



Рекомендации ВОЗ по лабораторной диагностике нового вируса гриппа А (H1N1) у людей

Все пробы, содержащие нетипируемые вирусы гриппа А, настоятельно рекомендуется немедленно направить в один из пяти сотрудничающих центров ВОЗ по гриппу для диагностического исследования и дальнейшей характеристики.

21 мая 2009 года

В этом документе представлена информация по имеющимся на указанную выше дату методам диагностики у людей вирусов гриппа, подобных штамму А (H1N1) A/California/4/2009. Новая информация по лабораторной диагностике будет публиковаться по мере ее появления.

Пробы

Наиболее пригодны для исследования, как и при сезонном гриппе, пробы отделяемого из верхних дыхательных путей. Пробы следует брать из глубины носовых ходов (носовым тампоном) или из носоглотки (носоглоточным тампоном); исследуют также носоглоточный аспират и аспирацы из горла и бронхов. До сих пор нет данных о том, исследование каких клинических проб дает наилучшие диагностические результаты. При взятии проб следует соблюдать соответствующие меры предосторожности, так как при выполнении этой процедуры лаборант может контактировать с выделениями из дыхательных путей больных людей.

До настоящего времени пока нет информации о диагностической ценности исследования проб не из дыхательных путей – например, проб стула. Для определения нарастания титров антител необходимо использовать парные сыворотки, взятые в острый период заболевания и в период реконвалесценции.

Лабораторные исследования

Молекулярно-диагностические методы

В настоящее время методы молекулярной диагностики являются методами выбора при исследовании на вирусы гриппа свиней А (H1N1) (swl) (вирусы типа A/California/4/2009).

Для правильной идентификации этого вируса оптимальным является анализ нескольких целевых генов. Наиболее важными являются следующие гены-мишени: ген, кодирующий матричный белок вируса гриппа типа А; ген, кодирующий гемагглютинин вируса гриппа А (H1N1)swl, и ген, кодирующий гемагглютинин вируса сезонного гриппа А H1/H3 и других подтипов вируса.

В настоящее время имеются следующие варианты ПЦР:

- обычная ПЦР и ПЦР в режиме реального времени для выявления вируса гриппа А (см. приложения 1 и 2); и
- разработанный CDC вариант ОТ-ПЦР в режиме реального времени (rRT-PCR) для выявления и характеристики вируса гриппа А (H1N1) (версия 2009 года).¹

Секвенирование продуктов ПЦР гена, кодирующего матричный белок вирусов гриппа А с использованием праймеров, предусмотренных протоколом ВОЗ (см. приложение 1) позволит дифференцировать М-гены вирусов H1N1 свиного происхождения и сезонного гриппа; однако для подтверждения происхождения вируса потребуется провести дополнительный анализ.

В настоящее время проводится оценка обычной ОТ-ПЦР. Обновленная информация будет опубликована после получения результатов.

Выделение вирусов и их типирование с помощью реакции торможения гемагглютинации или реакции иммунофлуоресценции

Могут быть использованы существующие вирусологические методы, применяемые для выделения вирусов сезона гриппа на клетках MDCK или в куриных эмбрионах, хотя необходимо определить их чувствительность (см. ниже раздел «Биологическая безопасность»).

Вирус гриппа А (H1N1)swl вызывает агглютинацию эритроцитов индейки, цыпленка, морской свинки и человека.

Поликлональные антитела к вирусам сезона гриппа подтипа H1, имеющиеся в стандартном наборе ВОЗ для диагностики гриппа, **НЕ МОГУТ** быть использованы в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) при выявлении циркулирующих в настоящее время вирусов гриппа А (H1N1).

Результаты, полученные при использовании моноклональных антител к вирусам гриппа подтипа H1, имеющиеся в наборе ВОЗ, не могут считаться окончательными и требуют дополнительного подтверждения.

Быстрые тесты или реакция иммунофлуоресценции

В настоящее время нет данных о чувствительности и специфичности экспресс-методов («у постели больного») или реакции иммунофлуоресценции, предназначенных для непосредственного выявления вирусов гриппа А. Обновленная информация будет опубликована после получения результатов. Следует подчеркнуть, что результаты этих методов не позволяют дифференцировать вирусы сезона гриппа А от вирусов гриппа (H1N1)swl.

