



ender **MASS**

ender MASS este un set de teste de diagnostic in-vitro bazat pe o tehnologie de amplificare moleculară izotermică a acidului nucleic [1] și o procedură de preparare a probelor mult simplificată în comparație cu ender LAB. Este destinată detectării calitative a secvenței genei ORF-1a a acidului nucleic din RNA (ARN) [2] viral al SARS-CoV-2 din tampoane (băț de exsudat) nazale directe, nazofaringiene sau din gât pentru persoanele suspectate de COVID-19 de către medicul curant. Testul este executat pe procesoare de ciclare standard de reacție de polimerizare în lanț în timp real (Real-Time Polymerase Chain Reaction / RT-PCR) (a se vedea mai jos detalii suplimentare despre specificații).

Kitul de testare ender MASS identifică ARN-ul SARS-CoV-2 în probe clinice. ARN-ul SARS-CoV-2 este în general detectabil în probele respiratorii în timpul fazei acute de infectare [3]. Rezultatele pozitive sunt indicații ale prezenței ARN-ului SARS-CoV-2; pentru determinarea stadiului de infectare a pacientului este necesară corelarea clinică cu istoricul pacientului și alte informații diagnostice. Rezultatele pozitive nu exclud infecția bacteriană sau co-infecția cu alți viruși.

Rezultatele negative nu elimină posibilitatea infecției cu SARS-CoV-2 și nu ar trebui folosite ca bază unică pentru deciziile de gestionare a pacientului. Rezultatele negative ar trebui luate în considerare în contextul expunerilor recente ale pacientului, antecedentelor și prezenței semnelor și simptomelor clinice corespunzătoare COVID-19.

Kitul de testare ender MASS este destinat utilizării de către personal medical profesional sau operatori instruiți care sunt pregătiți în utilizarea procesoarelor de ciclare RT-PCR și a procedurilor standard de laborator molecular biologic.

● Principiile procedurii de testare:

ender MASS se bazează pe tehnologia de amplificare izotermică [1] și detectare în timp real a secvenței genei SARS-CoV-2 ORF-1a [2]. Reacția de amplificare se realizează la o temperatură constantă de 65 °C. Nu este necesară o ciclare termică deoarece polimeraza cuprinde o activitate a helicazelor. Astfel, legarea și amplificarea primerului se realizează instantaneu și continuu. O etapă de transcripție inversă separată nu este necesară datorită activității de transcripție inversă a enzimei utilizate. ADN-ul transcris și amplificat invers este detectat cu un colorant fluorescent care intercalează ADN-ul. După amplificarea izotermică se realizează o analiză a curbei de topire pentru a distinge ampliconul SARS-CoV-2 de controlul de amplificare intern inclus (IC). Cele două ținte sunt identificate pe baza temperaturii lor de topire. Timpul total necesar de reacție este 30 minute.

Pregătirea probei nu necesită extracție de ARN care consumă mult de timp. În schimb, se efectuează o etapă simplă de încălzire și diluare pentru a prepara proba.

Reactivi și materiale:

| Culoare capac / Simbol | ender MASS-80 RO (Nr. cat: EMRO16S) | ender MASS-240 RO (Nr. cat: EMRO16M) | ender MASS-400 RO (Nr. cat: EMRO16L) |
|--|--|---|---|
| numărul total de reacții | 80 | 240 | 400 |
| Albastru / 1 | 2x 160 μl | 6x 160 μl | 10x 160 μl |
| Verde / 2 | 2x 1200 μl | 6x 1200 μl | 10x 1200 μl |
| Galben / lys | 2x 1600 μl | 6x 1600 μl | 10x 1600 μl |
| Roșu / pos | 1x 40 μl pentru 5 rulări | 2x 40 μl pentru 10 rulări | 2x 40 μl pentru 10 rulări |

Tubul "1" (capac albastru): Amestec de primeri, incluzând primeri pentru SARS-CoV-2, controlul intern (IC) și secvența țintă a IC

Tubul "2" (capac verde): Enzimă de amplificare în tampon de reacție

Tubul "lys" (capac galben): Tampon de liză (nepericulos)

Tubul "pos" (capac roșu): Control pozitiv (plasmidă neinfecțioasă, nepericuloasă)

Control negativ: utilizați H₂O de puritate biologică (H₂O of molecular grade) (nu este furnizat împreună cu kitul de testare)

● Colectarea probelor:

Utilizați truse de colectare a probelor tampon autorizate pentru colectarea probelor în tractul respirator superior utilizând tampon UTM sau Amies pentru depozitarea și transportul probelor până la prelucrare. Mediile de transport care conțin tiocianat de guanidină inhibă reacția de amplificare și nu este permisă utilizarea lor. Respectați instrucțiunile de utilizare furnizate de producătorul trusei de colectare a probelor.

