

## ГЛАВА 2.6.3

### РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ АНАЛИЗОВ ПО ОБНАРУЖЕНИЮ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

---

#### ВВЕДЕНИЕ

*В рекомендациях МЭБ по валидации представлена подробная информация и примеры в обоснование стандарта валидации МЭБ, опубликованного в главе 1.1.6 Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных или главе 1.1.2 Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для водных животных. При упоминании термина «стандарт валидации МЭБ» в этой главе следует ориентироваться на указанные главы.*

*В настоящее время растет число методов обнаружения нуклеиновых кислот (ОНК), используемых для диагностики инфекционных заболеваний у разнообразных видов животных и человека. Наиболее широко применяемыми методами являются полимеразная цепная реакция (ПЦР), имеющая множество вариантов, методы изотермической амплификации (например, петлевая изотермическая амплификация). Дополнительно появляются новые биотехнологические инструменты диагностики, представляющие собой микроматричные (основанные на использовании твердофазных и жидкофазных микрочипов) методики. Благодаря применению амплификации эти анализы приобретают высокую аналитическую чувствительность. Существует несколько способов обнаружения продуктов амплификации, например, визуализация в агарозных гелях с использованием меченых зондов (например, зондов Taqman), обнаружения накопления продуктов в реальном времени или посредством фиксации специфичных зондов в матриксах с твердой поверхностью или на гранулах (Lauerman, 2004; Viljoen et al., 2005). Различные анализы ПЦР могут быть мультиплексированы для обнаружения нескольких мишеней в одной пробирке или для объединения целевых анализов и контрольных образцов, с образованием разных продуктов амплификации в одном реакционном сосуде. Несмотря на очевидные преимущества такого подхода, при оптимизации требуется предельная осторожность, чтобы не допустить снижения эффективности анализа. Аналогично, может быть создана ПЦР с множественными исходами при использовании одного набора праймеров в сочетании с мечеными зондами, которые связываются с другими целевыми последовательностями различных видов или штаммов, обнаруженных методом ПЦР (Wakeley et al., 2005; 2006).*

*Методики амплификации, используемые для ОНК, обычно основаны на принципе экспоненциальной амплификации заданной целевой последовательности при проведении реакции. Этот принцип обеспечивает создание метода ОНК, обладающего высокой аналитической чувствительностью и специфичностью. Вследствие такого характерного высокого уровня чувствительности, достигаемого при обнаружении НК, требуется особое внимание и, в действительности, особые предосторожности, для того чтобы не допустить контаминации ампликоном анализа последующих образцов. Такая контаминация с большей вероятностью может оказаться проблемой, если оставлять пробирки с реакционной смесью открытыми в лаборатории перед следующими стадиями, которые могут заключаться в разделении фракций в геле или проведения гнездовых анализов. Для того чтобы не допустить такой контаминации, следует использовать строгие лабораторные протоколы, в том числе проводить отдельные стадии анализа в отдельных комнатах или боксах, менять лабораторные*

халаты и перчатки и использовать строгие программы очистки (Viljoen et al., 2005; Подкомитет по лабораторным стандартам в ветеринарии). Поэтому методы, основанные на использовании систем с закрытыми пробирками, в целом, в большей степени подходят для диагностических анализов (Sawyer et al., 2006). При проведении любых анализов важно использовать правильные контрольные образцы, чтобы быть уверенным в выполнении анализа в соответствии с ожидаемым. Необходимо, чтобы все используемые при разработке анализа образцы были получены из надежных источников, и чтобы разработка проводилась в рамках системы качества, обеспечивающей на надлежащем уровне подготовку аналитов, текущий ремонт и мониторинг оборудования и т.д. (Burkhardt, 2000).

## А. ПЛАН РАЗРАБОТКИ АНАЛИЗА

### 1. Определение предполагаемого назначения анализа

При разработке анализа следует начать с ясного определения конкретного назначения и применения метода, который следует разработать. На этих первых соображениях будут основываться многие решения, касающиеся плана разработки. Например, может потребоваться разработать скрининг-тест для обнаружения всех подтипов или вариантов птичьего гриппа (ПГ) у птиц, который должен быть всеохватывающим и с широким спектром реактивности; в другой ситуации может потребоваться определить тип гемагглютинаина, и тогда метод должен быть более специфичным. К некоторым анализам предъявляется требование обнаруживать группу вирусов, например, как в случае ПЦР для определения всех пестивирусов, позволяющей обнаружить вирусы, вызывающие вирусную диарею крупного рогатого скота (ВДКРС), пограничную болезнь (ПБ) и европейскую чуму свиней (ЕЧС). К другим анализам может предъявляться требование обнаружить единственный возбудитель или в некоторых случаях даже позволить использовать подход DIVA (дифференциации инфицированных и вакцинированных животных; ДИВЖ). Примером такого метода является недавно опубликованный метод ОТ-ПЦР в реальном времени для обнаружения вируса ЕЧС, который был разработан для генетической дифференциации вакцинированных диких кабанов от заразившихся в естественных условиях (Liu et al., 2009).

#### Цель анализа:

- Анализ проводится для скрининга или подтверждения, или должен решать обе задачи?
- Анализ предназначен для обнаружения группы патогенов?
- Анализ предназначен для обнаружения единственного патогена?
- Предназначен ли анализ для дифференциации вакцинированных и инфицированных животных?

### 2. Разработка анализа – проведение экспериментов

#### 2.1. Обеспечение качества

Важно, чтобы разработка анализов происходила в лабораториях с высокими стандартами обеспечения и контроля качества (см. *Руководство по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных, глава 1.1.2 Управление качеством в ветеринарных испытательных лабораториях*). Результаты валидации эффективности и точности метода, полученные во время разработки и валидации анализа, должны быть устойчивыми, поскольку они будут формировать основу для интерпретации статуса заболевания и последующих действий, когда анализ войдет в повседневную практику.

## 2.2. Референтные материалы

Выбор образцов (см. *Руководство по наземным животным, глава 1.1.2 Получение, представление и хранение диагностических образцов*).

