

**ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ**

**ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**



**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
ЩОДО ДІАГНОСТИКИ ГРИПУ ПТИЦІ,
ТИПУВАННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ПАТОГЕННОСТІ
ВІРУСУ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ
МЕТОДАМИ**

КИЇВ – 2025

Методичні рекомендації розглянуто та затверджено на засіданні Вченої ради Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № 6 від 29 липня 2025 р.).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою при Державній службі України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол №__ від 02 грудня 2025 р.).

Розробники: Мандигра С.С., Сушко М.І., Ружинська І.Л., Посна О.В., Троян О.М., Дрожже Ж.М., Рудой О.В., Алексеева Г.Б., Піщанський О.В.

Рецензенти:

Тарасов О. А. – кандидат ветеринарних наук, завідувач лабораторії зоонозних інфекцій та оцінки ризиків Інституту ветеринарної медицини НААН України;

Уховський В. В. – доктор ветеринарних наук, професор, заступник директора з контролю якості ветеринарних імунобіологічних засобів ДНДІЛДВСЕ;

Романько М. Є. – доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, заступник директора з наукової роботи ДНДІЛДВСЕ.

Методичні рекомендації щодо діагностики грипу птиці, типування та визначення патогенності вірусу молекулярно-генетичними методами : метод. рекомендації. (2025). С.С., Мандигра, М.І. Сушко, І.Л. Ружинська, О.В. Посна, О.М. Троян, Ж.М., Дрожже, О.В. Рудой, Г.Б. Алексеева, О.В. Піщанський; К: ДНДІЛДВСЕ, 2025; 56 с.

Методичні рекомендації призначені для спеціалістів регіональних державних лабораторій Держпродспоживслужби, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина».

У методичних рекомендаціях описано молекулярно-генетичні методи діагностики грипу птиці, типування та визначення патогенності вірусу молекулярно-генетичними методами.

ЗМІСТ

ПОЗНАЧЕННЯ ТА СКОРОЧЕННЯ.....	4
ВСТУП.....	5
1. ВИМОГИ ДО ОРГАНІЗАЦІЇ РОБОТИ У МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ.....	7
2. ВІДБІР, ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ ПАТОЛОГІЧНОГО/БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ.....	9
3. СХЕМА ДІАГНОСТИКА ГРИПУ ПТИЦІ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧНИМИ МЕТОДАМИ. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ.....	10
4. ПІДГОТОВЛЕННЯ ЗРАЗКІВ ПАТОЛОГІЧНОГО/БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ДО ВИДІЛЕННЯ РНК.....	14
5. ВИДІЛЕННЯ РНК ІЗ ПАТОЛОГІЧНОГО/БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ.....	15
6. ДІАГНОСТИКА ГРИПУ ПТИЦІ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ.....	16
6.1. Виявлення РНК вірусу грипу типу А (ген М).....	16
6.2. Визначення підтипу Н5 вірусу грипу типу А.....	21
6.3. Визначення підтипу Н7 вірусу грипу типу А.....	24
6.4. Визначення підтипу Н9 вірусу грипу типу А.....	29
6.5. Визначення підтипів Н1-Н8, Н10-Н16 вірусу грипу типу А.....	32
6.6. Визначення підтипів N1-N9 вірусу грипу типу А.....	37
7. ВИЗНАЧЕННЯ ПАТОГЕННОСТІ ВІРУСІВ ГРИПУ ТИПУ А ПІДТИПІВ Н5 ТА Н7 СЕКВЕНУВАННЯМ ЗА МЕТОДОМ СЕНГЕРА.....	41
8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	51
9. КОНТАМІНАЦІЯ ДОСЛІДЖУВАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ТА РЕАКТИВІВ.....	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	55

ПОЗНАЧЕННЯ ТА СКОРОЧЕННЯ

ВПП – високопатогенний грип птиці;

ВПК – внутрішній позитивний контроль;

ГП – грип птиці;

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфат;

ддНТФ – дідезоксинуклеотидтрифосфат;

ЗТ-ПЛР-РЧ – полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу зі зворотною транскрипцією;

кДНК —комплементарний ланцюг ДНК;

НК – нуклеїнова кислота;

ПЗ – позитивний зразок;

НКВ – негативний контроль виділення;

НКА – негативний контроль ампліфікації;

п.н. – пара нуклеотидів;

ПКА – позитивний контроль ампліфікації;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

НПП – низькопатогенний грип птиці;

РНК – рибонуклеїнова кислота;

РНКаза – рибонуклеаза;

ФБР– фосфатно-буферний розчин;

НА – гемаглютинін;

НА – нейрамінідаза;

ВСТУП

Віруси грипу поділяються на чотири типи: А, В, С і D. Відомо, що тільки тип А є зоонозом і може становити велику небезпеку як для тварин так людей. Типи В і С в основному вражають людей і зазвичай викликають легкий перебіг захворювання, типом D може інфікуватися в основному ВРХ.

Віруси грипу птиці належать до сімейства *Orthomyxoviridae*, роду *Influenzavirus A*. Віруси типу А є надзвичайно різноманітними та широко поширені серед птахів.

Віруси грипу типу А поділяються на підтипи на основі двох поверхневих білків, гемаглютиніну (НА) та нейрамінідази (НА). На сьогоднішній день від птахів виділено 16 підтипів НА та 9 підтипів НА у різних комбінаціях. Крім того, у 2012 та 2013 роках з'явилися дані про два нових підтипи НА і НА – H17N10 та H18N11, виділених від кажанів.

Штами вірусу грипу птиці (ГП) поділяють на дві категорії, залежно від важкості захворювання у птиці:

- низькопатогенні штами (НПГП), які зазвичай зовсім не викликають або викликають незначні клінічні ознаки у птиці, і можуть залишатися непоміченими через відсутність симптомів у деяких видів птахів;
- високопатогенні (ВПГП) штами, які можуть викликати серйозні клінічні ознаки та високі показники смертності серед домашньої птиці.

На сьогоднішній день природні високопатогенні віруси грипу типу А, які викликають гострі клінічні захворювання у курей, індиків та інших птахів, що мають економічне значення, асоціюються лише з підтипами H5 та H7. Класифікація вірусів пташиного грипу на низькопатогенні або високопатогенні стосується виключно їхньої патогенності для домашньої птиці та інших видів птахів і не обов'язково відображає ступінь небезпеки для людини чи інших тварин.

Про випадки захворювання ГП, викликаних підтипами H5 та H7, не залежно від їхньої патогенності, необхідно повідомляти у Всесвітню організацію охорони здоров'я тварин (ВООЗТ) та вживати відповідних заходів

з запобігання поширення та ліквідації хвороби згідно Інструкції з профілактики та ліквідації грипу птиці. Причина того, що всі підтипи H5 і H7 підлягають звітності, при виявленні у домашньої птиці, полягає в тому, що існує ризик для них стати високопатогенними через мутації.

Діагноз на ГП встановлюється комплексно з урахуванням епізоотичних даних, клінічних ознак, патологоанатомічних змін та результатів лабораторних досліджень. Основними лабораторними методами діагностики ГП є: молекулярно-генетичні (полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР-РЧ), секвенування), вірусологічні (біологічна проба на курячих ембріонах та на курях) та серологічні (реакція гемаглютинації, реакція затримки гемаглютинації, імуноферментний аналіз). Референтними методами визначення патогенності вірусу ГП є визначення послідовності амінокислот в місці розщеплення НА та визначення внутрішньовенозного індексу патогенності шляхом зараженням 10 курей 4-8 тижневого віку.

1. ВИМОГИ ДО ОРГАНІЗАЦІЇ РОБОТИ У МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Принципи організації лабораторії та етапи проведення молекулярно-генетичних досліджень, а також робота персоналу лабораторії, де проводяться дослідження молекулярно-генетичними методами регламентуються Державними санітарними нормами і правилами 9.9.5-153-2008 «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I–IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами» та ДСТУ 6051:2008 «Ветеринарна медицина. ПЛР-лабораторія для молекулярної діагностики. Загальні вимоги».

Відповідно до вищезазначених нормативних документів ПЛР-лабораторія в залежності від способу детекції результатів реакції повинна включати наступний набір розташованих окремо робочих зон, або окремо виділених робочих зон у складі інших функціональних приміщень:

- Робоча зона 1 – прийому, реєстрації і первинної обробки матеріалу.
- Робоча зона 2 – виділення нуклеїнових кислот (НК).
- Робоча зона 3 – приготування реакційних сумішей.
- Робоча зона 4 – проведення ПЛР–ампліфікації.
- Робоча зона 5 – детекції продуктів ампліфікації (при застосуванні методів електрофорезу) – форезна, а також секвенування – секвенаторна.

Зональність ПЛР-лабораторії має забезпечувати поточність руху (односпрямований рух) досліджуваного матеріалу, зразків НК, продуктів ампліфікації. При цьому передачу досліджуваного матеріалу до Робочої зони 1 та зразків, при суміжному розташуванні приміщень Робочих зон 1, 2, 3, 4 бажано здійснювати через шлюзові передавальні вікна.

Кожна робоча зона ПЛР-лабораторії повинна мати свій промаркований набір обладнання, автоматичних піпеток, наконечників, пластикового та скляного посуду, захисного одягу, гумових рукавичок, інвентарю для прибирання тощо, які використовують тільки в даному приміщенні.

Мінімальний перелік основного обладнання ПЛР-лабораторії:

Робоча зона 1: шафа біологічної безпеки II або III класу, гомогенізатор для патологічного матеріалу, високошвидкісна центрифуга (13 тис об/хв або більше) з охолодженням для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл, мініцентрифуга-струшувач для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл, набір одноканальних дозаторів зі змінними об'ємами (0,5-10 мкл; 2-20 мкл, 10-100 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл), холодильник з морозильною камерою (мінус 20°C) для короткострокового зберігання патологічного матеріалу, морозильна камера (мінус 80°C) для довгострокового зберігання патологічного матеріалу;

Робоча зона 2: шафа біологічної безпеки II або III класу, термострушувач (зі змінною температурою та частотою струшування) для пробірок об'ємом 1,5-2 мл, високошвидкісна центрифуга (13 тис. об/хв або більше) з охолодженням для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл, мініцентрифуга-струшувач для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл, набір одноканальних дозаторів зі змінними об'ємами (0,5-10,0 мкл; 2-20 мкл, 10-100 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл), холодильник з морозильною камерою (мінус 20°C) для зберігання компонентів діагностичних наборів, лабораторний відсмоктувач;

Робоча зона 3: два ПЛР-бокси (один для приготування мастерміксу, другий для внесення дослідних зразків НК в реакційну суміш), мініцентрифуга-струшувач для пробірок об'ємом 1,5-2,0 мл, мініцентрифуга-струшувач для стріпованих (у кількості 8 шт.) пробірок об'ємом 0,1-0,2 мл, набір одноканальних дозаторів зі змінними об'ємами (0,5-10,0 мкл; 2-20 мкл, 10-100 мкл; 20-200 мкл; 100-1000 мкл), холодильник з морозильною камерою (мінус 20°C) для короткострокового зберігання зразків виділених нуклеїнових кислот, морозильна камера (мінус 20°C) для зберігання діагностичних наборів.

Робоча зона 4: ампліфікатори для проведення класичної ПЛР та ПЛР у режимі реального часу;

Робоча зона 5: ПЛР-бокс, ампліфікатор для проведення класичної ПЛР, обладнання для проведення електрофорезу з системою документації, спектрофотометр, центрифуга, струшувач, секвенатор, мікрохвильова піч,

холодильник з морозильною камерою.

Увага! Для роботи з НК використовують тільки одноразові стерильні пластикові матеріали, що мають спеціальне маркування «RNase-free» «DNase-free». Працюють тільки в одноразових рукавичках. Всі маніпуляції, пов'язані з підготовкою зразків, проводяться дозаторами змінних об'ємів із використанням одноразових поліпропіленових пробірок та наконечників з аерозольним бар'єром. Одноразовий пластиковий посуд (пробірки, наконечники) повинні скидатись у спеціальний контейнер з дезінфікуючим розчином.

Після 3-годинної дезінфекції розчин виливають у каналізацію, а відпрацьований пластик автоклавують при 1 Атм, протягом 30 хв та відправляють на перероблення у спеціалізовані підприємства.

Після проведення досліджень дозатори, лабораторне обладнання та робочі поверхні рекомендовано обробляти розчинами для руйнування ДНК/РНК.

Рекомендується опромінювати приміщення ультрафіолетом протягом 1 год до початку та 1 год після закінчення робіт.

2. ВІДБІР, ТРАНСПОРТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ ПАТОЛОГІЧНОГО/БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Відбір зразків. При підозрі на ГП для молекулярно-генетичних досліджень в лабораторію надсилають наступні зразки:

- від загиблої птиці: шматочки трахеї, легені, повітроносні мішки, фрагмент кишечника з вмістимим, селезінку, нирки, головний мозок, печінку, серце. Зразки слід відбирати від трупів птахів, які щойно загинули, або ті, що були важко хворими або агонізували і були гуманно вбиті. Відібрані зразки легень, трахеї, селезінки, нирок, печінки, серця можна поміщати в одну ємкість для збору зразків; проби посліду та зразки кишківника – в окремі ємкості;

- від живої птиці: орофарингеальні і клоакальні мазки. Для відбору мазків використовують спеціально призначені для цього стерильні зонди,

використання гігієнічних паличок заборонено. Якщо не можливо відібрати мазки, можна відібрати свіжий слід.

