

Протокол полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР РВ, Realtime RT-PCR) Центров по контролю над заболеваниями (CDC) для выявления и исследования свиного гриппа (версия 2009)

ДАННЫЕ МАТЕРИАЛЫ И ПРОТОКОЛЫ ЯВЛЯЮТСЯ СОБСТВЕННОСТЬЮ ЦЕНТРОВ ПО КОНТРОЛЮ НАД ЗАБОЛЕВАНИЯМИ И ПРЕДОСТАВЛЯЮТСЯ СОГЛАСНО РАЗРЕШЕНИЮ НА ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЯХ (EUA) В КАЧЕСТВЕ ПОМОЩИ СИСТЕМЕ ЛАБОРАТОРИЙ ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ. ДАННЫЕ ПРОТОКОЛЫ НЕ ПРЕДНАЗНАЧЕНЫ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ С ЦЕЛЮ КОММЕРЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ ИЛИ ТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ВЫГОДЫ.

Общие комментарии

Допущения: Данная процедура предполагает наличие базовых знаний о методах ОТ-ПЦР РВ.

Принцип метода: Протокол полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР РВ, Realtime RT-PCR) Центров по контролю над заболеваниями (CDC) для выявления и исследования свиного гриппа включает в себя набор олигонуклеотидных праймеров и гидролизных зондов с двумя метками (Taqman®), которые должны использоваться в анализах ОТ-ПЦР для количественного определения и исследования *in vitro* вирусов свиного гриппа в образцах из дыхательных путей и вирусных культурах. Комплект праймеров и зондов InfA предназначен для универсального выявления вирусов гриппа типа А. Комплект праймеров и зондов swInfA предназначен для специального выявления всех вирусов свиного гриппа А. Комплект праймеров и зондов swH1 предназначен для специального выявления свиного гриппа H1. Этот метод используется для подтверждения присутствия вируса гриппа А в образцах (не поддающихся типированию), полученных из дыхательных путей больных с подозрением на вирус свиного гриппа А.

Ограничения по использованию протокола: Данные протоколы были оптимизированы с применением количественной одношаговой ОТ-ПЦР с зондами (комплект для количественной одношаговой ПЦР Invitrogen SuperScript™III Platinum®), которая дала сопоставимые результаты с использованием приборов 96-луночного формата, таких как ПЦР в реальном времени Applied Biosystems™ (Applied Biosystems™ real-time PCR 7000, 7300, 7500, др.), детекторные системы ПЦР в реальном времени BioRad (BioRad real-time PCR iQ™ или iQ5™) или оборудование для количественной ПЦР Stratagene (Stratagene QPCR MX4000, MX3000 или MX3005).

Информация по технике безопасности: Обработка образцов должна производиться в соответствии с применимыми государственными нормами по биологической безопасности.

Допустимые образцы: Образцы из дыхательных путей, включая бронхоальвеолярный лаваж, трахеальный аспират, мокроту, носоглоточный или ротоглоточный аспираты или смывы и носоглоточный или ротоглоточный мазки. Взятие мазков должно производиться только тампонами из синтетического материала (полиэстер или дакрон (Dacron®)) на алюминиевых или пластиковых стержнях. Использование ватных тампонов и деревянных стержней не рекомендуется. Образцы, взятые тампонами с альгинатом кальция, не допускаются.

Критерии отбраковки:

- Образцы, которые не содержались при температуре 2-4°C (не более 4 дней) или были заморожены при температуре -70°C и ниже.
- Негодные образцы, не перечисленные выше.

Выделение нуклеиновых кислот: Проведение анализов методом ОТ-ПЦР зависит от количества и качества матричных РНК в пробах. Перед тестированием образцов методики выделения РНК должны

быть признаны годными и проверены на выделение и чистоту. Было показано, что имеющиеся в продаже комплекты для выделения РНК, включая комплект QIAamp® Viral RNA Mini Kit или RNeasy® Mini Kit (QIAGEN), комплекты Roche MagNA Pure Compact RNA Isolation Kit, MagNA Pure LC RNA Isolation Kit II и Roche MagNA Pure Total Nucleic Acid Kit, позволяют выделить высокоочищенные РНК при соблюдении рекомендованных производителем процедур для экстрагирования образцов.

