



Сравнительное исследование ПЦР-наборов для выявления ДНК вируса АЧС

М. С. Красникова¹, С. П. Яцентюк², М. Б. Брюсова³, А. Д. Козлова⁴, М. А. Гергель⁵

ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»), г. Москва, Россия

¹ ORCID 0000-0002-6248-419X, e-mail: m.krasnikova@vgnki.ru

² ORCID 0000-0002-4819-2131, e-mail: pcr-lab@vgnki.ru

³ e-mail: m.bryusova@vgnki.ru

⁴ ORCID 0000-0002-4793-2345, e-mail: adkozlova@vgnki.ru

⁵ ORCID 0000-0002-8033-1154, e-mail: m.gergel@vgnki.ru

РЕЗЮМЕ

В работе представлены результаты сравнения 12 отечественных диагностических наборов/ПЦР-тест-систем для выявления ДНК вируса африканской чумы свиней по таким показателям, как полнота и грамотность инструкций по применению; маркировка и комплектация; удобство использования наборов; стабильность работы реагентов в течение срока хранения; стабильность реагентов после транспортировки и многократного замораживания – оттаивания; межсерийная сходимость; чувствительность при тестировании различного материала и специфичность наборов. Изучение инструкций по применению и комплектации наборов выявило неполноту некоторых инструкций. Отмечено, что отдельные производители допускают в инструкциях серьезные ошибки, которые могут существенно повлиять на интерпретацию результатов исследования. Также отмечена недостаточность контроля производственного процесса, результатом которой является выпуск неработоспособных наборов, а также наборов с низким качеством компонентов и ошибками в их маркировке. Так, при проведении исследования один набор показал свою неработоспособность, демонстрируя отсутствие кривых накопления флуоресцентного сигнала как при амплификации положительных контролей, так и ДНК изолятов вируса АЧС. При оценке специфичности все наборы показали отсутствие неспецифических реакций и приемлемую чувствительность при тестировании различных типов материала (крови, суспензий свиной селезенки и черевы свиной, используемой при производстве колбасных изделий), содержащих вирус АЧС. Проверка стабильности показала резкое ухудшение качества работы одного набора в пределах срока годности, для другого набора выявлено существенное снижение уровня флуоресцентного сигнала при многократном замораживании – оттаивании. Сравнение сходимости результатов работы разных серий наборов одного производителя показало существенные расхождения для 41,5% наборов. Установлено, что лишь у 33% рассмотренных наборов для выявления ДНК вируса АЧС отсутствуют какие-либо недостатки. Результаты проведенной работы демонстрируют необходимость контроля выпускаемых диагностических наборов, используемых в государственных программах мониторинга заболеваний животных.

Ключевые слова: ПЦР-тест-система, африканская чума свиней, чувствительность, специфичность, стабильность

Благодарность: Работа выполнена при поддержке Россельхознадзора в рамках научно-исследовательской работы по теме: «Изучение параметров качества отечественных и зарубежных диагностических ПЦР-наборов, применяемых в лабораторной ветеринарной практике на территории РФ, с целью разработки единых требований к параметрам качества и методам их контроля». Авторы выражают благодарность ФГБУ «ВНИИЗЖ» и ФГБНУ ФИЦВиМ за предоставленные образцы вируса АЧС.

Для цитирования: Красникова М. С., Яцентюк С. П., Брюсова М. Б., Козлова А. Д., Гергель М. А. Сравнительное исследование ПЦР-наборов для выявления ДНК вируса АЧС. *Ветеринария сегодня*. 2021; 10 (3): 209–215. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-3-38-209-215.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Яцентюк Светлана Петровна, кандидат биологических наук, заведующий отделом генодиагностики инфекционных болезней животных отделения биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ», 123022, Россия, г. Москва, Звенигородское шоссе, 5, e-mail: pcr-lab@vgnki.ru.

