59	0,52
Zmienność całkowita	0,89	0,63

Wszystkie próbki testowane przy 3 x LoD (próbki pozytywne o niskim stężeniu) dały wynik pozytywny dla SARS-CoV-2 (gen E i gen S).

Tabela 17: Dane precyzji (CV% określone na podstawie wartości C_q) dla próbek pozytywnych o wysokim stężeniu wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B

	Próbka pozytywna o wysokim stężeniu wirusa grypy typu A (C_q w kanale FAM™)	Próbka pozytywna o wysokim stężeniu wirusa grypy typu B (C_q w kanale FAM™)
Zmienność międzyseryjna	0,93–1,16	0,52–1,48
Zmienność wewnątrzseryjna	1,02	1,02
Zmienność całkowita	1,48	1,69

Wszystkie próbki testowane przy 3 x LoD (próbki pozytywne o niskim stężeniu) dały wynik pozytywny dla wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B.

Tabela 18: Dane precyzji (CV% określone na podstawie wartości C_q) dla IC w próbkach negatywnych SARS-CoV-2, wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B

	IC
Zmienność międzyseryjna	0,23–0,35
Zmienność wewnątrzseryjna	0,38
Zmienność całkowita	0,74

12.1.5 Całkowity odsetek nieudanych

Elastyczność zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 została oceniona na podstawie badania 30 wymazów z górnych dróg oddechowych od indywidualnych dawców z negatywnym wynikiem dla SARS-CoV-2, wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B z dodatkiem SARS-CoV-2, wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B do końcowego stężenia odpowiadającego 3 x LoD (6,03E+02 IU/ml dla SARS-CoV-2, 1,02E+03 kopii/ml dla wirusa grypy typu A oraz 1,29E+03 kopii/ml dla wirusa grypy typu B). Wszystkie (30 z 30) próbki dały wynik pozytywny dla kanału detekcji fluorescencji (Cy5 i ROX™) właściwych dla SARS-CoV-2 oraz dla kanału detekcji fluorescencji (FAM™) właściwego dla wirusa grypy typu A i wirusa grypy typu B.

12.1.6 Efekt przeniesienia

Efekt przeniesienia stanowi ryzyko zależne od procedury wykonania badania, a nie od stosowanego testu PCR. Dla zautomatyzowanej procedury badania AltoStar® Workflow, jako modelu przykładowego użyto zestawu AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Potencjalne zanieczyszczenie krzyżowe poprzez zanieczyszczenie pozostałościami z próbek pozytywnych o wysokim stężeniu zostały ocenione na podstawie naprzemiennych testów próbek pozytywnych o wysokim stężeniu parwowirusa B19 (1,00E+07 IU/ml) oraz próbek negatywnych (n = 44 na serię; 2 serie) z użyciem zestawu AltoStar® Parvovirus B19 PCR Kit 1.5. Nie stwierdzono efektu przeniesienia, a wszystkie próbki negatywne parwowirusa B19 dały wynik negatywny testu.

12.1.7 Parametry kliniczne

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 oceniono w badaniu porównawczym z zestawem *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) z posiadającym znak CE. W badaniu retrospektywnym, poddano równolegle testom 165 indywidualnych wymazów z górnych dróg oddechowych.

Zestaw *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) został użyty w połączeniu z zestawami MagNA Pure® 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche) oraz MagNA Pure 96 Extraction System (Roche).

Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 został użyty w połączeniu z zestawem AltoStar® Purification Kit 1.5 oraz AltoStar® Internal Control 1.5 wraz z systemem AltoStar® AM16 oraz urządzeniem CFX96™ DW Dx.

Z analizy jakościowej zostały wykluczone wszystkie próbki z nieprawidłowym wynikiem dla jednego lub obu oznaczeń.

Wyniki dla pozostałych próbek (164 dla SARS-CoV-2 oraz 152 dla wirusa grypy) zostały przedstawione odpowiednio w tabelach 19 i 20.

Tabela 19: Wyniki oceny czułości i swoistości diagnostycznej dla SARS-CoV-2 w wymazach z górnych dróg oddechowych

		<i>ampliCube</i> Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik)	
		POZYTYWNY	NEGATYWNY
FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5	POZYTYWNY	58	1
	NEGATYWNY	0	105

Czułość i swoistość diagnostyczna zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 w porównaniu z *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) wynosiła odpowiednio 100% (przedział ufności 93,8%–100%) i 99,1% (przedział ufności 94,9%–100%).

Tabela 20: Wyniki oceny czułości i swoistości diagnostycznej dla wirusa grypy w wymazach z górnych dróg oddechowych

		<i>ampliCube</i> Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik)	
		POZYTYWNY	NEGATYWNY
FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5	POZYTYWNY	37	1
	NEGATYWNY	0	114

Czułość i swoistość diagnostyczna zestawu FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 w porównaniu z *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) wynosiła odpowiednio 100% (przedział ufności 90,1%–100%) i 95,3% (przedział ufności 95,3%–100%).