Оговорка: Названия разработчиков и производителей приводятся в качестве примеров допустимой продукции. Такое упоминание не подразумевает поддержку данной продукции со стороны Центров по контролю и предупреждению заболеваний.

Материалы

Реагенты:

1. Комплект гидролизных зондов (например, Taqman®) для одношаговой количественной ОТ-ПЦР
 - Комплект для одношаговой количественной ПЦР Invitrogen SuperScript™III Platinum® (кат. № 11732-020 или 11745-100).
2. Стерильная дистиллированная вода молекулярно-биологического качества (без РНКазы и ДНКазы)
3. Прямой и обратный праймеры (40 мкМ)
4. Зонды с двумя метками (10 мкМ)
5. Образцы положительного контроля

Вспомогательные материалы:

1. Лабораторный разметочный карандаш
2. Охлаждающий контейнер для микроцентрифужных пробирок (1,5 мл) и реакционных пробирок (0,2 мл) 96-луночного модуля для ПЦР
3. 20-мкл и 200-мкл регулируемые пипетки и наконечники с аэрозольным барьером
4. Стрипы и планшеты для реакционных пробирок ПЦР (0,2мл)
5. Оптически крышечки для стрипов
6. Стерильные свободные от нуклеазы 1,5 мл микроцентрифужные пробирки
7. Одноразовые перчатки без талька

Оборудование:

1. Микроцентрифуга
2. Мешалка
3. Детекторный модуль ПЦР в реальном времени с 96-луночным реакционным модулем амплификатора.

Порядок действий

Подготовка:

1. Предупреждение контаминации проб

Из-за чувствительности флуорогенных 5'-нуклеазных анализов необходимо принять специальные меры предосторожности, чтобы не допустить ложноположительные амплификации. Рекомендуется следующие меры предосторожности:

- (a) Разделять зоны для постановки анализов и манипуляции с нуклеиновыми кислотами.
- (b) Держать по отдельности специальное оборудование (например, пипетки, микроцентрифуги) и вспомогательные материалы (например, микроцентрифужные пробирки, наконечники пипеток) для постановки анализов и манипуляции с выделенными нуклеиновыми кислотами.
- (c) При постановке анализов надевать чистый лабораторный халат и одноразовые перчатки без талька (ранее не использовавшиеся).
- (d) Заменять перчатки между пробами и при каждом случае подозрения на их загрязнение.
- (e) По возможности держать реагенты и реакционные пробирки закрытыми.

2. Подготовка оборудования

Рабочие поверхности, пипетки и центрифуги должны быть очищены и обеззаражены специальными средствами, такими как 5% гипохлорит натрия, «DNAzap™» или «RNase AWAY®» для сведения к минимуму риска контаминации нуклеиновыми кислотами.

3. Подготовка реагентов

Примечание: Держите все реагенты в охлаждающем контейнере во время постановки анализа.

(a) Праймеры и зонды

- Разморозьте замороженные аликвоты праймеров и зондов (Разморозенные аликвоты зондов могут храниться в темноте до 3 месяцев при температуре 2-8°C. Не замораживайте зонды повторно).
- Перемешайте на мешалке все праймеры и зонды.
- Кратковременно отцентрифугируйте все праймеры и зонды и затем поместите их в охлаждающий контейнер.

(b) Реагенты ОТ-ПЦР в реальном времени

- Поместите смесь мастер-микс (Master Mix) и энзим в охлаждающий контейнер
- Разморозьте флакон с реакционной смесью 2X Reaction Mix.
- Перемешайте смесь 2X Reaction Mix, переворачивая.

- Кратковременно отцентрифугируйте смесь 2x Reaction Mix и энзим, затем поместите в охлаждающий контейнер

Тесты для каждой серии ОТ-ПЦР

1. Каждая проба экстракта РНК тестируется отдельным комплектом праймеров/зондов: InfA, универсальный свиной (swFluA), свиной H1 (swH1) и РНКазы Р (RP). Комплект праймеров и зондов РНКазы Р выявляет ген РНКазы Р человека и таким образом служит как внутренний положительный контрольный образец для нуклеиновой кислоты человека.

2. В каждую серию образцов для каждой прогонки должны быть включены отрицательный контроль, не содержащий образца РНК (NTC), и положительные контрольные образцы РНК (PTC) для всех комплектов праймеров/зондов.

