

Применение спектрометрического способа опосредованной оценки концентрации 146S компонента при определении количества РНК вируса ящура

М. И. Доронин¹, Д. В. Михалишин², Н. Е. Камалова³, А. В. Борисов⁴

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

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

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

³ ORCID 0000-0001-5671-2347, e-mail: kamalova@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov_av@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

Ящур причиняет серьезный экономический ущерб, который выражается в существенных затратах на ликвидацию болезни, введение строгих ограничений, налагаемых на внутреннюю и международную торговлю продукцией животноводства. Комплекс мер для борьбы и профилактики заболевания предполагает массовую иммунизацию восприимчивых животных, а также контроль уровня напряженности поствакцинального иммунитета. При промышленном изготовлении противоящурных вакцинных препаратов определяют концентрацию 146S частиц, которые являются основным компонентом, влияющим на иммуногенную активность вакцины. В статье представлены результаты оценки возможности применения спектрометрического способа для опосредованного определения концентрации 146S компонента при определении количества РНК вируса ящура, выделенной после серологического связывания. Данный способ является дешевым, простым в исполнении, позволяет опосредованно определять концентрацию 146S частиц вируса ящура в неактивированном сырье для вакцины в течение 3–4 ч. При исследовании суспензий культурального вируса ящура доказано, что линейная модель вида $C_{146S} = (3,9 \times N_{\text{РНК } 146S} + 566\,783\,689) / 280\,818\,944\,837$ с помощью спектрального исследования позволяет оценивать концентрацию 146S компонента вируса ящура в сырье для вакцины. Совпадение фактических результатов полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени и ожидаемых результатов по определению концентрации 146S компонента культурального вируса ящура спектрометрическим способом составило 97,0–99,9%. При сравнении с данными, полученными в реакции связывания комплемента, совпадение фактических и ожидаемых результатов соответствовало значениям 94,5–99,5%. Для положительного контроля совпадение фактических и ожидаемых результатов составило 99,0–99,6%. В отрицательном контрольном образце геном и 146S частицы вируса ящура не обнаружены, что также соответствовало ожиданиям.

Ключевые слова: РНК вируса ящура, концентрация 146S компонента, спектрометрический анализ.

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

Для цитирования: Доронин М. И., Михалишин Д. В., Камалова Н. Е., Борисов А. В. Применение спектрометрического способа опосредованной оценки концентрации 146S компонента при определении количества РНК вируса ящура. *Ветеринария сегодня*. 2021; 1 (36): 7–14. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-1-36-7-14.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

UDC 619:578.835.2:615.371.004.12:616-076

Using spectrometric analysis for indirect estimation of 146S component concentration while measuring FMDV RNA amount

M. I. Doronin¹, D. V. Mikhailishin², N. Ye. Kamalova³, A. V. Borisov⁴

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

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

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

³ ORCID 0000-0001-5671-2347, e-mail: kamalova@arriah.ru

⁴ ORCID 0000-0001-9880-9657, e-mail: borisov_av@arriah.ru

SUMMARY

Foot and mouth disease has a negative impact on economy due to the high cost of eradication campaigns and stringent measures imposed on domestic and international trade in animal products. Prevention and control measures include mass vaccination of susceptible animals and control of post-vaccination immunity level. Concentration of 146S particles, which are the main component affecting the vaccine immunogenicity, is determined during commercial scale production of FMD vaccines. The paper assesses feasibility of spectrometric analysis for indirect determination of 146S component concentration while measuring amount of FMDV RNA isolated after serological binding. This method is cheap, easy-to-use and makes it possible to determine indirectly concentration of FMDV 146S particles in inactivated vaccine raw materials within 3–4 hours. Study of cultural FMDV suspensions shows that the linear model $C_{146S} = (3.9 \times N_{RNA\ 146S} + 566,783,689) / 280,818,944,837$ makes it possible to estimate FMDV 146S component concentration in the vaccine raw materials with the help of a spectrometric analysis. The actual results obtained in real-time reverse transcription – polymerase chain reaction (rtRT-PCR) were 97.0–99.9% consistent with the expected results of the spectrometric analysis used to determine cultural FMDV 146S component concentration. When compared to a complement fixation test, the actual results were 94.5–99.5% in line with the expected ones. The actual results for positive control were 99.0–99.6% in line with the expected ones. As expected, no FMDV genome or 146S particles were detected in the negative control sample.

Keywords: Foot-and-mouth disease virus (FMDV) RNA, 146S component concentration, spectrometric analysis.

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., Kamalova N. Ye., Borisov A. V. Using spectrometric analysis for indirect estimation of 146S component concentration while measuring FMDV RNA amount. *Veterinary Science Today*. 2021; 1 (36): 7–14. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-1-36-7-14.

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

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

ВВЕДЕНИЕ

Ящур – острое инфекционное вирусное заболевание преимущественно диких и домашних парнокопытных животных [1]. Вирус ящура характеризуется высокой антигенной вариабильностью за счет изменений в генах поверхностных белков, известны 7 серотипов вируса: А, О, С, Азия-1, САТ-1, САТ-2, САТ-3, включающих множество подтипов [2].

Геном представлен одноцепочечной позитивной РНК длиной около 8 500 н.о. Молекулярный вес вириона находится в диапазоне от 8 080 000 до 8 167 500 Да [2, 3]. В результате заражения биологических систем вирус ящура формирует 4 варианта частиц с разными значениями коэффициента седиментации: 146S компонент (полные частицы), состоящие из одной молекулы вирусной РНК и 60 копий полипептида VP₁-VP₂-VP₃-VP₄; 75S компонент, лишенный РНК и включающий в себя 60 копий полипептида VP₁-VP₃-VP₀; 12S частицы, представленные белками VP₁, VP₂, VP₃; 3,8S субъединицы, состоящие из функционального протеина VP₉ [4].

