

# Опосредованное определение концентрации 146S компонента вируса ящура в неинактивированной суспензии при сравнении графиков второй производной для кривых ОТ-ПЦР-РВ

М. И. Доронин<sup>1</sup>, Д. В. Михалишин<sup>2</sup>, В. А. Стариков<sup>3</sup>, Д. А. Лозовой<sup>4</sup>, А. В. Борисов<sup>5</sup>

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир, Россия

<sup>1</sup> ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

<sup>2</sup> ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

<sup>3</sup> ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

<sup>4</sup> ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

<sup>5</sup> ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov\_av@arriah.ru

## РЕЗЮМЕ

При репродукции в биологических системах вирус ящура формирует 4 варианта компонентов, три из которых не включают в себя РНК вируса. В процессе промышленного производства противоящурных вакцин особое внимание уделяют количеству цельных вирионов, которые обладают важнейшими биологическими свойствами вируса ящура и являются основными компонентами, определяющими иммуногенность вакцинных препаратов. Сырье для вакцин на различных этапах технологического процесса исследуют с целью определения концентрации 146S компонента вируса ящура. Традиционным методом определения является количественный вариант реакции связывания комплемента. Для опосредованного определения концентрации 146S компонента вируса ящура в вирусосодержащей суспензии в последние годы стали использовать полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в режиме реального времени. В статье представлен новый подход к опосредованному определению концентрации 146S компонента вируса ящура в неинактивированной суспензии при сравнении максимальных экстремумов графиков второй производной кривых накопления сигнала флуоресценции относительно количества циклов реакции амплификации. Существование зависимости между концентрацией 146S компонента вируса ящура и максимальными экстремумами графиков второй производной кривой накопления флуоресцентного сигнала представлено в виде квадратичной функции  $C_{146S\text{BR}} = 0,0111(C_p)^2 - 1,0157C_p + 20,446$  с высокой достоверностью аппроксимации ( $R^2 = 0,993$ ). Предложенная модель позволяет количественно оценивать содержание 146S компонента в вирусосодержащем сырье для вакцины. Представленный способ позволяет исследовать большое количество образцов неинактивированного сырья для противоящурной вакцины за 4–5 ч. Основным преимуществом предлагаемого способа является возможность определения концентрации 146S компонента вируса ящура в суспензии, содержащей высокое количество балластного белка (более 7,00 мг/см<sup>3</sup>) и количество полных вирусных частиц от 0,01 до 5,00 мкг/см<sup>3</sup>.

**Ключевые слова:** вирионы вируса ящура, ОТ-ПЦР-РВ, пороговый цикл амплификации, график второй производной кривой амплификации.

**Благодарность:** Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

**Для цитирования:** Доронин М. И., Михалишин Д. В., Стариков В. А., Лозовой Д. А., Борисов А. В. Опосредованное определение концентрации 146S компонента вируса ящура в неинактивированной суспензии при сравнении графиков второй производной для кривых ОТ-ПЦР-РВ. *Ветеринария сегодня*. 2020; 3 (34): 220–227. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-220-227.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Для корреспонденции:** Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Россия, г. Владимир, мкр. Юрьевец, e-mail: doronin@arriah.ru.

## Indirect determination of FMDV 146S component concentration in non-inactivated suspension by comparison of graphs of the second derivative for real-time RT-PCR curves

M. I. Doronin<sup>1</sup>, D. V. Mikhailishin<sup>2</sup>, V. A. Starikov<sup>3</sup>, D. A. Lozovoy<sup>4</sup>, A. V. Borisov<sup>5</sup>

FGBI "Federal Centre for Animal Health" (FGBI "ARRIAH"), Vladimir, Russia

<sup>1</sup> ORCID 0000-0002-4682-6559, e-mail: doronin@arriah.ru

<sup>2</sup> ORCID 0000-0003-1718-1955, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

<sup>3</sup> ORCID 0000-0002-9960-0887, e-mail: starikov@arriah.ru

<sup>4</sup> ORCID 0000-0002-5983-7062, e-mail: lozovoy@arriah.ru

<sup>5</sup> ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov\_av@arriah.ru

## SUMMARY

During reproduction in biological systems, FMD virus forms four variants of components, three of which do not include RNA of the virus. In the process of industrial production of FMD vaccines, special attention is paid to the number of whole virions, which have the most important biological properties of FMD virus and are the main components that determine the immunogenicity of vaccine preparations. Raw materials for vaccines at various stages of the technological process are tested for concentration of FMDV 146S component. The traditional method of determination is quantitative complement fixation test. In recent years, real-time RT-PCR has been used for indirect determination of FMDV 146S component concentration in a virus-containing suspension. The article presents a new approach to indirect determination of FMDV 146S component concentration in a non-inactivated suspension by comparing the maximum extreme points of the graphs of the second derivative of the fluorescence signal accumulation curves and the number of amplification reaction cycles. The dependence between FMDV 146S component concentration and the maximum extreme points of the graphs of the second derivative of the fluorescence signal accumulation curve is presented in the form of a square function:  $C_{146S\text{ FMDV}} = 0.0111(C_p)^2 - 1.0157C_p + 20.446$  with a high accuracy of approximation ( $R^2 = 0.993$ ). The proposed model allows to quantitatively estimate the content of 146S component in virus-containing vaccine raw materials. The presented method allows studying a large number of samples of non-inactivated raw materials for FMD vaccine in 4–5 hours. The main advantage of the proposed method is the capacity to determine the concentration of FMDV 146S component in a suspension with a high level of ballast proteins (more than 7.00 mg/cm<sup>3</sup>) and complete viral particles (from 0.01 to 5.00 µg/cm<sup>3</sup>).

**Key words:** FMDV virions, real-time RT-PCR, amplification threshold cycle, graph of second derivative of amplification curve.

**Acknowledgements:** The study was funded by the FGBI "ARRIAH" within the framework of "Veterinary Welfare" research work.