● Procedura de preparare a probelor:

Recomandăm alicotarea tamponului de liză în alicote de câte 40 μl (pașii 1. și 2.) la sosirea kitului.

1. Se amestecă bine tamponul de liză (tubul «lys» cu capac galben) prin mixare în vortex
2. Pentru fiecare probă care trebuie analizată picurați cu pipeta 40 μl de tampon de liză într-un tub de reacție de 1,5 ml. Utilizați un vârf de pipetă cu deschidere mare (de ex. un vârf de pipetă de 1000 μl). Important: pentru a avea toate componentele tamponului de liză în soluție, mixați prin vortex tubul «lys» rapid după fiecare 5 probe
3. Adăugați 100 μl din probă
4. Încălziți 2 min la 95°C într-un thermoshaker, agitând la viteză maximă
5. Așezați imediat proba pe gheață și adăugați rapid proba la amestecul master preparat (a se vedea mai jos)

● Utilizarea kitului de testare ender MASS:

Utilizați reacții de unică folosință conform recomandărilor producătorului aparatului RT-PCR.

Este recomandat să utilizați articole din plastic fără RNase și DNase și să lucrați pe gheață pentru configurarea reacției.

Procedura pentru un singur specimen și reacție: preparați amestecul de reacție în ordinea următoare:

1. adăugați 30 μl de enzimă (tubul 2 cu capac verde)
2. adăugați 8 μl H₂O de puritate biologică (H₂O of molecular grade)
3. picurați cu pipeta 4 μl de amestec primer, inclusiv controlul intern (tubul 1 cu capac albastru)
4. adăugați 8 μl din proba preparată dintr-un specimen specific

Tratați fiecare specimen într-o reacție separată.

Notă: calculați cantitatea totală necesară a fiecărui reactiv, inclusiv toate eșantioanele și controalele și asamblați un amestec primer și enzimatic master din 1), 2) și 3). Amestecați cu grijă în vortex și rotiți scurt în jos. Alicotați 42 μl din amestecul master în fiecare vas de reacție și adăugați 8 μl din probă sau controalele preparate, fiecare cu un vârf de pipetă proaspăt.

Măsurați un control pozitiv și negativ în fiecare rulare colectivă pe ciclu RT-PCR utilizând 8 μl din soluția de control pozitivă și H₂O de puritate biologică (H₂O of molecular grade) în locul soluție de probă preparate, dar incluzând toți ceilalți reactivi, așa cum este evidențiat la 1), 2) și 3) mai sus.

După prepararea tuturor reacțiilor, plasați reacțiile în aparatul RT-PCR.

● Amplificarea și identificarea secvenței genei SARS-CoV-2 ARN ORF-1a în probe neextrase:

Utilizați un aparat RT-PCR standard, care permite programarea în conformitate cu protocolul de amplificare și detecție prezentat mai jos.

Metoda de amplificare:

Amplificare izotermică și analiza curbelor de topire conform următorului program:

1. 30 minute la 65 °C, colectând date de fluorescență o dată pe minut
2. aplicați un gradient de temperatură de la 80 °C la 90 °C pentru evaluarea temperaturii de topire a produsului de amplificare, înregistrând continuu fluorescența

Detectarea rezultatelor:

Semnalul de fluorescență al SYBR Verde / FAM sau al unui canal echivalent (excitație la aproximativ 470 nm, detecție la aproximativ 514 nm) este înregistrat pentru fiecare reacție în timpul amplificării și al curbei de topire. Analiza se realizează după rulare.