Ящур причиняет серьезный экономический ущерб, который включает затраты на ликвидацию болезни, введение строгих ограничений, налагаемых на внутреннюю и международную торговлю продукцией животноводства. Комплекс мер для борьбы и профилактики заболевания предполагает проведение стемпинга, массовую иммунизацию восприимчивых животных, а также контроль уровня напряженности поствакцинального иммунитета [1, 5].

При промышленном производстве противоящурных вакцин определяют концентрацию 146S компонента, влияющего непосредственно на иммуногенную активность препарата [2]. Традиционно для этого применяют количественный вариант реакции связывания компонента (РСК) и проводят оценку в соответствии с методическими рекомендациями [6]. Однако метод имеет ряд недостатков: трудоемкость и длительность

проводимого анализа (до 3 суток), невозможность одновременного исследования большого количества проб, вопреки требованиям производственного процесса, а также высокая себестоимость процедуры. В последние годы для опосредованного определения концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированной суспензии стали использовать полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) [7]. Представленный метод является высокочувствительным, специфичным, экономичным, быстрым в проведении и получении результатов анализа, а также позволяет одновременно исследовать несколько десятков проб неинaktivированного вирусосодержащего материала. Однако метод ОТ-ПЦР-РВ предполагает использование дорогостоящих реактивов и оборудования.

Разработан спектрометрический способ опосредованного определения концентрации 146S компонента вируса ящура в неинaktivированных суспензиях при оценке количества вирусной РНК, выделенной после серологического связывания полных частиц, с применением линейной модели $C_{146S} = (3,9 \times N_{PHK\ 146S} + 566\ 783\ 689) / 280\ 818\ 944\ 837$. Предложенный способ является дешевым, простым в исполнении, позволяет определять концентрацию 146S частиц вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины в течение 3–4 ч [8].

Цель работы – оценить возможность применения спектрометрического способа для опосредованного определения концентрации 146S компонента при анализе количества РНК вируса ящура в суспензиях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирус. В работе использовали неинaktivированные суспензии культурального вируса ящура производственных вакцинных штаммов А/Турция/2006, А/ВНИИЗЖ/2015, О/Приморский/2012, О/Приморский/2014, Азия-1/

Таджикистан/2011, CAT-2/Саудовская Аравия 7/2000. Культивирование вируса проводили в суспензионной перевиваемой линии клеток почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/SUSP/ARRIAH) с концентрацией $(3,0-3,5) \times 10^6$ млн кл./см³.

Иммобилизацию планшета и серологическое связывание вируса ящура штаммоспецифическими иммуноглобулинами G (IgG) проводили в соответствии с требованиями, представленными ранее [8].

Экстрагирование РНК из полных частиц вируса ящура. Процесс элюирования РНК из 146S компонента вируса ящура, связанных штаммоспецифическими IgG, проводили в соответствии с методикой P. Chomczynski [9, 10]. В итоге получали по 0,1 см³ 30-кратных экстрактов вирусной РНК. Данные элюаты либо сразу применяли в дальнейшей работе, либо замораживали при температуре минус 20 °С.

Измерение степени чистоты элюата РНК вируса ящура с помощью спектрального анализа. Спектральную поглощающую способность экстрактов РНК вируса ящура проводили в ультрафиолетовом спектре света при длинах волны в диапазоне 205–325 нм. Содержание в препарате остатков фосфолипидов, полисахаридов и гуанидин изотиоцианата, фенола, полипептидов, крупных конгломератов оценивали, определяя значения оптической плотности (OD) при длинах волны 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно [11]. Элюат РНК считали свободным от примесей белка и фенола, если коэффициент экстинкции $R_1 (OD_{262}/OD_{280})$ находился в пределах 1,8–2,2 и его значение приближалось к 2,0. Превышение данного показателя свидетельствовало о дегградации нуклеиновой кислоты до олигонуклеотидов и свободных нуклеотидов. Экстракт РНК вируса ящура считали незагрязненным углеводами, если коэффициент экстинкции $R_2 (OD_{262}/OD_{235})$ находился в диапазоне значений 2,00–2,02. При замещении 1% РНК на полисахаридные составляющие значение коэффициента R_2 уменьшается на 0,002. При $R_2 > 2,02$ наблюдается процесс диссоциации нуклеиновой кислоты и отмечается наличие свободных нуклеотидов или олигонуклеотидов в элюате исследуемого образца. Отсутствие крупных взвешенных частиц в экстракте РНК вируса ящура подтверждали, если значение OD_{320} стремилось к нулю [12].

Определение количества молекул РНК вируса ящура. Количество молекул РНК, экстрагированных из полных частиц вируса ящура ($N_{\text{РНК } 146S}$), определяли с использованием математического выражения:

$$N_{\text{РНК } 146S} = 0,98 \times \frac{41,67 \times K \times (OD_{262} - OD_{320} - OD_{260K}) \times N_A}{10^{7,48} \times Mw_{\text{рибонуклеозида}} \times L},$$

где K – кратность разведения элюата РНК, выделенной из полных частиц вируса ящура;

OD_{262} – значение оптической плотности экстракта РНК, выделенной из 146S компонента вируса ящура, при длине волны 262 нм;

OD_{320} – значение оптической плотности элюата РНК, выделенной из 146S частиц вируса ящура, при длине волны 320 нм;

OD_{260K} – значение оптической плотности отрицательного контроля при длине волны 260 нм;

N_A – значение постоянной Авогадро (в Международной системе единиц (СИ) согласно изменениям определений основных единиц точно равно $6,02214076 \times 10^{23}$ моль⁻¹);

$Mw_{\text{рибонуклеозида}}$ – средний молекулярный вес рибонуклеозида (340,5 Да);

L – длина РНК вируса ящура (около 8 500 н. о., в соответствии с данными National Center for Biotechnology Information);

41,67 – фактор для РНК вируса ящура ($F_{\text{РНКВЯ}}$);

$1/10^{7,48}$ – суммарный коэффициент перевода массы из [мкг] в [г] и пересчета количества молекул РНК вируса ящура из тридцатикратного элюата в однократный экстракт [8].