**For citation:** Doronin M. I., Mikhailishin D. V., Starikov V. A., Lozovoy D. A., Borisov A. V. Indirect determination of FMDV 146S component concentration in non-inactivated suspension by comparison of graphs of the second derivative for real-time RT-PCR curves. *Veterinary Science Today*. 2020; 3 (34): 220–227. DOI: 10.29326/2304-196X-2020-3-34-220-227.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**For correspondence:** Maksim I. Doronin, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", 600901, Russia, Vladimir, Yur'evets, e-mail: doronin@arriah.ru.

## ВВЕДЕНИЕ

Во многих государствах ящур занимает первоочередное место в системе мер борьбы и профилактики вирусных болезней животных. Ящур является вирусным высококонтагиозным остропротекающим заболеванием диких и домашних парнокопытных и мозолоногих животных и представляет собой мировую проблему, которой уделяют особое внимание международные организации (ФАО, МЭБ) и ветеринарные службы многих стран [1, 2].

Геном вируса ящура представлен одноцепочечной позитивной РНК, состоящей приблизительно из 8500 н. о., окруженной икосаэдрическим капсидом, состоящим из 60 копий, каждая из которых представлена 4 структурными белками: VP<sub>1</sub> (1D-ген), VP<sub>2</sub> (1B-ген), VP<sub>3</sub> (1C-ген), VP<sub>4</sub> (1A-ген) [3–5].

В процессе репродукции в биологических системах вирус ящура формирует 4 варианта компонентов: 146S компонент (цельный вирион, полная частица), состоящий из одной цельной молекулы вирусной РНК и 60 копий полипептида, каждая из которых представлена комплексом белков VP<sub>1</sub> (1D-ген), VP<sub>2</sub> (1B-ген), VP<sub>3</sub> (1C-ген), VP<sub>4</sub> (1A-ген); 75S частица («пустой» капсид), включающая в себя 60 копий полипептидов VP<sub>0</sub> (1AB-ген), VP<sub>1</sub> (1D-ген), VP<sub>3</sub> (1C-ген); 12S частица (капсомер), состоящая из структурных белков VP<sub>1</sub> (1D-ген), VP<sub>2</sub> (1B-ген), VP<sub>3</sub> (1C-ген); 3,8S субъединица, представленная неструктурным белком VP<sub>0</sub>, 75S, 12S и 3,8S компоненты не включают в себя РНК вируса ящура [1, 3].

В процессе промышленного производства противоящурных вакцин особое внимание уделяют количеству цельных вирионов, которые обладают важнейшими биологическими свойствами вируса ящура и являются основными компонентами, определяющими иммуногенность вакцинных препаратов [2, 3]. Поэтому сырье для вакцин на различных этапах технологического процесса исследуют с целью определения концентрации 146S компонента вируса ящура. Традиционно для этого применяют количественный вариант реакции связывания комплемента (РСК) и проводят оценку в соответствии с методическими рекомендациями [6]. В последние годы для опосредованного определения концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированной вирусосодержащей суспензии стали использовать полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) [1, 7–12]. Представленный метод является высокочувствительным, специфичным, экономичным и экспрессным, а также позволяет одновременно исследовать несколько десятков проб вирусосодержащего материала. Однако данная модификация имеет некоторые недостатки: при содержании в исследуемой пробе 146S компонента менее 0,1 мкг/см<sup>3</sup> чувствительность реакции снижается; при наличии в образце большого количества белков и липопротеинов частицы сорбента сенсibiliзируются избытком балластных компонентов, что уменьшает возможность сорбирования РНК вируса и снижает чувствительность анализа; при

возможном попадании следовых количеств сорбента в реакционную смесь может возрастать фоновое значение флуоресценции и отмечаться искажение результатов анализа при определении коэффициента пропорциональности  $\alpha$  между сигналом флуоресценции и количеством цельного вируса в пробе.

В связи с этим актуальной и перспективной задачей является совершенствование способа опосредованного определения концентрации 146S компонента вируса ящура в неинактивированной суспензии на основе метода сравнения максимальных экстремумов графиков второй производной для кривых реакции амплификации в режиме реального времени.

Цель исследования – разработка способа опосредованного определения концентрации 146S компонента вируса ящура в вирусной суспензии при сравнении максимальных экстремумов графиков второй производной для кривых реакции амплификации в режиме реального времени.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирус.** В работе использовали культуральный вирус ящура штамма Азия-1/Шамир Израиль 3/89. Репродукцию вируса осуществляли в суспензионной перевиваемой линии клеток почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21. Использовали неинактивированные суспензии вируса ящура с содержанием балластного белка более 7,00 мг/см<sup>3</sup>.

**Реакция связывания комплемента (РСК).** Для определения концентрации 146S компонента вируса ящура применяли количественный вариант РСК [6].

**Определение концентрации 146S компонента.** Оценку концентрации 146S компонента вируса ящура проводили методом ОТ-ПЦР-РВ с применением значений порогового цикла амплификации (Ct) в соответствии с требованиями, описанными ранее [7].

**Сенсибилизация планшета поликлональными штаммоспецифическими антителами против вируса ящура.** Шестилуночный планшет сенсибилизировали высокоочищенными штаммоспецифическими поликлональными антителами против вируса ящура в объеме 1,5 см<sup>3</sup> суспензии с концентрацией иммуноглобулинов G 5,0 мкг/см<sup>3</sup> при температуре 4 ± 2 °С в течение 18–20 ч. Открытые сайты связывания блокировали 1%-й суспензией желатина при температуре 37 ± 1 °С в течение 30 мин и промывали лунки 1/15 М фосфатно-буферным раствором (ФБР) 5 раз.

**Штаммоспецифическое связывание вируса ящура.** В лунки с сенсибилизированными штаммоспецифическими антителами против вируса ящура вносили по 2,4 см<sup>3</sup> образцов суспензий и инкубировали при температуре 37 ± 1 °С в течение 30 мин. Лунки отмывали от балластных компонентов 3 раза с использованием 1/15 М ФБР. Образовавшиеся иммунные комплексы респендировали в 1,0 см<sup>3</sup> среды Игла МЕМ.