Применительно к большинству заболеваний образцы, требуемые для анализов ОНК с большой вероятностью оказываются сходными с современными анализами, предназначенными для обнаружения возбудителя, например, выращивание бактерий в культуре или выделение вируса. Например, для обнаружения ПГ методом ОТ-ПЦР в реальном времени и для выделения вируса используются одни и те же образцы. Недавно был продемонстрирован удобный подход, заключающийся в получении мазков со свежих срезов образцов органов и заменивший трудоемкую гомогенизацию образцов органов. Аналогично, наблюдается тенденция к использованию образцов, которые могут быть получены неинвазивными методами, например, образцов слюны для обнаружения свиней, больных репродуктивно-респираторным синдромом свиней (PPCC) (Prickett *et al.*, 2008), или сборного образца молока для определения статуса стада по ВДКРС. Перед тем как сделать выбор в пользу объединенных образцов, например, сборного молока, разработчикам метода необходимо рассмотреть и оценить последствия разведения целевого аналита для диагностической чувствительности, и включить этот вопрос в план валидации (см. ниже).

- Какие типы образцов будут получены в целевой популяции?
- Какая локализация в организме хозяина является наиболее предпочтительной для патогена?
- Какие методы получения, хранения и транспортировки образцов предполагается использовать, и как они могут повлиять на результаты анализа?
- Предполагается анализировать одиночные или объединенные образцы?
- Будут ли образцы из валидационной панели репрезентативными для целевой популяции?

Важно понимать биологические свойства рассматриваемого патогена и природу устройств для получения образцов. В случае ПГ, для различных подтипов или вариантов вирусов предпочтительная локализация в организме птиц-хозяев существенно различается. Например, для обнаружения некоторых подтипов подходят клоакальные образцы, тогда как для других подтипов требуется получить буккальные образцы. Поэтому метод, предназначенный для использования в рамках надзорной программы, должен включать оба места отбора образцов и должен быть валидирован при использовании обоих типов образцов. Другим важным фактором является матрикс аналита в организме-хозяине. Ингибиторы ПЦР с большей вероятностью будут с большей вероятностью находиться в клоакальных, а не в буккальных образцах. Другим потенциальным смешивающим фактором является тип тампона, используемого для отбора образцов; в состав некоторых тампонов входят материалы, ингибирующие анализы ПЦР. Поэтому очень важно точно указывать предпочтительный материал образца и полностью описывать тампоны и протокол отбора мазка, включая предпочтительные буферные растворы или транспортные среды и условия хранения.

Следует также рассмотреть возможность анализа одиночных и объединенных образцов, и в случае объединенных образцов – следует ли включать в них образцы одного или нескольких животных. Любая стратегия объединения образцов должна быть строго определена и валидирована перед началом использования анализа. Наконец, если целевой популяцией являются «птицы, то валидационное исследование должно включать крупную репрезентативную популяцию разных видов, для того чтобы продемонстрировать возможность широкого применения анализа, и при этом заострить

внимание на наиболее распространенных видах или «сигнальных» видах рассматриваемой инфекции.

### 2.3. Дизайн метода испытаний (соответствие целям)

#### 2.3.1. Выбор метода

В большинстве случаев при осуществлении надзорной деятельности вначале может быть протестировано большое количество образцов скрининг-методом. В приведенном выше примере ПГ с помощью описанного выше скрининг-метода должны быть обнаружены все известные подтипы или варианты гриппа А, в определенном регионе или в любой точке мира. Тест должен быть высокочувствительным, для того чтобы не пропустить истинно положительные образцы, и аналитически специфичным (инклюзивным), для обнаружения всех вирусов, принадлежащих к группе вирусов гриппа А.

- Предназначен ли тест только для определенного региона или он будет применяться по всему миру?
- Является ли метод достаточно чувствительным, и является ли аналитическая мишень достаточно инклюзивной, для того чтобы не пропустить положительные образцы?
- Рассмотрено ли влияние высокого процента ложноположительных результатов, которые невозможно подтвердить?
- Возможно и/или требуется ли быстрое получение результатов?
- Будут ли проводиться подтверждающие тесты (аналитическая проработка) для определения/подтверждения патотипа (штамма) патогена?
- Будет ли определение штамма иметь важное значение для предпринимаемых действий?

Птичий грипп является резонансным заболеванием. Если в результате использования нового теста будет получен высокий процент ложноположительных результатов, которые невозможно подтвердить, то будет сложно принять окончательное решение о статусе инфекции у птиц. Поэтому принципиально важно исключить близкородственных патогенов, не представляющих интереса в контексте предполагаемого применения анализа.

Продолжая рассматривать вопрос на примере скрининга на ПГ, отметим важность быстрого получения результатов анализа, обеспечивающего возможность своевременного применения мер по борьбе с инфекцией. Итак, логичным выбором методов анализа для обнаружения птичьего гриппа должна быть ПЦР в реальном времени с использованием зондов TaqMan или анализ, который можно проводить в полевых условиях. Если говорить о методе скрининга на ПГ, то основу праймеров и зондов, вероятно, должен составлять матричный (М) ген, обнаруженный в изолятах вируса гриппа А. В зависимости от заданной степени соответствия цели анализа, ученые могут принять решение о разработке дополнительного анализа для использования его вместе со скрининг-тестом, чтобы точно определить присутствующий штамм ПГ, и является ли этот штамм высоко патогенным, поскольку от этого зависят требования об уведомлении о заболевании и последующие меры по борьбе с инфекцией. Некоторые методы испытаний могут быть классифицированы в качестве дополнительных аналитических инструментов, которые используют для изучения аналита, обнаруженного при скрининг-анализе (см. Стандарт валидации МЭБ, раздел В.1.4). Пример такого аналитического метода будет включать анализ последовательности ампликона, полученного при ПЦР матрикса и обнаруженного во время скрининга на ПГ. Для разработки парных подтверждающих анализов, например, ПЦР в реальном времени, направленной на другие гены, например гемагглютинин или нейроминидазу вируса ПГ, с целью идентификации подтипа или патотипа, потребуется, чтобы эти анализы тоже

прошли все этапы разработки, оптимизации и валидации.. Недавно в партнерском центре МЭБ был разработан инновационный анализ ПЦР с использованием плексус-праймеров для биотехнологической диагностики инфекционных заболеваний в Уппсале, Швеция. Этот анализ позволяет быстро и легко обнаруживать разнообразные патотипа РНК-вируса. Например, вирусы птичьего гриппа и вирусы Ньюкаслской болезни могут быть обнаружены с последующей оценкой на недорогостоящем оборудовании (установке для ПЦР) и в течение очень короткого периода времени (менее чем за 3 часа) в просто оборудованных лабораториях или даже в исследовательском центре, в полевых условиях во время вспышки заболевания (Leijon *et al.*, 2011; Yasoub *et al.*, 2012). Этот пример показывает очень быструю разработку и упрощение диагностических тестов, основанных на оценке ОНК, для диагностики в полевых условиях/ непосредственно по месту регистрации случая.