Определение концентрации 146S частиц по количеству молекул РНК вируса ящура. На основе полученных данных о количестве молекул вирусной РНК ($N_{\text{РНК } 146S}$) определяли концентрацию 146S частиц вируса ящура (C_{146S}), пользуясь математическим выражением $C_{146S} = (3,9 \times N_{\text{РНК } 146S} + 566\,783\,689)/280\,818\,944\,837$ [8].

Параллельно для определения концентрации полных частиц вируса ящура (в мкг/см³) применяли количественный вариант ПСК, проведение осуществляли в соответствии с требованиями [6].

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Количественный анализ РНК вируса ящура в неинaktivированной суспензии для изготовления вакцины проводили методом ОТ-ПЦР-РВ в соответствии с требованиями. По итогам проводимого исследования определяли значение порогового цикла амплификации, тем самым опосредованно оценивали количество нуклеиновой кислоты вируса и интерпретировали полученные данные для определения концентрации 146S частиц вируса ящура [7].

Контрольные образцы. В качестве положительного контроля применяли неинaktivированную суспензию штамма Азия-1/Таджикистан/2011 вируса ящура с концентрацией 146S компонента 3,7 мкг/см³, репродукцию которого проводили в суспензионной перевиваемой линии клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH. Отрицательным контролем служила суспензия культуры клеток ВНК-21/SUSP/ARRIAH с концентрацией $(3,0-3,5) \times 10^6$ млн кл./см³.

Статистическая обработка данных подразумевала: расчет средних арифметических значений и достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными методом Стьюдента – Фишера; расчет стандартных отклонений концентраций числа молекул РНК и количества полных частиц вируса ящура. Обработку результатов и оформление гистограмм проводили с применением пакета прикладных программ StatSoft (версия 6.0) и Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В данном исследовании проводили тестирование спектрометрического способа опосредованного определения концентрации 146S частиц при оценке количества РНК вируса ящура указанных в материалах и методах штаммов. Каждое исследование предусматривало применение положительного и отрицательного контрольных образцов, представленных выше.

На первом этапе работы определяли концентрацию 146S компонента вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011 (положительный контроль) спектрометрическим способом при оценке количества вирусной РНК, выделенной после серологического связывания с помощью IgG, а также посредством количественных вариантов ПСК и ОТ-ПЦР-РВ. Проводили процесс иммунного

связывания полных вирусных частиц из неинaktivированной суспензии вируса и экстрагирование РНК из 146S компонента вируса ящура, связанных штаммоспецифическими антителами. Итоговые данные анализа степени чистоты полученных элюатов для опытного и контрольных образцов отражены в таблице.

Из результатов спектрального анализа 30-кратного элюата РНК вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011 видно, что средние значения степени экстинкции при длинах волны 205–259 нм ($OD_{205-259}$) и 263–325 нм ($OD_{263-325}$) не превышали $OD_{260-262}$ ($0,001 - 0,948 < 0,951 - 0,952$ и $0,947 - 0,002 < 0,951 - 0,952$). Иными словами, препарат содержал преимущественно рибонуклеиновую кислоту. Элюат не содержал примесей фосфолипидов, полисахаридов и остатков гуанидин изотиоцианата, карболовой кислоты, белков и крупных конгломератов, так как на спектрограмме отсутствовали выраженные пики при длинах волны 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно. Коэффициент экстинкции R_1 составлял 1,996 ($OD_{262}/OD_{280} = 0,952/0,477$), что приближено к значению нормы 2,000, означает высокую степень чистоты элюата и практически полное отсутствие полипептидных составляющих и остатков карболовой кислоты после этапа выделения РНК. Коэффициент экстинкции R_2 составлял 2,000 ($OD_{262}/OD_{235} = 0,952/0,476$), что также соответствовало норме и было показателем высокой степени чистоты контрольного препарата. Такая чистота препарата повышает достоверность проводимого анализа [12].

В результате спектрометрического исследования экстракта РНК вируса ящура получены следующие средние значения оптической плотности: $OD_{262} = 0,952 \pm 0,001$, $OD_{320} = 0,002$, $OD_{260K} = 0,006$ (для OD_{320} и OD_{260}). Среднеарифметическое число молекул РНК (число структурных частиц), выделенных из 146S компонента вируса ящура штамма Азия-1/Таджикистан/2011, составило $265\ 600\ 889\ 380 \pm 331\ 586\ 628$. Пользуясь разработанной линейной моделью связи C_{146S} и $N_{РНК}$ 146S [8], опосредованно определили значение концентрации анализа в положительном контроле, которое составило $3,691 \pm 0,004$ мкг/см³, что коррелировало с результатами количественного варианта РСК ($3,710 \pm 0,170$ мкг/см³) и ОТ-ПЦР-РВ ($3,700 \pm 0,030$ мкг/см³) на 99,43 и 99,84% соответственно. Таким образом, положительный контроль удовлетворял требованиям по степени чистоты и содержанию заявленного количества 146S компонента. В отрицательном контроле РНК и 146S частиц вируса ящура обнаружено не было ни одним из представленных методов.

Параллельно определяли концентрацию 146S компонента вируса в опытных образцах штаммов А/Турция/2006, А/ВНИИЗЖ/2015, О/Приморский/2012, О/Приморский/2014, Азия-1/Таджикистан/2011 и САТ-2/Саудовская Аравия 7/2000 с помощью спектрометрического метода при оценке количества РНК вируса ящура, элюированной после процесса серологического связывания, а также в количественных вариантах РСК и ОТ-ПЦР-РВ. Этапы исследования проводили, как указано выше. Результаты оценки степени чистоты элюатов РНК указанных штаммов вируса ящура представлены на рисунке и в таблице.

