ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 56144— 2014

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Метод секвенирования фрагментов генома для идентификации вакцинных штаммов вирусов болезни Ньюкасла, инфекционной бурсальной болезни и инфекционного бронхита кур

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2015

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 454 «Охрана жизни и здоровья животных и ветеринарно-санитарная безопасность продуктов животного происхождения и кормов»

3 УТВЕРЖДЕН и ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 сентября 2014 г. № 1246-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в ГОСТ Р 1.0—2012 (раздел 8). Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (gost.ru)

© Стандартинформ, 2015

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения и сокращения 2
4 Условия выполнения испытаний и требования безопасности 5
5 Средства измерений, оборудование, реактивы, посуда и материалы 6
6 Сущность метода 8
7 Отбор и подготовка проб 9
8 Экстракция и очистка РНК 9
9 Реакция обратной транскрипции (ОТ) 10
10 Амплификация фрагментов генома вирусных штаммов методом ПЦР 10
11 Детекция ПЦР-продуктов методом электрофореза в агарозном геле 13
12 Учет результатов ПЦР 13
13 Секвенирование амплифицированных фрагментов генома 15
14 Определение нуклеотидной последовательности фрагментов геномов штаммов вирусов методом капиллярного электрофореза 15
15 Идентификация вирусных штаммов и интерпретация результатов испытания 16
Приложение А (справочное) Примеры результатов секвенирования ДНК 18
Библиография 23

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

СРЕДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Метод секвенирования фрагментов генома для идентификации вакцинных штаммов вирусов болезни Ньюкасла, инфекционной бурсальной болезни и инфекционного бронхита кур

Biological Drugs for veterinary use. Method of genome fragments sequencing for identification of Newcastle disease virus, infection bursal disease virus and avian infectious bronchitis virus vaccine strains

Дата введения — 2016—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт распространяется на биологические лекарственные средства для ветеринарного применения — вакцины против болезни Ньюкасла, инфекционной бурсальной болезни, инфекционного бронхита кур (далее — вакцины) — и устанавливает метод секвенирования фрагментов генома для идентификации соответствующих вакцинных штаммов.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004–91 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.005–88 Система стандартов безопасности труда. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны

ГОСТ 12.1.007–76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.009–83 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.021–75 Система стандартов безопасности труда. Системы вентиляционные. Общие требования

ГОСТ 12.4.131–83 Халаты женские. Технические условия

ГОСТ 12.4.132–83 Халаты мужские. Технические условия

ГОСТ OIML R 76-1–2011 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ 1770–74 (ИСО 1042–83, ИСО 4788–80) Посуда мерная лабораторная стеклянная. Цилиндры, мензурки, колбы, пробирки. Общие технические условия

ГОСТ 3164–78 Масло вазелиновое медицинское. Технические условия

ГОСТ 6709–72 Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 12026–76 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ ИСО/МЭК 17025–2009 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ 25336–82 Посуда и оборудования лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 26678–85 Холодильники и морозильники бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия

Издание официальное

ГОСТ 28311–89 Дозаторы медицинские лабораторные. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 31929–2013 Средства лекарственные для ветеринарного применения. Правила приемки, методы отбора проб

ГОСТ IEC 60335-2-25–2012 Безопасность бытовых и аналогичных электрических приборов. Часть 2.25. Частные требования для микроволновых печей, включая комбинированные микроволновые печи

ГОСТ Р 12.1.019–2009 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ Р 52239–2004 (ИСО 11193-1:2008) Перчатки медицинские диагностические одноразовые. Часть 1. Спецификация на перчатки из каучукового латекса или раствора

ГОСТ Р 52682–2006 Средства лекарственные для ветеринарного применения. Термины и определения

ГОСТ Р 52833–2007 (ИСО 22174:2005) Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения.

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ Р 52682, а также следующие термины с соответствующими определениями.

3.1.1 **алгоритм *BLAST*:** Алгоритм поиска родственных нуклеотидных или аминокислотных последовательностей в базах данных.

Примечание — В настоящем стандарте под базами данных подразумеваются базы данных *GenBank, EMBL* и *DDBJ*, доступные через поисковой интернет-ресурс gost.e-ecolog.ru , содержащие охарактеризованные последовательности НК организмов различных видов и доступные пользователям на безвозмездной основе.

3.1.2 **алгоритм *CLUSTAL*:** Алгоритм множественного выравнивания нуклеотидных или аминокислотных последовательностей.

3.1.3

амплификатор: Автоматический прибор, выполняющий необходимые для ПЦР циклы нагрева и охлаждения с заданными условиями.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.4.20

3.1.4 **амплификация ДНК:** Процесс, многократно увеличивающий число копий фрагмента генома какого-либо организма.

3.1.5 **буферный раствор:** Реакционная среда, содержащая различные компоненты, в том числе ионы Mg^{2+}, необходимые для поддержания оптимальной активности и стабильности фермента.

3.1.6 **внутренний контрольный образец;** ВКО: Раствор, содержащий определенное количество известных фрагментов РНК, добавляемый в анализируемую пробу перед этапом выделения целевого нуклеинового материала.

3.1.7 **выравнивание нуклеотидных последовательностей:** Процесс сопоставления сравниваемых последовательностей до такого их взаиморасположения, при котором наблюдается максимальное количество совпадений нуклеотидов.

3.1.8 **генетическая неоднородность:** Гетерогенность сигнала в отдельных положениях хроматограммы, полученной при секвенировании ДНК, обусловленная присутствием в анализируемой пробе нескольких генетически различающихся форм вируса.

3.1.9 **дезоксирибонуклеаза:** Фермент, разрушающий ДНК.

3.1.10

денатурация ДНК: Процесс, в результате которого двухцепочечная ДНК разделяется на одноцепочечные.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.4.14

3.1.11 **ДНК-полимераза:** Термостабильный фермент (ДНК-зависимая ДНК-полимераза), катализирующий циклический синтез ДНК.

3.1.12 **идентификация:** Процесс определения принадлежности микроорганизма к определенному таксону.

3.1.13 **изолят:** Чистая культура микроорганизма, выделенная из какого-либо конкретного источника.

3.1.14

лабораторная проба: Проба, предназначенная для лабораторных исследований или испытаний.

ГОСТ Р 50779.10, пункт 4.31

3.1.15 **мастермикс:** Смесь реагентов, необходимых для амплификации ДНК в ПЦР, включающая специфические праймеры и дНТФ.

3.1.16 **матрица:** Одноцепочечная НК, комплементарная синтезируемой цепи ДНК, определяющая последовательность нуклеотидов в синтезируемой цепи.

3.1.17

нуклеиновые кислоты; НК: Макромолекулы, являющиеся носителями генетической информации, или выступающие в качестве посредника при синтезе полипептидной цепи.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.1.1

3.1.18 **нуклеотидная последовательность:** Порядок чередования нуклеотидных остатков в НК.

3.1.19 **очистка РНК:** Процесс обработки выделенной РНК, позволяющий повысить ее чистоту с целью снижения ингибирования реакций ОТ и ПЦР.

3.1.20

обратная транскриптаза: Фермент, катализирующий обратную транскрипцию РНК в ДНК с использованием ОТ-праймеров.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.3.2

3.1.21

обратная транскрипция; ОТ: Синтез ДНК с матрицы РНК с использованием фермента обратной транскриптазы в сочетании с ОТ-праймером в присутствии дезоксирибонуклеотидтрифосфатов.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.3.1

3.1.22

ОТ-праймер: Праймер, используемый в обратной транскрипции.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.3.5

3.1.23

отжиг: Гибридизация праймера с комплементарной последовательностью нуклеиновых кислот в заданных условиях.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.4.15

3.1.24 **отрицательный контрольный образец;** ОКО: Раствор, используемый вместо анализируемой пробы для контроля чистоты выделения РНК.

