

Informacja wstępna

Szanowni Państwo,

Oddajemy w Państwa ręce zestaw MediPAN-2G+ FAST COVID test wykonany w ramach współpracy z Instytutem Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk oraz firmą A&A Biotechnology s.c.

Zestaw MediPAN-2G+ FAST COVID test jest przeznaczony do wykrywania SARS-CoV-2. Obecność wirusa jest potwierdzana w dwóch niezależnych reakcjach zaprojektowanych na dwa geny SARS-CoV-2. Dodatkowo przeprowadzana reakcja kontrolna pozwala na kontrolę procedury przygotowania materiału. Cechy ułatwiające użytkowanie testu to:

- prosta interpretacja wyniku,
- wysoka czułość reakcji wykrywających wirusa,
- detekcja sygnałów w trzech kanałach w jednym dołku,
- krótki czas reakcji, około 1h,
- bufor reakcyjny połączony z enzymem.

Uwaga! Test skutecznie wykrywa także wariant genetyczny wirusa SARS-CoV-2 - VUI 202012/01 (tzw. mutacja angielska).

Dodatkowe informacje można znaleźć na stronie:

<http://medicofarma.pl/coronavirus-test/>

Wszelkie wątpliwości, uwagi i sugestie prosimy zgłaszać na adres e-mail:

covid@medicofarma.pl

lub kontaktować się telefonicznie pod numerem tel.:

+48 691 772771



Instrukcja używania

MediPAN-2G+ FAST COVID test

SARS-CoV-2 Detection Kit

Real-time RT-PCR

Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro* do oznaczania materiału genetycznego SARS-CoV-2 w próbkach wymazów pobranych od ludzi z górnych dróg oddechowych: jamy ustnej i nosogardzieli.

numer katalogowy

liczba testów



MPC5



94



Spis treści

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Opis i zastosowanie | 4 |
| Skład zestawu | 4 |
| Dodatkowy sprzęt i odczynniki | 4 |
| Ważne informacje i środki ostrożności | 5 |
| Ograniczenia użycia | 5 |
| Procedura | 5 |
| Przygotowanie składników reakcji | 5 |
| Dodanie kontroli wewnętrznej IC | 5 |
| Przygotowanie mieszanin reakcyjnych na 94 testy (cała płytka 96) | 6 |
| Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej na określoną liczbę testów | 6 |
| Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej | 6 |
| Przygotowanie płytki | 7 |
| Warunki reakcji PCR | 8 |
| Analiza wyników | 8 |
| Interpretacja wyników | 9 |
| Aparaty do real-time PCR | 9 |
| Parametry działania testu | 10 |
| Objaśnienie użytych symboli | 11 |

Opis i zastosowanie

MediPAN-2G+ FAST COVID jest testem do specyficznego wykrywania wirusa SARS-CoV-2 u ludzi. Kluczowym etapem testu jest detekcja materiału genetycznego wirusa, która następuje w procesie odwrotnej transkrypcji i łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (ang: Reverse Transcription and real-time Polymerase Chain Reaction). Detekcja wirusa jest możliwa dzięki zastosowaniu starterów oraz fluorescencyjnych sond, specyficznych dla genomu wirusa SARS-CoV-2. W teście wykrywane są wysoce swoiste fragmenty dwóch genów SARS-CoV-2: ORF1ab (nsp2) oraz gen S. Kontrolą wewnętrzną jest syntetyczny fragment genomu wirusa roślinnego (wirus RNA) dodawany do próbki na etapie izolacji RNA lub reakcji PCR.

Zestaw został przygotowany w taki sposób, aby próbka pobrana od osoby badanej była analizowana równolegle w trzech reakcjach w jednym dołku. W dwóch reakcjach wykrywany jest RNA wirusa wywołującego COVID-19 we fluorescencyjnym kanale dla barwnika FAM i HEX. Dodatkowo w mieszaninie przeprowadzana jest reakcja towarzysząca wykrywana w kanale dla barwnika Cy5 (Rysunek 1).

| | | |
|----------------------|---------------------|-----|
| FAM | HEX | Cy5 |
| SARS-CoV-2 ORF1ab | SARS-CoV-2 gen S | IC |

Rysunek 1. Schemat multipleksowych reakcji w mieszaninie reakcyjnej.