Comparative study of PCR test kits for ASFV DNA detection

M. S. Krasnikova¹, S. P. Yatsentyuk², M. B. Bryusova³, A. D. Kozlova⁴, M. A. Gergel⁵

FSBI "The Russian State Centre for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed" (FSBI "VGNKI"), Moscow, Russia

¹ ORCID 0000-0002-6248-419X, e-mail: m.krasnikova@vgnki.ru

² ORCID 0000-0002-4819-2131, e-mail: pcr-lab@vgnki.ru

³ e-mail: m.bryusova@vgnki.ru

⁴ ORCID 0000-0002-4793-2345, e-mail: adkozlova@vgnki.ru

⁵ ORCID 0000-0002-8033-1154, e-mail: m.gergel@vgnki.ru

SUMMARY

The paper presents comparative test results of 12 domestically produced diagnostic kits/PCR test systems for DNA detection of the African swine fever virus with regard to the following parameters: completeness and correctness of instructions for use; labeling and package contents; convenience of using the kit; shelf life stability of reagents; stability of reagents after transportation and repeated freezing – thawing; batch-to-batch repeatability; sensitivity of various test materials and specificity of kits. The study of the instructions for use and kit contents revealed incompleteness of some instructions. It was noted that some manufacturers make serious errors in the instructions, which can significantly affect the interpretation of test results. It was also observed that there is insufficient control of the manufacturing process, which results in the production of faulty kits, as well as kits with poor-quality components and errors in the labeling. Thus, during the study, one kit showed its inactivity, demonstrating the absence of accumulation curves of the fluorescent signal during amplification of both positive controls and DNA of ASFV isolates. When the specificity was assessed, all the kits showed absence of non-specific reactions and acceptable sensitivity when testing various types of ASFV-containing material (blood, suspensions of pork spleen and pork casings used in sausage production). The stability test showed a sharp deterioration in the quality of operation of one kit within the shelf life period, and a significant decrease in the fluorescence signal was detected during repeated freeze – thaw cycles for another kit. Comparison of the repeatability results of different kit batches of the same manufacturer showed significant discrepancies for 41.5% of all kits. It was found that only 33% of the studied kits for ASFV DNA detection were compliant. The results of this study demonstrate the need for control of the manufactured diagnostic kits used in state programs for animal disease monitoring.

Keywords: PCR test system, African swine fever, sensitivity, specificity, stability

Acknowledgements: The study was carried out with the support of the Rosselkhoznadzor within the research work: “Study of quality parameters of domestic and foreign diagnostic PCR test kits used in laboratory veterinary practice in the Russian Federation in order to develop common requirements for quality parameters and methods of their control”. The authors express their gratitude to the FGBI “ARRIAH” and the FSBI FRCVM for providing the ASF virus samples.

For citation: Krasnikova M. S., Yatsentyuk S. P., Bryusova M. B., Kozlova A. D. Gergel M. A. Comparative study of PCR test kits for ASFV DNA detection. *Veterinary Science Today*. 2021; 10 (3): 209–215. DOI: 10.29326/2304-196X-2021-3-38-209-215.

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

For correspondence: Svetlana P. Yatsentyuk, Candidate of Science (Biology), Head of the Department of Genodiagnosics of Infectious Animal Diseases, Department of Biotechnology, FSBI “VGNKI”, 123022, Russia, Moscow, Zvenigorodskoye shosse, 5, e-mail: pcr-lab@vgnki.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Африканская чума свиней (АЧС) – это высококонтагиозное вирусное заболевание свиней, вызываемое вирусом семейства *Asfarviridae*, которое поражает как домашних, так и диких свиней всех возрастов. АЧС является причиной серьезных экономических и производственных потерь и входит в список заболеваний Кодекса здоровья наземных животных, о случаях вспышек которых необходимо сообщать во Всемирную организацию здравоохранения животных (МЭБ).

Учитывая отсутствие эффективного лечения, а также программ вакцинации, профилактика АЧС во многом зависит от своевременной локализации и ликвидации вспышек заболевания. В Российской Федерации ежегодно проводят диагностические исследования как среди диких, так и среди домашних свиней. Количество проведенных исследований, по данным отчетов (форма 1-вет А), обобщенных в ФГБУ «Центр ветеринарии», в 2019 г. превысило 670 тыс., за 9 месяцев 2020 г. – 473 тыс. исследований. В 2020 г., по данным информационно-аналитического центра управления ветеринарным надзором Россельхознадзора [1], на территории России зафиксированы и нотифицированы в МЭБ 161 вспышка АЧС в популяции домашних свиней и 110 вспышек заболевания в популяции диких кабанов.