3.1.25 **отрицательный контроль ПЦР;** К-: Реакционная смесь для проведения ПЦР, заведомо не содержащая целевой нуклеиновый материал.

3.1.26

отрицательный контроль выделения (контроль чистоты выделения); $К_в$: Контроль, прошедший все этапы выделения ДНК, но в отсутствие анализируемой пробы.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.5.4

3.1.27

полимеразная цепная реакция; ПЦР: Ферментативная реакция, позволяющая амплифицировать фрагмент ДНК *in vitro*.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.4.1

3.1.28 **положительный контроль ПЦР;** К+: Реакционная смесь для проведения ПЦР, заведомо содержащая целевой нуклеиновый материал (ПКО).

3.1.29 **положительный контрольный образец;** ПКО: Раствор, содержащий определенное количество целевого нуклеинового материала для проведения ПЦР.

3.1.30

праймер: Олигонуклеотид с определенной длиной и последовательностью, комплементарный фрагменту аналитически значимой последовательности ДНК.

Примечание — Праймеры ограничивают целевую последовательность ДНК.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.4.12

3.1.31

проба для анализа: Проба, подготовленная для проведения испытаний или анализа, которую полностью и единовременно используют для проведения испытания или анализа.

ГОСТ Р 50779.10, пункт 4.32

3.1.32

ПЦР-продукт: Фрагмент ДНК, амплифицированный в ПЦР.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.4.5

3.1.33

ПЦР с горячим стартом: Активация термостабильной ДНК-полимеразы с помощью этапа прогрева перед основной программой, позволяющая избежать неспецифической амплификации.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.4.9

3.1.34

рибонуклеаза: Фермент, разрушающий РНК.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.3.3

3.1.35 **секвенирование ДНК:** Определение нуклеотидной последовательности фрагмента генома организма.

3.1.36 **смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов;** дНТФ: Раствор, содержащий дезоксиаденозинтрифосфат, дезоксицитидинтрифосфат, дезоксигуанинтрифос-фат, дезокситимидинтрифосфат, являющиеся «строительными блоками» для синтеза новых комплементарных цепей ДНК.

3.1.37 **смесь дидезоксинуклеозидтрифосфатов;** ддНТФ: Смесь производных дНТФ, у которых гидроксильная группа у третьего атома углерода дезоксирибозы замещена атомом водорода.

Примечание — Флуоресцентно-меченные ддНТФ используют при секвенировании в качестве терминаторов элонгации праймеров, так как их включение прерывает возможность дальнейшего удлинения цепи ДНК.

3.1.38

специфичность: Способность применяемого метода распознавать исключительно целевую последовательность и отличать ее от сходных последовательностей и загрязняющих примесей.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.6.4

3.1.39

целевая ДНК: Выбранная для амплификации последовательность ДНК.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.4.13

3.1.40 **штамм:** Чистая культура микроорганизма, выделенная из конкретного источника и характеризующаяся некоторыми изученными признаками (морфологическими, физиологическими), отличающими ее от других культур того же вида.

3.1.41 **элюция:** Извлечение вещества из твердого носителя вымыванием подходящим растворителем.

3.1.42

элонгация праймера: Ферментативная реакция, приводящая к синтезу новой цепи ДНК путем добавления одиночных дезоксирибонуклеотидов к 3'-концу праймера.

ГОСТ Р 52833, пункт 3.4.16

3.1.43 **экстракция РНК:** Обработка анализируемой пробы вакцины, высвобождающая РНК вируса.

3.2 В настоящем стандарте использованы следующие сокращения:

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;

кДНК — комплементарная ДНК;

п. н. — пара нуклеотидов;

РНК — рибонуклеиновая кислота;

ТБЭ — трис боратный электродный буфер;

ЭДТА — натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты;

НБ — Ньюкаслская болезнь;

ИББ — инфекционная бурсальная болезнь;

ИБК — инфекционный бронхит кур.

4 Условия выполнения испытаний и требования безопасности

4.1 Условия выполнения испытаний

4.1.1 Общие требования, предъявляемые к испытательной лаборатории и проведению испытаний, — по ГОСТ ИСО/МЭК 17025.

4.1.2 Общие требования к лаборатории, использующей методы амплификации ДНК для молекулярно-генетических испытаний, устройство и оснащение лаборатории — по ГОСТ Р 52833 (раздел 6).

Примечание – Организацию работы лабораторий, использующих методы амплификации НК при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I — IV групп патогенности, осуществляют в соответствии с [1].

4.2. Требования к персоналу лаборатории

4.2.1 Общие требования — по ГОСТ ИСО/МЭК 17025 и ГОСТ Р 52833.

4.2.2 Персонал должен знать правила работы в лаборатории, использующей методы амплификации ДНК, санитарно-гигиенические нормы, правила охраны труда, пожарной и электробезопасности.

4.2.3 Персонал, выполняющий испытания, должен владеть методами ПЦР и секвенирования ДНК.

4.3 Требования безопасности

4.3.1 При работе с химическими реактивами необходимо соблюдать общие требования безопасности обращения с вредными веществами, установленные ГОСТ 12.1.007.

Примечание — Работа с материалом, содержащим микроорганизмы III — IV групп патогенности, должна соответствовать требованиям [1] и [2].

4.3.2 Помещение должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией по ГОСТ 12.4.021. Содержание вредных веществ в воздухе рабочей зоны не должно превышать норм, установленных ГОСТ 12.1.005.

4.3.3 При работе с электроустановками следует соблюдать требования электробезопасности, установленные в ГОСТ Р 12.1.019.

4.3.4 Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004, быть оснащено средствами пожаротушения по ГОСТ 12.4.009.

5 Средства измерений, оборудование, реактивы, посуда и материалы

5.1 При проведении испытаний оборудование следует обслуживать в соответствии с инструкциями производителя и требованиями ГОСТ ИСО/МЭК 17025 и ГОСТ Р 52833.

5.2 Для проведения испытаний применяют следующее средства измерений и оборудование:

- весы электронные по ГОСТ OIML R 76-1 II (высокого) класса точности с действительной ценой деления $d \leq 0{,}01$ г; при взвешивании в диапазоне от 0,02 до 50,00 г пределом допускаемой погрешности при первичной поверке ± 4 мг, при эксплуатации — ± 5мг;
- анализатор генетический для разделения фрагментов ДНК методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флюоресценции, позволяющий осуществить прочтение нуклеотидной последовательности длиной до 950 п. н. с точностью не менее 98,5 % ;
- бокс ламинарный с классом биологической безопасности II тип А для выделения НК;
- ПЦР-бокс с бактерицидной лампой;
- амплификаторы для микропробирок вместимостью 0,2 и 0,6 $см^3$ с возможностью активного регулирования температуры по раствору в пробирке;
- термостат твердотельный с диапазоном температур от 25 °С до 100 °С для микропробирок вместимостью 1,5 $см^3$;
- отсасыватель вакуумный медицинский с колбой-ловушкой;
- микроцентрифуги с угловым ротором для микропробирок вместимостью 1,5 $см^3$ со скоростью вращения до 14800 об./мин, максимальным ускорением 21100 *g*;
- миницентрифуги-встряхиватели с роторами для микропробирок вместимостью 0,2; 0,6 и 1,5 $см^3$, скоростью вращения не менее 2400 об./мин и максимальным ускорением до 700 *g*;
- холодильник бытовой электрический по ГОСТ 26678, обеспечивающий поддержание температуры от 2 °С до 8 °С, с морозильной камерой, обеспечивающий поддержание температуры не выше минус 16 °С;
- набор дозаторов электронных или механических медицинских лабораторных по ГОСТ 28311, с варьируемыми объемами доз;
- камеру для горизонтального электрофореза вместимостью не более 500 $см^3$;
- источник питания для электофореза постоянного тока с напряжением от 150 до 460 В;
- трансиллюминатор ультрафиолетовый с кабинетом для просмотра гелей;
- видеосистему с цифровой видеокамерой для регистрации результатов и передачи изображения;
- печь микроволновую мощностью не менее 800 Вт, соответствующую требованиям ГОСТ IEC 60335-2-25.

