

Gebrauchsanweisung

FlexStar®

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

02/2022 DE

Respiratory

FlexStar®

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

Zur Verwendung mit

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

Inhaltsverzeichnis

1.	Über diese Gebrauchsanweisung	6
2.	Zweckbestimmung	6
3.	Produktinhalt	7
4.	Lagerung	8
5.	Hintergrundinformationen	9
6.	Produktbeschreibung	10
6.1	Komponenten	11
6.2	Real-Time-PCR-Geräte	12
6.3	Probenarten	12
7.	Benötigtes, nicht mitgeliefertes Zubehör	13
8.	Warnungen, Vorsichtsmaßnahmen und Einschränkungen	14
9.	Verfahren	16
9.1	Probenentnahme, -handhabung und -lagerung	16
9.2	Probenvorbereitung	17
9.3	Master Mix Ansatz	19
9.4	Reaktionsansatz	20
10.	Programmierung des Real-Time-PCR-Gerätes	21
10.1	Einstellungen	22
10.2	Fluoreszenz-Detektionskanäle (Farbstoffe)	22
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	Atemwegsabstriche	26
12.1.1	Analytische Sensitivität.....	26
12.1.2	Analytische Spezifität	30
12.1.2.1	Negativproben	31
12.1.2.2	Störende Substanzen.....	31
12.1.2.3	Kreuzreaktionen	32
12.1.3	Inklusivität.....	33
12.1.4	Präzision.....	36
12.1.5	Gesamtausfallrate	38
12.1.6	Verschleppung.....	38
12.1.7	Klinische Leistungsdaten.....	39
13.	Entsorgung	41
14.	Qualitätskontrolle.....	41
15.	Technischer Support	42
16.	Literatur	42
17.	Handelsmarken und Haftungsausschlüsse.....	43
18.	Erläuterung der Symbole	44
19.	Änderungshistorie	46

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® SARS-CoV-2 Type & FLU 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 spezifischer RNA des schweren akuten respiratorischen Syndrom-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) und Influenzavirus in menschlichen Atemwegsabstrich-Proben. Der Nachweis von SARS-CoV-2 basiert auf der parallelen Detektion des E-Gens der Linie-B-Beta-Coronaviren (einschließlich SARS-CoV-2) und des S-Gens von SARS-CoV-2.

Der FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 ist als Hilfsmittel für die Diagnose einer Infektion mit SARS-CoV-2 und Influenzavirus vorgesehen.

Die mit dem FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 generierten Ergebnisse müssen in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden interpretiert werden.

Der FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU 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® SARS-CoV-2 Type & FLU 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	240
Rot	PC ²⁾	2	250
Weiß	NTC ³⁾	2	250

¹⁾ Enthält biologisches Material tierischen Ursprungs

²⁾ Positivkontrolle [Linie-B-βCoV(E-Gen)-, SARS-CoV-2(S-Gen)- und Influenzavirus-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® SARS-CoV-2 Type & FLU 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 des Detection Mixes sollte vermieden werden, da es die Leistung des Produkts beeinträchtigen kann.
- Das wiederholte Auftauen und Einfrieren der Positivkontrolle (PC) 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 den 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

SARS-CoV-2

Das schwere akute respiratorische Syndrom-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) ist ein Virus mit einzelsträngiger (+)ssRNA, das zu der Familie *Coronaviridae*, Gattung Betacoronavirus, Untergattung Linie B, gehört.

SARS-CoV-2 ist im Dezember 2019 das erste Mal in der Region Wuhan in China in Erscheinung getreten und hat sich innerhalb von 2 Monaten weltweit verbreitet. Nachdem der Erreger zunächst als 2019-nCoV (novel Coronavirus) bezeichnet wurde, fand am 11.02.2020 durch das „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (Internationales Komitee für Virustaxonomie) eine Umbenennung in SARS-CoV-2 statt. Zur gleichen Zeit wurde durch die WHO für die durch den Erreger verursachte Erkrankung der Name COVID-19 eingeführt. Aufgrund der schnellen weltweiten Verbreitung von COVID-19 wurde am 12.03.2020 der Pandemiestatus durch die WHO ausgerufen.