Відбір матеріалу проводять з дотриманням правил біобезпеки, не допускають потрапляння будь-якої кількості інфікованого матеріалу в зовнішнє середовище.

Транспортування. Перед транспортуванням патологічний/біологічний матеріал слід упакувати дотримуючись правил потрійної система пакування:

1. Герметичний, пластиковий контейнер, який містить патологічний/біологічний матеріал (контейнер № 1) обгорнути абсорбуючим, змоченим дезінфектантом матеріалом і помістити в інший герметичний, пластиковий контейнер більшого розміру (контейнер № 2).

2. Контейнер № 2 помістити, обклавши його з усіх боків охолоджуючим елементом, в термоконтейнер або термосумку (спеціально призначених для транспортування інфекційного матеріалу).

Зразки направляють до лабораторії впродовж 24 год.

Зберігання зразків. Мазки рекомендовано зберігати 48-96 год при температурі 4 °С; 1 тиждень – 1 міс при температурі мінус 20 °С; довготривале зберігання при мінус 70 °С або нижче.

Тканини рекомендовано зберігати 48-96 год при температурі 4 °С; довготривале зберігання при мінус 70 °С або нижче. Зберігати тканини при мінус 20 °С не рекомендовано.

3. СХЕМА ДІАГНОСТИКА ГРИПУ ПТИЦІ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ МЕТОДАМИ. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Лабораторна діагностика ГП молекулярно-генетичними методами проводиться у декілька етапів. Спочатку досліджують патологічний/біологічний матеріал на наявність РНК вірусу ГП за допомогою ЗТ-ПЛР-РЧ з використання специфічних праймерів до гену М вірусу грипу типу А. У разі отримання позитивного результату (виявлено РНК вірусу грипу типу А)

виключають наявність у пробі РНК вірусу ГП підтипів Н5 і Н7, оскільки лише віруси ГП даних підтипів можуть бути високопатогенними. Наступним етапом є визначення патогенності вірусу підтипів Н5 і Н7 секвенуванням.

Для більш детального вивчення вірусу ГП рекомендовано провести типкування НА методом ЗТ-ПЛР-РЧ.

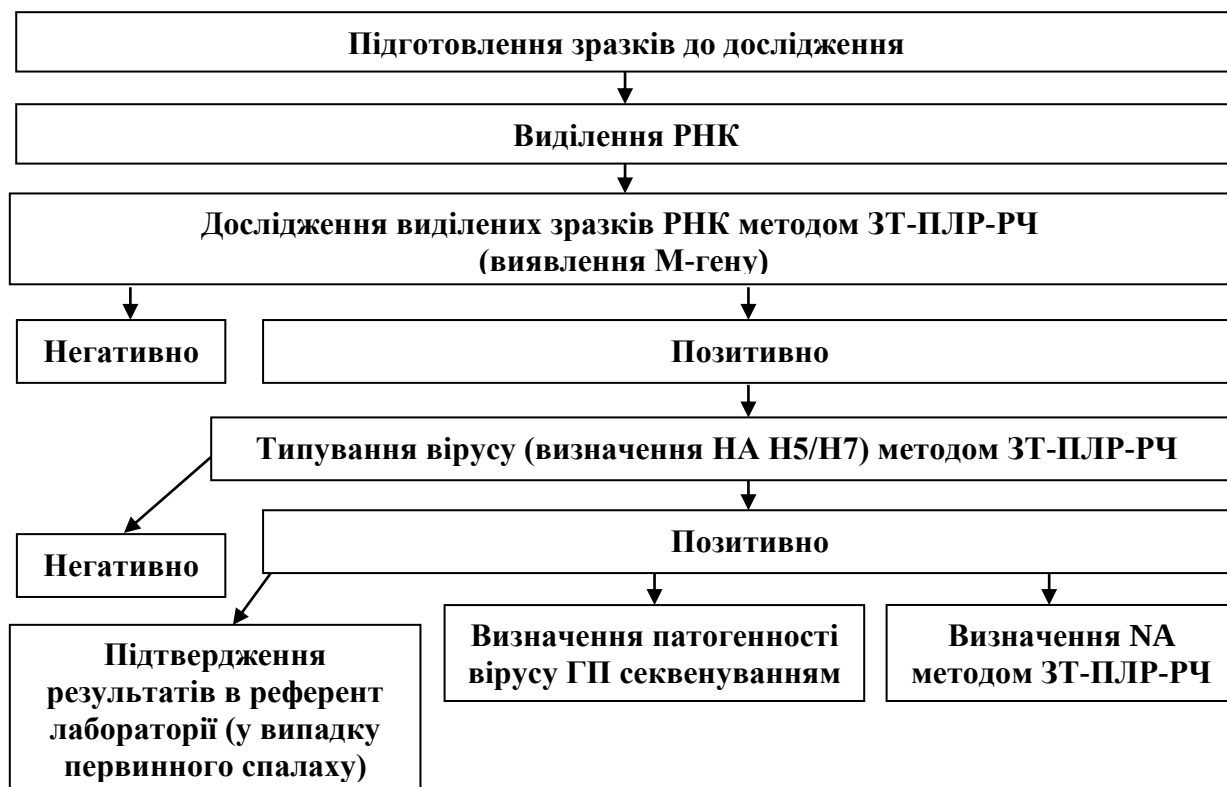


Рис. 1. Схема діагностики грипу птиці молекулярно-генетичними методами

Для дослідження на ГП методом ЗТ-ПЛР-РЧ можуть використовуватися комерційні діагностичні тест-системи та реагенти згідно стандартних операційних процедур (СОП) розроблених референтними лабораторіями. Перевагою використання реагентів згідно СОПів, є те, що референтні лабораторії постійно вивчають та відслідковують мутації у геномах вірусів, які циркулюють у світі, і за необхідності вносять зміни в СОПи, так щоб за допомогою них можна було виявити всі циркулюючі варіанти вірусів і роблять це досить швидко.

В даних методичних рекомендаціях наводяться протоколи досліджень по виявленню, типуванню та визначення патогенності вірусу ГП, які розроблені на

основі СОПів референт лабораторії Європейського Союзу (ЄС) по ГП та хворобі Ньюкасла. Зазначення конкретних назв реактивів та їх виробників не є рекламуванням чи пропагуванням використання реактивів певних виробників, це лише вибір розробників протоколів дослідження, які на основі їх досліджень було визначено як найбільш придатні для даного використання. Кінцевий користувач може використовувати аналогічні реактиви інших виробників, перед їх використанням необхідно провести валідацію протоколу досліджень.

При замовленні праймерів та зондів у синтезуючій компанії необхідно вказувати шкалу синтезу та метод очищення. Праймери для проведення ЗТ-ПЛР-РЧ можна щоб були очищені методом знесолення, але краще щоб методом високоефективної рідинної хроматографії (HPLC) або методом поліакриламідного гель-електрофорезу (PAGE), флуоресцентні зонди – обов'язкове очищення методом HPLC, праймери для секвенування – методом HPLC, за можливості, додатково методом PAGE.

Праймери та зонди поставляються в леофільновисушеному вигляді. Перед першим використанням леофільновисушені праймери та зонди необхідно відновити до концентрації 100 мкМоль (100 пікоМоль/мкл) (матрична концентрація) шляхом додавання ТЕ буфера в об'ємі, що вказаний в паспорті до праймерів/ зондів. З матричної концентрації готують робочу концентрацію праймерів (наприклад концентрація леофільно висушеного праймера (згідно паспорту/сертифікату) становить 39,7 наноМоль, для приготування 100 пікоМоль/мкл матричного розчину необхідно в пробірку з праймером додати 379 мкл ТЕ буфера; для приготування робочого розчину праймера з концентрацією 20 пікоМоль/мкл, необхідно до 20 мкл матричного розчину праймера додати 80 мкл ТЕ буфера), згідно протоколу дослідження. Матричну та робочу концентрацію праймерів та зондів зберігають за температури не вище мінус 16°C. Оскільки праймери та зонди не можна заморожувати-розморожувати більше 5-ти разів, праймери та зонди в матричній та робочій концентраціях слід розділити на аліквоти. При зміні партії праймерів/зондів або

не рідше одного разу на рік проводити перевірку їх придатності шляхом дослідження референтних матеріалів.

При дослідженні зразків на ГП методом ЗТ-ПЛР-РЧ можуть використовуватися наступні контролі:

- Негативний контроль виділення (НКВ) – зразок, виділення РНК з якого проводиться як із дослідних зразків, однак замість дослідного зразка додається деіонізована вода вільна від нуклеаз. Використовується для виявлення контамінації досліджуваних зразків між собою.

- Внутрішній позитивний контроль (ВПК) – РНК, послідовність нуклеотидів якої відрізняється від послідовності нуклеотидів РНК вірусу ГП і яка обов'язково має бути присутньою в дослідному зразку. ВПК використовується з метою контролю правильності виділення НК та контролю інгібіції ПЛР. Розрізняють екзогенний та ендогенний ВПК. В якості екзогенного ВПК використовується РНК, яка за нормальних умов не може бути присутньою в дослідному зразку, наприклад, штучносинтезована РНК, або РНК вірусів рослин (вразі дослідженні зразків від тварин). Ендогенний ВПК – РНК, яка вже присутня в дослідному зразку, наприклад гени, які постійно експресуються в різних тканинах, є важливими для забезпечення життєдіяльності клітини і є консервативними у різних видів тварин (наприклад, ген β -актину). Ендогенний ВПК також дає можливість визначати придатність дослідних зразків до дослідження та правильність відбору зразків.

- Позитивний контроль ампліфікації (ПКА) – зразок, який містить порогову концентрацію цільової РНК і при цьому стабільно виявляється. ПКА дає змогу контролювати правильність приготування реакційної суміші та якість реактивів.

- Негативний контроль ампліфікації (НКА) – зразок, який не містить РНК. НКА дає змогу виявити контамінацію реактивів РНК.

- Позитивний зразок (ПЗ) – зразок, який завідомо містить цільову послідовність РНК, використовується для контролю всіх етапів ПЛР.

- Негативний зразок (НЗ) – зразок, який не містить цільової послідовності

РНК, але містить саму РНК.

НКВ, ПКА, НКА, ВПК або ПЗ є обов'язковими та повинні використовуватися при кожній постановці ПЛР.

У випадку, якщо протоколом дослідження не передбачено використання ВПК, то необхідно використовувати ПЗ.

Графіки накопичення інтенсивності флуоресценції повинні мати правильну (сигмоїдну або логарифмічну) форму. У випадку, коли графік має іншу форму необхідно повторно провести дослідження зразку.

4. ПІДГОТОВЛЕННЯ ЗРАЗКІВ ПАТОЛОГІЧНОГО/БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ДО ВИДІЛЕННЯ РНК

Підготовка матеріалу для дослідження проводиться в Робочій зоні 1 – прийому, реєстрації і первинної обробки матеріалу.

Мазки і змиви. Якщо зразки отримані у вигляді сухих тампонів, необхідно відрізати головку тампона, помістити в пробірку та додати 750-1000 мкл стерильного фізіологічного або фосфатно-буферного розчину (ФБР). Далі пробірки з тампонами необхідно струсити на струшувачі протягом 30 с і центрифугувати протягом 2 хв при $15000 \times g$.

Внутрішні органи тварин і секційний матеріал нарізають на маленькі шматки використовуючи стерильні ножиці та пінцет і переносять приблизно 150-200 мг матеріалу в стерильну пробірку, яка містить кульку із нержавіючої сталі, додають 450-600 мкл стерильного фізіологічного розчину або ФБР і гомогенізують при 30 Гц протягом 3 хв. У разі відсутності гомогенізатора можна використовувати стерильну фарфорову ступку з товкачиком. Пробірку з гомогенізатором центрифугують протягом 2 хв при $15000 \times g$. Супернатант використовують для екстракції РНК.

Послід. Для дослідження використовують щонайменше 1 г посліду. Готують суспензію на стерильному фізіологічному розчині у співвідношенні

1:4, ретельно змішують на струшувачі протягом 30 с і центрифугують протягом 2 хв. при $15000 \times g$. Для екстракції РНК використовують супернатант.

Об'єднання зразків. Об'єднання зразків можна проводити, якщо це передбачено тест-системою, яка буде використана для виявлення РНК вірусу грипу або при використанні нижче наведених протоколів, якщо зразки відібрані з однієї епізоотичної одиниці. Рекомендовано об'єднувати до 5 зразків відібраних з одного анатомічного місця (орофарингеальні мазки можна об'єднувати з орофарингеальними, клоакальні з клоакальними, внутрішні органи з внутрішніми органами), для підготовки кожного зразка необхідно використовувати окремі інструменти.

5. ВИДІЛЕННЯ РНК ІЗ ПАТОЛОГІЧНОГО/БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

Виділення РНК із досліджуваного матеріалу проводиться в Робочій зоні 2 – виділення НК.

Метою даного етапу є виділення РНК з клітин та очищенні їх від білків, жирів, вуглеводів та дезактивації клітинних ферментів. Процес виділення РНК складається з наступних етапів:

- лізування (під час даного етапу відбувається руйнування мембран клітин і ядер, вихід РНК в розчин, звільнення їх від білків та дезактивація клітинних ферментів);
- адсорбція РНК (зв'язування РНК з адсорбуючою речовиною, яка може знаходитися у вигляді суспензії, мембрани фільтрувальних колонок чи на поверхні магнітних частинок в залежності від набору, який використовується для виділення РНК);
- відмивання (РНК від білків, жирів, вуглеводів і залишків клітинних мембран);
- елюція (відокремлення РНК від адсорбуючої речовини і перехід РНК в розчин).