### 2.3.2. Дизайн метода

Для соответствия поставленным целям метод должен быть тщательно спланирован. Важные факторы, которые необходимо учитывать, будут включать применение, типы и количество тестируемых образцов. Это, в свою очередь, приводит к обсуждению логистических и практических аспектов потенциального анализа, например, будет ли анализ проводиться в лабораторных условиях и будет ли он в этом случае автоматизирован для обеспечения высокой пропускной способности, или же анализ будет проводиться в полевых условиях сразу после отбора образцов. Следует использовать всю доступную информацию, нуклеотидные последовательности, внесенные в базы данных, и нуклеотидные последовательности, определенные в собственной организации. Первым этапом является приобретение современного программного обеспечения для оптимизации дизайна праймеров и зондов и компьютерное моделирование вероятных последовательностей для использования при проведении анализа.

- Проводилась ли первоначальная оценка анализа на небольшой панели (6-8 образцов), чтобы оценить перспективность подхода?
- Достигалось ли хорошее разделение между результатами анализа отрицательных и положительных образцов?
- Проводился ли предварительный тест с использованием серии разведений матриксом, чтобы оценить относительную аналитическую чувствительность?

### 2.4. Исследование осуществимости

Перед тем как приступить к валидации нового прототипного анализа, следует провести исследование осуществимости для небольшой панели образцов, состоящей из 6-8 хорошо охарактеризованных образцов, для того чтобы оценить перспективность системы. Панель должна включать образцы, охватывающие весь рабочий диапазон анализа, т.е. не менее 2 отрицательных образцов, не менее 2 несомненно положительных образцов и в идеале образцы, находящиеся в середине диапазона. В идеале, эти образцы должны быть получены от разных животных. Анализ должен обеспечивать как можно более широкое разделение результатов, полученных для резко положительных и отрицательных образцов из этой панели. На этом этапе может оказаться полезным анализ серии разведений (разведение аналита матриксом образца), позволяющий оценить относительную аналитическую чувствительность, если тест потенциально разрабатывается с целью замены другого метода, для которого чувствительность является важным критерием (см. главу 3.6.8 *Сопоставимость анализов после изменения валидированных методов*).

## 2.5. Разработка и оптимизация

- Оптимальное размещение? Для Чтобы минимизировать контаминацию, используйте чистое помещение или боксы
- Выбор оптимального метода экстракции для получения образца? Ручной или автоматизированный метод

На этом этапе следует определить и оптимизировать метод, который будет использоваться в будущем для проведения анализа в повседневной практике. Эта задача включает описание надлежащего оснащения для проведения анализа. Важно рассмотреть и метод экстракции, требуемый для получения образца, и методику анализа. Для всех анализов методом ПЦР требуется определить протоколы чистого помещения, чтобы минимизировать контаминацию. Если ожидается большое количество образцов, то выбор автоматизированной процедуры экстракции может иметь принципиальное значение (Jungkind, 2001).

Обычно для оптимизации экстракции и собственно анализа требуется оценить несколько различных методологий и варьировать концентрации реактивов, время внесения матрицы и продолжительность реакции. Важно либо менять лишь одну переменную одновременно, либо использовать многофакторный дизайн и анализ (см. Стандарт валидации МЭБ, раздел А.2.5 Устойчивость). Важно идентифицировать факторы, оптимальная активность которых наблюдается лишь в узком диапазоне, потому что такие факторы являются критическими точками анализа и могут повлиять на устойчивость анализа. Как правило, стадии анализа оптимизировать относительно просто, но необходимо уделить внимание обеспечению устойчивой экстракции нуклеиновой кислоты и оптимизации и пригодности всех реактивов и стадий анализа для повседневного применения в лаборатории (Burkhardt, 2000).

- Проводилась ли тестирование реактивов в разных концентрациях для определения концентрации с оптимальной реактивностью?
- В какое время добавляли матрицу и какой была продолжительность реакции для оптимизации анализа?
- Какие факторы характеризуются узким диапазоном, в котором они имеют оптимальные характеристики?
- Определен ли этот диапазон?

Для проведения ПЦР необходимы многочисленные и разнообразные контрольные образцы. Для того чтобы показать соответствие рабочих характеристик анализа ожидаемым, важно включить в анализ необходимые контрольные образцы. Ниже перечислены разнообразные контрольные образцы, которые необходимо учитывать при проведении анализа:

### 2.5.1. Контроль организма-хозяина

Этот контроль демонстрирует надлежащее получение образца у целевых видов животных. В примере со скрининг-анализом ПГ контроль подтверждает, что тампон с образцом находился в контакте с целевым видом, и что образец содержит «птичью» нуклеиновую кислоту, которая может быть экстрагирована при использовании заданного протокола. Возможной мишенью для такого контроля является конститутивный ген, например, ген бета-актина, который присутствует у целевых хозяйских видов. Это довольно просто, если организм-хозяин представлен одним видом, например, курами, но найти подходящую мишень для всех «птичьих» образцов окажется значительно более сложной задачей. Такой тип контроля может не потребоваться, если в процессе экстракции используют собственно образец, например ткани или крови, но

рекомендован для «непрямых образцов», например, образцов, для получения которых используют тампоны; в этом случае контроль организма-хозяина следует использовать при тестировании каждого образца.

Включены ли вами все необходимые контрольные образцы, подтверждающие соответствие анализа ожидаемым характеристикам?

- Контроль матрицы?
- Контроль ингибирования?
- Положительный контрольный образец?

Данный контроль позволяет выявить контаминацию образца по наличию амплификации в ситуации, когда образец не содержит мишени и амплифицированный продукт должен отсутствовать.

### **2.5.2. Контроль отсутствия матрицы**

Следует обдумать количество и размещение контролей отсутствия матрицы на схеме анализа. Как правило, количество (приблизительно 5% лунок) контролей отсутствия матрицы следует случайным образом распределить в серии проб для анализа или на планшете, если используется 96- и 386-луночные планшеты.

