

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.

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 płytką 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 multiplexowych 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 zawiązujący 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 uzyskaną 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”.

- 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**
- Zawartość probówki kilkakrotnie przepipetować i krótko zwirować.
- Probówkę opisać "**MIX**" i przechowywać na lodzie.

Informacja: Mieszanina wystarcza na 94 testy wykrywające wirus a wraz z reakcjami i 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

- 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**
- Zawartość probówki kilkakrotnie przepipetować i krótko zwirować.
- 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.

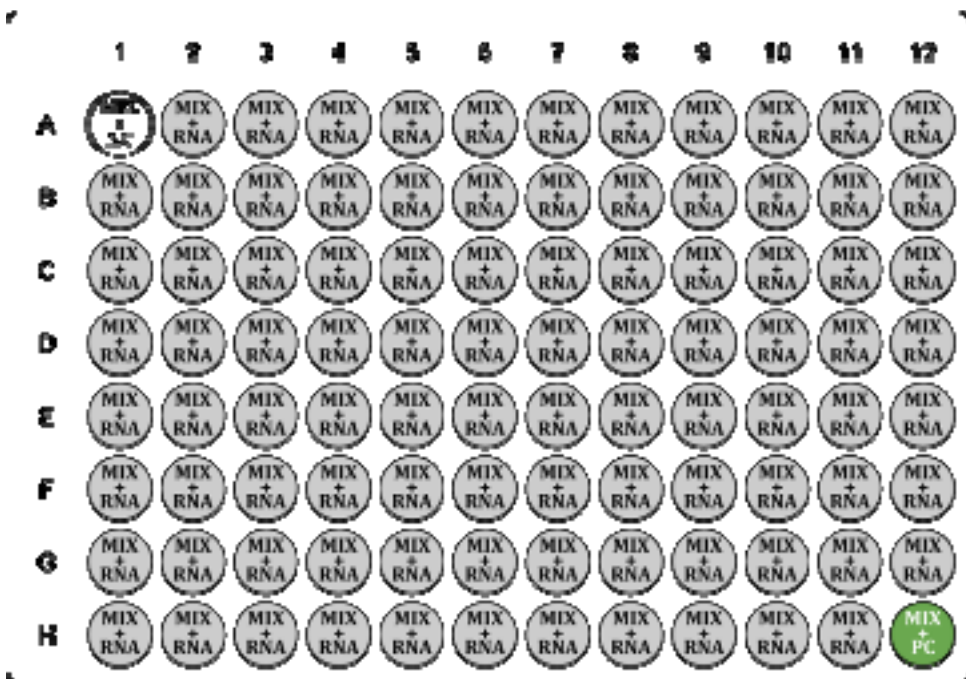
2. Dodać **10 µl** kontroli ujemnej NC do dołka A1.

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 do dać 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 do dać odpowiednią objętość IC, w przeliczeniu 1 µl/próbkę, do sporządzanej mieszaniny reakcyjnej (aby uniknąć wielokrotnego dodawania IC na płytce). W takim wypadku do dawać 16 µl mieszaniny reakcyjnej z IC do 9 µl próbki i oczywiście będzie uzyskanie sygnału na kanale Cy5 także w dołku kontroli ujemnej N.C.

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.



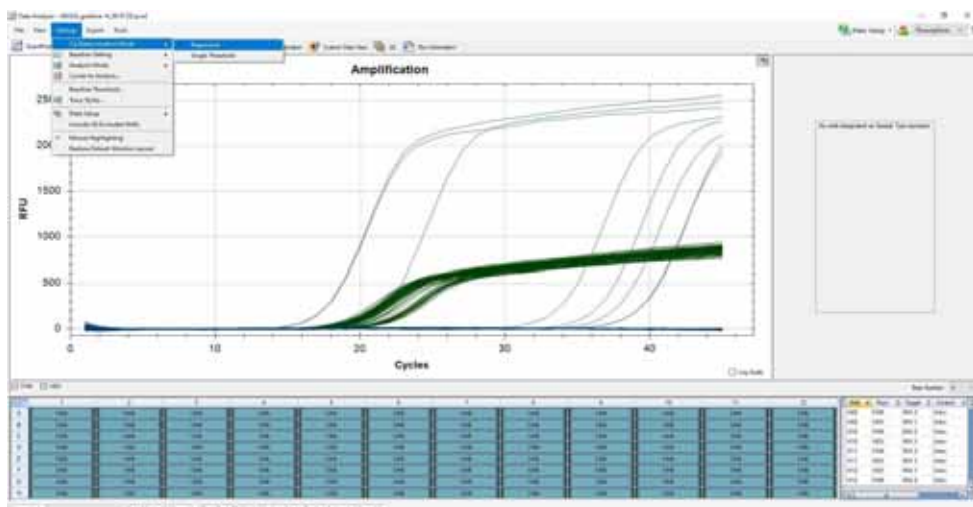
Rysunek 2. Schemat przygotowania płytki 96-dołkowej.

Warunki reakcji PCR

temperatura	czas	liczba cykli
52°C	5 min.	1
95°C	10 sek.	1
95°C	3 sek.	45
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 COVID-19 ^a
+	-	+/-	Wynik nierozstrzygający ^b
-	+	+/-	Wynik nierozstrzygający ^b
-	-	+	Osoba badana negatywna pod względem COVID-19
-	-	-	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 nierozstrzygający. 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 Wynik jest nierozstrzygający w przypadku uzyskania sygnału tylko dla jednego z kanałów, FAM lub HEX. Takie odczyty mogą być obserwowane przy późnych amplifikacjach z jednego kanału.

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

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 zasygnalizowanej 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 z 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 (RocheDiagnostics)
- 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

- Czułość > 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)	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 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>	231	Nie obserwowane
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> group	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	382	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

	Wyrob 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		



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



Wersja instrukcji nr 4 obowiązuje od 16.11.2020