

  
ender **MASS**

ender MASS ist ein in-vitro-diagnostischer Test, der auf einer schnellen molekularen isothermalen Nukleinsäure-Amplifikationstechnologie [1] und einem im Vergleich zu RT-PCR Methoden stark vereinfachten Probenvorbereitungsverfahren basiert. Er ist für den qualitativen Nachweis der ORF-1a-Gensequenz aus der viralen RNA von SARS-CoV-2 [2] in direkten Nasen-, Nasen-Rachen- oder Rachenabstrichen von Personen bestimmt, die klinische Symptome von COVID-19 zeigen. Der Test wird auf Standard-Real-Time-Polymerase-Kettenreaktions-Geräten (RT-PCR) durchgeführt (siehe unten für weitere Details zu Spezifikationen).

Der ender MASS Test identifiziert SARS-CoV-2 RNA in klinischen Proben. Die SARS-CoV-2-RNA ist im Allgemeinen in respiratorischen Proben während der akuten Phase der Infektion nachweisbar [3]. Positive Ergebnisse sind ein Hinweis auf das Vorhandensein von SARS-CoV-2 RNA; eine klinische Korrelation mit der Patientengeschichte und anderen diagnostischen Informationen ist notwendig, um den Infektionsstatus des Patienten zu bestimmen. Positive Ergebnisse schließen eine bakterielle Infektion oder eine Co-Infektion mit anderen Viren nicht aus.

Negative Ergebnisse schließen eine SARS-CoV-2-Infektion nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für Entscheidungen für das Patientenmanagement herangezogen werden. Negative Ergebnisse sollten im Zusammenhang mit den jüngsten Expositionen eines Patienten, seiner Vorgeschichte und dem Vorliegen klinischer Zeichen und Symptome, die mit COVID-19 übereinstimmen, betrachtet werden.

Der ender MASS Test ist für die Verwendung durch medizinisches Fachpersonal oder geschultes Laborpersonal bestimmt, welches im Umgang mit RT-PCR-Geräten und molekularbiologischen Standardlaborverfahren geübt ist.

## ● Grundsätze des Testverfahrens:

ender MASS basiert auf einer isothermen Amplifikation [1] und Echtzeit-Detektionstechnologie der SARS-CoV-2 ORF-1a-Gensequenz [2]. Die Amplifikationsreaktion findet bei einer konstanten Temperatur von 65 °C statt. Es sind keine thermischen Zyklen erforderlich, da die Polymerase eine Helikase-Aktivität besitzt. Primer-Bindung und Amplifikation erfolgen daher sofort und kontinuierlich. Ein separater Schritt der reversen Transkription ist aufgrund der reversen Transkriptionsaktivität des verwendeten Enzyms nicht erforderlich. Reverse transkribierte und amplifizierte DNA wird durch einen fluoreszierenden DNA-interkalierenden Farbstoff nachgewiesen. Nach isothermer Amplifikation wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um das SARS-CoV-2-Amplifikationsprodukt von der internen Amplifikationskontrolle (IC) zu unterscheiden. Die beiden Targets werden anhand ihrer Schmelztemperatur identifiziert. Die erforderliche Gesamtreaktionszeit beträgt 30 Minuten.

Die Probenvorbereitung erfordert keine zeitaufwändige RNA-Extraktion. Stattdessen wird zur Probenvorbereitung ein einfacher Heiz- und Verdünnungsschritt durchgeführt.

## Reagenzien und Materialien:

Farbe / Symbol	ender MASS-80 (Kat.-Nr.: EM16S)	ender MASS-240 (Kat.-Nr.: EM16M)	ender MASS-400 (Kat.-Nr.: EM16L)
Gesamtzahl der Reaktionen	80	240	400
Blau / <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">1</span>	2x 160 µl	6x 160 µl	10x 160 µl
Grün / <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">2</span>	2x 1200 µl	6x 1200 µl	10x 1200 µl
Gelb/ <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">lys</span>	2x 1600 µl	6x 1600 µl	10x 1600 µl
Rot / <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">pos</span>	1x 40 µl für 5 Läufe	2x 40 µl für 10 Läufe	2x 40 µl für 10 Läufe