Серологические исследования

Можно предполагать, что с помощью РТГА и реакции микронейтрализации, при постановке которых будет использован вирус гриппа А (H1N1)swl, можно будет выявлять специфические антитела, производимые в результате инфицирования этими вирусами.

¹ <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimetcpcr/en/index.html>

Интерпретация результатов лабораторных исследований

- ПЦР - Проба считается положительной, если результаты двух тестов для выявления различных мишеней (например, при использовании специфических праймеров для универсального М-гена и для гена гемагглютинина вируса подтипа H1sw1) будут положительными, а результаты ПЦР с праймерами для генов человеческих вирусов H1+H3 отрицательными. Если при исследовании одной пробы положительные результаты получены в ОТ-ПЦР для выявления генов различных гемагглютининов (например, H1, H3 и H1sw1), прежде всего, необходимо исключить возможность контаминации путем повторной постановки ПЦР с использованием нового экстракта РНК из той же пробы клинического материала или экстракта РНК из другой пробы. Если при повторной постановке ПЦР для выявления различных генов гемагглютинина вновь получены положительные результаты, это наводит на мысль о возможной ко-инфекции, что необходимо подтвердить с помощью секвенирования или с помощью вирусологического исследования в культуре клеток или эмбрионах. В приложении 3 приведена схема, которую можно использовать для интерпретации результатов ПЦР.
- ПЦР в режиме реального времени – результаты следует интерпретировать в соответствии со схемой, приведенной в руководстве CDC по выявлению вирусов гриппа H1N1 с помощью ПЦР в режиме реального времени.¹
- Отрицательные результаты ПЦР не исключают возможности того, что пациент инфицирован вирусом гриппа А (H1N1). Результаты исследования следует интерпретировать с учетом имеющейся клинической и эпидемиологической информации. Пробы от больных, у которых получены отрицательные результаты ПЦР, но в отношении которых имеются серьезные подозрение на наличие инфекции вирусом А (H1N1), должны быть дополнительно исследованы в других лабораторных тестах (например, с помощью вирусологического или серологического методов), чтобы исключить наличие инфекции, обусловленной вирусом гриппа А (H1N1)sw1 (см. схему в приложении 3).
- Серологические реакции – Четырехкратное или большее нарастание титров специфических антител к вирусу гриппа А (H1N1)sw1 свидетельствует о наличии недавней инфекции, обусловленной данным вирусом.
- Секвенирование – В настоящее время результаты секвенирования хотя бы одного целевого продукта реакции имеет существенное значение в подтверждении результатов обычной ПЦР.
- Выделение вирусов – Идентификацию и типирование штаммов вируса гриппа, выделенных в культуре клеток или на эмбрионах, можно проводить с помощью ПЦР или реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ) с использованием специфических моноклональных антител к нуклеопротеину или с помощью гемагглютинации и анализа антигенов (субтиповирования) в РТГА с использованием отдельных референс-сывороток.

Направление проб для подтверждения результатов и дополнительной характеристики вируса

Лабораториям, которые не имеют возможности проводить диагностические исследования на вирусы гриппа А, рекомендовано направлять соответствующие пробы от больных с подозрением (в соответствии с определением случая, приведенным в руководстве ВОЗ)² на грипп, вызванный вирусами А (H1N1), в один из сотрудничающих центров ВОЗ (СцВОЗ) по гриппу.

Также в СцВОЗ по гриппу должны быть направлены пробы, результаты лабораторных исследований которых выявили нетипируемые вирусы гриппа А [(например, с отрицательными результатами типирования на вирусы гриппа А(H1) и А(H3)], а также пробы, результаты исследования которых не были подтверждены в соответствии с критериями ВОЗ.

Лаборатории, где нет возможности проводить культуральное выделение вирусов (или которые не соответствуют необходимому уровню биологической безопасности), должны направлять пробы в любой СцВОЗ по гриппу.

При этом следует строго выполнять стандартные правила хранения, упаковки и транспортировки вирусов гриппа, а также соответствующие требования и инструкции Международной ассоциации воздушного транспорта (IATA).