Екстракція РНК з досліджуваного матеріалу проводиться разом з ВПК, що дозволяє контролювати процедуру екстракції РНК.

Враховуючи молекулярну нестабільність РНК, з нею необхідно поводитись обережно. Виділену РНК зберігають при температурі від 2 до 8 °С до 4 год, при температурі не вище мінус 16 °С протягом одного місяця, і більш тривало при температурі не вище мінус 68 °С, слід мінімізувати кількість циклів замороження-розмороження. Для екстракції РНК із дослідних зразків використовують комерційні набори для виділення РНК, або РНК/ДНК.

6. ДІАГНОСТИКА ГРИПУ ПТИЦІ МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

6.1. Виявлення РНК вірусу грипу типу А (ген М)

6.1.1 Протокол дослідження розроблений на основі SOP VIR 1003 – ed. 00 – 04/21. Detection of type A influenza virus by real-time RT-PCR (Nagy et al., 2021) референт лабораторії ЄС по ГП та хворобі Ньюкасла (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie). Даний протокол дає можливість виявляти РНК вірусу грипу усіх субтипів, ампліфікуючи 7 сегмент РНК (кодує матричний білок) вірусу. Даним протоколом не передбачено використання ВПК, тому бажано використовувати ПЗ.

Реагенти:

- Вода вільна від нуклеаз;
- Буфер для ресуспендування олігонуклеотидів (TE pH 8.0);
- Набір QuantiTect Probe RT-PCR Kit, Qiagen.

Таблиця 1

Послідовність нуклеотидів праймерів та зондів

№ п/п	Назва праймера/ зонда	Послідовність нуклеотидів в праймері / зонді (5'->3')
1	SVIP-MP-F	GGCCCCCTCAAAGCCGA
2	SVIP-MP-R	CGTCTACGYTGCAGTCC
3	SVIP-MP_P2-MGB	FAM-TCACTKGGCACGGTGAGCGT-MGB

Таблиця 2

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	3,72
2	2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	2X	1X	12,5
3	Прямий праймер SVIP-MP-F	10 мкМ	0,6 мкМ	1,5
4	Зворотний праймер SVIP-MP-R	10 мкМ	0,6 мкМ	1,5
5	Зонд SVIP-MP_P2-MGB	10 мкМ	0,21 мкМ	0,53
6	QuantiTect RT Mix	-	-	0,25
Загальний об'єм суміші				20,0

До 20,0 мкл реакційної суміші додати 5 мкл досліджуваного зразку/контролю.

Таблиця 3

Параметри циклювання

	Етап	Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Зворотна транскрипція	50 °C -30 хв	1
1. Утримування	Ініціалізація	95 °C -15 хв	1
2. Циклювання	Денатурація	95 °C-10 с	45
	Відпал	64 °C-30 с - детекція (FAM)	
	Елонгація	72 °C-10с	

Таблиця 4

Облік та інтерпретація результатів дослідження контролів

Контроль	Очікувані результати	Дії у випадку некоректних результатів
ПКА	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності, умови зберігання реактивів та правильність приготування реакційної суміші. Повторити дослідження починаючи з ЗТ-ПЛР-РЧ, за можливості використати нові реагенти
НКА	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ використовуючи нові реагенти
НКВ	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з виділення РНК
ПЗ	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності та правильність розведення буферів набору для виділення РНК. Повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК

Облік та інтерпретація результатів дослідження зразків

Результат	Інтерпретація та дії
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct $\leq$ 36	Зразок позитивний (виявлено РНК вірусу грипу типу А)
Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM	Зразок негативний (РНК вірусу грипу типу А не виявлено)
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct між 37 та 45	Зразок сумнівний. Необхідно повторити дослідження починаючи з підготовки зразка та досліджувати його паралельно з уже виділеним зразком РНК, за можливості використовуйте інший протокол дослідження. Якщо є підозра у пригніченні реакції, то необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатор зразку водою вільною від нуклеаз 1:10

6.1.2 Протокол дослідження розроблений на основі SOP VIR 018 – ed. 04 – 10/25. Detection of type A Avian influenza virus by real-time RT-PCR (Heine et al., 2015; Laconi et al., 2020) референт лабораторії ЄС по ГП та хворобі Ньюкасла (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie). Даний протокол дає можливість виявляти РНК вірусу грипу типу А будь-якого субтипу, ампліфікуючи 7 сегмент РНК (кодує матричний білок) вірусу та екзогенний ВПК.

Реагенти:

- Вода вільна від нуклеаз;
- Буфер для ресуспендування олігонуклеотидів (TE pH 8.0);
- Intype IC-RNA, Indical Bioscience – екзогенний ВПК, додається до кожного зразка, включаючи НКВ, на етапі виділення РНК, об'єм залежить від кінцевого об'єму, який буде використаний для елюції РНК з колонки/магнітних частинок, під час виділення, співвідношення повинно бути 1:10;
- Набір AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents, Applied Biosystems.

Таблиця 6

Послідовність нуклеотидів праймерів та зондів

№ п/п	Назва праймера/ зонда	Послідовність нуклеотидів в праймері / зонді (5'→3')
1	IVA D161M	AGA TGA GYC TTC TAA CCG AGG TCG
2	IVA D162M1	TGC AAA AAC ATC YTC AAG TCT CTG
3	IVA D162M2	TGC AAA CAC ATC YTC AAG TCT CTG
4	IVA D162M3	TGC AAA GAC ATC YTC AAG TCT CTG
5	IVA D162M4	TGC AAA TAC ATC YTC AAG TCT CTG
6	IVA MA	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-TAMRA/BHQ1
7	EGFP-11-F	CAG CCA CAA CGT CTA TAT CAT G
8	EGFP-2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G
9	EGFP-Cy5	Cy5-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ2

Таблиця 7

Приготування суміші праймерів та зонду для ампліфікації і виявлення ВПК (ВПК суміш)

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	TE pH 8.0	-	-	186,25
2	Прямий праймер EGFP-11-F	100 мкМ	2,5 мкМ	5,0
3	Зворотний праймер EGFP-2-R	100 мкМ	2,5 мкМ	5,0
4	Зонд EGFP-Cy5	100 мкМ	1,8 мкМ	3,75
Загальний об'єм суміші				200

Таблиця 8

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	0,51
2	2X RT-PCR Buffer	2X	1X	12,5
3	Прямий праймер IVA D161M	20 мкМ	0,9 мкМ	1,125
4	Зворотний праймер IVA D162M1	10 мкМ	0,225 мкМ	0,56
5	Зворотний праймер IVA D162M2	10 мкМ	0,225 мкМ	0,56
6	Зворотний праймер IVA D162M3	10 мкМ	0,225 мкМ	0,56
7	Зворотний праймер IVA D162M4	10 мкМ	0,225 мкМ	0,56
8	Зонд IVA MA	10 мкМ	0,250 мкМ	0,625
9	ВПК суміш	-	-	2
10	25X RT-PCR Enzyme Mix	25X	1X	1
Загальний об'єм суміші				20,0

До 20,0 мкл реакційної суміші додати 5 мкл досліджуваного зразку/контролю.

Параметри циклювання

	Етап	Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Зворотна транскрипція	45 °C -10 хв	1
1. Утримування	Ініціалізація	95 °C -10 хв	1
2. Циклювання	Денатурація	95 °C -15 с	45
	Відпал	60 °C-45с - детекція (FAM, Cy5)	

Облік та інтерпретація результатів дослідження контролів

Контроль	Очікувані результати	Дії у випадку некоректних результатів
ПКА	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності, умови зберігання реактивів та правильність приготування реакційної суміші. Повторити дослідження починаючи з ЗТ-ПЛР-РЧ, за можливості використати нові реагенти
НКА	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ використовуючи нові реагенти
НКВ	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення Ct ≤ 30	Повторити дослідження починаючи з виділення РНК
ВПК	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення Ct ≤ 30	Якщо є підозра у пригніченні реакції, то необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 та повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатор зразку водою вільною від нуклеаз 1:10. Якщо результати дослідження ВПК залишаються некоректними, зразок вважають непридатним для дослідження. Некоректні результати ВПК можуть бути у випадку, коли дослідний зразок містить високу концентрацію вірусу, внаслідок чого відбувається конкуренція за реагенти, в результаті чого ВПК може не ампліфікуватися та не виявлятися. За таких обставин зразок вважають позитивний і ніяких додаткових дій вживати не потрібно

Облік та інтерпретація результатів дослідження зразків

Результат	Інтерпретація та дії
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення $Ct \leq 36$	Зразок позитивний (виявлено РНК вірусу грипу типу А)
Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення $Ct \leq 30$	Зразок негативний (РНК вірусу грипу типу А не виявлено)
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct між 37 та 45, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, значення $Ct \leq 30$	Зразок сумнівний. Необхідно повторити дослідження починаючи з підготовки зразка та досліджувати його паралельно з уже виділеним зразком РНК, за можливості використати інший протокол дослідження
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct між 37 та 45, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, значення $Ct > 30$	Необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатором зразку водою вільною від нуклеаз 1:10. У випадку повторення результатів дослідження, зразок вважають не придатним для дослідження. Потрібно повторно відібрати зразок

6.2. Визначення підтипу H5 вірусу грипу типу А

Протокол дослідження розроблений на основі SOP VIR 143 – ed. 00 – 04/21. Detection of Eurasian H5 Avian influenza virus by real-time RT-PCR (Slomka et al., 2007) референт лабораторії ЄС по ГП та хворобі Ньюкасла (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie). Протокол дослідження дає можливість виявляти євразійський штам вірусу грипу типу А підтипу H5, ампліфікуючи ділянку 4 сегмента РНК вірусу ГП, що кодує субодиницю HA2 підтипу H5 та екзогенний ВПК.

Реагенти:

- Вода вільна від нуклеаз;
- Буфер для ресуспендування олігонуклеотидів (TE pH 8.0);
- Набір OneStep RT-PCR Kit, Qiagen;
- Intype IC-RNA, Indical Bioscience – екзогенний ВПК, додається до

кожного зразка, включаючи НКВ, на етапі виділення РНК, об'єм залежить від кінцевого об'єму, який буде використаний для елюції, співвідношення повинно бути 1:10;

- MgCl_2 25 мМ;
- RNase Inhibitor 40 U/ мкл.

Таблиця 12

Послідовність нуклеотидів праймерів та зондів

№ п/п	Назва праймера/ зонда	Послідовність нуклеотидів в праймері / зонді (5'→3')
1	H5LH1	ACATATGACTACCCACARTATTTCAG
2	H5RH1	AGACCAGCTAYCATGATTGC
3	H5PRO	FAM-TCWACAGTGGCGAGTTCCTAGCA-TAMRA
4	EGFP-11-F	CAG CCA CAA CGT CTA TAT CAT G
5	EGFP-2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G
6	EGFP-Cy5	Cy5-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ2

Таблиця 13

Приготування суміші праймерів та зонду для ампліфікації і виявлення ВПК (ВПК суміш)

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	TE pH 8.0	-	-	186,25
2	Прямий праймер EGFP-11-F	100 мкМ	2,5 мкМ	5,0
3	Зворотний праймер EGFP-2-R	100 мкМ	2,5 мкМ	5,0
4	Зонд EGFP-Cy5	100 мкМ	1,8 мкМ	3,75
Загальний об'єм суміші				200

Таблиця 14

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	11,0
2	Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5X	1X	5,0
3	dNTP Mix	10 мМ	0,4 мМ	1,0
4	MgCl_2	25 мМ	1,25 мМ	1,25
5	Прямий праймер H5LH1	50 мкМ	0,4 мкМ	0,2
6	Зворотний праймер H5RH1	50 мкМ	0,4 мкМ	0,2
7	Зонд H5PRO	6 мкМ	0,3 мкМ	1,25
8	Суміш ВПК	-	-	2,0
9	RNase Inhibitor	40 U/ мкл	4 U/ мкл	0,1
10	Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	-	-	1,0
Загальний об'єм суміші				23,0

До 23,0 мкл реакційної суміші додати 2,0 мкл досліджуваного зразку/контролю.