Из данных спектрального анализа 30-кратного элюата РНК вируса ящура штамма А/Турция/2006 видно, что средние значения экстинкции при длинах волны 205–259 и 263–325 нм не превышали

$OD_{260-262}$ ($0,001 - 0,482 < 0,483 - 0,488$ и $0,487 - 0,002 < 0,483 - 0,488$), иными словами, препарат содержал преимущественно молекулы РНК. Элюат не был контаминирован примесями фосфолипидов, полисахаридами и остатками гуанидин изотиоцианата, фенола, белковыми компонентами и крупными конгломератами, так как на спектрограмме отсутствовали выраженные пики при длинах волны 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно. Коэффициент экстинкции R_1 составлял 1,984 ($OD_{262}/OD_{280} = 0,488/0,246$), что приближено к значению нормы 2,000 и означает практически полное отсутствие полипептидов и остатков карболовой кислоты после этапа экстрагирования РНК. Значение коэффициента экстинкции R_2 составляло 1,992 ($OD_{262}/OD_{235} = 0,488/0,245$), что близко к 2,000 и говорит о высокой чистоте элюата. При замещении 1% РНК на полисахариды коэффициент R_2 снижался на 0,002, т. е. в полученном экстракте наличие полисахаридных компонентов не превышало 4%, что допустимо (не более 10%) [12].

При проведении спектрометрического анализа экстракта РНК вируса ящура штамма А/Турция/2006 получены следующие средние значения оптических плотностей: $OD_{262} = 0,488 \pm 0,001$, $OD_{320} = 0,002$, $OD_{260K} = 0,006$ (для OD_{320} и OD_{260}). Среднеарифметическое число структурных частиц (РНК), выделенных из полных вирусных частиц, составило $135\ 051\ 299\ 685 \pm 281\ 356\ 875$. С использованием разработанной линейной модели связи C_{146S} и $N_{РНК}$ 146S [8] рассчитали значение концентрации 146S компонента, которое составило $1,878 \pm 0,004$ мкг/см³, что коррелировало с результатами количественных вариантов РСК ($1,900 \pm 0,180$ мкг/см³) и ОТ-ПЦР-РВ ($1,895 \pm 0,032$ мкг/см³) на 98,84 и 99,89% соответственно. Таким образом, разработанная ранее линейная модель с помощью спектрального анализа позволяет определять концентрацию 146S компонента вируса ящура в неинaktivированной суспензии для изготовления вакцинных препаратов.

Спектральное исследование 30-кратного элюата РНК вируса ящура штамма А/ВНИИЗЖ/2015 показало, что средние значения экстинкции при длинах волны 205–259 и 263–325 нм не превышали $OD_{260-262}$ ($0,001 - 0,403 < 0,404 - 0,407$ и $0,403 - 0,001 < 0,404 - 0,407$), т. е. полученный препарат содержал преимущественно рибонуклеиновую кислоту. Экстракт не содержал примесей фосфолипидов, полисахаридов и остатков гуанидин изотиоцианата, фенола, полипептидов и крупных взвешенных частиц, поскольку на диаграмме отсутствуют выраженные пики при длинах волны 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно. Коэффициент экстинкции R_1 составлял 1,995 ($OD_{262}/OD_{280} = 0,407/0,204$), что приближено к норме 2,000 и означает практически полное отсутствие белка и примесей карболовой кислоты. Коэффициент экстинкции R_2 равен 1,995 ($OD_{262}/OD_{235} = 0,407/0,204$), что близко к 2,000 и указывает на высокую чистоту вытяжки. При замещении 1% РНК на полисахаридные компоненты коэффициент R_2 снижался на 0,002, следовательно, в полученном препарате наличие полисахаридных компонентов не превышает 2,5%, что является допустимым [12].

По итогам спектрометрического анализа элюата РНК вируса ящура штамма А/ВНИИЗЖ/2015 были получены следующие средние значения оптической плотности: $OD_{262} = 0,407 \pm 0,001$, $OD_{320} = 0,003$, $OD_{260K} = 0,006$ (для OD_{320} и OD_{260}). Среднеарифметическое число молекул РНК, элюированных из 146S частиц вируса ящура

Таблица
Соотношение результатов опосредованного определения концентрации 146S частиц исследуемых образцов по количеству молекул РНК вируса ящура и корреляции с данными РСК и ОТ-ПЦР-РВ ($n = 3, p < 0,005$)

Table
Correlation between results of indirect 146S concentration determination in the tested samples based on the number of FMDV RNA molecules and correlation with CFT and rRT-PCR data ($n = 3, p < 0.005$)