**Выделение связанной иммунным комплексом РНК вирионов вируса ящура.** Для выделения РНК 146S компонента вируса ящура за основу была взята методика P. Chomczynski [13, 14]. В результате процесса получали по 0,2 см<sup>3</sup> 12-кратных экстрактов вирусной РНК.

**Оценка степени чистоты элюатов РНК вируса ящура.** Измерения спектральной поглощающей способности экстрактов РНК проводили при длинах волны в диапазоне 205–325 нм и температуре 22–25 °С. В выделенных экстрактах оценивали содержание остатков фосфоли-

пидов, полисахаридов и гуанидин изотиоцианата (ГТЦ), карболовой кислоты, полипептидов и крупных взвешенных частиц, определяя значения оптической плотности (OD) при 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно [15]. Элюат РНК считали свободным от примесей белка и карболовой кислоты, если коэффициент экстинкции  $R_1$  ( $OD_{262}/OD_{280}$ ) находился в пределах 1,8–2,2 и оптимально составлял примерно 2,0. Более низкие значения  $R_1$  указывали на наличие ДНК, белковых составляющих и остатков карболовой кислоты в элюате. Более высокие значения коэффициента  $R_1$  свидетельствовали о деградации РНК и наличии свободных рибонуклеотидов. Экстракт нуклеиновой кислоты вируса ящура считали незагрязненным полисахаридами, если коэффициент экстинкции  $R_2$  ( $OD_{262}/OD_{235}$ ) приближен к значению 2,000. При замещении 1% РНК на полисахаридные составляющие  $R_2$  снижается на 0,002 [16]. Значения коэффициента  $R_2$  больше 2,000 могут указывать на деградацию молекул РНК. Отсутствие взвеси крупных частиц в элюате подтверждается, если  $OD_{320}$  приближено к нулевому значению [15, 16]. При несоответствии требованиям чистоты повторно проводят этапы серологического связывания и выделения РНК вируса ящура из исходного материала.

**Проведение ОТ-ПЦР-РВ для количественного определения 146S частиц вируса ящура.** Для постановки реакции в качестве гомологичных 3D-гену вируса ящура олигонуклеотидов использовали Forward-3D-FMDV-праймер (5'-ACT-GGT-TTT-ACA-AAC-CTG-TGA-GGT-3'), Reverse-3D-FMDV-праймер (5'-GCG-AGT-CCT-GCC-ACG-GAG-TTG-GTT-3') и 3D-FMDV-ROX/ВНҚ2-зонд (5'-ROX-TCC-TTT-GCA-CGC-CGT-GGG-ACG-3') в концентрации 15 пМ на реакцию. Концентрация каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов составляла по 0,2 мМ. В качестве основы использовали DreamTaq буфер (10x), хлорид магния и диметилсульфооксид в количествах 4 мМ и 3% от объема ОТ-ПЦР-РВ-смеси соответственно. В качестве катализаторов обратной транскрипции и реакции амплификации применяли MMLV-обратную транскриптазу (10 ед.) и *Thermus aquaticus* DNA-полимеразу (1 ед.). Температурные и временные показатели ОТ-ПЦР-РВ проводили в соответствии с требованиями, описанными ранее [7].

**Контроль при тестировании разработанного способа.** В качестве положительного контроля применяли неинактивированную суспензию культурального вируса ящура с количеством вирионов 1,00 мкг/см<sup>3</sup>. Отрицательным контролем служила не инфицированная вирусом ящура суспензия клеток ВНК-21 с концентрацией 2,5–3,0 млн/см<sup>3</sup>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования получали контрольную панель готовых разведений стандарта, в качестве которого использовали неинактивированную суспензию культурального вируса ящура штамма Азия-1/Шамир Израиль 3/89 с концентрациями 146S компонента вируса: 0,01; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 2,00; 2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50; 5,00 мкг/см<sup>3</sup>. Далее суспензию, содержащую вирус ящура, вносили в планшеты, сенсибилизированные антителами против вируса ящура данного штамма, и затем из полученных комплексов «вирион вируса ящура – штаммоспецифические антитела» выделяли вирусную РНК. В результате получали 12-кратные экстракты вирусной РНК каждого разведения стандарта и проводили оценку степени их чистоты с помощью