3. Контрольный образец пробы человека (HSC) служит вторичным отрицательным контрольным образцом, который подтверждает правильность методики выделения нуклеиновых кислот и целостность реагентов.

Постановка реакции

Смеси для реакций готовятся в виде коктейлей и распределяются в пробирки 96-луночной планшетки. Вода и экстрагированная нуклеиновая кислота или положительные контрольные образцы добавляются затем к соответствующим тестовым реакциям и контрольным образцам.

1. Обозначьте каждую 1,5 мл микроцентрифужную пробирку для каждого комплекта праймеров/зондов.

2. Определите количество реакций (N), которые должны ставиться для одного анализа. Необходимо подготовить достаточное количество реакционной смеси для NTC, PTC, HSC и на случай ошибки в пипетировании. См. ниже:

- Если число проб (n), включая контрольные образцы = 1 - 14, тогда $N = n + 1$
- Если число проб (n), включая контрольные образцы > 15, тогда $N = n + 2$

3. Смесь мастер-микс (Master Mix): рассчитайте количество каждого реагента, которое должно быть добавлено к каждой реакционной смеси мастер-микс комплекта, содержащего праймеры/зонды. Расчет делается следующим образом:

Реагент	Объем реагента, добавляемого на реакцию
Вода без нуклеаз	N x 5,5 мкл
Прямой праймер	N x 0,5 мкл
Обратный праймер	N x 0,5 мкл
Зонд	N x 0,5 мкл
Смесь SuperScript™ III RT/Platinum® Taq	N x 0,5 мкл
Смесь 2X Master Mix для ПЦР (2X PCR Master Mix)	N x 12,5 мкл
Общий объем	N x 20,0 мкл

После добавления воды, перемешайте реакционные смеси при помощи пипетки. Не используйте мешалку.

5. Отцентрифугируйте в течение 5 с, чтобы собрать содержимое на дне пробирке, затем поместите пробирку в охлаждающий контейнер.

6. Установите стрипы или планшетки для реакционных пробирок в 96-луночный охлаждающий контейнер.

7. Добавьте 20 мкл каждой смеси мастер-микс в каждую лунку по всему ряду, как показано ниже:

Пример постановки теста

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA
B	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA
C	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1
D	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
E	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA	InfA
F	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA	sw InfA
G	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1	swH1
H	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP

Пример постановки пробы

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NTC	S1	S3	S5	S7	S9	S11	S13	S15	S17	S19	PTC
B	NTC	S1	S3	S5	S7	S9	S11	S13	S15	S17	S19	PTC
C	NTC	S1	S3	S5	S7	S9	S11	S13	S15	S17	S19	PTC
D	NTC	S1	S3	S5	S7	S9	S11	S13	S15	S17	S19	PTC
E		S2	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	HSC	
F		S2	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	HSC	
G		S2	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	HSC	
H		S2	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	HSC	

Примечание: Образцы, служащие отрицательным контролем (NTC), должны добавляться первыми (колонка 1) до того, как какие-либо пробы будут добавлены для проверки контаминации в смеси мастер-микс. Положительный контроль человека (HSC) должен добавляться после того, как будут добавлены пробы (колонка 11), для проверки кросс-контаминации во время подготовки или добавления проб. Положительные контрольные образцы (PTC) должны добавляться в последнюю очередь после того, как все пробы и NTC будут закрыты.

