

Для цитирования: Доронин, М.И. Применение метода ПЦР в режиме реального времени в ветеринарной практике / М.И. Доронин, Д.А. Лозовой, А.В. Щербаков, В.В. Макаров // Российский ветеринарный журнал. — 2020. — № 2(6). — С. 5–12. DOI:10.32416/2500-4379-2020-2-5-12
 For citation: Doronin M.I., Lozovoy D.A., Shcherbakov A.V., Makarov V.V., Application of the real-time PCR in veterinary practice, Russian veterinary journal (Rossijskiy veterinarnyj zhurnal), 2020, No. 2(6), pp. 5–12. DOI:10.32416/2500-4379-2020-2-5-12

УДК 619: 616-076

Применение метода ПЦР в режиме реального времени в ветеринарной практике

М.И. Доронин¹, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории профилактики ящура (doronin@arriah.ru),

Д.А. Лозовой¹, доктор ветеринарных наук, доцент, зам. директора ФГБУ ВНИИЗЖ (lozovoy@arriah.ru),

А.В. Щербаков¹, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией по особо опасным болезням (ascherbakov@arriah.ru),

В.В. Макаров², доктор биологических наук, профессор департамента ветеринарной медицины РУДН (vvm-39@mail.ru).

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ ВНИИЗЖ) (600901, Владимир, мкр. Юрьевец).

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (115093, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8, кор. 2).

На сегодняшний день для лабораторных диагностических исследований при различных инфекционных заболеваниях животных широко применяют молекулярно-генетические методы анализа. В лекции отражены сведения об истории изобретения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ), сущности процессов, протекающих во время данной реакции, основные этапы ее постановки, особенности подготовки биологического материала для исследования в ПЦР-РВ. Представлен спектр возможностей использования метода ПЦР-РВ для качественного исследования биологического материала при подозрении на заражение животных некоторыми вирусными и бактериальными агентами, а также количественной оценки содержания вирусов в тканях, органах или в организме по аналогии с общепринятыми методами титрования инфекционности без непосредственной манипуляции с патогенными агентами. Количественный вариант ПЦР-РВ дает возможность ветеринарным врачам оценивать патогенетическую динамику развития заболевания, следить за эффектом антивирусной и антибактериальной терапии, отслеживать возникновение вариантов возбудителей с высокой резистентностью к используемым препаратам. Благодаря разработкам ВНИИЗЖ, качественный и количественный метод ПЦР-РВ в настоящее время можно использовать в отечественной ветеринарной науке и лабораторной практике для диагностики широкого спектра инфекционных заболеваний животных.

Ключевые слова: инфекционные болезни животных, диагностические исследования, обратная транскрипция, ПЦР в режиме реального времени.

Application of the real-time PCR in veterinary practice

M.I. Doronin¹, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher of the laboratory of the preventive maintenance of the foot-and-mouth disease (doronin@arriah.ru),

D.A. Lozovoy¹, Grand PhD in Veterinary Science, Associate Professor, Deputy directors of FSBI ARRIAH (lozovoy@arriah.ru),

A.V. Shcherbakov¹, PhD in Biological Sciences, Head of the laboratory for especially dangerous diseases (ascherbakov@arriah.ru),

V.V. Makarov², Grand PhD in Veterinary Science, professor of Veterinary medicine department (vvm-39@mail.ru).

¹Federal Center for Animal Health (microdistrict Yurievets, Vladimir, RF, 600901).

²People's Friendship University of Russian (8/2, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 115093).

To date the molecular genetic methods of analysis are widely used for laboratory diagnostic tests in various infectious diseases of animals. This discourse reflects information about the history of the invention of real-time polymerase chain reaction (PCR-RV), the nature of the processes that occur during this reaction, the main stages of the reaction, the preparation of biological material for research in PCR-RV. The spectrum of possibilities of using the PCR-RV method for a qualitative study of biological material in cases of suspected infection of animals with certain viral and bacterial agents, as well as a quantitative assessment of the virus content in tissues, organs or in the body by analogy with conventional methods for titrating infectiousness without direct manipulation with pathogenic agents, is presented. A quantitative PCR-RV option allows veterinarians to evaluate the pathogenetic dynamics of the development of the disease, monitor the effect of antiviral and antibacterial therapy, and monitor the emergence of pathogen variants with high resistance to the drugs used. Thanks to the development of ARRIAH, the qualitative and quantitative PCR-RV method can now be used in domestic veterinary science and laboratory practice for the diagnosis of a wide range of animal infectious diseases.

Keywords: animal infectious diseases, diagnostic studies, reverse transcription, real-time PCR.

Сокращения: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, НК — нуклеиновая/ые кислота/ты, ОТ — обратная транскрипция, н.о. — нуклеотидные основания, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, РНК — рибонуклеиновая кислота, dATP — дезоксирибоденозинтрифосфат, dCTP — дезоксирибозитидинтрифосфат, dGTP — дезоксирибугуанозинтрифосфат, dNTP — дезоксирибонуклеозидтрифосфат, dTTP — дезоксириботимидинтрифосфат, E — свободный фермент, ES — фермент-субстратный комплекс, Km — константа Михаэлиса, P — продукт реакции, S — субстрат.

Терминология: Ct (threshold cycle) — пороговый цикл амплификации, Taq ДНК-зависимая ДНК-полимераза — термостабильная ДНК-зависимая ДНК-полимераза бактерии *Thermus aquaticus* с периодом полураспада при температуре 92,5 °C в 130 мин, что позволяет проводить многочисленные циклы ПЦР без необходимости добавлять новую порцию фермента, ТЦД₅₀/мл — тканевая цитопатическая доза, вызывающая разрушение 50 % клеток (в 1,0 мл), IgT — десятичный логарифм титра инфекционной активности.