5.3 Для проведения испытаний применяют следующие реактивы:

а) набор реагентов для экстракции РНК[**], включающий:

1) «лизирующий раствор»;

2) «раствор для отмывки № 1»;

3) «раствор для отмывки № 3»;

---

[*] Примером подходящего оборудования может служить генетический анализатор «*ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer*» (*Applied Biosystems*, США) с капиллярным блоком типа «3130/3100-*Avant*» *Genetic Analyzer Capillary Array*,4 × 50 см (*Applied Biosystems*, США). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

[**] Примером может служить набор «РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, РФ). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

4) «раствор для отмывки № 4»;

5) сорбент (25 %-ная взвесь частиц SiO_2 размером от 20 до 50 мкм в растворе Трис-HCl молярной концентрации 5 ммоль/дм^3);

6) буфер для элюции РНК;

7) ВКО;

8) ОКО;

б) набор реагентов для ОТ*, включающий:

1) транскриптазу обратную рекомбинантную модифицированную из вируса лейкемии мышей «*M-MLV*» активностью 0,2 ед./см^3 в буфере для хранения;

2) ДНК-буфер;

3) реагенты «*RT-mix*» и «*RT-G-mix*-1», содержащие рабочий буферный раствор, дНТФ и гексануклеотидные праймеры со случайной последовательностью нуклеотидов;

в) растворы прямых и обратных ПЦР-праймеров молярной концентрацией 10 ммоль/дм^3 и чистотой специфического олигонуклеотида не менее 98 %, позволяющих амплифицировать соответствующие фрагменты генов штаммов вирусов;

г) «ПЦР-смесь-2»*, содержащую термостабильную ДНК-полимеразу «ДиаТак» активностью 0,25 ед./мм^3, магния сульфат $MgS0_4$ молярной концентрации 5 ммоль/дм^3; Трис-HCl молярной концентрации 66 ммоль/дм^3 с pH 8,3; аммония сульфат $(NH_4)_2S0_4$ молярной концентрации 16,7 ммоль/дм^3 ; раствор «Твин-20» 0,01 %-ный; глицерина раствор 20 %-ный; краситель крезоловый красный;

д) раствор дНТФ, содержащий натриевые соли дНТФ со степенью очистки более 98 % и концентрацией каждого 2 моль/дм^3, pH 7,5;

е) воду деионизованную, класса чистоты I, свободную от рибонуклеаз, дезоксирибонуклеаз, неорганических и органических примесей с удельным сопротивлением не менее 18 МОм·см;

ж) воск для ПЦР;

и) масло вазелиновое медицинское по ГОСТ 3164;

к) агарозу, пригодную для электрофоретического разделения ДНК;

л) ТБЭ-буфер для электрофореза (концентрированный буферный раствор, содержащий трис-основание молярной концентрации 0,89 моль/дм^3, борную кислоту молярной концентрации 0,89 моль/дм^3, ЭДТА молярной концентрации 0,02 моль/дм^3, pH = 8,3);

м) раствор бромистого этидия концентрацией 10 мг/см^3, х. ч.;

н) маркер молекулярных масс ДНК, содержащий фрагменты ДНК размером от 100 до 1000 п. н. концентрацией 100 нг/мм^3, объемом для нанесения в лунки геля 3 — 5 мм^3;

п) реагент для очистки продуктов ПЦР**;

р) реагент для секвенирования ДНК***;

с) спирт изопропиловый массовой долей основного вещества 99,8 %;

т) формамид высокоочищенный деионизированный с электропроводностью в диапазоне 19 — 34 мкСм/см*4;

у) набор для спектральной калибровки генетического анализатора*5;

ф) полимер для капиллярного электрофореза*6;

---

* Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

** Примером может служить набор «ExoSAP-IT™» (USB Corporation, США). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

*** Примером подходящего реагента может служить «BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix» из набора реактивов для секвенирования «BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit» (Applied Biosystems, США). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта

*4 Примером может служить формамид «Hi-DiTM Formamide» (Applied Biosystems, США). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

*5 Примером подходящего набора может служить «31xx and 3500 Matrix Standards Kit, BigDye® Terminator v1.1» (Applied Biosystems, США). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

*6 Примером подходящего полимера может служить «POP-7™ Polymer for 3130/3130xl Genetic Analyzers» (Applied Biosystems, США). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

ц) концентрат буфера для капиллярного электрофореза*;

ч) воду дистиллированную по ГОСТ 6709.

5.4 Для проведения испытаний применяют следующую посуду и материалы:

- пробирки одноразовые полипропиленовые плотно закрывающиеся градуированные вместимостью 0,6 и 1,5 $см^3$;
- пробирки для ПЦР с плоской крышкой вместимостью 0,2 $см^3$;
- колбу коническую по ГОСТ 25336, из термостойкого стекла вместимостью 250 $см^3$;
- цилиндры мерные вместимостью 50 и 1000 $см^3$ по ГОСТ 1770;
- стаканы стеклянные вместимостью 100 и 400 $см^3$ по ГОСТ 25336;
- наконечники одноразовые универсальные для электронных или механических дозаторов с варьируемыми объемами доз;
- штативы для микропробирок и наконечников;
- планшеты 96-луночные для автоматического генетического анализатора с уплотнителем, основанием (штативом) и фиксатором**;
- емкости для сброса наконечников;
- емкости для растворов с уплотнителями***;
- емкость для анодного буфера*4;
- салфетки для очистки линз, химически чистые;
- ленту лабораторную влагостойкую эластичную;
- халаты по ГОСТ 12.4.131 и ГОСТ 12.4.132;
- перчатки по ГОСТ Р 52239, одноразовые из латекса без пудры;
- бумагу фильтровальную по ГОСТ 12026;
- средства для обработки рабочего места по [1] и [2].

5.5 Допускается использование других средств измерений с метрологическими характеристиками, а также оборудования, материалов, посуды и реактивов с техническими характеристиками не хуже указанных.

6 Сущность метода

6.1 Сущность метода заключается в определении нуклеотидных последовательностей вариабельных участков геномов штаммов вирусов НБ, ИББ и ИБК из испытуемых вакцин, их сравнении с известными последовательностями и идентификации вакцинных штаммов.