В настоящее время для диагностики АЧС широко применяется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Ветеринарные лаборатории, как правило, проводят исследования с использованием наборов реагентов (тест-систем), выпускаемых отечественными производителями. Лаборатории, выполняющие диа-

гностические исследования в рамках государственных программ, должны быть аккредитованы Федеральной службой по аккредитации (Росаккредитация), а документы, устанавливающие правила и методы испытаний, должны быть указаны в области аккредитации испытательной лаборатории. Часто такими документами являются инструкции к тест-системе или набору реагентов, при этом лаборатории обязаны четко следовать этим инструкциям. Проблема заключается в том, что в настоящее время диагностические тест-системы не проходят обязательную государственную регистрацию и сертификацию, отсутствует перечень требований к ним, согласование текста инструкций и независимая проверка качества наборов, что может привести к выпуску на рынок недостаточно качественных продуктов, проведение исследований с использованием которых может привести к неэффективной диагностике.

На отечественном рынке ПЦР-диагностикумов присутствуют тест-системы/наборы для ПЦР-диагностики АЧС в нескольких форматах и комплектациях: с электрофоретической детекцией и с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени; в полной комплектации, включающей как набор реагентов для проведения ПЦР, так и набор для экстракции ДНК, и, в случае электрофоретической детекции, набор для проведения электрофореза, а также наборы, предназначенные только для проведения ПЦР. В последнем случае производитель в инструкции может давать рекомендации о том, какой набор для выделения нуклеиновых кислот может

использоваться вместе с ПЦР-набором или указывает метод экстракции, либо указывает, что можно использовать любой набор для выделения нуклеиновых кислот. Обязательными компонентами набора являются контрольные образцы ПЦР. Однако и здесь отсутствует единообразие: в состав одних наборов входят эндогенный и/или экзогенный внутренний контрольный образец (ВКО), позволяющий контролировать взятие материала или качество экстракции, другие наборы не содержат ВКО, что снижает достоверность диагностического исследования. Сравнительные исследования диагностических наборов для выявления ДНК вируса АЧС, представленных на рынке диагностикумов России, ранее не проводились.

Целью данного исследования являлось сравнение отечественных диагностических ПЦР-наборов для выявления ДНК вируса АЧС, для чего были изучены такие показатели, как: полнота и грамотность инструкций по применению; маркировка и комплектация; удобство использования наборов; стабильность работы реагентов в течение заявленного производителем срока хранения; стабильность работы реагентов после транспортировки и многократного замораживания – оттаивания; сходимость результатов, получаемых при использовании разных серий набора одного производителя; предел обнаружения (чувствительность) при тестировании различного материала и специфичность наборов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали наборы реагентов для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР отечественного производства (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, ООО НПФ «Литех», ООО «Синтол», ООО «Фрактал Био», ООО «ИДС», ООО «Вет Фактор», ООО «ВМТ», ООО «Ветбиохим», ООО «Технология Центр», ООО «Органик-Тест»). При обсуждении результатов работы названия тест-систем/наборов и их производителей закодировали.

В качестве референтной диагностической тест-системы использовали набор VetMAX ASFV Detection Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США), валидированный и сертифицированный МЭБ (регистрационный номер 20200114).

