

Informacja wstępna

Szanowni Państwo,

Oddajemy w Państwa ręce zestaw MediPAN-2G COVID test wykonany w ramach współpracy z Instytutem Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk oraz firmami A&A Biotechnology s.c. i Future Synthesis Sp. z o.o.

Zestaw MediPAN-2G COVID test jest przeznaczony do wykrywania SARS-CoV-2. Obecność wirusa jest potwierdzana w dwóch niezależnych reakcjach zaprojektowanych na dwa geny SARS-CoV-2. Dwie dodatkowo przeprowadzane reakcje kontrolne pozwalają na: (I) ocenę jakości/iłości analizowanego materiału (poprzez analizę ekspresji ludzkiego genu) oraz (II) kontrolę procedury przygotowania materiału. Cechy ułatwiające użytkowanie testu to:

- prosta interpretacja wyniku,
- wysoka czułość reakcji wykrywającej wirusa,
- podwójny system kontroli,
- detekcja sygnału wyłącznie w dwóch kanałach.

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



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
Polskiej Akademii Nauk

FUTURE
synthesis 


Instrukcja używania

MediPAN-2G 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
REF MPC2	 46
	IVD

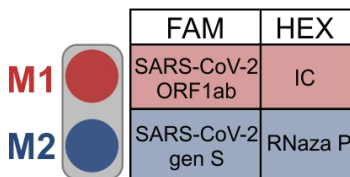
Spis treści

Opis i zastosowanie	4
Skład zestawu	4
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	5
Ważne informacje i środki ostrożności	5
Ograniczenia użycia	5
Procedura	6
Przygotowanie składników reakcji	6
Dodanie matrycy kontroli wewnętrznej IC	6
Przygotowanie mieszanin reakcyjnych na 46 testów (cała płytka 96)	6
Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej 1	6
Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej 2	6
Przygotowanie mieszanin reakcyjnych na określoną liczbę testów	7
Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej 1	7
Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej 2	7
Przygotowanie płytki	8
Warunki reakcji PCR	9
Analiza wyników	9
Interpretacja wyników	11
Aparaty do real-time PCR	11
Parametry działania testu	12
Objaśnienie użytych symboli	12

Opis i zastosowanie

MediPAN-2G 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. Dodatkowo test wykrywa obecność ludzkiego genu RNaza P w pobranym materiale, co stanowi kontrolę wymazu. Natomiast kontrolą wewnętrzną jest syntetyczny fragment genomu wirusa roślinnego (wirus RNA) dodawany do próbek na etapie izolacji RNA lub reakcji PCR.

Zestaw został przygotowany w taki sposób, aby próbka pobrana od osoby badanej była analizowana równolegle w dwóch mieszaninach reakcyjnych. W każdej z mieszanin reakcyjnych wykrywany jest RNA wirusa wywołującego COVID-19 we fluorescencyjnym kanale dla barwnika FAM (test właściwy). Dodatkowo każda z mieszanin reakcyjnych zawiera reakcję towarzyszącą wykrywaną w kanale dla barwnika HEX. W mieszaninie reakcyjnej 1 (M1) jednocześnie wykrywany jest gen ORF1ab (nsp2) oraz kontrola wewnętrzna izolacji (IC), natomiast w mieszaninie reakcyjnej 2 (M2) - gen S i kontrola wymazu (RNaza P) (Rysunek 1).



Rysunek 1. Schemat multipleksowych reakcji w mieszaninach M1 i M2.

Skład zestawu

składnik zestawu	objętość	przechowywanie i transport
B - bufor do reakcji	1430 µl	≤-20 °C
M1-SP - startery i sondy do reakcji 1	74 µl	≤-20 °C
M2-SP - startery i sondy do reakcji 2	74 µl	≤-20 °C
E - roztwór enzymów	148 µl	≤-20 °C
PC-R - kontrola dodatnia	100 µl	≤-20 °C
IC - matryca kontroli wewnętrznej	600 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
- Statywy chłodzące do płytek 96-dołkowych lub pojemniki do inkubacji na lodzie
- Aparat do real-time PCR z detekcją sygnałów dla barwników FAM i HEX
- Płytki 96-dołkowe dedykowane do aparatu do real-time PCR
- Sterylne probówki 1.5 ml typu Eppendorf
- Pipety automatyczne z końcówkami do pipet z filtrem
- Zamrażarka pracująca w zakresie temperatury ≤ -20 °C

Ważne informacje i środki ostrożności

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. Roztwory zawierające sondy (**M1-SP** i **M2-SP**) powinny być chronione przed światłem.

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 zakaźny, zestaw zawiera materiały pochodzenia ludzkiego, ale nieinfekcyjne.