**Tube "1" (blauer Deckel):** Primer-Mischung mit Primern für SARS-CoV-2, der Internen Kontrolle (IC) und Primern für die Zielsequenz der IC

**Röhrchen "2" (grüner Deckel):** Amplifikations-Enzym in Reaktionspuffer

**Tube "lys" (gelber Deckel):** Lyse-Puffer (ungefährlich)

**Röhrchen "pos" (roter Deckel):** Positivkontrolle (nicht infektiöses, ungefährliches Plasmid)

**Negativkontrolle:** H<sub>2</sub>O von molekularer Qualität verwenden (nicht im Testkit enthalten).

## ● Probenahme:

Verwenden Sie Abstrich Systeme, die für die Probenentnahme in den oberen Atemwegen zugelassen sind und verwenden Sie UTM- oder Amies-Puffer für die Lagerung und den Transport der Proben bis zur Verarbeitung. Transportmedien, die Guanidin-Thiocyanat enthalten, hemmen die Amplifikationsreaktion und können nicht verwendet werden. Befolgen Sie die Gebrauchsanweisung des Herstellers des Abstrich Systems.

## ● Verfahren zur Probenvorbereitung:

Wir empfehlen, den Lysepuffer bei der ersten Anwendung des Testkits in 40 µl Aliquots (Schritte 1. und 2.) zu aliquotieren.

1. Den Lysepuffer (Röhrchen "Lys" mit gelbem Deckel) durch Vortexen gut mischen
2. Für jede der zu analysierenden Proben werden 40 µl des Lysepuffers in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Verwenden Sie eine Pipettenspitze mit einer großen Öffnung (z.B. 1000 µl Pipettenspitze). Wichtig: Um alle Komponenten des Lysepuffers in Lösung zu haben, das "Lys"-Röhrchen nach jeweils 5 Proben kurz vortexen.
3. 100 µl der Probe hinzufügen
4. 2 Minuten lang bei 95°C in einem Thermoshaker erhitzen und bei voller Geschwindigkeit schütteln
5. Legen Sie die Probe sofort auf Eis und geben Sie die Probe schnell in die vorbereitete Master-Mischung (siehe unten)

## ● Verwendung des ender MASS Testkit:

Verwenden Sie für die Durchführung der Amplifikationen die vom Hersteller des RT-PCR-Geräts empfohlenen Verbrauchsmaterialien.

Es wird empfohlen, RNase- und DNase-freies Plastikmaterial zu verwenden und Reaktionsaufbau auf Eis durchzuführen.

**Vorgehensweise pro Probe und Reaktion: Bereiten Sie die Reaktionsmischung in der folgenden Reihenfolge vor:**

1. 30 µl Enzymlösung vorlegen (Röhrchen 2 mit grünem Deckel)
2. 8 µl H<sub>2</sub>O (molecular grade) hinzufügen
3. Pipettieren Sie 4 µl der Primer-Mischung einschließlich der Internen Kontrolle dazu (Röhrchen 1 mit blauem Deckel)
4. 8 µl der vorbereiteten Probe einer bestimmten Probe hinzufügen

Behandeln Sie jede Probe in einer separaten Reaktion.

**Hinweis:** Berechnen Sie die Gesamtmenge jedes benötigten Reagenzes einschließlich aller Proben und Kontrollen und stellen Sie einen Primer- und Enzym-Mastermix aus 1), 2) und 3) zusammen.

Durch vorsichtiges vortexen mischen und zentrifugieren, um die Lösung vollständig im Reaktionsgefäß zu sammeln. Aliquotieren Sie 42 µl des Mastermix in jedes Reaktionsgefäß und fügen Sie 8 µl der vorbereiteten Probe oder Kontrollen jeweils mit einer frischen Pipettenspitze hinzu.

Messen Sie eine Positiv- und Negativkontrolle in jedem Lauf auf dem RT-PCR Gerät, indem Sie je 8 µl der Positivkontrolllösung und H<sub>2</sub>O (molecular grade) anstelle der vorbereiteten Probenlösung verwenden, aber einschließlich aller anderen Reagenzien wie unter 1), 2) und 3) oben beschrieben.