6.2 Испытание состоит из следующих этапов:

- экстракция и очистка РНК вируса;
- реакция обратной транскрипции (ОТ) очищенной РНК вируса;
- амплификация фрагментов генома вирусов методом ПЦР с парами праймеров, фланкирующими определенные участки генома для идентификации штамма вируса: НБ — фрагменты генов *M* и *F*, ИББ — фрагмент гена *VP*2, ИБК — фрагмент гена *S*;
- детекция ПЦР-продуктов методом электрофореза в агарозном геле для выявления специфических полос амплифицированной ДНК и оценки концентрации ПЦР-продуктов;
- секвенирование ПЦР-продуктов, очищенных от невключившихся праймеров и дНТФ, дидезоксинуклеотидным методом с флуоресцентными красителями;

---

* Примером подходящего концентрата буфера может служить «310 and 31xx Running Buffer, 10X» (Applied Biosystems, США). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

** Примером может служить планшет «MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate» (Applied Biosystems, США) с уплотнителем типа «96-Well Plate Septa» (Applied Biosystems, США), основанием типа «3130 and 3100 series Plate Base 96-Well» (Applied Biosystems, США) и фиксатором типа «3130 and 3100 series Plate Retainer 96-Well» (Applied Biosystems, США). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта

*** Примерами могут служить емкости для растворов «Buffer, Water, Waste Reservoir», уплотнитель «Reservoir Septa» (Applied Biosystems, США). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

*4 Примером может служить емкость для анодного буфера «3130/3130xl Buffer Jar» (Applied Biosystems, США). Данная информация является рекомендуемой и приведена для удобства пользователей настоящего стандарта.

- определение нуклеотидной последовательности фрагментов геномов штаммов вирусов путем разделения продуктов реакции секвенирования, очищенных от избытка дНТФ, флуоресцентно-меченных ддНТФ, праймера и солей, методом каппилярного электрофореза с детекцией сигнала флюоресценции и контроль качества секвенирования;

- сравнение полученной нуклеотидной последовательности фрагмента генома вируса из анализируемой пробы с известными последовательностями вирусных штаммов из баз данных в целях идентификации вакцинного штамма и интерпретация результатов испытания.

7 Отбор и подготовка проб

7.1 Отбор лабораторной пробы

7.1.1 Лабораторную пробу от серии вакцины отбирают методом случайного отбора после проверки качества упаковки, маркировки и внешнего вида в соответствии с ГОСТ 31929. Лабораторная проба должна быть репрезентативной и содержать не менее двух упаковочных единиц из каждой серии вакцины.

7.1.2 При получении неудовлетворительных результатов испытаний проводят повторный отбор лабораторной пробы от удвоенного количества единиц упаковки той же серии в соответствии с ГОСТ 31929.

7.1.3 Лабораторные пробы хранят в соответствии с условиями, указанными производителем в нормативных документах на конкретную вакцину.

7.2 Подготовка анализируемой пробы

7.2.1 Каждую анализируемую пробу подготавливают в одноразовых перчатках.

7.2.2 Из одной упаковочной единицы отбирают 10 мм^3 жидкой вакцины и переносят в одноразовую полипропиленовую микропробирку вместимостью 1,5 см^3.

7.2.3 Лиофилизированные формы вакцин предварительно ресуспензируют в стерильном растворителе и готовят анализируемую пробу по 7.2.2.

8 Экстракция и очистка РНК

8.1 Экстракцию и очистку РНК из анализируемой пробы вакцины проводят с использованием комплекта реагентов для выделения РНК по 5.3 сорбционным методом.

8.2 Готовят необходимое количество одноразовых пробирок (по числу анализируемых проб) и добавляют пробирку для отрицательного контроля K_B. Вносят в каждую пробирку по 0,45 см^3 «лизирующего раствора» и по 5 мм^3 ВКО. Пробирки маркируют.

8.3 В пробирки по 8.2 вносят по 10 мм^3 анализируемых проб, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку K_B вносят 10 мм^3 ОКО.

8.4 В каждую пробирку по 8.3 вносят 25 мм^3 сорбента, который предварительно встряхивают. Содержимое пробирок перемешивают и инкубируют при комнатной температуре в течение 8 — 10 мин, встряхивая через каждые 2 — 3 мин. Затем осаждают сорбент в микроцентрифуге с угловым ротором при 5000 об./мин в течение 30 с. Надосадочную жидкость удаляют, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник для каждой анализируемой пробы.

8.5 К полученному после центрифугирования сорбенту по 8.4 добавляют по 0,4 см^3 «раствора для отмывки № 1». Перемешивают на встряхивателе до полного ресуспензирования сорбента. Сорбент осаждают центрифугированием при 5000 об./мин на микроцентрифуге в течение 30 с. Удаляют надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник для каждой анализируемой пробы.

8.6 Дважды повторяют процедуру отмывки, используя по 0,5 см^3 «раствора для отмывки № 3», аналогично 8.5.

8.7 Затем процедуру отмывки повторяют, используя по 0,4 см^3 «раствора для отмывки № 4», аналогично 8.5, при этом сорбент осаждают центрифугированием при 10000 об./мин.

8.9 Пробирки с отмытым сорбентом по 8.7 помещают для его подсушивания в термостат при температуре 60 °С на 12 — 15 мин. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

8.10 В пробирки с подсушенным отмытым сорбентом добавляют по 50 мм^3 буфера для элюции РНК, кратковременно перемешивают на встряхивателе, помещают в термостат при температуре

60 °С на 2 — 3 мин, снова встряхивают, а затем центрифугируют при 12000 — 13000 об./мин на микроцентрифуге с угловым ротором в течение 1 мин.

8.11 Надосадочная жидкость, полученная после центрифугирования по 8.10, содержит очищенную РНК (РНК-пробу), которую затем используют для реакции ОТ в соответствии с разделом 9.

Срок хранения РНК-пробы при температуре от 2 °С до 8 °С — не более 4 ч.

9 Реакция обратной транскрипции (ОТ)

9.1 Для проведения реакции ОТ используют набор реагентов по 5.3.

9.2 Готовят реакционную смесь. Для этого в микропробирку вместимостью 0,6 $см^3$ вносят 125 $мм^3$ реагента «*RT-mix*», добавляют 5 $мм^3$ реагента «*RT-G-mix*-1» и 6 $мм^3$ обратной транскриптазы «*M-MLV*», тщательно перемешивают.

9.3 В микропробирки вместимостью 0,6 $см^3$ вносят по 10 $мм^3$ готовой реакционной смеси по 9.2 и по 10 $мм^3$ РНК-проб, полученных в соответствии с разделом 8. Осторожно перемешивают пипетированием. Инкубируют пробирки в течение 30 мин в термостате при температуре 37 °С. Полученный препарат кДНК разводят в два раза ДНК-буфером, аккуратно перемешивают пипетированием.

9.4 Срок хранения готового препарата кДНК при температуре не выше минус 16 °С — не более семи дней или при температуре не выше минус 68 °С — не более одного года.

10 Амплификация фрагментов генома вирусных штаммов методом ПЦР

10.1 Для идентификации штаммов вируса НБ используют две пары праймеров, позволяющих амплифицировать фрагмент *F*-гена длиной 442 п. н. и фрагмент *M*-гена длиной 1051 п. н., в соответствии с таблицей 1.

Таблица 1 — Праймеры для идентификации штаммов вируса НБ

Наименование праймера	Направление праймера	Нуклеотидная последовательность	Положение*
NDF-1	Прямой	5'-CTCTTGA(T/C)GG(C/T)AG(G/A)CCTCT(T/C)GC-3'	4635 — 4656
NDF-2	Обратный	5'-GCCACTGCTAGTTG(T/G/C)GATAATCC-3'	5076– 5054
NDM-3	Прямой	5'-GGAGTGCCC(C/T)(A/G)ATTGTGCCAAGATG-3'	3268 — 3292
NDM-4	Обратный	5'-GTGGTC(A/G)G(C/A)(G/A)GTCAC(T/C)GCGAC-3'	4318 — 4298
* Указаны позиции первого и последнего нуклеотида соответствующего праймера относительно последовательности генома вируса НБ с регистрационным номером *AY*845400 в базах данных.			

10.2 Для идентификации штаммов вируса ИБК используют пару праймеров, позволяющую амплифицировать фрагмент *S*-гена длиной 467 п. н., в соответствии с таблицей 2.

