

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

1. Описание

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

Набор включает мультиплексную систему праймеров и зондов: систему, специфичную к последовательности гена N; систему для детекции SARS-CoV-2 варианта Омикрон и систему, детектирующую внутренний контроль (ген человека).

Детекция варианта Омикрон (линии BA.1) основана на выявлении специфической инсерции ins214EPE в последовательности гена S вируса SARS-CoV-2*

** система праймеров и зондов разработана ФГБУ НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России (Референс-лаборатория ВОЗ по COVID-19). Рег. номер заявки на Патент 2021140147, дата приоритета 31.12.2021*

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 × 360 мкл	1 × 620 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 внутреннего контроля (BK) – в канале VIC/TAMRA, для гена S варианта Омикрон (линии BA.1) – в канале ROX.

5. Проведение эксперимента

5.1 Подготовка образца:

Исходным материалом для исследований с использованием **Система для выявления SARS-CoV-2 варианта Омикрон (BA.1)** 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)** 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+x+1) реакционных смесей, где 2 – реакции с положительным и отрицательным контролями, x – количество образцов и +1 дополнительный объем для компенсации возможной ошибки пипетирования.

Реактив	Кол-во на 1 реакцию	Кол-во на 7 образцов
2× смесь для ОТ-ПЦР-РВ	12,5	125
БиоМастер-микс	1,0	10
Набор праймеров	3,0	30
Вода стерильная	3,5	35
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 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*	58 °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.

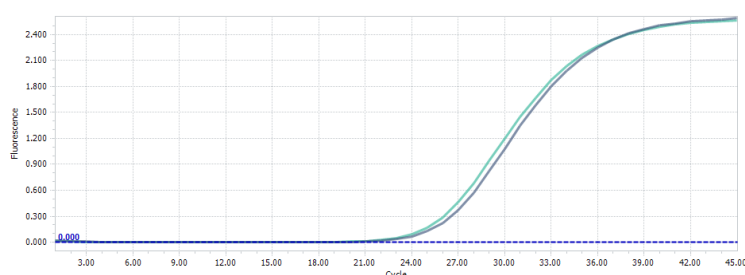
ПЦР прошла успешно и данные являются достоверными, при выполнении следующих критериев:

- в отрицательном контроле сигнал в канале FAM Ct > 37 цикла и в канале VIC Ct > 40 цикла или отсутствуют;

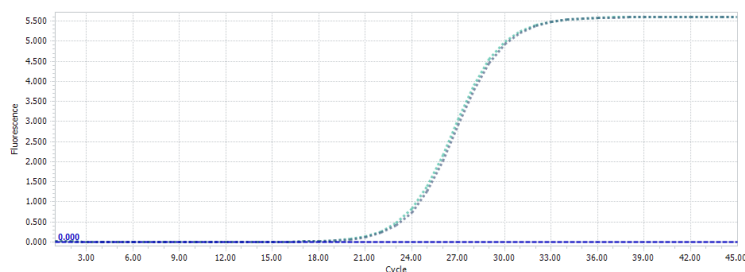
- в положительном контроле в канале FAM и ROX сигнал в районе Cq 18-24, в канале VIC - отсутствует или появляется не ранее 40 цикла.

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

Результат детекции позитивного контроля гена N:



Результат детекции позитивного контроля гена S с мутацией ins214EPE (позитивный контроль SARS-CoV-2 варианта Омикрон (BA.1))



Проба	FAM, Cq	VIC, Cq	ROX, Cq	Интерпретация
Отрицательный контроль	-(Cq>37)	-(Cq>40)	-(Cq>40)	Данные ПЦР достоверны.
	Cq<37	-(Cq>40)	-(Cq>40)	Возможна контаминация. Повторить стадию ПЦР для всех образцов из анализа.
	Cq<37	-(Cq>40)	Cq<40	Возможна контаминация. Повторить стадию ПЦР для всех образцов из анализа.
	-(Cq>37)	Cq<40	-(Cq>40)	Возможна контаминация мРНК. Повторить стадию ПЦР для всех образцов из анализа.
	Cq<37	Cq<40	Cq<40	Контаминация системы детекции. Взять новые

				реактивы и повторить анализ для всех образцов из постановки.
Положительный контроль	19 - 22	-/(Cq>40)		Тест-система работает корректно.
	-/(Cq>37)	-/(Cq>40)		Не добавлен положительный контроль или тест система не работает.
	19 - 22	Cq<40		Возможна контаминация мРНК. Провести повторный анализ проб с отрицательным FAM.
Образец	+	+	-	Проба содержит РНК SARS-CoV-2.
	+	+	+	Проба содержит РНК SARS-CoV-2 варианта Омикрон (BA.1).
	-	-	-	Результат теста не валиден. Необходимо повторить экстракцию РНК.
	+	-	-	Результат теста не валиден. Необходимо повторить экстракцию РНК. Возможна контаминация положительным контролем.
	-	-	+	Результат теста не валиден. Необходимо повторить экстракцию РНК. Возможна контаминация положительным контролем.
	+	-	+	Результат теста не валиден. Необходимо повторить экстракцию РНК. Возможна контаминация положительным контролем.

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!