

ВАЛИДАЦИЯ ОБРАТНО-ТРАНСКРИПТАЗНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПОСРЕДОВАННОЙ ОЦЕНКИ ТИТРА ВИРУСА ЯЩУРА

Д. А. Лозовой¹, М. И. Доронин², В. А. Стариков³, Д. В. Михалишин⁴, А. А. Шишкова⁵, А. М. Тимина⁶, А. В. Борисов⁷

¹ Директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: lozovoy@arriah.ru

² Научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: doronin@arriah.ru

³ Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: starikov@arriah.ru

⁴ Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

⁵ Главный технолог, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: shishkova@arriah.ru

⁶ Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: timina@arriah.ru

⁷ Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: borisov@arriah.ru

РЕЗЮМЕ

В статье описан процесс валидации методики для опосредованной оценки титра культурального вируса ящура ($T_{\text{вж}}$) в сырье для вакцины методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени на основании установленной величины порогового цикла амплификации (C_t) с применением линейной регрессионной модели $T_{\text{вж}} = -0,2956C_t + 11,4650$. Проведен анализ полученных результатов исследования 390 проб культурального вируса ящура и определены основные валидационные характеристики предложенной методики: специфичность, правильность, прецизионность, предел обнаружения и количественного определения, диапазон применения и линейность. Результаты валидации методики для опосредованной оценки титра вируса ящура в ОТ-ПЦР-РВ удовлетворяли критериям приемлемости.

Ключевые слова: ящур, титр инфекционной активности вируса, валидация, ОТ-ПЦР-РВ, пороговый цикл амплификации.

VALIDATION OF REAL-TIME REVERSE TRANSCRIPTION POLYMERASE CHAIN REACTION FOR INDIRECT ASSESSMENT OF FMD VIRUS TITRE

D. A. Lozovoy¹, M. I. Doronin², V. A. Starikov³, D. V. Mikhailishin⁴, A. A. Shishkova⁵, A. M. Timina⁶, A. V. Borisov⁷

¹ Director, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: lozovoy@arriah.ru

² Researcher, Candidate of Science (Biology), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: doronin@arriah.ru

³ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: starikov@arriah.ru

⁴ Head of Laboratory, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

⁵ Chief Technologist, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: shishkova@arriah.ru

⁶ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: timina@arriah.ru

⁷ Leading Researcher, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russian Federation, e-mail: borisov@arriah.ru

SUMMARY

Procedure for validation of the method for indirect assessment of cultural FMD virus titre (T_{FMDV}) in raw materials used for vaccine production with real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCRrt) based on determined amplification threshold cycle value (C_t) using linear regression model, $T_{\text{FMDV}} = -0.2956C_t + 11.4650$, is described in the paper. Testing results for 390 samples of cultural FMD virus were analyzed and basic validation characteristics of the proposed method: specificity, accuracy, precision, limit of detection and limit of quantification, application scope and linearity, were defined. Validation results for the method for indirect assessment of FMD virus titre with RT-PCRrt met the acceptance criteria.

Key words: foot-and-mouth disease (FMD), virus infectivity titre, validation, RT-PCRrt, amplification threshold cycle.

ВВЕДЕНИЕ

Производство вакцин для ветеринарного применения должно полностью гарантировать соответствие выпускаемой продукции своему назначению и предъявляемым к нему требованиям. Для достижения этих целей на предприятиях функционирует система обеспечения качества промежуточного сырья и готовой продукции, которая включает в себя проведение детального контроля всех этапов изготовления вакцины.

В процессе производства противоящурных вакцин важную роль играет аналитический контроль сырья, в частности, определение титра инфекционной активности вируса ящура, репродуцированного в суспензионной перевиваемой культуре клеток из почки новорожденного сирийского хомячка (ВНК-21/2-17). Одним из методов опосредованной оценки титра вируса ящура в сырье для вакцины является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) [9, 10], позволяющая определять количество копий генома и полных инфекционных частиц вируса, которые вызывают появление признаков цитопатического действия (ЦПД) в чувствительных культурах клеток [1, 6, 8, 9]. Результаты исследований Ж. А. Шаждо (1980), А. П. Пономарева, М. В. Котовой и соавт. (1983) подтверждают, что за инфекционную активность ответственны преимущественно полные частицы вируса ящура. Известно, что в вирусных суспензиях наряду с инфекционными присутствуют неинфекционные 146S частицы, однако их количество незначительно и составляет примерно 1:10000 [6]. Данные научных публикаций Т. R. Doel (1982), Н. С. Мамкова, В. Л. Узюмова и соавт. (1983), Р. Р. Рюкерта (1989) свидетельствуют о наличии корреляции между количеством 146S частиц вируса ящура и степенью его цитопатогенного действия в зараженной культуре клеток [1, 6]. Изложенные сведения доказывают возможность применения ОТ-ПЦР-РВ для опосредованного определения титра вируса ящура в сырье для вакцины [8].

Оценку пригодности количественного варианта ОТ-ПЦР-РВ с использованием ранее предложенной линейной регрессионной модели: $T_{br} = -0,2956Ct + 11,4650$, где T_{br} – титр вируса ящура; Ct – пороговый цикл амплификации [8], проводят на основе результатов валидации, предполагающей определение специфичности, правильности, прецизионности, диапазона применения и линейности аналитической методики, а также предела обнаружения и количественного определения аналита [2–4, 9].