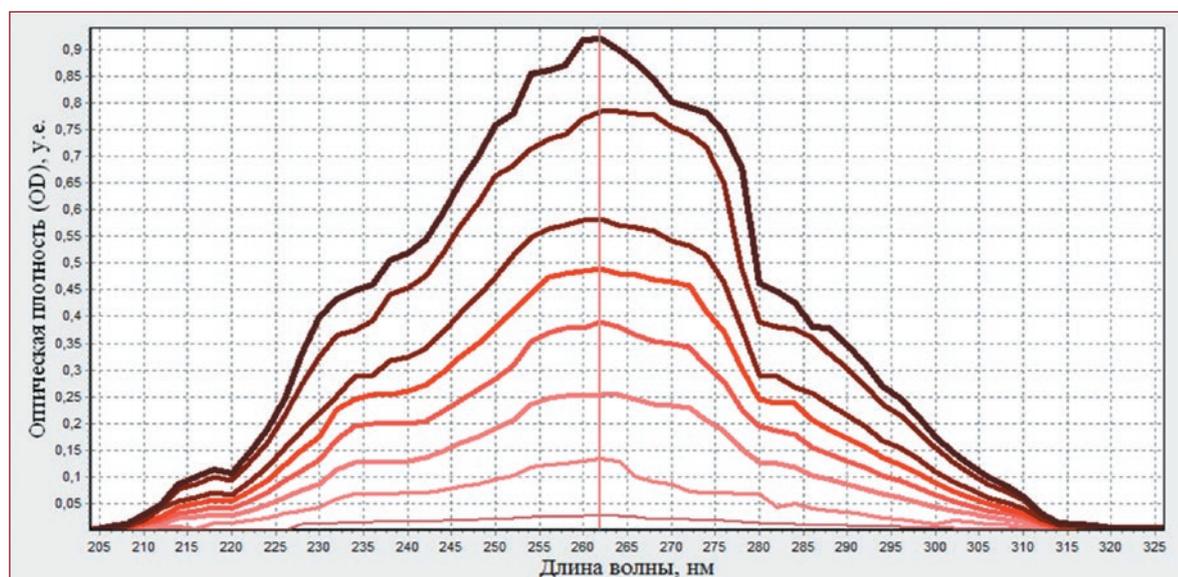


Рис. 1. Спектрограммы разведений элюатов РНК вируса ящура штамма Азия-1/Шамир Израиль 3/89. Снизу вверх отражены графики для разведений экстрактов, соответствующих следующим концентрациям вирионов: 0,01; 0,10; 0,50; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкг/см<sup>3</sup>

Fig. 1. Spectrograms of diluted eluates of FMDV RNA (Asia-1/Shamir Israel 3/89 strain). From bottom to top see graphs for diluted extracts corresponding to the following concentrations of virions: 0.01; 0.10; 0.50; 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0 µg/cm<sup>3</sup>

спектрального анализа в излучении ультрафиолетового света. Запись спектра поглощения РНК разведений стандарта при длинах волн от 205 до 325 нм представлена на рисунке 1.

По результатам анализа контрольных образцов в указанных выше разведениях выявили, что значения  $OD_{205-259}$  и  $OD_{263-325}$  не превышали  $OD_{260-262}$ , что является признаком высокой степени чистоты полученных элюатов РНК ( $n = 3$ ). Из данных спектрального исследования стандартов, отраженных на рисунке 1, отмечали отсутствие выраженных пиков на графиках при длинах волн 205, 235, 270, 280 и 320 нм, что свидетельствовало о практически полном отсутствии загрязнения экстрактов РНК примесями фосфолипидов, полисахаридов и остатков ГТЦ, карболовой кислоты, полипептидов и крупных конгломератов соответственно. Значения коэффициента экстинкции  $R_1$  для стандартов приближены к норме 2,000 ( $R_1$  составлял 1,995–1,999), что подтверждало отсутствие ДНК и наличие лишь следовых количеств примесей белка и остатков карболовой кислоты. Деградация нуклеиновой кислоты и наличия свободных нуклеотидов в элюатах не наблюдали, так как  $R_2$  не превышал 2,000. Экстракты вирусной РНК разведений стандарта не были загрязнены полисахаридами и ГТЦ, поскольку значения коэффициента экстинкции  $R_2$  приближены к норме 2,000 и соответствовали 2,000–2,001. Учитывая, что при замещении 1% РНК на углеводы значение  $R_2$  уменьшается на 0,002 [16], в полученных экстрактах наличие полисахаридных примесей не выявлено. Степень разрушения РНК в экстрактах составляла не более 0,5% ( $(2,001 - 2,000) / 0,002$ ), что является допустимым. Таким образом, экстракты РНК вируса ящура, выделенные из разведений стандарта и используемые для дальнейших исследований, характеризовались высокой степенью чистоты.

На следующем этапе работы проводили ОТ-ПЦР-РВ в соответствии с рекомендациями, отраженными выше.

Анализ был основан на использовании 5'-экзонуклеазной активности *Thermus aquaticus* ДНК-полимеразы. В отсутствие мишени флуорофор ROX и гаситель флуоресценции BHQ2 в составе 3D-FMDV-зонда сближены за счет максимального использования водородных связей между атомами Н, О и N олигонуклеотидов. Благодаря механизму флуоресцентно-резонансного переноса энергии свечение подавлено. За счет 5'-экзонуклеазной активности *Thermus aquaticus* ДНК-полимеразы после отжига Forward-3D-FMDV-, Reverse-3D-FMDV-праймеров и 3D-FMDV-ROX/BHQ2-зонда происходило разрушение гибридного зонда и ампликона, наблюдали их пространственное разделение, что приводило к росту детектируемого сигнала. Увеличение уровня флуоресценции ( $Fl$ ) было пропорционально количеству образующихся продуктов реакции. Мониторинг сигнала в течение 40 циклов (С) ПЦР в режиме реального времени позволил построить кинетические кривые флуоресценции, которые заданы функциями вида  $Fl = f(C)$ .

Полученные данные анализировали с помощью программного обеспечения Rotor-Gene FRT-Manager, которое позволяет строить графики накопления флуоресцентного сигнала в режиме реального времени на протяжении заданного количества циклов амплификации.

Применяя технологии компьютерной программы Maxima (или аналога), проводили построение графиков первой и второй производной для полученных элюатов РНК вируса ящура каждого разведения стандарта с известными концентрациями 146S компонента вируса и рассчитывали средние значения максимальных экстремумов ( $C_p$ ) графиков второй производной  $Fl = f(C_p)$  с проекцией на ось абсцисс «О-циклы».

Величина  $C_p$  является важной характеристикой реакции, прямо пропорциональна количеству копий исходной матрицы РНК и, соответственно, концентрации