Таблица 2 — Праймеры для идентификации штаммов вируса ИБК

Наименование праймера	Направление праймера	Нуклеотидная последовательность	Положение*
IBV-S-1	Прямой	5'-ATAATACTGG(C/T)AA(C/T)TTTTCAGATGG-3'	21071 — 21095
IBV-S-2	Обратный	5'-CTCACCTN(A/T/G)ATAAACACC(C/T)TTAC-3'	21537 — 21515
* Указаны позиции первого и последнего нуклеотида соответствующего праймера относительно последовательности генома вируса ИБК с регистрационным номером *FJ*904721 в базах данных.			

10.3 Для идентификации штаммов вируса ИББ используют пару праймеров, позволяющую амплифицировать фрагмент *VP*2-гена длиной 743 п. н., в соответствии с таблицей 3.

Таблица 3 — Праймеры для идентификации штаммов вируса ИББ

Наименование праймера	Направление праймера	Последовательность	Положение*
IBDV-VP2-1	Прямой	5'-GGCCCAGAGTCTACACCATAAC-3'	735 — 756
IBDV-VP2-2	Обратный	5'-CCGGATTATGTCTTTGAAGCC-3'	1477 — 1457
Указаны позиции первого и последнего нуклеотида соответствующего праймера относительно последовательности генома вируса ИББ с регистрационным номером *JQ411012* в базах данных.			

10.4 Для проведения ПЦР готовят мастермикс «ПЦР-смесь-1», смешивая по 0,10 $см^3$ растворов прямого и обратного ПЦР-праймеров, 0,25 $см^3$ раствора дНТФ и 0,05 $см^3$ деионизованной воды.

10.5 Эффективность экстракции РНК и реакции ОТ проверяют с помощью ПЦР-выявления в анализируемых пробах ВКО, добавленного на этапе экстракции РНК по 8.2.

10.6 Для ПЦР используют среднестенные микропробирки вместимостью 0,6 $см^3$ или тонкостенные вместимостью 0,2 $см^3$ в зависимости от типа амплификатора. Для повышения специфичности применяют «горячий старт» с восковой прослойкой, для чего воск расплавляют в термостате при температуре 90 °С.

10.7 В микропробирки по 10.6 вносят по 5 $мм^3$ «ПЦР-смеси-1», полученной по 10.4, наслаивают сверху по 10 $мм^3$ расплавленного воска так, чтобы он полностью накрыл жидкость. Закрывают крышки, делают пометки с наименованием используемой пары праймеров. Если воск покрыл жидкость неровно или образовались пузыри, прогревают пробирки в термостате в течение 1 мин при температуре 95 °С и охлаждают.

Срок хранения мастермикса «ПЦР смесь-1» под воском при температуре минус 20 °С — не более шести месяцев.

10.8 Для амплификации в микропробирки по 10.7 на поверхность наносят по 10 $мм^3$ «ПЦР-смеси-2» по 5.3, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с «ПЦР-смесью-1». В противном случае пробирку считают браком и утилизируют.

При использовании амплификаторов без нагреваемой крышки в микропробирки добавляют по капле (примерно 25 $мм^3$) вазелинового масла.

Затем в одну микропробирку вносят 10 $мм^3$ $К_В$, а в остальные — по 10 $мм^3$ кДНК анализируемых проб.

10.9 В двух микропробирках ставят контрольные реакции амплификации по ГОСТ Р 52833:

- отрицательный контроль ПЦР К- — вместо ДНК-пробы вносят 10 $мм^3$ ДНК-буфера;
- положительный контроль ПЦР К+ — вместо ДНК-пробы вносят 10 $мм^3$ ПКО (2×10^3 геномных эквивалентов вирусной кДНК в кубических сантиметрах).

10.10 Запускают на амплификаторе программу термоциклирования в соответствии с таблицей 4.

Таблица 4 — Программы для амплификации кДНК вирусов НБ, ИБК и ИББ на термоциклерах с активным регулированием температуры по раствору в пробирке

Наименование праймеров	Температура*, °С	Время*, с	Число циклов*
NDF-1/NDF-2	95	Пауза	
	95	300	1
	95	10	40
	60	10	
	72	10	
	72	300	1
	10	Хранение	

Окончание таблицы 4

Наименование праймеров	Температура*, °С	Время*, с	Число циклов*
NDM-3/NDM-4	95	Пауза	
	95	300	1
	95	20	40
	63	20	
	72	40	
	72	300	1
	10	Хранение	
IBV-S-1/IBV-S-2	95	Пауза	–
	95	300	1
	95	20	40
	50	20	
	72	40	
	72	300	1
	10	Хранение	
IBDV-VP2-1/IBDV-VP2-2	95	Пауза	
	95	300	1
	95	20	40
	55	20	
	72	40	
	72	300	1
	10	Хранение	

* Приведенные режимы ПЦР оптимизированы на термоциклерах «Терцик», «*GeneAmp PCR System* 2400» и «*Applied Biosystems*® 2720 *Thermal Cycler*».

При достижении температуры 95 °С микропробирки по 10.8 и 10.9 помещают в ячейки амплификатора и снимают программу с паузы.

После завершения реакции микропробирки отправляют в помещение детекции и учета результатов ПЦР методом электрофореза в соответствии с разделами 11 и 12.

10.8 Срок хранения анализируемых проб после амплификации при комнатной температуре — не более 16 ч, при температуре от 2 °С до 8 °С — не более семи дней, при температуре минус 16 °С — не более шести месяцев.

11 Детекция ПЦР-продуктов методом электрофореза в агарозном геле

11.1 Подготовка к испытанию

11.1.1 Готовят рабочий электрофорезный буфер: в мерный цилиндр вливают 50 $см^3$ ТБЭ-буфера, доводят дистиллированной водой до 500 $см^3$ и перемешивают.

11.1.2 Берут 1,7 г агарозы для электрофореза ДНК, помещают в стеклянную колбу из термостойкого стекла вместимостью 250 $см^3$. Наливают 100 $см^3$ рабочего электрофорезного буфера по 11.1.1, перемешивают вращением колбы и плавят в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности одной колбой — 1,5 мин.

11.1.3 Вынимают колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешивают, вращая колбу.

11.1.4 После этого вновь помещают колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 мин (при мощности 800 Вт), доводят агарозу до кипения.

11.1.5 Вынимают колбу из микроволновой печи и остужают агарозу до температуры 65 °С — 70 °С, вращая колбу.

11.1.6 К раствору агарозы, полученному по 11.1.5, добавляют 5 $мм^3$ раствора бромистого этидия концентрацией 10 $мг/см^3$, тщательно перемешивают раствор. Полученный агарозный гель используют для заливки в рамку камеры.

11.1.7 Выравнивают столик для заливки гелей, заливают агарозный гель, полученный по 11.1.6, в рамку камеры.

11.1.8 Устанавливают гребенки, не касаясь дна рамки камеры, на расстоянии не менее 3 см друг от друга. Толщина агарозного геля должна быть около 0,6 см.

11.1.9 После полного застывания агарозного геля (30 мин при комнатной температуре), осторожно вынимают из него гребенки, не повредив лунки. Помещают рамку с готовым агарозным гелем в камеру так, чтобы лунки располагались ближе к отрицательному электроду. Заливают в камеру рабочий электрофорезный буфер по 11.1.1 так, чтобы он полностью покрыл агарозный гель.

11.2 Проведение электрофореза

11.2.1 Из пробирок с продуктами амплификации по 10.7 отбирают по 10 $мм^3$ анализируемых проб и вносят в лунки агарозного геля. В каждом ряду лунок агарозного геля обязательно вносят К+ и маркер молекулярных масс ДНК по 5.3.

