

פרוטוקול בדיקה מהירה לזיהוי SARS-CoV-2 בדגימות קליניות באמצעות תגובת RT-LAMP קולורימטרית

סקירת השיטה: פרוטוקול זה נועד לזיהוי של SARS-CoV-2 באופן ישיר מדגימות קליניות (מטושים מהאף והלוע שנשמרו ב-viral transport media), תוך 30 דקות. הציוד היחיד שנדרש לתגובה הוא בלוק חימום. אין צורך בבידוד או טיהור של RNA. השיטה משתמשת ב-RT-LAMP (reverse transcription, loop mediated isothermal amplifications), אשר מגבירים RNA ויראלי ומשתמשים בצבע כאינדיקטור אשר מספק חיזוי ויזואלי של התוצאה.

לביצוע הבדיקה, יש לייצר תערובת ראשית אשר מכילה את ששת הפריימרים, בופר לליזיס, חומרים לתגובת ההגברה ואת תמיסת האינדיקטור. התערובות הראשית מועברת אל מבחנה למיקרו-צנטריפוגה. הדוגמא הקלינית (לדוגמא, VTM) מועברת אל המבחנת מיקרו-צנטריפוגה אשר מכילה את התערובת הראשית, מעורבת, ואז חצי מהתמיסה מועברת אל מבחנת מיקרו-צנטריפוגה שנייה. שתי המבחנות מונחות באמבט יבש בטמפרטורה של 63.0 מעלות צלזיוס למשך 30 דקות. לאחר 30 דקות, מסירים את הדגימה, מניחים אותה על קרח למשך דקה, ומפרשים את התוצאה. צבע אדום מעיד על תוצאה שלילית, בעוד שצבע צהוב מעיד על תוצאה חיובית.

בהמשך מצורף מדריך מפורט. הוא מחולק לשלושה חלקים. החלק הראשון הינו רשימה של התרכובות והחומרים אשר נחוצים לבדיקה. החלק השני מכיל את ההוראות הנחוצות כדי להכין את הבאפר לתגובה. החלק השלישי הינו הפרוטוקול לביצוע הבדיקה.

תרכובות וחומרים:

1. פריימרים ל-LAMP (FIP, BIP, LF, LB, F3, B3).
2. מים ללא נוקלאזות (Ambion, AM9937).
3. 100mM dUTP.
4. 0.5μL UDG.
5. 5mM SYTO 9 (Invitrogen, S34854).
6. 1250μL של תערובת מאסטר (WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA)).
7. (NEB, M1800L).
8. TE buffer pH 8.0.
9. Tween-20.
10. 1% Thermolabile Proteinase K (NEB, P8111S).
11. 2% ezDNase (Invitrogen, 11766051).
12. 0.3ng/μL של DNA גנומי אנושי.
13. 1.5mL LoBind microcentrifuge tube (Eppendorf, 022431021).
14. קרח וסל קרח.
15. פיפטה סטרילית חד פעמית (Fisherbrand, 13-711-20).
16. אמבט יבש בטמפרטורה של 63.0°C (Fisherbrand, 14-955-219).

הכנות:

1. הכן/י תערובות פריימרים בריכוז x25 מריכוז העבודה הסופי (CUFC-LB, CUFC-LF, CUFC-BIP, CUFC-FIP, CUFC-B3, CUFC-F3) באמצעות הוספה של 40 μM של הפריימרים CUFC-BIP ו-CUFC-FIP, 10μM של הפריימרים CUFC-LB ו-CUFC-LF, ו-5μM של הפריימרים CUFC-B3 ו-CUFC-F3 במים ללא נוקלאזות (Ambion, AM9937).
2. הכן/י 2X של תערובת מאסטר RT-LAMP קולורימטרית על ידי הוספה של 3.5μL של 100mM dUTP, 0.5μL של 5mM SYTO 9 (Invitrogen, S34854) ב-1250μL של WarmStart® Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) (NEB, M1800L).
3. הכן/י תערובת התגובה על ידי ערבוב 125μL של 2X תערובת מאסטר RT-LAMP קולורימטרית מסעיף 2, 10μL של תערובת הפריימרים ל-LAMP מסעיף 1, ו-95μL של מים ללא נוקלאזות לתערובת תגובה אחת של 250μL, והכפל/י לפי מספר הדוגמאות בפועל.

4. בופר הליזיס מכיל מיהול פי 10 של TE buffer pH 8.0 עם 0.1% של tween-10, 1% של Thermolabile Proteinase K (NEB, P8111S), 2% של ezDNase (Invitrogen, 11766051), 0.3ng/μL של DNA גנומי אנושי מזכר נורמלי. לתגובה אחת, 460μL של תערובת תגובה ו 20μL של הבופר ליזיס מועברים מראש למבחנת מיקרו-צנטריפוגה LoBind בגודל 1.5mL (Eppendorf, 022431021), ושומרים אותה על קרח עד לשימוש.

ביצוע הבדיקה:

1. הוספי 20μL של דוגמא קלינית ישירות לתוך מבחנת מיקרו-צנטריפוגה LoBind בגודל 1.5 mL (Eppendorf, 022431021) אשר מכילה את תערובת התגובה (460μL) ואת בופר הליזיס (20μL)
- שיטה אלטרנטיבית: הוספי 10μL של דוגמא קלינית ישירות לתוך מבחנת מיקרו-צנטריפוגה LoBind בגודל 1.5mL (Eppendorf, 022431021) אשר מכילה את תערובת התגובה (230μL) ואת בופר הליזיס (10μL). בצעי את הפעולה שוב עבור מבחנה נוספת. המשכי ישירות לשלב 4.
2. ערבבי באמצעות פיפטה סטרילית חד פעמית (Fisherbrand, 13-711-20)
3. העברי 250 μL מתוך 500 μL של התמיסה לתוך מבחנת צנטריפוגה LoBind בגודל 1.5 mL חדשה.
4. מקמי את שתי המבחנות עם 250 μL כל אחת בתוך אמבט יבש בטמפרטורה של 63 מעלות צלזיוס (Fisherbrand, 14-955-219).
5. בצעי אינקובציה של המבחנות ל-30 דקות בתוך האמבט היבש בטמפרטורה של 63 מעלות צלזיוס.
6. מקמי את המבחנות על קרח למשך דקה על מנת לעצור את התגובה.
7. קראי את התוצאה הקלורימטרית:
 - a. אדום=שלילי
 - b. צהוב=חיובי

טבלה 1. רצפי הפריימרים לתגובת LAMP עבור זיהוי של SARS-CoV-2.

Primer	Sequence
Name	
CUFC1-F3	TGGATACAACTAGCTACAGAGAAG
CUFC1-B3	AGCCAAAGACCGTTAAGTGTA
CUFC1-FIP	GTGGTGGTTGGTAAAGAACATCAGACTTGTTGTCATCTCGCAAAGG
CUFC1-BIP	CCTCTATCACCTCAGCTGTTTTGCTGTACCATACAACCCTCAACTT
CUFC1-LF	ACCTGAGTTACTGAAGTCATTGAGA
CUFC1-LB	TGGTTTTAGAAAAATGGCATTCCC