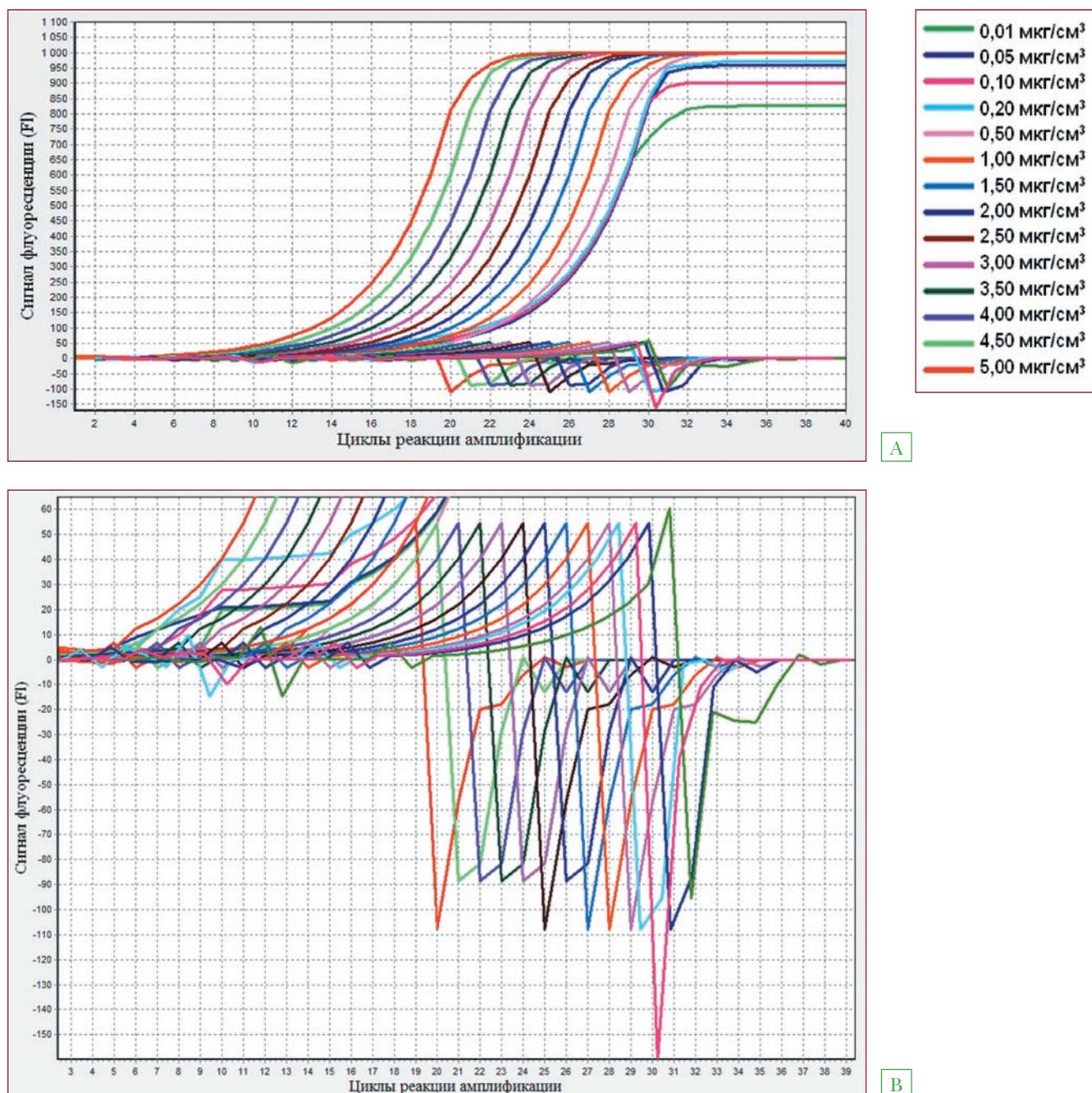


Рис. 2. Средние значения критических точек  $C_p$ , рассчитанные с помощью второй производной для графиков реакции амплификации в реальном времени при анализе РНК стандарта вируса ящура штамма Азия-1/Шамир Израиль 3/89 с концентрациями 146S компонента 0,01; 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50; 5,00 мкг/см<sup>3</sup> ( $n = 3$ ) (А – графики накопления флуоресцентного сигнала, первой и второй производных; В – графики второй производной для кривых реакции амплификации)

Fig. 2. Mean values of critical points  $C_p$  calculated with the second derivative for real-time amplification reaction graphs during analysis of RNA of standard FMD virus, Asia-1/Shamir Israel 3/89 strain, with the following concentrations of 146S component: 0.01; 0.05; 0.10; 0.20; 0.50; 1.00; 1.50; 2.00; 2.50; 3.00; 3.50; 4.00; 4.50; 5.00 mg/cm<sup>3</sup> ( $n = 3$ ) (A – graphs of accumulation of fluorescent signal, first and second derivatives; B – graphs of second derivatives for amplification reaction curves)

146S компонента вируса ящура, поскольку каждая такая частица содержит по одной молекуле вирусной РНК [3, 17, 18]. Учитывая, что вторая производная функции  $f(C_p)$  ( $f''(C_p)$ ) непрерывна в некоторых окрестностях точки  $C_p = C_{p1}$  и задана на отрезке циклов амплификации от 0 до 40, существует определенный участок

около точки  $C_p$ , для которого во всех координатах на оси  $O-C_p$  вторая производная функции  $f(C_p)$  будет отрицательна. Поскольку  $f''(C_p)$  является первой производной от функции  $f'(C_p)$ , то из условия  $(f'(C_p))' < 0$  следует, что  $f'(C_p)$  на некотором малом отрезке, содержащем точку  $C_p = C_{p1}$ , будет убывающей. Учитывая, что  $f'(C_p) = 0$ ,

## Таблица

Зависимость концентрации 146S компонента вируса ящура и значений максимальных экстремумов кривых реакции амплификации в реальном времени, определенных с помощью второй производной ( $n = 3$ )

## Table

Relationship between concentration of FMDV 146S component and values of maximum extreme points of real-time amplification reaction curves determined with the second derivative ( $n = 3$ )