11.2.2 Подключают камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК должна двигаться в направлении положительного электрода). Электрофорез проводят при напряжении от 180 до 250 В в течение 20 — 30 мин, при этом краситель крезоловый красный, входящий в «ПЦР-смесь-2», должен продвинуться не менее чем на 2 см от старта. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.

11.2.3 По завершении времени электрофореза выключают источник тока, переносят рамку с гелем на УФ-трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получают изображение агарозного геля (электрофореграмму) на компьютере с помощью видеосистемы.

12 Учет результатов ПЦР

12.1 Учет результатов ПЦР проводят по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК. Длина амплифицированных специфических фрагментов ДНК:

- фрагмента *F*-гена вируса НБ — 442 п. н.;
- фрагмента *M*-гена вируса НБ — 1051 п. н.;
- фрагмента *S*-гена вируса ИБК — 467 п. н.;
- фрагмента *VP2*-гена вируса ИББ — 743 п. н.

Длина фрагмента ВКО указана в инструкции по его применению.

12.2 Учет начинают с оценки результатов амплификации положительных и отрицательных контролей по ГОСТ Р 52833 в соответствии с таблицей 5.

Таблица 5 — Ожидаемый результат амплификации положительных и отрицательных контролей ПЦР

Контроль	Наличие специфической полосы на электрофореграмме, соответствующей				
	ВКО	фрагменту *F*-гена вируса НБ	фрагменту *M*-гена вируса НБ	фрагменту *S*-гена вируса ИБК	фрагменту *VP2*-гена вируса ИББ
Экстракции РНК, $К_В$	+	–	–	–	–
ПЦР, К-	–	–	–	–	–
ПЦР, К+	+	+	+	+	+
Примечание — Знак «+» означает, что обнаружен ПЦР-продукт, знак «–» — не обнаружен.					

В дорожках К+ и $К_В$ с ВКО должна быть яркая светящаяся полоса соответствующего размера.

В дорожках К+ с ПКО вирусов НБ, ИББ и ИБК должны наблюдаться специфические полосы амплифицированной ДНК соответствующей длины по 12.1.

В дорожках К- и $К_В$, кроме $К_В$ с ВКО, не должно быть никаких полос, за исключением возможных димеров праймеров, находящихся ниже уровня 100 п. н.

12.3 Если результаты анализа положительных и отрицательных контролей не соответствуют приведенным в таблице 5, испытание повторяют со следующих этапов:

- если в дорожках отрицательных контролей $К_В$ и/или К- выявляется специфическая полоса, значит, произошла контаминация реактивов или проб. Принимают меры по выявлению источника контаминации. Повторяют испытание в соответствии с разделом 7;

- если в пробах с ВКО не выявляется соответствующая специфическая полоса, необходимо повторить испытание в соответствии с разделом 7;

- если в дорожках К+ не выявляются специфические полосы, повторяют испытание с этапа ПЦР по 10.7;

- если в дорожках электрофореграммы наблюдаются неспецифические полосы на разных уровнях, то испытание повторяют с этапа ПЦР по 10.7. Возможные причины неспецифической амплификации — отсутствие «горячего старта» или неверный температурный режим в ячейках амплификатора.

12.4 Если результаты амплификации контролей не противоречат ожидаемому результату в соответствии с таблицей 5, учитывают результаты амплификации анализируемых проб. Интерпретацию результатов ПЦР-амплификации проводят в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6 — Интерпретация результатов ПЦР-амплификации анализируемых проб

Результат ПЦР-анализа	Специфическая полоса на электрофореграмме, соответствующая			
	фрагменту *F*-гена вируса НБ	фрагменту *M*-гена вируса НБ	фрагменту *S*-гена вируса ИБК	фрагменту *VP2*-гена вируса ИББ
Выявлена кДНК вируса НБ	+	+	–	–
Выявлена кДНК вируса ИБК	–	–	+	–
Выявлена кДНК вируса ИББ	–	–	–	+
Выявлена кДНК вирусов НБ, ИББ, ИБК	+	+	+	+
Выявлена кДНК вирусов НБ, ИБК	+	+	+	–
Выявлена кДНК вирусов ИБК, ИББ	–	–	+	+
Выявлена кДНК вирусов НБ, ИББ	+	+	–	+
кДНК вирусов не выявлена	–	–	–	–
Примечание — Знак «+» означает, что обнаружен ПЦР-продукт, знак «—» — не обнаружен.				

12.5 Для анализируемых проб, содержащих кДНК вируса, в дорожке должна наблюдаться яркая светящаяся полоса на уровне, соответствующем ПКО данного вируса.

12.6 Оценивают концентрацию ПЦР-продукта, сравнивая визуально интенсивность свечения соответствующей ему полосы и полос маркера молекулярных масс ДНК по 5.3 на электрофореграмме. Испытания (секвенирование ДНК) пробы продолжают при условии, если свечение полосы ПЦР-продукта той же интенсивности или более интенсивно по отношению к свечению полос маркера молекулярных масс ДНК.

12.7 В случае, если полоса ПЦР-продукта менее интенсивна по отношению к полосам маркера молекулярных масс ДНК, то проводят повторное испытание, начиная с этапа выделения РНК.

Примечание — Низкий уровень или отсутствие амплификации фрагмента генома вируса может быть в некоторых случаях обусловлено неполным соответствие нуклеотидной последовательности штамма вируса и используемых ПЦР-праймеров. В подобных случаях рекомендуется разрабатывать специфические данному штамму вируса праймеры на основании сведений о особенностях его генетической структуры.

13 Секвенирование амплифицированных фрагментов генома

13.1 Очистка ПЦР-продукта

13.1.1 Перед секвенированием амплифицированного фрагмента генома проводят очистку ПЦР-продукта, полученного в соответствии с разделом 10, от невключившихся праймеров и дНТФ.

13.1.2 Для очистки берут 0,5 — 2,0 мм^3 ПЦР-продукта, добавляют 2 мм^3 реагента для очистки продуктов ПЦР по 5.3 и перемешивают пипетированием.

13.1.3 Полученный по 13.1.2 раствор инкубируют при температуре 37 °С в течение 15 мин. Затем встряхивают и осаждают капли кратковременным центрифугированием и снова инкубируют при температуре 80 °С в течение 15 мин.

13.2 Проведение секвенирования

13.2.1 Очищенные в соответствии с 13.1 ПЦР-продукты секвенируют с прямого и обратного праймеров. Для *F*-гена вируса НБ и *S*-гена вируса ИБК в реакцию секвенирования берут 20 нг соответствующего ПЦР-продукта (ДНК); для продуктов амплификации *M*-гена вируса НБ и *VP*2 гена вируса ИБК — 40 нг.

13.2.2 Для проведения реакции в тонкостенные микропробирки вместимостью 0,2 см^3 вносят необходимое количество ДНК по 13.2.1, 0,8 мм^3 специфичного праймера молярной концентрации 1 мкмоль/дм^3, а также 1 мм^3 смеси реагента для секвенирования по 5.3. При этом общий объем реакционной смеси должен быть 5 мм^3.

13.2.3 Термоциклирование проводят на амплификаторах с термостатируемой крышкой, соблюдая следующий режим:

а) начальная денатурация — 1 мин при температуре 96 °С;

б) затем 25 циклов:

1) денатурация при температуре 96 °С — 10 с;

2) отжиг праймера — 5 с;

3) элонгация праймера при температуре 60 °С — 4 мин.

13.2.4 Отжиг в реакции секвенирования проводят при температуре:

- 60 °С — для праймеров *NDF*1, *NDR*2, *NDM*3 и *NDM*4;
- 55 °С — для праймеров *IBDV-VP*2-1 и *IBDV-VP*2-2;
- 50 °С — для праймеров *IBV-S*-1 и *IBV-S*-2.

