

УДК 001. 891. 577.214

**Назар Б. І., к.вет.н. ©***Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів, Україна***ПРОБЛЕМИ, ЯКІ ВИНИКАЮТЬ ПІД ЧАС ПРОВЕДЕННЯ ПОЛІМЕРАЗНО-ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ (ПЛР) ТА МОЖЛИВІСТЬ ЇХ УНИКНЕННЯ**

*Проведено аналіз можливих помилок та проблем, що можуть виникати в процесі проведення полімеразно-ланцюгової реакції на преаналітичному, аналітичному та постаналітичному етапах. Подано основні заходи щодо недопущення виникнення контамінації і, як наслідок, отримання хибно позитивних або хибно негативних результатів. Із метою підтвердження відсутності контамінації, необхідно кожну серію експериментів супроводжувати постановкою негативних контролів (К-). Для контролю за якістю проходження основних етапів аналізу (відбір, транспортування, зберігання, виділення НК, проведення реакції зворотної транскрипції чи безпосередньо реакції ампліфікації) обов'язковим є використання позитивних контролів (К+), що дозволяють оцінити ефективність реакції і якість реагентів. Висвітлено декілька способів усунення контамінації. Вказано на необхідність проводити регулярний внутрішньолaboratorний контроль якості досліджень із періодичністю, яка залежить від обсягу роботи. Основними критеріями оцінки якості роботи ПЛР-лабораторії є результати внутрішнього і зовнішнього лабораторного контролю якості досліджень, а також відсутність випадків лабораторної контамінації НК.*

**Ключові слова:** полімеразно-ланцюгова реакція, нуклеїнова кислота, контамінація, хибно позитивний результат, хибно негативний результат.

УДК 001. 891. 577.214

**Назар Б. И., к. вет. н.***Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок, м. Львов, Украина***ПРОБЛЕМЫ, КОТОРЫЕ ВОЗНИКАЮТ ВО ВРЕМЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПОЛИМЕРАЗНО-ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР) И ВОЗМОЖНОСТЬ ИХ ИЗБЕЖАНИЯ**

*Проведен анализ возможных ошибок и проблем, которые могут возникать в процессе проведения полимеразной цепной реакции на преаналитическом, аналитическом и постаналитическом этапах. Представлены основные мероприятия по недопущению возникновения контаминации и, как следствие, получение ложно положительных или ложно отрицательных результатов. С целью подтверждения отсутствия контаминации необходимо каждую серию экспериментов сопровождать постановкой негативных контролей (К-). Для контроля за качеством прохождения основных этапов анализа (отбор, транспортировка, хранение, выделения НК, проведения реакции обратной транскрипции или непосредственно реакции амплификации) необходимо использовать положительные контроли (К+), позволяющие оценить эффективность реакции и качество реагентов. Освещены несколько способов устранения загрязнений. Указано необходимость проводить регулярный внутри-laboratorный контроль качества исследований с периодичностью, которая зависит от объема работы. Основными критериями оценки качества работы ПЦР-лаборатории являются результаты внутреннего и внешнего лабораторного контроля качества исследований, а также отсутствие случаев лабораторной контаминации НК.*

UDC 001. 891. 577.214

**Nazar. I.***State scientific-research control Institute of veterinary preparations  
and fodder additives, Lviv, Ukraine***PROBLEMS THAT OCCUR DURING THE POLYMERASE-CHAIN REACTION  
(PCR) AND THE ABILITY TO AVOID THEM**

*The analysis of possible errors and problems that may arise in the process of polymerase chain reaction to pre-analytical, analytical and post-analytical stages. The basic measures for prevention of occurrence of contamination and consequently obtaining false positive or false negative results. In order to confirm the absence of contamination, should accompany each experiment staging a series of negative controls (K-). For quality control passage of the main stages of analysis (selection, transportation, storage, allocation of IPC reverse transcription reaction or direct reaction amplification) is required to use a positive control (C+), to assess the effectiveness and quality of reaction reagents. Deals are several ways to eliminate contamination. Specified the need to conduct regular internal laboratory quality control studies with frequency depending on the workload. The main criteria for assessing the quality of PCR laboratory are results of internal and external quality control of laboratory studies and the lack of laboratory cases of contamination NC.*

Перевагами полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР), порівняно з іншими методами, є універсальність, специфічність, чутливість, актуальність відповіді (швидкість отримання результату).