Тип образца	Концентрация 146S компонента вируса ящура, мкг/см <sup>3</sup>	Определение концентрации 146S компонента вируса ящура в ОТ-ПЦР-РВ							
		по критической точке $C_p$ (crossing point) (предложенный способ)					по пороговому циклу амплификации $C_t$ (threshold cycle) (прототип)		
		$C_{p1}$	$C_{p2}$	$C_{p3}$	$C_{p\text{ср}}$	$C_{\text{вирионов}}$ , мкг/см <sup>3</sup>	$C_{t\text{ср}}$	$C_{\text{вирионов}}$ , мкг/см <sup>3</sup>	
							на 12× элюат	на 1× элюат	
Стандарт с известными концентрациями 146S компонента вируса ящура (по данным РСК)	0,01	29,85	29,92	29,81	29,86 ± 0,06	0,010 ± 0,003	29,19 ± 0,08	0,058 ± 0,069	0,005 ± 0,005
	0,05	29,82	29,78	29,71	29,77 ± 0,06	0,050 ± 0,010	29,12 ± 0,07	0,304 ± 0,098	0,025 ± 0,009
	0,10	29,59	29,63	29,61	29,61 ± 0,04	0,103 ± 0,020	29,01 ± 0,06	0,660 ± 0,083	0,055 ± 0,038
	0,20	23,34	29,31	29,35	29,33 ± 0,02	0,204 ± 0,030	28,78 ± 0,06	1,440 ± 0,038	0,120 ± 0,050
	0,50	28,53	28,51	28,56	28,53 ± 0,03	0,503 ± 0,041	27,74 ± 0,05	4,985 ± 0,024	0,415 ± 0,050
	1,00	27,21	27,19	27,28	27,23 ± 0,05	1,019 ± 0,032	25,93 ± 0,05	11,160 ± 0,013	0,931 ± 0,052
	1,50	26,02	26,05	26,08	26,05 ± 0,03	1,520 ± 0,031	24,28 ± 0,04	16,741 ± 0,015	1,395 ± 0,048
	2,00	25,03	25,01	25,00	25,01 ± 0,02	1,990 ± 0,030	22,57 ± 0,04	22,560 ± 0,011	1,882 ± 0,051
	2,50	23,94	23,88	23,92	23,91 ± 0,03	2,506 ± 0,028	20,83 ± 0,03	28,503 ± 0,014	2,375 ± 0,039
	3,00	22,99	22,95	23,00	22,98 ± 0,03	2,970 ± 0,027	19,26 ± 0,03	33,840 ± 0,015	2,820 ± 0,045
	3,50	22,01	22,04	21,99	22,01 ± 0,03	3,470 ± 0,034	17,72 ± 0,05	39,060 ± 0,012	3,255 ± 0,044
	4,00	20,99	20,98	21,04	21,00 ± 0,03	4,010 ± 0,030	16,22 ± 0,05	44,160 ± 0,014	3,682 ± 0,038
	4,50	20,10	20,07	20,05	20,07 ± 0,03	4,530 ± 0,031	14,60 ± 0,05	49,684 ± 0,019	4,144 ± 0,061
5,00	19,29	19,21	19,26	19,25 ± 0,04	5,007 ± 0,033	13,15 ± 0,05	54,601 ± 0,017	4,556 ± 0,055	
Отрицательный контроль	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

$p$ -критерий: для  $C_p$  образцов с концентрациями 0,01–0,10 мкг/см<sup>3</sup> составляет менее 0,010, с концентрациями 0,10–5,00 мкг/см<sup>3</sup> – менее 0,005 (для разработанного метода); для  $C_t$  образцов с концентрациями 0,01–0,10 мкг/см<sup>3</sup> – менее 0,020, с концентрациями 0,10–0,20 мкг/см<sup>3</sup> – менее 0,10 мкг/см<sup>3</sup> и с концентрациями 0,50–5,00 мкг/см<sup>3</sup> – менее 0,005 (для прототипа). Для расчета концентрации 146S частиц в 12-кратном образце методом  $C_t$  (первоначальный способ) применяли формулу:  $C_{146S} = -3,401(C_t) + 99,333$ , для расчета содержания вирионов в однократном образце полученное значение делили на 12.

$p$ -criteria: for  $C_p$  samples with concentrations of 0.01–0.10 µg/cm<sup>3</sup> is less than 0.010, with concentrations of 0.10–5.00 µg/cm<sup>3</sup> – less than 0.005 (for the developed method); for  $C_t$  samples with concentrations of 0.01–0.10 µg/cm<sup>3</sup> – less than 0.020, with concentrations of 0.10–0.20 µg/cm<sup>3</sup> – less than 0.10 µg/cm<sup>3</sup>, and with concentrations of 0.50–5.00 µg/cm<sup>3</sup> – less than 0.005 (for the prototype). To calculate the concentration of 146S particles in 12-fold sample using  $C_t$  method (initial method) the following formula was used:  $C_{146S} = -3.401(C_t) + 99.333$ , to evaluate the content of virions in an one-fold sample the obtained value was divided by 12.

на участке при  $C_p < C_{p1}$  первая производная функции  $f(C_p) > 0$ , а при  $C_p > C_{p1}$  получаем, что  $f'(C_p) < 0$ . Иными словами, первая производная функции  $f(C_p)$  при переходе через точку  $C_p = C_{p1}$  изменяет знак с плюса на минус, следовательно, в точке  $C_{p1}$  функция, отражающая процесс накопления флуоресцентного сигнала, имеет максимальный экстремум [17]. Таким образом, если график реакции амплификации в режиме реального времени представлен функцией  $Fl = f(C_p)$ ,  $f'(C_p) = 0$  и  $f''(C_p) < 0$ , то при условии, что  $C_p = C_{p1}$  полученная функция имеет максимум в точке с аргументом  $C_{p1}$ , значение которой учитывают для установления зависимости между концентрацией 146S компонента вируса ящура и величиной  $C_p$ .

Преимущество использования второй производной в данном случае заключается в том, что при умножении

функции кривой амплификации  $Fl = f(C_p)$  на любые множители, в том числе на коэффициент пропорциональности  $a$  [8, 14], положение максимумов производных не меняется. Максимальный экстремум второй производной находится внутри экспоненциального участка графика накопления флуоресценции, то есть в зоне экспоненты, при анализе которой эффективность реакции амплификации не изменяется [17].

Графики первой и второй производной для полученных элюатов РНК вируса ящура каждого разведения стандарта с известными концентрациями вирионов вируса ящура представлены на рисунке 2.