Биологическая безопасность

Диагностические лаборатории, проводящие исследование клинических проб от больных с подозрением на заболевания, вызванные вирусом гриппа А (H1N1)sw1, должны работать с соблюдением требований биологической безопасности уровня BSL-2 и использованием соответствующих индивидуальных защитных средств (ИЗС). Все манипуляции с клиническими пробами должны осуществляться внутри сертифицированных боксов биологической безопасности (БББ). Дополнительную информацию можно найти в третьем издании руководства ВОЗ по биологической безопасности («*Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях*»).³

В настоящее время при выделении вирусов необходимо соблюдать более строгие требования к обеспечению биологической безопасности. Дополнительную информацию и соответствующие рекомендации можно найти в документе ВОЗ «*Управление лабораторным риском в лабораториях, работающих с клиническими образцами с подозреваемым или подтвержденным наличием вируса гриппа А(H1N1), вызывающего международные эпидемии в настоящее время*».⁴

Алгоритмы лабораторного исследования

² http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/interim_guidance/en/index.html

³ http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11/en/. Русская версия документа доступна на сайте:

http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_CDS_CSR_LYO_2004_11w.pdf

⁴ <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/Laboratorybioriskmanagement.pdf>. Русская версия документа доступна на сайте:

http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/Laboratorybioriskmanagement_ru.pdf

Общие подходы к выявлению вирусов гриппа с помощью ПЦР должны учитывать эпидемиологическую ситуацию в стране, в частности, сколько проб можно будет исследовать («общий поток»), какие генные последовательности будут использованы в качестве мишней для ОТ-ПЦР, а также будет ли проводиться одновременно или последовательно исследование в ОТ-ПЦР для выявления генов, кодирующих белок M, нуклеопротеин и гемагглютинин.

Надлежащая лабораторная практика

Должны постоянно использоваться и периодически пересматриваться стандартные протоколы для проведения всех процедур. Решающее значение имеет использование рекомендованных реагентов и правильное их применение, поскольку в методическом отношении реакции очень сложные и неправильное применение даже одного реагента может приводить к существенному искажению полученных результатов.

Проверка

В каждой лаборатории все протоколы должны пройти предварительную проверку, чтобы обеспечить соответствующую специфичность и чувствительность исследования с использованием при каждой постановке реакции одинаковых контролей.

Контроль качества

В лабораториях всегда должны использоваться стандартные протоколы контроля качества и надлежащая лабораторная практика. Каждой лаборатории настоятельно рекомендовано участвовать в решении контрольных заданий, рассылаемых национальными центрами по гриппу (программа внешнего контроля качества), для того чтобы подтвердить, что лаборатория обеспечивает необходимый уровень чувствительности и специфичности при проведении всех своих исследований.

Обучение персонала

Краеугольными камнями при проведении диагностических тестов являются знание рабочих протоколов и опыт правильной интерпретации результатов.

Помещения и рабочие зоны для работы с пробами

Лаборатория должна иметь в достаточном объеме помещения для работы с пробами и реагентами (включая «холодовую цепь») и соответствующего разделения различных стадий ОТ-ПЦР для предупреждения перекрестной контаминации проб. Помещения и оборудование должны полностью соответствовать требованиям к необходимому уровню биобезопасности. Для постановки ОТ-ПЦР должно иметься отдельное помещение, которое не применяется для выделения вирусов.

Оборудование

Все оборудование должно храниться и использоваться в соответствии с рабочими инструкциями производителей.

Приложение 1:

Анализ с помощью обычной ОТ-ПЦР для детекции гена матричного белка вирусов гриппа типа А

Протокол обычной ОТ-ПЦР⁵

Ниже приведены протоколы и праймеры для обычной ПЦР и электрофорез в геле продуктов амплификации для выявления вируса гриппа А. Было показано, что данные протоколы являются достаточно эффективными при идентификации вирусов гриппа типа А в случаях, если используются рекомендованные реагенты и праймеры. Рекомендовано, чтобы лаборатории, у которых возникают сложности при идентификации циркулирующих в настоящее время вирусов, обратились в одну из референс-лабораторий ВОЗ⁶, осуществляющих диагностику инфекции, обусловленной вирусами А/H5, или в один из сотрудничающих центров ВОЗ по гриппу⁷ для получения помощи в выборе оптимальных для использования праймеров.

