

CoV-2-Id

Набор реагентов для выявления и идентификации вариантов РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ)

Инструкция-вкладыш

Настоящая инструкция устанавливает порядок использования набора реагентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ с целью обнаружения специфических фрагментов РНК коронавируса SARS-CoV-2 путем флуоресцентной детекции в режиме реального времени.

Набор реагентов позволяет выявить в одной пробирке пять мишеней: фрагмент РНК SARS-CoV-2, фрагмент РНК SARS-CoV-2 специфичный для варианта дельта, фрагмент РНК SARS-CoV-2 специфичный для варианта альфа, фрагмент РНК SARS-CoV-2 специфичный для варианта бета и гамма и фрагмент РНК внутреннего положительного контроля (ВПК-РНК).

Порог обнаружения – не более 20 копий фрагментов РНК SARS-CoV-2.

Набор рассчитан на проведение 96 реакций.

I Состав набора

№	Реагент	Описание	Объем	Кол-во
1.	Реакционная смесь, PC CoV-Id	сиреневая жидкость	3 мкл	1 пробирка
2.	Положительный контрольный образец, ПКО-CoV-Id	сухое вещество белого цвета	-	1 пробирка
3.	Раствор для разбавления ПКО, ОКО	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка
4.	Внутренний положительный контроль выделения, ВПК-В-РНК	прозрачная бесцветная жидкость	1 мл	1 пробирка

II Условия хранения и транспортирования, срок годности

Температура хранения - от минус 20 до плюс 4°C.

Транспортирование - при температуре от минус 16 до минус 20°C, краткосрочное (не более суток) - при температуре от 2 до 8°C.

Срок годности указан на этикетке.

III Список оборудования и расходных материалов

1. Прибор для проведения ПЦР в реальном времени.
2. Микроцентрифуга-встряхиватель для микропробирок 1,5 мл.
3. Микропипетки переменного объема на 20 и 200 мкл.
4. Наконечники к микропипеткам с аэрозольным барьером.
5. Микропробирки на 1,5 мл.
6. Штатив для микропробирок.
7. Штатив для пробирок или стрипованных пробирок для амплификации.

IV Планирование исследования

1. Проведение ОТ-ПЦР-РВ возможно только для образцов, прошедших процедуру пробоподготовки и выделения РНК. Для выделения необходимо использовать наборы, позволяющие обеспечить качество РНК, достаточное для проведения реакции обратной транскрипции.
2. В исследование необходимо обязательно включить положительный контрольный образец (ПКО) и отрицательный контрольный образец (ОКО).

V Подготовка к проведению ОТ-ПЦР-РВ

1. Поместить микропробирки с реакционной смесью **PC CoV-Id** в штатив.
2. Приготовить исследуемые образцы РНК, ПКО (в пробирку с сухим веществом добавить 100 мкл ОКО) и ОКО, при необходимости перемешать и центрифугировать.
3. Внести в микропробирки с **PC CoV-Id** по **20 мкл** исследуемых образцов, ПКО, ОКО, перемешать и центрифугировать.
4. Поместить пробирки в прибор для амплификации.

VI Режим амплификации

Провести реакцию амплификации в соответствии с инструкцией к прибору, используя рекомендуемые ниже режимы амплификации и измерения сигналов флуоресценции.

1. Режим амплификации:

Номер ступени	Температура, °C	Число повторов	Время, сек	Детекция
1	58	1	30	-
2	50	1	420	-
3	96	1	20	-
4	95	5	15	-
5	62		25	-
6	70		15	-
7	95	40	5	-
8	61		22(12)*	+
9	70		16	-

* Время для приборов, в которых измерение сигнала флуоресценции (детекция) производится после окончания удержания температуры ступени

2. Используемые красители для детекции и мишени.

В данном наборе используются **пять независимых реакций**, которые проводятся в одной пробирке одновременно. Реакции по каналу детекции R6G позволяют обнаружить фрагмент РНК SARS-CoV-2 любого из известных вариантов, реакция по каналу детекции ROX - фрагмент РНК SARS-CoV-2 специфичный для варианта дельта (E156del), реакции по каналам детекции Cy5 и ROX - фрагменты РНК SARS-CoV-2 специфичные для варианта альфа (N501Y и 70del), реакция по каналу детекции Cy5 - фрагмент РНК SARS-CoV-2 специфичный для варианта бета и гамма (N501Y) и реакция по каналу детекции FAM - фрагмент РНК внутреннего положительного контроля (ВПК).

VII Обработка результатов работы прибора и анализ полученных данных

Обработка результатов амплификации проводится в соответствии с инструкцией к прибору. Результатом обработки результатов анализа должно быть определение значения порогового цикла.