Штамм вируса ящура	Спектральный анализ элюата РНК						OD _{260нм.ф.}	N _{РНК 146S.ф.}	C _{146S.ф.} МКГ/см ³		
	OD _{262ф.}	OD _{235ф.}	OD _{280ф.}	OD _{320ф.}	R ₁	R ₂			спектральный анализ*	РСК [6]	ОТ-ПЦР-РВ [7]
Азия-1/Таджикистан/2011	0,810 ± 0,001	0,407 ± 0,001	0,406 ± 0,001	0,003 ± 0,000	1,995	2,000	0,006 ± 0,000	225 366 856 349 ± 281 356 874	3,150 ± 0,170	3,132 ± 0,004	3,137 ± 0,040
А/Турция/2006	0,488 ± 0,001	0,245 ± 0,002	0,246 ± 0,001	0,002 ± 0,000	1,984	1,992	0,006 ± 0,000	135 051 299 685 ± 281 356 871	1,900 ± 0,180	1,878 ± 0,004	1,876 ± 0,040
0/Приморский/2014	0,314 ± 0,002	0,157 ± 0,001	0,158 ± 0,001	0,002 ± 0,000	1,987	2,000	0,006 ± 0,000	86 095 203 549 ± 562 713 749	1,210 ± 0,150	1,198 ± 0,008	1,204 ± 0,050
А/ВНИИЗЖ/2015	0,407 ± 0,001	0,204 ± 0,001	0,204 ± 0,001	0,003 ± 0,000	1,995	1,995	0,006 ± 0,000	111 698 679 114 ± 281 356 870	1,580 ± 0,170	1,553 ± 0,004	1,554 ± 0,041
0/Приморский/2012	0,339 ± 0,002	0,170 ± 0,001	0,171 ± 0,001	0,001 ± 0,000	1,982	1,994	0,006 ± 0,000	93 410 482 282 ± 562 713 747	1,330 ± 0,160	1,299 ± 0,008	1,314 ± 0,050
САТ-2/Сауровская Аравия 7/2000	0,203 ± 0,002	0,102 ± 0,001	0,103 ± 0,001	0,001 ± 0,000	1,971	1,990	0,006 ± 0,000	54 864 590 497 ± 562 713 752	0,750 ± 0,140	0,764 ± 0,008	0,768 ± 0,040
Азия-1/Таджикистан/2011 (положительный контроль)	0,952 ± 0,001	0,476 ± 0,001	0,477 ± 0,001	0,002 ± 0,000	1,996	2,000	0,006 ± 0,000	265 600 889 380 ± 331 586 628	3,710 ± 0,170	3,691 ± 0,004	3,700 ± 0,030

OD_{262ф.} — среднее значение экстинкции при 262 нм; OD_{235ф.} — среднее значение экстинкции при 235 нм; OD_{280ф.} — среднее значение экстинкции при 280 нм; OD_{320ф.} — среднее значение экстинкции при 320 нм; OD_{260ф.ф.} — среднее значение экстинкции отрицательного контроля при 260 нм; R₁ — коэффициент экстинкции (OD_{262/OD₂₈₀}), рассчитанный исходя из средних значений OD при длинах волн 262 и 280 нм; R₂ — коэффициент экстинкции (OD_{262/OD₂₃₅}), рассчитанный исходя из средних значений OD при длинах волн 262 и 235 нм; N_{РНК 146S.ф.} — среднее количество молекул РНК, выделенных из 146S частиц вируса ящура; C_{146S.ф.} — среднее значение концентрации 146S частиц вируса ящура; * предложенный спектрометрический способ опосредованного определения концентрации полных частиц вируса ящура [8].
 OD_{262mean} — mean extinction for 262 nm; OD_{235mean} — mean extinction for 235 nm; OD_{280mean} — mean extinction for 280 nm; OD_{320mean} — mean extinction for 320 nm; OD_{260f.f.} — mean extinction of negative control for 260 nm; R₁ — extinction coefficient (OD_{262/OD₂₈₀}), calculated based on OD mean values at the wavelengths of 262 and 280 nm; R₂ — extinction coefficient (OD_{262/OD₂₃₅}), calculated based on OD mean values at the wavelengths of 262 and 235 nm; N_{RNA 146Smean} — average number of RNA molecules, isolated from FMDV 146S particles; C_{146Smean} — mean concentration of FMDV 146S particles; * the proposed spectrometric method to indirectly determine concentration of the whole FMDV particles [8].

после серологического штаммоспецифического связывания в результате реакции нейтрализации, составило $111\ 698\ 679\ 114 \pm 281\ 356\ 870$. Значение концентрации 146S компонента вируса ящура в полученном образце было $1,553 \pm 0,004$ мкг/см³, что коррелировало с результатами количественных вариантов ПСК ($1,58 \pm 0,17$ мкг/см³) и ОТ-ПЦР-ПВ ($1,555 \pm 0,041$ мкг/см³) на 98,29 и 99,94% соответственно. Следовательно, указанная выше математическая линейная функция с помощью спектрального анализа позволяет определять концентрацию полных частиц вируса ящура в неинaktivированной суспензии для изготовления широкого спектра вакцинных препаратов [8].

Результаты спектрального анализа элюата РНК вируса ящура штамма О/Приморский/2014 показали, что средние значения $OD_{205-259}$ и $OD_{263-325}$ не превышали $OD_{260-262}$ ($0,001-0,311 < 0,312-0,314$ и $0,311-0,001 < 0,312-0,314$), следовательно, полученный экстракт содержал преимущественно молекулы рибонуклеиновой кислоты. Элюат не загрязнен примесями фосфолипидов, углеводов и остатками гуанидин изотиоцианата, карболовой кислоты, полипептидов и крупными агрегированными частицами, так как на спектрограмме отсутствовали выраженные пики при длинах волны 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно. Коэффициент экстинкции R_1 соответствовал значению 1,987 ($OD_{262}/OD_{280} = 0,314/0,158$), что приближено к нормальному значению 2,000 и означает практически полное отсутствие пептидов и остатков карболовой кислоты в препарате РНК. Коэффициент экстинкции R_2 составлял 2,000 ($OD_{262}/OD_{235} = 0,314/0,157$),

что соответствует норме и свидетельствует об отсутствии полисахаридных примесей и признаков деградации вирусной РНК [12].