Параметри циклювання

Етап		Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Зворотна транскрипція	50 °C -30 хв	1
2. Утримування	Ініціалізація	95 °C -15 хв	1
3. Циклювання	Денатурація	95 °C-10 с	40
	Відпал	54 °C-30 с - детекція (FAM, Cy5)	
	Елонгація	72 °C-10 с	

Облік та інтерпретація результатів дослідження контролів

Контроль	Очікувані результати	Дії у випадку некоректних результатів
ПКА	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності, умови зберігання реактивів та правильність приготування реакційної суміші. Повторити дослідження починаючи з ЗТ-ПЛР-РЧ, за можливості використати нові реагенти
НКА	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ використовуючи нові реагенти
НКВ	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення Ct ≤ 30	Повторити дослідження починаючи з виділення РНК
ВПК	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення Ct ≤ 30	Якщо є підозра у пригніченні реакції, то необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатор зразку водою вільною від нуклеаз 1:10. Якщо результати дослідження ВПК залишаються некоректними, зразок вважають непридатним для дослідження. Некоректні результати ВПК можуть бути коли дослідний зразок містить високу концентрацію вірусу, внаслідок чого відбувається конкуренція за реагенти в результаті чого ВПК може не ампліфікуватися. За таких обставин зразок вважають позитивний і ніяких додаткових дій вживати не потрібно

Облік та інтерпретація результатів дослідження зразків

Результат	Інтерпретація та дії
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct $\leq$ 35	Зразок позитивний (виявлено РНК вірусу грипу типу А підтипу H5)
Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM	Зразок негативний (РНК вірусу грипу типу А підтипу H5 не виявлено)
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct між 36 та 40, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, значення Ct $\leq$ 30	Зразок сумнівний. Необхідно повторити дослідження починаючи з підготовки зразка та досліджувати його паралельно з уже виділеним зразком РНК, за можливості використати інший протокол дослідження
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct між 36 та 40, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, значення Ct $>$ 30	Необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатором зразку водою вільною від нуклеаз 1:10. У випадку повторення результатів дослідження, зразок вважають не придатним для дослідження. Потрібно повторно відібрати зразок

6.3. Визначення підтипу H7 вірусу грипу типу А

6.3.1 Протокол дослідження розроблений на основі SOP VIR 144 – ed. 00 – 04/21. Detection of Eurasian H7 Avian influenza virus by real-time RT-PCR (Slomka et al., 2009) референт лабораторії ЄС по ГП та хворобі Ньюкасла (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie). Протокол дослідження дає можливість виявляти євразійський штам вірусу грипу типу А підтипу H7, ампліфікуючи ділянку 4 сегмента РНК вірусу ГП, що кодує субодиницю HA2 підтипу H7 та екзогенний ВПК.

Реагенти:

- Вода вільна від нуклеаз;
- Буфер для ресуспендування олігонуклеотидів (TE pH 8.0);
- Набір OneStep RT-PCR Kit, Qiagen;
- Intype IC-RNA, Indical Bioscience – екзогенний ВПК, додається до кожного зразка, включаючи НКВ, на етапі виділення РНК, об'єм залежить від

кінцевого об'єму, який буде використаний для елюції, співвідношення повинно бути 1:10;

- $MgCl_2$ 25 mM;
- RNase Inhibitor 40 U/мкл.

Таблиця 18

Послідовність нуклеотидів праймерів та зондів

№ п/п	Назва праймера/ зонда	Послідовність нуклеотидів в праймері / зонді (5'→3')
1	LH6H7	5'-GGCCAGTATTAGAAACAACACCTATGA-3'
2	RH4H7	GCCCCGAAGCTAAACCAAAGTAT
3	H7pro11	FAM-CCGCTGCTTAGTTTGACTGGGTCAATCT-BHQ1
4	EGFP-11-F	CAG CCA CAA CGT CTA TAT CAT G
5	EGFP-2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G
6	EGFP-Cy5	Cy5-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ2

Таблиця 19

Приготування суміші праймерів та зонду для ампліфікації і виявлення ВПК (ВПК суміш)

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	TE pH 8.0	-	-	186,25
2	Прямий праймер EGFP-11-F	100 мкМ	2,5 мкМ	5,0
3	Зворотний праймер EGFP-2-R	100 мкМ	2,5 мкМ	5,0
4	Зонд EGFP-Cy5	100 мкМ	1,8 мкМ	3,75
Загальний об'єм суміші				200

Таблиця 20

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	11,625
2	Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	5X	1X	5,0
3	dNTP Mix	10 mM	0,4 mM	1,0
4	$MgCl_2$	25 mM	1,25 mM	1,25
5	Прямий праймер LH6H7	50 мкМ	0,4 мкМ	0,2
6	Зворотний праймер RH4H7	50 мкМ	0,4 мкМ	0,2
7	Зонд H7pro11	6 мкМ	0,15 мкМ	0,625
8	ВПК суміш	-	-	2,0
9	RNase Inhibitor	40 U	4 U	0,1
10	Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	-	-	1,0
Загальний об'єм суміші				23,0

До 23,0 мкл реакційної суміші додати 2,0 мкл досліджуваного зразку/контролю.

Параметри циклювання

	Етап	Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Зворотна транскрипція	50 °C - 30 хв	1
2. Утримування	Ініціалізація	95 °C - 15 хв	1
3. Циклювання	Денатурація	95 °C-10 с	40
	Відпал	54 °C- 30 с - детекція (FAM, Cy5)	
	Елонгація	72 °C-10 с	

Облік та інтерпретація результатів дослідження контролів

Контроль	Очікувані результати	Дії у випадку некоректних результатів
ПКА	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності, умови зберігання реактивів та правильність приготування реакційної суміші. Повторити дослідження починаючи з ЗТ-ПЛР-РЧ, за можливості використати нові реагенти
НКА	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ використовуючи нові реагенти
НКВ	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення Ct ≤ 30	Повторити дослідження починаючи з виділення РНК
ВПК	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення Ct ≤ 30	Якщо є підозра у пригніченні реакції, то необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатор зразку водою вільною від нуклеаз 1:10. Якщо результати дослідження ВПК залишаються некоректними, зразок вважають непридатним для дослідження. Некоректні результати ВПК можуть бути коли дослідний зразок містить високу концентрацію вірусу, внаслідок чого відбувається конкуренція за реагенти в результаті чого ВПК може не ампліфікуватися. За таких обставин зразок вважають позитивний і ніяких додаткових дій вживати не потрібно

Облік та інтерпретація результатів дослідження зразків

Результат	Інтерпретація та дії
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct $\leq$ 35	Зразок позитивний (виявлено РНК вірусу грипу типу А підтипу Н7)
Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM	Зразок негативний (РНК вірусу грипу типу А підтипу Н7 не виявлено)
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct між 36 та 40, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, значення Ct $\leq$ 30	Зразок сумнівний. Необхідно повторити дослідження починаючи з підготовки зразка та досліджувати його паралельно з уже виділеним зразком РНК, за можливості використати інший протокол дослідження
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct між 36 та 40, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, значення Ct $>$ 30	Необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатором зразку водою вільною від нуклеаз 1:10. У випадку повторення результатів дослідження, зразок вважають не придатним для дослідження. Потрібно повторно відібрати зразок

6.3.2 Протокол дослідження розроблений на основі SOP VIR 1001 – ed. 00 – 04/21. Detection of Eurasian H7 Avian influenza virus by real-time RT-PCR (Van Borm et al., 2010 модифікований Hoffmann et al., 2016) референт лабораторії ЄС по ГП та хворобі Ньюкасла (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie).

Протокол дослідження дає можливість виявляти євразійський штам вірусу грипу типу А підтипу Н7, ампліфікуючи ділянку 4 сегмента РНК вірусу ГП, що кодує субодиницю НА2 підтипу Н7.

Даним протоколом не передбачено використання ВПК, тому бажано використовувати ПЗ.

Реагенти:

- Вода вільна від нуклеаз;
- Буфер для ресуспендування олігонуклеотидів (TE pH 8.0);
- Набір QuantiTect Probe RT-PCR Kit, Qiagen;
- RNase Inhibitor 40 U/мкл.

Таблиця 24

Послідовність нуклеотидів праймерів та зондів

№ п/п	Назва праймера/ зонда	Послідовність нуклеотидів в праймері / зонді (5'→3')
1	FeurH7	GYA GYG GYT ACA AAG ATG TG
2	ReurH7	GAA GAC AAG GCC CAT TGC AA
3	IAV-HA7-CODA-FAM	FAM-TGG TTT AGC TTC GGG GCA TCA TG-BHQ1

Таблиця 25

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	7,15
2	2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	2X	1X	12,5
3	Прямий праймер FeurH7	20 мкМ	0,9 мкМ	1,25
4	Зворотний праймер ReurH7	20 мкМ	0,9 мкМ	1,25
5	Зонд IAV-HA7-CODA-FAM	10 мкМ	0,2 мкМ	0,5
6	RNase Inhibitor	40 U/мкл	4 U/мкл	0,1
7	QuantiTect RT Mix	-	-	0,25
Загальний об'єм суміші				23,0

До 23,0 мкл реакційної суміші додати 2 мкл досліджуваного зразку/контролю.

Таблиця 26

Параметри циклювання

Етап		Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Зворотна транскрипція	50 °C -30 хв	1
1. Утримування	Ініціалізація	95 °C -10 хв	1
2. Циклювання	Денатурація	95 °C-15 с	45
	Відпал	56 °C-33 с - детекція (FAM)	
	Елонгація	72 °C-10 с	

Таблиця 27

Облік та інтерпретація результатів дослідження контролів

Контроль	Очікувані результати	Дії у випадку некоректних результатів
ПКА	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності, умови зберігання реактивів та правильність приготування реакційної суміші. Повторити дослідження починаючи з ЗТ-ПЛР-РЧ, за можливості використати нові реагенти
НКА	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ використовуючи нові реагенти

НКВ	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з виділення РНК
ПЗ	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності та правильність розведення буферів набору для виділення РНК. Повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК

Таблиця 28

Облік та інтерпретація результатів дослідження зразків

Результат	Інтерпретація та дії
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct ≤ 36	Зразок позитивний (виявлено РНК вірусу грипу типу А підтипу Н7)
Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM	Зразок негативний (РНК вірусу грипу типу А підтипу Н7 не виявлено)
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct між 37 та 45	Зразок сумнівний. Необхідно повторити дослідження починаючи з підготовки зразка та досліджувати його паралельно з уже виділеним зразком РНК, за можливості використати інший протокол дослідження. Якщо є підозра у пригніченні реакції, то необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатор зразку водою вільною від нуклеаз 1:10

6.4. Визначення підтипу Н9 вірусу грипу типу А

Протокол дослідження розроблений на основі SOP VIR 014 – ed. 01 – 06/22. Detection of H9 Avian influenza virus by real-time RT-PCR (Panzarin et al., 2022) референт лабораторії ЄС по ГП та хворобі Ньюкасла (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie). Протокол дослідження дає можливість виявляти вірус грип типу А підтипу Н9, ампліфікуючи ділянку 4 сегмента РНК вірусу ГП, що кодує субодиницю НА2 підтипу Н9 та екзогенний ВПК.

Реагенти:

- Вода вільна від нуклеаз;
- Буфер для ресуспендування олігонуклеотидів (ТЕ рН 8.0);

- Intype IC-RNA, Indical Bioscience – екзогенний ВПК, додається до кожного зразка, включаючи НКВ, на етапі виділення РНК, об'єм залежить від кінцевого об'єму, який буде використаний для елюції РНК з колонки, під час виділення, співвідношення повинно бути 1:10;
- RNase Inhibitor 40 U/мкл
- Набір AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents, Applied Biosystems.

Таблиця 29

Послідовність нуклеотидів праймерів та зондів

№ п/п	Назва праймера/ зонда	Послідовність нуклеотидів в праймері / зонді (5'->3')
1	Pan-H9 for	ATR GGG TTT GCT GCC
2	Pan-H9 rev1	TCA TAT ACA AAT GTT GCA YCT G
3	Pan-H9 rev2	TTA TAT ACA GAT GTT GCA YCT G
4	Probe Pan-H9	FAM-TTC TGG GCY ATG TCH AAY GG-BHQ1
5	EGFP-11-F	CAG CCA CAA CGT CTA TAT CAT G
6	EGFP-2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G
7	EGFP-Cy5	Cy5-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ2

Таблиця 30

Приготування суміші праймерів та зонду для ампліфікації і виявлення ВПК (ВПК суміш)

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	ТЕ рН 8.0	-	-	186,25
2	Прямий праймер EGFP-11-F	100 мкМ	2,5 мкМ	5,0
3	Зворотний праймер EGFP-2-R	100 мкМ	2,5 мкМ	5,0
4	Зонд EGFP-Cy5	100 мкМ	1,8 мкМ	3,75
Загальний об'єм суміші				200

Таблиця 31

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	1,5
2	2X RT-PCR Buffer	2X	1X	12,5
3	Прямий праймер Pan-H9 for	10 мкМ	0,4 мкМ	1,0
4	Зворотний праймер Pan-H9 rev1	10 мкМ	0,2 мкМ	0,5
5	Зворотний праймер Pan-H9 rev2	10 мкМ	0,2 мкМ	0,5
8	Зонд Probe Pan-H9	10 мкМ	0,2 мкМ	0,5
9	ВПК суміш	-	-	2
10	RNase Inhibitor	40 U/мкл	20 U/мкл	0,5
11	25X RT-PCR Enzyme Mix	25X	1X	1
Загальний об'єм суміші				20,0

До 20,0 мкл реакційної суміші додати 5 мкл досліджуваного зразку/контролю.

Таблиця 32

Параметри циклювання

	Етап	Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Зворотна транскрипція	50 °C -10 хв	1
1. Утримування	Ініціалізація	95 °C -10 хв	1
2. Циклювання	Денатурація	95 °C-15 с	45
	Відпал	54 °C-30 с - детекція (FAM, Cy5)	
	Елонгація	72 °C-15 с	

Таблиця 33

Облік та інтерпретація результатів дослідження контролів

Контроль	Очікувані результати	Дії у випадку некоректних результатів
ПКА	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності, умови зберігання реактивів та правильність приготування реакційної суміші. Повторити дослідження починаючи з ЗТ-ПЛР-РЧ, за можливості використати нові реагенти
НКА	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ використовуючи нові реагенти
НКВ	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення Ct ≤ 30	Повторити дослідження починаючи з виділення РНК
ВПК	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і відповідно значення Ct, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення Ct ≤ 30	Якщо є підозра у пригніченні реакції, то необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатор зразку водою вільною від нуклеаз 1:10. Якщо результати дослідження ВПК залишаються некоректними, зразок вважають непридатним для дослідження. Некоректні результати ВПК можуть бути коли дослідний зразок містить високу концентрацію вірусу, внаслідок чого відбувається конкуренція за реагенти в результаті чого ВПК може не ампліфікуватися.