Необходимые материалы

- Мини-набор QIAamp Viral RNA (QIAGEN, Cat#52904. Другие наборы для выделения вирусной РНК могут быть использованы после тщательной предварительной оценки).
- Набор для ОТ-ПЦР OneStep RT-PCR (QIAGEN, Cat#210212)
- Ингибитор РНКазы RNase Inhibitor 20U/μl (Applied Biosystems, Cat# N8080119)
- Вода без РНКазы (RNase-free water)
- Этиловый спирт (96–100%)
- Микроцентрифуга (со скоростью вращения ротора до 13000 об/мин)
- Пипетки переменного объема (10, 20, 200 и 100 мкл)
- Стерильные наконечники без РНКазы для дозаторов с аэрозольным барьером
- Вортекс
- Пробирки для микроцентрифуги (0,2 мл и 1.5 мл)
- Термоциклер (Устройство для постановки ПЦР)
- Наборы праймеров
- Положительный контроль (по запросу может быть получен из сотрудничающего центра ВОЗ в Centers for Disease Control and Prevention, Атланта, США)

Праймеры

Ген: М

Вирусы гриппа типа А

Последовательности праймеров

M30F2/08: 5`- ATGAGYCTTYAACCGAGGTCGAAACG -3`

M264R3/08: 5`- TGGACAAANC GTCTACGCTGCAG -3`

Ожидаемый размер продуктов амплификации 244 п.о. (референс-набор:

Национальный институт инфекционных болезней NIID⁸)

⁵ Протокол представлен Отделом вирусологии, Центр охраны здоровья, Гонконг, Китай (Референс-лаборатория ВОЗ по вирусам гриппа H5).

⁶ http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/referencelabs/en/

⁷ <http://www.who.int/csr/disease/influenza/collabcentres/en/>

⁸ Праймеры, разработанные в лаборатории Национального института инфекционных болезней (National Institute of Infectious Diseases - NIID), Токио, Япония (Сотрудничающий и референс-центр ВОЗ по гриппу)

Процедура

1. Выделите вирусную РНК из пробы клинического материала с помощью набора QIAamp Viral RNA Mini Kit или другого аналогичного набора для экстракции РНК – в соответствии с инструкцией производителя по применению набора.

2. Проведите одноэтапную ОТ-ПЦР

- Достаньте реагенты из морозильной камеры и оставьте при комнатной температуре. После размораживания храните реагенты на льду.
- Приготовление матриксной смеси (выполняется на льду)
- Внесите в пробирку для микроцентрифуги следующие ингредиенты и аккуратно перемешайте путем десятикратного пипетирования. (Примечание: Для предупреждения даже минимальных различий в концентрации солей в растворе очень важно до использования тщательно перемешать раствор).

Реакция без раствора Q

Вода (для молекулярно-биологических исследований)	9,5 мкл
Буфер QIAGEN 5x для ОТ-ПЦР	5,0 мкл
Смесь dНТФ	1,0 мкл
Прямой праймер (10 мкмоль/л)	1,5 мкл
Обратный праймер (10 мкмоль/л)	1,5 мкл
Смесь ферментов	1,0 мкл
Ингибитор РНКазы (20 ед/мкл)	0,5 мкл
Общий объем	20,0 мкл

- Внесите по 20 мкл матриксной смеси в каждую пробирку для ПЦР.
- Добавьте к матриксной смеси 5 мкл экстрагированной из пробы РНК. Для постановки контролей добавьте 5 мкл воды без РНКазы (отрицательный контроль) и 5 мкл соответствующей вирусной РНК (положительный контроль).
- Запрограммируйте термоциклер в соответствии с необходимыми условиями термоциклирования.
- Не убирая пробирки для постановки ПЦР со льда, запустите программу постановки ОТ-ПЦР. Подождите, пока температура в термоцикльере достигнет 50°C. Затем поместите пробирки для постановки ПЦР в термоциклер.