Nach der Vorbereitung aller Reaktionen werden die Reaktionen in die RT-PCR-Maschine gegeben.

## ● Amplifikation und Identifizierung der SARS-CoV-2 RNA ORF-1a Gensequenz in nicht-extrahierten Proben:

Verwenden Sie eine Standard-RT-PCR-Maschine, die entsprechend dem unten gezeigten Amplifikations- und Nachweisprotokoll programmiert werden kann.

### **Amplifikationsmethode:**

Isotherme Amplifikation und Schmelzkurvenanalyse Programm:

1. 30 Minuten bei 65 °C, einmal pro Minute Fluoreszenzdaten aufzeichnen
2. Zur Bewertung der Schmelztemperatur des Amplifikationsproduktes einen Temperaturgradienten von 80 °C bis 90 °C anwenden und die Fluoreszenz kontinuierlich aufzeichnen

### **Detektion der Ergebnisse:**

Das Fluoreszenzsignal von SYBR Grün / FAM oder eines äquivalenten Kanals (Anregung bei ca. 470 nm, Detektion bei ca. 514 nm) wird für jede Reaktion während des Amplifikations- und des Schmelzkurvenschritts aufgezeichnet. Die Analyse erfolgt nach dem Lauf.

### **Interpretation der Ergebnisse:**

Um festzustellen, ob eine Probe SARS-CoV-2-RNA enthält, vergleichen Sie die Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) mit den Positiv- und Negativ-Assay-Kontrollen. Die Ct-Werte der Amplifikationskurven sind für die Unterscheidung zwischen einem positiven und einem negativen Ergebnis nicht relevant. Eine positive, sigmoidale Amplifikationskurve zeigt die korrekte Amplifikation entweder der SARS-CoV-2 Zielsequenz oder der Internen Kontrolle (IC) an. Liegt keine sigmoidale Amplifikationskurve vor, muss der Test aufgrund von Inhibition oder falscher Handhabung als ungültig betrachtet werden. In diesem Fall muss die Probe erneut getestet werden.

Entspricht die T<sub>m</sub> der Probe der T<sub>m</sub> der Negativ-Assay-Kontrolle  $\pm 0,5$  °C, ist sie als SARS-CoV-2-RNA-negativ zu interpretieren. In diesem Fall wurde die Interne Kontrolle (IC) amplifiziert. Auf dem Roche LightCycler 96 liegt die T<sub>m</sub> der IC bei ca. 83,0 °C. Auf Ihrem Gerät kann die T<sub>m</sub> leicht abweichen. Bitte notieren Sie sich diesen Wert als Referenz für Ihre Proben.

Wenn die  $T_m$  der Probe zwischen  $-0,5\text{ °C}$  und  $+1,0\text{ °C}$  der positiven Assay-Kontrolle liegt, ist die Probe als SARS-CoV-2-positiv zu interpretieren. Auf dem Roche LightCycler 96 liegt die  $T_m$  von SARS-CoV-2 bei  $86,0\text{ °C}$ . Auf Ihrem Gerät kann die  $T_m$  leicht abweichen.

Proben mit einer geringen Menge an SARS-CoV-2-RNA können zwei Schmelzpeaks aufweisen, einen für das SARS-CoV-2-RNA-Ziel und einen für die IC. Dieses Ergebnis muss als SARS-CoV-2-positiv interpretiert werden.