В отношении рассматриваемой методики ОТ-ПЦР-РВ под специфичностью понимают способность однозначно количественно определять наличие инфекционных частиц вируса ящура, вызывающих развитие ЦПД в культуре клеток из почки свиньи (IB-RS-2) [4] при наличии в анализируемой пробе посторонних антигенных компонентов.

Получение результатов с высокой степенью достоверности возможно исключительно при использовании точной методики, с помощью которой итоги измерения близки к эталонному значению величины [2]. Точность количественной методики раскрывают понятия правильности и прецизионности. Под правильностью в данном случае рассматривают близость среднего значения титра вируса ящура, полученного на основании большой серии экспериментов, к эталонному значению. Под прецизионностью предложенной методики понимают степень разброса результатов из-

мерений пороговых циклов амплификации между сериями измерений, проведенных для множества проб, которые взяты из одного и того же образца в условиях, регламентированных методикой [2, 7]. Для оценки уровня достижения необходимого качества результатов проводят анализ повторяемости в условиях сходимости и воспроизводимости, определяя абсолютные и относительные показатели вариации [2, 3, 7, 11, 12].

Пределом обнаружения рассматриваемой аналитической методики считают наименьшее количество инфекционных частиц вируса ящура в пробе, вызывающих развитие ЦПД, которое может быть обнаружено, но не обязательно определено количественно [5, 7]. Пределом количественного определения в данном случае является наименьшее значение титра вируса ящура, которое можно количественно определить с соответствующей правильностью и прецизионностью методики [2].

Показателем того, что существует прямо пропорциональная зависимость значений порогового цикла амплификации и титра вируса ящура в пределах аналитической области методики, является ее линейность [2, 7, 11]. Диапазоном применения разработанной методики считают интервал между наибольшим и наименьшим значениями титра вируса, в котором предложенный алгоритм определения аналита имеет приемлемый уровень прецизионности, правильности и линейности [2, 12].

Цель исследований – оценка пригодности методики опосредованной оценки титра инфекционной активности культурального вируса ящура в сырье для вакцины методом ОТ-ПЦР-РВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемый материал. В работе использовали культуральный вирус ящура вакцинных штаммов: А № 2187/Кути/2013, А № 2029/Турция/2006, А № 2171/Кабардино-Балкарский/2013, О № 2212/Приморский/2014, О № 2047/08/Саудовская Аравия 120/29, О₁ № 1618/Чечено-Ингушский/66, Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011, Азия-1 № 1946/Шамир Израиль 3/89, САТ-2/Кения 183/74, САТ-2/Саудовская Аравия/2000, репродукцию которых осуществляли в суспензионной перевиваемой культуре клеток ВНК-21/2-17.

Обратно-транскриптная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Постановку анализа проводили, как описано А. П. Пономаревым и соавт. [6]. Результаты ОТ-ПЦР-РВ представляли в виде расчетных значений титра. Расчетным титром вируса считали значение, полученное при анализе порогового цикла амплификации для отобранных проб относительно калибровочных проб вируса ящура с известным титром. Для построения калибровочных графиков применяли функцию «Количественный анализ» программного обеспечения амплификатора Rotor-Gene 6000 Series Software v. 1.8.17.5.

Титрование вируса ящура в чувствительной клеточной линии. Для определения титра инфекционной активности ($Ig\ TCD_{50}/cm^3$) вакцинных штаммов культурального вируса ящура применяли перевиваемую монослойную культуру клеток IB-RS-2 [4].

Оценка специфичности методики. Специфичность методики оценивали по относительной погрешности (е) результатов, полученных одновременно с использованием валидируемой методики ОТ-ПЦР-РВ [6] и титро-

ванием вируса в культуре клеток IB-RS-2 [4]. Проводили исследование 10 модельных смесей культурального вируса ящура, которые содержали разное количество инфекционных частиц, вызывающих развитие ЦПД в клеточной линии IB-RS-2, в смеси с 75S, 12S и 3,8S компонентами, которые не оказывают подобного эффекта на клетки [1, 4, 9]. Фракционирование культурального вируса ящура на компоненты осуществляли с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы [9]. Анализ выполняли в 6 повторностях. Относительную погрешность находили по формуле: $e = (T_{\text{вв}}^1 - T_{\text{вв}}^2) / T_{\text{вв}}^1$, где $T_{\text{вв}}^1$ – титр вируса по результатам ОТ-ПЦР-РВ; $T_{\text{вв}}^2$ – титр вируса по итогам титрования в культуре клеток IB-RS-2.

Специфичность методики считали высокой при $e \leq 5\%$ [7, 11].

Оценка правильности методики. Для определения правильности методики проводили анализ 390 проб культурального вируса ящура с известными значениями титра, осуществляя постановку количественного варианта ОТ-ПЦР-РВ. Данные были представлены в виде уравнения линейной зависимости между экспериментально найденными в ОТ-ПЦР-РВ (y) и эталонными значениями титра вируса (x): $y = k \times x + b$. Для полученной функции проверяли гипотезы о равенстве тангенса угла наклона (k) единице и равенстве свободного члена (b) нулю. При доказательстве верности указанных гипотез со степенью надежности, равной 0,05, использование валидируемой методики дает свободные от ошибки результаты [2, 5, 7, 12].

Анализ прецизионности методики. Для оценки прецизионности предложенной методики ОТ-ПЦР-РВ в условиях сходимости и воспроизводимости рассчитывали абсолютные и относительные показатели вариации.