UWAGA. Zestaw MediPAN-2G Covid test nie zawiera barwnika normalizacyjnego ROX. W przypadku urządzeń wymagających normalizacji (np. aparatu typu ABI 7500), do mieszanin reakcyjnych 1 i 2 należy dodać barwnik ROX do odpowiedniego stężenia. Barwnik ROX nie jest dołączony do zestawu.

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.
- Próbkki RNA uzyskane od badanych osób należy umieścić na lodzie, a płytki 96-dółkowe na statywach chłodzących.

Dodanie matrycy 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 matrycy **IC**. Tak dodana matryca **IC** stanowi kontrolę przebiegu izolacji RNA, którą należy przeprowadzić zgodnie ze wskazaniami producenta.

Opcjonalnie można dodać 1 µl matrycy **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 matrycy **IC** bezpośrednio do reakcji PCR zwiększa ryzyko zanieczyszczenia kontroli wodnej.

Przygotowanie mieszanin reakcyjnych na 46 testów (cała płytka 96)

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej 1

1. Do sterylnej probówki 1.5 ml typu Eppendorf dodać:
 - 650 µl buforu do reakcji **B**
 - 65 µl starterów i sond do reakcji 1 **M1-SP**
 - 65 µl roztworu enzymów **E**
2. Zawartość probówki kilkakrotnie przepipetować i krótko zwirować.
3. Probówkę opisać "**mieszanina 1**" i przechowywać na lodzie.
Uwaga! Mieszanina 1 nie nadaje się do ponownego użycia po zamrożeniu.
Informacja: Mieszanina 1 wystarczy na 46 testów wykrywających wirusa.

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej 2

1. Do sterylnej probówki 1.5 ml typu Eppendorf dodać:
 - 650 µl buforu do reakcji **B**
 - 65 µl starterów i sond do reakcji 2 **M2-SP**
 - 65 µl roztworu enzymów **E**
2. Zawartość probówki kilkakrotnie przepipetować i krótko zwirować.

3. Probówkę opisać "**mieszanina 2**" i przechowywać na lodzie.

Uwaga! Mieszanina 2 nie nadaje się do ponownego użycia po zamrożeniu.

Informacja: Mieszanina 2 wystarczy na 46 testów wykrywających wirusa.

Przygotowanie mieszanin reakcyjnych na określoną liczbę testów

Do przygotowania mieszanin reakcyjnych **1** i **2** 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.

składniki mieszaniny 1	objętość na 1 reakcję	składniki mieszaniny 2	objętość na 1 reakcję
B - bufor do reakcji	12.5 µl	B - bufor do reakcji	12.5 µl
M1-SP - startery i sondy do reakcji 1	1.25 µl	M2-SP - startery i sondy do reakcji 2	1.25 µl
E - roztwór enzymów	1.25 µl	E - roztwór enzymów	1.25 µl

Przykładowo: do przygotowania mieszaniny M1 na 15 testów należy użyć:

- **B:** $(15 + 2) \times 12.5 \mu\text{l} = 212.5 \mu\text{l} + 10\% \text{ nadmiaru} (21.25 \mu\text{l}) = \mathbf{234 \mu\text{l}}$
- **M1-SP:** $(15 + 2) \times 1.25 \mu\text{l} = 21.25 \mu\text{l} + 10\% \text{ nadmiaru} (2.125 \mu\text{l}) = \mathbf{24 \mu\text{l}}$
- **E:** $(15 + 2) \times 1.25 \mu\text{l} = 21.25 \mu\text{l} + 10\% \text{ nadmiaru} (2.125 \mu\text{l}) = \mathbf{24 \mu\text{l}}$

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej **1**

1. Do jałowej probówki 1.5 ml typu Eppendorf dodać:

- obliczoną objętość buforu do reakcji **B**
- obliczoną objętość starterów i sond do reakcji **1 M1-SP**
- obliczoną objętość roztworu enzymów **E**

2. Zawartość probówki kilkakrotnie przepipetować i krótko zwirować.

3. Probówkę opisać "**mieszanina 1**" i przechowywać na lodzie.

Uwaga! Mieszanina 1 nie nadaje się do ponownego użycia po zamrożeniu.

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej **2**

1. Do jałowej probówki 1.5 ml typu Eppendorf dodać:

- obliczoną objętość buforu do reakcji **B**
- obliczoną objętość starterów i sond do reakcji **2 M2-SP**

- obliczoną objętość roztworu enzymów **E**

2. Zawartość próbówki kilkakrotnie przepipetować i krótko zwirować.

3. Probówkę opisać "**mieszanina 2**" i przechowywać na lodzie.

Uwaga! Mieszanina 2 nie nadaje się do ponownego użycia po zamrożeniu.

