

**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 ХВОРОБИ НЬЮКАСЛА 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 № 7 від 01 вересня 2025 р.).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної служби 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., Алексєєва 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 хвороби Ньюкасла 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. Алексєєва, О.В. Піщанський; К: ДНДІЛДВСЕ, 2025; 31 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 6.130501, 8.130501 – «Ветеринарна медицина».

У методичних рекомендаціях описано молекулярно-генетичні методи діагностики хвороби Ньюкасла та визначення патогенності вірусу.

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 ХВОРОБИ НЬЮКАСЛА 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 ХВОРОБИ НЬЮКАСЛА МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ.....	16
7. ВИЗНАЧЕННЯ ПАТОГЕННОСТІ ВІРУСУ ХВОРОБИ НЬЮКАСЛА.....	19
7.1 Визначення патогенності вірусу хвороби Ньюкасла секвенуванням за методом Сенгера.....	19
7.2 Визначення патогенності вірусу хвороби Ньюкасла методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу.....	25
8. КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ ЛАБОРАТОРНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	26
9. КОНТАМІНАЦІЯ ДОСЛІДЖУВАЛЬНИХ ЗРАЗКІВ ТА РЕАКТИВІВ.....	28
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	30

ПОЗНАЧЕННЯ ТА СКОРОЧЕННЯ

дНТФ – дезоксинуклеотидтрифосфат;

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

кДНК —комплементарний ланцюг ДНК;

НК – нуклеїнова кислота;

ПКА – позитивний контроль ампліфікації;

НКВ – негативний контроль виділення;

п.н. – пара нуклеотидів;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

ПЛР-РЧ – полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу;

РНК – рибонуклеїнова кислота;

РНКаза – рибонуклеаза;

ФБР– фосфатно-буферний розчин.

ХН – хвороба Ньюкасла;

ВСТУП

Хвороба Ньюкасла (ХН) викликається вірулентними штамми параміксовірусів птиці 1-го типу (APMV-1), які ще відомі як вірус ХН, який належить до роду *Orthoavulavirus* сімейства *Paramyxoviridae*. На теперішній час існує 21 серотип (APMV-1 – APMV-21) параміксовірусів птиці, які розподіляють на три роди: *avian metaavulavirus*, *avian orthoavulavirus* та *avianparaavulavirus*. APMV-1 здатний інфікувати до 200 видів птиці.

На основі клінічних ознак, які вірус ХН викликає у інфікованих курей розрізняють п'ять його патотипів: 1) вісцеротропний велогенний, 2) нейротропний велогенний, 3) мезогенний, 4) лентогенний або респіраторний, 5) безсимптомний. Прояв того чи іншого патотипу рідко буває чітким.

Клінічні ознаки, що спостерігаються у птахів, інфікованих вірусом ХН, дуже різноманітні та залежать від таких факторів, як: патотип вірус, вид та вік господаря, супутнє зараження іншими організмами, імунний статус. Захворюваність і смертність залежить від вірулентності штаму вірусу, ступеня вакцинного імунітету, умов навколишнього середовища. Лентогенні штами вірусу зазвичай викликають субклінічний перебіг хвороби з незначними розладами респіраторної системи такими як кашель, задишка, чхання, хрипи. У випадку ко-інфекції клінічні ознаки можуть посилюватися. Смертність незначна. Мезогенні штами в деяких видів птиці можуть викликати гострі респіраторні розлади та неврологічні ознаки, смертність зазвичай менше 10%, при ко-інфекції клінічні ознаки можуть посилюватися. Велогенні штами зазвичай викликають важкий перебіг з респіраторними і неврологічними клінічними ознаками, смертність висока. Первинні клінічні ознаки варіюються і можуть включати: летаргію, закуйовджене пір'я, набряк. Якщо хвороба продовжується, то можуть розвиватися діарея, диспное, запалення голови та шиї, часто з ціанозом. На пізніх стадіях хвороби можуть проявлятися неврологічні ознаки: тремор, клонічні спазми, парез або параліч ніг/крил, викривлення шиї та рух по колу, також спостерігається різке зниження яйценосності, яйця містять водянистий альбумін і виглядають деформованими,

аномально забарвлені, шорсткі або тонкі оболонки. Лентогенні штами часто призводять до раптової смерті з незначними клінічними ознаками або без них. У птахів, які важко перехворіли, може розвинутися неврологічне захворювання та часткове або повне припинення яйценосності. У невакцинованих курей рівень захворюваності та смертності може наближатися до 100%.