SARS-CoV-2 ist hoch ansteckend, wird über Aerosole und Tröpfchen übertragen und verursacht eine akute Atemwegsinfektion mit grippeähnlichen Symptomen. Hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, kann eine Infektion mit SARS-CoV-2 bei älteren Personen und Personen mit Vorerkrankungen zu einer ernsthaften und lebensbedrohenden Erkrankung führen. Die Bandbreite der Schwere der Erkrankung reicht von asymptomatischen Infektionen über leichte und mittelschwere Verläufe bis hin zu schweren Verläufen mit tödlichem Ausgang [1,2].

Influenzavirus

Influenza, gemeinhin als Grippe bezeichnet, ist eine Infektionskrankheit, die von RNA-Viren der Familie *Orthomyxoviridae* (Influenzaviren) hervorgerufen wird [3,4]. Charakteristisch für Influenzaviren ist die fortwährende Veränderung ihrer Haupt-Oberflächenantigene Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N) (Antigen-Drift) [5]. Sie infizieren Vögel und Säugetiere per Übertragung durch Aerosole [6]. Humane Influenza-A- und Influenza-B-Viren verursachen schwere Infektionen, die in erster Linie die Atemwege betreffen und mit Fieber und Husten als häufigste Symptome einhergehen. In schwereren Fällen kann die Grippe eine Lungenentzündung nach sich ziehen, die, insbesondere bei Kindern und älteren Menschen, tödlich verlaufen kann [7].

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® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 ist ein in-vitro-diagnostischer Test. In Kombination mit dem FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 ist es für den qualitativen Nachweis und die Differenzierung von Linie-B-Beta-Coronaviren(Linie-B-βCoV, E-Gen)-, SARS-CoV-2(S-Gen)- und Influenzavirus(A+B)-spezifischer RNA in menschlichen Atemwegsabstrich-Proben einsetzbar.

Der FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU 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 Linie B-βCoV (E-Gen), SARS-CoV-2 (S-Gen) und Influenza (A+B) sowie fluoreszenzmarkierte, zielsequenzspezifische Sonden für den Nachweis der vervielfältigten cDNA.

Zusätzlich zu den für Linie-B-βCoV-, SARS-CoV-2- und Influenzavirus-RNA spezifischen Amplifikations- und Nachweissystemen enthält der FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU 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 Linie-B-βCoV(E-Gen)-RNA spezifischen Sonden sind mit dem Fluorophor ROX™ markiert, die für SARS-CoV-2(S-Gen)-RNA spezifischen Sonden mit dem Fluorophor Cy5 und die für Influenzavirus(A+B)-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 Linie B-βCoV (E-Gen), SARS-CoV-2 (S-Gen), Influenza(A+B)-Viren und der IC in den entsprechenden Detektionskanälen der Real-Time-PCR-Geräte ermöglicht.

6.1 Komponenten

Der FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 enthält ausreichende Mengen an Reagenzien, um 384 Reaktionen durchzuführen. Das Produkt besteht aus den nachstehenden Komponenten:

- Detection Mix¹⁾
- PC²⁾
- NTC³⁾

¹⁾ Enthält biologisches Material tierischen Ursprungs

²⁾ Positivkontrolle [Linie-B-βCoV(E-Gen)-, SARS-CoV-2(S-Gen)- und Influenzavirus-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 der Detection Mix alle Reagenzien (PCR-Puffer, Magnesiumsalz, Primer und Sonden), die den Nachweis und die Differenzierung von Linie-B-βCoV(E-Gen)- und SARS-CoV-2(S-Gen)- sowie den Nachweis von Influenzavirus(A+B)-spezifischer RNA und IC-spezifischer RNA ermöglichen.

Die PC enthält Linie-B-βCoV(E-Gen)- und SARS-CoV-2(S-Gen)- sowie Influenzavirus-spezifische RNA. Sie wird verwendet, um die Funktionalität der spezifischen Amplifikations- und Nachweissysteme für Linie B-βCoV, SARS-CoV-2 und Influenzavirus zu überprüfen.

Die NTC enthält weder Linie-B-βCoV- noch SARS-CoV-2- oder Influenzavirus(A+B)-spezifische RNA, aber sie enthält das IC-Template. Die NTC wird als Negativkontrolle für die Linie-B-βCoV(E-Gen)-, die SARS-CoV-2(S-Gen)- und die Influenzavirus(A+B)-spezifische Real-Time-PCR verwendet und zeigt eventuelle Verunreinigungen des Detection Mixes an.