Skład zestawu

| składnik zestawu | objętość | przechowywanie i transport |
|-----------------------------------------|----------|----------------------------|
| BE - bufor i enzymy do reakcji | 1430 µl | ≤-20 °C |
| PP - startery i sondy do reakcji | 285 µl | ≤-20 °C |
| PC - kontrola dodatnia | 60 µl | ≤-20 °C |
| IC - kontrola wewnętrzna | 1100 µl | ≤-20 °C |
| NC - kontrola ujemna | 100 µl | ≤-20 °C |

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

- Mikrowirówka
- Wytrząsarka do płytek 96-dołkowych
- Sterylna komora z nawiewem laminarnym
- Pojemniki do inkubacji na lodzie
- Aparat do real-time PCR z detekcją sygnałów dla barwników FAM, HEX i Cy5
- Płytki 96-dołkowe dedykowane do aparatu do real-time PCR
- Sterylne probówki 1.5 ml lub 2 ml typu Eppendorf
- Pipety automatyczne z końcówkami do pipet z filtrem
- Zamrażarka pracująca w zakresie temperatury ≤-20 °C

Ważne informacje i środki ostrożności

Roztwór zawierający sondy (**PP**) powinien być chroniony przed światłem.

Należy unikać wielokrotnego rozmrażania i ponownego zamrażania odczynników (>3x), ponieważ może to zmniejszyć czułość testu. Jeśli składniki mają być stosowane w małych ilościach, należy je zamrozić w oddzielnych porcjach.

W celu uniknięcia zanieczyszczeń reakcji zalecana jest praca w warunkach sterylnej komory z nawiewem laminarnym i korzystanie z końcówek do pipet z filtrem. Należy używać plastikowych materiałów zużywalnych wolnych od rybonukleaz oraz jednorazowych rękawiczek i zmieniać je każdorazowo, jak wymaga tego dobra praktyka laboratoryjna.

Składniki zachowują pełną stabilność do upływu terminu ważności podanego na etykietach, jeśli są przechowywane zgodnie z zaleceniami.

Zestaw powinien być transportowany na suchym lodzie. Po otrzymaniu zestawu należy sprawdzić obecność suchego lodu.

Należy sprawdzić datę ważności na pudełku zestawu i etykietach odczynników - nie używać przeterminowanego zestawu lub składników zestawu.

Wszystkie odpady powstałe podczas etapu izolacji kwasu nukleinowego, próbki i inne materiały, które potencjalnie mogły mieć kontakt z materiałem zakaźnym należy wyrzucić do odpadów medycznych i bezpiecznie zutylizować.

Ten produkt nie jest szkodliwy ani nie zawiera materiału zakaźnego.

Ograniczenia użycia

Wszystkie składniki zestawu mogą być używane wyłącznie do diagnostyki *in vitro*.

Z zestawu należy korzystać zgodnie z niniejszą instrukcją używania.

Produkt ten powinien być używany przez personel specjalnie przeszkolony do wykonywania procedur diagnostycznych *in vitro*.

Procedura

Przygotowanie składników reakcji

- Odczynniki zawarte w zestawie należy rozmrażać na lodzie, następnie powinny na nim pozostawać podczas całego procesu.
- Próbki RNA uzyskane od badanych osób należy umieścić na lodzie.

Dodanie kontroli wewnętrznej IC

Przed przystąpieniem do izolacji RNA SARS-CoV-2, materiał pobrany od osoby badanej należy zawiesić w odczynniku lizującym (wchodzącym w skład zestawu do izolacji RNA), a następnie dodać 10 µl kontroli wewnętrznej **IC** (w celu uproszczenia procedury można także dodać określoną ilość **IC**, w przeliczeniu 10 µl/próbkę, do odpowiedniej objętości odczynnika lizującego (zgodnie z protokołem)). **IC** stanowi kontrolę przebiegu izolacji RNA, którą należy przeprowadzić zgodnie ze wskazaniami producenta.