История изобретения ПЦР-РВ

Открытие ПЦР в 1983 г. стало одним из выдающихся событий в области молекулярной биологии. Метод основан на природном процессе синтеза ферментом ДНК-полимеразой новых молекул НК как генетического материала (открытие принадлежит Артуру Корнбергу, впервые синтезировавшем ДНК, что принесло ему в 1959 году Нобелевскую премию). Данный молекулярно-генетический анализ позволяет синтезировать в пробирке определенный фрагмент генома возбудителя заболевания практически в неограниченных количествах, что облегчает детекцию НК инфекционного агента.

В классическом варианте ПЦР-детекцию продуктов реакции, или ампликонов, проводили после ее окончания путем электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле [12]. В 1993 г. американские исследователи Higuchi R., Watson R., Dolliger G. и др. нашли способ определять накопление продуктов ПЦР непосредственно в ходе анализа, положив начало технологии ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ). С момента своего появления метод ПЦР-РВ завоевывает все большую и большую популярность [10].

В настоящее время отечественный рынок предлагает различные детектирующие амплификаторы и тест-системы, позволяющие оценивать накопление продуктов ПЦР непосредственно в ходе анализа. В практике ветеринарных врачей при детекции интересующих участков генома и определении количества матрицы в исходных исследуемых образцах в процессе ДНК/РНК-диагностики большей популярностью (по сравнению с классическим вариантом ПЦР) пользуется метод флуоресцентной ПЦР.

Преимущества ПЦР-РВ

Принципиальной особенностью ПЦР-РВ является количественный анализ накопления фрагментов генома возбудителя заболевания, а также автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов. В отличие от классического варианта ПЦР в ПЦР-РВ отсутствует стадия детекции результатов с помощью

горизонтального электрофореза в геле, что позволяет избежать ошибок и ложноположительных результатов, связанных с контаминацией, и значительно ускорить получение результатов анализа. Преимущества ПЦР-РВ: можно видеть кинетику амплификации, тем самым оценивать показатели реакции и проводить сравнительный анализ графиков амплификации для количественного определения матрицы, что в ряде случаев позволяет уточнить диагноз и выбрать адекватный способ лечения.

Данный метод характеризуется высокой степенью надежности, поскольку является высокоспецифичным и чувствительным, а также простым в процедуре анализа; сокращает время исследования биологического материала до двух-трех часов; позволяет оценивать количественное содержание инфекционного агента в пробе по аналогии с общепринятым титрованием биологической активности прочих возбудителей инфекций. С помощью данного метода теоретически можно выявить даже одну молекулу ДНК или РНК в тестируемой пробе [11]. Эти преимущества были достигнуты благодаря использованию флуоресцентной детекции продуктов реакции амплификации в режиме реального времени, автоматизации, применению компьютерных приемов регистрации и интерпретации данных.

Разработаны тест-системы, благодаря которым возможна качественная и количественная детекция геномов одновременно нескольких патогенов [2, 3, 10]. Это удобно при обследовании животного с подозрением сразу на несколько заболеваний или при наличии клинических и иных признаков, схожих для разных болезней. В частности, проблема дифференциальной диагностики возникает в ряде эпизоотических ситуаций, и существуют реально сложившиеся комплексы манифестно сходных инфекций среди КРС (например, убиквитарные факторные болезни молодняка с пневмоэнтеритным синдромом), свиней (африканская, классическая чума свиней и другие болезни с геморрагическим синдромом), птицы (ньюкаслская болезнь, птичий грипп, парамиксовирусная и другие острые инфекции), заболевания с неврологическими расстройствами (бешенство, болезнь Ауески, листериоз, прионные болезни). Решением в таком случае является ранняя лабораторная диагностика, в частности, с помощью ПЦР-РВ [6].

Известно, что достоверность анализа в значительной степени определяется способом регистрации результатов исследования. При ПЦР-РВ проводят флуоресцентную детекцию, характерная особенность которой заключается в том, что продукт реакции амплификации для определения не извлекается, а свечение учитывают в закрытой пробирке. Иными словами, решается серьезная проблема контаминации в ветеринарной лабораторной практике. Следует также отметить, что крупные диагностические центры часто используют для ПЦР-РВ многолуночные стрипы или планшеты, что дает возможность применять роботизированные дозаторы и снижать вероятность ошибки действий оператора [8]. Наконец, современные компьютерные программы в сочетании с применением флуоресцентной детекции результатов практически полностью исключают неправильную интерпретацию данных [12].

ПЦР-РВ как элементарная ферментативная реакция

ПЦР-РВ представляет собой процесс ферментативного синтеза (амплификации, или многократного копирования) *in vitro* определенных коротких двухцепочечных фрагментов ДНК. В основе реакции лежит механизм, который в природе реализуется при внутриклеточной репликации (удвоении) молекул ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы [7, 12]. Для ПЦР-РВ необходимы следующие ключевые компоненты реакции: исходная молекула ДНК (матрица реакции), dNTP, катионы магния (Mg^{2+}), олигонуклеотидные праймеры (ДНК-затравки) и зонд, комплементарные матричной цепи ДНК, фермент ДНК-зависимая ДНК-полимераза. Все компоненты реакции нужно смешать в соответствующем солевом (буферном) растворе и создать определенные температурные и временные режимы для осуществления основных этапов ПЦР в режиме реального времени [10].

Матрицей для ПЦР-РВ служит ДНК исследуемого объекта (генетический материал вирусов, бактерий и иных идентифицируемых объектов), которая представляет собой генетически оригинальную специфическую нуклеотидную последовательность. Реально это означает выбор в пределах генома относительно небольшого участка для последующего использования в качестве матрицы и амплификации, который бы надежно представлял генетическую оригинальность и позволял детектировать объект (главным образом, наиболее консервативные последовательности, кодирующие полипептиды группоспецифических, родовых антигенов). К таким участкам ДНК-матриц, выделяемых из биологического материала или полученных в ходе реакции обратной транскрипции с вирусных РНК, разрабатывают специфические комплементарные олигонуклеотидные праймеры и зонды [8].

