



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. 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.

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



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 MPC3	 94	IVD

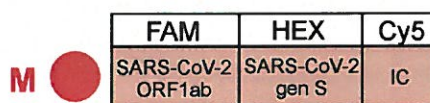
Spis treści

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 matrycy kontroli wewnętrznej IC	6
Przygotowanie mieszanin reakcyjnych na 94 testy (cała płytka 96)	6
Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej	6
Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej na określoną liczbę testów	6
Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej	7
Przygotowanie płytki	7
Warunki reakcji PCR	8
Analiza wyników	8
Interpretacja wyników	10
Aparaty do real-time PCR	10
Parametry działania testu	11
Objaśnienie użytych symboli	11

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. 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
B - bufor do reakcji	1430 µl	≤-20 °C
M-SP - startery i sondy do reakcji	120 µl	≤-20 °C
E - roztwór enzymów	170 µl	≤-20 °C
PC-R - kontrola dodatnia	60 µl	≤-20 °C
IC - matryca kontroli wewnętrznej	1100 µl	≤-20 °C
NC - kontrola ujemna	100 µl	≤-20 °C

Dodatkowy sprzęt i odczynniki

- Mikrowirówka
- Wyrząsarka 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

Instrukcja używania - MediPAN-2G+ COVID test

- 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. **Roztwór zawierający startery i sondy (M-SP) powinien być chroniony 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 mieszanki reakcyjnej 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.
- Próbki RNA uzyskane od badanych osób należy umieścić na lodzie, a płytki 96-dołkowe 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 94 testy (cała płytka 96)

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

1. Do sterylnej probówki 1.5 ml typu Eppendorf dodać:

- 1300 µl buforu do reakcji B
- 104 µl starterów i sond do reakcji **M-SP**
- 156 µl roztworu enzymów **E**

2. Zawartość probówki kilkakrotnie przepipetować i krótko zwirować.

3. Probówkę przechowywać na lodzie.

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

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.

składniki mieszaniny	objętość na 1 reakcję
B - bufor do reakcji	12.5 µl
M-SP - startery i sondy do reakcji	1.00 µl
E - roztwór enzymów	1.50 µl

Przykładowo: do przygotowania mieszaniny na 15 testów należy użyć:

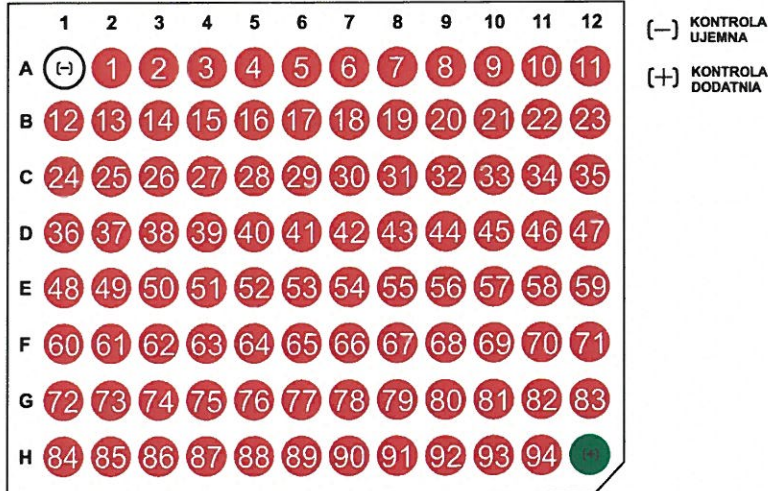
- **B:** $(15 + 2) \times 12.5 \mu\text{l} = 212.5 \mu\text{l} + 10\% \text{ nadmiaru } (21.25 \mu\text{l}) = 234 \mu\text{l}$
- **M-SP:** $(15 + 2) \times 1.00 \mu\text{l} = 17 \mu\text{l} + 10\% \text{ nadmiaru } (1.7 \mu\text{l}) = 18.7 \mu\text{l}$
- **E:** $(15 + 2) \times 1.50 \mu\text{l} = 25.5 \mu\text{l} + 10\% \text{ nadmiaru } (2.55 \mu\text{l}) = 28.05 \mu\text{l}$

Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej

1. Do jałowej probówki 1.5 ml typu Eppendorf dodać:
 - obliczoną objętość buforu do reakcji **B**
 - obliczoną objętość starterów i sond do reakcji **M-SP**
 - obliczoną objętość roztworu enzymów **E**
2. Zawartość probówki kilkakrotnie przepipetować i krótko zwirować.
3. Probówkę przechowywać na lodzie.
Uwaga! Mieszanina nie nadaje się do ponownego użycia po zamrożeniu.

Przygotowanie płytki

1. Dodać po **15 µl** mieszaniny do dołków na płytce 96-dołkowej, według schematu przedstawionego na Rysunku 2.
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 na płytce 96-dołkowej, według schematu przedstawionego na Rysunku 2. (pierwsza osoba: 2A, druga osoba: 3A, trzecia osoba: 4A 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 **10 µl** kontroli dodatniej **PC-R** 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.