Przygotowanie płytki

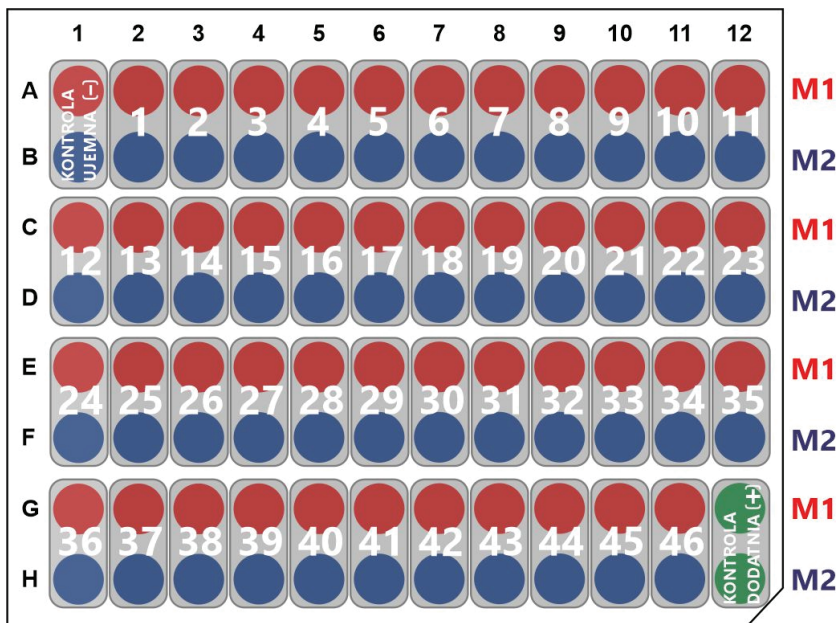
1. Dodać po **15 µl** mieszanin **1** i **2** do dołków na płytce 96-dołkowej, według schematu przedstawionego na Rysunku 2.

2. Dodać po **10 µl** kontroli ujemnej **NC** do dołków **A1** i **B1**.

3. Dodać po **10 µl** roztworu RNA wyizolowanego z materiału pobranego od badanych osób do dołków na płytce 96-dołkowej, według schematu przedstawionego na Rysunku 2. (pierwsza osoba: 2A i 2B, druga osoba: 3A i 3B, trzecia osoba: 4A i 4B itd.). Opcjonalnie dodać po **1 µl** matrycy **IC** do każdej reakcji z wyjątkiem kontrolnych (jeśli ta matryca nie została dodana przed izolacją RNA).

4. Dodać po **10 µl** kontroli dodatniej **PC-R** do dołków **G12** i **H12**.

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



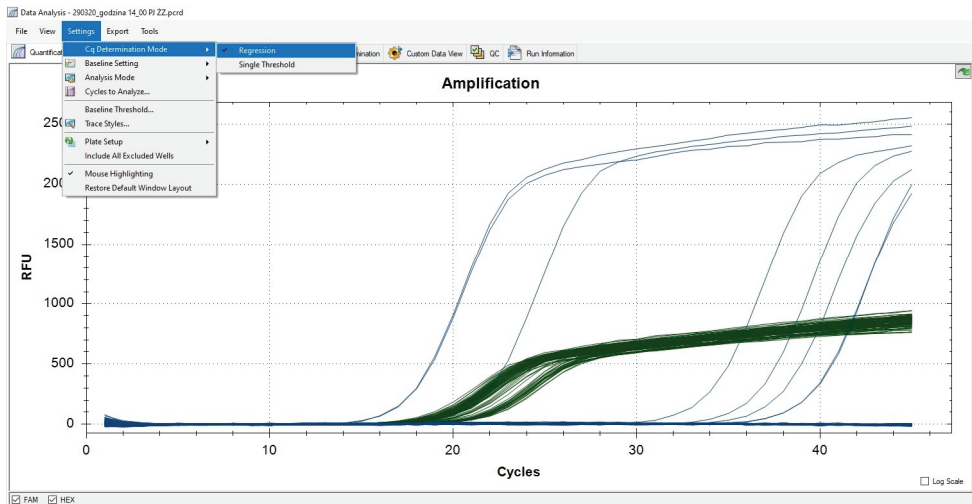
Rysunek 2. Schemat przygotowania płytki 96-dółkowej.

