

## «ИзоТест-SARS-CoV-2»

### Набор реагентов для обнаружения РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом петлевой изотермической амплификации (RT-LAMP)

#### Инструкция-вкладыш

Настоящая инструкция устанавливает порядок использования набора реагентов для проведения реакции обратной транскрипции и петлевой изотермической амплификации (RT-LAMP) с целью обнаружения специфических фрагментов РНК коронавируса SARS-CoV-2 путем флуоресцентной детекции в режиме реального времени.

Набор реагентов позволяет выявить в одной пробирке две мишени: фрагмент РНК SARS-CoV-2 или фрагмент ДНК внутреннего положительного контроля (ВПК).

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

Набор рассчитан на проведение 100 реакций.

#### I Состав набора

№	Наименование	Описание	Кол-во, шт
1	Реакционная смесь, <b>PC iCoV2</b>	Пробирка с реакционной смесью для проведения RT-LAMP, 1400 мкл	1
2	Смесь ферментов, <b>rtSD<sub>S+</sub></b>	Пробирка со смесью ферментов для RT-LAMP, 200 мкл	1
3	ПКО, <b>кДНК SBV</b>	Пробирка с положительным контрольным образцом, фрагмент кДНК SARS-CoV-2, <b>20 копий/мкл</b> , 50 мкл	1
4	<b>ОКО</b>	Пробирка с отрицательным контрольным образцом, 50 мкл	1

#### II Условия хранения и транспортирования, срок годности

Температура хранения – от минус 18 до минус 25 °С.

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

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. Микропипетка переменного объема на 20, 200 и 1000 мкл.
4. Наконечники к микропипеткам с аэрозольным барьером.
5. Микропробирки на 1,5 (2,0) мл.
6. Штатив для микропробирок.
7. Пробирки или стрипованные пробирки, соответствующие оборудованию для амплификации.
8. Штатив для пробирок или стрипованных пробирок для амплификации.

#### V Подготовка к проведению RT-LAMP

1. Разморозить, перемешать и центрифугировать реакционную смесь **PC iCoV2**.
2. Добавить в микропробирку на 1,5 (2,0) мл рассчитанный объем **PC iCoV2**.

3. Добавить в микропробирку на 1,5(2,0) мл с **PC iCoV2** рассчитанный объем **rtSDs+**, перемешать и центрифугировать.
4. Внести в пробирки для амплификации по 16 мкл реакционной смеси с ферментом.
5. Приготовить исследуемые образцы РНК, ПКО и ОКО, при необходимости перемешать и центрифугировать.
6. Внести в пробирки для амплификации по **10 мкл** и перемешать пипетированием исследуемые образцы, ПКО и ОКО.
7. Поместить пробирки в прибор для амплификации.

#### IV Планирование исследования

1. Проведение RT-LAMP 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), содержащий 20 копий/мкл кДНК SARS-CoV-2 и отрицательный контрольный образец (ОКО).
3. Объем реакционной смеси и фермента рассчитывается исходя из количества образцов для исследования и двух контрольных образцов. Количество образцов должно быть **N+2**, где N- количество исследуемых образцов.

№	Название	Объем на пробирку, мкл	Формула для расчета объема	Пример расчета объема на 6 исследуемых образцов, мкл
1	<b>PC iCoV2</b>	14	<b>14 × (N+2)</b>	14 × (6+2)=112
2	<b>rtSDs+</b>	2	<b>2 × (N+2)</b>	2 × (6+2)=16

#### VI Режим амплификации

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

##### 1. Температурные условия реакции.

При проведении RT-LAMP в приборе для ПЦР в реальном времени необходимо использовать следующий режим амплификации:

Номер ступени	Температура, °C	Число повторов	Время, сек	Детекция
1	58	1	30	-
2	50	1	360	-
3	92	1	15	-
4	66	3	15	-
5	92		5	-
6	66	34	60 (50)*	+

\* Время для приборов с детекцией после окончания удержания температуры ступени

##### 2. Используемые красители.

В данном наборе используются **две независимые реакции**, которые проводятся в каждой пробирке одновременно. Первая реакция позволяет обнаружить фрагмент РНК или кДНК SARS-CoV-2, краситель **ROX**. Вторая реакция позволяет обнаружить фрагмент ДНК внутреннего положительного контроля (ВПК), краситель **FAM**.