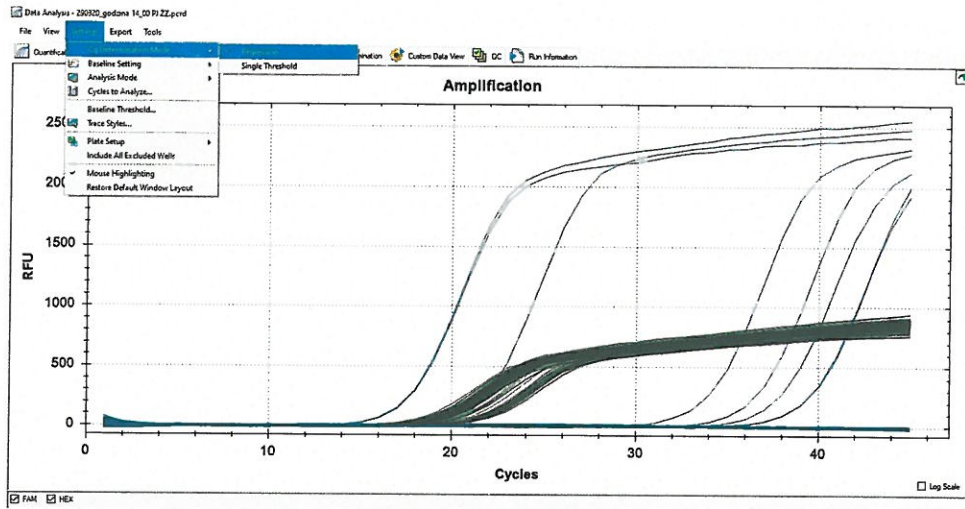
Warunki reakcji PCR

temperatura	czas	liczba cykli
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, HEX i Cy5)		

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).

Instrukcja używania - MediPAN-2G+ COVID test



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 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
-	-	-	Procedura izolacji nie przebiegła prawidłowo lub wystąpił błąd reakcji PCR

* 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 W przypadku późnej amplifikacji dla jednej z reakcji dla genów swoistych dla SARS-CoV-2 (w kanale FAM lub HEX) możliwe jest nieuzyskanie sygnału w drugiej reakcji. Dodatni wynik dla próbki w kanale FAM lub HEX dla jednego genu jest interpretowany jako pozytywny, jednak w takim przypadku zaleca się powtórzenie analizy lub ponowne pobranie próbki za kilka dni.

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. Fakt ten nie wpływa na interpretację wyników w reakcjach wykrywających SARS-CoV-2. Jeżeli jednak sygnały amplifikacji w kanale Cy5 w kontrolach ujemnych pojawią 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.










Instrukcja używania - MediPAN-2G+ COVID test

Parametry działania testu

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

Grupa taksonomiczna	Patogen	Liczba przetestowanych kulturowo	Reaktywność krzyżowa
	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)	9000	Obserwowana
Betacoronavirus			
Betacoronavirus	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV)	211	Nie obserwowana
Betacoronavirus	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus	6	Nie obserwowana
Betacoronavirus	Human coronavirus OC43	1	Nie obserwowana
Betacoronavirus	Human coronavirus HKU1	3	Nie obserwowana
Alphacoronavirus	Human coronavirus 229E	4	Nie obserwowana
Alphacoronavirus	Human coronavirus NL63	3	Nie obserwowana
Human metadenovirus C	Human adenovirus 1	3	Nie obserwowana
Enterovirus	Enterovirus B	178	Nie obserwowana
Enterovirus	Enterovirus D	6	Nie obserwowana
Influenza A	H1N1 subtype	36135	Nie obserwowana
Influenza B	Influenza B virus	18538	Nie obserwowana
Human metapneumovirus	Human metapneumovirus	4	Nie obserwowana
Enterovirus	Rhinovirus B	25	Nie obserwowana
Respirovirus	Respirovirus 1	7	Nie obserwowana
Respirovirus	Respirovirus 3	8	Nie obserwowana
Rubulavirus	Rubulavirus 2	2	Nie obserwowana
Rubulavirus	Rubulavirus 4	4	Nie obserwowana
Orthopneumovirus	Human orthopneumovirus	47	Nie obserwowana
Bordetella	Bordetella pertussis	48	Nie obserwowana
Candida	Candida albicans	91	Nie obserwowana
Corynebacterium	Corynebacterium diptheriae	22	Nie obserwowana
Haemophilus	Haemophilus influenzae	40	Nie obserwowana
Legionella	Legionella pneumophila	41	Nie obserwowana
Mycobacterium tuberculosis complex	Mycobacterium tuberculosis	2900	Nie obserwowana
Moraxella	Moraxella catarrhalis	15	Nie obserwowana
Neisseria	Neisseria meningitidis	231	Nie obserwowana
Pseudomonas aeruginosa group	Pseudomonas aeruginosa	382	Nie obserwowana
Staphylococcus	Staphylococcus aureus	4639	Nie obserwowana
Staphylococcus	Staphylococcus epidermidis	111	Nie obserwowana
Streptococcus	Streptococcus salivarius	11	Nie obserwowana
Streptococcus	Streptococcus pneumoniae	339	Nie obserwowana
Streptococcus	Streptococcus pyogenes	835	Nie obserwowana

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 ≤ -20°C
	Numer katalogowy		

MEDICOFARMA S.A.
01-142 Warszawa
ul. Sokołowska 9 lok. U19
NIP: 527-23-24-54

Instrukcja używania - MediPAN-2G+ COVID test



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

CE

Wersja instrukcji nr 1, obowiązuje od 14.07.2020