

Система для выявления SARS-CoV-2 варианта Омикрон (BA.1 и BA.2-BA.5)

1. Описание

Система для выявления SARS-CoV-2 варианта Омикрон (BA.1 и BA.2-BA.5) - это набор реагентов для качественного выявления РНК коронавируса SARS-CoV-2 *in vitro*, основанный на технологии одношаговой ОТ-ПЦР в реальном времени. Позволяет выявить РНК SARS-CoV-2 в образцах и установить принадлежность выявленного вируса к вариантам **Омикрона (B.1.1.529) сублиний BA.1 и BA.2-BA.5**.

Набор включает мультиплексную систему праймеров и зондов:

систему, специфичную к последовательности гена N;

систему для детекции SARS-CoV-2 варианта Омикрон **сублинии BA.1***

систему для детекции **всех сублиний*** SARS-CoV-2 варианта Омикрон

систему, детектирующую внутренний контроль (ген человека).

** система праймеров и зондов разработана ФГБУ НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России (Референс-лаборатория ВОЗ по COVID-19).*

Набор предназначен для исследовательских работ. Не предназначен для проведения диагностики!

2. Компоненты набора:

Компонент	100 реакций	200 реакций
2× смесь для ОТ-ПЦР-РВ	1 × 1.25 мл	2 × 1.25 мл
БиоМастер-микс	1 × 100 мкл	1 × 200 мкл
Набор праймеров	1 × 160 мкл	1 × 310 мкл
Позитивный РНК-контроль	1 × 100 мкл	1 × 200 мкл
Отрицательный контроль	1 × 100 мкл	1 × 200 мкл
Вода стерильная	1 × 1.25 мл	1 × 1.25 мл

3. Инструментальная база:

Настоящая тест-система была разработана для использования на следующих амплификаторах с режимом детекции в реальном времени:

- LightCycler® 96 (Roche)
- LightCycler® 480 (Roche)
- ABI Prism® 7500 SDS (Applied Biosystems)
- ABI Prism® 7500 Fast SDS (Applied Biosystems)
- Rotor-Gene® 6000 (Corbett Research)
- Rotor-Gene® Q5/6 plex Platform (QIAGEN)
- CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- CFX96™ Deep Well Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

4. Схема тестирования:

Образцы должны быть протестированы с использованием предоставленной системы праймеров и зондов с постановкой соответствующего положительного и отрицательного контролей. Детекция сигнала амплификации: для гена N должна проходить в канале FAM, для мутации в гене N варианта Омикрон (линии BA.1-BA.5) – в канале VIC/TAMRA/HEX, для мутации в гене S варианта Омикрон (линии BA.1) – в канале ROX, для внутреннего контроля (BK) – в канале Cy5.

5. Проведение эксперимента

5.1 Подготовка образца:

Исходным материалом для исследований с использованием Система для выявления SARS-CoV-2 варианта Омикрон (BA.1 и BA.2-BA.5) является РНК, выделенная из биологического образца.

Качество используемых образцов выделенной РНК оказывает критическое влияние на выявление вируса SARS-CoV-2. Необходимо убедиться, что система, используемая для экстракции нуклеиновых кислот, совместима с технологией ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Пригодность процедуры экстракции нуклеиновой кислоты для использования с Система для выявления SARS-CoV-2 варианта Омикрон (BA.1 и BA.2-BA.5) должна быть проверена и подтверждена пользователем самостоятельно.

Для выделения вирусной РНК рекомендуем:

- Набор реагентов для выделения РНК коронавируса SARS-CoV-2 из мазка/соскоба эпителиальных клеток на магнитных частицах (с РУ) MC21-100/MC21-100-MR. <https://biolabmix.ru/catalog/COVID-19/>
- Набор из мазка/соскоба эпителиальных клеток на магнитных частицах (NAmagp100 и NAmagp200, ООО «Биолабмикс»);
- Набор для выделения РНК из мазка/соскоба эпителиальных клеток на колонках (RU-50 и RU-250, ООО «Биолабмикс»);
- Набор для выделения ДНК/РНК из мазка/соскоба эпителиальных клеток, вирусов, клеток животных и бактерий (с соосадителем) (PN-100, ООО «Биолабмикс»).