Метою роботи є оглядове висвітлення причини виникнення помилок та методи їхнього усунення після проведення ПЛР. У рамках статті ми звернемо особливу увагу на проблему контамінації та основні шляхи її попередження. Контамінація – потрапляння із навколишнього середовища в реакційну суміш специфічних і неспецифічних молекул ДНК, здатних служити мішенями в реакції ампліфікації і давати хибно позитивні або хибно негативні результати [1–3].

За проведення ПЛР-аналізу виникнення помилок можливе на преаналітичному, аналітичному та постаналітичному етапах. Це може призвести як до хибно позитивних (ХП) (позитивний результат дослідження, коли фрагмент специфічної ділянки нуклеїнової кислоти (НК) у матеріалі відсутній), так і хибно негативних (ХН) (негативний результат за наявності НК в зразку) результатів.

На преаналітичному етапі важливу роль слід приділити правильності відбору матеріалу. Для попередження виникнення ХП помилок при відборі проби слід використовувати виключно стерильні одноразові ємності, рукавиці, пробірки, оскільки за недотримання цих правил виникає ризик контамінації відібраного матеріалу «чужорідною» НК.

На аналітичному етапі правильна організація ПЛР-лабораторії має принципове значення для отримання вірогідних результатів і суттєво залежить від методу детекції продуктів ампліфікації.

За умов використання методу горизонтального електрофорезу, етапу детекції необхідно приділяти особливу увагу, адже він є основним джерелом контамінації. Приміщення для електрофорезу має бути розміщене в такому місці, що виключає попадання ампліконів в інші технологічні зони лабораторії. Окрім цього потрібний окремий співробітник, ретельно продумана система вентиляції, відсутність можливості переміщення пробірок, штативів та іншого обладнання із кімнати для електрофорезу в інші приміщення.

У роботі співробітника, що займається ПЛР-діагностикою, трапляються два види контамінації: перша – перехресна контамінація від проби до проби (наприклад, у процесі обробки клінічних зразків), що веде до появи спорадичних хибно позитивних результатів і друга – контамінація продуктами ампліфікації (ампліконами), яка має найбільше значення, адже в процесі ПЛР амплікони накопичуються у великих кількостях і слугують ідеальними продуктами для реампліфікації.

До появи систематичних хибно позитивних результатів призводить контамінація залишковими кількостями ампліконів посуду, автоматичних піпеток, лабораторного обладнання, поверхонь лабораторних столів і навіть поверхні шкіри співробітників лабораторії.

Зазвичай визначити джерело контамінації буває дуже важко, а сам процес її ліквідації потребує значних витрат часу та засобів. Дотримання вимог, що ставляться до планування приміщень ПЛР-лабораторій і проведення самих аналізів, виключає можливість контамінації та отримання хибно позитивних результатів. У кожному приміщенні ПЛР-лабораторії має бути достатній набір реагентів, автоматичних піпеток, наконечників, пластикового і скляного посуду, лабораторного обладнання, халатів і рукавиць, що використовуються тільки в даному приміщенні і не виносяться в інші. Обладнання, матеріали та інвентар у кожній кімнаті відповідним чином маркуються.

За умов досліджень із використанням ампліфікації нуклеїнових кислот, обов'язкове забезпечення потоковості руху матеріалу, проб НК, продуктів ампліфікації. Робота у лабораторії має бути організована тільки в одному напрямку від пре-ПЛР-приміщень до пост-ПЛР-приміщень.