## VII Обработка результатов работы прибора и анализ полученных данных

Обработка результатов амплификации проводится в соответствии с инструкцией к прибору. Результатом анализа должно быть определение значения порогового цикла. Оценка ведется из расчета один пороговый цикл – одна минута изотермической амплификации без учета предварительных шагов.

### 1. Оценка результата для контрольных образцов.

Критерии оценки результатов амплификации для контрольных образцов:

Время прохождения реакции для ПКО по каналу **ROX** должно быть в диапазоне от 16 до 21 минут;

Время прохождения реакции для ОКО по каналу **FAM** должно быть в диапазоне от 24 до 28 минут;

Реакции для ОКО по каналу **ROX** должна отсутствовать.

### 2. Оценка результата для исследуемых образцов.

Критерием положительного результата обнаружения РНК SBV является прохождение реакции по каналу **ROX**.

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

Отсутствие реакции по каналу **FAM** свидетельствует об отсутствии амплификации. Это позволяет исключить ложноотрицательный результат.

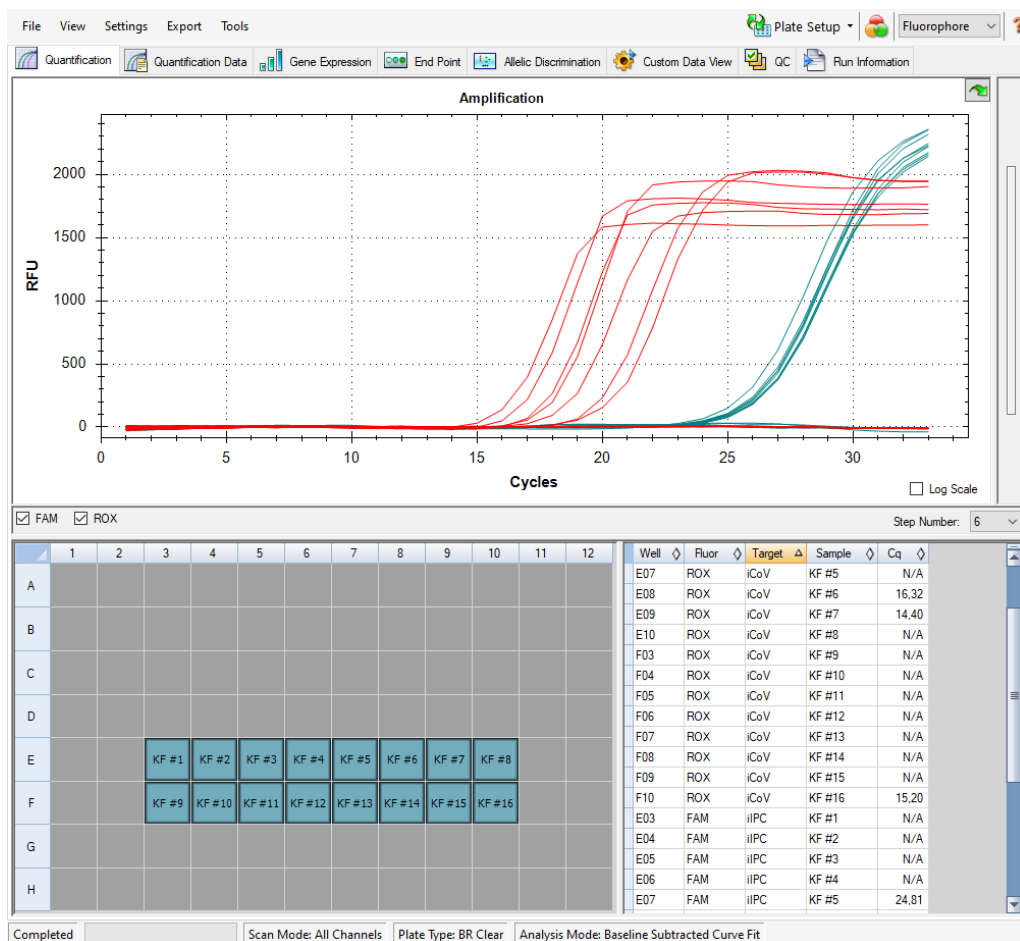


Рисунок 1. Пример прохождения реакций по каналам **FAM** и **ROX**.