		За таких обставин зразок вважають позитивний і ніяких додаткових дій вживати не потрібно
--	--	--

Таблиця 34

Облік та інтерпретація результатів дослідження зразків

Результат	Інтерпретація та дії
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення $C_t \leq 36$	Зразок позитивний (виявлено РНК вірусу грипу типу А підтипу H9)
Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення $C_t \leq 30$	Зразок негативний (РНК вірусу грипу типу А підтипу H9 не виявлено)
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення C_t між 37 та 45, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, значення $C_t \leq 30$	Зразок сумнівний. Необхідно повторити дослідження починаючи з підготовки зразка та досліджувати його паралельно з уже виділеним зразком РНК, за можливості використати інший протокол дослідження
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення C_t між 37 та 40, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, значення $C_t > 30$	Необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатором зразку водою вільною від нуклеаз 1:10. У випадку повторення результатів дослідження, зразок вважають не придатним для дослідження. Потрібно повторно відібрати зразок

6.5. Визначення підтипів H1-H8, H10-H16 вірусу грипу типу А

Протокол дослідження розроблений на основі VIR 1004 – ed. 00 – 04/21. NA and NA subtyping of Avian influenza virus by real-time RT-PCR (Hoffmann et al., 2016; James et al., 2018) референт лабораторії ЄС по ГП та хворобі Ньюкасла (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie).

Реагенти:

- Вода вільна від нуклеаз;
- Буфер для ресуспендування олігонуклеотидів (TE pH 8.0);
- Intype IC-RNA, Indical Bioscience – екзогенний ВПК, додається до кожного зразка, включаючи НКВ, на етапі виділення РНК, об'єм залежить від кінцевого об'єму, який буде використаний для елюції РНК з колонки, під час виділення, співвідношення повинно бути 1:10;
- Набір AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents, Applied Biosystems;

- Послідовність нуклеотидів праймерів та зондів (таблиця 35).

Приготування суміші праймерів. Суміш праймерів та зондів можна готувати заздалегідь з використанням ТЕ рН 8,0 і зберігати при температурі мінус 20 °С. Кінцеві концентрації кожного олігонуклеотиду в реакційній суміші зазначені в таблиці 35.

Таблиця 35

Приготування суміші праймерів та зондів

Нх	Назва праймера, зонда	Послідовність праймера, зонда 5'→3'	мкл в суміші	Конц. в реакційній суміші
H1	H1-F1	CCA TCT GTA TAG GCT AYC AT	20	0,8 мкМ
	H1-F2	AAA CAT YCC TTC CRT TCA ATC	20	0,8 мкМ
	H1-FAM1	FAM-TAC AGA CAC TGT YGA CAC DGT GCT-BHQ1	5	0,2 мкМ
	H1-FAM2	FAM-TTC ATT GAA GGR GGR TGG ACA GGA AT-BHQ1	5	0,2 мкМ
	H1-R1	GTG AGT CAC RGT YAC ATT CTT	20	0,8 мкМ
	H1-R2	GAG CAA GGI TCY GGT TAT G	20	0,8 мкМ
	TE pH 8,0		110	-
H2	H2-F	CTA AST GTR CCW GAA TGG TC	40	1,6 мкМ
	H2-R	GAG GTG TTT CAR TTC YTC RTA	40	1,6 мкМ
	H2-FAM	FAM-TGT GCT ACC CAG GYA GTT TCA ATG A-BHQ1	8	0,32 мкМ
	TE pH 8,0		112	-
H3	H3-F1	CCT CGR GGC TAY TTC AAR AT	15	0,6 мкМ
	H3-F2	AGA CTG GAT CYT RTG GAT TTC	15	0,6 мкМ
	H3-F3	CTG GGR CAC CAT GCA GT	15	0,6 мкМ
	H3-FAM1	FAM-TGC ATC TGA YCT CAT TAT YGA RCT TTT-BHQ1	4	0,16 мкМ
	H3-FAM2	FAM-ACR CAA AGC AAA AAG CAT GAT ATG GC-BHQ1	4	0,16 мкМ
	H3-FAM3	FAM-ACA GGG AAA ATA TGC ARC AAT CCY CA-BHQ1	4	0,16 мкМ
	H3-R1	ATT TGG RGT GAT RCA TTC AGA	15	0,6 мкМ
	H3-R2	CTC AAA TGC AAA TGK TGC AYC	15	0,6 мкМ
	H3-R3	TGT GCA GTC YCT TCC ATC	15	0,6 мкМ
	TE pH 8,0		98	-
H4	H4-F1	ACY CAG GGR TAC AAG GAC A	20	0,8 мкМ
	H4-F2	GGA CAT CAT YCT YTG GAT TTC	20	0,8 мкМ
	H4-FAM	FAM-TCC ATA TCA TGC TTY TTG CTY GTA GC-BHQ1	4	0,16 мкМ
	H4-R	CAA GCC CAC AAA AYR AAG G	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		116	-
H5	H5-HA1-F	GAT TYT AAA RGA TTG TAG YGT AGC	20	0,8 мкМ
	H5-FAM3-RC	FAM-CGC ACA TTG GRT TYC CRA GGA GCC-BHQ1	6	0,24 мкМ
	H5-HA1-R1	CTC TCY ACC ATG TAR GAC CA	15	0,6 мкМ
	H5-HA1-R2	CTC TCY ACT ATG TAR GAC CA	15	0,6 мкМ
	H5-F2	GTT CCC TAG YAY TGG CAA TCA T	20	0,8 мкМ
	H5-FAM2	FAM-CTG GTC TAT YYT TRT GGA TGT GCT CC-BHQ1	6	0,24 мкМ
	H5-R2	AAT TCT ARA TGC AAA TTC TGC AYT G	15	0,6 мкМ
	TE pH 8,0		103	-
H6	H6-F1	TTG GYG TGT ATC AAA TYC TTK C	20	0,8 мкМ

	H6-F2	TTG RCG TGT ATC AAA TAC TTG C	20	0,8 мкМ
	H6-FAM	FAM-AGR CTG CTC GAY ACC GTA CTA TAA A-BHQ1	10	0,4 мкМ
	H6-R	TTG ARC YAT TTG AAC ACA TCC A	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		110	-
H7	H7-F	CAA CTG AAA CRG TRG ARC G	45	1,8 мкМ
	H7-FAM	FAM-CCC AGG ATY TGC TCA ARA GGR AAA A-BHQ1	10	0,4 мкМ
	H7-R1	CAG GAG YCC ACA TTG ACC	15	0,6 мкМ
	H7-R2	CAG WAG YCC ACA TTG ACC	15	0,6 мкМ
	H7-R3	TTC TAG GAA TTG GTC ACA TTG	15	0,6 мкМ
	TE pH 8,0		100	-
H8	H8-F	CCA CCT AYA AAA TTC TCA GCA	40	1,6 мкМ
	H8-FAM	FAM-TGC CAA GCA RAG ACT GGC CGC CA-BHQ1	4	0,16 мкМ
	H8-R	ARA CCT CCA GCA AYC AGG A	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		116	-
H10	H10-F	CAA CTC AGR CAG AAT GCW GA	40	1,6 мкМ
	H10-FAM	FAM-TGC ATG GAG AGY ATA AGR AAC AAC AC-BHQ1	6	0,24 мкМ
	H10-R	CTT CYT CTC TGT AYT GTG AAT G	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		114	-
H11	H11-F	GGA CAT ATG AYC ACA ARG AAT T	40	1,6 мкМ
	H11-FAM	FAM-ACT GTC RAT TTA CAG CTG CAT YGC A-BHQ1	8	0,32 мкМ
	H11-R	ATG CAA ATG GTA CAT CTA CAT G	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		112	-
H12	H12-F	CAT CTA CAG CAG YGT YGC	40	1,6 мкМ
	H12-FAM	FAM-ACT GCT CAT GAT TAT TGG GGG TTT CA-BHQ1	12	0,48 мкМ
	H12-R	GAA AGT ACA ACG AAC ATT TCC A	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		108	-
H13	H13-F1	CTT AAG CAC AAA CTC ATC AGA A	20	0,8 мкМ
	H13-F2	CTG AGC ACC AAT TCA TCA GA	20	0,8 мкМ
	H13-FAM1	FAM-CKA ACC ACA CRG GAA CAT AYT GTT C-BHQ1	5	0,2 мкМ
	H13-FAM2	FAM-CAC ACI GGA ACA TWC TGT TCA ATC A-BHQ1	5	0,2 мкМ
	H13-R1	CTG GCA CAG GCA GGG TT	20	0,8 мкМ
	H13-R2	CCY ACA ATC CAT CCT TCA AA	20	0,8 мкМ
	TE pH 8,0		105	-
H14	H14-F	CCC AAT ATA GGA AGT AGA CC	40	1,6 мкМ
	H14-HEX	HEX-AAG CAT CTA CTG GAC YCT AGT AAA CC-BHQ1	6	0,24 мкМ
	H14-R	CTT CTT GTC ACT TYT AAG CAC	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		114	-
H15	H15-F	CAS CTT TCT CCG CTC TAA TG	40	1,6 мкМ
	H15-FAM	FAM-CAC TGG GAA TAC AGA GTG ATG CAC AA-BHQ1	3	0,12 мкМ
	H15-R	AAR CAT TCC CCT TCA CAT GA	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		117	-
H16	H16-F	ARY TGA AGA CTG AAG ACA ATG T	40	1,6 мкМ
	H16-HEX	HEX-CTG GTA GGW CTC ATA CTY GCA TTT AT-BHQ1	6	0,24 мкМ
	H16-R	CCA CTG CTG CAT GCC CA	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		114	-
BHK	EGFP-11-F	CAG CCA CAA CGT CTA TAT CAT G	5	0,2 мкМ
	EGFP-Cy5	Cy5-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ2	3,75	0,15 мкМ
	EGFP-2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G	5	0,2 мкМ
	TE pH 8,0		186,25	-

Таблиця 36

Приготування суміші праймерів та зонду для ампліфікації і виявлення ВПК (ВПК суміш)

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	ТЕ рН 8.0	-	-	186,25
2	Прямий праймер EGFP-11-F	100 мкМ	2,5 мкМ	5,0
3	Зворотний праймер EGFP-2-R	100 мкМ	2,5 мкМ	5,0
4	Зонд EGFP-Су5	100 мкМ	1,8 мкМ	3,75
Загальний об'єм суміші				200

Таблиця 37

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	2,5
2	2X RT-PCR Buffer	2X	1X	12,5
3	Суміш праймерів і зонду (таб. 35)	-	-	1,0
4	ВПК суміш	-	-	1
5	25X RT-PCR Enzyme Mix	25X	1X	1,0
Загальний об'єм суміші				20,0

До 20,0 мкл реакційної суміші додати 5 мкл досліджуваного зразку/контролю.

Таблиця 38

Параметри циклювання

	Етап	Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Зворотна транскрипція	45 °C -10 хв	1
2. Утримування	Ініціалізація	95 °C -10 хв	1
3. Циклювання	Денатурація	95 °C-15с	45
	Відпал	56,5 °C-20 с - детекція (FAM/HEX)	
	Елонгація	72 °C-30 с	

Таблиця 39

Облік та інтерпретація результатів дослідження контролів

Контроль	Очікувані результати	Дії у випадку некоректних результатів
ПКА	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності, умови зберігання реактивів та правильність приготування реакційної суміші. Повторити дослідження починаючи з ЗТ-ПЛР-РЧ, за можливості використати нові реагенти
НКА	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ використовуючи нові реагенти

НКВ	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX і відповідно значення Ct, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення $Ct \leq 30$	Повторити дослідження починаючи з виділення РНК
ВПК	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX і відповідно значення Ct, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення $Ct \leq 30$	Якщо є підозра у пригніченні реакції, то необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатор зразку водою вільною від нуклеаз 1:10. Якщо результати дослідження ВПК залишаються некоректними, зразок вважають непридатним для дослідження. Некоректні результати ВПК можуть бути коли дослідний зразок містить високу концентрацію вірусу, внаслідок чого відбувається конкуренція за реагенти в результаті чого ВПК може не ампліфікуватися. За таких обставин зразок вважають позитивний і ніяких додаткових дій вживати не потрібно

Таблиця 40

Облік та інтерпретація результатів дослідження зразків

Результат	Інтерпретація та дії
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX, графік правильної форми, значення $Ct \leq 36$	Зразок позитивний
Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення $Ct \leq 30$	Зразок негативний
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX, графік правильної форми, значення Ct між 37 та 45, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, значення $Ct \leq 30$	Зразок сумнівний. Необхідно повторити дослідження починаючи з підготовки зразка та досліджувати його паралельно з уже виділеним зразком РНК, за можливості використати інший протокол дослідження
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct між 37 та 40, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, значення $Ct > 30$	Необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши

	гомогенізувати зразок водою вільною від нуклеаз 1:10. У випадку повторення результатів дослідження, зразок вважають не придатним для дослідження. Потрібно повторно відібрати зразок
--	--

6.6. Визначення підтипів N1-N9 вірусу грипу типу А

Протокол дослідження розроблений на основі VIR 1004 – ed. 00 – 04/21. HA and NA subtyping of Avian influenza virus by real-time RT-PCR (Hoffmann et al., 2016; James et al., 2018) референт лабораторії ЄС по ГП та хворобі Ньюкасла (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie).