Opcjonalnie można dodać 1 µl kontroli wewnętrznej **IC** bezpośrednio do reakcji RT-qPCR (Przygotowanie płytki, punkt 3.), ale stanowi ona wtedy tylko dodatkową kontrolę przebiegu reakcji PCR. Należy jednak mieć na uwadze, że dodawanie kontroli wewnętrznej **IC** bezpośrednio na płytce do PCR zwiększa ryzyko zanieczyszczenia kontroli negatywnej **NC**.

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej na 94 testy (cała płytka 96)

Jeżeli podczas izolacji RNA nie została dodana kontrola wewnętrzna IC to zapoznać się uprzednio z punktem 3. w „Przygotowanie płytki”.

1. Do sterylnej probówki 1.5 ml lub 2 ml typu Eppendorf dodać:

- **1300 µl** mieszaniny reakcyjnej **BE**
- **260 µl** starterów i sond do reakcji **PP**

2. Zawartość probówki kilkakrotnie przepipetować i krótko zwirować.

3. Probówkę opisać "MIX" i przechowywać na lodzie.

Informacja: Mieszanina wystarczy na 94 testy wykrywające wirusa wraz z reakcjami kontrolnymi.

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej na określoną liczbę testów

Do przygotowania mieszaniny reakcyjnej na określoną liczbę testów należy pomnożyć objętość każdego składnika potrzebnego do przeprowadzenia 1 reakcji przez ilość planowanych do wykonania testów + 2. Do uzyskanych wartości dodać 10% nadmiaru.

Jeżeli podczas izolacji RNA nie została dodana kontrola wewnętrzna IC to zapoznać się uprzednio z punktem 3. w „Przygotowanie płytki”.

| składniki mieszaniny reakcyjnej | objętość na 1 reakcję |
|-----------------------------------------|-----------------------|
| BE - bufor i enzymy do reakcji | 12.5 µl |
| PP - startery i sondy do reakcji | 2.5 µl |

Przykładowo: do przygotowania mieszaniny na 15 testów należy użyć:

- **BE** : $(15 + 2) \times 12.5 \mu\text{l} = 212.5 \mu\text{l} + 10\% \text{ nadmiaru } (21.25 \mu\text{l}) = 234 \mu\text{l}$
- **PP** : $(15 + 2) \times 2.5 \mu\text{l} = 42,5 \mu\text{l} + 10\% \text{ nadmiaru } (4.25 \mu\text{l}) = 47 \mu\text{l}$

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

1. Do jałowej probówki 1.5 ml typu Eppendorf dodać:

- obliczoną objętość buforu i enzymów do reakcji **BE**
- obliczoną objętość starterów i sond do reakcji **PP**

2. Zawartość probówki kilkakrotnie przepipetować i krótko zwirować.

3. Probówkę opisać "MR" i przechowywać na lodzie.

Przygotowanie płytki

1. Dodać po **15 µl** mieszaniny reakcyjnej MIX do każdego z dołków na płytce 96-dołkowej.

Uwaga! Mieszanina reakcyjna MIX nie nadaje się do ponownego użycia. Ewentualny nadmiar należy wyrzucić.

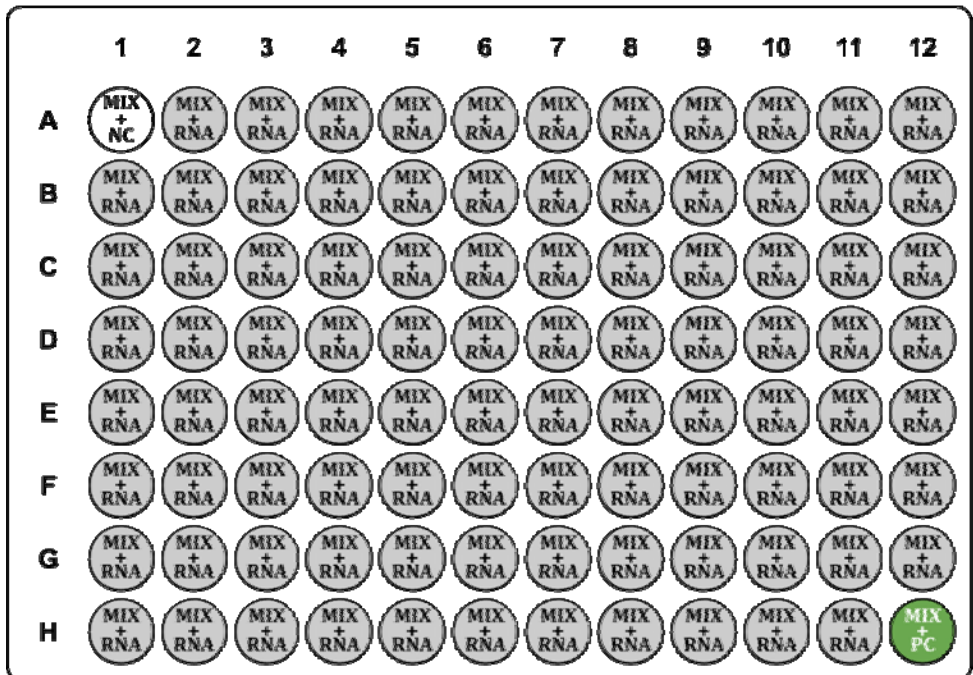
2. Dodać **10 µl** kontroli ujemnej NC do dołka A1.