Для усунення контамінації безпосередньо під час ампліфікації існує декілька способів. Одним із них є використання ензиму N-урацил-глікозилази (УГ), який розщеплює молекули ДНК, що містять у своєму складі урацил. Реакцію ампліфікації проводять із використанням суміші dNTPs, в якій dTTP замінений на dUTP, і в результаті термоциклювання всі амплікони, що утворилися в пробірці міститимуть урацил. Якщо додати в реакційну суміш УГ перед етапом ампліфікації, то амплікони, що потрапили в реакційну суміш зруйнуються, а нативна ДНК залишиться неушкодженою і слугуватиме в подальшому мішенню в реакції ампліфікації. Інший спосіб інактивації ампліконів – фотохімічний вплив на молекули ДНК. Із цією метою використовують сполуки псоралену, які активуються короткочасною дією ультрафіолетового світла. Модифіковані цими сполуками молекули ДНК не можуть брати участь в реакції ампліфікації [3]. Але жоден із цих методів не дає 100% гарантії уникнення контамінації, а отже існує ризик отримання ХП та ХН результатів. Із метою підтвердження відсутності контамінації, необхідно кожну серію експериментів супроводжувати постановкою негативних контролів (К-). Як К- можуть використовуватися: вода, реакційна суміш, зразки генетичного матеріалу, які негативні за ДГ. Для контролю за якістю проходження основних етапів аналізу (відбір, транспортування, зберігання, виділення НК, проведення реакції зворотної транскрипції чи безпосередньо реакції ампліфікації) обов'язковим є використання позитивних контролів (К+), що дозволяють оцінити ефективність реакції і якість реагентів. Для проведення кількісного ПЛР-аналізу слід використовувати серію калібраторів, що містять кількісно охарактеризовані ДГ, які використовуються для побудови калібрувальних прямих, а також в якості К+ [3]. Постановка К+, К-, калібраторів, використання УГ, сполук псоралену, знижують ризик появи ХП і ХН результатів на вищезгаданих етапах дослідження.

У ПЛР-лабораторіях необхідно проводити регулярний внутрішньолабораторний контроль якості досліджень із періодичністю, яка залежить від обсягу роботи і визначена керівником лабораторії, але не менше одного разу на квартал.

Лабораторія має брати участь у встановленому порядку в заходах (програмах) із зовнішньої оцінки якості лабораторних досліджень за конкретними показниками не менше одного разу на рік.

Внутрішньолабораторний і зовнішній контроль якості лабораторних досліджень здійснюють шляхом аналізу шифрованих атестованих контрольних панелей, які містять позитивні й негативні проби. Під час внутрішньолабораторного контролю якості використовують атестовані на наявність аналізу (його кількості) панелі виробників комерційних наборів або внутрішньолабораторні атестовані зразки, що містять і не містять НК конкретного досліджуваного матеріалу у різній концентрації, при стабільних умовах зберігання.

Контроль якості досліджень є невід'ємною складовою правильною організації роботи ПЛР-лабораторії. Він включає в себе постійне проведення внутрішньолабораторного контролю якості, передбаченого системою забезпечення якості досліджень, що діє в кожній конкретній лабораторії, і участь у програмах зовнішньої оцінки якості ПЛР-досліджень (професійне тестування).

Система забезпечення якості роботи ПЛР-лабораторії повинна передбачати систематичне проведення внутрішньолабораторного контролю якості дезінфекції (деконтамінації). Періодичність проведення внутрішньолабораторного контролю якості деконтамінації об'єктів довкілля визначається керівником лабораторії залежно від об'єму виконуваної роботи, але не рідше одного разу на квартал. У разі підозри на контамінацію внутрішньолабораторний контроль деконтамінації об'єктів довкілля лабораторії проводять негайно. Для оцінки якості деконтамінаційних заходів та виявлення можливої контамінації лабораторії НК або продуктами ампліфікації контроль проводять шляхом відбору змивів із поверхонь. Змиви з поверхонь беруть стерильними ватними тампонами (мінімальний розмір площі 10x10 см). Перед відбором змивів тампони змочують стерильним ізотонічним розчином натрію хлориду або ТЕ-буфером (10 mM Tris, 1 mM EDTA), після чого обертальними рухами протирають робочі поверхні обладнання, меблів, дверних ручок тощо.

Особливу увагу приділяють приміщенням, які відвідують усі співробітники лабораторії (кімнати прийому їжі, туалет тощо). Після відбору змиву тампон поміщають у мікропробірку типу «епендорф» з 300–400 мкл ТЕ-буфера, обертальними рухами змивають відібраний матеріал протягом 10–15 секунд, уникаючи розбризкування розчину, і, відтиснувши надлишок рідини з тампону об стінки пробірки, видаляють.