8. Перед перестановкой планшетки в зону манипуляции с нуклеиновой кислотой поставьте реакции NTC для колонки 1 в зоне постановки анализов. Как показано выше, пробы можно добавлять в соответствии со схемой по колонкам.
9. Добавьте пипеткой 5 мкл воды без нуклеаз в пробирки, обозначенные как NTC. Закройте эти пробирки крышечками.
10. Закройте планшечку для реакционных пробирок и переставьте в зону манипуляции с нуклеиновыми кислотами.
11. Перемешайте на мешалке пробирки с пробами в течение 5 с. Отцентрифугуйте в течение 5 с.
12. Установите пробы с экстрагированными нуклеиновыми кислотами в охлаждающий контейнер.
13. Как показано выше, пробы можно добавлять в пробирки, в соответствии со схемой по колонкам. Добавьте пипеткой 5 мкл первой пробы во все пробирки, обозначенные для данной пробы (например, Проба «S1» как показано выше). Меняйте наконечник после каждого добавления
14. Закройте крышечками пробирки в колонке, в которые добавлялись пробы. Это поможет избежать кросс-контаминации и позволит следить за порядком действия на планшете.
15. При необходимости замените перчатки, чтобы не допустить контаминации.
16. Повторите шаги 13- 15 для оставшихся проб.
17. Добавьте 5 мкл экстрагированной пробы HSC в пробирки, обозначенные HSC (колонка 11 на схеме). Закройте пробирки крышечками.
18. В конце добавьте пипеткой 5 мкл положительного контрольного образца РНК во все пробирки, обозначенные РТС. Закройте пробирки крышечками.
19. При использовании 8-пробирочных стрипов, сделайте пометки на ВЫСТУПАХ каждого стрипа для индикации положения каждой пробы (НЕ ДЕЛАЙТЕ ПОМЕТКИ НА ВЕРХНЕЙ ПОВЕРХНОСТИ РЕАКЦИОННЫХ ПРОБИРОК!). Отцентрифугуйте стрипы пробирок в течение 10-15 секунд. Поставьте стрипы в охлаждающий контейнер.
При использовании планшеток отцентрифугуйте при 500g в течение 30 с при температуре 4°C. Поставьте в охлаждающий контейнер.

Условия амплификации ОТ-ПЦР

Объем реакционной смеси 25 мкл. Запрограммируйте инструмент следующим образом:

Обратная транскрипция	50°C - 30 мин.
Активация Taq ингибитора	95°C - 2 мин
ПЦР-амплификация (45 циклов)	95°C -15 с 55°C - 30 с*

* Данные по флуоресцентным красителям (FAM) должны собираться во время инкубации при 55°C.

Интерпретация/изучение:

1. Реакции с использованием NTC для комплектов праймеров/зондов не должны показывать кривые роста флуоресценции, которые пересекали бы пороговую линию. Если будет получен ложноположительный результат с одним или большим числом проб в NTC-образцах с праймерами и зондами, причиной может быть контаминация пробы. Аннулируйте серию и повторите анализ, соблюдая более строго указания по порядку действий.
2. Все клинические пробы должны показывать кривые реакции RP, которые пересекают пороговую линию на 37 цикле или до него, что указывает на присутствие достаточного количества РНК гена РНКазы Р человека, свидетельствуя о приемлемом качестве образца. Однако, возможно, некоторые пробы могут не дать положительной реакции из-за недостаточного количества клеток в исходном клиническом образце. Также, пробы, взятые от животных/птиц, или из клеточных культур обычно либо совсем не показывают, либо показывают слабую RP реакцию. Невозможность обнаружения РНКазы Р в каком-либо из клинических образцов может означать:

- (а) Неправильное выделение нуклеиновой кислоты из клинических материалов, приводящее к потере РНК или заражению образца ингибиторами ОТ-ПЦР.

- (b) Отсутствие достаточного количества клеточного материала человека в пробе, позволяющего производить обнаружение
- (c) Неправильную постановку и выполнение анализа
- (d) Дефект реагентов или оборудования

3. Контрольные образцы пробы человека (HSC) НЕ должны показывать кривых роста флуоресценции для комплектов праймеров/зондов InfA, swFluA или swH1, которые пересекали бы пороговую линию в пределах 40 циклов. Если какой-либо специфичный для гриппа комплект праймеров/зондов покажет кривую роста, которая пересекает пороговую линию, интерпретируйте это следующим образом:

- а) Могла произойти контаминация экстрагирующих реагентов РНК. Аннулируйте серию и подтвердите целостность экстрагирующих реагентов РНК до продолжения тестирования.
- б) Произошла кросс-контаминация проб во время процедур экстрагирования РНК или постановки анализа. Аннулируйте серию и повторите анализ, соблюдая более строгие указания по порядку действий.

4. Реакции с использованием РТС должны давать положительный результат с реакциями InfA, swInfA, swH1 и RP до 40 циклов. Если ожидаемая положительная реактивность не достигается, аннулируйте серию и повторите анализ, соблюдая более строгие указания по порядку действий. Определите причину несоответствующей реактивности РТС, введите корректирующие действия и оформите документально результаты исследований и корректирующих действий. Не используйте реагенты РТС, которые не дают ожидаемого результата.