3. Dodać po **10 µl** roztworu RNA wyizolowanego z materiału pobranego od badanych osób do dołków od A2 do H11 według schematu przedstawionego na [Rysunku 2](#).

Informacja. Jeżeli podczas izolacji RNA nie została dodana kontrola wewnętrzna IC to należy dodać ją na tym etapie. W takim przypadku do dołków od A2 do H11 dodać po 9 µl roztworu RNA wyizolowanego z materiału pobranego od badanych osób, a następnie po 1 µl kontroli wewnętrznej IC. W przypadku dodawania kontroli IC na etapie reakcji PCR można dodać odpowiednią objętość IC, w przeliczeniu 1 µl/próbkę, do sporządzanej mieszaniny reakcyjnej (aby uniknąć wielokrotnego dodawania IC na płytce). W takim wypadku dodawać 16 µl mieszaniny reakcyjnej z IC do 9 µl próbek i oczywiste będzie uzyskanie sygnału na kanale Cy5 także w dołku z kontrolą ujemną NC.

4. Dodać **10 µl** kontroli dodatniej PC do dołka H12.

5. Zakleić płytkę folią odpowiednią do stosowanego aparatu do real-time PCR. Wytrząsać i zwirować płytkę.



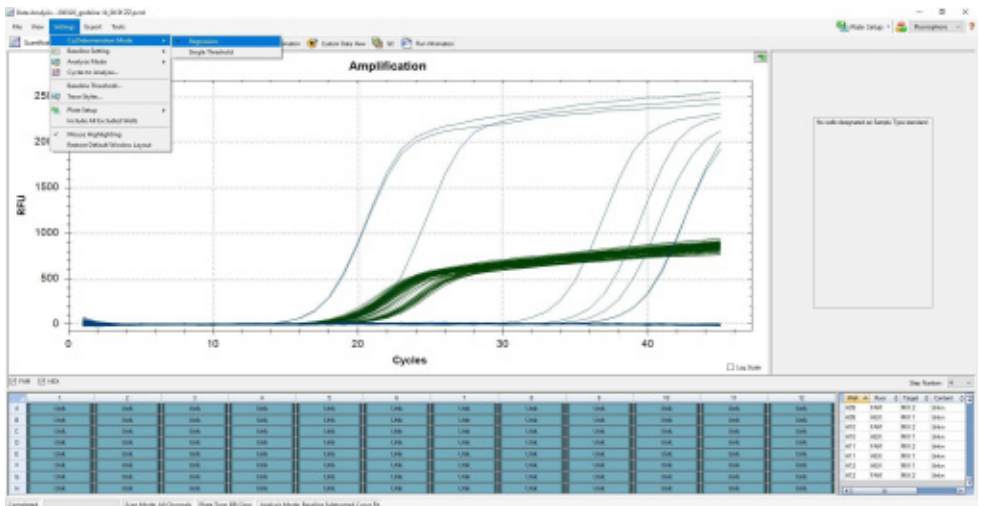
Rysunek 2. Schemat przygotowania płytki 96-dołkowej.