Результаты эксперимента по представлению системы параллельной оценки величины максимальных экстремумов графиков второй производной для

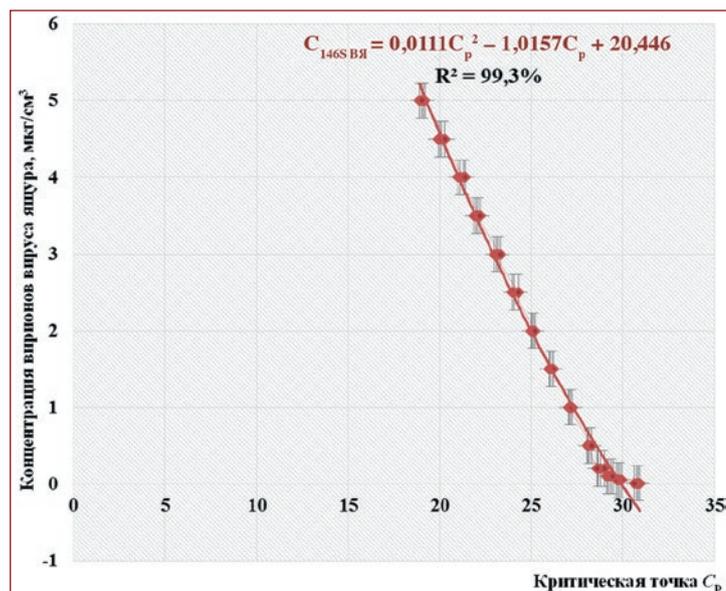


Рис. 3. Зависимость критической точки  $C_p$  детектируемой с помощью второй производной для кривой амплификации в режиме реального времени, от концентрации 146S компонента вируса ящура (с указанием стандартной погрешности) ( $n = 3$ )

Fig. 3. Relationship between critical point  $C_p$  detected with the second derivative for real-time amplification curve and concentration of FMDV 146S component (standard error specified) ( $n = 3$ )

кривых реакции амплификации в режиме реального времени ( $C_p$ ) и концентрации 146S компонента вируса ящура ( $C_{146S \text{ ВЯ}}$ ) в контрольных образцах представлены в таблице, из которой следует, что значения  $C_p$  для всех разведений стандарта культурального вируса ящура с концентрациями 146S компонента от 0,01 до 5,00 мкг/см<sup>3</sup> находятся в диапазоне от 29,86 ± 0,06 до 19,25 ± 0,04 соответственно. При исследовании отрицательного контроля накопления флуоресцентного сигнала не наблюдалось, что подтверждало отсутствие вируса ящура в данном образце. В представленных исследованиях  $p$ -уровень значимости меньше 0,010 для контрольных образцов стандарта с концентрациями 146S компонента вируса ящура от 0,01 до 0,10 мкг/см<sup>3</sup> и  $p < 0,005$  – от 0,20 до 5,00 мкг/см<sup>3</sup>.

Зависимость концентрации 146S компонента вируса ящура и значений максимальных экстремумов графиков второй производной для кривых накопления флуоресцентного сигнала представлена на рисунке 3 и отражена в виде квадратичной функции  $C_{146S \text{ ВЯ}} = 0,0111(C_p)^2 - 1,0157C_p + 20,446$  с высокой достоверностью аппроксимации ( $R^2 = 99,3\%$ ). Модель разработана для анализа полученных данным способом 12-кратных элюатов РНК вируса ящура. Таким образом, выявлено существование зависимости концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины и максимального экстремума графика второй производной для кривой реакции амплификации в режиме реального времени.

Контрольные образцы параллельно исследовали в РСК и классическим методом ОТ-ПЦР-РВ с определением значения порогового цикла амплификации ( $C_t$ ) и расчетом концентрации 146S компонента ( $n = 3$ ) [7]. Следует отметить, что подготовка элюатов и проведение ОТ-ПЦР-РВ для разработанного способа и прото-

типа различаются, в связи с этим значения пороговых циклов амплификации для получаемых графиков накопления флуоресцентного сигнала одной и той же пробы будут иметь отличия.

Полученные данные отражены в таблице, из которой следует, что степень различий результатов анализа контролей разработанным способом и истинными значениями положительных стандартов составляет 0,00–2,91%. Различия в определении концентрации 146S компонента вируса ящура положительных контролей с содержанием балластного белка более 7,00 мкг/см<sup>3</sup> первоначальным способом по сравнению с ожидаемыми значениями для образцов с концентрациями 146S компонента от 0,01 до 0,10 мкг/см<sup>3</sup> составили 45–52%, от 0,01 до 0,10 мкг/см<sup>3</sup> – 17–45%, с содержанием полных вирусных частиц от 0,50 до 5,00 мкг/см<sup>3</sup> – 5–17%. В отрицательном контроле вирус ящура не был выявлен ни одним из представленных способов. Таким образом, разработанный способ опосредованного определения концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированной суспензии при сравнении максимальных экстремумов графиков второй производной для кривых реакции амплификации в режиме реального времени позволяет в течение 4–5 ч с высокой степенью достоверности исследовать вирусосодержащий материал с концентрациями 146S компонента от 0,01 до 5,00 мкг/см<sup>3</sup> с наличием в пробах более 7,00 мкг/см<sup>3</sup> балластного белка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый подход к опосредованному определению концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированной суспензии при сравнении максимальных экстремумов графиков второй производной кривых накопления сигнала флуоресценции относительно количества циклов реакции амплификации.

Предложенный способ позволяет: 1) повысить специфичность анализа проб за счет штаммоспецифического связывания вирионов вируса ящура; 2) исключить возможность увеличения фоновых значений флуоресценции за счет использования методики Р. Chomczynski разделения фракций проб; 3) повысить достоверность проводимого анализа благодаря установлению зависимости между значениями концентрации 146S компонента вируса ящура ( $C_{146S \text{ ВЯ}}$ ) и максимальными экстремумами графиков второй производной для кривых реакции амплификации ( $C_p$ ).