6.2 Real-Time-PCR-Geräte

Der FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde für die Verwendung mit folgenden Real-Time-PCR-Geräten entwickelt und validiert:

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

HINWEIS



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

6.3 Probenarten

Der FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde für die Verwendung in Kombination mit der folgenden Probenart validiert:

- Probe aus menschlichem Atemwegsabstrich

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® SARS-CoV-2 Type & FLU 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® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 enthaltene Reagenzien:

- FlexStar® (RT-)PCR Amplification Mix 1.5 (Bestellnr. FS0011515)
- AltoStar® Internal Control 1.5 (Bestellnr. IC15-16/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® SARS-CoV-2 Type & FLU 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 Linie-B-βCoV(E-Gen)-, SARS-CoV-2(S-Gen)- und/oder Influenzavirus-Zielsequenz 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 Linie B-βCoV (E-Gen), SARS-CoV-2 (S-Gen) und/oder Influenzavirus 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 Linie-B-βCoV(E-Gen)-, SARS-CoV-2(S-Gen)- und/oder Influenzavirus-Genoms, die durch in diesem Kit verwendete Primer und/oder Sonden abgedeckt werden, können dazu führen, dass die Erreger trotz Vorhandenseins 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® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 Lots. Dies kann die Leistungsfähigkeit des Produkts beeinträchtigen.

9.1 Probenentnahme, -handhabung und -lagerung

Die Probennahme muss mithilfe von Tupfern mit Enden aus Dacron- oder Polyesterfasern und Kunststoffstielen erfolgen. Bei Verwendung von Trockentupfern müssen diese anschließend in einem universellen Transportmedium (z. B. UTM® von Copan) resuspendiert werden. Calciumalginat-Tupfer, Tupfer mit Holzstielen und/oder Baumwollenden sowie in Agar-Gel gesammelte Tupfer dürfen nicht verwendet werden. Der Transport ist in Übereinstimmung mit den lokalen und nationalen Vorschriften für den Transport biologischer Materialien durchzuführen.

In UTM® resuspendierte Atemwegsabstrich-Proben sind vor ihrer Verwendung nicht länger als 48 Stunden bei Raumtemperatur (+20 °C bis +25 °C), 5 Tage bei +2 °C bis +8 °C oder 2 Monate 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.

HINWEIS



Verwenden Sie keine Tupfer aus Calciumalginat. Dies kann zu fehlerbehafteten oder ungültigen Ergebnissen durch Inhibition der PCR-Reaktion führen.

HINWEIS



Verwenden Sie keine Tupfer mit Holzstielen und/oder Baumwollenden und keine Tupfer mit Agar-Gel als Transportmedium, denn Reste von Holz, Baumwolle oder Agar können den Probentransfer auf den AltoStar® AM16 beeinträchtigen, so dass die Proben nicht verarbeitet werden können.

9.2 Probenvorbereitung

Extrahierte RNA dient als Ausgangsmaterial für das FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5. Die Qualität der extrahierten RNA hat eine tiefgreifende Auswirkung auf die Leistungsfähigkeit des Produkts.