Warunki reakcji PCR

temperatura	czas	liczba cykli
50°C	20 min.	1
95°C	15 min.	1
94°C	15 sek.	40
60°C	1 min.	
Odczyt sygnałów z płytki (kanały FAM i HEX)		

Analiza wyników

Do 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:

reakcja 1		reakcja 2		Interpretacja
FAM	HEX*	FAM	HEX**	
+	+/-	+	+/-	Osoba badana pozytywna pod względem COVID-19 ^a
+	+/-	-	+/-	Osoba badana pozytywna pod względem COVID-19 ^b
-	+/-	+	+/-	Osoba badana pozytywna pod względem COVID-19 ^b
-	+	-	+	Osoba badana negatywna pod względem COVID-19
-	-	-	+	Osoba badana negatywna pod względem COVID-19 ^c
-	+	-	-	Próbkę należy ponownie przeanalizować lub pobrać nowy wymaz
-	-	-	-	Procedura izolacji nie przebiegła prawidłowo lub wystąpił błąd reakcji PCR

* Wynik reakcji 1 w kanale HEX stanowi kontrolę procedury izolacji RNA.

** Wynik reakcji 2 w kanale HEX należy interpretować jako przybliżoną ocenę jakości i/lub ilości całkowitego materiału obecnego w wymazie. Wynik tej reakcji może zależeć od sposobu pobrania materiału, czasu przechowywania materiału przed wykonaniem analizy, sposobu przechowywania i transportu materiału, jakości i sposobu izolacji RNA wirusa z wymazu, a także innych czynników.

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

^b W przypadku późnej amplifikacji dla jednej z reakcji w kanale FAM możliwe jest nieuzyskanie sygnału w drugiej reakcji. Dodatni wynik dla próbki w kanale FAM dla jednego genu jest interpretowany jako pozytywny, jednak w takim przypadku zaleca się ponowne pobranie próbki za kilka dni.

^c Brak sygnału dla reakcji 1 w kanale HEX najprawdopodobniej wynika z niedodania IC do próbek.

Kontrole ujemne. Kontrole ujemne nie mogą wykazywać sygnału dla żadnego z genów SARS-CoV-2 (kanał FAM). Pojawienie się późnego sygnału (Ct > 35) w kontroli ujemnej w kanale HEX (IC i/lub RNaza P) świadczy o kontaminacji. Fakt ten nie wpływa na interpretację wyników w reakcjach wykrywających SARS-CoV-2. Jeżeli jednak sygnały amplifikacji w kanale HEX w kontrolach ujemnych pojawiają się wcześniej (Ct < 35) należy powtórzyć cały proces diagnostyczny.

Aparaty do real-time PCR

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

Walidację zestawu przeprowadzono na urządzeniach:

- CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- LightCycler 480 II (Roche)*

* W przypadku zastosowania LC 480 II można spodziewać się wystąpienia sygnału amplifikacji 1-2 cykle później niż w przypadku aparatów Bio-Rad.

UWAGA. Zestaw można stosować także w urządzeniach typu ABI7500, które wymagają jednak stosowania dodatkowych barwników normalizacyjnych. W takim przypadku, do mieszanin reakcyjnych 1 i 2 należy dodać barwnik ROX do odpowiedniego stężenia. Barwnik ROX nie jest dołączony do zestawu.

Parametry działania testu

- Czułość > 95%
- Specyficzność > 99%
- Reaktywność krzyżowa *in silico*

Grupa taksonomiczna	Patogen	Liczba przetestowanych linii izolatów	Reaktywność krzyżowa
Betacoronavirus	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)	9000	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	128	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 2	8	Nie obserwowane
Rubulavirus	Rubulavirus 2	2	Nie obserwowane
Rubulavirus	Rubulavirus 4	4	Nie obserwowane
Orthopneumovirus	Human orthopneumovirus	42	Nie obserwowane
Bordetella	Bordetella pertussis	48	Nie obserwowane
Candida	Candida albicans	91	Nie obserwowane
Corynebacterium	Corynebacterium diphtheriae	22	Nie obserwowane
Haemophilus	Haemophilus influenzae	40	Nie obserwowane
Legionella	Legionella pneumophila	41	Nie obserwowane
Mycobacterium tuberculosis complex	Mycobacterium tuberculosis	2900	Nie obserwowane
Moraxella	Moraxella catarrhalis	13	Nie obserwowane
Neisseria	Neisseria meningitidis	231	Nie obserwowane
Pseudomonas aeruginosa group	Pseudomonas aeruginosa	382	Nie obserwowane
Staphylococcus	Staphylococcus aureus	4639	Nie obserwowane
Staphylococcus	Staphylococcus epidermidis	111	Nie obserwowane
Streptococcus	Streptococcus salivarius	11	Nie obserwowane
Streptococcus	Streptococcus pneumoniae	339	Nie obserwowane
Streptococcus	Streptococcus pyogenes	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 46 testów
	Numer partii		Zapoznaj się ze środkami ostrożności
	Data ważności		Przechowywać w temperaturze ≤-20°C
	Numer katalogowy		



ul. Sokołowska 9, lok. U19, 01-142 Warszawa, Polska
www.medicofarma.pl/coronavirus-test