ХН необхідно диференціювати від високопатогенного пташиного грипу, ларинготрахеїту, віспи курей (дифтерійна форма), пситакоза, мікоплазмозу, інфекційний бронхіту, аспергільозу, сальмонельозу, аденовірусу, ботулізму, холери та інші параміксовірусів.

Про випадки захворювання ХН 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 захворювання птиці на ХН. Діагноз на ХН встановлюється комплексно з урахуванням епізоотичних даних, клінічних ознак, патологоанатомічних змін та результатів лабораторних досліджень. Основними лабораторними методами діагностики ХН є: молекулярно-генетичні (ЗТ-ПЛР-РЧ, секвенування), вірусологічні (біологічна проба на курячих ембріонах та на курях) та серологічні (РГА, РЗГА, ІФА). Референтними методами визначення патогенності вірусу ХН є визначення послідовності амінокислот в місці розщеплення F білку та визначення внутрішньоцеребрального індексу патогенності шляхом зараженням 10 курчат 24 – 40 годинного 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 ХН 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 ХВОРОБИ НЬЮКАСЛА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ МЕТОДАМИ. ЗАГАЛЬНІ ПОЛОЖЕННЯ

Лабораторна діагностика ХН молекулярно-генетичними методами проводиться у декілька етапів. Спочатку досліджують патологічний/біологічний матеріал на наявність РНК вірусу ХН за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу із зворотною

транскрипцією (ЗТ-ПЛР-РЧ) з використання специфічних праймерів до гену М вірусу ХН. У разі отримання позитивного результату (виявлено РНК вірусу ХН), проводять визначення патогенності вірусу.