Условия термоциклирования

Обратная транскрипция	30 мин, 50°C
Начальная активация ПЦР	15 мин, 95°C

Трехэтапный цикл

Денатурация	30 сек., 94°C
Отжиг праймеров	30 сек., 50°C
Синтез копии фрагмента	1 мин., 72°C
Количество циклов	45
Заключительный синтез	10 мин., 72°C
Хранение продуктов ПЦР	4°C ∞

3. Электрофорез в геле агарозы продуктов ОТ-ПЦР

Приготовьте гель агарозы, внесите продукты ПЦР и маркер молекулярной массы и проведите электрофорез в соответствии со стандартным протоколом. Определите расположение маркера с помощью УФ-лучей. Ниже приведены перечень необходимых материалов и описание процедуры.

Необходимые материалы

- Планшет для геля агарозы и камера для проведения электрофореза
- Источник электрического тока и электроды
- Источник УФ-излучения ($\lambda = 302$ нм)
- Заряженный фотоаппарат Полароид или фотоаппарат, соединенный с компьютером
- Пипетки изменяемого объема
- 2% гель агарозы в буферном растворе 1x TAE
- Буферный раствор 1x TAE
- Раствор бромистого этидия (10 мг/мл)
- Буферный раствор для геля (6x GLB)
- Маркер молекулярной массы

Процедура

A) Приготовление геля агарозы:

- i) Поместите планшет для геля на заливочный столик. Поместите в планшет гребенку и установите подставку строго горизонтально.
- ii) Приготовьте 2% гель агарозы, взвесив 4 г порошка агарозы и расплавив его в 200 мл буферного раствора 1x TAE. Расплавьте агарозу с помощью нагревания в микроволновой печи.
- iii) Охладите расплавленную агарозу до примерно 60°C и затем добавьте 10 мкл раствора бромистого этидия.
- iv) Вылейте расплавленную агарозу в планшет для геля.
- v) Оставьте гель при комнатной температуре до его застывания.
- vi) Удалите гребенку из рамки планшета.
- vii) Поместите планшет в камеру для электрофореза так, чтобы лунки располагались со стороны катода.
- viii) Налейте в камеру буферный раствор 1x TAE так, чтобы он покрыл поверхность геля.

B) Внесение проб:

- i) Внесите по 5 мкл буферного раствора для геля (6x GLB) в каждую пробирку для ПЦР.
- ii) Внесите маркер молекулярной массы в первую лунку в геле агарозы.
- iii) Внесите в остальные лунки по 15 мкл продукта ПЦР в буферном растворе GLB.
- iv) Закройте камеру крышкой и подсоедините электроды. Проведите электрофорез в геле в течение 30–35 минут при напряжении 100 вольт.
- v) Определите (визуализируйте) расположение полосок маркера и продуктов ПЦР с помощью УФ-лучей.
- vi) Задокументируйте результаты электрофореза в геле с помощью фотокамеры.

Интерпретация результатов

Сравните размеры (мол. массу) продуктов ПЦР с ожидаемыми размерами продуктов. Если реакция проводится без положительного контроля, специфичность продуктов должна быть подтверждена с помощью секвенирования и сравнения с имеющимися известными сиквенсами.

Приложение 2:

Анализ с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени для детекции гена матричного белка вирусов гриппа типа А

При использовании ОТ-ПЦР в режиме реального времени возникают дополнительные сложности по сравнению с обычной ОТ-ПЦР. Помимо описанных в приложении 1 общих моментов, которые необходимо учитывать при постановке ОТ-ПЦР, в случае использования ОТ-ПЦР в режиме реального времени следует помнить и о таких важных деталях:

- Следует использовать только соответствующее оборудование, программное обеспечение и флуоресцентные реагенты, которые должны использоваться в строгом соответствии с инструкциями.
- Персонал лаборатории должен пройти соответствующую подготовку по интерпретации результатов исследования (существенное значение имеет приобретение опыта в распознавании истинно положительных результатов, в интерпретации контролей и определении пороговых величин, аберрантной флуоресценции и т.д.).
- Существенное значение для правильного проведения количественных исследований имеют проверка точности лабораторных процедур и оптимизация реакций.
- Вероятность контаминации невелика в тех случаях, когда продукты реакции сразу после постановки тестов выбрасываются. Однако во многих лабораториях после постановки ПЦР проводятся дополнительные исследования (например, определение полиморфизма длины фрагментов рестрикции в геле, секвенирование и т.д.), во время которых может произойти контаминация.