Дезоксирибонуклеозитрифосфаты (dNTP), н.о., — необходимый «строительный» материал для синтеза цепей ДНК четырех типов (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), которые смешивают в равных пропорциях; их оптимальная концентрация составляет 200 мкМ [7, 8].

Катионы магния (Mg^{2+}), добавляемые в реакционную смесь в виде хлорида магния ($MgCl_2$), образуют растворимые комплексы с dNTP, которые воспринимаются ферментом ДНК-полимеразой в качестве субстрата для амплификации. Иными словами, катионы Mg^{2+} являются коферментом данного процесса. Их концентрация в реакционной смеси зависит от концентрации свободных dNTP. Наиболее часто применяемая в ПЦР концентрация катионов магния составляет 2 мМ при количестве dNTP 200 мкМ [7, 12].

Олигонуклеотидные праймеры — важнейшие компоненты ПЦР, которые определяют генетическую специфичность, начало (затравку) и окончание реакционного цикла. Это короткие олигонуклеотидные последовательности (20...30 н.о.), комплементарные противоположным участкам амплифицируемого одноцепочечного фрагмента ДНК-матрицы. При ПЦР-РВ праймеры гибридизуются (связываются) по правилам комплементарности оснований с соответствующими участками ДНК и ограничивают (фланкируют) тем

самым часть матричной молекулы, которая будет амплифицирована во время реакции.

Соблюдение комплементарности н.о. праймера и ДНК исследуемого объекта обеспечивает абсолютную специфичность стерического молекулярного распознавания последней в исследуемом материале, аналогичную таковой для диагностических реакций типа антиген+антитело, взаимоотношений фермент+субстрат, рецептор+лиганд и т. п., и дальнейший синтез новой молекулы ДНК, комплементарной исходной матрице. Неверный выбор нуклеотидного состава праймеров или их длины приводит к ошибочным результатам амплификации.

Зная последовательность ДНК-матрицы и искомого амплифицируемого участка, можно моделировать и химически синтезировать праймеры в течение нескольких дней, а современные биоинформационные ресурсы значительно упрощают дизайн и условия полимеразной реакции. Оптимальная концентрация праймеров в реакционной смеси составляет 100...500 пМ [8, 10].

Молекулярный зонд представляет собой короткий олигонуклеотид размером 20...25 н.о., на 5'-конце которого расположен флуоресцентный краситель (флуорофор), а на 3'-конце — гаситель флуоресценции.

Флуоресцентные красители (флуорофоры) — это молекулы, которые при поглощении фотона испускают свет с большей длиной волны (т. е. флуоресцируют). Существует большое число флуорофоров, различающихся по спектру флуоресценции.

Гаситель флуоресценции — молекула, спектр поглощения которой лежит в области длины волны спектра испускания флуорофора. Тушение флуоресценции происходит благодаря безызлучательному переносу энергии от молекулы флуорофора к молекуле гасителя и рассеиванию энергии.

Шесть-семь н.о. зонда с двух концов комплементарны друг другу и в результате гибридизации образуют «стеблевую» часть. За счет этого флуорофор и гаситель сближены при отсутствии ДНК-матрицы в растворе. При этом гаситель полностью поглощает энергию, которую испускает флуоресцентный краситель. Центральная часть зонда является гибридной по отношению к фрагменту ДНК-мишени, заключенному между двумя праймерами. При внесении ДНК-матрицы в реакционную смесь происходит отжиг олигонуклеотидных праймеров и гибридной части зонда на комплементарные участки ДНК. «Стеблевая» часть зонда «расходится», флуорофор и гаситель пространственно отдаляются друг от друга. После отжига олигонуклеотидных праймеров и зонда происходит элонгация, во время которой фермент Taq ДНК-зависимая ДНК-полимераза синтезирует цепь ДНК в процессе удлинения праймеров и за счет 5'→3'-экзонуклеазной активности разрушает водородные связи между ДНК-матрицей и зондом. В результате этого зонд разрушается, флуоресцентный краситель «разгорается» и наблюдают свечение, которое улавливается детектором в определенном диапазоне длины волны (рис. 1) [10, 12]. Учитывая, что флуоресцентные красители по своей природе имеют индивидуальные диапазоны и максимум флуоресценции, фиксировать наибольшее свечение можно только при определенных значениях длин волн, которые соответствуют разным участкам видимого спектра света.

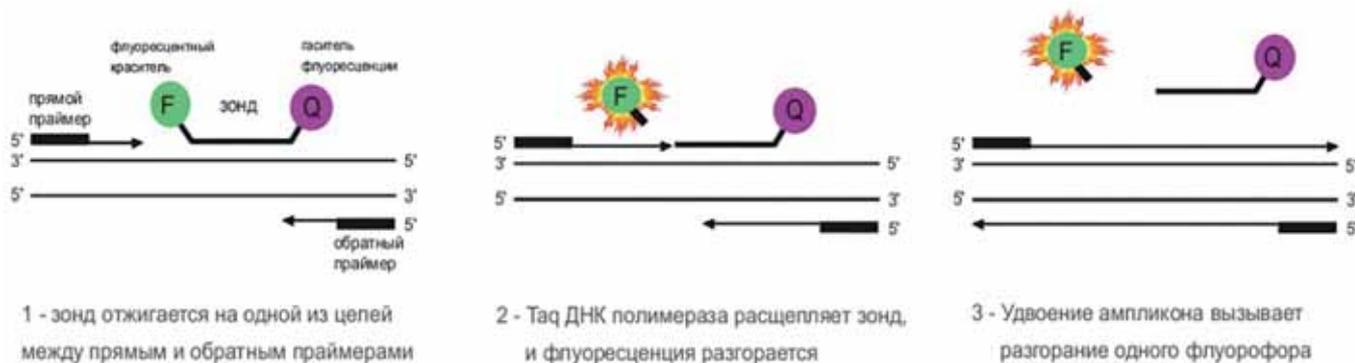


Рис. 1. Принцип работы молекулярного ДНК-зонда
 Fig. 1. The principle of operation of the molecular DNA probe

Например, для красителя FAM (карбоксифлуоресцеин) наибольшая степень флуоресцентного свечения будет фиксироваться при длине волны 520 нм (зеленая часть спектра), для красителя ROX (карбокси-X-родамин) — при 610 нм (оранжевая часть спектра) и т. д.