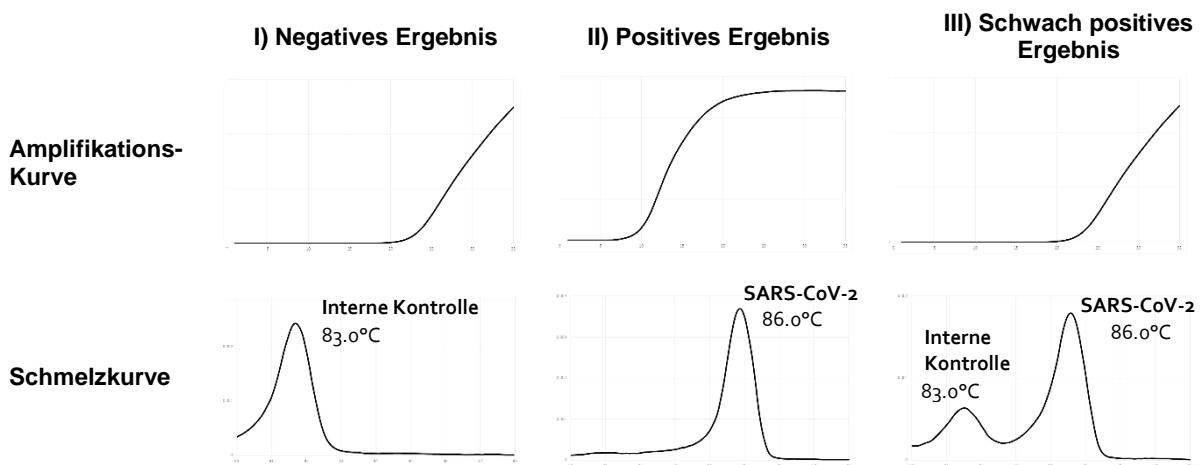


Abbildung 1: Interpretation der Testergebnisse

- I. Die Gültigkeit des gesamten Testlaufes wird durch ein negatives Ergebnis für die Negativkontrolle ( $T_m\ 83,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ ) und ein positives Ergebnis ( $T_m\ 85,5\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ ) für die Positivkontrolle angezeigt.
- II. Die Ungültigkeit des gesamten Laufs wird durch ein positives Ergebnis ( $T_m\ 85,5\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ ) für die Negativkontrolle (Kontamination wird vermutet) und/oder ein negatives Ergebnis ( $T_m\ 83,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ ) für die Positivkontrolle angezeigt. Im Falle der Ungültigkeit des gesamten Laufs dürfen die Ergebnisse für keine der Proben desselben Laufs verwendet werden.
- III. Ergebnis für die IC im Falle eines gültigen Testlaufes: Positives Ergebnis mit einer Schmelztemperaturspitze bei  $86,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  (die Amplifikation der IC wird durch die Amplifikation der Proben-Zielsequenz SARS-CoV-2 unterdrückt). Das Ergebnis für die entsprechende Probe ist gültig und kann verwendet werden. Das Ergebnis für die Probe ist positiv für das Vorhandensein der SARS-CoV-2 ORF-1a-Gensequenz, wenn ein Peak bei einer Schmelztemperatur von  $86,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  detektiert wird. Das Ergebnis für die Probe ist negativ, wenn ein Peak bei einer Schmelztemperatur von  $86,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  fehlt und ein Peak bei einer Schmelztemperatur von  $83,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$  für die IC vorhanden ist.
- IV. Ergebnis für die IC bei ungültigem Testlauf: kein Ergebnis für die Amplitifikationskurve mit einem fehlenden Peak für die Schmelztemperatur. Im Falle eines ungültigen Testlaufes, das durch ein fehlendes Ergebnis für die IC angezeigt wird, dürfen die Ergebnisse für die entsprechende Probe nicht verwendet werden.

## ● Verwendung des Testkits:

- Der Test ist nur für den *in-vitro*-diagnostischen Gebrauch bestimmt.
- Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse hängt von einem angemessenen Verfahren zur Entnahme, Lagerung, Transport und Verarbeitung der Proben ab.
- Die Reagenzien des Testkits sind nur zum einmaligen Gebrauch bestimmt.
- Der Arbeitsablauf im Labor sollte in einer unidirektionalen Weise ablaufen, wobei den spezifischen Arbeitsbereichen entsprechende Materialien und Geräte zur Verfügung stehen sollten
- Wenn nicht alle in einem Testkit-Röhrchen enthaltenen Reaktionen zu einem bestimmten Zeitpunkt verwendet werden, können die restlichen Reagenzien nacheinander verwendet werden. Der Anwender muss sicherstellen, dass er die gute Laborpraxis anwendet und idealerweise Filterspitzen verwendet, um keine Reagenzien durch SARS-CoV-2 positive Patientenproben, Positivkontrollen oder Amplifikationsprodukte zu kontaminieren.
- Wenn Testkits nacheinander verwendet werden, muss das Testkit in der Originalverpackung unter den angegebenen Bedingungen gelagert werden.