Метод ЗТ-ПЛР-РЧ для виявлення нейрамінідаз вірусу грипу типу А, з використання праймерів специфічних до ділянки сегмента 6 NA.

Реагенти:

- Вода вільна від нуклеаз;
- Буфер для ресуспендування олігонуклеотидів (TE pH 8.0);
- Intype IC-RNA, Indical Bioscience – екзогенний ВПК, додається до кожного зразка, включаючи НКВ, на етапі виділення РНК, об'єм залежить від кінцевого об'єму, який буде використаний для елюції РНК з колонки, під час виділення, співвідношення повинно бути 1:10;
- Набір AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents, Applied Biosystems;
- Послідовність нуклеотидів праймерів та зондів (таблиця 41).

Приготування суміші праймерів. Суміш праймерів можна готувати заздалегідь з використанням TE pH 8,0 і зберігати при температурі мінус 20 °С. Кінцеві концентрації кожного олігонуклеотиду в реакційній суміші зазначені в таблиці 41.

Таблиця 41

Приготування суміші праймерів та зондів

Nx	Назва праймера, зонда	Послідовність праймера, зонда 5'->3'	мкл в суміші	Конц. в реакційній суміші
N1	N1-F	GRC CTT GYT TCT GGG TKG A	40	1,6 мкМ
	N1-FAM	FAM-CAA TYT GGA CYA GTG GRA GYA GCA T-BHQ1	6	0,24 мкМ
	N1-R	ACC GTC TGG CCA AGA CCA	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		114	-
N2	N2-1367F	AGT CTG GTG GAC YTC AAA YAG	60	2,4 мкМ

	N2-1444.1 FAM-MGB	FAM-CCA TCA GGC CAT GAG CCT-MGB	10	0,4 мкМ
	N2-1488R	AAT TGC GAA AGC TTA TAT AGV CAT	60	2,4 мкМ
	TE pH 8,0		70	-
N3	N3-F	GCA AYA GTA TAG TTA CYT TCT G	40	1,6 мкМ
	N3-FAM	FAM-AGA CAA TGA ACC TGG ATC GGG VAA-BHQ1	3	0,12 мкМ
	N3-R1	TTA CTT GGG CAT RAA CCC AAT	20	0,8 мкМ
	N3-R2	GTT GGM ACC RTC WGG CCA	20	0,8 мкМ
	TE pH 8,0		117	-
N4	N4-F1	GAC TAG YGG TAG TAG YAT TGC	20	0,8 мкМ
	N4-F2	AGT AGY ATT GCR TTY TGT GGT GTT	20	0,8 мкМ
	N4-HEX	HEX-TGG TCR TGG CCY GAT GGC GCT CT-BHQ1	6	0,24 мкМ
	N4-R	CGA AAA ATY ACT TGT CTA TGT CAA	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		114	-
N5 (a)	N5-F1	CCT TCA GAA TGC AGR ACY TT	20	0,8 мкМ
	N5-F2	CAA ATA ATA CAG TAA ARG ACA GAA G	20	0,8 мкМ
	N5-HEX	HEX-TAA TGA GCG TRC CAT TGG GAT CCT C-BHQ1	6	0,24 мкМ
	N5-R	TAG CAG ACC AYC CRA CGG A	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		114	-
N5 (b)	Mod-N5-1353F	TTC CAC TGT GTT TTG TGG KGT	15	0,6 мкМ
	Mod-N5-1375 FAM	FAM-TCY AGT GAG GTC CCA GGA TGG TC-BHQ1	10	0,4 мкМ
	Mod-N5-1426R	CGA ATG GTA GAA TTG CTC CAT CA	15	0,6 мкМ
	TE pH 8,0		160	-
N6	Mod-N6-10F	AGG GTG AAA ATG AAT CCA AAT CA	40	1,6 мкМ
	Mod-N6-14F	TGA AAA TGA ATC CAA ATC ARA AGR TAA	40	1,6 мкМ
	Mod-N6-43 FAM	FAM-TGC RTT TCA GCM ACA GGA RTR ACA CTA TC-BHQ1	10	0,4 мкМ
	Mod-N6-97R	AAT TCC TAT YAG CAG RCT TAC YAC	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		70	-
N7 (a)	N7-F1 ⁸	GTT GAA TTA ATW AGA GGA AGR CC	20	0,8 мкМ
	N7-F2	AGA GGC YAA ATA YGT RTG GTG	20	0,8 мкМ
	N7-FAM	FAM-CCT ATG TGG RAG CCC ATT CCC AGT-BHQ1	3	0,12 мкМ
	N7-R	GAT YTG TGC CCC ATC RGG GA	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		117	
N7 (b)	Mod-N7-1305F	GTT GAA TTR ATT AGA GGR AGR CC	40	1,6 мкМ
	IAV-N7-1383FAM	FAM-AGC CCA DTC YCA GTT GGG TCY GGT TC-BHQ1	10	0,4 мкМ
	IAV-N7-1430R	GAT YTG TGC CCC ATC RGG GA	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		110	-
N8 (a)	N8-F1	TCC ATG YTT TTG GGT TGA RAT GAT	15	0,6 мкМ
	N8-F2	CTG ATC TCT CTT ACA GGG TTG	15	0,6 мкМ
	N8-F3	TCC ATG YTT TTG GGT IGA AAY GAT	15	0,6 мкМ
	N8-FAM1	FAM-TCH AGY AGC TCC ATT GTR ATG TGT GGA GT-BHQ1	6	0,24 мкМ
	N8-FAM2	FAM-TGC CCA GTG ACA CTC CAA GAG GGG AA-BHQ1	6	0,24 мкМ
	N8-R1	GCT CCA TCR TGC CAY GAC CA	20	0,8 мкМ
	N8-R2	GTG CAT GAA CCG ACA AAT TGA G	20	0,8 мкМ
	TE pH 8,0		103	-

N8 (b)	Mod-N8-1296F	YCC CTG YTT TTG GGT CGA AAT GAT	20	0,8 мкМ
	Mod-N8-1354FAM	FAM-TCT AGT AGC TCC ATT GTA ATG TGT GGA GT-BHQ1	10	0,4 мкМ
	Mod-N8-1423 R	GCT CCA TCG TGC CAT GAC CA	20	0,8 мкМ
	TE pH 8,0		150	-
N9 (a)	IAV-N9-1363F	AGY ATA GTA TCR ATG TGT TCC AG	40	1,6 мкМ
	IAV-N9-1393FAM	FAM-TTC CTB GGA CAA TGG AAC TGG CC-BHQ1	10	0,4 мкМ
	Mod-N9-1439R	AAG TAC TCT ATT YTA GCC CCR TC	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		110	-
N9 (b)	N9-F	AGY ATA GTA TCR ATG TGT TCC AG	40	1,6 мкМ
	N9-FAM	FAM-TTC CTR GGA CAA TGG RAC TGG CC-BHQ1	3	0,12 мкМ
	N9-R	GTA CTC TAT TYT AGC CCC RTC	40	1,6 мкМ
	TE pH 8,0		117	
ВПК	EGFP-11-F	CAG CCA CAA CGT CTA TAT CAT G	5	0,2 мкМ
	EGFP-Cy5	Cy5-AGC ACC CAG TCC GCC CTG AGC A-BHQ2	3,75	0,15 мкМ
	EGFP-2-R	GAA CTC CAG CAG GAC CAT G	5	0,2 мкМ
	TE pH 8,0		186,25	-

Таблиця 42

Приготування суміші праймерів та зонду для ампліфікації і виявлення ВПК (ВПК суміш)

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	TE pH 8.0	-	-	186,25
2	Прямий праймер EGFP-11-F	100 мкМ	2,5 мкМ	5,0
3	Зворотний праймер EGFP-2-R	100 мкМ	2,5 мкМ	5,0
4	Зонд EGFP-Cy5	100 мкМ	1,8 мкМ	3,75
Загальний об'єм суміші				200

Таблиця 43

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	2,5
2	2X RT-PCR Buffer	2X	1X	12,5
3	Суміш праймерів і зонду (таб. 41)	-	-	1,0
4	ВПК суміш			1
5	25X RT-PCR Enzyme Mix	25X	1X	1,0
Загальний об'єм суміші				20,0

До 20,0 мкл реакційної суміші додати 5 мкл досліджуваного зразку/контролю.

Таблиця 44

Параметри циклювання

	Етап	Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Зворотна транскрипція	45 °C -10 хв.	1
2. Утримування	Ініціалізація	95 °C -10 хв.	1
3. Циклювання	Денатурація	95 °C-15с.	45
	Відпал	56,5 °C-20с. - детекція (FAM/HEX)	
	Елонгація	72 °C-30с.	

Таблиця 45

Облік та інтерпретація результатів дослідження контролів

Контроль	Очікувані результати	Дії у випадку некоректних результатів
ПКА	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX, графік правильної форми, очікуване значення Ct	Перевірити термін придатності, умови зберігання реактивів та правильність приготування реакційної суміші. Повторити дослідження починаючи з ЗТ-ПЛР-РЧ, за можливості використати нові реагенти
НКА	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ використовуючи нові реагенти.
НКВ	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX і відповідно значення Ct, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення Ct ≤ 30	Повторити дослідження починаючи з виділення РНК
ВПК	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX і відповідно значення Ct, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення Ct ≤ 30	Якщо є підозра у пригніченні реакції, то необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатор зразку водою вільною від нуклеаз 1:10. Якщо результати дослідження ВПК залишаються некоректними, зразок вважають непридатним для дослідження. Некоректні результати ВПК можуть бути коли дослідний зразок містить високу концентрацію вірусу, внаслідок чого відбувається конкуренція за реагенти в результаті чого ВПК може не ампліфікуватися. За таких обставин зразок вважають позитивний і ніяких додаткових дій вживати не потрібно

Облік та інтерпретація результатів дослідження зразків

Результат	Інтерпретація та дії
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX, графік правильної форми, значення $Ct \leq 36$	Зразок позитивний
Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення $Ct \leq 30$	Зразок негативний
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/HEX, графік правильної форми, значення Ct між 37 та 45, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, значення $Ct \leq 30$	Зразок сумнівний. Необхідно повторити дослідження починаючи з підготовки зразка та досліджувати його паралельно з уже виділеним зразком РНК, за можливості використати інший протокол дослідження
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM, графік правильної форми, значення Ct між 37 та 40, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, значення $Ct > 30$	Необхідно розвести виділений зразок РНК водою вільною від нуклеаз 1:10 і повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ або повторити дослідження починаючи з етапу виділення РНК розвівши гомогенізатор зразку водою вільною від нуклеаз 1:10. У випадку повторення результатів дослідження, зразок вважають не придатним для дослідження. Потрібно повторно відібрати зразок

7. ВИЗНАЧЕННЯ ПАТОГЕННОСТІ ВІРУСІВ ГРИПУ ТИПУ А СУБТИПІВ H5 ТА H7 СЕКВЕНУВАННЯМ МЕТОДОМ СЕНГЕРА

Визначення патогенності вірусів ГП типу А субтипів H5 та H7 проводиться шляхом секвенування ділянки РНК вірусу, яка кодує НА, методом Сенгера з подальшою конвертацією послідовності нуклеотидів в послідовність амінокислот. По послідовності амінокислот в місці розщеплення НА визначається патогенність вірусу ГП.

В основі принципу секвенування методом Сенгера (метод термінуючих нуклеотидів) лежить принцип ферментативного синтезу комплементарного ланцюга ДНК по існуючій одноланцюговій матриці з його блокуванням в різних місцях ддНТФ. В результаті чого утворюється велика кількість фрагментів кДНК, які відрізняються між собою довжиною в 1 нуклеотид.

Процес секвенування складається з наступних етапів:

1. Виділення РНК з досліджуваного матеріалу;
2. Накопичення фрагменту кДНК, який буде секвеновано;
3. Проведення електрофорезу;
4. Виділення кДНК з агарозного гелю або очищення ПЛР продукту;
5. Вимірювання концентрації кДНК і оцінка чистоти розчину уДНК;
6. Проведення секвенувальної ПЛР;
7. Очищення ПЛР продукту;
8. Проведення капілярного електрофорезу.

ЕТАП 1. Виділення РНК з досліджуваного матеріалу проводять згідно розділу 5.

ЕТАП 2. Накопичення фрагменту кДНК, який буде секвеновано

Даний етап проводиться в ЗОНІ 3 кімната для приготування реакційної суміші та виділення НК.

Для накопичення фрагменту РНК необхідно провести етап зворотної транскрипції для переведення РНК в комплементарну ДНК (кДНК), яка придатна для проведення подальшого її накопичення методом ПЛР.

Накопичення фрагменту кДНК, який буде секвеновано, необхідно для подальшого проведення секвенувальної ПЛР, з метою отримання фрагментів кДНК, які будуть відрізнятися довжиною в 1 нуклеотид. З цією метою проводять звичайну ПЛР.