Der FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde mit Proben aus menschlichen Atemwegsabstrichen 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® SARS-CoV-2 Type & FLU 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 LinieB-βCoV(E-Gen)-, SARS-CoV-2(S-Gen)- und/oder Influenzavirus-Zielsequenz 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® SARS-CoV-2 Type & FLU 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® SARS-CoV-2 Type & FLU 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
Linie-B-βCoV-spezifische RNA	E gene	ROX™	(Ohne)
SARS-CoV-2-spezifische RNA	S gene	Cy5	(Ohne)
Influenzavirus(A+B)-spezifische RNA	Flu	FAM™	(Ohne)
Interne Kontrolle	IC	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® SARS-CoV-2 Type & FLU 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			
	ROX™	Cy5	FAM™	JOE™
Positivkontrolle [Linie B-βCoV (E-Gen), SARS-CoV-2 (S-Gen) und Influenzavirus]	+	+	+	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
ROX™ (E-Gen)	Cy5 (S-Gen)	FAM™ [Influenza (A+B)]	JOE™ (IC)	
+	+	-	+/-*	Linie-B-βCoV- und SARS-CoV-2-spezifische RNA detektiert.
+	-	-	+/-*	Nur Linie-B-βCoV-spezifische RNA detektiert.**
-	+	-	+/-*	Nur SARS-CoV-2-spezifische RNA detektiert.**
-	-	+	+/-*	Nur Influenzavirus(A und/oder B)-RNA detektiert.
+	-	+	+/-*	Linie-B-βCoV- und Influenzavirus(A und/oder B)-spezifische RNA detektiert.
-	+	+	+/-*	SARS-CoV-2- und Influenzavirus(A und/oder B)-spezifische RNA detektiert.
+	+	+	+/-*	Linie-B-βCoV-, SARS-CoV-2- und Influenzavirus(A und/oder B)-spezifische RNA detektiert.
-	-	-	+	Weder Linie-B-βCoV- noch SARS-CoV-2- noch Influenzavirus(A und/oder B)-spezifische RNA detektiert. Die Probe enthält keine nachweisbaren Mengen an Linie-B-βCoV-, SARS-CoV-2- oder Influenzavirus-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 ROX™ und/oder im Detektionskanal Cy5 und/oder im Detektionskanal FAM™ nicht notwendig. Eine hohe Konzentration an Linie-B-βCoV(Zielsequenz: E-Gen)- und/oder SARS-CoV-2(Zielsequenz: S-Gen)- und/oder Influenza(A+B)-RNA in der Probe kann zu einem reduzierten oder ausbleibenden Signal der IC führen.

** Detektion in lediglich einem der beiden Detektionskanäle für Linie B-βCoV (E-Gen) bzw. SARS-CoV-2 (S-Gen) kann auf eine niedrige Konzentration an viraler RNA im Bereich der Nachweisgrenze oder auf eine Mutation in einer der beiden Zielsequenzen zurückzuführen sein.

12. Leistungsbewertung

Die Leistung des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde unter Verwendung des WHO-Standards „1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA (NIBSC code: 20/146)“ sowie von handelsüblichem Influenza-A-Virus-Material (Influenza A H3N2, Stamm Wisconsin/67/05) und von handelsüblichem Influenza-B-Virus-Material (Stamm Florida/04/06) bewertet.

12.1 Atemwegsabstriche

12.1.1 Analytische Sensitivität

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze (LoD) wurde eine Verdünnungsreihe des „1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA“ sowie von handelsüblichem Influenza-A-Virus-Material (Influenza A H3N2, Stamm Wisconsin/67/05) und Influenza-B-Virus-Material (Stamm Florida/04/06) in universellem Transportmedium (UTM®, Copan) mit künstlichem Nasalsekret [5 % w/v Mucin, 5 % v/v Blut, 0,8 % v/v NaCl (95 %ige Lösung) und 0,00002 % w/v humane genomische DNA (510k-Antrag für BD MAX™ MRSA XT-Assay; Zugangsnummer: K133605)] angesetzt.

Es wurde eine Verdünnungsreihe des „1st WHO International Standard for SARS-CoV-2 RNA“ von 1,00E+04 IU/ml bis 5,00E-01 IU/ml getestet. Für Influenza-A-Virus und Influenza-B-Virus wurde eine Verdünnungsreihe von 2,00E+03 Kopien/ml bis 1,00E+01 Kopien/ml getestet.

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® SARS-CoV-2 Type & FLU 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® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 für SARS-CoV-2 (S-Gen)

Konzentration [IU/ml]	N [gesamt]	N [positiv]	Trefferquote [%]
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

Die LoD des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 für den Nachweis von SARS-CoV-2 (S-Gen) in UTM® beträgt 201 IU/ml (95 % Vertrauensintervall: 107–501 IU/ml).

Tabelle 10: PCR-Ergebnisse zur Berechnung der analytischen Sensitivität des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 für SARS-CoV-2 (E-Gen)

Konzentration [IU/ml]	N [gesamt]	N [positiv]	Trefferquote [%]
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

Die LoD des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 für den Nachweis von SARS-CoV-2 (E-Gen) in UTM® beträgt 226 IU/ml (95 % Vertrauensintervall: 124–545 IU/ml).

Tabelle 11: PCR-Ergebnisse zur Berechnung der analytischen Sensitivität des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 für das Influenza-A-Virus

Konzentration [Kopien/ml]	N [gesamt]	N [positiv]	Trefferquote [%]
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

Die LoD des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 für den Nachweis von Influenza-A-Virus in UTM® beträgt 341 Kopien/ml (95 % Vertrauensintervall: 230–611 Kopien/ml).