Warunki reakcji PCR

| temperatura | czas | liczba cykli |
|--------------------------------------------------|---------|--------------|
| 52°C | 5 min. | 1 |
| 95°C | 10 sek. | 1 |
| 95°C | 3 sek. | 42 |
| 58°C | 30 sek. | |
| Odczyt sygnałów z płytki (kanały FAM, HEX i Cy5) | | |

Analiza wyników

Jeśli to możliwe to dla określenia wartości Ct należy wykorzystać metodę regresji (Cq determination mode->regression). Przykładowo, dla oprogramowania firmy Bio-Rad ustawienie to można znaleźć w zakładce „settings” (Rysunek 3).



Rysunek 3. Określanie wartości Ct za pomocą metody regresji.

Interpretacja wyników

Wyniki należy interpretować według wskazań zamieszczonych w tabeli poniżej:

| Kanał detekcji | | | Interpretacja |
|----------------|------|-------|----------------------------------------------------------------------------|
| FAM* | HEX* | Cy5** | |
| + | + | +/- | Osoba badana pozytywna pod względem SARS-CoV-2 ^a |
| + | - | +/- | Osoba badana pozytywna pod względem SARS-CoV-2 ^b |
| - | + | +/- | Osoba badana pozytywna pod względem SARS-CoV-2 ^b |
| - | - | + | Osoba badana negatywna pod względem SARS-CoV-2 |
| - | - | - | Procedura izolacji nie przebiegła prawidłowo lub wystąpił błąd reakcji PCR |

* Wyniki w kanale FAM i HEX są interpretowane jako pewne pozytywne przy wartościach Ct ≤ 38. Dla późniejszych amplifikacji wynik jest nierozstrzygujący. W takim przypadku zaleca się ponowne pobranie próbki od osoby badanej.

** Wynik reakcji w kanale Cy5 stanowi kontrolę procedury izolacji RNA i/lub reakcji PCR.

^a Dodatni wynik dla próbki pacjenta w kanale FAM i HEX dla obu genów swoistych dla SARS-CoV-2 jest interpretowany jako pozytywny niezależnie od wyników na kanale Cy5.

^b Przy późnych amplifikacjach możliwe jest uzyskanie sygnału tylko dla jednego z kanałów, FAM lub HEX. W takim przypadku zaleca się ponowne pobranie próbki od osoby badanej.

Kontrole dodatnie. Wynik dla kontroli dodatnich (sygnały na trzech analizowanych kanałach) jest spodziewany w zakresie 18-25 cykli.

Kontrola IC. W przypadku użycia IC na etapie izolacji RNA wynik prawidłowy oczekiwany jest przy wartościach Ct ≤ 32.

Kontrole ujemne. Kontrole ujemne nie mogą wykazywać sygnału dla żadnego z genów SARS-CoV-2 (kanał FAM i HEX). Pojawienie się późnego sygnału (Ct > 35) w kontroli ujemnej w kanale Cy5 (IC) świadczy o kontaminacji, co nie wpływa jednak na interpretację wyników w reakcjach wykrywających SARS-CoV-2. Jeśli użytkownik postępuje wg procedury zasugerowanej w punkcie 3. w części „Przygotowanie płytki” to konsekwencją będzie uzyskanie sygnałów dla IC w kontroli negatywnej w zakresie 18-25 cykli.

Aparaty do real-time PCR

Zestaw został zaprojektowany do stosowania w tzw. systemach otwartych RT-PCR.

Walidację zestawu przeprowadzono na urządzeniach:

- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler 480 II (Roche Diagnostics)
- AriaMx Real-time PCR System (Agilent)
- Montania 4896 (Anatolia Geneworks)

- Applied Biosystems 7500 oraz Applied Biosystems 7500 Fast
- QuantStudio 5 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems)
- Cobas Z Bioanalyzer (Roche Diagnostics)
- Rotor Gene 3000 (Corbett Research)
- LineGene (BIOER Technology)

Uwaga! Zestaw MediPAN-2G+ FAST COVID test zawiera barwnik normalizacyjny ROX w niskim stężeniu pozwalającym na bezpośrednie używanie zestawu w takich aparatach jak: Applied Biosystems® 7500, QuantStudio™, ViiA7™, Agilent Mx™, Bio-Rad® iQ™5, CFX96, CFX384, Opticon, Roche Lightcycler®, Qiagen Rotor-Gene™, Eppendorf Mastercycler®, Cepheid® SmartCycler®.