Interpretarea rezultatelor:

Pentru a determina dacă o probă conține ARN SARS-CoV-2, comparați temperatura de topire (T_m) cu controalele de testare pozitive și negative (Positive and Negative Assay Controls). Valorile C_t ale curbelor de amplificare nu sunt relevante pentru a distinge între un rezultat pozitiv și un rezultat negativ. O curbă de amplificare sigmoidă pozitivă indică amplificarea corectă fie a secvenței țintă SARS-CoV-2, fie a controlului intern (IC). Dacă nu este prezentă nici o curbă de amplificare sigmoidă, testul trebuie considerat invalid din cauza inhibării sau a manipulării eronate. În acest caz proba trebuie testată din nou.

Dacă T_m -ul probei corespunde T_m -ul testului negativ de control (Negative Assay Control) $\pm 0,5$ °C, acesta este considerat SARS-CoV-2 ARN negativ. În acest caz, controlul intern a fost amplificat. Pe Roche LightCycler 96 T_m -ul controlului intern (IC) este în jur de 83,0 °C, iar pe aparatul dvs. T_m ar putea fi ușor diferită; vă rugăm să luați valoarea respectivă pentru referință la probele dvs.

Dacă T_m -ul probei este între -0,5°C și +1,0 °C din testul pozitiv de control (Positive Assay Control) proba este considerată SARS-CoV-2 pozitivă. Pe Roche LightCycler 96 T_m -ul SARS-CoV-2 este în jur de 86,0 °C, în timp ce pe aparatul dvs. T_m ar putea fi ușor diferită.

Probele cu o cantitate redusă de ARN SARS-CoV-2 pot să prezinte două vârfuri de topire, unul pentru ținta ARN SARS-CoV-2 și unul pentru controlul intern (IC). Acest rezultat trebuie însă considerat SARS-CoV-2 pozitiv.