### **2.5.3. Положительный контроль анализа**

Этот положительный контрольный образец, пороговая (Ct) активность которого в цикле ПЦР в реальном времени находится в заданном рабочем диапазоне анализа, используется на каждом планшете. Одним из таких контрольных образцов может быть плазида, содержащая целевую последовательность, которая может быть использована для проверки ожидаемого уровня амплификации анализа. Однако этот образец не позволяет оценить эффективность процесса экстракции, для которого требуется полевой положительный образец или равноценный образец (например, образец, полученный у животного с экспериментальной инфекцией).

### **2.5.4. Контроль ингибирования**

Этот контроль необходим для обнаружения возможных ингибиторов реакции ПЦР. Если для контроля ингибирования получен отрицательный результат, это означает, что в образце присутствуют ингибирующие вещества, и что полученный для исследуемого образца отрицательный результат анализа нельзя интерпретировать, как «отрицательный», поскольку при проведении анализа допущена ошибка. В некоторых образцах, например, кала и спермы, часто содержатся ингибиторы, тогда как при тестировании образцов крови или выращенных в культуре микроорганизмом с этой проблемой приходится сталкиваться реже (Ballagi-Pordany & Belak, 1996). Данные по эффективности анализа, полученные в процессе валидации при использовании матричных целевых образцов, позволят принимать рискоориентированные решения о целесообразности включения контроля ингибирования для каждого образца или о низкой вероятности ингибирования. Если ингибирующие вещества являются значимой проблемой, то контроль ингибирования должен сопровождать каждый исследуемый образец.

- Рассмотрены ли преимущества и недостатки включения внутреннего контроля?
- Включено ли в протокол анализа ясное и конкретное описание контроля ингибирования?

В отношении наиболее пригодного и эффективного контроля ингибирования существуют большие разногласия. Примеры перечислены ниже:

i) Искусственную мишень, например, фрагмент ДНК длиной, соответствующей плазмидной ДНК, который добавляют в полученный после экстракции образец и амплифицируют с использованием тех же праймеров, которые применялись для исследуемой мишени, но другого размера или содержащих другую внутреннюю последовательность, идентифицируют как внутренний контроль при применении метода обнаружения (Sawyer *et al.*, 2006). Преимущество такого подхода заключается в использовании тех же праймеров, которые применялись при изучении исследуемого образца, и в возможности добавления контроля в точной концентрации. Поскольку исследуемый образец и контроль содержат одну и ту же мишень, конкуренция за праймер и дНТФ может приводить к снижению аналитической эффективности анализа. Во время оптимизации анализа следует сосредоточиться на том, чтобы не допустить резкого снижения аналитической чувствительности. Другой недостаток заключается в том, что этот контроль, представляющий собой добавленный компонент, позволяет проверить только стадию анализа теста и не является контролем на этапе экстракции.

ii) Альтернативная стратегия в отношении контроля ингибирования заключается в том, чтобы амплифицировать конститутивный или структурный ген, например, ген бета-актина, который обязательно присутствует в целевой ткани и, следовательно, в образце. Если присутствующие в образце вещества ингибируют конститутивный ген, то делают вывод о возможном ингибировании также и гена, на обнаружение которого направлен этот анализ. Этот вывод не всегда подтверждается. Конститутивные гены часто присутствуют в избыточном количестве, поэтому иногда они могут быть обнаружены даже в присутствии ингибирующих веществ, тогда как присутствующие в меньших количествах целевые последовательности могут быть ингибированы в результате амплификации. В таком случае амплифицированный и обнаруженный конститутивный ген не является достаточным контролем ингибиторов, и существует значимый риск получения ложноотрицательного результата анализа. Однако, если знать о риске, связанном с конститутивными генами, которые имеют естественное происхождение в образце, конститутивные гены могут быть полезным контролем ингибиторов анализа в целом, в том числе, на этапах отбора образцов, хранения и экстракции.

## **2.6. Ингибирующие факторы в матриксе образца**

В целом, применительно к методам ОНК, предпочтительными образцами являются чистые культуры, кровь и большинство тканей, поскольку экстракция и извлечение амплифицированной НК из таких образцов обычно оказывается успешным. Анализ образцов кала, спермы и аутолизатов ткани, как правило, содержащих больше ингибиторов анализа ОНК, может представлять собой более сложную задачу. Крайне важно использовать устойчивую и характеризующуюся высокой сходимостью процедуру экстракции образца (при необходимости, автоматизированная), которая может применяться к многочисленным образцам, и, при необходимости, контроли ингибирования (см. предыдущий раздел).

## **2.7. Рабочий диапазон анализа**

Для определения рабочего диапазона анализа следует выполнить анализ разведений резко положительного образца и откладывать на графике полученные результаты, как функцию от известных количеств нуклеиновой кислоты (концентрации, разведения, количества геномных копий и т.д.). Референтный образец должен находиться в таком же матриксе, как исследуемый образец, т.е. было бы неправильным определять рабочий диапазон образца, разбавляя его буферным раствором, если обычным матриксом является кровь.



- Выполняли ли разведения образца матриксом, для которого предназначен метод, при определении рабочего диапазона анализа?
- Соответствует ли рабочий диапазон образца ожидаемым для такого анализа нормам?

## **2.8. Устойчивость**

Для того чтобы анализ был эффективно перенесен и развернут на новом месте и обеспечивал получение воспроизводимых результатов при использовании в многочисленных лабораториях, необходимо, чтобы анализ был устойчивым к небольшим изменениям концентраций реактивов и/или небольшим отклонениям времени обработки и температуры, используемым на разных этапах анализа. Это можно определить во время оптимизации анализа, при идентификации критических этапов методики, реактивов и оборудования. Такие факторы, которые при несоблюдении могут вызывать неприемлемую изменчивость, должны быть описаны в протоколе анализа, для того чтобы предъявлять особенно строгие требования к процессам, обеспечивающим соответствие этих факторов. Необходимо осуществлять мониторинг сходимости и точности этого трудоемкого процесса, включая в каждый анализ образцы внешнего и внутреннего контроля качества.