5. Если все контрольные образцы отвечают оговоренным требованиям, образец считается предположительно положительным для вируса гриппа А, если кривые роста реакции с использованием InfA пересекают пороговую линию в пределах 40 циклов. Если реакция на грипп А положительна, она может быть также положительной для Univ SW и/или SW H1. Образец считается предположительно положительным для свиного гриппа А/Н1, если ОБЕ кривые роста реакций с использованием InfA и соответствующего подтипа (swInfA или swH1) пересекают пороговую линию в течение 40 циклов. Если образец положителен с использованием InfA и только одной из реакций с использованием подтипа или положителен только с использованием InfA, свяжитесь с CDC для получения указаний.

6. Если все контрольные образцы отвечают оговоренным требованиям, образец считается отрицательным для вируса гриппа, если кривые роста с использованием InfA никогда не пересекают порог в течение 40 циклов.

Ограничения:

1. Лаборанты должны иметь соответствующую подготовку и знать методы тестирования и интерпретацию результатов до выполнения анализа.
2. Ложноотрицательный результат может получиться, если в образце присутствует несоответствующее количество организмов из-за неправильного сбора, транспортировки или обращения с ними.
3. Ложноотрицательный результат может получиться, если в реакции присутствует лишняя матрица ДНК/РНК. Если будет замечено ингибирование контрольной реакции RP для конкретной пробы, экстрагированная РНК может тестироваться при 2-кратном или большем разведении (например, 1:10 и 1:100) для проверки результата.

Комментарии: Предложения и вопросы в отношении данной процедуры можно направлять по адресу: slindstrom@cdc.gov

КОМПЛЕКТЫ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ

Примечание: комплекты праймеров/зондов могут подвергаться периодическим модификациям по мере того, как становится известна информация о циркулирующих в настоящее время вирусах.

Праймеры и зонды	Последовательность (5'>3')	Рабочая концентрация
InfA прямой	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C	40 мкМ
InfA обратный	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA	40 мкМ
InfA зонд ¹	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG	10 мкМ
SW InfA прямой	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG	40 мкМ
SW InfA обратный	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC	40 мкМ
SW InfA зонд ²	CYA CTG CAA GCC CA"Т" ACA CAC AAG CAG GCA	10 мкМ
SW H1 прямой	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA	40 мкМ
SW H1 обратный	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC	40 мкМ
SW H1 зонд ²	CA GAA TAT ACA "Т"CC RGT CAC AAT TGG ARA A	10 мкМ
РНКазаР прямой	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	40 мкМ
РНКазаР обратный	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	40 мкМ
РНКазаР зонд ¹	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG	10 мкМ

¹ Зонды TaqMan® отмечены на 5'-конце репортерной группой - 6- карбоксифлуоресцена (FAM) и гасителем, Black hole Quencher 1 (BHQ1) (Biosearch Technologies, Inc., Новато, Калифорния) на 3'-конце.

² Зонды Taqman® отмечены на 5'-конце репортерной группой - 6- карбоксифлуоресцена (FAM) и гасятся внутренне на модифицированном "Т" остатке при помощи BHQ1, при помощи модифицированного 3'-конца для предотвращения наращивания зонда Taq-полимеразой.

Указания Центров по контролю над заболеваниями (CDC) по заказу комплекта для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени с целью выявления свиного гриппа H1

Пожалуйста, учтите:

У нас много запросов на данные комплекты. Хотя у Вас может быть другая информация, пожалуйста, выполните следующие действия, чтобы получить комплект для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления свиного гриппа A/H1N1.

Последовательность действий для получения комплекта праймеров/зондов для проведения ОТ-ПЦР РВ для выявления свиного гриппа A/H1N1:

****Отправьте следующее электронное письмо по адресу fluorder@cdc.gov ****

1. Прошу предоставить мне комплект праймеров/зондов для проведения ОТ-ПЦР РВ для выявления свиного гриппа A/H1
2. ФИО контактного лица:
3. Номер телефона:
4. Электронный адрес:
5. Название организации:
6. Адрес организации для доставки (№ почтового ящика):
7. Предпочтительный грузоперевозчик:

Пожалуйста, не направляйте вопросы на адрес fluorder@cdc.gov; этот адрес предназначен только для заказа комплектов. Если у Вас есть вопросы, свяжитесь, пожалуйста, с Международным координационным отделом (eocinternational@cdc.gov).

Когда комплект для ОТ-ПЦР РВ будет отправлен, Вы получите номер для отслеживания груза/накладной.