При проведении спектрометрического исследования элюата РНК вируса ящура штамма О/Приморский/2014 были получены следующие средние значения оптической плотности: $OD_{262} = 0,314 \pm 0,002$, $OD_{320} = 0,002$, $OD_{260K} = 0,006$ (для OD_{320} и OD_{260}). Среднее содержание структурных частиц РНК в экстракте составило $86\ 095\ 203\ 549 \pm 562\ 713\ 749$, значение концентрации 146S компонента вируса соответствовало значению $1,198 \pm 0,008$ мкг/см³, что коррелировало с данными количественных вариантов ПСК ($1,21 \pm 0,15$ мкг/см³) и ОТ-ПЦР-ПВ ($1,199 \pm 0,045$ мкг/см³) на 99,01 и 99,50% соответственно. Таким образом, разработанная ранее линейная математическая модель с помощью спектрального анализа дает возможность определять содержание 146S компонента вируса ящура в неинaktivированном сырье для производства противоящурных вакцин [8].

При тестировании спектрометрического способа опосредованного определения концентрации 146S частиц при оценке содержания молекул РНК вируса ящура штамма О/Приморский/2012 установили, что средние значения $OD_{205-259}$ и $OD_{263-325}$ не превышали $OD_{260-262}$ ($0,002-0,335 < 0,336-0,339$ и $0,334-0,001 < 0,336-0,339$), иными словами, экстракт содержал преимущественно молекулы РНК. Элюат не загрязнен примесями фосфолипидов, углеводных компонентов и остатками гуанидин изотиоцианата, гидроксibenзола, белков и конгломератов, поскольку на спектрограмме отсутствовали

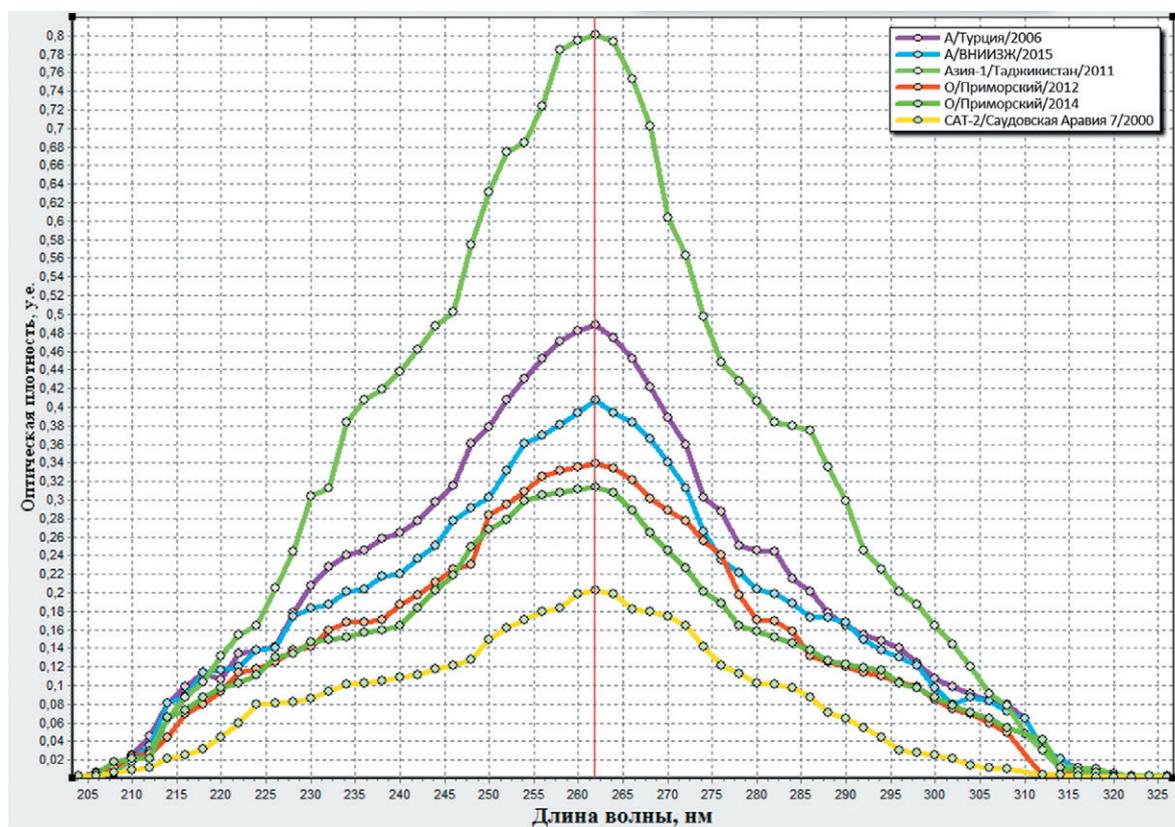


Рис. Спектрограммы экстрактов РНК вируса ящура исследуемых штаммов для оценки чистоты и определения концентрации 146S частиц в исходных суспензиях

Fig. Spectrograms of the FMDV RNA extracts of the studied strains to assess purity and determine concentration of 146S particles in the original suspensions

выраженные пики при длинах волны 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно. Коэффициент экстинкции R_1 составлял 1,982 ($OD_{262}/OD_{280} = 0,339/0,171$), что приближено к значению нормы 2,000 и означает практически полное отсутствие полипептидов и пептидов, а также остатков карболовой кислоты в анализируемом экстракте. Коэффициент экстинкции R_2 соответствовал значению 1,994 ($OD_{262}/OD_{235} = 0,339/0,170$), что близко к норме (2,000). Полученные данные обуславливают отсутствие признаков деградации вирусной РНК и содержание полисахаридных примесей в количестве, не превышающем 3%, что допустимо [12].

В результате проведения спектрометрического анализа элюированного препарата вирусной нуклеиновой кислоты получены следующие средние значения оптической плотности: $OD_{262} = 0,339 \pm 0,002$, $OD_{320} = 0,001$, $OD_{260K} = 0,006$ (для OD_{320} и OD_{260}). Среднее количество молекул РНК в образце составило $93\,410\,482\,282 \pm 562\,713\,747$, а концентрация полных частиц вируса ящура штамма О/Приморский/2012 – $1,299 \pm 0,008$ мкг/см³, что коррелировало с результатами количественных вариантов РСК ($1,33 \pm 0,16$ мкг/см³) и ОТ-ПЦР-РВ ($1,302 \pm 0,052$ мкг/см³) на 97,67 и 98,66% соответственно. Таким образом, используемое в работе математическое выражение с помощью спектрального исследования дает возможность оценивать концентрацию компонента вируса ящура с коэффициентом седиментации 146S в неинaktivированной суспензии для вакцинных препаратов против ящура [8].