## **2.9. Калибровка анализа по референтным образцам**

В идеале для калибровки анализа следует использовать международные или национальные референтные образцы. Однако такие образцы не всегда доступны, поэтому может потребоваться создать внутрифирменный референтный образец (см. главу 3.6.6). Рабочие стандартные образцы, предназначенные для включения во все серии анализа, необходимо создать, разделить на аликвоты, и хранить в достаточных количествах, используя в каждой серии анализа в процессе валидации и в повседневной практике после завершения валидации. Рабочие стандартные образцы могут представлять собой многочисленные аликвоты определенного образца, которые могут быть использованы в каждой серии анализа. Эти образцы могут также представлять собой плазмиду, содержащую интересующую последовательность, добавленную в известном количестве в матрикс образца. Использование плазмиды позволяет разработчику теста определять число геномных копий, которые можно обнаружить с помощью анализа. В некоторых случаях результаты анализа исследуемого образца нормализуют посредством сравнения с рабочим стандартным образцом/образцами, включаемыми в каждую серию анализа, что позволяет выполнять прямое сравнение данных, полученных в разных сериях анализа (Huggett *et al.*, 2005; и Стандарт валидации МЭБ).

- Выполнена ли вами калибровка анализа по внешним референтным образцам?
- Если внешние референтные образцы отсутствуют или недоступны, создали ли вы внутрифирменный референтный образец?
- Приготовлены ли вами рабочие референтные образцы для использования во всех экспериментах на этапах разработки и валидации анализа?

## **В. ПЛАН ВАЛИДАЦИИ АНАЛИЗА**

После того, как протокол анализа разработан и оптимизирован, следует зафиксировать его, не внося изменений на протяжении всех этапов оценки плана валидации и во время повседневного использования. В случае незначительных изменений валидированного анализа могут быть проведены сравнительные исследования, чтобы документировать сохранение первоначальных характеристик эффективности анализа (см. главу 3.6.8).

## 1. Этап 1 – Критерии аналитической эффективности

### 1.1. Сходимость (St или качественная традиционная ПЦР)

Сходимость – степень согласованности результатов, полученных (в одной серии измерений и в нескольких сериях измерения) при использовании одного метода испытания в одной лаборатории. Обычно отбирают и тестируют небольшую панель из трех (предпочтительно пяти) образцов, охватывающих рабочий диапазон анализа, выполняя при этом полную процедуру анализа (включая экстракцию нуклеиновой кислоты). Для определения изменчивости в пределах одного анализа (межаналитическую изменчивость) выполняют тестирование нескольких (не менее 5) повторностей каждого образца из этой панели в одной серии анализа. Для определения изменчивости результатов между сериями (внутрианалитической изменчивости) несколько лаборантов тестируют эти образцы в течение нескольких дней, выполняя не менее 20 серий измерений. Для тестирования панели для проверки сходимости следует обрабатывать все образцы и каждую из повторностей в точности так же, как индивидуальные диагностические образцы на каждой стадии подготовки образца к анализу данных. Соответственно, экстракцию каждой повторности каждого образца выполняют отдельно. Это позволяет определить сходимость, как в одной серии, так и между сериями анализа, который имитирует будущие серии анализа, используемого для диагностики. Важна минимальная изменчивость сходимости, в особенности вблизи пороговых точек (точек отсечения), которые разделяют диапазоны положительных, неоднозначных и отрицательных результатов, поскольку повышенная изменчивость может приводить к неправильной интерпретации результатов анализа (см. главу 3.6.4 *Неопределенность измерений*).

- Определена ли внутри- и межаналитическая сходимость?
- Находится ли значение сходимости внутри одобренных границ диапазона коэффициента вариации (КВ)?

Для выражения сходимости может применяться коэффициент вариации (см. главу 3.6.5 *Статистические подходы к валидации*). Анализ должен быть запланирован таким образом, чтобы точка принятия решения (точка отсечения) находилась на участке самого крутого подъема кривой в пороговом цикле ПЦР в реальном времени. Если это достигнуто, что в критической точке анализа сходимость будет оптимальной. (Возле границ рабочего диапазона анализа, которым соответствуют явно отрицательные и резко положительные образцы, КВ имеет более высокие значения, которые практически не оказывают влияния на интерпретацию результатов анализа).

### 1.2. Аналитическая специфичность (АЧ)

В зависимости от предполагаемого применения анализа аналитическую специфичность определяется отобранными генетическими последовательностями организмов, являющихся мишенями для этого анализа. Может быть запланирован высоко селективный анализ, аналитически специфичный в отношении одной генетической последовательности, отсутствующей, насколько это известно, у других организмов или штаммов целевого организма. Такой анализ обладает эксклюзивностью и дополнительно является подтверждающим анализом на высокую АЧ.

Альтернативно, анализ может быть направлен на обнаружение консервативной генетической последовательности, общей для нескольких штаммов данного вида или нескольких видов рода. Такой анализ обладает АЧ, обладающей инклюзивностью, благодаря которой он может применяться для скрининга. Аналитическую специфичность инклюзивного скринингового анализа следует определять посредством тестирования всех линий, штаммов, видов и т.д., которые предполагается обнаруживать с

помощью данного анализа. Затем следует оценить способность анализа исключать родственные организмы, например, непатогенные штаммы, не представляющие интереса и не относящиеся к предполагаемому назначению потенциального метода анализа.

- Проводилось ли тестирование панели, включающей как можно больше хорошо охарактеризованных изолятов целевого патогена, включая изолят, полученные из разных географических регионов и от разных организмов-хозяев?
- Проводилось ли тестирование родственных организмов и патогенов, вызывающих сходные клинические синдромы?