Определено существование зависимости между количествами 146S частиц вируса ящура и максимальными экстремумами графиков второй производной кривой накопления флуоресцентного сигнала в виде квадратичной функции  $C_{146S \text{ ВЯ}} = 0,0111(C_p)^2 - 1,0157C_p + 20,446$  с высокой достоверностью аппроксимации ( $R^2 = 0,993$ ). Предложенная модель позволяет количественно оценивать содержание вирионов вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины за 4–5 ч.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

### (п. п. 1, 2, 4, 5, 8–18 см. REFERENCES)

- Пономарев А. П., Узюмов В. Л. Вирус ящура: структура, биологические и физико-химические свойства. Владимир: Фолиант; 2006. 250 с.
- Бондаренко А. Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. Суздаль. 1994: 92 с.
- Лозовой Д. А., Михалишин Д. В., Доронин М. И., Щербаков А. В., Тимина А. М., Шишкова А. А. и др. Способ определения концентрации 146S-компонента вируса ящура в вирусосодержащем сырье для вак-

цины с применением метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Патент № 2619878 Российской Федерация, МПК G01N 33/58 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). ФГБУ «ВНИИЗЖ». № 2016140460. Заявл. 14.10.2016. Оpubл. 18.05.2017. Бюл. № 14.

## REFERENCES

- Lubroth J., Rodriguez L., Dekker A. Vesicular diseases. In: *Diseases of Swine*. Ed by B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Alaire, D. J. Taylor. 9<sup>th</sup> ed. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing Professional; 2006: 517–536.
- Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). In: *OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2018; Чап. 3.1.8: 433–464. Available at: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.08\\_FMD.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.08_FMD.pdf).
- Ponomarev A. P., Uzyumov V. L. Foot-and-mouth disease virus: structure, biological, physical and chemical properties [Virus yashchura: struktura, biologicheskie i fiziko-himicheskie svojstva]. Vladimir: Foliant; 2006: 250 p. (in Russian)
- Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson A. L., Garland A. J. M. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Comp. Pathol.* 2003; 129 (1): 1–36. DOI: 10.1016/S0021-9975(03)00041-0.
- Food-and-Mouth Disease Virus. Taxonomy. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=FMDV>.
- Bondarenko A. F. Qualitative and quantitative immunochemical analysis of viral proteins [Kachestvennyy i kolichestvennyy immunohimicheskiy analiz virusnyh belkov]. Suzdal; 1994: 92 p. (in Russian)
- Lozovoy D. A., Mikhailishin D. V., Doronin M. I., Shcherbakov A. V., Timina A. M., Shishkova A. A., et al. Method for foot and mouth disease virus 146S-component concentration determination in virus-containing raw material for vaccine using reverse transcription-polymerase chain reaction method in real time mode. Patent No. 2619878 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/58 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). FGBI "ARRIAH". No. 2016140460. Date of filing: 14.10.2016. Date of publication: 18.05.2017. Bull. No. 14. (in Russian)
- Liu W., Saint D. A. Validation of a quantitative method for real-time PCR kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 294 (2): 347–353. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00478-3.
- Peirson S. N., Butler J. M., Foster R. G. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31 (14):e73. DOI: 10.1093/nar/gng073.
- Shaw A. E., Reid S. M., Ebert K., Hutchings G. H., Ferris N. P., King D. P. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods.* 2007; 143 (1): 81–85. DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.02.009.
- Scherbakov A., Lomakina N., Drygin V., Gusev A. Application of RT-PCR and nucleotide sequencing in foot-and-mouth disease diagnosis. *Veterinary Quarterly.* 1998; 20 (2): 32–34. DOI: 10.1080/01652176.1998.9694962.
- Wernike K., Beer M., Hoffmann B. Rapid detection of foot-and-mouth disease virus, influenza A virus and classical swine fever virus by high-speed real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2013; 193 (1): 50–54. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.05.005.
- Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (2): 581–585. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.
- Peirson S. N., Butler J. N. RNA extraction from mammalian tissues. In: *Circadian Rhythms. Methods in Molecular Biology™*. Eds E. Rosato. 2007; 362: 315–327. DOI: 10.1007/978-1-59745-257-1\_22.
- The analysis of DNA or RNA using its wavelengths: 230 nm, 260 nm, 280 nm. Available at: <https://www.webcitation.org/6ATzE7YQz?url=http://biotechnology.com/dna/analysis-dna-rna-wavelengths-230-260-280-nm> (date of access: 02.06.2019).
- Glase J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. *Biotechniques.* 1995; 18 (1): 62–63. PMID: 7702855.
- Rutledge R. G., Côté C. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. *Nucleic Acids Res.* 2004; 31 (16):e93. DOI: 10.1093/nar/gng093.
- Wittwer C. T., Gutekunst M., Lohmann S. Method for quantification of an analyte. Patent No. 6,503,720 B2 United States, Int. Cl. C12Q 1/68, C12P 19/34; C07H 21/04; C07H 21/00. Roche Diagnostics GmbH (DE); University of Utah Research Foundation, Salt Lake City, UT (US). Appl. No. 09/789,170. Filed: Feb. 20, 2001. Prior publication data: Mar. 7, 2002. Date of patent: Jan. 7, 2003.

Поступила 10.02.2020

Принята в печать 07.04.2020

Received on 10.02.2020

Approved for publication on 07.04.2020

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Доронин Максим Игоревич**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Михалишин Дмитрий Валерьевич**, кандидат ветеринарных наук, заведующий лабораторией профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Стариков Вячеслав Алексеевич**, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Лозовой Дмитрий Анатольевич**, доктор ветеринарных наук, доцент, г. Владимир, Россия.

**Борисов Алексей Валерьевич**, кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия.

**Maksim I. Doronin**, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Dmitry V. Mikhailishin**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Head of Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Vyacheslav A. Starikov**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

**Dmitry A. Lozovoy**, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Associate Professor, Vladimir, Russia.

**Alexey V. Borisov**, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Leading Researcher, Laboratory for FMD Prevention, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.