Tabelle 12: PCR-Ergebnisse zur Berechnung der analytischen Sensitivität des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 für das Influenza-B-Virus

Konzentration [Kopien/ml]	N [gesamt]	N [positiv]	Trefferquote [%]
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

Die LoD des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 für den Nachweis von Influenza-B-Virus in UTM® beträgt 432 Kopien/ml (95 % Vertrauensintervall: 286–780 Kopien/ml).

12.1.2 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU 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 SARS-CoV-2- und Influenzavirus-Genotypen detektiert werden.

Zur Überprüfung der analytischen Spezifität des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU 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

30 für SARS-CoV-2, Influenza-A-Virus und Influenza-B-Virus negative Atemwegsabstrich-Proben von Einzelspendern wurden mit dem FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 getestet. Alle (30 von 30) Proben wurden negativ für SARS-CoV-2-, Influenza-A-Virus- und Influenza-B-Virus-spezifische RNA getestet und positiv für die IC. Die analytische Spezifität des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 für Atemwegsabstrich-Proben beträgt $\geq 95\%$.

12.1.2.2 Störende Substanzen

Zur Bewertung des Einflusses potentiell störender endogener und exogener Substanzen auf die Leistung des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 wurden ausgewählte Substanzen in UTM® mit SARS-CoV-2, Influenza-A-Virus und Influenza-B-Virus in einer finalen Konzentration von $3 \times \text{LoD}$ ($6,03\text{E}+02$ IU/ml, $1,02\text{E}+03$ Kopien/ml bzw. $1,29\text{E}+03$ Kopien/ml) sowie in UTM® ohne SARS-CoV-2, Influenza-A-Virus und Influenza-B-Virus angereichert.

Die Ergebnisse für Proben mit potentiell störenden Substanzen wurden mit den Ergebnissen verglichen, die mit UTM® ohne angereicherte störenden Substanzen erhalten wurden. Jede Probe wurde in 3 Replikaten verarbeitet.

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

- Endogene Substanzen
 - Menschliche genomische DNA
 - Humanes Vollblut
 - Mucin
- Exogene Substanzen
 - Antiallergisches Nasenspray (mit Beclomethason-Dipropionat)
 - Abschwellendes Nasenspray (mit Xylometazolinhydrochlorid und Dexpanthenol)

- Mupirocin
- Zanamivir

VORSICHT



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

12.1.2.3 Kreuzreaktionen

Die analytische Spezifität des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 in Bezug auf Kreuzreaktionen mit anderen Erregern als SARS-CoV-2, Influenza-A-Virus, Influenza-B-Virus wurde durch Tests mit folgenden Erregern ermittelt:

- Mit SARS-CoV-2 und Influenza-Viren verwandten Erregern
- Erregern, die vergleichbare Symptome hervorrufen wie eine Infektion mit SARS-CoV-2 oder Influenzaviren

Der FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 zeigte keine Kreuzreaktionen mit den folgenden Erregern:

- Adenovirus
- *Bordetella pertussis*
- *Bordetella parapertussis*
- *Chlamydia pneumoniae*
- Enterovirus
- *Haemophilus influenzae*
- Humanes Coronavirus 229E
- Humanes Coronavirus NL63
- Humanes Coronavirus OC43
- Humanes Metapneumovirus (hMPV)
- *Legionella pneumophila*
- MERS-Coronavirus
- *Moraxella catarrhalis*
- *Mycoplasma pneumoniae*
- Parainfluenza-Virus 1-4
- *Pneumocystis jirovecii*
- Respiratorisches Synzytial-Virus A
- Respiratorisches Synzytial-Virus B
- Rhinovirus
- *Streptococcus pneumoniae*

VORSICHT



Sollten die Proben andere Erreger als Linie B-βCoV (E-Gen), SARS-CoV-2 (S-Gen) und/oder Influenzavirus 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 Inklusivität

Die Spezifität des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 in Bezug auf den Nachweis der unterschiedlichen SARS-CoV-2-Varianten wird in erster Linie durch die Auswahl der Primer und Sonden sichergestellt. Um zu verifizieren, dass der FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 für den Nachweis verschiedener SARS-CoV-2-Varianten und unterschiedlicher Stämme von Influenzaviren geeignet ist, wurden die nachfolgend genannten Varianten/Stämme getestet (siehe Tabellen 13 und 15).