## ● Warnhinweise:

- I. Das Reaktionsgefäß nach der Amplifikation nicht öffnen, um eine mögliche Kontamination des Arbeitsbereichs mit Amplifikationsprodukt zu vermeiden, die zu falschen Ergebnissen bei anderen Proben führen könnte.
- II. Verwenden Sie nur die vom Hersteller des RT-PCR-Geräts empfohlenen Reaktionsgefäße, um ein mögliches Öffnen der Reaktionsgefäße während der Amplifikationsreaktion und des Schmelzkurvenverlaufs aufgrund der Entwicklung eines zu hohen Drucks im Gefäß zu vermeiden. Die Folge wäre eine mögliche Kontamination des Arbeitsbereichs, was zu falsch positiven Ergebnissen bei anderen Proben führen würde.
- III. Verwenden Sie die Reaktion nicht für eine zweite Probe, da das Ergebnis immer das des ersten Probendurchlaufs sein wird.
- IV. Verwenden Sie die Volumina pro Reaktion wie in dieser IFU beschrieben. Geringere Volumina führen zu unzuverlässiger Leistung des Testkits und damit zu ungültigen Ergebnissen.
- V. ender MASS-Reagenzien nicht mit im Labor hergestellten Reagenzien mischen. Ein solches Vorgehen führt zu unzuverlässiger Leistung des Testkits und damit zu ungültigen Ergebnissen.
- VI. Mischen Sie keine ender MASS-Reagenzien verschiedener Chargen (Chargennummer ist auf den einzelnen Reagenzröhrchen angegeben). Ein solches Vorgehen führt zu unzuverlässiger Leistung des Testkits und damit zu ungültigen Ergebnissen.
- VII. Entsorgen Sie die verschlossenen Reaktionsgefäße gemäß den örtlichen Vorschriften für nicht infektiöse und nicht gefährliche Proben.
- VIII. Wenn verschüttete Reagenzien oder beschädigte Röhrchen beim Öffnen der Verpackung des Testkits identifiziert werden, muss das Testkit entsorgt werden und kann nicht verwendet werden.

- IX. ender MASS ist ein sehr empfindlicher Assay und jede Kontamination des Arbeitsbereichs mit Ziel-RNA kann potenziell zu falsch positiven Testergebnissen führen. Daher müssen die Proben mit hoher Vorsicht und entsprechend der guten Laborpraxis gehandhabt werden.

## ● Einschränkungen:

- I. Die Leistung des ender MASS-Tests wurde nur mit den in dieser Produktbeilage angegebenen Verfahren bewertet. Änderungen an diesen Verfahren können die Leistung des Tests verändern.
- II. Falsch-negative Ergebnisse können auftreten, wenn eine Probe unsachgemäß entnommen, transportiert oder gehandhabt wird. Falsch-negative Ergebnisse können auch auftreten, wenn Amplifikationsinhibitoren in der Probe vorhanden sind oder wenn die Viren in unzureichender Menge in der Probe vorhanden sind. Negative Ergebnisse sollten im Zusammenhang mit den jüngsten Expositionen eines Patienten, seiner Vorgeschichte und dem Vorliegen klinischer Zeichen und Symptome, die mit COVID-19 übereinstimmen, betrachtet werden.
- III. Wie bei jedem molekularen Test könnten Mutationen innerhalb der Zielregionen des ender MASS-Tests die Primer-Bindung beeinflussen, was dazu führen könnte, dass die Anwesenheit des Virus nicht nachgewiesen werden kann.
- IV. Der Test kann Krankheiten, die durch andere bakterielle oder virale Erreger verursacht werden, nicht nachweisen oder ausschließen.

## ● Diagnostische Leistungsdaten:

Die diagnostische Leistung von ender MASS wurde anhand von 74 nasopharyngealen Abstrichproben bewertet, die von Personen mit Anzeichen und Symptomen von Atemwegserkrankungen entnommen wurden. Die positiven Proben wurden durch RT-PCR als Referenzmethode überprüft und ebenfalls unter Anwendung des von der WHO veröffentlichten Protokolls als positiv bestätigt [4].

Diagnostische Sensitivität: 93,0% (40/43 - 95% CI: 80,9%-98,5)

Diagnostische Spezifität: 100% (31/31 - 95% CI 88,8%-100%).

PPV: 100 %,

NPV: 99,2% (CI 97,7%-99,7%) bei einer Prävalenz von 10%.

## ● Analytische Leistungsdaten:

Untere Nachweisgrenze (LoD): 480 Kopien SARS-CoV-2 RNA / Reaktion (AccuPlex™ SARS-CoV-2 Verification Panel, SeraCare, MA, USA; Material Nr. 0505-0129)

Die LoD wurde als die niedrigste Konzentration bestimmt, die in  $\geq 95\%$  der Fälle festgestellt wurde (d. h. Konzentration, bei der mindestens 19 von 20 Wiederholungen positiv getestet wurden).

Die Kreuzreaktivität wurde *in silico* und \*wet lab analysiert: \*Humanes Coronavirus 229E, Humanes Coronavirus OC43, Humanes Coronavirus HKU1, \*Humanes Coronavirus NL63, SARS-Coronavirus, MERS-Coronavirus, \*Adenovirus, Humanes Metapneumovirus, Parainfluenza-Virus 1-4, \*Influenza A & B, \*Enterovirus, \*Respiratorisches Syncytialvirus, \*Rhinovirus, \*Chlamydia pneumoniae, Haemophilus influenzae, Legionella pneumophila, Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, \*Bordetella pertussis, \*Mycoplasma pneumoniae, Pneumocystis jirovecii, Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermis, Streptococcus salivarius.

## ● Name und Adresse des Herstellers:

ender diagnostics ag, Freiburgstrasse 251, 3018 Bern, Schweiz

Artikelnummer	EM16S	EM16M	EM16L
Anzahl der Tests	80	240	400

**Lagerung:** Röhrchen "1", "2", "pos" und "lys" bei  $\leq -20$  °C; nur bis zu dem auf der Verpackung des Testkits angegebenen Verfallsdatum verwenden.

## ● Vom Benutzer zur Verfügung gestellte Materialien:

- Mikropipetten (einstellbar) und sterile Pipettenspitzen
- 1,5 ml Reaktionsgefäße
- H<sub>2</sub>O (molecular grade), RNase- und DNase-frei
- Eis, um Proben und Reagenzien während der Vorbereitung kühl zu halten
- Saubere Arbeitsfläche
- Vortex, falls verfügbar
- Thermoshaker
- Tischzentrifuge
- RT-PCR-Thermocycler programmierbar nach den oben genannten Spezifikationen
- vom rRT-PCR-Thermocycler-Hersteller empfohlene Verbrauchsmaterialien



## ● Referenzen:

- 1] Y Zhao, F Chen, Q Li, L Wang, C Fächer, isotherme Amplifikation von Nukleinsäuren [1] Y Zhao, F Chen, Q Li, L Wang, C Fächer, isotherme Amplifikation von Nukleinsäuren. Chemikalienübersichten, (2015), 115 (22), 12491-12545
- 2] NCBI-Referenzsequenz: NC\_045512.2, Grundlagen 2720-8554
- 3] L Zou, F Ruan, M Huang, et al., SARS-CoV-2-Viruslast in Proben der oberen Atemwege von infizierten Patienten. N Engl J Med (2020) wurde am 19. Februar online veröffentlicht.
- 4] Institut Pasteur, Paris. 2020. Protokoll: Echtzeit-RT-PCR-Assays für den Nachweis von SARS-CoV-2. [https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/real-time-rt-pcr-assays-for-the-detection-of-sars-cov-2-institut-pasteur-paris.pdf?sfvrsn=3662fcb6_2)

## ● Symbole:



CE-Kennzeichnung; In-vitro-Diagnostik



Gebrauchsanweisung lesen



Chargencode



Produkt-Referenz



Anzahl Tests



Zulässiger Temperaturbereich



Legalen Hersteller



Verfallsdatum