Протокол №1 ПЦР в режиме реального времени⁹

Выделите вирусную РНК из пробы клинического материала, как это описано в приложении 1: Протокол обычной ОТ-ПЦР.

Необходимые материалы

Обратная транскрипция

Буфер I для ПЦР (10x PCR buffer I) с содержанием 15 ммол/л MgCl₂ (Applied Biosystems)

Случайный гексамер в концентрации 50 мкмоль/л (Applied Biosystems)

Обратная транскриптаза MuLV в концентрации 50 ед/мкл (Applied Biosystems)

Ингибитор РНКазы в концентрации 20 ед/мкл (Applied Biosystems)

ПЦР в режиме реального времени

Набор (комплект) LightCycler® – FastStart™ DNA Master HybProbe (Roche)

Смесь праймеров и зондов: добавьте равные объемы следующих компонентов, чтобы приготовить смесь праймеров и зондов для выявления гена, кодирующего белок M

Праймеры и зонды

⁹ Протокол представлен Отделом вирусологии, Центр охраны здоровья, Гонконг, Китай (Референс-лаборатория ВОЗ).

Вирусы гриппа типа А

Последовательности праймеров

FLUAM-1F: 5'-AAGACCAATCCTGTCACCTCTGA-3' (10 мкмоль/л)

FLUAM-2F: 5'-CATTGGGATCTTGCACTTGATATT-3' (10 мкмоль/л)

FLUAM-1R: 5'-CAA AGCGTCTACGCTGCAGTCC-3' (10 мкмоль/л)

FLUAM-2R: 5'-AAACCGTATTTAAGGCCGACGATAA-3' (10 мкмоль/л)

FLUA-1P: 5'-(FAM)-TTTGTGTTCACGCTCACCGT-(TAMRA)-3' (5 мкмоль/л)

FLUA-2P: 5'-(FAM)-TGGATTCTTGATCGTCTTCAAATGCA-(TAMRA)-3' (5 мкмоль/л)

Рабочую смесь праймеров и зондов готовят путем смещивания перечисленных выше 6 реагентов в равных объемах.

Процедура

- Проведите стадию обратной транскрипции, используя перечисленные в следующей таблице реагенты и строго выполняя помещенные за таблицей инструкции i-iii.

Реагенты	Объем (мкл) на 1 тест
Буфер I для ПЦР с содержанием 15 ммол/л MgCl ₂	2
Дополнительный раствор MgCl ₂ 25 ммол/л	2,8
Раствор дНТФ в концентрации 2,5 ммол/л	8
Случайный гексамер в концентрации 50 мкмоль/л	1
Ингибитор РНКазы в концентрации 20 ед/мкл	1
Обратная транскриптаза в концентрации 50 ед/мкл	1
Выделенная РНК	4,2

- Перемешайте смесь на вортексе и центрифугируйте пробирку в течение очень короткого времени (~3 секунды).
- Оставьте пробирку при комнатной температуре на 10 минут и затем инкубируйте при температуре 42°C не менее чем на 15 минут.
- Инкубируйте пробирку при температуре 95°C в течение 5 минут и затем охладите во льду.