Спектральное исследование 30-кратного элюата РНК вируса ящура штамма Азия1/Таджикистан/2011 показало, что средние значения $OD_{205-259}$ и $OD_{263-325}$ не превышали $OD_{260-262}$ ($0,001-0,801 < 0,802-0,810$ и $0,801-0,003 < 0,802-0,810$), следовательно, элюат содержал в своем составе преимущественно рибонуклеиновую кислоту. Выделенный препарат не содержал примесей фосфолипидов, углеводов и остатков детергента гуанидин изотиоцианата, гидроксibenзола, полипептидов и взвешенных конгломератов, так как на спектрограмме отсутствовали выраженные пики при длинах волны 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно. Коэффициент экстинкции R_1 соответствовал значению 1,995 ($OD_{262}/OD_{280} = 0,810/0,406$), что приближено к нормальному значению 2,000 и означает высокую степень чистоты элюата РНК вируса и практически полное отсутствие полипептидных составляющих и остатков карболовой кислоты. Коэффициент экстинкции R_2 составлял 1,990 ($OD_{262}/OD_{235} = 0,810/0,407$), что также близко к 2,000 и свидетельствует о высокой чистоте образца. При замещении 1% нуклеиновой кислоты на полисахаридные составляющие значение коэффициента экстинкции R_2 уменьшается на 0,002, следовательно, в полученном экстракте наличие углеводных компонентов составляло не более 5%, что является допустимым [12]. Таким образом, элюат вирусной нуклеиновой кислоты, выделенной из пробы вируса ящура штамма Азия1/Таджикистан/2011, имел высокую степень чистоты, что позволяло с высокой степенью достоверности определить число структурных частиц (молекул РНК).

По данным спектрального анализа, средние значения оптической плотности OD_{262} составляли $0,810 \pm 0,001$, $OD_{320} = 0,003$, $OD_{260K} = 0,006$ (для OD_{320} и OD_{260}). Среднеарифметическое количество молекул РНК, выделенных из полных вирусных частиц, было $225\,366\,856\,349 \pm 281\,356\,874$, концентрация

146S компонента вируса ящура штамма Азия1/Таджикистан/2011 – $3,132 \pm 0,004$ мкг/см³, что коррелирует с результатами, полученными в РСК ($3,150 \pm 0,170$ мкг/см³) и ОТ-ПЦР-РВ ($3,136 \pm 0,040$ мкг/см³), на 99,49 и 99,76% соответственно. Отсюда следует, что разработанная с помощью данных спектрального анализа линейная алгебраическая функция связи C_{146S} и $N_{РНК\,146S}$ позволяет оценивать концентрацию полных частиц в неинaktivированной суспензии для вакцины против ящура [8].

В результате спектрального исследования 30-кратного элюата рибонуклеиновой кислоты вируса ящура штамма САТ-2/Саудовская Аравия 7/2000 обнаружил, что средние значения экстинкции при длинах волны 205–259 и 263–325 нм не превышали $OD_{260-262}$ ($0,002-0,199 < 0,200-0,203$ и $0,198-0,001 < 0,200-0,203$), т. е. элюат включал преимущественно РНК. Экстракт не был загрязнен фосфолипидными примесями, углеводами и остатками гуанидин изотиоцианата, гидроксibenзола, полипептидов и взвешенных конгломератов, так как на спектрограмме отсутствовали выраженные пики при длинах волны 205, 235, 270, 280 и 320 нм соответственно. Коэффициент экстинкции R_1 составлял 1,971 ($OD_{262}/OD_{280} = 0,203/0,102$), что приближено к норме 2,000 и означает практически полное отсутствие полипептидов и остатков карболовой кислоты в препарате. Коэффициент экстинкции R_2 соответствовал значению 1,990 ($OD_{262}/OD_{235} = 0,203/0,102$), что близко к 2,000 и обуславливает высокую степень чистоты образца. При замещении 1% РНК на углеводы коэффициент R_2 снижается на 0,002, иными словами, в полученном препарате наличие полисахаридов не превышает 5%, что допустимо [12].

По итогам спектрометрического исследования экстракта РНК получены следующие средние значения экстинкции: $OD_{262} = 0,203 \pm 0,002$, $OD_{320} = 0,002$, $OD_{260K} = 0,006$ (для OD_{320} и OD_{260}). Среднее число молекул нуклеиновой кислоты, выделенной из частиц вируса ящура штамма САТ-2/Саудовская Аравия 7/2000 с коэффициентом седиментации 146S, составило $54\,864\,590\,497 \pm 562\,713\,752$. Значение концентрации 146S компонента вируса ящура соответствовало значению $0,764 \pm 0,008$ мкг/см³, что коррелировало с результатами количественных вариантов РСК ($0,75 \pm 0,14$ мкг/см³) и ОТ-ПЦР-РВ ($0,765 \pm 0,044$ мкг/см³) на 98,10 и 99,48% соответственно. Следовательно, разработанная ранее линейная математическая модель с помощью спектрального анализа позволяет оценивать содержание полных частиц вируса ящура в неинaktivированной суспензии для вакцинных препаратов [8].