Одержані суспензії центрифугують при 8 000 g (12 000 об/хв) протягом однієї хвилини. Надосадову рідину відбирають наконечником з аерозольним бар'єром в мікропробірку об'ємом 1,5 мл. Для виділення НК використовують 0,1–0,2 мл надосадової фракції. Для дослідження слід обирати тест-системи з внутрішнім контрольним зразком. Постановка негативних контролів за виділення НК і проведенні реакції обов'язкова. Це дозволить своєчасно виявити контамінацію в лабораторії. Керівник ПЛР-лабораторії або фахівець, на якого покладені функції контролю якості (менеджер з якості), періодично проводить тестування працівників шляхом надання контрольних задач (внутрішній контроль якості досліджень). Як «позитивні» можуть бути використані:

- зразки, штучно контаміновані НК;

- зашифровані проби матеріалу, уже дослідженого в лабораторії раніше, які зберігалися за температури мінус 20 °С не більше тижня. У цих пробах визначають НК з того ж матеріалу, що за первинного дослідження;

- атестовані контрольні панелі, що містять «позитивні» і «негативні» проби. Як «негативні» - зразки, що не містять НК, наприклад, ДНК-буфер.

Кількість проб залежить від об'єму проведених досліджень і повинна бути достатньою для оцінки роботи співробітників і виявлення контамінованих ділянок лабораторії.

За проведення зовнішньої оцінки якості досліджень лабораторія-учасник отримує атестовані контрольні панелі, що містять "позитивні" і "негативні" проби. За результатами розшифровки атестованих контрольних панелей роблять висновок щодо оцінки якості ПЛР-досліджень. Основними критеріями оцінки якості роботи ПЛР-лабораторії є результати внутрішнього і зовнішнього лабораторного контролю якості досліджень, а також відсутність випадків лабораторної контамінації НК.

**Висновки.** 1. Найбільш поширений в лабораторній практиці молекулярно-біологічний метод – полімеразної ланцюгової реакції в процесі проведення потребує обов'язкового дотримання всіх вимог і правил проведення ПЛР.

2. З метою підтвердження відсутності контамінації необхідно кожен серію експериментів супроводжувати постановкою негативних контролів (К-). Для контролю за якістю проходження основних етапів аналізу обов'язковим є використання позитивних контролів (К+).

3. Для уникнення одержання хибно позитивних результатів необхідно регулярно (щоквартально) проводити внутрішньо-лабораторний контроль, а зовнішню оцінку якості роботи ПЛР-лабораторії – не менше одного разу на рік.

#### Література

1. Молекулярно-генетичні методи діагностики у ветеринарній медицині та біотехнології. / Герілович А. П., Стегній Б. Т., Завгородній А. І., Влізло В. В. та співавтори – Київ, СТ-Друк, 2014. – 286 с.

2. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції у лабораторній практиці (методичні аспекти) / М. С. Калачнюк, Л. Г. Калачнюк, Д. О. Мельничук та ін. // Біологія тварин. – 2012. – 14, №1. – С. 660–667.

3. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. пер. с англ. / под ред. С. Херрингтона и Дж. Макги. – М., 1999. – 558с.

*Стаття надійшла до редакції 3.09.2015*

УДК 636.4:591.11

**Огородник Н. З.**, к.вет.н., ст. наук. співр. (E-mail: nataohorodnyk@ukr.net)

**Віщур О. І.**, д.вет.н., професор<sup>©</sup>

*Інститут біології тварин НААН, м. Львів, Україна*

### **ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ «ІНТЕРФЛОК» НА ПАРАМЕТРИ ШИЙНИХ ЛІМФОВУЗЛІВ, МАСУ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ І ПРОДУКТИВНІСТЬ ПОРОСЯТ ПІСЛЯ ВІДЛУЧЕННЯ ВІД СВИНОМАТОК**

*Організм поросят після відлучення від свиноматок постійно перебуває під впливом багатьох факторів екзогенного і ендогенного походження, які сприяють виникненню оксидативного стресу, проявом якого є накопичення в крові і тканинах продуктів пероксидного окиснення ліпідів. У результаті цього відбуваються зміни в органах і тканинах, що призводять до дестабілізації гомеостазу в організмі поросят,*