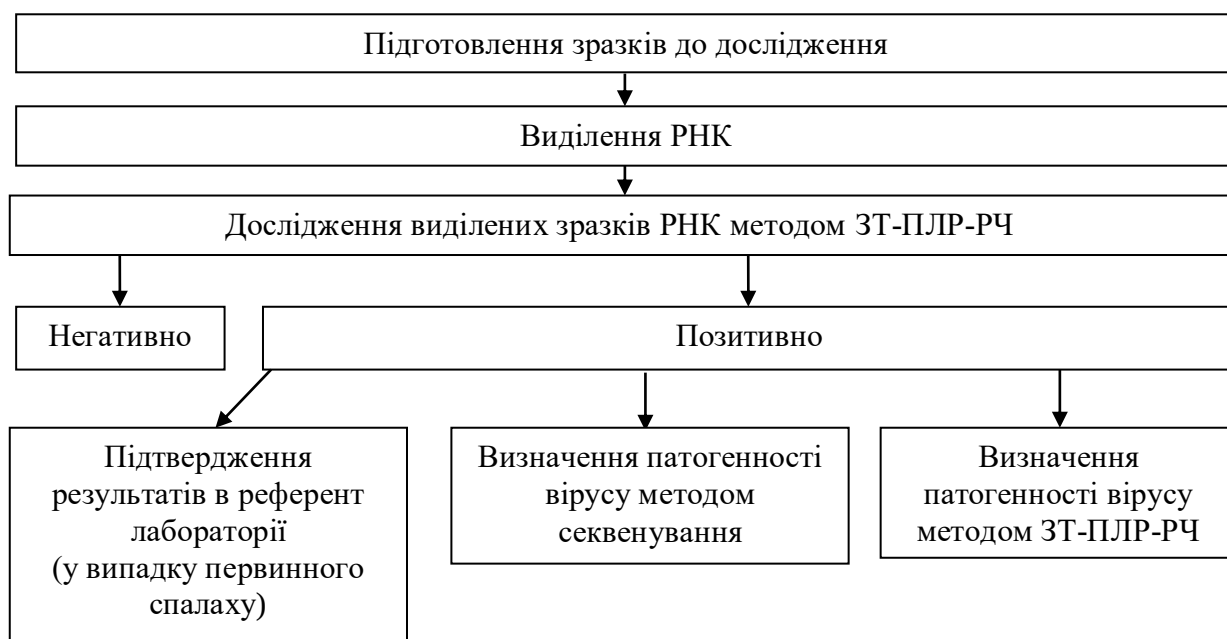


Рис. 1. Схема діагностики хвороби Ньюкасла молекулярно-генетичними методами

Для дослідження на ХН 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 та визначення патогенності вірусу ХН, які розроблені на основі СОПів референт лабораторії Європейського Союзу (ЄС) по грипу птиці (ГП) та ХН. 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 ХН методом ЗТ-ПЛР-РЧ можуть використовуватися наступні контролю:

- 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 ХН 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 зондів, необхідно відрізати головку зонда, помістити в пробірку та додати 750-1000 мкл стерильного фізіологічного або фосфатно-буферного розчину (ФБР). Далі пробірки з зондами необхідно струсити на вортексі протягом 30 с і центрифугувати протягом 2 хв при $15000 \times g$.

Внутрішні органи тварин і секційний матеріал нарізають на маленькі шматочки 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 вортексі 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 ХН або при використанні нижче наведених протоколів, і 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 ХВОРОБИ НЬЮКАСЛА МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

6.1. Виявлення РНК вірусу хвороби Ньюкасла

Протокол дослідження розроблений на основі SOP VIR 151 – ed. 01 – 09/23 – Detection of Avian Orthoavulavirus type 1 (AOAV-1) by real-time RT-PCR (Sutton et al., 2019) референт лабораторії ЄС по ГП та ХН (Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie). Даний протокол дає можливість виявляти РНК вірусу ХН, ампліфікуючи L ген (кодує полімеразу) вірусу та екзогенний ВПК.

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/зонду	Послідовність нуклеотидів в праймері / зонді (5'→3')
1	NDF	GAG CTA ATG AAC ATT CTT TC
2	NDR	AAT AGG CGG ACC ACA TCT G
3	LproMGB	FAM-CCA ATC AAC TTC CC-MGB
4	LproMGB2	VIC-AAT AGT GTA TGA CAA CAC-MGB
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 2

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 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 3

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	1,25
2	2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix	2X	1X	12,5
3	Прямий праймер NDF	12,5 мкМ	0,5 мкМ	1
4	Зворотний праймер NDR	12,5 мкМ	0,5 мкМ	1
5	Зонд LproMGB	5 мкМ	0,2 мкМ	1
6	Зонд LproMGB2	5 мкМ	0,2 мкМ	1
	ВПК суміш	-	-	2
	QuantiTect RT Mix	-	-	0,25
Загальний об'єм суміші				20,0

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

Таблиця 4

Параметри циклювання

	Етап	Режим	Кількість циклів
1. Утримування	Зворотна транскрипція	50 °C - 20 хв	1
1. Утримування	Ініціалізація	95 °C - 15 хв	1
2. Циклювання	Денатурація	94 °C - 45 с	40
	Відпал	50 °C - 45 с - детекція (FAM/VIC/Cy5)	

Таблиця 5

Облік та інтерпретація результатів дослідження контролів

Контроль	Очікувані результати	Дії у випадку некоректних результатів
ПКА	Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/VIC, 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/VIC і відповідно значення Ct	Повторити дослідження починаючи з етапу постановки ЗТ-ПЛР-РЧ використовуючи нові реагенти
НКВ	Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM/VIC 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
--	--	---