Tabelle 13: Getestete SARS-CoV-2-Linien

Variante (Linie)	Detektionskanal ROX™ (E-Gen)	Detektionskanal Cy5 (S-Gen)	Detektionskanal VIC™ (IC)
BetaCoV/Munich/ChVir984/2020 (Wildtyp)	+	+	+
2019-nCoV/Italy-INMI1 (Wildtyp)	+	+	+
Alpha (B.1.1.7)	+	+	+
Beta (B.1.351)	+	+	+
Delta (B.1.617.2)	+	+	+
Gamma (P.1)	+	+	+

Tabelle 14: Inklusivität [in-silico-Analyse von 2.993.884 Vollgenom-Sequenzen aus SARS-CoV-2, am 10. Oktober 2021 über GISAID e.V. (www.gisaid.org) veröffentlicht, sowie 518.615 Vollgenom-Sequenzen, am 10. Oktober 2021 veröffentlicht über das National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov), für die E-Gen- und die S-Gen-Zielsequenz: FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5]

3.512.499 Vollgenom-Sequenzen		Sequenzen mit 100 % Homologie	Sequenzen mit Fehlpaarungen (Anzahl der Fehlpaarungen)
E-Gen	Vorwärts-Primer	3.505.942	6.549 (1) 8 (2)
	Rückwärts-Primer	3.509.461	3.032 (1) 5 (2) 1 (3)**
	Sonde	3.510.308	2.183 (1) 4 (2)
S-Gen	Vorwärts-Primer	3.491.594	20.728 (1) 160 (2)
	Rückwärts-Primer	3.490.361	22.061 (1) 77 (2)
	Sonde	3.498.798	13.653 (1) 44 (2) 3 (3) 1 (4)*

* Die Sequenz (Zugangs-ID EPI_ISL_415593, GISAID) wies 4 Fehlpaarungen im Bereich der Sonden-Bindungssequenz für das S-Gen auf. Diese Sequenz wurde am 10. März 2020 veröffentlicht und stammt aus Washington, USA. Seitdem wies keine der publizierten Sequenzen mehr so viele Fehlpaarungen auf. Die Autoren kommentierten die Sequenz wie folgt: „Vorsicht! NNN-Abschnitte (1,74 % der gesamten Sequenz)“, was auf eine nicht-ideale Qualität der Sequenzierung hinweist. Die Auswirkungen auf die für das S-Gen spezifischen Oligonukleotide wurden demnach nicht untersucht.

** Die Sequenz (Zugang MW584978.1) wies 3 Fehlpaarungen im Bereich der Rückwärts-Primer-Bindungssequenz für das E-Gen auf. Diese Probe wurde am 3. April 2020 in Cleveland, USA, genommen und das Ergebnis im Februar 2021 veröffentlicht. Seitdem wies keine der publizierten Sequenzen mehr so viele Fehlpaarungen auf.

Mutationen, die ≤ 2 Fehlpaarungen in einer einzelnen Oligonukleotidsequenz zur Folge haben, wirken sich höchstwahrscheinlich nicht signifikant negativ auf die Leistungsfähigkeit des Tests aus. Für alle derartigen Sequenzen (mit ≤ 2 Fehlpaarungen), die bisher im Zuge der Überwachung nach Markteinführung der SARS-CoV-2-Nachweiskits von RealStar®, FlexStar® und AltoStar® im Labor getestet wurden, wurde bestätigt, dass die Leistung durch diese Mutationen nicht beeinträchtigt war. Mit Ausnahme einer einzigen spezifischen Sequenz wies keine der analysierten Sequenzen in mehr als einem der Oligonukleotide Basenfehlpaarungen auf, und in keiner der Fehlpaarungen enthaltenden Sequenzen wurden mit beiden spezifischen Detektionssystemen (für E-Gen und S-Gen) gleichzeitig Fehlpaarungen nachgewiesen. Dementsprechend kann geschlossen werden, dass die Reaktivität der in den SARS-CoV-2-Nachweiskits von RealStar®, FlexStar® und AltoStar® verwendeten spezifischen Oligonukleotide nicht beeinträchtigt ist.