- Поставьте ПЦР в режиме реального времени

- Подготовьте реакционную смесь для горячего старта “Hot Start” путем осторожного добавления пипеткой 60 мкл смеси LightCycler-FastStart Reaction Mix HybProbe (флакон 1b) в раствор фермента LightCycler-FastStart Enzyme (флакон 1a).
- Для каждой исследуемой пробы, а также для положительного и отрицательного контролей подготовьте рабочую смесь праймеров и зондов в соответствии с перечнем реагентов в следующей таблице:

Рабочая смесь:

Реагенты	Объем (мкл)
Вода для использования в ПЦР	7,6
Раствор MgCl ₂ (25 ммоль/л)	2,4
Смесь праймеров и зондов	3
Реакционная смесь для горячего старта “Hot Start”	2
Общий объем	15

Каждая реакция:

Рабочая смесь 15 мкл
кДНК 5 мкл

Температурные режимы и количество циклов при проведении ПЦР

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
95	10:00	1
95	0:10	
56	0:15	} 50
72	0:10	
40	0:30	1

Протокол №2 ПЦР в режиме реального времени ¹⁰

Выделите вирусную РНК из пробы клинического материала, как это описано в приложении 1: Протокол обычной ОТ-ПЦР.

Необходимые материалы

- QIAGEN® QuantiTect®, Probe RT-PCR kit (#204443):
 - 2 x QuantiTect®, Probe RT-PCR Master Mix;
 - QuantiTect®, RT Mix;
 - Вода без РНКазы.
- Ингибитор РНКазы (Applied Biosystems Cat# N808-0119)
- Праймеры
- Зонд TaqMan® MGB
- Оборудование: анализатор (детектор) Chromo-4 Real-time PCR (BioRad), термоциклиры LightCycler 2 (Roche) или LightCycler 480 (Roche)

ПЦР в режиме реального времени

ПЦР в режиме реального времени проводится как одностадийная ОТ-ПЦР с использованием зонда TaqMan®

Праймеры и зонды:**Ген: тип А (М)****Последовательности праймеров**

MP-39-67For 5'-CCMAGGTCGAAACGTAYGTTCTCTATC-3' (10 мкмоль/л)
MP-183-153Rev 5'-TGACAGRATYGGTCTTGTCTTAGCCAYTCCA-3' (10 мкмоль/л)

Последовательности зонда

MP-96-75ProbeAs 5' (FAM)-ATYTCGGCTTGAGGGGGCCTG-(MGB)-3' (5 пкмоль/мкл)

¹⁰ Протокол представлен Центром по изучению вируса гриппа (Center for Influenza Virus Research) Национального института инфекционных болезней (National Institute of Infectious Diseases - NIID), Токио, Япония (Сотрудничающий и референс-центр ВОЗ по гриппу).

Реакционная смесь

Реагенты	Объем (мкл)
Зонд QuantiTect® в смеси 2х ОТ-ПЦР	12,5
Прямой праймер (10 мкмоль/л)	1,5
Обратный праймер (10 мкмоль/л)	1,5
Зонд TaqMan MGB (5 пкмоль/мкл)	0,5
Смесь QuantiTect ® Т	0,25
Вода без РНКазы	3,75
Всего	20

Процедура

1. Внесите 20 мкл реакционной смеси в каждый планшет для ОТ-ПЦР.
2. Добавьте к реакционной смеси 5 мкл РНК, выделенной из пробы. Для постановки контролей используйте 5 мкл воды без РНКазы (отрицательный контроль) и 5 мкл соответствующей вирусной РНК (положительный контроль).
3. Запрограммируйте термоциклиер так, как показано ниже в таблице.
4. Пока планшеты для ОТ-ПЦР находятся на льду, запустите программу ОТ-ПЦР в режиме реального времени.
5. Подождите, пока температура в термоциклиере достигнет 50°C, и затем поместите планшеты для постановки ОТ-ПЦР в термоциклиер.

Температурные режимы и количество циклов при проведении ОТ-ПЦР:
Амплификатор для ПЦР в режиме реального времени Chromo-4 (BioRad)

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
50	30:00	1
95	15:00	1
94	0:15	} 45
56	1:00	

Температурные режимы и количество циклов при проведении ОТ-ПЦР:
Термоциклиры LightCycler 2 (Roche) и LightCycler 480 (Roche)

Температура (°C)	Время (минуты:секунды)	Количество циклов
50	30:00	1
95	15:00	1
94	0:15 (скорость нагрева/охлаждения 1,2°C/сек.)	} 45
56	1:15 (скорость нагрева/охлаждения 1.2°C/сек.) Учет результатов	

Приложение 3:
Алгоритм постановки ПЦР и интерпретация результатов