На заключительном этапе проводили тестирование спектрометрического способа для определения концентрации 146S частиц в 410 неинaktivированных суспензиях вируса ящура вакцинных штаммов А/Турция/2006, А/ВНИИЗЖ/2015, О/Приморский/2012, О/Приморский/2014, Азия-1/Таджикистан/2011, САТ-2/Саудовская Аравия 7/2000. Исследования проводили параллельно количественными методами ОТ-ПЦР-РВ и РСК в трех повторениях. Совпадение фактических результатов в ОТ-ПЦР-РВ и ожидаемых результатов по определению концентрации 146S компонента культурального вируса ящура спектрометрическим способом составило 97,0–99,9%. При сравнении с данными РСК совпадение фактических и ожидаемых результатов соответствовало значениям 94,5–99,5%. Для положительного контроля совпадение фактических и ожидаемых результатов было 99,0–99,6%. В отрицательном контрольном

образце РНК и 146S частицы вируса ящура не обнаружены, что соответствовало ожиданиям. Таким образом, по результатам проведенного исследования корреляция спектрометрического способа для определения содержания 146S компонента при оценке количества рибонуклеиновой кислоты вируса ящура, выделенной после серологического связывания полных частиц с помощью штаммоспецифических IgG, с количественными вариантами ОТ-ПЦР-РВ и РСК составила 94,5–99,9%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена оценка возможности применения спектрометрического способа для опосредованного определения концентрации 146S компонента по количеству молекул нуклеиновой кислоты вируса ящура, выделенной после серологического связывания полных вирусных частиц с помощью IgG. Данный способ является дешевым, простым в исполнении, позволяет определять содержание 146S частиц вируса ящура в неинaktivированной суспензии для противоящурной вакцины в течение 3–4 ч.

При исследовании неинaktivированных суспензий культурального вируса ящура штаммов А/Турция/2006, А/ВНИИЗЖ/2015, О/Приморский/2012, О/Приморский/2014, Азия-1/Таджикистан/2011 и САТ-2/Саудовская Аравия 7/2000 доказано, что линейная алгебраическая модель вида $C_{146S} = (3,9 \times N_{\text{РНК } 146S} + 566\,783\,689) / 280\,818\,944\,837$ с помощью спектрального исследования позволяет опосредованно оценивать концентрацию 146S компонента вируса ящура в сырье для широкого спектра вакцинных препаратов.

Выявлено, что корреляция спектрометрического способа для определения содержания полных вирусных частиц при оценке количества нуклеиновой кислоты вируса ящура, выделенной после серологического связывания, с количественными вариантами ОТ-ПЦР-РВ и РСК составила 94,5–99,9%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. п. 1, 3–5, 9, 10, 12 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., Шербак А. В., Тимина А. М., Шишкова А. А. и др. Способ определения концентрации 146S-компонента вируса ящура в вирусосодержащем сырье для вакцины с применением метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Патент № 2619878 Российская Федерация, МПК G01N 33/58 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). ФГБУ «ВНИИЗЖ». № 2016140460/15. Заявл. 14.10.2016. Оpubл. 18.05.2017. Бюл. № 14.

- Лозовой Д. А., Михалишин Д. В., Доронин М. И., Стариков В. А., Гусева М. Н., Борисов А. В. Способ спектрометрического определения концентрации 146S частиц вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины по оценке количества молекул вирусной РНК, выделенной после иммунного захвата вирионов. Патент № 2712769 Российская Федерация, МПК G01N 33/58 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). ФГБУ «ВНИИЗЖ». № 2019116272. Заявл. 27.05.2019. Оpubл. 31.01.2020. Бюл. № 4.

11. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: пер. с англ. М.: Мир, 1991. 544 с.

REFERENCES

- Foot and mouth disease (infection with foot and mouth disease virus). In: *OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2018; Chap. 3.1.8: 433–464. Available at: 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 svoystva]. Vladimir: Foliant; 2006. 250 p. (in Russian)
- Nucleotide Database of National Center for Biotechnology Information (NCBI). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/?term=FM-DV+complete> (date of access: 20.02.2020).
- Martinez-Salas E., Saiz M., Sobrino F. Foot-and-Mouth Disease Virus. In: *Animal Viruses: Molecular Biology*. Ed. by T. C. Mettenleiter, F. Sobrino. Caister Academic Press; 2008; 1–38.
- 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.
- Bondarenko A. F. Qualitative and quantitative immunochemical assay of viral proteins [Kachestvennyj i kolichestvennyj immunohimicheskij 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. 2016140460/15. Date of filing: 14.10.2016. Date of publication: 18.05.2017. Bull. No. 14. (in Russian)
- Lozovoy D. A., Mikhailishin D. V., Doronin M. I., Starikov V. A., Guseva M. N., Borisov A. V. Method of spectrometric determination of concentration of 146S foot-and-mouth disease virus particles in non-inactivated raw material for a vaccine by estimating the number of molecules of viral RNA released after immune capture of virions. Patent No. 2712769 Russian Federation, Int. Cl. G01N 33/58 (2006.01), C12Q 1/68 (2006.01). FGBI "ARRIAH". No. 22019116272. Date of filing: 27.05.2019. Date of publication: 31.01.2020. Bull. No. 4. (in Russian)
- 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*[™]. Ed. by E. Rosato. 2007; 362: 315–327. DOI: 10.1007/978-1-59745-257-1_22.
- Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. H., Jones K. M. Data for Biochemical Research. Oxford: Clarendon Press; 1989. 592 p.
- Glase J. A. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*. 1995; 18 (1): 62–63. PMID: 7702855.

Поступила 25.09.2020

Принята в печать 04.12.2020

Received on 25.09.2020

Approved for publication on 04.12.2020

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Доронин Максим Игоревич, кандидат биологических наук, ведущий 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.

Камалова Наталья Евгеньевна, доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник центра доклинических исследований ФГБУ «ВНИИЗЖ», 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), Leading 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.

Natalia Ye. Kamalova, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Chief Researcher, Centre for Preclinical Studies, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia.

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