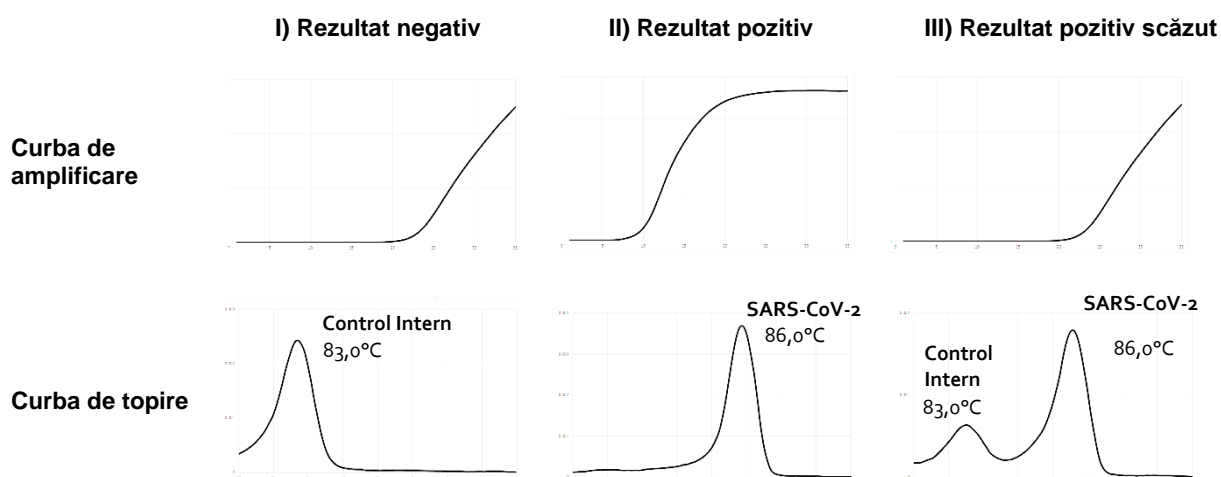


Figura 1: Interpretarea rezultatului testului

- I. Validitatea întregii rulări este indicată de un rezultat negativ pentru controlul negativ (T_m $83,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) și un rezultat pozitiv (T_m $85,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) pentru controlul pozitiv.
- II. Invaliditatea întregii rulări este indicată de un rezultat pozitiv (T_m $85,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) pentru controlul negativ (se suspectează contaminarea) și/sau un rezultat negativ (T_m $83,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) pentru controlul pozitiv. În caz de invaliditate a întregii rulări, nu utilizați rezultate pentru niciunul dintre eșantioanele din aceeași probă.
- III. Rezultatul controlului intern în cazul unei proceduri de testare valabile pentru probe: Rezultat pozitiv cu o temperatură maximă de topire la $86,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (amplificarea controlului intern este suprimată de amplificarea secvenței țintă a probei SARS-CoV-2 a probei). Rezultatul pentru eșantionul corespunzător este valid și poate fi utilizat. Rezultatul probei este pozitiv pentru prezența secvenței genei SARS-CoV-2 ORF-1a dacă se detectează un vârf la o temperatură de topire de $86,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rezultatul probei este negativ dacă lipsește un vârf la o temperatură de topire de $86,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ și este prezent un vârf la o temperatură de topire de $83,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ pentru controlul intern.
- IV. Rezultatul controlului intern în cazul unei proceduri de testare invalide pentru probe: nu s-a detectat niciun rezultat pentru curba de amplificare cu un vârf lipsă pentru temperatura de topire. În cazul unei proceduri de testare invalide, indicată de rezultatul lipsă pentru controlul intern, nu utilizați rezultatele pentru proba corespunzătoare.

● Utilizarea kitului de testare:

- Kitul de testare este destinat doar diagnosticării in-vitro
- Fiabilitatea rezultatelor depinde de procedura adecvată de colectare, depozitare, transport și procesare a probelor
- Reactivii kitului de testare sunt de unică folosință
- Fluxul de lucru în laborator ar trebui să se desfășoare într-un mod unidirecțional cu consumabile și echipamente dedicate zonelor de lucru specifice
- Dacă nu se utilizează toate reacțiile cuprinse într-o eprubetă a kitului la un anumit moment, reactivii reziduali pot fi utilizați consecutiv. Utilizatorul trebuie să se asigure că aplică bunele practici de laborator și, în mod ideal, să se asigure că utilizează vârfuri de filtrare pentru a nu contamina reactivii cu probe de pacienți SARS-CoV-2 pozitivi, cu control pozitiv sau cu ampliconi.
- Dacă kiturile de testare sunt utilizate consecutiv, trusa de testare trebuie păstrată în ambalajul original în condițiile indicate.

● Avertizări:

- I. Nu deschideți tubul de reacție după amplificare pentru a evita contaminarea potențială a zonei de lucru cu amplicon, putând provoca rezultate false pentru alte specimene.
- II. Utilizați numai tuburile de reacție recomandate de către producătorul aparatului RT-PCR pentru a evita deschiderea potențială a tuburilor de reacție în timpul procedurii de amplificare și detecție datorită dezvoltării unei presiuni prea ridicate în tub. Consecința ar fi contaminare potențială a zonei de lucru cu amplicon, provocând rezultate fals pozitive pentru alte specimene.
- III. Nu utilizați reacția pentru un al doilea specimen, deoarece rezultatul va fi întotdeauna cel dat pentru primul specimen.
- IV. Folosiți obligatoriu volumele per reacție evidențiate în prezentele Instrucțiuni de utilizare. Volumele mai mici duc la performanțe nesigure ale kitului de testare, și prin urmare, la rezultate invalide.
- V. Nu amestecați reactivii ender MASS cu reactivi preparați în laborator. O asemenea procedură duce la performanțe nesigure ale kitului de testare, și prin urmare, la rezultate invalide.
- VI. Nu amestecați reactivii ender MASS din diferite loturi, așa cum este indicat pe tuburile individuale de reactivi. O asemenea procedură duce la performanțe nesigure ale kitului de testare, și prin urmare, la rezultate invalide.
- VII. Aruncați tuburile de reacție închise conform reglementărilor locale pentru probele neinfecțioase și nepericuloase.
- VIII. Dacă se constată reactivi vărsați sau tuburi deteriorate când se deschide ambalajul kitului de testare, kitul de testare trebuie aruncat și nu poate fi utilizat.
- IX. ender MASS este un test foarte sensibil și orice contaminare a zonei de lucru cu ARN țintă poate conduce la rezultate fals pozitive ale testului. Prin urmare, eșantioanele trebuie manipulate cu precauție ridicată și în conformitate cu bunele practici de laborator.