W przypadku urządzeń wymagających barwnika ROX w wysokim stężeniu, takich jak: Applied Biosystems® 7000, 7300, 7700, 7900HT, StepOne™, StepOnePlus™, do mieszaniny reakcyjnej należy dodać barwnik ROX do odpowiedniego stężenia. Barwnik ROX w wysokim stężeniu nie jest dołączony do zestawu.

Parametry działania testu

- Czulość > 99% (wykrycie 200 kopii wirusa/mL czyli 5 kopii wirusa/reakcję)
- Specyficzność > 99%
- Reaktywność krzyżowa *in silico*

| Grupa taksonomiczna | Patogen | Liczba przetestowanych linii izolatów | Reaktywność krzyżowa |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------|
| | Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) | 9800 | Obserwowana |
| Betacoronavirus | | | |
| | Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV) | 211 | Nie obserwowane |
| Betacoronavirus | Middle East respiratory syndrome-related coronavirus | 6 | Nie obserwowane |
| Betacoronavirus | Human coronavirus OC43 | 1 | Nie obserwowane |
| Betacoronavirus | Human coronavirus HKU1 | 3 | Nie obserwowane |
| Alphacoronavirus | Human coronavirus 229E | 4 | Nie obserwowane |
| Alphacoronavirus | Human coronavirus NL63 | 3 | Nie obserwowane |
| Human mastadenovirus C | Human adenovirus 1 | 2 | Nie obserwowane |
| Enterovirus | Enterovirus B | 126 | Nie obserwowane |
| Enterovirus | Enterovirus D | 6 | Nie obserwowane |
| Influenza A | H1N1 subtype | 36135 | Nie obserwowane |
| Influenza B | Influenza B virus | 18538 | Nie obserwowane |
| Human metapneumovirus | Human metapneumovirus | 4 | Nie obserwowane |
| Enterovirus | Rhinovirus B | 25 | Nie obserwowane |
| Respirovirus | Respirovirus 1 | 7 | Nie obserwowane |
| Respirovirus | Respirovirus 3 | 8 | Nie obserwowane |
| Rubulavirus | Rubulavirus 2 | 2 | Nie obserwowane |
| Rubulavirus | Rubulavirus 4 | 4 | Nie obserwowane |
| Orthopneumovirus | Human orthopneumovirus | 42 | Nie obserwowane |
| Bordetella | <i>Bordetella pertussis</i> | 48 | Nie obserwowane |
| Candida | <i>Candida albicans</i> | 91 | Nie obserwowane |
| Corynebacterium | <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 22 | Nie obserwowane |
| Haemophilus | <i>Haemophilus influenzae</i> | 40 | Nie obserwowane |
| Legionella | <i>Legionella pneumophila</i> | 41 | Nie obserwowane |
| Mycobacterium tuberculosis complex | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 2900 | Nie obserwowane |
| Moraxella | <i>Moraxella catarrhalis</i> | 13 | Nie obserwowane |
| Neisseria | <i>Neisseria meningitidis</i> | 291 | Nie obserwowane |
| Pseudomonas aeruginosa group | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 383 | Nie obserwowane |
| Staphylococcus | <i>Staphylococcus aureus</i> | 4639 | Nie obserwowane |
| Staphylococcus | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 111 | Nie obserwowane |
| Streptococcus | <i>Streptococcus salivarius</i> | 11 | Nie obserwowane |
| Streptococcus | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 339 | Nie obserwowane |
| Streptococcus | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 833 | Nie obserwowane |

Objaśnienie użytych symboli

| | | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|  | Wyrób medyczny do diagnostyki <i>in vitro</i> |  | Przed użyciem zapoznaj się z instrukcją używania |
|  | Wytwórca |  | Zestaw pozwala na wykonanie 94 testów |
|  | Numer partii |  | Zapoznaj się ze środkami ostrożności |
|  | Data ważności |  | Przechowywać w temperaturze $\leq -20^{\circ}\text{C}$ |
|  | Numer katalogowy | | |



Medicofarma

ul. Sokołowska 9, lok. U19, 01-142 Warsaw, Poland

www.medicofarma.pl/coronavirus-test



Wersja instrukcji nr 6 obowiązuje od 20.01.2021