Таблиця 47

**Послідовність праймерів, які використовуються для накопичення
фрагменту РНК методом ПЛР**

Назва праймера	Послідовність	Довжина фрагменту
Н5		
H5-kha-1	CCT CCA GAR TAT GCM TAY AAA ATT GTC	300-320 п.н.
H5-kha-3	TAC CAA CCG TCT ACC ATK CCY TG	
Н7		
GK7.3	ATGTCC GAG ATA TGT TAA GCA	200-220 п.н.
GK7.4	TTT GTAATC TGC AGC AGT TC	

Таблиця 48

Приготування реакційної суміші для накопичення фрагменту НК

Назва реагенту	Кінцева концентрація	Кількість (мкл) на 1 реакцію (50 мкл)
RNase-free water	-	14,3
Qiagen OneStep RT-PCR Buffer	1×	5
dNTPs Mix	0,4 мМ	1
Forward primer: 50 pmol/μl (50мкМ)	1мкМ	0,5
Reverse primer: 50 pmol/μl (50мкМ)	1мкМ	0,5
RNase Inhibitor 40U/μl (Promega)	8U	0,2
One Step RT-PCR Enzyme Mix (Qiagen kit)		1
Об'єм реакційної суміші		22,5
Об'єм досліджуваного зразка		2,5
Загальний об'єм		25

Таблиця 49

Параметри ампліфікації

Праймери: H5-kha-1/H5-kha-3			Праймери: GK7.3/ GK7.4		
Етап	Режим (температура, час)		Етап	Режим (температура, час)	
1. Утримування	50 °С -30 хв		1. Утримування	50 °С - 30 хв	
2. Утримування	94 °С -15 хв		2. Утримування	94 °С - 15 хв	
3. Циклювання	94 °С - 30с	40 циклів	3. Циклювання	94 °С - 45 с	40 циклів
	58 °С - 1 хв			52 °С - 45 с	
	68 °С 1 хв			68 °С 1 хв	
4.Утримування	68 °С 7 хв		4.Утримування	68 °С 7 хв	
Охолодження	4 °С - ∞		Охолодження	4 °С - ∞	

Для проведення звичайної ПЛР використовують відповідні праймера, які будуть обмежувати ділянку кДНК, яку буде секвеновано та універсальний мастермікс OneStep RT-PCR Kit, Qiagen.

ЕТАП 3. Проведення електрофорезу

Даний етап проводиться в ЗОНІ 4 Кімната для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР, проведення секвенування НК.

Метою даного етапу є підтвердження того, що ПЛР пройшла належним чином і відбулося накопичення специфічного, завідомо відомої довжини фрагменту кДНК, а також виявлення ампліфікації неспецифічних фрагментів кДНК. Електрофорез проводять в 2% агарозному гелі з використанням відповідних ДНК маркерів.

ЕТАП 4. Виділення кДНК з агарозного гелю або очищення ПЛР продукту

Даний етап проводиться в ЗОНІ 4 Електрофоретичного аналізу продуктів

ПЛР, проведення секвенування НК.

У випадку коли в агарозному гелі виявляють окрім ампліфікованих специфічних фрагментів (довжина ампліфікованих фрагментів кДНК відповідає очікуваній довжині) виявляють також ампліфікацію неспецифічних фрагментів кДНК, то з агарозного гелю вирізають лише специфічні фрагменти кДНК і проводять їх очищення. У випадку коли виявляють лише специфічні фрагменти кДНК, то проводять очищення реакційної суміші.

Очищення фрагменту кДНК з агарозного гелю та ПЛР реакції проводять за допомогою використання комерційних наборів згідно інструкції до набору.

Метою даного етапу є очищення розчину кДНК від компонентів, які можуть негативно впливати на проведення секвенувальної ПЛР (праймерів, димерів праймерів, нуклеотидів, залишків агарози, інтеркалюючих барвників, детергентів (Твін), добавок (бетаїн)). Очищення розчину кДНК складається з наступних етапів:

- розчинення агарози;
- адсорбція кДНК (зв'язування кДНК адсорбуючою речовиною, яка може знаходитися у вигляді суспензії, мембрани фільтрувальних колонок чи на поверхні магнітних частинок в залежності від набору, який використовується для очищення),
- відмивання (відмивання адсорбуючої речовини від вище перерахованих компонентів, які також можуть зв'язуватися з адсорбуючою речовиною).
- елюція (відокремлення кДНК від адсорбуючої речовини і перехід кДНК в розчин).

ЕТАП 5. Вимірювання концентрації кДНК і оцінка чистоти розчину кДНК.

Даний етап проводиться в ЗОНІ 4 кімната для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР, проведення секвенування НК.

Вимірюють концентрацію кДНК за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 260 нм.

Ступінь чистоти розчину кДНК визначають за співвідношенням величини

поглинання дослідним зразком за довжини хвилі 260 нм до величини поглинання дослідним зразком за довжини хвилі 280 нм. Величина даного співвідношення повинна бути в межах від 1,8 до 2,0. Нижче значення цього співвідношення вказує на забруднення дослідного зразку білками або іншими органічними речовинами.

ЕТАП 6. Проведення секвенувальної ПЛР

Даний етап проводиться в ЗОНІ 4 кімната для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР, проведення секвенування НК.

Метою даного етапу є накопичення фрагментів кДНК, які будуть відрізнятися довжиною в один нуклеотид і які будуть мічені певним барвником. Це досягається шляхом застосування суміші, в певному співвідношенні, звичайних дНТФ з ддНТФ у яких в 3' положенні пентозного кільця відсутня гідроксильна група внаслідок чого полімераза не може приєднати наступний дНТФ і відбувається зупинка синтезу комплементарного ланцюга кДНК. Під час синтезу кДНК ддНТФ приєднуються по принципу випадковості, внаслідок цього утворюються фрагменти кДНК різної довжини.

Для виявлення фрагментів і встановлення яким ддНТФ синтез кДНК був зупинений використовують мічення ддНТФ флуоресцентними барвниками. Кожний тип ддНТФ мічений специфічним флуорофором, довжина хвилі флуоресценції якого не перекриваються або перекриваються на незначному діапазоні з флуорофорами, якими мічено інші ддНТФ.

Для кожного дослідного зразку проводять секвенування з прямим і зворотнім праймерами. Таким чином отримуємо мічені фрагменти ДНК різної довжини, при цьому кожен фрагмент, синтез якого зупинено певним типом ддНТФ мічений специфічним для даного типу ддНТФ флуорофором.

Приготувати реакційну суміші для проведення секвенувальної ПЛР згідно інструкції до BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit, Applied Biosystems.

На кожний зразок готують і маркують 2 пробірки об'ємом 0,2 см³. В першій пробірці готують реакційну суміші для проведення секвенувальної ПЛР

з прямим (форвард) праймером; в другій пробірці – зі зворотним (реверс) праймером. Для отримання належної кількості фрагментів кДНК і достатнього рівня флуоресценції при проведенні капілярного електрофорезу і достовірного визначення послідовності нуклеотидів для проведення секвенувальної ПЛР необхідно довести концентрацію кДНК до 3-10нг/мкл.

Таблиця 50

Реакційна суміш для проведення секвенувальної ПЛР

Форвард реакція		Реверс реакція	
Праймер (3,2pmol)	1 мкл	Праймер (3,2pmol)	1 мкл
BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл	BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix	8 мкл
Вода вільна від нуклеаз	10 мкл	Вода вільна від нуклеаз	10 мкл
Зразок РНК	1 мкл	Зразок РНК	1 мкл
Загальний об'єм	20 мкл	Загальний об'єм	20 мкл

ЕТАП 7. Очищення ПЛР продукту після секвенувальної ПЛР

Даний етап проводиться в ЗОНІ 4 кімната для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР, проведення секвенування НК.

Метою даного етапу є очищення розчину кДНК від компонентів, які можуть негативно впливати на якість проведення капілярного електрофорезу (мічених нуклеотидів, солей).

Проводити очищення продукту секвенувальної ПЛР від невикористаних дНТФ, мічених ддНТФ та іонів солей можна за допомогою використання комерційних наборів, зокрема набору BigDye XTerminator purification kit, Applied Biosystems.

Очищення розчину кДНК складається з наступних етапів:

- адсорбція кДНК (зв'язування кДНК адсорбуючою речовиною, яка може знаходитися у вигляді суспензії, мембрани фільтрувальних колонок чи на поверхні магнітних частинок в залежності від набору, який використовується для очищення);
- відмивання (відмивання адсорбуючої речовини від вище перерахованих речовин, які також можуть зв'язуватися з адсорбуючою речовиною);
- елюція (відокремлення кДНК від адсорбуючої речовини і перехід кДНК

в розчин).

ЕТАП 8. Проведення капілярного електрофорезу і визначення нуклеотидної послідовності кДНК

Даний етап проводиться в ЗОНІ 4 кімната для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР, проведення секвенування НК.

Для встановлення послідовності нуклеотидів кДНК проводять капілярний електрофорез за допомогою генетичного аналізатора, який дає можливість розділити фрагменти кДНК, які відрізняються між собою довжиною в один нуклеотид. Суть процесу полягає в тому, що під дією постійного електричного струму фрагменти кДНК різної довжини рухаються по капіляру заповненому полімером з різною швидкістю. Коротші фрагменти кДНК рухаються швидше, довші – повільніше. При проходженні камери зчитування лазер збуджує флуорофори, якими мічені фрагменти і відбувається детекція певної довжини хвилі, програмне забезпечення генетичного аналізатора переводить довжину хвилі, яку детектує прилад у відповідний нуклеотид. Таким чином встановлюється послідовність нуклеотидів всього фрагменту.

За допомогою програми blastx переводять послідовність нуклеотидів в послідовність амінокислот.

Порівняти отриману послідовність амінокислот в місці розщеплення НА з послідовністю амінокислот в таблиці і визначити патогенність вірусу грипу птиці (Вірус грипу птиці вважається високопатогенним, якщо в місці розщеплення НА знаходить багато амінокислот таких як аргінін (R) або лізин (K). Більшість високопатогенних вірусів грипу птиці мають наступну послідовність амінокислот в місці розщеплення ГА R-X-R/K-R-G) (X - може бути будь-яка амінокислота), хоча бувають виключення. Місце розщеплення ГА починається з проліну (P) і закінчується RGLF.

Послідовність амінокислот в місці розщеплення НА, субтип Н5

Штам вірусу	Субтип	Послідовність амінокислот в місці розщеплення НА	Патогенність*
НПВГ Євразійського походження	H5N*	PQRET----- RGLF	-
A/turkey/Kfar Vitkin/71	H5N2	PQREA----- RGLF	-
A/turkey/Ramon/73	H5N2	PQREA----- RGLF	-
A/laughing gull/AK/296/75	H5N3	PSIGE----- RGLF	-
A/arctic tern/AK/300/75	H5N3	PSIGE----- RGLF	-
A/mallard/Alberta/271/88	H5N3	PEKQT----- RGLF	-
A/chicken/Italy/RA9097/98	H5N9	PQKET----- RGLF	-
A/chicken/Scotland/59	H5N1	PQRKK----- RGLF	+
A/tern/South Africa/61	H5N1	PQRETRRQKRGLF	+
A/turkey/Ontario/7732/66	H5N9	PQRRKK--RGLF	+
A/chicken/PA/1370/83	H5N2	PQKKK----- RGLF	+
A/duck/Ireland/113/83	H5N8	PQRKRKK--RGLF	+
A/turkey/Ireland/1378/83	H5N8	PQRKRKK--RGLF	+
A/turkey/England/91	H5N1	PQRKRKT--RGLF	+
A/chicken/Pueblo/94	H5N2	PQRKRKT--RGLF	+
A/chicken/Queretaro/20/95	H5N2	PQRKRKRKTRGLF	+
A/chicken/Puebla/8623-607/97	H5N2	PQRRKRKTRGLF PQRKRKRKTRGLF	+
A/chicken/Hong Kong/990/97, A/chicken/Thailand/04 та інших вірусів групи 2 підтипу H5N1	H5N1	PQRERRRKKRGLF	+
A/Hong Kong/156/97	H5N1	PQRETRRKKRGLF	+
A/Hong Kong/486/97	H5N1	PQRRRRKK-RGLF	+
A/poultry/Italy/97	H5N2	PQRRRKK-RGLF	+
A/chicken/Italy/1487/97	H5N2	PQRRKKR-RGLF	+
A/avian/Texas/04	H5N2	PQRKKRGLF	+
A/ostrich/ZA/N227/04	H5N2	PQREKRRKKRGLF	+
A/ostrich/SA/AI2114/11 A/ostrich/SA/AI2887/11	H5N2	PQRRKKRGLF PQRRRKRGLF	+
A/turkey/Turkey/1/05 та інших вірусів групи 2.2 підтипу H5N1	H5N1	PQGERRRKKRGLF	+
Спостерігається в деяких вірусів групи 2.3.4 підтипу H5N1 та групи 2.3.4.4 підтипу H5N8	H5N1 H5N8	PLRERRRKKRGLF	+
ВПВГП H5N8, які виявляли в диких птахів в 2017 в Великобританії	H5N8	PLRKKRRRKRGLF	+
Спостерігається в деяких вірусів групи 1	H5N1	PQREGRRKKRGLF	+