Специфичность наборов оценивали с использованием панели из 38 различных образцов, включая штаммы бактерий и вирусов: «Скиф» вируса болезни Ауески, «Ильиногорский» штамм вируса трансмиссивной гастроэнтерита свиней, «ИС» вируса эпидемической диареи свиней, «КС» и «ЛК-ВНИИВВиМ» классической чумы свиней, «ВЛ90-94» парвовируса свиней, «G10 P11» ротавируса, 94881 вируса репродуктивно-респираторного синдрома свиней, 1010 цирковируса свиней, *Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617, *Brachyspira pilosicoli* ATCC 51139, *Brucella abortus* 82 сер. 022, *Brucella suis* 1330, *Campylobacter jejuni* «70.2T», *Chlamydia psittaci* «ЛС-87», *Clostridium perfringens* «Амо», *Escherichia coli* 0157:H7, *Erysipelothrix rhusiopathiae* ATCC 8139, *Haemophilus parasuis* «Уральский», *Histophilus somni* ATCC 700025, *Klebsiella pneumoniae* «K2 5055», *Lawsonia intracellularis* «MS B3903», *Leptospira interrogans* Pomona «ВГНК-6», *Listeria monocytogenes* «УСХИ-6», *Mycobacterium avium* «D4», *Mycobacterium bovis* 1414, *Mycobacterium paratuberculosis* 19698, *Mycoplasma hyopneumoniae* «J», полевой изолят *Mycoplasma hyorhinis*, *Pasteurella multocida* ATCC 43137, *Pseudomonas aerugi-*

nosa ATCC 27853, *Salmonella enterica* «Dublin 6», *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Staphylococcus aureus* «ВКПМВ 6646», *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Yersinia enterocolitica* «Му ОЗ ВНИПЧИ «Микроб», *Yersinia pseudotuberculosis* 192, а также геномную ДНК свиньи и панель из 6 образцов суспензии, содержащей вирус АЧС, полученных из коллекции ФГБУ «ВНИИЗЖ» (изоляты: Калининград 10/17, Орел 07/18, Арм07, Краснодар 07/17, Ленинград 02/19) и ФГБНУ ФИЦВиМ (штамм «Ставрополь 01/08»).

Для тест-систем в полной комплектации, включающих как набор реагентов для проведения ПЦР, так и набор для экстракции ДНК, чувствительность (предел обнаружения) в разных матрицах – биологическом материале (кровь, селезенка) и свиной череве, используемой для производства колбас, – оценивали для всего комплекта в целом. При работе с тест-системами, предназначенными только для проведения ПЦР и в инструкциях к которым отсутствуют рекомендации по экстракции ДНК, использовали комплект реагентов для выделения «ДНК/РНК-С-Фактор» (ООО «Вет Фактор», Россия). Были подготовлены серии десятикратных разведений изолята Ленинград 02/19 вируса АЧС (исходный титр 6,2 Ig ГАД_{Е50}/см³) в 10%-х суспензиях свиной селезенки, черевы и в крови. Выделение ДНК, а затем ПЦР проводили в трех повторностях для каждого разведения каждого типа материала.

Сравнение чувствительности комплектов для амплификации (без учета стадии экстракции ДНК) проводили с использованием серии разведений изолята Калининград 10/17 вируса АЧС (исходный титр 5,8 Ig ГАД_{Е50}/см³) в физиологическом растворе. Для выделения ДНК использовали набор «Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора). Полученную ДНК использовали для амплификации в ПЦР с помощью наборов различных производителей. Для каждого разведения вируса ПЦР проводили в трех повторностях.

Для сравнения эффективности экстракции ДНК наборами для выделения разных производителей, нуклеиновую кислоту выделяли из десятикратных разведений изолята Ленинград 02/19 вируса АЧС в физиологическом растворе. ПЦР проводили с помощью референтного набора реагентов VetMAX ASFV Detection Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., США).

Амплификацию ДНК, в зависимости от указанного производителем наборов способа детекции продуктов ПЦР, проводили с использованием приборов CFX96 C1000 Touch (Bio-Rad Laboratories Inc., США), Rotor-Gene Q (QIAGEN GmbH, Германия) и «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия).

При проверке стабильности работы наборов реагентов оценивали результат амплификации положительных и отрицательных контролей каждые 3 месяца в течение срока годности. Для оценки устойчивости реагентов к температурным условиям транспортировки, рекомендованным производителями, а также к многократному замораживанию – оттаиванию каждый из них делили на три равные части. Одну часть выдерживали при температурах, указанных производителем для хранения. Другую подвергали многократному (до 15 раз) замораживанию – оттаиванию. Вторую выдерживали в термоизолирующей пенопластовой коробке во льду в течение максимального срока транспортировки, допускаемого производителем. По завершении испытаний для каждого диагностического набора

проводили сравнительные реакции амплификации положительных и отрицательных контролей в нескольких повторностях.