1. Критерии оценки результатов амплификации для контрольных образцов:

- прохождения реакции для **ПКО** должно быть в диапазоне **от 30 до 34 цикла** по каналам **FAM**, **R6G**, **ROX** и **Cy5**;
- прохождения реакции для **ОКО** должно быть в диапазоне **от 20 до 25 цикла** по каналу **FAM**;
- реакция для ОКО по каналам **R6G**, **ROX** и **Cy5** должна отсутствовать.

2. Оценка результата для исследуемых образцов.

Критерием положительного результата обнаружения РНК SARS-CoV-2 в исследуемом образце является прохождение реакций по каналам **R6G** и **FAM**.

Критерием обнаружения РНК SARS-CoV-2 варианта дельта в исследуемом образце является прохождение реакций по каналам **R6G**, **ROX** и **FAM**.

Критерием обнаружения РНК SARS-CoV-2 варианта альфа в исследуемом образце является прохождение реакций по каналам **R6G**, **ROX**, **Cy5** и **FAM**.

Критерием обнаружения РНК SARS-CoV-2 варианта бета и гамма в исследуемом образце является прохождение реакций по каналам **R6G**, **Cy5** и **FAM**.

Критерием отрицательного результата обнаружения РНК SARS-CoV-2 в исследуемых образцах является прохождение реакции по каналу **FAM**.

Отсутствие реакции по каналу **FAM** свидетельствует об отсутствии амплификации и получении недостоверного ложноотрицательного результата.

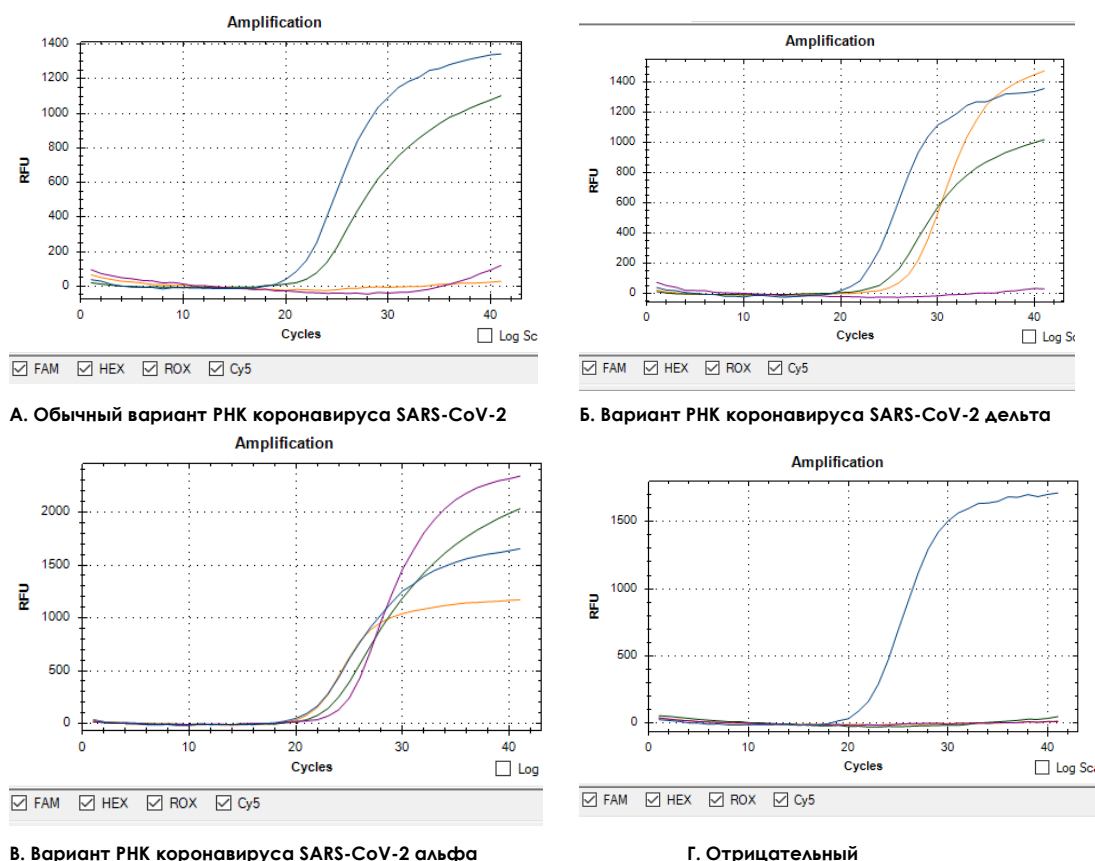


Рисунок 1. Кинетические кривые роста сигнала флуоресценции, полученные на приборе CFX96