5.2 Приготовление реакционной смеси:

Все реагенты и образцы следует полностью разморозить, перемешать (путем пипетирования или легкого встряхивания) и сбросить капли центрифугированием.

Рекомендуем приготовить премиксы реагентов с набором праймеров и зонда N/BK, исходя из следующей формулы: (2+х+1) реакционных смесей, где 2 – реакции с положительным и отрицательным контролями, х – количество образцов и +1 дополнительный объем для компенсации возможной ошибки пипетирования.

Реактив	Кол-во на 1 реакцию	Кол-во на 10 образцов
2× смесь для ОТ-ПЦР-РВ	12,5	125
БиоМастер-микс	1,0	10
Набор праймеров	1,5	15
Вода стерильная	5,0	50
Суммарный объем	20,0	200

Всё перемешать на вортексе и сбросить капли центрифугированием.

5.3 Постановка реакции:

Возьмите 96-луночный планшет, добавьте, используя автоматическую пипетку, по **20** мкл приготовленного премикса в зависимости от стадии тестирования.

Добавить по 5,0 мкл раствора образца (раствор после выделения РНК) и контроли (положительного и отрицательного) в соответствующие ячейки, содержащие премиксы с системой праймеров и зондов.

Убедитесь, что положительные и отрицательные контроли были добавлены.

Аккуратно перемешайте растворы образцов и контролей с премиксами пипетированием. Не забывайте менять наконечник автоматической пипетки.

Закройте 96-луночный реакционный планшет соответствующими крышками или оптической клейкой пленкой. Если вы используете реакционные пробирки, убедитесь, что они подходят для использования в амплификаторах с детекцией в режиме реального времени.

Центрифугируйте 96-луночный реакционный планшет в центрифуге с ротором для микротитровального планшета в течение 30 секунд со скоростью примерно 1000 x g (~ 3000 об / мин).

5.4 Протокол амплификации

Для получения основной информации о настройке и программировании различных инструментов ПЦР в режиме реального времени, пожалуйста, обратитесь к руководству пользователя соответствующего инструмента.

Установите следующий температурный профиль и считывание сигнала в каналах FAM, VIC, Cy5 и ROX:

Шаг	Температура	Время	Количество циклов
Обратная транскрипция	45 °C	15 мин	1
Предварительная инкубация	95 °C	5 мин	1
Денатурация	95 °C	10 с	45
Отжиг и элонгация*	62 °C	30 с	

* шаг считывания сигнала

6. Анализ и интерпретация данных:

Тест считается успешным, если эффективно и корректно прошли обе стадии: выделения РНК и ПЦР.

ПЦР прошла успешно и данные являются достоверными, при выполнении следующих критериев:

- в отрицательном контроле сигнал в канале FAM Ct > 37 цикла и в каналах VIC/TAMRA/HEX, Cy5 и ROX Ct > 40 цикла или отсутствуют;

- в положительном контроле в канале FAM, VIC/TAMRA/HEX и ROX сигнал в районе Cq 18-24, в канале Cy5 - отсутствует или появляется не ранее 40 цикла.

Эффективность стадии выделения оценивается для каждой пробы индивидуально по присутствию в ячейке сигнала Cy5. **Если сигнал в канале Cy5 отсутствует или превышает значение Cq более 34, следовательно, выделение прошло неудачно, и тестирование образца необходимо повторить, начиная со стадии выделения.**

FAM	HEX	ROX	Cy5	
+	-	-	+	Образец положительный на SARS-CoV-2 (не Омикрон)
+	+	-	+	Образец положительный на SARS-CoV-2 (BA.2-BA.5)
+	+	+	+	Образец положительный на SARS-CoV-2 (BA.1)
-	-	-	+	Образец отрицательный на SARS-CoV-2
-	-	-	-	Результат теста не валиден. Необходимо повторить экстракцию РНК.

Хранение: при +4 °С - 1 месяц; при -20 °С – 1 год, не более 30 циклов замораживания размораживания для 2х смесь для ОТ-ПЦР-РВ, БиоМастер-микс и растворов праймеров и не более 5 циклов для растворов позитивных контролей.

Транспортировка: в термоконтейнерах с охлаждающими элементами.

Ограничения: использовать только для исследовательских работ!