На примере скрининг-теста на ПГ: следует выполнить оценку анализа, используя как можно большее число хорошо охарактеризованных изолятов вируса ПГ, чтобы гарантировать обнаружение всех штаммов, полученных из разнообразных географических регионов и разных организмов-хозяев (т.е. продемонстрировать инклюзивность). Для решения этой задачи обычно используют лабораторные штаммы/культуры или экстрагированные нуклеиновые кислоты. В случае ПГ существуют разные линии вируса, например, азиатская, европейская и североамериканская. Важно учесть, как будет использован анализ и в каких географических регионах. Это поможет определить, существует ли необходимость в оценке всех этих линий. Это важное требование отчетливо демонстрируют недавно разработанные, быстрые и простые в применении анализы с патотипированием РНК-содержащего вируса, для проверки которых использовали большую коллекцию вирусов ПГ и Ньюкаслской болезни, собранных в Восточном и Западном полушариях (Leijon *et al.*, 2011; Yasoub *et al.*, 2012), в сотрудничестве с несколькими Партнерскими центрами МЭБ. Другой важный фактор заключается в том, что вирусы способны к быстрым изменениям, и в результате возникающих при этом мутаций диагностический тест может становиться субоптимальным. Примером является появление пандемического штамма H1N1 вируса гриппа А в 2009 г., и вспышка гриппа в Китае в 2013 г., вызванная низкопатогенным штаммом вируса ПГ H7N9. Аналитическая чувствительность ПЦР к традиционному М-гену этого штамма была снижена из-за мутации в последовательности, которой обусловлена специфичность анализа. В большинстве стран были внедрены новые праймеры, и начали использовать либо новый метод обнаружения вируса, либо комбинированный метод, сочетающий новые и традиционные праймеры, специфичные для М-гена.

Для проверки дифференцирующей способности анализа следует использовать тест-организмы, родственные вирусу ПГ. К ним относятся патогены, вызывающие сходные клинические синдромы, например, Ньюкаслскую болезнь, инфекционный бурсит птиц и т.д., и другие организмы, которые с высокой вероятностью можно обнаружить в целевой выборке (т.е. для демонстрации эксклюзивности).

### **1.3. Аналитическая чувствительность (АЧ)**

Существует два подхода к оценке аналитической чувствительности, оба называются порогом обнаружения, или нижним пределом чувствительности. Первый подход заключается в том, чтобы использовать серию разведений целевого патогена (в данном случае вируса ПГ) в матриксе образца, а не в буферном растворе. Для тестирования серии разведений обычно используют валидируемый метод и стандартный метод. Применительно к ПГ, стандартным методом может быть выделение вируса или другой внутрифирменный стандартный метод обнаружения. Этот подход представляет собой сравнение двух методов (см. главу 3.6.5). Второй подход заключается в использовании плазмидной конструкции, содержащей целевую последовательность, и тестировании серии разведений этой конструкции в матриксе образца. Этот подход позволяет оценить

количество геномных копий, которое может быть обнаружено с помощью тестируемого метода.

#### **1.4. Сравнение стандартного метода анализа с потенциальным методом**

В некоторых ситуациях проведение полной валидации невозможно либо по причине немногочисленности образцов с известным статусом аналита (например, в случае экзотических заболеваний), либо, в экстремальных ситуациях, анализ необходимо начать использовать раньше, чем он будет полностью валидирован. При условии благоприятных результатов сравнения результатов, полученных на Этапе 1 процесса валидации, с результатами применения стандартного метода, либо известного, признанного и желательно опубликованного метода, может быть получено временное признание. Другим выбором стандартного метода является метод, являющийся частью повседневной практики в лаборатории. Важно осознавать, что различные методы идентифицируют разные морфологические или функциональные структуры организма. Поэтому в случае сравнения стандартного метода выращивания микроорганизма в культуре с новой методикой ОНК могут быть получены противоречивые результаты (см. обсуждение устранения несоответствий в разделе В.2, Этап 2). Выбор панели образцов для оценки тоже очень важен, и такая панель должна быть настолько широкой, насколько это возможно (см. главу 3.6.6 *Выбор и использование референтных образцов и панелей*). Если для оценки доступна лишь небольшая панель образцов, то будет полезным проверить соответствие анализа критерию воспроизводимости, т.е. способность анализа пройти жесткую проверку в других лабораториях. Для этого требуется, чтобы обе лаборатории использовали один и тот же протокол, одни и те же реактивы, одну и ту же панель образцов и сходное (а лучше идентичное) оборудование.

- Являются ли характеристики эффективности нового метода удовлетворительными по сравнению со стандартным методом?
- Являются ли приемлемыми предварительные данные по воспроизводимости
- Достаточно ли высоки характеристики анализа, чтобы перейти к исследованиям, необходимым для полной валидации (этапы 2-4)?

Если отсутствие образцов препятствует переходу на новый этап плана валидации (Диагностическая эффективность анализа), допустимо использовать анализ ОНК, который был предварительно одобрен посредством тщательной валидации Этапа 1 (см. Стандарт валидации МЭБ, раздел В.2.6). Признание предварительной валидации полностью зависит от одобрения локальными официальными организациями либо совершается посредством двусторонних соглашений между странами.

#### **1.5. Аналитическая точность**

Для методов анализа, предназначенных для получения информации, характеризующей образцы, обнаруживаемые при использовании скрининг-анализа, требуется только валидация характеристик аналитической эффективности. Таким образом, в этих случаях не требуется определять диагностическую чувствительность или диагностическую специфичность. Примерами таких анализов являются типирование методом ПЦР, позволяющее различить матрикс-положительные штаммы H5 и H7 гриппа А, и методы определения антибиотикорезистентности, применимые только к бактериальным культурам. К используемым в таких анализах технологиям, основанным на нуклеиновых кислотах, относятся методы с применением наночипов, привносящих дополнительные проблемы по причине большого объема данных, получаемых для каждого тестируемого образца. Перед внедрением таких анализов следует разобраться, каким образом такой анализ может быть осуществлен. Более простой подход заключается в сравнении результатов применения новых аналитических методов со стандартным методом, и

разрешении использовать новый метод, при условии благоприятных результатов сравнения новых и существующих методов favourably (Anjum *et al.*, 2007; Batchelor *et al.*, 2008).

## **2. Этап 2 – Критерии диагностической эффективности**

### **2.1. Диагностическая чувствительность и диагностическая специфичность**

Диагностическая чувствительность (ДЧ) и диагностическая специфичность (ДС) являются основными показателями эффективности применения диагностического анализа. При определении этих оценок принципиально важно выбрать достаточное количество образцов, отражающих целевую популяцию для рассматриваемого анализа. Получение большого количества образцов может представлять собой сложную задачу, особенно положительных образцов с возбудителями некоторых экзотических заболеваний и отрицательных образцов с возбудителями некоторых эндемичных заболеваний. В таких случаях, при наличии небольшого числа образцов, уровень ошибки, допустимой для оценок ДЧ и ДС, в силу необходимости, может быть достаточно высоким (см. Стандарт валидации МЭБ, раздел В.2, таблицу 1). Если возможно использовать надлежащую схему отбора образцов и различные независимые методы тестирования образцов, то возможно получить оценки ДЧ и ДС, используя Байесовские методы (модели латентных классов (см. главу 3.6.5.)). Отрицательные референтные образцы часто получают у животных из регионов, в которых заболевание отсутствует, тогда как положительные образцы обычно получают у животных с клиническими признаками, подтвержденными в лаборатории. Это может привести к чрезмерно оптимистичным оценкам ДЧ и ДС, поскольку образцы не отражают весь спектр патологического процесса, начиная от животных с отсутствием клинических признаков заболевания, но с патогенной нагрузкой, существенно отличающихся от животных с молниеносным или хроническим течением заболевания.

