

## ***Informacja wstępna***

MediPAN FAST COVID + FLU test jest przeznaczony do wykrywania wirusów SARS-CoV-2 oraz grypy typu A i B. Obecność SARS-CoV-2 jest potwierdzana w dwóch niezależnych reakcjach zaprojektowanych na dwa geny tego wirusa. Dla wykrycia wirusów grypy przeprowadzane są dodatkowe dwie reakcje. Reakcja kontrolna pozwala na kontrolę jakości próbki i procedury przygotowania materiału. Cechy ułatwiające użytkowanie testu to:

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

Zestaw został opracowany przez badaczy z Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk.

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](mailto:covid@medicofarma.pl)

lub kontaktować się telefonicznie pod numerem tel.:

+48 691 772771





## ***Instrukcja używania***

# **MediPAN FAST COVID + FLU test**

### **SARS-CoV-2 + FLU A/B virus Detection Kit**

#### **Real-time RT-PCR**

Wyrób medyczny do diagnostyki *in vitro* do oznaczania materiału genetycznego SARS-CoV-2 i wirusów grypy typu A i B 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	5
Skład zestawu	5
Dodatkowy sprzęt i odczynniki	5
Ważne informacje i środki ostrożności	6
Ograniczenia użycia	6
<b>Procedura</b>	<b>6</b>
<b>Przygotowanie składników reakcji</b>	<b>6</b>
<b>Przygotowanie mieszanin reakcyjnych na 94 testy (cała płytka 96)</b>	<b>6</b>
<b>Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej na określoną liczbę testów</b>	<b>7</b>
<b>Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej</b>	<b>7</b>
<b>Przygotowanie płytki</b>	<b>7</b>
Warunki reakcji PCR	8
Analiza wyników	9
Interpretacja wyników	10
Aparaty do real-time PCR	11
Parametry działania testu	11
Objaśnienie użytych symboli	14

## Opis i zastosowanie

MediPAN FAST COVID + FLU jest testem do specyficznego wykrywania wirusów SARS-CoV-2 i grypy typu A i B u ludzi. Kluczowym etapem testu jest detekcja materiału genetycznego wirusów, 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 danego wirusa. W teście wykrywane są wysoce swoiste fragmenty dwóch genów SARS-CoV-2: ORF1ab (nsp2) oraz gen S, oraz swoiste fragmenty wirusa grypy typu A (gen PB1) i B (gen M). Kontrolą jest reakcja wykrywająca ludzki gen ACE2, którego poziom ekspresji jest wysoki w komórkach nabłonka górnych dróg oddechowych.

Zestaw został przygotowany w taki sposób, aby próbka pobrana od osoby badanej była analizowana równolegle w czterech reakcjach w jednym dołku. W dwóch reakcjach wykrywany jest RNA wirusa wywołującego COVID-19 we fluorescencyjnym kanale dla barwnika FAM i HEX. Reakcje dla wirusów grypy A i B dają sygnał w kanale dla barwnika TexasRed. Dodatkowo w mieszaninie przeprowadzana jest reakcja kontrolna wykrywana w kanale dla barwnika Cy5 ([Rysunek 1](#)).

kanal detekcji	FAM	HEX	TexasRed	Cy5
wykrywany gen	SARS-CoV-2 ORF1ab	SARS-CoV-2 gen S	Grypa typ A/B	ACE2

**Rysunek 1.** Schemat multipleksowych reakcji w mieszaninie reakcyjnej.

## Skład zestawu

składnik zestawu	objętość	przechowywanie i transport
<b>BE</b> - bufor i enzymy do reakcji	1430 µl	≤-20 °C
<b>PP</b> - startery i sondy do reakcji	285 µl	≤-20 °C
<b>PC</b> - kontrola dodatnia	60 µl	≤-20 °C
<b>NC</b> - kontrola ujemna	100 µl	≤-20 °C

## Dodatkowy sprzęt i odczynniki

- Mikrowirówka
- Wytrząsarka do płytek 96-dołkowych lub wirówka z rotorem na płytce 96-dołkowej
- Sterylna komora z nawiewem laminarnym
- Pojemniki do inkubacji na lodzie
- Aparat do real-time PCR z detekcją sygnałów dla barwników FAM, HEX, TexasRed i Cy5
- Płytki 96-dołkowe dedykowane do aparatu do real-time PCR
- Sterylne próbówki 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 używalnych 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.

### Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej na 94 testy (cała płytką 96)

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

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

2. Zawartość próbówki kilkakrotnie przepipetować i krótko zwirować.

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

**Informacja:** Mieszanina wystarczy na 94 testy wykrywające wirusy 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 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 "MIX" i przechowywać na lodzie.