Определение абсолютных показателей вариации. Размах вариации (R) определяли как разность между наибольшим и наименьшим значениями порогового цикла амплификации: $R = Ct_{\text{max}} - Ct_{\text{min}}$. Индивидуальное линейное отклонение (d_i) находили по формуле: $d_i = |Ct_i - Ct_{\text{cp}}|$. Среднее линейное отклонение (d_{cp}) рассчитывали как среднее арифметическое из индивидуальных линейных отклонений: $d_{\text{cp}} = \sum |d_i| / N$, где d_i – индивидуальные линейные отклонения пороговых циклов амплификации; N – объем совокупности. Оценку дисперсии (δ^2) показателей проводили с использованием формулы: $\delta^2 = (\sum d_i^2) / N$. Для характеристики размеров вариации Ct рассчитывали среднее квадратичное отклонение (δ), пользуясь формулой: $\delta = \sqrt{\delta^2}$ [2].

Определение относительных показателей вариации. Расчет коэффициента осцилляции (V_R) проводили, пользуясь формулой: $V_R = R / Ct_{\text{cp}} \times 100$. Линейный коэффициент вариации (C_d) рассчитывали по формуле: $C_d = d_{\text{cp}} / Ct_{\text{cp}} \times 100$. Для оценки колеблемости индивидуальных значений пороговых циклов амплификации определяли коэффициент вариации (C_δ) по формуле: $C_\delta = \delta / Ct_{\text{cp}} \times 100$ [2]. Метод считают надежным при $C_\delta < 2\%$ в условиях сходимости и $C_\delta < 3\%$ в условиях воспроизводимости [2, 7].

Расчет предела обнаружения титра вируса ящура ($ПО_{\text{твв}}$). Наименьшее количество инфекционных частиц вируса ящура с использованием валидируемой методики находили по формуле: $ПО_{\text{твв}} = 3,3 \times S_b / k$, где S_b – стандартное отклонение аналитического сигнала, которое соответствует стандартному отклонению свободного члена (b); k – тангенс угла наклона [5, 7].

Свободный член b находили при анализе 10 модельных образцов с титрами вируса ящура: 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 7,50; 8,00; 9,00 \lg ТЦД₅₀/см³.

Вычисление предела количественного определения титра вируса ящура ($ПКО_{\text{твв}}$). Минимальное значение титра вируса ящура, определенное с соответствующей правильностью и прецизионностью валидируемой методики, рассчитывали, применяя формулу: $ПКО_{\text{твв}} = 10 \times S_b / k$ [7, 11]. Полученное значение $ПКО_{\text{твв}}$ подтверждали прямым экспериментом при исследовании 13 модельных суспензий культурального вируса с титрами, близкими к найденному значению предела количественного определения. Анализ проводили в 5 повторениях. Результаты исследования считали достоверными при $p < 0,005$.

Определение диапазона применения методики. Для оценки аналитической области валидируемой методики исследовали 11 модельных образцов со следующими значениями титра вируса ящура: 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00; 5,00; 6,00; 7,00; 8,00; 9,00; 9,50 \lg ТЦД₅₀/см³ в 5 повторениях.

Оценка линейности методики. Существование линейной зависимости порогового цикла амплификации и титра вируса ящура в пределах диапазона применения методики проверяли в ходе эксперимента, определяя Ct для 40 проб с различными количествами аналита в 5 повторениях. Полученные данные обрабатывали методом наименьших квадратов с использованием регрессии вида: $Ct = k \times T_{\text{вв}} + b$, где k – угловой коэффициент; b – свободный член. Достоверность результатов анализа подтверждали, вычисляя коэффициент корреляции (r), который по модулю должен быть $\geq 0,99$ [5, 7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На начальном этапе работы проводили оценку специфичности валидируемой методики для опосредованной оценки титра вируса ящура в сырье для вакцины с помощью ОТ-ПЦР-РВ. Подготавливали 10 модельных образцов, добавляя к суспензиям 146S компонент, определяющих инфекционную активность вируса [1, 9], смесь 75S, 12S и 3,8S компонентов для выявления возможного их влияния на специфичность данной методики. Качественный и количественный состав модельных образцов, а также результаты определения относительной погрешности (e) при исследовании в ОТ-ПЦР-РВ отражены в таблице 1.

Как следует из таблицы 1, относительная погрешность опосредованного определения титра вируса ящура с помощью валидируемой методики при количестве инфекционных частиц 9,00–8,03; 8,03–7,02; 7,02–6,04; 6,04–5,04; 5,04–4,00; 4,00–3,01; 3,01–2,05; 2,05–1,00; 1,00–0,50 \lg ТЦД₅₀/см³ составляла 0,11–0,63; 0,12–0,57; 0,14–0,83; 0,17–0,79; 0,20–1,00; 0,50–1,99; 0,66–3,41; 0,49–5,00; 1,00–16,00% соответственно. То есть отмечали высокую специфичность методики для суспензий с титрами вируса ящура от 1,00 до 9,00 \lg ТЦД₅₀/см³, при исследовании которых относительная погрешность не превышала 5%.