● Limitări:

- I. Performanța testului ender MASS a fost evaluată utilizând doar procedurile prevăzute în acest prospect al produsului. Modificările aduse acestor proceduri pot afecta performanța testului.
- II. Pot apărea rezultate negative false dacă un specimen este colectat, transportat sau manipulat în mod necorespunzător. Rezultate fals negative pot apărea și în cazul în care inhibitori de amplificare sunt prezenți în eșantion sau dacă sunt prezente niveluri inadecvate de virusi în eșantion. Rezultatele negative trebuie luate în considerare în contextul expunerilor recente ale pacientului, antecedentelor și prezenței semnelor și simptomelor clinice corespunzătoare COVID-19.
- III. Ca și în cazul oricărui test molecular, mutațiile din regiunile țintă ale testului ender MASS pot afecta legarea primerului, rezultând în eșecul detectării prezenței virusului.
- IV. Testul nu poate exclude bolile cauzate de alți agenți patogeni bacterieni sau virali.

● Date de performanță:

Performanța ender MASS a fost evaluată folosind 74 probe de tampon nasofaringiene obținute de la persoane cu semne și simptome de boli respiratorii. Eșantioanele pozitive au fost verificate prin rtPCR ca metodă de referință și, de asemenea, confirmate ca pozitive prin aplicarea protocolului publicat de WHO [4].

Sensibilitatea de diagnostic: 93,0% (40/43 – 95% CI: 80,9%-98,5%)

Specificitatea de diagnostic: 100% (31/31 – 95% CI 88,8%-100%)

PPV: 100%

NPV 99,2% (CI 97,7%-99,7%) la o prevalență estimată de 10%.

● Date analitice de performanță:

Limita de detecție (LoD): 480 copii ARN SARS-CoV-2 / reacție (AccuPlex™ SARS-CoV-2 Verification Panel, SeraCare, MA, USA; material # 0505-0129)

LoD a fost determinată ca fiind cea mai scăzută concentrație care a fost detectată $\geq 95\%$ de ori (adică concentrație la care cel puțin 19 din 20 de replici au dat rezultate pozitive).

Reactivitatea încrucișată a fost analizată in silico și *în laborator umed (wet lab): *Human coronavirus 229E, Human coronavirus OC43, Human coronavirus HKU1, *Human coronavirus NL63, SARS-coronavirus, MERS-coronavirus, *Adenovirus, Human Metapneumovirus, Parainfluenza virus 1-4, *Influenza A & B, *Enterovirus, *Respiratory syncytial virus, *Rhinovirus, *Chlamydia pneumoniae, Haemophilus influenzae, Legionella pneumophila, Mycobacterium tuberculosis, Streptococcus pneumoniae, Streptococcus pyogenes, *Bordetella pertussis, *Mycoplasma pneumoniae, Pneumocystis jirovecii, Candida albicans, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus salivarius.

● Numele și adresa producătorului:

ender diagnostics ag, Freiburgstrasse 251, 3018 Berna, Elveția

| Număr articol | EMRO16S | EMRO16M | EMRO16L |
|----------------|---------|---------|---------|
| Număr de teste | 80 | 240 | 400 |

Depozitare: Tuburile "1", "2", "pos" și "lys" la ≤ -20 °C; utilizați numai până la data de expirare indicată pe ambalajul kitului de testare

● Materiale furnizate de utilizator:

- Pipete (reglabile) și vârfuri de pipetă sterile
- Tuburi de reacție de 1,5 ml
- Apă de puritate biologică, fără RNase și Dnase (H₂O of molecular grade)
- Gheață pentru a menține probele și reactivii reci în timpul preparării
- Suprafață de lucru curată
- Vortex dacă este disponibil
- Thermoshaker
- Centrifugă de birou
- Termociclator rtPCR programabil conform specificațiilor menționate mai sus
- Articole din plastic recomandate de către producătorului aparatului de termociclare rtPCR

● Referințe:

- [1] Y Zhao, F Chen, Q Li, L Wang, C Fan, Isothermal Amplification of Nucleic Acids. Chemical reviews, (2015), 115 (22), 12491–12545.
- [2] NCBI Reference Sequence: NC_045512.2, Bases 2720-8554.
- [3] L Zou, F Ruan, M Huang, et al., SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. N Engl J Med (2020) publicat online Feb 19.
- [4] Institute Pasteur, Paris. 2020. Protocol: Real-time RT-PCR assays for the detection of 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

● Simboluri:



Marcaj CE; Diagnostic In-vitro



Codul lotului



Număr de teste



Producătorul legal



Citiți instrucțiunile de utilizare



Referință produs



Interval de temperaturi acceptabil



Data expirării