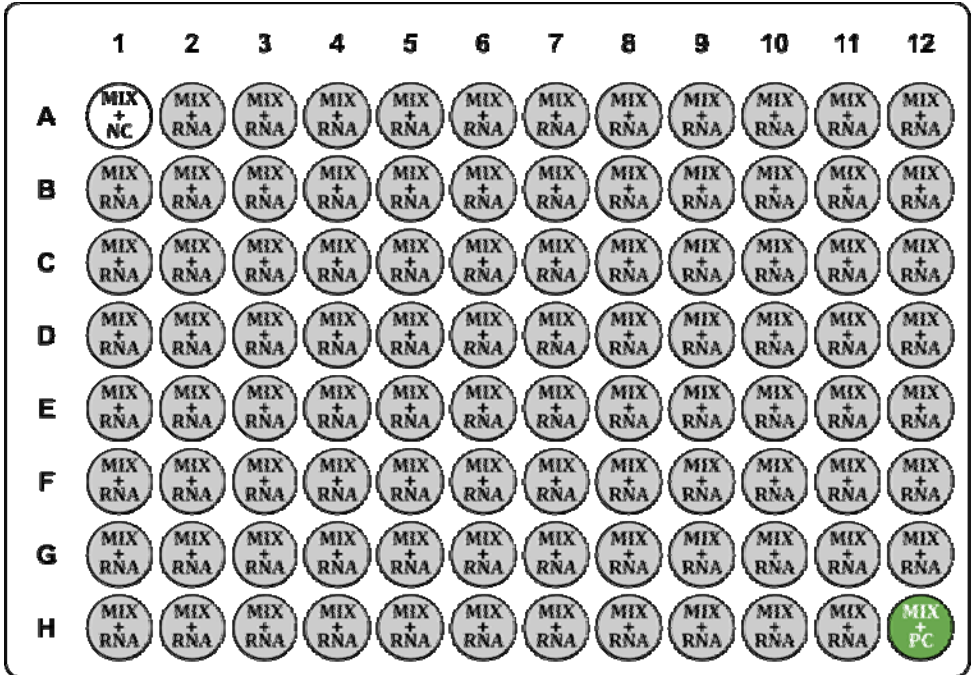
## Przygotowanie płytki

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.

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.

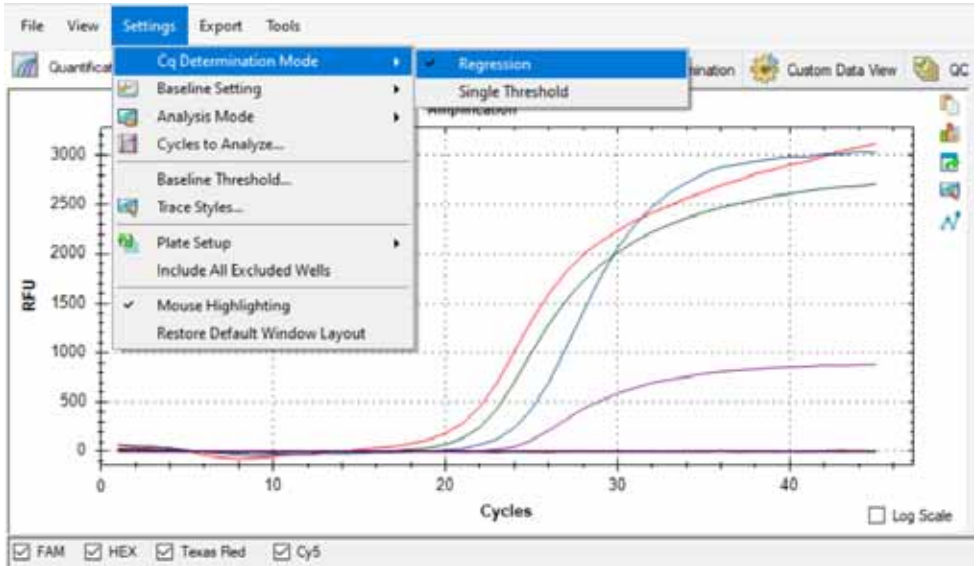
## Warunki reakcji PCR

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, TexasRed 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*	TexasRed*	Cy5**	
+	+	-	+/-	Osoba badana pozytywna pod względem SARS-CoV-2 <sup>a</sup>
+	-	-	+/-	Osoba badana pozytywna pod względem SARS-CoV-2 <sup>b</sup>
-	+	-	+/-	Osoba badana pozytywna pod względem SARS-CoV-2 <sup>b</sup>
-	-	+	+/-	Osoba badana pozytywna pod względem wirusa grypy typu A lub B <sup>a</sup>
+	+	+	+/-	Osoba badana pozytywna pod względem SARS i grypy typu A lub B (koinfekcja) <sup>a</sup>
-	-	-	+	Osoba badana negatywna pod względem SARS-CoV-2 i grypy typu A i B
-	-	-	-	Próbka wymazu złej jakości, procedura izolacji nie przebiegła prawidłowo lub wystąpił błąd reakcji PCR