Таблиця 6

Облік та інтерпретація результатів дослідження зразків

Результат	Інтерпретація та дії
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і/або VIC, графік правильної форми, значення $Ct \leq 35$	Зразок позитивний (виявлено РНК вірусу ХН)
Відсутність зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM та VIC, зростання інтенсивності флуоресценції барвника Cy5, графік правильної форми, значення $Ct \leq 30$	Зразок негативний (РНК вірусу ХН не виявлено)
Зростання інтенсивності флуоресценції барвника FAM і/або VIC, 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 і/або VIC, 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 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 ВІРУСУ ХН

7.1 Визначення патогенності вірусу ХН секвенуванням за методом Сенгера

Визначення патогенності вірусу ХН проводиться шляхом секвенування ділянки РНК вірусу, яка кодує F білок, за методом Сенгера з подальшою конвертацією послідовності нуклеотидів в послідовність амінокислот. По послідовності амінокислот в місці розщеплення F білку визначають патогенність вірусу ХН.

В основі принципу секвенування за методом Сенгера (ферментативний метод, метод термінуючих нуклеотидів) лежить принцип ферментативного синтезу комплементарного ланцюга кДНК 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 РНК, який буде секвеновано;
3. Проведення електрофорезу;
4. Виділення кДНК з агарозного гелю або очищення ПЛР продукту;
5. Вимірювання концентрації кДНК і оцінка чистоти розчину кДНК;
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 РНК, 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 ДНК, які будуть відрізнятися довжиною в 1 нуклеотид. З цією метою проводять звичайну ПЛР. Для проведення звичайної ПЛР використовують відповідні праймера, які будуть обмежувати ділянку кДНК, яку буде секвеновано та універсальний мастермікс (AgPath-ID One-Step RT-PCR Reagents, Applied Biosystems).

Таблиця 7

Послідовність праймерів, які використовуються для накопичення фрагменту РНК методом ПЛР

Назва праймера	Послідовність праймера 5'→3'	Довжина фрагменту
Праймер А	TTG ATG GCA GGC CTC TTG C	362 п.н.
Праймер В	GGA GGA TGT TGG CAG CAT T	

Таблиця 8

Приготування мастерміксу для накопичення фрагменту НК

Назва реагенту	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	Кількість (мкл) на 1 реакцію (50 мкл)
Nuclease-free water	-	-	5,5
2×RT-PCR Buffer	2×	1×	12,5
Primer A:	10 мкМ	0,2 мкМ	0,5
Primer B	10 мкМ	0,2 мкМ	0,5
25× RT-PCR Enzyme Mix	25×	1×	1
Об'єм реакційної суміші			20
Об'єм досліджувального зразка			5
Загальний об'єм			25

Таблиця 9

Параметри ампліфікації

Етап	Режим (температура, час)	
1. Утримування	45 °С -45 хв	
2. Утримування	94 °С -2 хв	
3. Циклювання	94 °С – 1хв	40 циклів
	55 °С-1 хв	
	72 °С 1 хв	
4.Утримування	72 °С 10 хв	
Охолодження	4 °С - ∞	

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, 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 довжини хвилі 260 нм до величини поглинання дослідним зразком 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 суміш 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 суміш 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 3-10 нг/мкл.

Таблиця 10

Реакційна суміш для проведення секвенувальної ПЛР

Форвард реакція		Реверс реакція	
Реакційна суміш:	1 X	Реакційна суміш:	1 X
Праймер (3,2pmol)	1мкл	Праймер (3,2pmol)	1мкл
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 X Terminator 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.

Ідентифікація місця розщеплення білку

Будь-який вірус ХН, який у 117 позиції білку F має амінокислоту фенілаланін (F) або у 115 і 116 має амінокислоти аргінін, лізин або гістидин (R, K або H) вважається, що він з високою ймовірністю є вірулентним.

Наприклад, віруси ХН, які мають наступні послідовності амінокислот в позиціях 112-117 F білка вважаються вірулентними: RRQRRF, RRQKRF, RRRRRF, RRKRRF, KRQKRF, RRRKRF, RRKKRF, GRQKRF, GRQRRF, RRRKRF.