ДНК-зависимая ДНК-полимераза — фермент, который при наличии всех необходимых компонентов реакции в буферном растворе синтезирует новые фрагменты ДНК из dNTP по принципу комплементарности к матричной одноцепочечной молекуле ДНК, начиная от праймера. Ни одна из известных ДНК-полимераз не может создать нуклеотидную цепочку «с нуля»: они в состоянии лишь добавлять нуклеотиды к уже существующей 3'-гидроксильной группе. По этой причине ДНК-полимераза нуждается в праймере, к которому она могла бы добавить первый нуклеотид.

Получить данный фермент можно из различных микроорганизмов. В частности, для циклов ПЦР подходит ДНК-полимераза, выделенная из термофильной зубактерии *Thermas aquiticus* (сокращенно Taq) и обладающая 5'→3'-экзонуклеазной активностью, за счет которой разрушается зонд. Основное требование к ДНК-полимеразе, используемой для ПЦР, — сохранение своей активности при температуре 95 °С в течение длительного времени, поскольку ПЦР-РВ предусматривает проведение реакции при высоких температурах (до 95 °С включительно) [7, 8, 10, 12].

Основные этапы ПЦР-РВ

Молекулярно-генетический анализ исследуемой пробы методом ПЦР-РВ предполагает четыре этапа: пробоподготовка, обратная транскрипция (ОТ) в случае исследования вирусных РНК, амплификация (умножение) определенного участка ДНК возбудителя, детекция результатов исследования.

Пробоподготовка, или процесс выделения генома возбудителя заболевания, предполагает экстракцию ДНК или РНК за счет лизиса структур клетки и частиц инфекционного агента, очистку от липопротеиновых, углеводных, белковых составляющих и других примесей, а также ингибиторов реакций ОТ и ПЦР-РВ. На этапе экстракции НК применяются различные хаотропные агенты, денатурирующие белки, а также комплекс протеиназ, расщепляющих белковые компоненты [11]. Следует отметить, что существуют методики одновременного получения элюатов ДНК и РНК, что удоб-

но, поскольку унифицирует этап выделения НК при исследовании образцов в ПЦР-РВ сразу на несколько инфекций.

Обратная транскрипция, или **реверсия**, необходима для синтеза ДНК-копии генома возбудителя на матрице его РНК и проводится только для РНК-содержащих инфекционных агентов, например, для вирусов бешенства, ящура, блютанга, инфекционного бронхита кур, гриппа птиц, ринотрахеита индеек и др. [6, 9, 13]. Предполагается использование элюата РНК, dNTP, буферного раствора, праймеров, ревертазы (РНК-зависимой ДНК-полимеразы). ОТ проводится в течение одного цикла термостагирования, как правило, при температуре 37...45 °С [8, 12].

Амплификация выбранного фрагмента ДНК инфекционного агента в ПЦР-РВ обеспечивает получение ампликонов в высокой концентрации. Данный этап исследования является основным, предполагает применение элюата ДНК или полученной в результате ОТ комплементарной ДНК возбудителя инфекции, а также необходимых реагентов: ионов магния, dNTP, пары олигонуклеотидных праймеров, комплементарных идентифицируемым участкам генома инфекционного агента, ДНК-зонда, меченого флуоресцентным красителем и гасителем свечения, фермента ДНК-полимеразы [7, 12]. Процесс амплификации может состоять из 35...50 циклов реакции, каждый из которых включает в себя три подэтапа: денатурацию ДНК, отжиг праймеров и ДНК-зонда, элонгацию (построение фрагмента нуклеотидной цепи за счет работы фермента ДНК-полимеразы).

Поскольку для отжига олигонуклеотидных праймеров нужно предварительно разрушить водородные связи между цепями ДНК и разъединить их (провести денатурацию цепей ДНК), реакционную смесь нагревают до 93...96 °С. Далее смесь охлаждают до температуры 40...75 °С, при которой праймеры и зонд гибридизуются с одноцепочечной ДНК-матрицей. После взаимодействия олигонуклеотидов с матричной молекулой ДНК-полимераза проводит элонгацию, то есть синтез комплементарной цепи ДНК путем удлинения стартового праймера при температуре 60...75°С, и разрушение ДНК-зонда, что приводит к появлению флуоресцентного сигнала (см. рис. 1). В результате многократного повторения подобных циклов реакции нарастает флуоресцентное свечение и увеличивается количество продуктов реакции (ампликонов) в гео-

метрической прогрессии с основанием, близким к 2, поскольку ранее синтезированные фрагменты на каждом цикле реакции выступают в качестве матриц для синтеза новых ампликонов.

Детекция результатов подробно описана в следующем разделе.

Фазы амплификации и количественный ПЦР-анализ

ПЦР-РВ проводят в течение 20...50 циклов термоденатурации, в каждом из которых накапливаются продукты реакции. В каждом цикле на этапе элонгации с помощью флуориметра детектируется флуоресцентный сигнал и фиксируется в виде логистической кривой (сигмоиды). Данная кривая процесса отражает его фазы: экспоненциальную недетектируемую, экспоненциальную детектируемую, линейную и фазу плато (рис. 2).