На следующем этапе работы оценивали правильность валидируемой методики, тестируя в ОТ-ПЦР-РВ 390 проб культурального вируса ящура с титрами инфекционной активности от 1,00 до 9,00 \lg ТЦД₅₀/см³ (с шагом 0,25 \lg ТЦД₅₀/см³). Значения титра, выходящие за указанный диапазон, не использовали в анализе, поскольку в процессе промышленного

Таблица 1

Оценка специфичности методики опосредованной оценки титра вируса ящура в сырье для вакцины с применением ОТ-ПЦР-РВ ($n = 6, M \pm m$)

№ смеси	Соотношение компонентов смеси		Титр вируса ящура, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$		Относительная погрешность (e) при расчете титра вируса методом ОТ-ПЦР-РВ, %
	146S частицы	75S + 12S + 3,8S компоненты	в клетках линии IB-RS-2	результаты ОТ-ПЦР-РВ в виде расчетных значений титра	
1	1	0	$9,00 \pm 0,09$	$8,98 \pm 0,02$	0,11–0,44
2	1	10	$8,03 \pm 0,08$	$8,02 \pm 0,04$	0,12–0,63
3	1	10^2	$7,02 \pm 0,13$	$7,00 \pm 0,02$	0,14–0,57
4	1	10^3	$6,04 \pm 0,18$	$6,02 \pm 0,03$	0,17–0,83
5	1	10^4	$5,04 \pm 0,15$	$5,02 \pm 0,03$	0,20–0,79
6	1	10^5	$4,00 \pm 0,14$	$3,99 \pm 0,03$	0,50–1,00
7	1	10^6	$3,01 \pm 0,18$	$3,05 \pm 0,02$	0,66–1,99
8	1	10^7	$2,05 \pm 0,14$	$2,01 \pm 0,03$	0,49–3,41
9	1	10^8	1,00*	$0,98 \pm 0,03$	1,00–5,00
10	1	$10^{8,7}$	0,50*	$0,53 \pm 0,05$	4,00–16,00

* значения титра получены с помощью теоретических расчетов, исходя из кратности разведений.

получения суспензий вируса ящура титр инфекционности преимущественно находится в диапазоне от 6,0 до 8,5 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Результаты исследования представлены на рисунке 1 в виде линейной функции $y = 0,9985x + 0,0113$, которая при степени достоверности (R^2) 0,9995 подтверждает, что тангенс угла наклона (k) стремится к единице ($k = 0,9985$), а свободный член (b) – к нулю ($b = 0,0113$). Из анализа полученных данных следует, что использование валидируемой методики позволяет получать достоверные результаты.

Проводили оценку прецизионности методики опосредованного определения титра инфекционной активности вируса ящура в сырье для вакцины методом ОТ-ПЦР-РВ с расчетом абсолютных и относительных показателей вариации данных анализа.

Прецизионность в условиях сходимости оценивали по вариабельности результатов ОТ-ПЦР-РВ внутри одного исследования 5 суспензий культурального вируса ящура с титрами: 1,0; 5,0; 7,0; 8,0; 9,0 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, которые одновременно тестировал один оператор на одном приборе в 20 повторениях. Результаты статистического анализа полученной совокупности пороговых циклов амплификации (Ct_j) отражены в таблице 2 и на рисунке 2. Из данных таблицы 2 следует, что размах вариации составил 0,05–0,22; среднее линейное отклонение – 0,007–0,042, то есть уровень вариации Ct_j в полученных выборках при указанных титрах вируса относительно средней величины признака был низким. Коэффициент дисперсии находился в диапазоне $9,4 \times 10^{-5}$ – $3,9 \times 10^{-3}$, среднее квадратичное отклонение составило 0,010–0,056, что подтверждает незначительную степень отклонений индивидуальных значений Ct_j от среднего арифметического (Ct_{cp}). Таким образом, по

результатам анализа абсолютных показателей вариации колеблемость индивидуальных значений в выборках низкая, а значения пороговых циклов амплификации представляют собой надежную совокупность.

Для исследования колеблемости полученных значений Ct_j внутри генеральной совокупности определяли относительные показатели вариации. Коэффициент осцилляции составлял 0,427–0,662%, следовательно, относительное изменение крайних значений Ct_j по сравнению со средней величиной во всех выборках низкое. Линейный коэффициент вариации находился в диапазоне 0,089–0,118%, следовательно, доля усредненного значения отклонений от Ct_{cp} в каждой совокупности незначительна. Коэффициент вариации индивидуальных значений пороговых циклов составил 0,116–0,158%, что соответствует общим требованиям, предъявляемым к валидируемому методикам ($C_v < 2\%$) [2, 5].

Как следует из таблицы 2 и рисунка 2, при увеличении титра вируса от 1,00 до 9,00 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ отмечалось снижение вариации значений каждого из показателей внутри выборок, тем самым степень достоверности опосредованного количественного определения анализа с помощью ОТ-ПЦР-РВ возрастала. Таким образом, при исследовании суспензий вируса ящура с титрами от 1,00 до 9,00 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в 20 повторениях с помощью предложенной методики одним оператором получены однородные и надежные совокупности значений пороговых циклов, которые можно применять для опосредованного выражения в виде титра вируса.

Следующий этап работы был посвящен исследованию прецизионности методики ОТ-ПЦР-РВ в условиях воспроизводимости. Для этого анализ суспензий культурального вируса ящура проводили два

оператора в разное время в 20 повторениях (40 измерений для каждой пробы). Полученные результаты отражены в таблице 3, из которой видно, что для генеральной совокупности значений пороговых циклов амплификации размах вариации (R) составил 0,06–0,37, среднее линейное отклонение (d_{cp}) – 0,008–0,040, иными словами, степень колеблемости Ct_i в полученных выборках относительно среднего уровня признака низкая. По итогам статистического анализа дисперсия (δ^2) в совокупностях составила $1,2 \times 10^{-5}$ – $3,9 \times 10^{-3}$, среднее квадратичное отклонение (δ) – 0,011–0,063, что подтверждает незначительную степень отклонений индивидуальных значений пороговых циклов амплификации от среднего арифметического и высокий уровень достоверности результатов внутри каждой выборки.