\* Wyniki w kanale FAM, HEX i TexasRed są interpretowane jako pewne pozytywne przy wartościach Ct ≤ 40. Dla późniejszych amplifikacji wynik jest nierozstrzygujący. W takim przypadku zaleca się ponowne pobranie próbki od osoby badanej.

\*\* Wynik reakcji w kanale Cy5 stanowi kontrolę jakości wymazu, procedury izolacji RNA i/lub reakcji PCR. Akceptowalny wynik dla tej reakcji to Cq ≤ 35. Wyższe wartości Cq lub brak sygnału świadczą o złej jakości wymazu lub słabej wydajności izolacji RNA dla danej próbki.

<sup>a</sup> Dodatni wynik dla próbki pacjenta w kanale FAM i HEX dla obu genów swoistych dla SARS-CoV-2 lub w kanale TexasRed dla genu swoistego dla wirusa grypy A lub B jest interpretowany jako pozytywny niezależnie od wyników na kanale Cy5.

<sup>b</sup> 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 czterech 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) i genów wirusów grypy A i B (kanał TexasRed). Pojawienie się późnego sygnału (Ct > 35) w kontroli ujemnej w kanale Cy5 świadczy o kontaminacji, co nie wpływa jednak na interpretację wyników w reakcjach wykrywających wirusy.

## 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)
- Rotor Gene 3000 (Corbett Research)

**Uwaga!** Zestaw MediPAN FAST COVID + FLU 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%
- Swoistość diagnostyczna > 98%

Reaktywność krzyżowa *in silico*

### 1. Reaktywność krzyżowa *in silico* w odniesieniu do wybranych patogenów










Grupa taksonomiczna	Patogen	Liczba przetestowanych liniizolatów	Reaktywność krzyżowa <i>in silico</i>
Betacoronavirus	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2	1050	Obserwowana
Betacoronavirus	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 1	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 mastadenovirus C	Human adenovirus 1	2	Nie obserwowana
Enterovirus	Enterovirus B	128	Nie obserwowana
Enterovirus	Enterovirus D	6	Nie obserwowana
Influenza A	H1N1 subtype	243939	Obserwowana
Influenza B	Influenza B virus	18538	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	42	Nie obserwowana
Bordetella	Bordetella pertussis	48	Nie obserwowana
Candida	Candida albicans	91	Nie obserwowana
Corynebacterium	Corynebacterium diphtheriae	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	13	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	833	Nie obserwowana

2. Reaktywność krzyżowa *in silico* w odniesieniu do znanych szczepów wirusa grypy A i grypy B

Grupa taksonomiczna	Linia	Wariant antygenowy	Reaktywność krzyżowa <i>in silico</i>
Influenza A	H1N1pdm	6b	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1.A	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1.A/156K	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1.A/183P-1	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1.A/183P-2	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1.A/183P-3	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1.A/183P-4	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1.A/183P-5	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1.A/183P-5a	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1.A/183P-5b	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1.A/183P-6	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1.A/183P-7	Obserwowana
Influenza A	H1N1pdm	6b1.A/187A	Obserwowana
Influenza A	H3N2	3c2.A	Obserwowana
Influenza A	H3N2	3c3	Obserwowana
Influenza A	H3N2	3c3.A	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A1	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A1a	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A1b	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A1b/131K	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A1b/135K	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A1b/135N	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A1b/137F	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A1b/166D	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A1b/187R	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A1b/94N	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A2	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A2/re	Obserwowana
Influenza A	H3N2	A3	Obserwowana
Influenza B	Victoria	V1A	Obserwowana

Influenza B	Victoria	V1A.1	Obserwowana
Influenza B	Victoria	V1A.2	Obserwowana
Influenza B	Victoria	V1A.3	Obserwowana
Influenza B	Victoria	V1A/165N	Obserwowana
Influenza B	Yamagata	172Q	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 $\leq -20^{\circ}\text{C}$
	Numer katalogowy		





ul. Sokołowska 9, lok. U19, 01-142 Warszawa, Polska  
[www.medicofarma.pl/coronavirus-test](http://www.medicofarma.pl/coronavirus-test)



*Wersja instrukcji nr 2 obowiązuje od 12.01.2021*