Для классификации образцов часто используют современные методы, такие как выделение вируса (ВВ) или выращивание бактерий в культуре. Однако при валидации новых молекулярных методов такой подход может оказаться проблематичным из-за различия основы двух тест-систем. Например, положительная бактериальная культура определяется присутствием жизнеспособного организма, тогда как методы, основанные на нуклеиновой кислоте, позволяют обнаруживать геномные последовательности и живых, и мертвых организмов до тех пор, пока нуклеиновая кислота присутствует в образце. В/в методы могут быть особенно чувствительны к ингибиторам и контаминантам, присутствующим в матриксе образца, что может привести к заниженной оценке «истинно положительных результатов». В результате может возникнуть явное несоответствие: одни и те же образцы окажутся положительными при использовании нового молекулярного теста и отрицательными при использовании традиционных методов. Различные стратегии, используемые для принятия решений в таких аномальных ситуациях, включают, в частности, секвенирование (которое может продемонстрировать присутствие интересующего патогена в определенном образце, или тестирование с другим молекулярным подходом).

- На непрерывной шкале результатов тестирования выбирают пороговое значение/точку отсечения ( $C_t$ ) между отрицательными и положительными результатами.
- Для обозначения зоны значений между положительной и отрицательной точками отсечения используют термины-синонимы неопределенный, промежуточный, предполагаемый, пограничный, серая зона или сомнительный.

Для того чтобы рассчитать ДЧ и ДС оценки потенциального анализа, результаты анализов следует вначале сократить их до категорийного (положительные, отрицательные или неопределенные) статуса. Это задача решается размещением одной

их двух контрольных точек отсечения (пороговых значений) на непрерывной шкале результатов теста. Например, в некоторых обстоятельствах целесообразно использовать точку отсечения для ПЦР в реальном времени на уровне 35 Ct, это означает, что некоторые образцы с повышенным значением Ct классифицированы как отрицательный или неубедительный. Однако для другого анализа методом ПЦР любой образец, для которого существует значение Ct, может быть классифицирован, как положительный. При принятии решения о значении отсечения следует учитывать эффективность конкретной ПЦР в реальном времени, данные сравнительной валидации, окончательное применение полученных результатов и любую релевантную ветеринарную информацию.

### **3. Этап 3 – Оценки воспроизводимости и повышенной сходимости**

Воспроизводимость – это мера согласованности между результатами анализа, который проводится в нескольких лабораториях с использованием одного протокола, сходного (предпочтительно одинакового) оборудования и одинаковой панели образцов. В идеале панель образцов должна включать 20-30 образцов, включая некоторые из них, представленные в количестве 4 экземпляров. Панель должна состоять из образцов, охватывающих весь динамический диапазон теста; включая некоторые образцы с активностью вблизи и с обеих сторон от точек отсечения исследования. Для данной оценки может быть использована та же панель, которую использовали для определения сходимости, но с большим количеством повторностей. Могут быть выполнены измерения прецизионности, как для данных по сходимости, так и для данных по воспроизводимости (см. главу 3.6.4, в которой подробно разъяснена эта тема и ее применение). В главе 3.6.4. подробно рассмотрены выбор и использование референтных панелей.

### **4. Этап 4 – Осуществление программы**

#### **4.1. Интерпретация результатов испытания**

Практические рекомендации по осуществлению программы являются общими для всех типов анализа (Стандарт валидации МЭБ, раздел В.4). Применительно к ОНК, дополнительным внутренним преимуществом является возможность последующего секвенирования генома для исключения видимых ложноположительных результатов. Для валидации анализов, включающих ПЦР, часто используют сходное количество положительных и отрицательных образцов. Однако в надзорных программах результаты анализа часто используют для подтверждения отсутствия рассматриваемого заболевания на территориях, где распространенность заболевания очень низка и часто приближается к нулю. В таких обстоятельствах ложноположительные результаты могут представлять значительную проблему, даже при высокой диагностической специфичности конкретного анализа. Если ДС анализа составляет 99,5%, это означает, что при распространенности заболевания, близкой к нулю, ложным будет лишь один из 200 положительных результатов. Если протестировано большое количество образцов из популяции с распространенностью заболевания равной нулю или очень низкой, то количество таких ложноположительных результатов может существенно превосходить количество истинно положительных результатов (см. Стандарт валидации МЭБ, раздел В.4.2, в котором представлено дополнительное разъяснение прогностической значимости результатов испытания, как функции от распространения заболевания). Что касается использования анализов ОНК в таких обстоятельствах целесообразно подтверждать положительные результаты ПЦР секвенированием.

### **5. Мониторинг эффективности анализа после первой валидации**

#### **5.1. Мониторинг анализа**

Мониторинг сходимости посредством откладывания на карте значений Ct, полученных для контрольных рабочих стандартных образцов, гарантирует соответствие анализа

ожидаемому уровню эффективности. Аналогично, участие в программах проверки эффективности анализа, подготовленных внешними провайдерами с использованием образцов для обеспечения качества, является доказательством сохраняющейся воспроизводимости и позволяет также сравнить точности анализа, если референтные стандарты включены в каждую серию для нормализации данных. В некоторых лабораториях проводится повторное тестирование части (обычно 1-5% в зависимости от пропускной способности) оставшихся образцов, чтобы продемонстрировать как постоянство характеристик устройства между сериями.

Со временем может потребоваться модифицировать анализ по причине изменения целевого аналита, например, если анализ на грипп птиц будет применяться в другой части мира, либо если возникнет другая часть мира, если все на линии, либо если возникнут новые линии или штаммы вируса (см. главу В.1.2, или выше, в которой описана эндемичность новой пандемичной линии H1N1). РНК-содержащие вирусы быстро развиваются, и в них могут возникать точечные мутации, поэтому рекомендуется регулярно подтверждать нуклеотидные последовательности на участках праймера и зонда, обеспечивая их актуальность.