13.2.5 Полученные после амплификации продукты секвенирования — реакционную смесь объемом 5 мм^3 — используют для дальнейшего испытания в соответствии с разделом 14.

14 Определение нуклеотидной последовательности фрагментов геномов штаммов вирусов методом капиллярного электрофореза

14.1 Подготовка анализируемой пробы с продуктами секвенирования

14.1.1 Проводят очистку реакционной смеси, полученной в соответствии с 13.2, от избытка дНТФ, флуоресцентно-меченных ддНТФ, секвенирующего праймера и солей осаждением полинуклеотидов изопропиловым спиртом. Для этого к реакционной смеси объемом 5 мм^3 в

микропробирке добавляют 30 мм^3 75 %-ного изопропилового спирта и инкубируют в течение 20 мин при комнатной температуре.

14.1.2 Микропробирки с полученной по 14.1.1 смесью центрифугируют при 14000 об./мин в течение 20 мин и удаляют надосадочную жидкость.

14.1.3 К полученному осадку добавляют 100 мм^3 75 %-ного изопропилового спирта, центрифугируют при 14000 об./мин в течение двух минут и удаляют надосадочную жидкость.

14.1.4 Высушивают полученный по 14.1.3 осадок в термостате при температуре 65 °С в течение 10 мин и растворяют в 20 мм^3 формамида по 5.3.

14.1.5 Полученные анализируемые пробы в формамиде переносят в 96-луночный планшет, закрывают уплотнителем и подвергают тепловой денатурации при температуре 95 °С в течение 3 мин, а затем при температуре 4 °С — в течение 5 мин.

14.2 Проведение капиллярного электрофореза

14.2.1 Подготовленные в соответствии с 14.1 анализируемые пробы, содержащие продукты секвенирования, разделяют методом капиллярного электрофореза с детекцией сигнала флюоресценции.

14.2.2 Подготовку, все этапы испытания и интерпретацию результатов выполняют в соответствии с инструкцией по эксплуатации генетического анализатора по 5.2.

14.2.3 Программное обеспечение генетического анализатора автоматически анализирует полученные сигналы (хроматограммы) и определяет последовательность нуклеотидов. Результатом анализа является расшифрованная последовательность нуклеотидов, приведенная над пиками хроматограммы в формате *abi* файла.

14.3 Контроль качества секвенирования

14.3.1 Для оценки качества секвенирования, поиска причин и путей устранения проблем рекомендуется использовать примеры типовых результатов, приведенные в приложении А. Для последующей идентификации вакцинных штаммов в соответствии с разделом 15 используют нуклеотидные последовательности на хроматограммах, полученных по 14.2.3, с высокой интенсивностью сигнала флюоресценции и хорошо разделенными пиками.

14.3.2 Дополнительно вручную проверяют корректность чтения нуклеотидов в целях исключения ошибки автоматического анализа. Удаляют плохо читаемые из-за всплесков фона нуклеотиды в начале хроматограммы и область праймера на конце секвенируемого ПЦР-продукта. В случае присутствия на хроматограмме в некоторых позициях нуклеотидной последовательности генетической неоднородности устанавливают обозначение неопределенного нуклеотида «*N*» (см. таблицу А.1, пункт 5).

14.3.3 Подтверждают достоверность определения нуклеотидной последовательности, объединяя перекрывающиеся фрагменты с прямого и обратного праймеров с помощью алгоритма *CLUSTAL*.

15 Идентификация вирусных штаммов и интерпретация результатов испытания

15.1 Для идентификации штаммов вирусов испытуемых вакцин сравнивают полученную в соответствии с разделом 14 нуклеотидную последовательность фрагмента генома с известными последовательностями вирусных штаммов.

15.2 Для поиска гомологичных последовательностей сравнивают нуклеотидную последовательность фрагмента генома вакцинного штамма в текстовом формате с последовательностями, имеющимися в базах данных с использованием алгоритма *BLAST*. Отчет о поиске представляется в виде списка последовательностей штаммов/изолятов, с которыми полученная в результате испытания нуклеотидная последовательность имеет наибольшую гомологию.

В случае если нуклеотидная последовательность фрагмента генома штамма вируса испытуемой вакцины отсутствует в базах данных, обращаются к—производителю вакцины для получения дополнительной информации о генетической структуре штамма.

15.3 Если полученная нуклеотидная последовательность имеет 100 %-ную гомологию с аналогичным участком генома штамма вируса, заявленного в сопроводительной документации

вакцины, принимают, что не выявлено генетических отличий штамма испытуемой вакцины от заявленного.

15.4 Если полученная нуклеотидная последовательность имеет незначительные отличия от последовательности заявленного штамма (более 99 % гомологии), принимают, что штамм испытуемой вакцины имеет высокую степень гомологии с заявленным, с указанием выявленных отличий.

15.5 В случае значительных отличий полученной нуклеотидной последовательности от заявленного штамма (менее 99 % гомологии) принимают, что штамм испытуемой вакцины не соответствует заявленному штамму с указанием выявленных нуклеотидных отличий.

15.6 В случае значительных отличий полученной нуклеотидной последовательности от заявленного штамма и при условии высокой гомологии с аналогичным участком генома другого штамма (более 99 % гомологии), принимают, что полученная нуклеотидная последовательность принадлежит незаявленному штамму, указывают его название, происхождение и степень генетических отличий от заявленного.

15.7 Если полученная нуклеотидная последовательность имеет генетическую неоднородность в отдельных положениях (см. таблицу А.1, пункт 5), принимают, что штамм испытуемой вакцины генетически неоднороден.

15.8 Если полученная нуклеотидная последовательность имеет генетическую неоднородность, но возможность установления родства с определенным штаммом или изолятом вируса сохраняется, принимают, что штамм испытуемой вакцины имеет генетическую неоднородность с указанием наиболее гомологичных последовательностей.

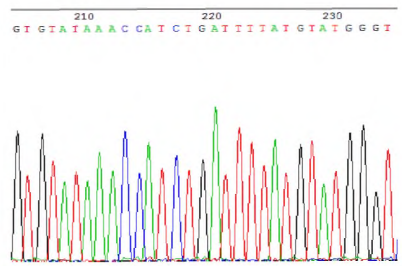
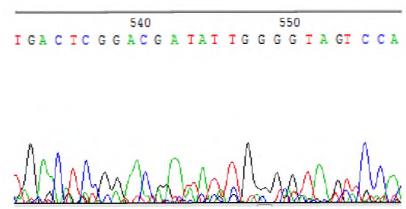
15.9 В случаях, описанных в 15.5, 15.6 и 15.8, результаты испытания рекомендуется дополнять результатами филогенетического анализа, наглядно представляющего уровень нуклеотидных различий полученной нуклеотидной последовательности и последовательностей из баз данных.

Приложение А
(справочное)

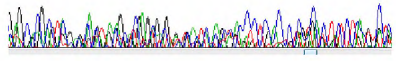
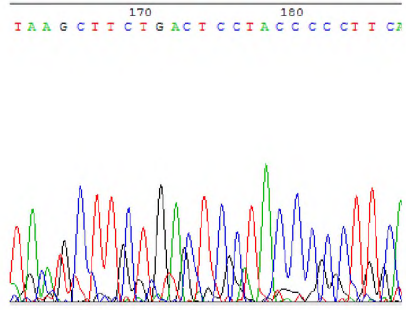
Примеры результатов секвенирования ДНК

А.1 Примеры результатов секвенирования ДНК, возможные причины неудачных испытаний и пути устранения проблем приведены в таблице А.1.

