

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 brytyjska).

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

REF MPC5

 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 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	1150 µl	≤-20 °C
PP - startery i sondy do reakcji	230 µl	≤-20 °C
PC - kontrola dodatnia	50 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.
- Próbkę 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:

- **1040 µl** mieszaniny reakcyjnej **BE**
- **208 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	10 µl
PP - startery i sondy do reakcji	2 µl

Przykładowo: do przygotowania mieszaniny na 15 testów należy użyć:

- **BE** : $(15 + 2) \times 10 \mu\text{l} = 170 \mu\text{l} + 10\% \text{ nadmiaru } (17 \mu\text{l}) = 187 \mu\text{l}$
- **PP** : $(15 + 2) \times 2 \mu\text{l} = 34 \mu\text{l} + 10\% \text{ nadmiaru } (3.4 \mu\text{l}) = 37.4 \mu\text{l}$

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 **12 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.

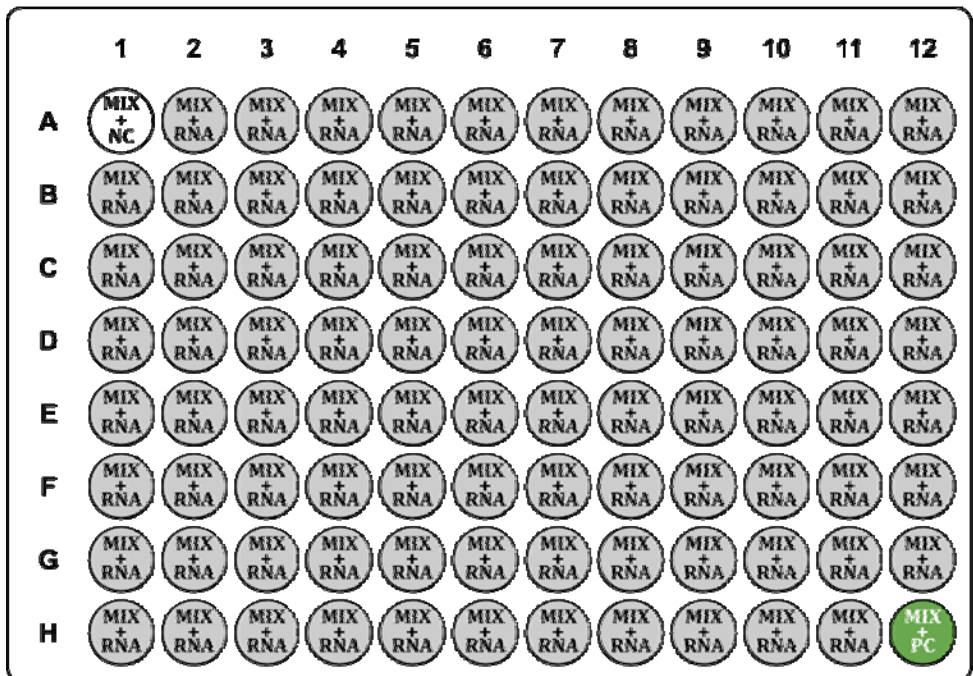
2. Dodać **8 µl** kontroli ujemnej NC do dołka A1.

3. Dodać po **8 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 7 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 13 µl mieszaniny reakcyjnej z IC do 7 µl próbek i oczywiste będzie uzyskanie sygnału na kanale Cy5 także w dołku z kontrolą ujemną NC.

4. Dodać **8 µl** kontroli dodatniej PC do dołka H12.

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



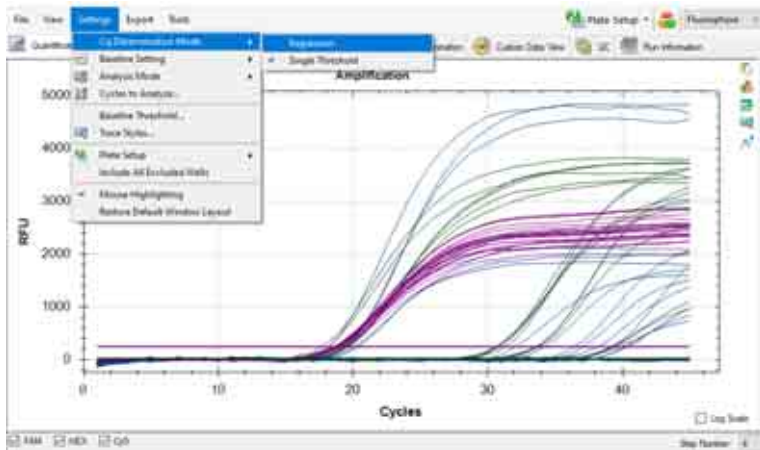
Rysunek 2. Schemat przygotowania płytki 96-dołkowej.

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 użyczenie 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/stron	Ryzykowność krzyżowa
	Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)	990	Obserwowana
Betacoronavirus	Severe acute respiratory syndrome related coronavirus (SARS-CoV)	211	Nie obserwowana
Betacoronavirus	Middle East respiratory syndrome-related coronavirus	8	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 metapneumovirus C	Human metapneumovirus 1	2	Nie obserwowana
Enterovirus	Enterovirus B	128	Nie obserwowana
Enterovirus	Enterovirus D	6	Nie obserwowana
Influenza A	H1N1 subtype	36135	Nie obserwowana
Influenza B	Influenza B virus	18518	Nie obserwowana
Human metapneumovirus	Human metapneumovirus	4	Nie obserwowana
Enterovirus	Enterovirus 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
Orthogammatovirus	Human orthogammatovirus	42	Nie obserwowana
Bordetella	Bordetella pertussis	48	Nie obserwowana
Comidae	Comidae 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 carolinensis	15	Nie obserwowana
Nocardia	Nocardia asteroides	211	Nie obserwowana
Phaenomonas aeruginosa group	Phaenomonas aeruginosa	383	Nie obserwowana
Staphylococcus	Staphylococcus aureus	4619	Nie obserwowana
Staphylococcus	Staphylococcus epidermidis	111	Nie obserwowana
Streptococcus	Streptococcus salivarius	11	Nie obserwowana
Streptococcus	Streptococcus pneumoniae	338	Nie obserwowana
Streptococcus	Streptococcus pyogenes	831	Nie obserwowana



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



Wersja instrukcji nr 7 obowiązuje od 14.04.2021