При оценке относительных показателей вариации Ct_i определили, что коэффициент осцилляции (V_R) составил 0,512–1,045%, линейный коэффициент вариации (C_d) – 0,095–0,114%, коэффициент вариации (C_v) – 0,132–0,177%, что соответствует общепринятым нормам ($C_v < 3\%$) [2, 7]. Исходя из полученных результатов, относительное изменение крайних значений пороговых циклов амплификации и доля усредненного значения абсолютных отклонений в сравнении со средним внутри каждой совокупности незначительны. При этом вариация значений параметров валидации при исследовании суспензий вируса ящура с увеличением титра от 1,00 до 9,00 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ снижалась, а степень достоверности результатов возрастала.

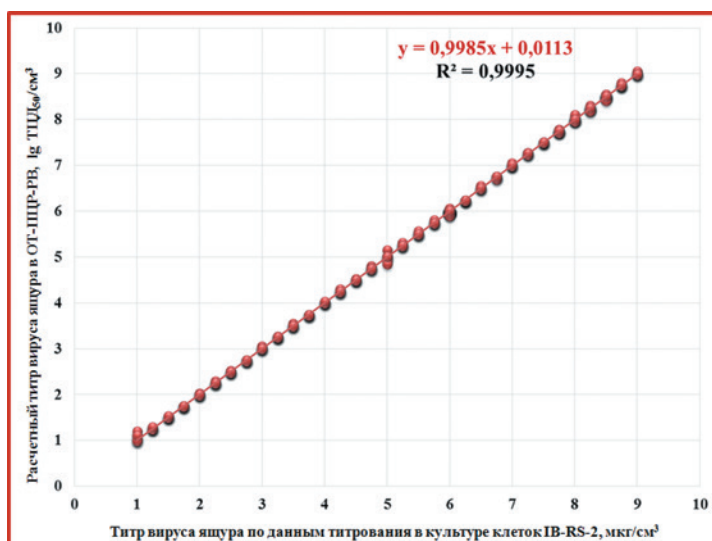


Рис. 1. Исследование правильности методики опосредованной оценки титра вируса ящура с помощью ОТ-ПЦР-РВ

Сравнительный анализ данных, полученных при оценке прецизионности методики, позволил доказать, что в условиях сходимости степень достоверности результатов опосредованного определения титра вируса выше по сравнению с оценкой, проводимой в условиях воспроизводимости, что соответствует общепринятым статистическим ожиданиям [7]. При этом по всем

Таблица 2

Исследование прецизионности методики для опосредованной оценки титра вируса ящура с помощью ОТ-ПЦР-РВ

Валидационные показатели методики при оценке прецизионности	Значения показателей валидации при исследовании суспензий с разными титрами вируса ящура, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$									
	условия сходимости					условия воспроизводимости				
	1,0	5,0	7,0	8,0	9,0	1,0	5,0	7,0	8,0	9,0
Объем выборки пороговых циклов амплификации (N)	20	20	20	20	20	40	40	40	40	40
Среднее значение пороговых циклов амплификации (Ct_{cp})	35,390	21,847	15,110	11,710	8,353	35,397	21,848	15,107	11,71	8,354
Суммарное значение индивидуального линейного отклонения по модулю ($\sum d_i $)	0,833	0,471	0,304	0,232	0,148	1,612	1,002	0,652	0,490	0,316
Суммарное значение квадрата модуля индивидуального линейного отклонения ($\sum d_i^2$)	0,063	0,021	0,009	0,004	0,002	0,158	0,051	0,018	0,010	0,005
Наибольшее значение порогового цикла (Ct_{max})	35,50	21,94	15,16	11,74	8,37	35,58	21,94	15,17	11,74	8,39
Наименьшее значение порогового цикла (Ct_{min})	35,28	21,80	15,06	11,69	8,32	35,21	21,78	15,06	11,68	8,33
Размах вариации (R)	0,22	0,14	0,10	0,05	0,05	0,37	0,16	0,11	0,06	0,06
Среднее линейное отклонение (d_{cp})	0,042	0,024	0,015	0,012	0,007	0,040	0,025	0,016	0,012	0,008
Дисперсия (δ^2)	$3,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$9,4 \times 10^{-5}$	$3,9 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-5}$
Среднее квадратичное отклонение (δ)	0,056	0,032	0,021	0,014	0,010	0,063	0,035	0,021	0,016	0,011
Коэффициент осцилляции (V_R), %	0,622	0,640	0,662	0,427	0,599	1,045	0,732	0,728	0,512	0,718
Линейный коэффициент вариации (C_d), %	0,118	0,108	0,100	0,097	0,089	0,114	0,112	0,108	0,105	0,095
Коэффициент вариации (C_v), %	0,158	0,148	0,137	0,123	0,116	0,177	0,164	0,141	0,134	0,132