Для проверки межсерийной воспроизводимости результатов сравнивали работоспособность одинаковых наборов реагентов разных серий, при этом учитывали данные, полученные после проведения сравнительных реакций амплификации положительных контролей и их разведений, а также образцов, содержащих ДНК вируса АЧС.

Прецизионность в условиях сходимости (повторяемости) и воспроизводимости определяли как степень согласованности результатов множественных анализов одного образца [2, 3]. Проводили расчет среднего арифметического значения порогового цикла C_t , среднеквадратического отклонения и коэффициента вариации. Совокупность полученных данных считали: однородной – если коэффициент вариации не превышал 10%; достаточно однородной – если коэффициент вариации находился в пределах 10–20%; достаточно разнородной – если коэффициент вариации был в диапазоне от 20 до 33%; разнородной – если коэффициент вариации превышал 33% [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследование были включены 12 наборов десяти производителей. Из них 10 наборов относились к формату ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени и 2 набора – к ПЦР с электрофоретической детекцией.

Оценка инструкций по применению наборов реагентов (тест-систем) показала, что некоторые произво-

дители уделяют недостаточно внимания их подготовке, а также маркировке компонентов. В инструкциях допускаются серьезные ошибки, в том числе противоречащие нормативным документам, регламентирующим работу лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот [5]. Такие ошибки могут существенно повлиять на интерпретацию результатов исследования, привести к выдаче ложноположительных или ложноотрицательных результатов. Не во всех инструкциях присутствует информация о подготовке проб к выделению ДНК. Для набора № 12 производитель заменил инструкцию по применению памяткой, в которой содержится информация о проведении этапа амплификации ДНК и по интерпретации результатов, но отсутствует описание компонентов набора, а также условий хранения реагентов и их транспортировки.

Анализ комплектации и эргономичности наборов показал, что отдельные производители неверно рассчитывают объем контрольных образцов, не учитывая возможность исследования в лаборатории единичных проб биологического материала.

В экспериментах по изучению специфичности все тест-системы, за исключением № 12, корректно детектировали ДНК вируса АЧС во всех исследуемых образцах изолятов вируса АЧС, выделенных в разное время на территории России.

Набор для амплификации № 12 показал свою работоспособность при тестировании девяти комплектов реагентов этого производителя разными операторами на разных приборах в разное время. Было выявлено отсутствие флуоресцентного сигнала по каналам детекции вируса АЧС как при амплификации ДНК, выде-

Таблица 1
Сравнительные результаты определения чувствительности наборов для амплификации при тестировании различного материала, загрязненного вирусом АЧС

Table 1
Comparative results of sensitivity assessment of amplification kits when testing various ASFV-contaminated materials

Обозначение-закодированной тест-системы/набора	Чувствительность наборов для амплификации ДНК вируса АЧС			
	без учета стадии выделения ДНК	при выделении ДНК из разных типов материала		
		Выявляемый титр вируса АЧС изолята Калининград 10/17 в физиологическом растворе (исходный титр 5,8 lg ГАД _{Е50} /см ³)	Выявляемый титр вируса АЧС изолята Ленинград 02/19 (исходный титр 6,2 lg ГАД _{Е50} /см ³)	
	в крови свиней		в суспензии свиной селезенки	в суспензии черевы свиной
№ 1	0,8	3,2	4,2	3,2
№ 2	0,8	3,2	3,2	3,2
№ 3	0,8	2,2	2,2	2,2
№ 4	0,8	2,2	2,2	1,2
№ 5	1,8	4,2	3,2	2,2
№ 6	1,8	3,2	4,2	3,2
№ 7	1,8	3,2	3,2	2,2
№ 8	1,8	3,2	3,2	4,2
№ 9	1,8	4,2	4,2	4,2
№ 10	1,8	3,2	3,2	2,2
№ 11	2,8	3,2	3,2	4,2

Таблица 2

Сравнительные результаты испытаний разных серий наборов с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени

Table 2

Comparative test results of different batches of kits with real time hybridization-fluorescence detection

Обозначение закодированной тест-системы/набора	Амплификация положительного контрольного образца на каналах детекции	Серия 1, Ct	Серия 2, Ct	Среднеквадратическое отклонение	Коэффициент вариации, %
№ 1	АЧС	17,36	18,03	0,34	1,89
	ВКО	19,28	19,50	0,11	0,57
№ 2	АЧС	26,89	28,87	0,99	3,55
	ВКО	29,35	22,55	3,40	13,40
№ 3	АЧС	19,22	17,35	0,93	5,11
	ВКО	20,23	19,51	0,36	1,81
№ 4	АЧС	32,68	34,14	0,73	2,18
	ВКО	31,35	32,14	0,40	1,24
№ 5	АЧС	23,15	23,24	0,04	0,19
	ВКО	20,44	20,37	0,04	0,17
	Экзогенный ВКО	21,76	21,83	0,03	0,16
№ 7	АЧС	23,68	16,61	3,54	17,55
№ 9	АЧС	16,87	20,32	1,73	9,28
№ 10	АЧС	19,69	19,87	0,09	0,46
	ВКО	24,17	26,34	1,09	4,30
№ 11	АЧС	Отсутствие детекции	10,15	–	–

ленной из изолятов вируса, так и при амплификации положительных контролей, входящих в состав набора. Поэтому наборы для проведения ПЦР этого производителя в остальных проверках не участвовали.

Результаты проверки чувствительности наборов для амплификации без учета стадии выделения ДНК, а также чувствительности систем праймеров при тестировании ДНК, выделенной из различных типов материала (кровь, суспензии свиной селезенки и черевы свиной), обобщены в таблице 1.

У ряда наборов наблюдали снижение предела обнаружения вируса при исследовании разных типов материала от свиной. Данный факт приобретает важное значение в случае исследования на АЧС пищевых продуктов свиного происхождения (колбас, фарша), в которых концентрация вируса может быть невысокой. При этом часть исследованных наборов (№ 2, 3, 9) показала одинаковую чувствительность вне зависимости от тестируемого материала. В целом можно отметить, что все наборы для амплификации продемонстрировали приемлемую чувствительность, поэтому при выборе между ними необходимо руководствоваться количеством и типом исследуемых проб, а также оценивать в связи с этим риск возникновения контаминации.

Поскольку этап выделения нуклеиновых кислот играет важную роль в ПЦР-исследовании, отдельно изучали эффективность экстракции ДНК наборами разных производителей. Эффективность экстракции оценивали, сравнивая результаты ПЦР,

полученные с помощью референтного набора VetMAX ASFV Detection Kit.

Установлено, что эффективность выделения ДНК при использовании наборов № 7–9 была ниже, чем у остальных. Выделенный с помощью этих наборов вирус АЧС был детектирован VetMAX ASFV Detection Kit с титром $4,2 \text{ Ig ГАД}_{50}/\text{см}^3$ в отличие от наборов № 1–6 и 10, которые позволили детектировать тем же набором сравнения вирус с титром $2,2 \text{ Ig ГАД}_{50}/\text{см}^3$. Несмотря на некорректную работу набора для ПЦР № 12, исследование показало достаточно высокую эффективность выделения ДНК разных комплектов для экстракции этого производителя: все комплекты реагентов, основанные на разных методах выделения ДНК, демонстрируют одинаковую эффективность (выявляемый титр вируса $3,2 \text{ Ig ГАД}_{50}/\text{см}^3$).

Надо отметить, что все исследованные наборы для выделения ДНК соответствуют своему целевому назначению и позволяют достаточно эффективно проводить экстракцию ДНК при тестировании материала от животных.

Результаты изучения стабильности наборов реагентов в течение срока годности показали резкое ухудшение качества работы набора № 8 в последней временной точке (12-й месяц хранения). Остальные наборы демонстрировали высокую или достаточную однородность результатов ПЦР на протяжении всего срока, с коэффициентом вариации до 10% или в пределах 10–20%.

Оценка устойчивости компонентов наборов к многократному замораживанию – оттаиванию и хранению при условиях транспортировки показала высокую стабильность десяти наборов из одиннадцати. Для набора № 7 при многократном замораживании – оттаивании выявлено двукратное снижение флуоресцентного сигнала при детекции результатов амплификации относительно значений, полученных при использовании аликвот исходных реагентов.

При проведении сравнительных испытаний разных серий наборов одного производителя выявлены расхождения в работе серий пяти из одиннадцати исследуемых наборов. Набор № 6 с электрофоретической детекцией продуктов амплификации показал высокую однородность результатов для двух разных серий, тогда как для разных серий аналогичного по методу детекции набора № 8 выявлены различия в работе входящего в комплект положительного контроля выделения: в одной серии результат амплификации детектируется только при десятикратном разведении этого компонента, а в другой детекция наблюдается при использовании компонента без предварительного разведения. Это может указывать на недоработки при производстве контрольного образца и наличие большого количества ингибиторов ПЦР в реагенте из первой серии.

В таблице 2 представлены результаты сравнения положительных контролей наборов реагентов для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР с гибридно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени.

В разных сериях набора № 7 различия в значении *St* при ампликации положительного контроля составили 7 (коэффициент вариации превышает 10%), при том что результаты амплификации ДНК вируса АЧС практически идентичны. Также в одной серии выявлена неработоспособность системы амплификации внутреннего контроля, что в целом говорит о нестабильном качестве контрольных образцов, системы праймеров и зондов данного производителя.

При сравнении разных серий набора № 2 установлено различие уровня флуоресцентного сигнала при детекции продуктов амплификации положительных образцов в 4 раза (коэффициент вариации превышает 10%).

В разных сериях набора № 10 выявлены различия в результатах ампликации внутреннего контроля ПЦР: различия в значении *St* по каналу детекции внутреннего контроля из наборов разных серий составили более 14 (коэффициент вариации превышает 25%), что также свидетельствует о нестабильном качестве производства этого компонента набора.

Набор № 11 разных серий показал низкую сходимость результатов: одна серия показала хорошую работоспособность, а наборы другой серии (проверку трех наборов этой серии проводили разные операторы) не продемонстрировали экспоненциальный рост кривых накопления флуоресцентного сигнала ни для положительных контролей, входящих в состав тест-системы, ни для контрольных образцов, содержащих вирус АЧС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что только у четырех из двенадцати рассмотренных наборов реагентов для выявления ДНК вируса АЧС трех различ-

ных производителей ПЦР-тест-систем ветеринарного назначения отсутствуют какие-либо недостатки, препятствующие их максимально результативному использованию.

Было отмечено, что отдельные производители ПЦР-тест-систем не уделяют должного внимания подготовке инструкций и комплектации наборов. Недостаточный контроль производственного процесса приводит к несоответствию маркировки, низкому качеству компонентов и в итоге – к неработоспособности контрольных образцов, реагентов или тест-системы в целом. Исследование показало, что чувствительность одного и тех же наборов при тестировании различного материала, указанного в инструкции по применению, может отличаться на 2 порядка. Наборы всех производителей продемонстрировали отсутствие неспецифических реакций, а проверка стабильности и межсерийной схожимости результатов показала, что замечаний по этим параметрам нет только для пяти диагностических наборов из двенадцати.

В настоящий момент сравнение тест-систем для диагностики проводится только внутри лабораторий либо провайдером при анализе результатов раундов профессионального тестирования. Результаты проведенной работы демонстрируют важность как государственной регистрации, так и периодического контроля выпускаемых диагностических наборов, используемых в государственных программах мониторинга заболеваний животных. Подобные процедуры регулирования рынка диагностических наборов существуют в странах ЕС, США и Канаде. Анализ данных процедур показал, что при оценке диагностикомов для ветеринарного применения в первую очередь рассматривают соответствие целевому назначению диагностического средства, его специфичность, чувствительность и воспроизводимость результатов, получаемых с использованием набора реагентов. В Российской Федерации сравнимой является процедура регистрации медицинских изделий, направленная на выпуск на российский рынок качественной и безопасной продукции. Разработка аналогичной процедуры государственного контроля диагностических наборов ветеринарного назначения представляется актуальной задачей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (п. 4 см. REFERENCES)

1. Эпизоотическая ситуация по АЧС в Российской Федерации в 2020 г. Режим доступа: <https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2020/12-31/01.pdf> (дата обращения: 02.01.2021).
2. Поляков И. В., Соколова Н. С. Практическое пособие по медицинской статистике. Л.: Медицина; 1975; 26–30.
3. Полякова В. В., Шаброва Н. В. Основы теории статистики: учебное пособие. 2-е изд., испр. и доп. Екатеринбург: Издательство Уральского университета; 2015. 145 с.
5. МУ 1.3-2569-09 Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2010. 51 с. Режим доступа: https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4801.

REFERENCES

1. ASF epidemic situation in the Russian Federation in 2020. [Эпизоотическая ситуация по АЧС в Российской Федерации в 2020 г.]. Available at: <https://fsvps.gov.ru/fsvps-docs/ru/iac/asf/2020/12-31/01.pdf> (date of access 02.01.2021). (in Russian)
2. Polyakov I. V., Sokolova N. S. Practical guide to medical statistics [Практическое пособие по медицинской статистике]. L.: Meditsyna; 1975; 26–30. (in Russian)

3. Polyakova V. V., Shabrova N. V. Fundamentals of the theory of statistics [Osnovy teorii statistiki]: Study Guide. 2nd ed., revised and updated. Yekaterinburg: Ural University Publishing House; 2015. 145 p. (in Russian)

4. Sundar Rao P.S.S., Richard J. Introduction to biostatistics and research methods. 5th ed. New Delhi: PHI Learning Private Limited; 2012. 280 p.

5. Methodical Guidelines 1.3-2569-09 Organization of laboratory activities using methods for amplification of nucleic acids and handling materials containing microorganisms of I–IV pathogenicity groups [МУ 1.3-2569-09 Organizaciya raboty laboratorij, ispol'zuyushchih metody amplifikacii

nukleinovyh kislot pri rabote s materialom, soderzhashchim mikroorganizmy I–IV grupp patogennosti]: Methodical Guidelines. M.: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2010. 51 p. Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=4801. (in Russian)

Поступила 09.03.2021

Принята в печать 26.05.2021

Received on 09.03.2021

Approved for publication on 26.05.2021

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Красникова Мария Сергеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генодиагностики инфекционных болезней животных отделения биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Яцентюк Светлана Петровна, кандидат биологических наук, заведующий отделом генодиагностики инфекционных болезней животных отделения биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Брюсова Мария Борисовна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом исследований биологических объектов ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Козлова Александра Дмитриевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела генодиагностики инфекционных болезней животных отделения биотехнологии ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Гергель Мария Александровна, заместитель директора, руководитель испытательного центра ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва, Россия.

Maria S. Krasnikova, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Department for Genodiagnostics of Infectious Animal Diseases of VGNKI, Department of Biotechnology, FSBI "VGNKI", Moscow, Russia.

Svetlana P. Yatsentyuk, Candidate of Science (Biology), Head of the Department for Genodiagnostics of Infectious Animal Diseases of VGNKI, Department of Biotechnology, FSBI "VGNKI", Moscow, Russia.

Maria B. Bryusova, Candidate of Science (Biology), Leading Researcher, Head of the Department for Biological Object Studies, FSBI "VGNKI", Moscow, Russia.

Aleksandra D. Kozlova, Candidate of Science (Biology), Senior Researcher, Department for Genodiagnostics of Infectious Animal Diseases of VGNKI Department of Biotechnology, FSBI "VGNKI", Moscow, Russia.

Mariya A. Gergel, Deputy Director and Head of Testing Center, FGBU "VGNKI", Moscow, Russia.