Tabelle 15: Getestete Stämme von Influenza-A- und Influenza-B-Virus

Subtyp/Stamm	Detektionskanal FAM™ (Influenza-A- und B-Virus)	Detektionskanal VIC™ (IC)
Influenza-A-Virus, Subtyp H1N1 (New Caledonia/20/98)	+	+
Influenza-A-Virus, Subtyp H1N1pdm09 (A/NY/02/2009)	+	+
Influenza-A-Virus, Subtyp A/H3N2 Drift- Variante (A/Sachsen/2/2015)	+	+
Influenza-A-Virus, Subtyp H5N1 (A/Anhui/1/05)	+	+
Influenza-B-Virus, (B/Colorado/6/2017, B-Victoria-Linie)	+	+
Influenza-B-Virus (B/Phuket/3073/2013, B/Yamagata-16/88-Linie)	+	+

12.1.4 Präzision

Die Präzision des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde anhand eines Panels folgender Proben ermittelt:

- 1 hochpositive [50 x LoD (1,00E+04 IU/ml)] Probe für SARS-CoV-2 in UTM® mit künstlichem Nasalsekret
- 1 hochpositive [50 x LoD (1,70E+04 Kopien/ml)] Probe für Influenza-A-Virus in UTM® mit künstlichem Nasalsekret
- 1 hochpositive [50 x LoD (2,16E+04 Kopien/ml)] Probe für Influenza-B-Virus in UTM® mit künstlichem Nasalsekret
- 1 schwach positive [3 x LoD (6,03E+02 IU/ml)] Probe für SARS-CoV-2 in UTM® mit künstlichem Nasalsekret
- 1 schwach positive [3 x LoD (1,02E+03 Kopien/ml)] Probe für Influenza-A-Virus in UTM® mit künstlichem Nasalsekret
- 1 schwach positive [3 x LoD (1,29E+03 Kopien/ml)] Probe für Influenza-B-Virus in UTM® mit künstlichem Nasalsekret
- 1 für SARS-CoV-2, Influenza-A-Virus und Influenza-B-Virus negative Probe (UTM® mit künstlichem Nasalsekret)

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® SARS-CoV-2 Type & FLU 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 SARS-CoV-2, Influenza-A-Virus- und Influenza-B-Virus-hochpositiven Proben (siehe Tabellen 16 und 17)
- Werte des Schwellenwertzyklus (C_q^*) für die IC in den SARS-CoV-2-, Influenza-A-Virus- und Influenza-B-Virus-negativen Proben (siehe Tabelle 18)

* 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 16: Präzisionsdaten (Variationskoeffizient, CV % C_q -Werte) für hochpositive SARS-CoV-2-Proben

	Hochpositive SARS-CoV-2-Probe (C_q im Detektionskanal ROX™, Ziel E-Gen)	Hochpositive SARS-CoV-2-Probe (C_q im Detektionskanal Cy5, Ziel S-Gen)
Laufinterne Variabilität	0,21–0,42	0,44–0,60
Variabilität zwischen Lots	0,59	0,52
Gesamtvariabilität	0,89	0,63

Alle bei 3 x LoD getesteten Proben (schwach positive Proben) wurden positiv für SARS-CoV-2 (E-Gen und S-Gen) getestet.

Tabelle 17: Präzisionsdaten (Variationskoeffizient, CV % C_q -Werte) für die Influenza-A-Virus- und Influenza-B-Virus-hochpositiven Proben

	Hochpositive Influenza-A-Virus-Probe (C_q im Detektionskanal FAM™)	Hochpositive Influenza-B-Virus-Probe (C_q im Detektionskanal FAM™)
Laufinterne Variabilität	0,93–1,16	0,52–1,48
Variabilität zwischen Lots	1,02	1,02
Gesamtvariabilität	1,48	1,69

Alle bei 3 x LoD getesteten Proben (schwach positive Proben) wurden positiv für Influenza-A-Virus und Influenza-B-Virus getestet.