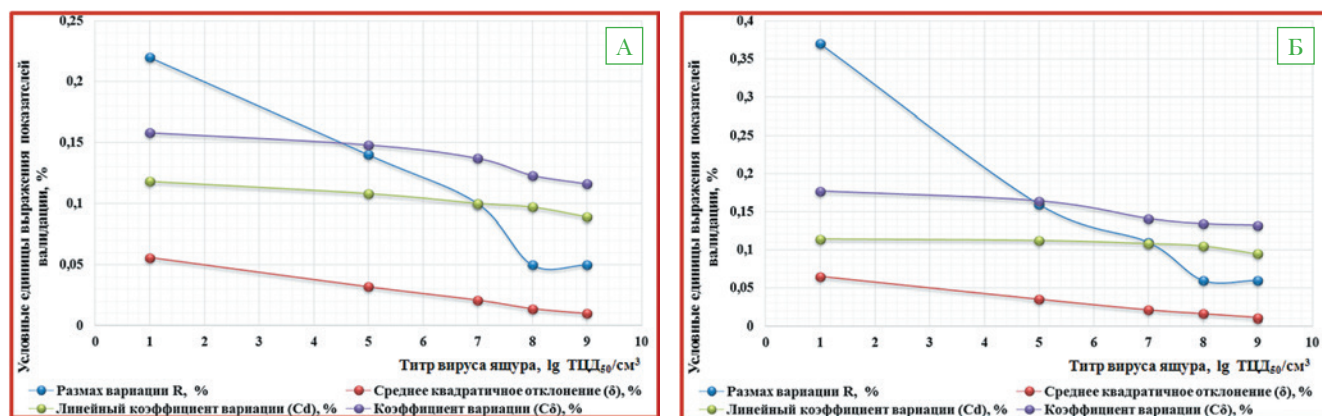


Рис. 2. Изменение значений валидационных показателей при оценке правильности методики опосредованного определения титра вируса ящура с помощью ОТ-ПЦР-РВ в условиях сходимости (А) и воспроизводимости (Б)

абсолютным и относительным показателям вариации валидируемая методика ОТ-ПЦР-РВ удовлетворяла критериям приемлемости [2, 7, 11].

На следующем этапе исследования опосредованно методом ОТ-ПЦР-РВ определяли предел обнаружения (PO_{TBR}) и количественного определения (PKO_{TBR}) титра

вируса ящура в сырье для вакцины. Проведя исследования в 10 повторениях, получили следующие значения свободного члена (b): 11,461; 11,465; 11,469; 11,470; 11,465; 11,466; 11,465; 11,465; 11,452; 11,461. Учитывая, что стандартное отклонение свободного члена (S_b) составило 0,005, а тангенс угла наклона (k) был равен -3,38,

Таблица 3
Выявление предела количественного опосредованного определения титра вируса ящура с помощью валидируемой методики ОТ-ПЦР-РВ ($n = 5, M \pm m$)

№ суспензии вируса ящура	Титр вируса ящура		Исследование суспензии в ОТ-ПЦР-РВ		Факт экспериментального подтверждения: $PO_{TBR} = 0,00 \lg TЦД_{50}/см^3$; $PKO_{TBR} = 0,48 \lg TЦД_{50}/см^3$
	$TЦД_{50}/см^3$	$\lg TЦД_{50}/см^3$	пороговый цикл	результаты в виде расчетных значений титра вируса, $\lg TЦД_{50}/см^3$	
1	0,63	-0,2	$39,31 \pm 0,45$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
2	0,79	-0,1	$39,15 \pm 0,41$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
3	1,00	0,0	$38,79 \pm 0,69$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
4	1,26	0,1	$38,49 \pm 0,52$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
5	1,58	0,2	$38,15 \pm 0,66$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
6	2,00	0,3	$37,79 \pm 0,42$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
7	2,51	0,4	$37,47 \pm 0,48$ ($p > 0,01$)	н/о	подтверждено
8	3,16	0,5	$37,09 \pm 0,09$ ($p < 0,005$)	$0,50 \pm 0,02$	подтверждено
9	4,00	0,6	$36,76 \pm 0,06$ ($p < 0,005$)	$0,60 \pm 0,02$	подтверждено
10	5,00	0,7	$36,42 \pm 0,06$ ($p < 0,005$)	$0,70 \pm 0,02$	подтверждено
11	6,31	0,8	$36,08 \pm 0,05$ ($p < 0,005$)	$0,79 \pm 0,01$	подтверждено
12	7,94	0,9	$35,74 \pm 0,05$ ($p < 0,005$)	$0,90 \pm 0,01$	подтверждено
13	10,00	1,0	$35,40 \pm 0,05$ ($p < 0,005$)	$1,01 \pm 0,02$	подтверждено

н/о – титр вируса достоверно не определен.

Таблица 4
Оценка параметров валидации методики опосредованного определения титра вируса ящура в сырье для вакцины методом ОТ-ПЦР-РВ

Параметр валидации методики	Валидационный показатель	Значения показателей валидации методики при исследовании вируса ящура с разными титрами, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$					
		0,5	1,0	5,0	7,0	8,0	9,0
Специфичность	относительная погрешность (e), %	4–16	1–5	0,2–0,79	0,14–0,57	0,12–0,63	0,11–0,44
Сходимость	среднее квадратичное отклонение (δ), %	н/и	0,056	0,032	0,021	0,014	0,010
	коэффициент вариации (C_v), %	н/и	0,158	0,148	0,137	0,123	0,116
Воспроизводимость	среднее квадратичное отклонение (δ), %	н/и	0,063	0,035	0,021	0,016	0,011
	коэффициент вариации (C_v), %	н/и	0,177	0,164	0,141	0,134	0,132
Линейность	коэффициент корреляции (r)	н/и 0,9997					
Правильность	степень достоверности (R^2)	н/и 0,9995					
	тангенс угла наклона (k)	н/и 0,9985					
	свободный член (b)	н/и 0,0113					
Аналитическая область	диапазон опосредованного количественного определения титра вируса ящура, $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$	0,50–9,00					

н/и – не исследовали.