## **5.2. Незначительные изменения существующего валидированного анализа**

### **5.2.1. Технические изменения**

Со временем, вероятно, потребуется, внести изменения в анализ. Например, использование разного оборудования, использование разных протоколов экстракции или автоматизация определенных этапов потребует минимального сравнения оригинального валидированного анализа с его модифицированной версией (см. главу 3.6.8). Если результаты, полученные для модифицированной версии, окажутся за пределами рабочего диапазона или за пределами ожиданий эффективности оригинальных праймеров, то может потребоваться повторная валидация.

### **5.2.2. Замена закончившихся реактивов**

Важно присвоить уникальные идентификационные номера всем сериям реактивов и записать компоненты, использованные для определенных анализов. Наиболее критичными компонентами при проведении анализов, основанных на ПЦР, являются зонды, праймеры и ферменты. Текущие и новые серии критических реактивов следует тестировать параллельно, до включения в анализ. Однако, что касается остальных реактивов, например, буферных растворов и нуклеотидов, то обычно достаточно бывает мониторировать серии и информировать о неисправностях, если возникнет такая необходимость.

## **5.3. Важные изменения анализа, требующие повторной валидации метода**

Через некоторое время может потребоваться расширить применение анализа за пределы первоначально предполагаемого назначения. Примерами является включение другого вида-хозяина, либо популяции животных из другого региона. В таких случаях важно выполнить ревалидацию анализа по причине появления новых биологических соображений и связанных с ними многочисленных переменных. Точные детали будут зависеть от масштабов изменений. Перемещение анализа в новый географический регион может означать, что аналитические характеристики анализа по прежнему валидны, но определения диагностических критериев необходимо пересмотреть. Аналогично, модификации могут затрагивать последовательности праймеров или зондов для ПЦР, что позволит обнаруживать новые штаммы. Затем будет необходимо продемонстрировать, как новые реактивы влияют на аналитическую и диагностическую точность, по сравнению с предыдущей версией анализа.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

ANJUM M.F., MAFURA M., SLICKERS P., BALLMER K., KUHNERT P., WOODWARD M.J. & EHRICHT R. (2007). Pathotyping of *Escherichia coli* by using miniaturized DNA microarrays. *App. Environ. Microbiol.*, **73** (17), 5692–5697.

BALLAGI-PORDÁNY A. & BELÁK S. (1996). The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell. Probes*, **10**, 159–164.

BATCHELOR M., HOPKINS K.L., LIEBANA E., SLICKERS P., EHRICHT R., MAFURA M., AERESTRUP F., MEVIUS D., CLIFTON-HADLEY F.A., WOODWARD M.J., DAVIES R.H., THRELFALL E.J. & ANJUM M.F. (2008). Development of a miniaturised microarray based assay for the rapid identification of antimicrobial resistance genes in Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **31**, 440–451.

BURKHARDT H.J. (2000). Standardization and quality control of PCR analyses. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **38**, 87–91.

HUGGETT J., DHEDA A.K., BUSTIN S. & ZUMLA A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.*, **6**, 279–284 (Review).

JUNGKIND D. (2001). Automation of laboratory testing for infectious diseases using the polymerase chain reaction – our past, our present, our future. *J. Clin. Virol.*, **20**, 1–6.

LAUERMAN L.H. (2004). Advances in PCR technology. *Anim. Health Res. Rev.*, **5**, 247–248 (Review).

LEIJON M., ULLMAN K., THYSELIUS S., ZOHARI S., PEDERSEN J.C., HANNA A., MAHMOOD S., BANKS J., SLOMKA M.J. & BELÁK S. (2011). Rapid PCR-based molecular pathotyping of H5 and H7 avian influenza viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **49**, 3860–3873.

LIU L., HOFFMANN B., BAULE C., BEER M., BELÁK S. & WIDÉN F. (2009). Two real-time RT-PCR assays of classical swine fever virus, developed for the genetic differentiation of naturally infected from vaccinated wild boars. *J. Virol. Methods*, **159** (1), 131–133.

PRICKETT J., CHRISTOPHER-HENNINGS J., YOON K.-J., EVANS R.B. & ZIMMERMAN J.J. (2008). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **20**, 156–163.

SAWYER J., WAKELEY P., WEST D., FEARNLEY C., ANDERSON S., FLOWERS M., WEBSTER K., ERINGTON J. & WILLIAMS R. (2006). Practical experiences of moving molecular diagnostics into routine use at the Veterinary Laboratories Agency. *Dev. Biol. (Basel)* **126**, 89–97.

SUBCOMMITTEE OF ANIMAL HEALTH LABORATORY STANDARDS (SCAHLs) (2008). Veterinary Laboratory Guidelines for nucleic acid detection techniques ([http://www.scahls.org.au/procedures/other\\_procedures](http://www.scahls.org.au/procedures/other_procedures))



VILJOEN G.J., NELL H. & CROWTHER J.R. (2005). *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. IAEA-FAO, Springer, Dordrecht, The Netherlands.

WAKELEY P.R., ERRINGTONJ., HANNONS., ROESTH.I., CARSONT., HUNTB., SAWYERJ.& HEATHP.(2006). Development of a real time PCR for the detection of *Taylorella equigenitalis* directly from genital swabs and discrimination from *Taylorella asinigenitalis*. *Vet. Microbiol.*, **118**, 247–254.

WAKELEY P.R., JOHNSON N., MCELHINNEY L.M., MARSTON D., SAWYER J.& FOOKS A.R.(2005). Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 2786–2792.

YACOB A., LEIJON M., MCMENAMY M.J., ULLMAN K., MCKILLEN J., ALLAN G. & BELÁK S. (2012). Development of a novel real-time PCR-based strategy for simple and rapid molecular pathotyping of Newcastle disease virus. *Arch. Virol.*, **157**, 833–844.

### **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

BELÁK S., THORÉN P., LEBLANC N.& VILJOEN G. (2009). Advances in viral disease diagnostic and molecular epidemiological techniques. *Exp. Rev. Molec. Diagn.*, **9**, 367–381.

\* \* \*