

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 dodatkowo 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

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 |
|---|--|
|  MPC5 |  94  |

Spis treści

| | |
|---|----------|
| Opis i zastosowanie | 5 |
| Skład zestawu | 5 |
| Dodatkowy sprzęt i odczynniki | 5 |
| Ważne informacje i środki ostrożności | 6 |
| Ograniczenia użycia | 6 |
| Procedura | 6 |
| Przygotowanie składników reakcji | 6 |
| Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej na 94 testy (cała płytka 96) | 6 |
| Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej na określoną liczbę testów | 7 |
| Przygotowanie mieszaniny reakcyjnej | 7 |
| Przygotowanie płytki | 7 |
| Warunki reakcji PCR | 8 |
| Analiza wyników | 9 |
| Interpretacja wyników | 10 |
| Aparaty do real-time PCR | 11 |
| Parametry działania testu | 11 |
| Objaśnienie użytych symboli | 15 |

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 |
|---|----------|----------------------------|
| 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 |
| NC - 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.

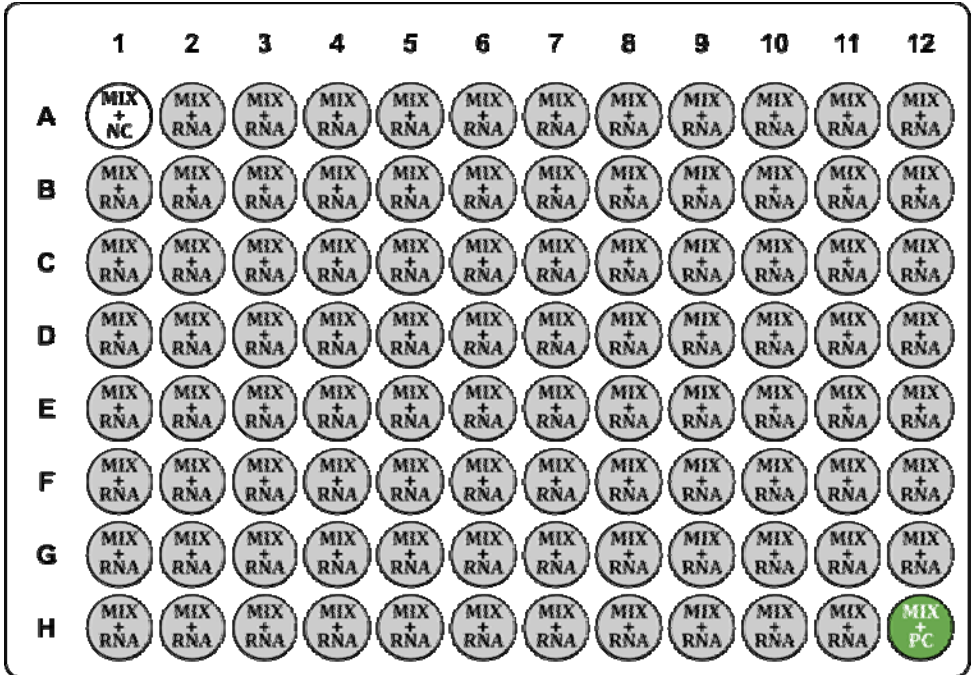
Przygotowanie płytki

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.



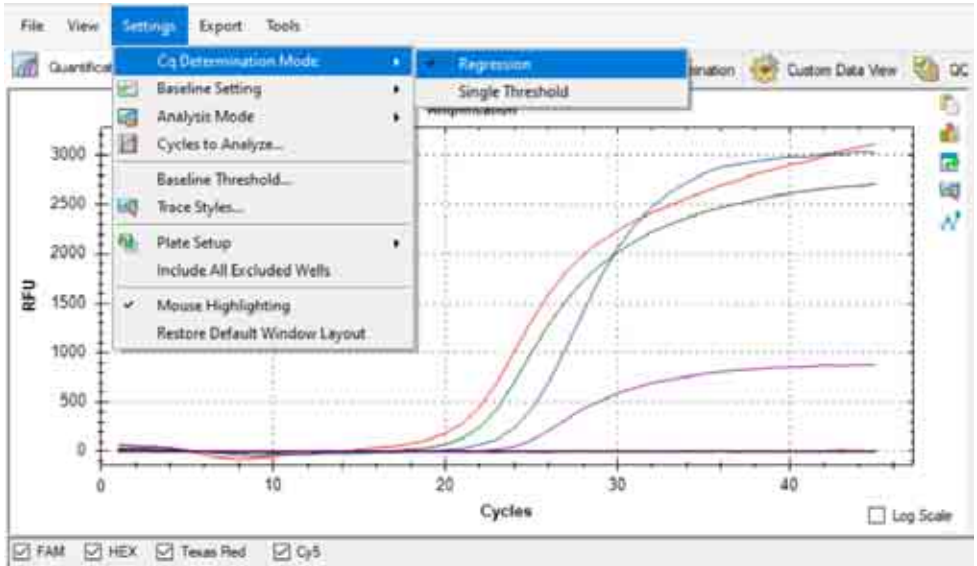
Rysunek 2. Schemat przygotowania płytki 96-dołkowej.

Warunki reakcji PCR

| temperatura | czas | liczba cykli |
|--|---------|--------------|
| 52°C | 5 min. | 1 |
| 95°C | 10 sek. | 1 |
| 95°C | 3 sek. | 40 |
| 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 ^a |
| + | - | - | +/- | Osoba badana pozytywna pod względem SARS-CoV-2 ^b |
| - | + | - | +/- | Osoba badana pozytywna pod względem SARS-CoV-2 ^b |
| - | - | + | +/- | Osoba badana pozytywna pod względem wirusa grypy typu A lub B ^a |
| + | + | + | +/- | Osoba badana pozytywna pod względem SARS i grypy typu A lub B (koinfekcja) ^a |
| + | - | + | +/- | Osoba badana pozytywna pod względem SARS i grypy typu A lub B (koinfekcja) ^{a,b} |
| - | + | + | +/- | Osoba badana pozytywna pod względem SARS i grypy typu A lub B (koinfekcja) ^{a,b} |
| - | - | - | + | 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 ≤ 36. 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.

^a 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.

^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 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 | 16538 | Obserwowana |
| Human metapneumovirus | Human metapneumovirus | 4 | Nie obserwowana |
| Enterovirus | Rhinovirus B | 26 | 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 | 4638 | 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/167R | 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



Wersja instrukcji nr 4 obowiązuje od 04.11.2021