провели расчеты и определили, что $\text{ПО}_{\text{Твья}}$ данной методикой составил 1 $\text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (или 0 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$), а $\text{ПКО}_{\text{Твья}} = 3 \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (или 0,48 $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$).

Выявленное значение $\text{ПКО}_{\text{Твья}}$ подтверждали экспериментально при исследовании 13 модельных образцов культурального вируса ящура с титрами от $-0,2$ до $1,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ в 5 повторениях. Результаты анализа представлены в таблице 3.

Как следует из данных таблицы 3, экспериментальным путем подтвердили, что минимальный $\text{ПКО}_{\text{Твья}}$ валидируемой методикой составляет $0,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

При исследовании 11 модельных образцов с титрами вируса ящура от $0,50$ до $9,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ определили, что аналитическая область опосредованной оценки титра инфекционности с помощью ОТ-ПЦР-РВ находилась в диапазоне $0,50$ – $9,00 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ при значениях пороговых циклов от $37,08 \pm 0,09$ до $8,34 \pm 0,03$ ($n = 5$, $p < 0,005$). По всей видимости, при титрах более $9,00 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ предложенная регрессионная модель не позволяла проводить достоверный опосредованный количественный анализ по причине высокого содержания полных вирусных частиц ($n = 5$, $p > 0,01$).

Следующий этап работы был посвящен проверке линейной зависимости порогового цикла амплификации и титра вируса в пределах аналитической области методики. Для этого исследовали 40 вирусосодержащих суспензий с титрами от $1,00$ до $9,00 \text{ мкг}/\text{см}^3$ в 5 повторениях. Суспензии с титрами вируса менее $1,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ для анализа не использовали, поскольку в производственной работе они не применяются. В результате анализа получена регрессия вида $T_{\text{вья}} = -0,2956C_t + 11,465$ с коэффициентом корреляции (r), равным $0,9997$, что позволяет судить о достоверности результатов статистического анализа.

По итогам проведенных исследований осуществлена оценка основных параметров валидации методики опосредованного определения титра вируса

ящура в сырье для вакцины с помощью ОТ-ПЦР-РВ. Итоговые результаты анализа приведены в таблице 4, из которой видно, что диапазон применения ОТ-ПЦР-РВ составил $0,50$ – $9,00 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. При тестировании вирусосодержащего материала с титрами от $1,00$ до $9,00 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ валидируемая методика характеризуется высокой специфичностью (e составляет $0,11$ – $5,00\%$), а также высокой прецизионностью (в условиях сходимости (δ находилось в диапазоне $0,010$ – $0,056\%$, $\delta < 2\%$, $C_v = 0,116$ – $0,156\%$, $C_v < 2\%$) и воспроизводимости (δ составило $0,011$ – $0,063\%$, $\delta < 3\%$, $C_v = 0,132$ – $0,177\%$, $C_v < 3\%$). При оценке линейности и правильности доказано, что валидируемая методика дает свободные от ошибки результаты с высоким коэффициентом корреляции ($r = 0,995$, $r \rightarrow 1$) и степенью достоверности ($R^2 = 0,991$, $R^2 \rightarrow 1$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена оценка основных валидационных характеристик методики опосредованного определения титра вируса ящура в сырье для вакцины методом ОТ-ПЦР-РВ с применением регрессионной модели $T_{\text{вья}} = -0,2956C_t + 11,4650$. Определено, что аналитическая область методики находится в диапазоне $0,50$ – $9,00 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Доказана высокая специфичность ОТ-ПЦР-РВ при исследовании суспензий вируса ящура с титрами от $1,00$ до $9,00 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Разработанная методика характеризуется высокой прецизионностью в условиях сходимости и воспроизводимости и соответствует общепризнанным требованиям относительно линейности и правильности [2, 7, 11, 12].

Результаты валидации ОТ-ПЦР-РВ удовлетворяют всем критериям приемлемости. Исходя из этого, предложенная методика является достоверной и может быть использована для опосредованной количественной оценки титра вируса ящура в сырье для вакцины.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Взаимосвязь инфекционности и концентрации 146S частиц в суспензии лапинизированного вируса ящура / М. В. Котова, В. Л. Узюмов, О. Г. Андреева, М. Г. Удалых // Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тез. докладов науч. конф. ВНИИЯ. – Владимир, 1983. – С. 46–48.

2. ГОСТ Р ИСО 5725-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Ч. 1–6. – Введ. 01.11.02. – М.: Стандартинформ, 2006.

3. Государственная фармакопея РФ. Ч. 1. – 12-е изд. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского назначения, 2008. – С. 254–266.

4. Жильцова М. В. Биологические свойства эпизоотических изолятов вируса ящура типов А, О и Азия-1: автореф. дис. ... канд. наук. – Владимир, 2008. – 23 с.

5. Лакин Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для биол. спец. вузов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

6. Пономарев А. П., Узюмов В. Л., Груздев К. Н. Вирус ящура: структура, биологические и физико-химические свойства. – Владимир: Фолиант, 2006. – 250 с.