Цей список не є вичерпний.

Будь-який вірус ХН, який у 117 позиції білку F має амінокислоту лейцин (L) і менше двох із наступних амінокислот аргінін, лізин або гістидин в позиціях 115 і 116 вважається авірулентним.

Наприклад, віруси ХН, які мають наступні послідовності амінокислот в позиціях 112-117 F білка вважаються авірулентними: GKQGRL, GRQGRL, RRQGRL, RKQGRL, EKQGRL, ERQGRL, ERQERL.

Цей список не є вичерпний.

7.2 Визначення патогенності вірусу ХН методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу

Протокол дослідження розроблений на основі SOP «Molecular pathotyping of Avian Avulavirus type 1 by Real Time PCR» референт лабораторії ВООЗ та ФАО по грипі тварин та ХН (Animal & Plant Health Agency)

Реагенти:

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

Таблиця 11

Послідовність праймерів та зондів

№ п/п	Назва праймера/зонду	Послідовність праймера, зонда 5'->3'
1	F4804	GCATACAACAGAACAYTGAC
2	RT7	GGAGGATGTTGGCAGC
3	VRP1	FAM- CCTATAAAICGITTCTGICTCCTTCC-BHQ1
4	ARP3	[HEX] CCTATAAGICGICCTGTITCCC[BHQ1]
Додатковий праймер для лінії 6 вірусу ХН		
5	F4804 Lin6	GCATACAATAGGACBCTTACAAC
Додатковий зонд для лінії 6 вірусу ХН		
6	ARP6	[HEX] CCTACCAAACGCTCCTGCCGTTTC[BHQ1]

Таблиця 12

Приготування реакційної суміші

№ п/п	Назва реактиву	Початкова концентрація	Кінцева концентрація	мкл на реакцію
1	Вода вільна від нуклеаз	-	-	9
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 мМ	1,0
5	F4804	10 мкМ	0,4 мкМ	1,0
6	RT7	10 мкМ	0,4 мкМ	1,0
7	VRP1	5 мкМ	0,2 мкМ	1,0
8	ARP3	5 мкМ	0,2 мкМ	1,0
9	Qiagen OneStep RT-PCR Enzyme Mix	-	-	1,0
Загальний об'єм суміші				23,0

Примітка: Якщо очікується, що досліджуваний вірус ХН належить до лінії 6, то необхідно замінити праймер F4804 на F4804 Lin6 і додатково додати третій зонд ARP6.

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

Таблиця 13

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	40
	Відпал	50 °C - 30 с - детекція (FAM, HEX)	
	Елонгація	72 °C - 10 с	

Облік та інтерпретація результатів. Виявлення ампліфікації РНК вірулентних штамів вірусу ХН проводять по каналу FAM (значення Ct повинно бути меншим 37). Виявлення ампліфікації РНК авірулентних штамів вірусу ХН проводять по каналу HEX (значення Ct повинно бути меншим 37).

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 появи 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 внутрішньолабораторного 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;
- Накінечники 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. Brown C. & Torres A., Eds. (2008). - USAHA Foreign Animal Diseases, Seventh Edition. Committee of Foreign and Emerging Diseases of the US Animal Health Association. Boca Publications Group, Inc.
2. Coetzer J.A.W. & Tustin R.C. Eds. (2004). - Infectious Diseases of Livestock, 2nd Edition. Oxford University Press.
3. Fauquet C., Fauquet M. & Mayo M.A. (2005). - Virus Taxonomy: VIII Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.
4. Kahn C.M., Ed. (2005). - Merck Veterinary Manual. Merck & Co. Inc. and Merial Ltd.
5. Spickler A.R. & Roth J.A. Iowa State University, College of Veterinary Medicine - <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.htm>
6. World Organisation for Animal Health (2021). - Terrestrial Animal Health Code. OIE, Paris.
7. World Organisation for Animal Health (2021). - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE, Paris.

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 ДНДІЛДВСЕ

ПЩАНСЬКИЙ 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)