Tabelle 18: Präzisionsdaten (Variationskoeffizient, CV % C_q-Werte) für die IC in für SARS-CoV-2, Influenza-A-Virus und Influenza-B-Virus negativen Proben

	IC
Laufinterne Variabilität	0,23–0,35
Variabilität zwischen Lots	0,38
Gesamtvariabilität	0,74

12.1.5 Gesamtausfallrate

Die Robustheit des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde durch das Testen von 30 SARS-CoV-2-, Influenza-A-Virus- und Influenza-B-Virus-negativen menschlichen Atemwegsabstrich-Proben, angereichert mit SARS-CoV-2, Influenza-A-Virus und Influenza-B-Virus bis zu einer Endkonzentration von 3 x LoD (6,03E+02 IU/ml SARS-CoV-2, 1,02E+03 Kopien/ml Influenza-A-Virus und 1,29E+03 Kopien/ml Influenza-B-Virus). Alle (30 von 30) Proben wurden in den SARS-CoV-2-spezifischen Fluoreszenzdetektionskanälen (Cy5 und ROX™) sowie in dem für Influenza-A-Virus und Influenza-B-Virus spezifischen Fluoreszenzdetektionskanal (FAM™) positiv getestet.

12.1.6 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.

12.1.7 Klinische Leistungsdaten

Der FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde in einer Studie mit dem CE-markierten *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) verglichen. Nachträglich wurden 165 Einzelproben menschlicher Atemwegsabstriche parallel getestet.

Das *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) wurde in Kombination mit dem MagNA Pure 96 DNA and Viral NA Small Volume Kit (Roche) und dem MagNA Pure 96 Extraction System (Roche) eingesetzt.

Der FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 wurde in Kombination mit 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 (164 für SARS-CoV-2 und 152 für Influenzavirus) sind in den Tabellen 19 und 20 angegeben.

Tabelle 19: Testergebnisse zur Bewertung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität für SARS-CoV-2 in Atemwegsabstrichen

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

Die diagnostische Sensitivität und Spezifität des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 betragen verglichen mit dem *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) 100 % (Vertrauensintervall 93,8 %–100 %) bzw. 99,1 % (Vertrauensintervall 94,9 %–100 %).

Tabelle 20: Ergebnis der Bewertung der diagnostischen Sensitivität und Spezifität für Influenzavirus in Atemwegsabstrichen

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

Die diagnostische Sensitivität und Spezifität des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU RT-PCR Detection Mix 1.5 betragen verglichen mit dem *ampliCube* Respiratory Flu & SARS-CoV-2 LC (Mikrogen Diagnostik) 100 % (Vertrauensintervall 90,1 %–100 %) bzw. 95,3 % (Vertrauensintervall 95,3 %–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 Firma altona Diagnostics GmbH wird jedes Lot des FlexStar® SARS-CoV-2 Type & FLU 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] Versalovic, James, Carroll, Karen C., Funke, Guido, Jorgensen, James H., Landry, Marie Louise and David W. Warnock (ed). Manual of Clinical Microbiology. 10. Ausgabe. ASM Press, 2011.
- [2] Cohen, Jonathan, Powderly, William G, and Steven M Opal. Infectious Diseases, Dritte Ausgabe. Mosby, 2010.
- [3] International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Index of Viruses — Orthomyxovirus (2019). Virus Taxonomy: 2018b Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, letzter Zugriff am 24. März 2020.
- [4] Kawaoka Y, ed. (2006) „Influenza Virology: Current Topics“ Caister Academic Press ISBN 978-1-904455-06-6. <https://www.caister.com/flu>, letzter Zugriff am 24. März 2020.
- [5] Bouvier NM, Palese P (2008). „The biology of influenza viruses“ Vaccine. Band.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 Band 40, Ausgabe 1:68-85. doi:10.1093/femsre/fuv039. PMID 26385895.
- [7] World Health Organization (WHO). Fact sheets - „Influenza (Seasonal)“ 18. November 2018 [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)), letzter Zugriff am 24. März 2020.

17. Handelsmarken und Haftungsausschlüsse

AltoStar®, FlexStar® (altona Diagnostics); CFX96™ (Bio-Rad); UTM® (Copan); Rotor-Gene® (QIAGEN); LightCycler® (Roche); FAM™, JOE™, ROX™, VIC™ (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® SARS-CoV-2 Type & FLU 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 21: Änderungshistorie

Kennung	Datum der Ausgabe [Monat/Jahr]	Änderungen
MAN-FS0021510-DE-S01	02/2022	Erste Veröffentlichung

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



COV-FlexStar-DM-CE-EN-02_01/2021