7. Практикум по GMP. Валидация аналитических методик: теория / П. Носырев, М. Носырева, Т. Рассказова, Н. Корнеева. – URL: <http://www.nedug.ru/news/фармацевтика/2004/2/12/Практикум-по-GMP--Валидация-аналитических-методик-теория> (дата обращения: 12.11.18).

8. Способ определения титра инфекционной активности вируса ящура в неинaktivированном сырье для вакцины с применением метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени: пат. 2674076 Российская Федерация, МПК⁷ А61К 39/135 / Д. В. Михалишин, М. И. Доронин, В. А. Стариков [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – № 2017145889/10; заявл. 25.12.17; опубл. 04.12.18.

9. Щербаков А. В., Тимина А. М., Перевозчикова Н. А. Разработка ПЦР в реальном времени для обнаружения и количественного определения вируса ящура // Рос. вет. журн. С.-х. животные. Спец. вып., посвящ. 50-летию ФГУ «ВНИИЗЖ». – 2008. – Сент. – С. 26–27.

10. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease / A. E. Shaw, S. M. Reid, K. Ebert [et al.] // J. Virol. Methods. – 2007. – Vol. 143 (1). – P. 81–85; DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.02.009.

11. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases / OIE. Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees). – Chapter 1.1.1. – URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf (дата обращения: 02.11.18).

12. Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases / OIE. – 2nd ed. – Paris: OIE, 2008. – 70 p.

REFERENCES

1. Interrelation between infectivity and 146S particle concentration in lapinized foot-and-mouth disease virus suspension [Vzaimosvyaz' infekcionnosti i koncentracii 146S chastic v suspenzii lapinizirovannogo

virusa yashchura]. M. V. Kotova, V. L. Uzyumov, O. G. Andreyeva, M. G. Udalykh. *Aktual'nye problemy veterinarnoj virusologii: scientific conference abstracts All-Union Foot and Mouth Disease Research Institute*. Vladimir, 1983: 46–48 (in Russian).

2. GOST R ISO 5725-2002. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results [Tochnost' (pravil'nost' i precizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenij]. Part 1–6. Put into force on 01.11.02. M.: Standartinform, 2006 (in Russian).

3. RF National Pharmacopeia Part 1. [Gosudarstvennaya farmakopeya RF]. 12th ed. M.: Scientific Centre for Medical Device Examination, 2008: 254–266 (in Russian).

4. Zhiltsova M. V. Biological properties of epidemic type A, O and Asia-1 foot-and-mouth disease virus isolates [Biologicheskie svoystva ehpozooticheskikh izolyatov virusa yashchura tipov A, O i Aziya-1]: author's abstract ... for Candidate of Science degree. Vladimir, 2008 (in Russian).

5. Lakin G. F. Biometrics: text book for Biological Higher Educational Institutes [Biometriya: uchebnoe posobie dlya biol. spec. vuzov]. 4th ed., revised and amended. M.: Vyshaya shkola, 1990 (in Russia).

6. Ponomarev A. P., Uzyumov V. L., Grudev K. N. Foot-and-mouth disease virus: its structure, biological, physical and chemical properties [Virus yashchura: struktura, biologicheskie i fiziko-himicheskie svoystva]. Vladimir: Foliant. 2006 (in Russian).

7. Manual of GMP. Validation of analytical methods: theory [Praktikum po GMP. Validatsiya analiticheskikh metodik: teoriya]. P. Nosyrev, M. Nosyрева, T. Rasskazova, N. Korneyeva. URL: <http://www.nedug.ru/news/фармацевтика/2004/2/12/Практикум-по-GMP--Валидация-аналитических-методик-теория> (access date: 12.11.18) (in Russian).

8. Method for determination of foot-and-mouth disease virus infectivity titre in non-inactivated raw materials used for vaccine production with real-time reverse transcription polymerase chain reaction [Sposob opredeleniya titra infekcionnoj aktivnosti virusa yashchura v neinaktivirovannom syr'e dlya vakciny s primeneniem metoda obratnoj transkripcii i polimeraznoj cepnoj reakcii v rezhime real'nogo vremeni]: pat. 2674076 Russian Federation, МПК⁷ А61К 39/135. D. V. Mikhailishin, M. I. Doronin, V. A. Starikov [et al.]; FGBI "ARRIAH". No. 2017145889/10; submitted on 25.12.17; published on 04.12.18 (in Russian).

9. Scherbakov A. V., Timina A. M., Perevozchikova N. A. Development of real-time PCR for foot-and-mouth disease virus detection and quantification [Razrabotka PCR v real'nom vremeni dlya obnaruzheniya i kolichestvennogo opredeleniya virusa yashchura]. *Russian Veterinary Journal. Productive animals. Special issue devoted to the 50th anniversary of the FGBI "ARRIAH"*. 2008; September: 26–27 (in Russian).

10. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease. A. E. Shaw, S. M. Reid, K. Ebert [et al.]. *J. Virol. Methods*. 2007; 143 (1): 81–85; DOI: 10.1016/j.jviromet.2007.02.009.

11. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. OIE. *Terrestrial Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*. Chapter 1.1.1. URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf (access data: 02.11.18).

12. Quality Standard and Guidelines for Veterinary Laboratories: Infectious Diseases. 2nd ed. Paris: OIE, 2008.

Поступила 17.01.19
Принята в печать 22.02.19