13. Utylizacja

Odpady niebezpieczne i biologiczne należy utylizować zgodnie z obowiązującymi przepisami lokalnymi i krajowymi. Pozostałych składników produktu i odpadów nie należy wprowadzać do kanalizacji, cieków wodnych lub gleby.

OSTROŻNIE



Próbki należy zawsze traktować jako materiał zakaźny i stanowiący zagrożenie biologiczne, zgodnie z procedurami bezpieczeństwa i praktykami obowiązującymi w danym laboratorium. W przypadku rozlania materiału próbki, natychmiast użyć odpowiedniego środka dezynfekującego. Skażone materiały należy traktować jako zagrożenie biologiczne.

OSTROŻNIE



Odpady niebezpieczne i biologiczne należy utylizować zgodnie z obowiązującymi przepisami lokalnymi i krajowymi, aby uniknąć skażenia środowiska.

14. Kontrola jakości

Zgodnie z systemem zarządzania jakością Altona Diagnostics GmbH według wytycznych EN ISO 13485, każda partia zestawów FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 jest weryfikowana pod względem zgodności ze specyfikacjami w celu zapewnienia stałej jakości wyrobu.

15. Pomoc techniczna

Pomoc można uzyskać w dziale pomocy technicznej Altona Diagnostics:

e-mail: support@altona-diagnostics.com

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

UWAGA



Wszelkie poważne wypadki związane z użyciem tego wyrobu należy zgłaszać firmie Altona Diagnostics oraz właściwym władzom w kraju użytkownika.

16. Literatura

- [1] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10th Edition. ASM Press, 2011.
- [2] Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Third Edition. Mosby, 2010.
- [3] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Index of Viruses — Orthomyxovirus (2019). Virus Taxonomy: 2018b Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, accessed on 24th March 2020.
- [4] Kawaoka Y, ed. (2006). "Influenza Virology: Current Topics". Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-06-6. <https://www.caister.com/flu>, accessed on 24th March 2020.
- [5] Bouvier NM, Palese P (2008). "The biology of influenza viruses". Vaccine. Vol.26, Suppl. 4:D49-D53. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.039. PMID 19230160.
- [6] Richard M, Fouchier RAM (2016) "Influenza A virus transmission via respiratory aerosols or droplets as it relates to pandemic potential". FEMS Microbiology Reviews. Vol.40, Issue 1:68-85. doi:10.1093/femsre/fuv039. PMID 26385895.
- [7] World Health Organization (WHO). Fact sheets - "Influenza (Seasonal)". 18th November 2018. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)), accessed on 24th March 2020.

17. Znaki towarowe i zastrzeżenia

AltoStar®, FlexStar® (altona Diagnostics); CFX96™ (Bio-Rad); UTM® (Copan); Rotor-Gene® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); FAM™, JOE™, ROX™, VIC™ (Thermo Fisher Scientific).

Zarejestrowane nazwy, znaki towarowe itp. stosowane w niniejszym dokumencie, nawet jeśli nie zostało to wyraźnie oznaczone, są traktowane jako chronione prawnie.
















Zestaw FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 to posiadający oznaczenie CE zestaw diagnostyczny zgodny z wymaganiami europejskiej dyrektywy 98/79/WE w sprawie diagnostyki *in vitro*.




Wyrób nie posiada licencji Health Canada oraz nie został zatwierdzony i dopuszczony przez FDA.

Wyrób nie jest dostępny we wszystkich krajach.

© 2023 altona Diagnostics GmbH; Wszelkie prawa zastrzeżone.

18. Wyjaśnienie symboli

Symbol	Wyjaśnienie
	Wyrób medyczny używany do diagnostyki <i>in vitro</i>
	Global Trade Item Number
	Numer partii
	Zawartość
	Kolor zakrętki
	Numer katalogowy
	Numer
	Składnik
	Zapoznaj się z instrukcją użytkowania
	Zawiera ilość wystarczającą na „n” testów/reakcji (rxns)
	Limit temperatury
	Termin ważności
	Producent
	Ostrożnie
	Numer materiału

Symbol	Wyjaśnienie
	Wersja
	Uwaga
	Zawiera materiał biologiczny pochodzenia zwierzęcego

19. Historia zmian

Tabela 21: Historia zmian

Identyfikator	Data wydania [miesiąc/rok]	Zmiany
MAN-FS0021510- PL-S01	02/2022	Pierwsze wydanie

strona celowo pozostawiona pusta

strona celowo pozostawiona pusta

strona celowo pozostawiona pusta

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