підтипу H5N1, які виявляли в 2009-2013 рр.			
Спостерігається в деяких вірусів групи 1 підтипу H5N1 2009-2016, які виявляли в 2009-2013 рр.	H5N1	PQREERRKKRGLF	+
Спостерігається в деяких вірусів групи 2.1 підтипу H5N1, які виявляли в 2009-2016 рр.	H5N1	PQRESRRKKGLF	+
Спостерігається в деяких вірусів груп 2.3.1, 2.3.2 та 2.3.3 підтипу H5N1, які виявляли в 2009-2013	H5N1	PQREERRRKRGLF	+
A/duck/Vietnam/18151/09 (група 2.3.2)	H5N1	PQREERRRRKRGLF	+
Спостерігається в деяких вірусів групи 7 вірусів підтипу H5N1, які виявляли в 2009-2013 рр.	H5N1	PQIEGRRRKRGLF	+
A/chicken/Israel/93/2015 (група 2.2.1)	H5N1	PQGEKRRKKRGLF	+
Спостерігається в деяких вірусів групи 2.2 підтипу H5N1, які виявляли в 2009-2016 рр.	H5N1	PQGEGRKKRGLF	+
A/chicken/Iraq/2016	H5N1	PQREKRRKRGLF	+
A/chicken/France/150169a/2015 A/duck/France/150233b/2015 A/duck/France/150236b/2015	H5N1 H5N2 H5N9	HQRRKRGLF	+
Спостерігається в деяких вірусів групи 4 підтипу H5N1, які виявляли в 2000-2008 рр.	H5N1	PQREIRRKKRGLF	+

Примітка. * Патогенність вірусу визначена шляхом визначення внутрішньовенозного індексу патогенності, (+) - ВІГП, (-) - НІГП

Таблиця 52

Послідовність амінокислот в місці розщеплення HA, субтип H7

Штам вірусу	Субтип	Послідовність амінокислот в місці розщеплення HA	Патогенність*
Американські штами вірусів	H7N*	PENPK ----- TRGLF	-
Американські та Євразійські шати вірусів	H7N*	PEIPK----- GRGLF	-
A/ruddy turnstone/NJ/65/85	H7N3	PEKPK ----- TRGLF	-
A/duck/OH/10/88	H7N8	PESPK ----- TRGLF	-
A/finch/CA/28710-8/93	H7N8	PEIPK----- ERGLF	-
A/pekin robin/CA/30412-5/94	H7N1	PEIPK---RRRGLF	-
A/FPV/Brescia/02	H7N1	PSKKR---KKRGLF	+
A/FPV/Dobson/27	H7N7	PELPK-KRRKRGLF	+
A/FPV/Dutch/27	H7N7	PPKKR---RKRGLF	+
A/FPV/Rostock/34	H7N1	PEPSK-KREKRGLF	+
A/FPV/Weybridge	H7N7	PELPK-KRRKRGLF	+
A/FPV/Egypt/45	H7N7	FSKKR---RKRGLF	+
A/turkey/England/63	H7N3	PETPK--RRRRGLF	+

A/chicken/Victoria/76	H7N7	PEIPK-KKEKRGLF	+
A/duck/Victoria/76	H7N7	PEIPK----- KRGLF	-
A/turkey/England/199/79	H7N7	PEIPK-KREKRGLF	+
A/chicken/Leipzig/79	H7N7	PEIPK--KKGRGLF	+
A/goose/Leipzig/192/79	H7N7	PEIPKRKKRGLF PEIPKKRKKRGLF PEIPKKKKKKRGLF	+
A/chicken/Victoria/1/85	H7N7	PEIPK-KREKRGLF	+
A/chicken/Queensland/94	H7N3	PEIPKRKRGLF	+
A/chicken/Pakistan/447/94	H7N3	PETPK-RKRKRGLF	+
A/chicken/Pakistan/547-99/95	H7N3	PETPK--RRNRGLF	+
A/chicken/Pakistan/1369/95	H7N3	PETPK--RRKRGLF	+
A/chicken/New South Wales/2/97	H7N4	PEIPRRRKRGLF	+
A/Teal/Taiwan/19. 2-37-2/98	H7N1	PEIPK-GRGLF	-
A/poultry/Italy/1999	H7N1	PEIPKGSRVRRGLF PEIPKGSRMRRGLF PEIPKRSRVRRGLF	+
Italy/7159-V02/02	H7N3	PEIPKGRGLF	-
Pakistan/various/01	H7N3	PETPK--RRKRGLF	+
Pakistan/27/01	H7N3	PEIPKGRGLF	-
Pakistan/33/ 01	H7N3	PETPKRRKRGLF	+
A/poultry/Chile/2002	H7N3	PEKPKTCSPLSRCRETRGLF PEKPKTCSPLSRCRKTRGLF	+
A/poultry/Chile/2002	H7N3	PEKPKTRGLF	-
A/chicken/NL/2003	H7N7	PEIPKRRRRGLF	+
A/turkey/NL/2003	H7N3	PEIPKGRGLF PEIPKGSRVRRGLF	- +
A/ck/Pakistan/03	H7N3	PETPK-RRKRGLF	+
A/chicken/Canada/rv504/04	H7N3	PENPKQAYRKRMTGLF PENPKQAYQKRMTGLF PENPKQAYKKRMTGLF PENPKQAYHKRMTGLF PENPKQAHQKRMTGLF PENPRQAYRKRMTGLF PENPKQACQKRMTGLF	+
A/chicken/North Korea/1/2005	H7N7	PEIPKGRHRRPKRGLF	+
A/turkey/Italy/4527/2007	H7N3	PETPKGRGLF	-
A/chicken/Saskatchewan/HR-00011/07	H7N3	PENPKTTKPRPRRGLF	+
A/mallard/Sweden/100993/08	H7N7	PEIPKKRGLF	-

A/chicken/England/2008	H7N7	PEIPKRKKRGLF PEIPKKKKRGLF PEIPKKKKKKRGLF	+
A/goose/Czech/NRL 1848/09	H7N9	PELPKGRGLF	-
A/chicken/Spain/6279-2/09	H7N7	PELPKGTKPRPRRGLF	+
A/chicken/Italy/11VIR-62/11	H7N3	PEPPKGRGLF	-
A/chicken/Italy/13VIR4527-11/13	H7N7	PETPKRRERRGLF	+
A/chicken/England/2015	H7N7	PEIPRHRKGRGLF PEIPRHRKRRGLF	+
A/chicken/Germany/AR1385/2015	H7N7	PEIPKRKRRLGLF	+
A/chicken/Italy/16VIR-1873/2016	H7N7	PELPKGRKRRLGLF	+
A/turkey/Indiana/16-001403-1/2016	H7N8	PENPKKRKTRGLF	+
A/chicken/Jalisco/CPA1/12 A/chicken/Puebla/CPA-4451/16 A/chicken/Jalisco/CPA-1859/16	H7N3	PENPKDRKSRHRRTGLF PENPKDRKNRHRRTGLF PENPKGKKSRRHRKTRGLF	+
H7N9 2017 штами вірусу, які були виявлені в Китаї та Тайвані у людей та курей	H7N9	PEVPKRKRTARGLF PEVPKGKRTARGLF	+

Примітка *Патогенність вірусу визначена шляхом визначення внутрішньовенозного індексу патогенності, (+) - ВПГП, (-) - НПГП

8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

В рамках організації контролю якості досліджень велику увагу необхідно приділяти розробленню та впровадженню на робочих місцях стандартних операційних процедур (СОП). З метою запобігання появі недостовірних, у тому числі хибнопозитивних результатів, необхідно:

- дотримуватися вимог щодо організації лабораторії;
- дотримуватися правил роботи персоналу з обладнанням та реактивами;
- дотримуватися вимог, зазначених в інструкціях, методичних рекомендаціях виробників використовуваних наборів реагентів;
- використовувати наступні контролю ПЛР: НКВ, ВПК, ПКА, НКА, ПЗ, НЗ та контроль оточуючого середовища – дає змогу виявити контамінацію робочих поверхонь, приладів та обладнання нуклеїновими кислотами.

НКВ, ПКА, НКА є обов'язковими та повинні використовуватися при

кожній постановці ПЛР.

Також якість лабораторних досліджень забезпечується впровадженням системи управління якістю (СУЯ) відповідно до вимог ДСТУ ISO/IEC 17025. СУЯ, яка передбачає проведення внутрішньолaboratorного та зовнішньолaboratorного контролю якості досліджень.

Внутрішньолaboratorний контроль якості. Внутрішньолaboratorний контроль якості являє собою систему внутрішньолaboratorних порівнянь одержаних у лабораторії результатів.

Для внутрішньолaboratorного контролю якості досліджень необхідно використовувати позитивні та негативні зразки. В якості позитивних зразків можуть бути використані:

- зразки, штучно контаміновані НК;
- зашифровані проби матеріалу, уже дослідженого в лабораторії раніше;
- атестовані контрольні панелі, що містять позитивні і негативні зразки.

В якості негативних (зразки, що не містять НК) – ДНК-буфер, ФБР.

Забезпечення внутрішнього контролю якості проводять відповідно до Державних санітарних норм і правил «Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I – IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами».

Внутрішньолaboratorний контроль включає такі спеціалізовані процедури:

- постійна оцінка контрольних зразків у кожній постановці (серії) ампліфікації;
- періодичне проведення повторного випробування (виконується двома операторами паралельно при зміні обладнання, спеціаліста, введенні нового набору реагентів);
- використання контрольних зразків для внутрішньолaboratorного контролю якості (даний вид контрольних процедур рекомендується проводити

при вхідному контролі наборів реагентів, зміні обладнання, спеціаліста, запровадження нового набору реагентів);

- систематичне проведення контролю забруднення лабораторії продуктами ампліфікації. У разі отримання постійних позитивних сигналів у негативних контролях всі вихідні реактиви підлягають негайній заміні, необхідно провести деконтамінаційні заходи.

Зовнішній контроль якості. Зовнішній контроль якості здійснюється у формі участі у міжлабораторних порівняльних тестуваннях. У разі незадовільної оцінки отриманих результатів у лабораторії необхідно приймати екстрені заходи щодо усунення помилок.

9. КОНТАМІНАЦІЯ ДОСЛІДЖУВАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ТА РЕАКТИВІВ

Види контамінації:

- Перехресна контамінація від одного дослідного зразка до іншого – під час підготовки зразків до дослідження, виділення НК, внесення зразків в реакційну суміш;
- Контамінація НК від попередніх зразків;
- Контамінація продуктами ампліфікації (ампліконами) – має найбільше значення, оскільки амплікони в процесі ПЛР накопичуються у великій кількості і є ідеальним продуктом для реампліфікації;
- Контамінація досліджуваного матеріалу.

Основні правила попередження контамінації:

- Одноразовий лабораторний одяг в кожній лабораторній зоні;
- Одноразові перчатки без тальку;
- Наконечники з аерозольними фільтрами;
- Одноразові пластикові пробірки та посуд;
- Дотримання поточності руху досліджуваних зразків;
- Хімічна та ультрафіолетова дезінфекція всіх поверхонь робочих зон.

Дії при контамінації:

- Утилізація всіх дослідних зразків на проміжних стадіях дослідження;
- Генеральне прибирання, хімічна і ультрафіолетова дезінфекція усіх поверхонь лабораторного приміщення;
- Дезінфекція меблів, робочих поверхонь приладів і обладнання;
- Контроль наслідків контамінації шляхом взяття змивів з робочих поверхонь.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. ComMission decision of 4 august 2006 approving a Diagnostic Manual establishing for avian influenza as provided for in Council Directive 2005/94/EC
2. Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю. Державні санітарні правила ДСП 9.9.5.-080-2002 – К., 2002.
3. Стегній Б.Г., Головка А.М., Музика Д.В., Бісюк І.Ю. і ін. Грип птиці. Епізоотологія, діагностика, профілактика – Харків, «НТМТ», 2010.
4. WOAH - World Organization for Animal Health, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Chapter 3.3.4. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses) (Version adopted in May 2025);.
5. Ilaria Capua,· Dennis J. Alexander. Avian Influenza and Newcastle Disease. A Field and Laboratory Manual. Springer-Verlag Italia 2009.
6. Spackman E., Senne D.A., Myers T.J., Bulaga L.L., Garber L.P., Perdue M.L., Lohman K., Daum L.T. & Suarez D.L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. J. Clin. Microbiol., 40, 3256–3260.
7. Wood G.W., Mccauley J.W., Bashiruddin J.B. & Alexander D.J. (1993). Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. Arch. Virol., 130, 209– 217.

МАНДИГРА Світлана Станіславівна
кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник
науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень ДНДІЛДВСЕ

СУШКО Микола Іванович
науковий співробітник, завідувач
науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень ДНДІЛДВСЕ

РУЖИНСЬКА Ірина Леонідівна
провідний лікар ветеринарної медицини
науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень ДНДІЛДВСЕ

ПОСНА Олена Валеріївна
провідний лікар ветеринарної медицини
науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень ДНДІЛДВСЕ

Троян Оксана Миколаївна
провідний лікар ветеринарної медицини
науково-дослідного відділу молекулярно-генетичних досліджень ДНДІЛДВСЕ

ДРОЖЖЕ Жанна Миколаївна
кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник
науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

РУДОЙ Олексій Васильович
кандидат ветеринарних наук, в.о. завідувача
науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ

АЛЕКСЕЄВА Галина Борисівна
кандидат ветеринарних наук, старший дослідник,
заступник директора з наукового забезпечення лабораторної діагностики
заразних хвороб тварин

ПІЩАНСЬКИЙ Олександр Вікторович
кандидат ветеринарних наук, директор ДНДІЛДВСЕ

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ЩОДО ДІАГНОСТИКИ ГРИПУ ПТИЦІ, ТИПУВАННЯ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ПАТОГЕННОСТІ ВІРУСУ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧНИМИ МЕТОДАМИ

В авторській редакції

Підписано до друку _____.____ р. Формат _____
Папір друк. №2. Друк офсетний. Ум. друк. арк. ____
Тираж ____ прим. Зам. № ____

Видавець: (назва підприємства)
(поштова адреса видавця)
Тел.: (телефони видавця)
E-mail: (електронна пошта видавця)