Во время первых циклов амплификации флуоресцентный сигнал накапливается, но он ниже пороговой величины, детектируемой флуориметром, и считается базовым (экспоненциальная недетектируемая фаза). Произвольно из базового уровня флуоресценции прибор выбирает пороговую линию, означающую пороговый уровень флуоресценции. Участок сигмоиды, расположенный между пороговой линией и линейной фазой на протяжении нескольких циклов амплификации, считают экспоненциальной детектируемой фазой реакции. В линейной фазе график приобретает вид функции $y = kx + b$, где уровень сигнала нарастает прямо пропорционально количеству циклов амплификации. На поздних циклах реакции график меняет направление с вертикального на горизонтальное, обозначая, что накопление продукта максимально, и субстрат практически исчерпан. В результате скорость ферментативной реакции резко снижается, и реакция выходит на фазу плато [8, 10, 12].

Во время экспоненциальной детектируемой фазы определяют пороговый цикл амплификации (threshold cycle, C_t), то есть предельную точку пересечения сиг-

моидной и пороговой линии, определяющей границу фоновых значений флуоресценции. Поскольку ключевые компоненты ПЦР как элементарной биохимической реакции и условия ее проведения постоянны вне зависимости от первичной структуры матрицы, сигмоидная кривая амплификации графически универсальна с однотипной крутой вертикалью в линейной фазе образования продукта при тестировании всех без исключения объектов безотносительно к их природе (штаммов, изолятов, видов вирусов, бактерий и др.). Переменной в реакционной смеси может быть только концентрация матрицы, которая зависит от содержания тестируемого объекта в пробе; обычно для начала реакции необходимо не менее 10...100 единиц его биологической активности (инфекционных единиц) — это нижний предел аналитической чувствительности ПЦР [12]. Продолжительность некоего «инкубационного» периода, предшествующего детектируемому количеству ампликонов (детектируемой фазе), определяется различной исходной концентрацией матрицы.

В графических пределах течения ПЦР, таким образом, пороговый цикл амплификации (C_t) — переменная характеристика; число предшествующих циклов обратно пропорционально количеству матрицы и, соответственно, инфекционных единиц (чем ниже C_t , меньше циклов до детектируемой фазы, тем больше амплифицируемого продукта). При этом для всестороннего сравнительного анализа практически важно определение и нижнего количественного предела амплификации (наибольшего числа требуемых репликационных циклов, минимума матрицы и инфекционных единиц). Обычно при максимальной эффективности реакции диапазон циклов амплификации варьируется от 10...15 (максимум матрицы и объекта) до 38...40 циклов, что позволяет получать 25...50 нг ампликонов в 1 мкл продукта реакции с одной молекулы ДНК [7].

Данные значения служат инструментом для количественного определения инфекционного агента, которое выражают в стандартных единицах: количестве копий ДНК/мл, копий ДНК/г, копий ДНК/фиксированное количество клеток или титр возбудителя в десятичных логарифмах ($\lg TCD_{50}/мл$) [2, 6, 10]. При этом исследователи отмечают, что количество возбудителя заболевания, в частности, вирусов, с помощью ПЦР-РВ можно оценивать в диапазоне концентраций от 10^{1-2} до 10^9 единиц [7, 8] за счет широкого динамического диапазона кинетики накопления ампликонов.

Для определения взаимосвязи концентрации матрицы и титра инфекционной активности агента на первом этапе исследования готовят серии последовательных десятикратных разведений суспензии с известным исходным титром. Каждое разведение используют для постановки ПЦР-РВ в нескольких повторностях и получают для каждого разведения сигмоидную кривую (рис. 3). Вычисляют среднее значение C_t , стандартное отклонение, а также 95%-й доверительный интервал. Пользуясь полученными данными, определяют предел выявляемости ДНК, а также существование зависимости значения C_t от логарифма титра инфекционного агента с расчетом коэффициента корреляции.

Сотрудниками ВНИИЗЖ были определены модели для расчета титра многих вирусов, в частности,

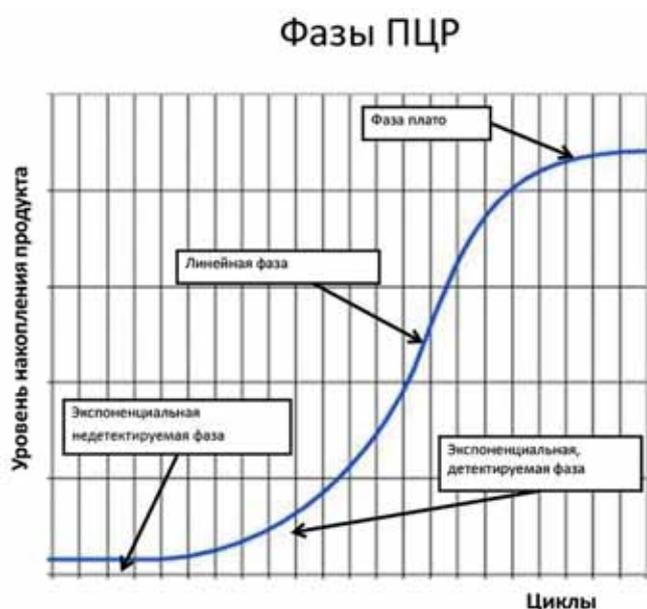


Рис. 2. Сигмоидная кривая и фазы ПЦР-РВ
Fig. 2. Sigmoid curve and phases of RT-PCR

ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

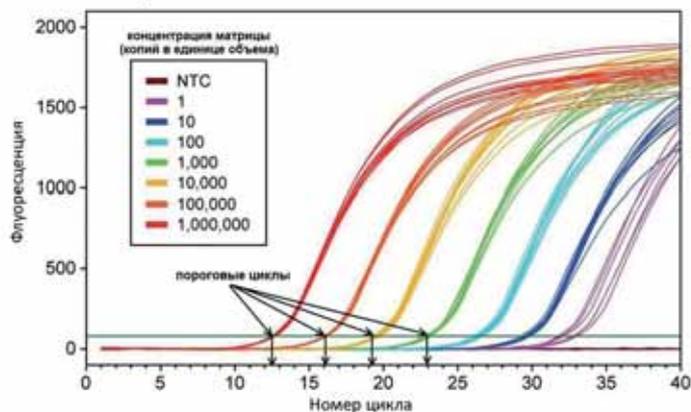


Рис. 3. Сигмоидные кривые разведений исследуемого материала с разной концентрацией матрицы при анализе в ПЦР-РВ

Fig. 3. Sigmoid dilution curves of the test material with different matrix concentrations when analyzed in RT-PCR

ящура $\lg T = (-0,2956) \cdot Ct + 11,465$ [28], африканской чумы свиней $\lg T = (-0,2439) \cdot Ct + 8,9425$ [13], инфекционного бронхита кур $\lg T = (-0,2654) \cdot Ct + 9,3363$ и др. Так, при исследовании культуральной суспензии вируса ящура выделяют РНК с последующей постановкой ОТ-ПЦР-РВ и получают значение Ct , например, 9,50 циклов. Следовательно, воспользовавшись формулой $\lg T = (-0,2956) \cdot Ct + 11,465$, получают значение титра инфекционной активности 8,66 \lg ТЦД₅₀/мл или $10^{8,66}$ ТЦД₅₀/мл (рис. 4).

В результате исследований установлено равномерное увеличение значения Ct при снижении титра вируса в

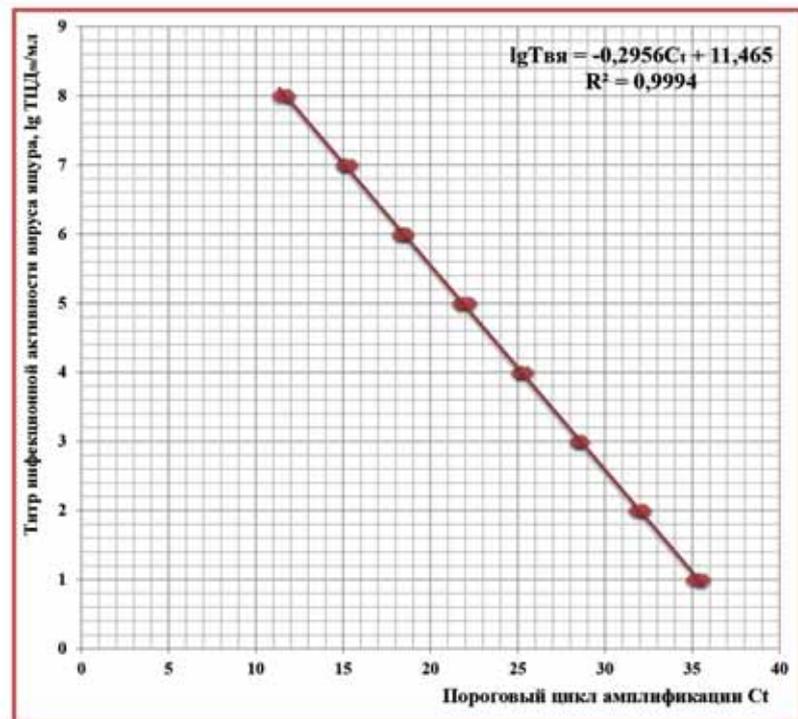


Рис. 4. Калибровочный график зависимости порогового цикла амплификации от титра вируса ящура

Fig. 4. Calibration graph of the dependence of the threshold amplification cycle on the titer of the FMD virus

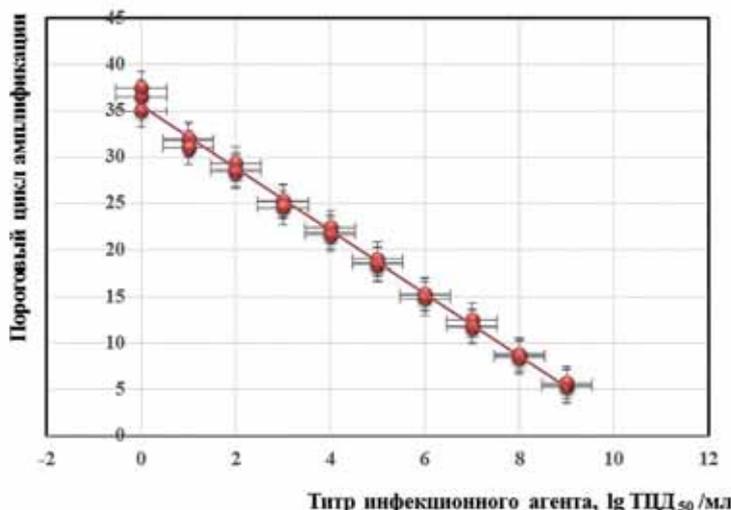


Рис. 5. Типичная стандартная калибровочная кривая, построенная на основе разведений количественного стандарта при анализе в ПЦР-РВ — прямое соотношение количества циклов и титра инфекционности

Fig. 5. Typical standard calibration curve, built on the basis of dilutions of a quantitative standard for analysis in RT-PCR - direct ratio of the number of cycles and titer of infectivity

тестируемом биологическом материале. Полученные калибровочные графики демонстрируют практически линейную зависимость показателя Ct ПЦР-РВ от титра (рис. 5).

Опираясь на экспериментальные данные, выявлено, что различия пороговых циклов амплификации для разведений суспензии инфекционного агента с шагом 10 ($1,0 \lg$ ТЦД₅₀/мл) приблизительно равно 3,32...3,33 циклам. Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК, которое можно описать формулой:

$$A = M \cdot (2^n - 1) \sim 2^n,$$

где A — количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации; M — начальное количество ДНК-мишеней; n — число циклов амплификации.

При данном значении Ct 3,32...3,33 различия между разведениями исследуемой суспензии около 10 ($2^{3,32} - 2^{3,33} = 9,99 - 10,06$), что соответствует теоретическим представлениям о разведении исследуемого материала.

Биологический материал для исследования в ПЦР-РВ

Для анализа в ПЦР-РВ используют различные биологические материалы, например, кровь, биоптаты, слюну, соскобы и др. В ПЦР-РВ можно исследовать любой биологический материал, поскольку реакция не требует стерильности, фиксации, антисептики и прочих традиционных элементов пробоотбора. При этом материал может быть гниющим,

трупным, аутолизированным или контаминированным посторонними микроорганизмами. Это объясняется тем, что для анализа в ПЦР-РВ необходимы не белковые составляющие, а молекула ДНК, проявляющая как химическая структура высокую устойчивость в разных естественных условиях окружающей среды [2, 10].

Наиболее стандартным биологическим материалом для количественного анализа в ПЦР-РВ является кровь, для которой количество инфекционного агента обычно выражают в числе копий генома возбудителя заболевания в 1 мл цельной крови [7]. При отборе биологических материалов для исследования в ПЦР-РВ важно избегать внесения в пробу ингибирующих ПЦР веществ, а также соединений, которые влияют на фоновую флуоресценцию смеси реагентов реакции амплификации. Так, например, кровь чаще всего берут с применением антикоагулянтов. Однако некоторые из них (в частности, гепарин и хелатирующие агенты, родственные этилендиаминтетраацетату) оказывают выраженное ингибирующее влияние на реакцию амплификации. При использовании гепарина операторы ПЦР-РВ применяют сорбционные методики выделения генома возбудителя заболевания с применением кремнийсодержащих частиц, способных удалить из биологического образца большинство ингибиторов реакции. Препятствовать реакции амплификации также может гемоглобин цельной крови, поэтому операторы для выделения НК используют специальные приемы, позволяющие максимально эффективно удалять остатки гема из образца [4].

Серьезной ошибкой на этапе отбора проб является неправильный выбор места взятия биологического материала. Для анализа в ПЦР-РВ необходимо соблюдать патогенетические аксиомы и брать материал из места предполагаемой локализации инфекционного процесса. Так, при ящуре следует отбирать эпителий из невоскрывшихся или только что воскрывшихся афт либо афтозную жидкость. Если это невозможно, в качестве альтернативного источника вируса берут пробы крови и/или образцы жидкости из глотки и пищевода (с помощью пищеводно-глоточного зонда у жвачных животных или мазки из зева у свиней) [9]. Важно также учитывать особенности инфекционного цикла возбудителя заболевания. Если нарушить данные правила, то высока вероятность, что результат анализа в ПЦР-РВ будет ошибочным.

ПЦР-РВ как диагностический инструмент в ветеринарной практике

Совершенствование технологий амплификации ДНК возбудителей инфекционных заболеваний среди животных произвело революцию в клинической вирусологии и бактериологии, позволив довольно просто, быстро, достоверно определять наличие инфекционного агента в биологическом материале и использовать полученные сведения для борьбы с заболеваниями. В настоящее время молекулярно-генетические методы анализа, в частности, ПЦР, широко применяют в лабораторных исследованиях при различных инфекционных заболеваниях животных; они прочно вошли в повседневную практику научно-исследовательских и клинических лабораторий ветеринарного профиля. Спектр применения ПЦР растет с каждым годом, поскольку при

лабораторном исследовании (в процессе экспресс-диагностики) нужно доказать или опровергнуть наличие генома возбудителя заболевания; а при проведении количественного анализа оценить степень вирусной или бактериальной нагрузки на организм или отдельный орган. Метод ПЦР-РВ в диагностике инфекционных заболеваний животных уверенно стремится к статусу «золотого стандарта».

Количественное определение возбудителей болезней, особенно вирусов, крайне важно как при острых, так и персистирующих инфекциях, для анализа которых качественная детекция не дает необходимой информации о течении заболевания и ходе лечения; а также при выявлении нецитопатогенных и некультивируемых патогенов [2, 5, 9]. Использование ПЦР-РВ для количественной оценки нагрузки организма инфекционным агентом позволяет сделать вывод о прогрессировании заболевания и назначить упреждающую терапию в доклинической фазе инфекции; оценить эффективность антивирусной и антибактериальной терапии и отслеживать устойчивость возбудителя болезни к лечебным препаратам [5, 9].

Научно-практические разработки и внедрения ПЦР-РВ в диагностике и изучении возбудителей инфекционных заболеваний животных Scientific and practical development and implementation of RT-PCR in the diagnosis and study of causative agents of infectious diseases in animals

Инфекции	Даты внедрения ПЦР-РВ в ветеринарную практику	Примечания
Ящур	2011, 2014, 2017, 2018	Диагностика и оценка антигенного сырья при производстве противоящурных вакцин
Везикулярная болезнь свиней	2014	Диагностика
Лейкоз КРС	2008, 2014, 2019	»
Бешенство	2011, 2014, 2018	»
Нодулярный дерматит	2018	Дифференциальная диагностика нодулярного дерматита, оспы овец и оспы коз
Оспа овец и оспы коз	2019	Диагностика
Африканская чума свиней	2014, 2019	»
Грипп птиц	2014	»
Микоплазмоз птиц	2008, 2014	Детекция и дифференциация штаммов
Болезнь Марека	2006, 2017	Диагностика трех серотипов в формате мультиплекс
Болезнь Ньюкасла	2014	Диагностика
Метапневмовирусная болезнь	2010, 2014	»
Сальмонеллез	2014	»

В настоящее время в РФ разработаны тест-системы для ПЦР-диагностики большинства особо опасных и экономически значимых болезней животных, что имеет большое значение для обеспечения ветеринарной безопасности страны. В таблице обобщены научно-практические разработки и внедрения ПЦР-РВ в диагностике и изучении возбудителей инфекционных заболеваний животных, выполненные ФГБУ ВНИИЗЖ.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

References

1. Mazlum A., Zhukov I.Yu., Aronova E.V., Igolkin A.S., Vlasova N.N., *Metodicheskie rekomendacii po ocenke urovnya reprodukcii virusa afrikanskoj chumy` svinej s ispol'zovaniem PCzR v rezhime real' nogo vremeni [Guidelines for assessing the level of reproduction of African swine fever virus using real-time PCR]*, Vladimir, Federal Center for Animal Health, 2019, 19 p. (In russ.)
2. Patent RF № 2674076, 25.12.2017 *Sposob opredeleniya titra infekcionnoj aktivnosti virusa yashhura v neinaktivirovannom sy'r'e dlya vakciny` s primeneniem metoda obratnoj transkripcii i polimeraznoj cepnoj reakcii v rezhime real' nogo vremeni, [Method for determining the titer of the infectious activity of the foot and mouth disease virus in non-inactivated raw materials for a vaccine using the method of reverse transcription and polymerase chain reaction in real time]*, Patent of Russia № 2017145889. (In russ.)
3. Abdul-Careem M.F., Hunter B.D., Nagy E., Read L.R., Sanei B., Spencer J.L., Development of a real-time PCR assay using SYBR Green chemistry for monitoring Marek's disease virus genome load in feather tips, *J. Virol. Methods*, 2006, No. 133, pp. 34-40.
4. Boom R., Sol C.J., Heijink R., Wertheim van Dillen P.M., Rapid and simple method for purification of nucleic acid, *J. Clin. Microbiol.*, 1990, No. 28, pp. 495-593.
5. Hoffman B., Beer M., Reid S.M., Mertens P., Oura C.A., Van Rijn P.A., Slomka M.J., Banks J., Brown I.H., Alexander D.J. & King D.P., A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health, *Vet. Microbiol.*, 2009, No. 139 (1-2), pp. 1-23.
6. Hole K., Velazques-Salinas L. & Clavijo A., Improvement and optimization of a multiplex real time RT-PCR assay for the detection and typing of vesicular stomatitis virus, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2010, No. 22, pp. 428-433.
7. Mackay I.M., Real-time PCR in the microbiology laboratory, *Clin Microbiol Infect.*, 2004, No. 10, pp. 190-212.
8. Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A., Real-time PCR in virology, *Nucleic Acids Res.*, 2002, No. 30, pp. 1292-1305.
9. OIE, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 7th ed. Paris, 2018, 1834 c.
10. Peirson S.N., Butler J.N., Forster R.S., Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis, *Nucleic Acids Res.*, 2003, No. 31, e73.
11. Read S.J., Recovery efficiencies on nucleic acid extraction kits as measured by quantitative LightCycler PCR, *Mol. Pathol.*, 2001, No. 54, pp. 86-90.
12. Shaw A.E., Reid S.M., Ebert K., Hutchinks G.H., Ferris N.P. & King D.P., Protocol: Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease, *J. Virol. Methods*, 2007, No. 143, pp. 81-85.
13. Wilson W.C., Letchworkth G.J., Jimenez C., Herrero M.V., Navarro R., Paz P., Cornish T.E., Smoliga G., Pauszek S.J., Dornak C., George M. & Rodriguez L.L., Field evaluation of a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of vesicular stomatitis virus, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2009, No. 21, pp. 179-186.

В Москве завершился конкурс «Московские мастера 2020» по профессии «Ветеринарный врач»



Лучший ветеринарный врач столицы был выбран 22 октября 2020 года. Его имя торжественно озвучено со сцены Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И.Скрябина, где состоялся финальный этап конкурса.

Победителем конкурса стала заведующий ветеринарным участком Красная Пахра Станции по борьбе с болезнями животных Троицкого и Новомосковского АО ГБУ «Мосветобъединение» **Девяткина Светлана Владимировна**.

Второе место занял ветеринарный врач 1 категории Бутовской УВЛ Станции по борьбе с болезнями животных Юго-Западного АО ГБУ «Мосветобъединение» **Боричук Сергей Владимирович**.

Третье место почетно заняла ветеринарный врач 1 категории ПЛВСЭ Станции по борьбе с болезнями животных Юго-Восточного АО ГБУ «Мосветобъединение» **Носова Анастасия Александровна**.

Памятные призы и почетные грамоты победителям и призерам вручил председатель Комитета ветеринарии города Москвы Алексей Сауткин.

«Этот конкурс дает ветеринарному врачу уникальную возможность продемонстрировать свой профессиональный уровень. Это хорошее испытание для тех, кто любит и ценит свою профессию. Не секрет, что в последние годы Государственная ветеринарная служба города Москвы активно развивается, закупается современное лечебно-диагностическое оборудование, внедряются передовые методы диагностики и лечения питомцев. Это помогает повысить эффективность работы и качество предоставляемых москвичам ветеринарных услуг. И, безусловно, в службе востребованы настоящие специалисты, которые ежедневно умножают достижения столичной ветеринарии. Этот конкурс, конечно, этому способствует» — сказал Председатель Комитета ветеринарии города Москвы.

Между финалистами также проводился конкурс по номинациям «Самый молодой участник Конкурса», «Лучший молодой специалист госветслужбы города Москвы», «За преданность выбранной профессии» и «За продолжение трудовой династии».

Победители награждены Почетными грамотами Комитета ветеринарии города Москвы, благодарностями Московской городской организации профсоюза работников АПК РФ и ценными подарками.

Торжественная церемония завершилась традиционным концертом творческих коллективов подразделений государственной ветеринарной службы города Москвы, посвященном знаменательной для всех нас дате — 75 годовщине Победы в Великой Отечественной войне.