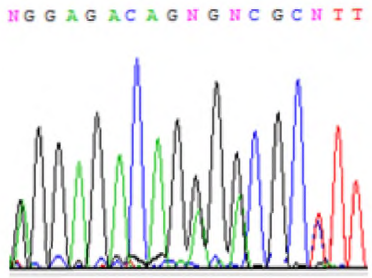
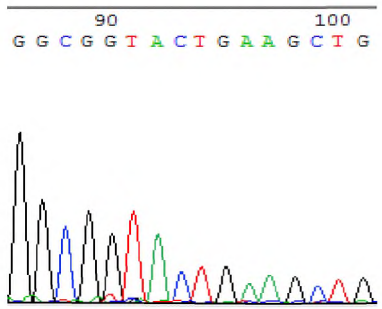
Таблица А.1

№ п.п	Полученный результат	Фрагмент хроматограммы	Возможные причины	Устранение проблем
1	Интенсивность сигнала высокая, пики хорошо разделены		Норма	–
2	Сигнал чтения матрицы ДНК идет на фоне выраженного шума прибора, «слабый сигнал»		Недостаточное количество матрицы в анализируемой пробе	Увеличение концентрации ДНК матрицы на этапе проведения реакции секвенирования

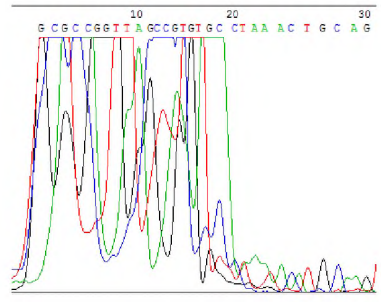
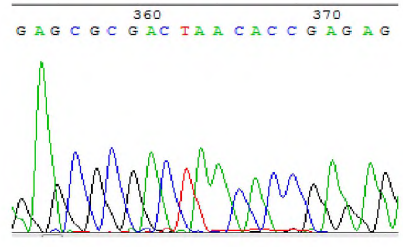
Продолжение таблицы А.1

№ п.п	Полученный результат	Фрагмент хроматограммы	Возможные причины	Устранение проблем
3	Отсутствие выраженных пиков, сигнал на уровне шума прибора		1) В реакционную смесь не добавлен один из компонентов: готовая смесь для секвенирования, матрица или праймер; 2) Недостаточное количество матрицы в анализируемой пробе; 3) Праймер не комплементарен данной матрице	Повторение испытания с этапа проведения реакции секвенирования. В случае воспроизведения неудачного результата испытание повторяют с этапа выделения РНК вируса
4	Основной сигнал чтения матрицы ДНК идет на фоне более или менее выраженного второго сигнала или нескольких сигналов		Нарушение режима ПЦР, приводящее к появлению неспецифических продуктов амплификации	Повторное испытание анализируемой пробы, начиная с этапа ПЦР

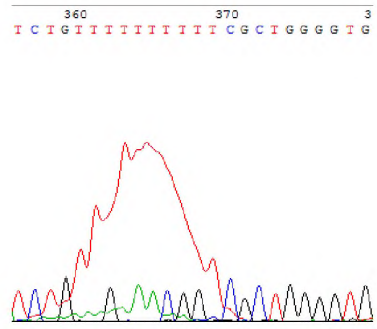
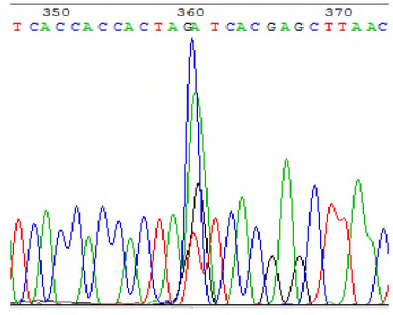
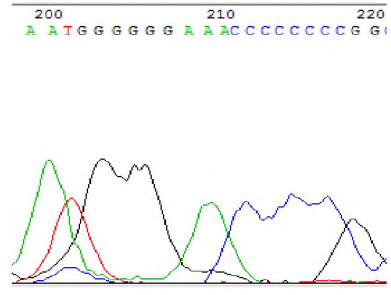
Продолжение таблицы А.1

№ п.п	Полученный результат	Фрагмент хроматограммы	Возможные причины	Устранение проблем
5	Гетерогенность сигнала в отдельных положениях хроматограммы		Присутствие в анализируемой пробе нескольких генетически различающихся форм вируса	Повторное испытание анализируемой пробы, начиная с этапа ПЦР. В случае повторного получения аналогичных данных интерпретация результатов по 15.7 и 15.8
6	Пики очень высокой интенсивности в начале хроматограммы, быстрое падение сигнала, короткое прочтение матрицы		Перегрузка реакционной смеси ДНК матрицей, в результате чего нарабатывается одновременно слишком много коротких фрагментов, амплификация длинных фрагментов тормозиться недостатком флуоресцентно-меченных ддНТФ	Уменьшение концентрации ДНК матрицы на этапе проведения реакции секвенирования

Продолжение таблицы А.1

№ п.п	Полученный результат	Фрагмент хроматограммы	Возможные причины	Устранение проблем
7	Перегрузка короткими фрагментами матрицы (20 — 40 п. н.) в начале хроматограммы, далее высота пиков резко снижается		Присутствие в анализируемой пробе большого количества димеров праймеров, образовавшихся в результате ПЦР	Повторение испытание, начиная с этапа ПЦР. Улучшение качества очистки ДНК матрицы для секвенирования (например, вырезание фрагмента основного продукта ПЦР из агарозного геля)
8	Пики на хроматограмме слева имеют крутые края, а справа — пологие		Загрязнение матрицы побочными веществами, например, солями	Повторяют испытание с этапа очистки ПЦР продукта, используют альтернативные методы очистки (например, переосаждение ДНК этиловым спиртом в присутствии ацетата калия)

Окончание таблицы А.1

№ п.п	Полученный результат	Фрагмент хроматограммы	Возможные причины	Устранение проблем
9	Всплески флюоресценции несвязавшихся во время ПЦР-реакции флюоресцентно-меченных терминаторов		Недостаточно эффективная очистка реакционной смеси от несвязавшихся флюоресцентно-меченных терминаторов	Оптимизация условий реакции секвенирования. Оптимизация условий очистки реакционной смеси, использование других доступных наборов реагентов
10	Появление в произвольном месте узкого и высокого пика всех четырех цветов		Попадание в капилляр кристалла полимера, дефект электрофореза	Повторение этапа капиллярного электрофореза анализируемой пробы
11	Размывание пиков на хроматограмме		Ухудшение качества полимера, истощение буферного раствора, загрязнение капилляров	Проведение технического обслуживания анализатора с заменой буфера и полимера. Повторение этапа капиллярного электрофореза анализируемой пробы

Библиография

[1] МУ 1.3.2569–2009 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I — IV групп патогенности

[2] СП 1.3.2322–2008 Безопасность работы с микроорганизмами III — IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней

УДК 619:578.831.11:578.834.11:636.5:006.354 ОКС 11.220

Ключевые слова: вакцина против болезни Ньюкасла, вакцина против инфекционной бурсальной болезни, вакцина против инфекционного бронхита кур, ПЦР, секвенирование ДНК, выделение нуклеинового материала, реакция обратной транскипции, определение нуклеотидной последовательности, идентификация вакцинных штаммов

Подписано в печать 03.03.2015. Формат 60х84⅛.
Усл. печ. л. 3,26. Тираж 31 экз. Зак. 1039

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»,
123995 Москва, Гранатный пер., 4.

gost.e-ecolog.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru