

Использование наборов реагентов для ОТ-ПЦР в реальном времени для оценки подлинности вакцин против кори, паротита и краснухи

А. С. Бинятова^{1,*}, Е. Д. Мыца¹, Н. В. Чертова¹, Р. А. Волкова¹, К. А. Саркисян¹, Т. Н. Ильясова¹, Т. Н. Юнасова¹, А. А. Мовсесянц¹, В. А. Меркулов^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

В настоящее время подлинность вирусных вакцин против кори, паротита и краснухи при сертификационных испытаниях определяют с помощью трудоемкой, длительной и дорогостоящей реакции нейтрализации на культуре клеток. Подлинность вируса в этих вакцинах устанавливают на основании нейтрализации цитопатогенного действия вирусов на чувствительной культуре клеток RK-13 и Vero специфической иммунной сывороткой. Упростить и удешевить контроль подлинности коммерческих серий вакцин для профилактики кори, паротита и краснухи с помощью ПЦР-тестирования представляется перспективной задачей. Целью работы было определение возможности выявления вирусной РНК в указанных вакцинах с помощью наборов реагентов разных производителей, предназначенных для выявления вирусов кори, паротита и краснухи в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР). В статье представлены результаты работы по оценке возможности использования метода ОТ-ПЦР для определения подлинности вирусов кори, паротита и краснухи в вакцинах. Были изучены отечественные и зарубежные наборы реагентов, предназначенные для выявления вирусов кори, паротита и краснухи в клиническом материале. Все изучавшиеся наборы реагентов выявляли рибонуклеиновые кислоты (РНК) названных вирусов в вакцинных препаратах. Показана высокая специфичность использовавшихся наборов реагентов и возможность их применения для подтверждения подлинности вирусов кори, паротита и краснухи во всех исследованных вакцинах. Для оценки подлинности вакцин против краснухи методом ОТ-ПЦР могут быть использованы коммерческие отечественные наборы реагентов. Для оценки подлинности вакцин против кори и паротита методом ОТ-ПЦР целесообразна разработка отечественных наборов реагентов. При оценке приемлемости результатов испытаний использовали отраслевые стандартные образцы активности вирусов кори, паротита и краснухи со стабильной аттестованной активностью.

Ключевые слова: ОТ-ПЦР; подлинность вируса в вакцине; вакцина коревая живая; вакцина паротитная живая; вакцина против краснухи живая; диагностические наборы реагентов; отраслевые стандартные образцы

Для цитирования: Бинятова АС, Мыца ЕД, Чертова НВ, Волкова РА, Саркисян КА, Ильясова ТН, Юнасова ТН, Мовсесянц АА, Меркулов ВА. Использование наборов реагентов для ОТ-ПЦР в реальном времени для оценки подлинности вакцин против кори, паротита и краснухи. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(4):249–256. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-249-256>

Контактное лицо: Бинятова Анна Станиславовна; Binyatova@expmed.ru

Using Real-Time RT-PCR Reagent Kits for Identity Testing of Measles, Mumps and Rubella Vaccines

A. S. Binyatova^{1,*}, E. D. Mytsa¹, N. V. Chertova¹, R. A. Volkova¹, K. A. Sarkisyan¹, T. N. Ilyasova¹, T. N. Yunasova¹, A. A. Movsesyants¹, V. A. Merkulov^{1,2}

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8/2 Trubetskaya Street, Moscow 119991, Russian Federation

Currently, the identity of measles, mumps and rubella virus vaccines is determined during certification testing by a labour-consuming, lengthy and costly neutralisation test using cell cultures. The identity of the virus contained in such vaccines is established based on neutralisation of cytopathic effect of viruses in sensitive RK-13 and Vero cell cultures using a specific immune serum. An urgent challenge is to simplify and reduce the cost of controlling the identity of commercial batches of measles, mumps and rubella vaccines using polymerase chain reaction (PCR) tests. The aim of the study was to determine the possibility of viral ribonucleic acid (RNA) detection in these vaccines using reagent kits from different manufacturers for detection of measles, mumps and rubella viruses in clinical material by real-time reverse transcription-PCR (RT-PCR). The article presents the results of the study, which assessed the possibility of using the real-time RT-PCR for testing the identity of measles, mumps and

rubella viruses in vaccines. The authors of the study analysed domestically produced and foreign reagent kits intended for detection of measles, mumps and rubella viruses in clinical material. All the studied reagent kits were able to detect RNAs of the above-mentioned viruses in vaccine products. All the reagent kits demonstrated high specificity and could be used to confirm the identity of the measles, mumps and rubella viruses in all the studied vaccines. Commercial domestic reagent kits can be used to determine the identity of rubella vaccines by RT-PCR. However, it is advisable to develop domestic reagent kits for checking the identity of measles and mumps vaccines by RT-PCR. The acceptability of the test results was assessed using the industry reference standards of measles, mumps and rubella viruses activity with certified stable activity values.

Key words: RT-PCR; identity of viruses in vaccines; live measles vaccine; live mumps vaccine; live rubella vaccine; diagnostic reagent kits; industry reference standards

For citation: Binyatova AS, Mytsa ED, Chertova NV, Volkova RA, Sarkisyan KA, Ilyasova TN, Yunasova TN, Movsesyants AA, Merkulov VA. Using real-time RT-PCR reagent kits for identity testing of measles, mumps and rubella vaccines. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(4):249–256. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-249-256>

Corresponding author: Anna S. Binyatova; Binyatova@expmed.ru

В соответствии с отечественными и международными нормативными документами^{1,2,3} определение подлинности вирусов кори, эпидемического паротита и краснухи в вакцинах проводят в реакции нейтрализации (РН) на культуре клеток на основании нейтрализации цитопатогенного действия вирусов иммунными сыворотками животных. Общеизвестно, что подготовка материалов для проведения испытания подлинности вирусов в вакцине с помощью РН включает в себя также приготовление и аттестацию специфических иммунных сывороток животных, создание посевных банков культур клеток и их ведение, что является трудоемким, затратным и длительным процессом. В среднем опыт по проведению испытания препаратов на подлинность в РН длится 10–12 сут. Метод ПЦР менее трудоемкий и позволяет получить результат в течение 1 рабочего дня.

Некоторые зарубежные производители для подтверждения подлинности вируса в вакцине при контроле готового продукта используют ОТ-ПЦР. Ряд авторов, используя собственные экспериментальные наборы реагентов, показал возможность с помощью ОТ-ПЦР в режиме реального времени количественно определять содержание РНК вирусов кори, паротита и краснухи в вирусосодержащих жидкостях [1, 2]. Необходимо отметить, что согласно требованиям международных фармакопей при определении основных показателей качества иммунобиологических препаратов следует по возможности отказываться от использования лабораторных животных и применять методы *in vitro* [3].

Цель работы — определение возможности выявления вирусной РНК в указанных вакцинах с помощью наборов реагентов разных производителей, предназначенных для выявления вирусов кори, паротита и краснухи в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР).

Материалы и методы

Объектом исследования были коммерческие диагностические наборы отечественного и зарубежного производства для выявления вирусов кори, паротита и краснухи в клиническом материале для ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

В работе были использованы следующие наборы реагентов:

1) набор реагентов для выявления РНК вируса краснухи (Rubella virus) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией АмплиСенс® Rubella virus-FL производства

ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (РУ № ФСР 2009/05501) — 2 серии;

2) набор реагентов для выявления РНК вируса краснухи методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени РеалБест РНК Rubella (комплект 1) производства АО «Вектор-Бест» (РУ № РЗН 2016/3704) — 2 серии;

3) набор реагентов для выявления вируса кори — Measles Virus Real Time RT-PCR Kit — в носоглоточных образцах методом ПЦР в реальном времени (Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd, Китай, производство Liferiver) — 1 серия;

4) набор реагентов для выявления вируса паротита — Mumps Virus Real Time RT-PCR Kit — в носоглоточных образцах методом ПЦР в реальном времени (Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd, Китай, производство Liferiver) — 1 серия;

5) набор реагентов для выявления вируса краснухи — Rubella Virus Real Time RT-PCR Kit — в носоглоточных образцах методом ПЦР в реальном времени (Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd, Китай, производство Liferiver) — 1 серия.

Пробоподготовка. Выделение РНК вирусов кори, паротита и краснухи для последующей работы с набором АмплиСенс® и наборами зарубежного производства проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала РИБО-преп производства ООО «ИнтерЛабСервис» (РУ № ФСР 2008/03147).

Выделение РНК вируса краснухи проводили набором реагентов для выделения нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) возбудителей инфекций из сыворотки (плазмы) крови РеалБест экстракция 1000 (АО «Вектор-Бест» (РУ № ФСР 2010/06867)) для последующей работы с набором РеалБест РНК Rubella, комплект 1.

С помощью указанных наборов были исследованы образцы коммерческих серий вакцин производства АО «НПО «Микроген» Минздрава России:

- вакцина против краснухи культуральная живая (штамм вируса краснухи RA-27/3) — 10 серий;

- вакцина паротитная культуральная живая (штамм вируса паротита Ленинград-3) — 5 серий;

- вакцина коревая культуральная живая (штамм вируса кори Ленинград-16) — 4 серии;

- вакцина паротитно-коревая культуральная живая (штамм вируса кори Ленинград-16, штамм вируса паротита Ленинград-3) — 2 серии.

¹ Комитет экспертов ВОЗ по стандартизации биологических препаратов: Сорок третий доклад. Серия технических докладов ВОЗ, № 840. Женева: ВОЗ; 1994.

² Фармакопейная статья 3.3.1.0024.15 «Вакцина против краснухи культуральная живая». Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 3, М.; 2015.

³ 04/2010:1057 Measles, Mumps and Rubella Vaccine (Live). European Pharmacopoeia 8.0.

Также были исследованы зарубежные вакцины:

- вакцина ММР II® — вакцина против кори, паротита и краснухи, живая (штамм вируса кори — Эдмонстон, штамм вируса паротита — Дж. Линн (уровень В), штамм вируса краснухи — Вистар RA-27/3) производства Мерк Шарп и Доум Б.В., Нидерланды;

- вакцина Приорикс® — вакцина против кори, паротита и краснухи живая культуральная (штамм вируса кори — Шварц, штамм вируса паротита — RIT 4385, штамм вируса краснухи — Вистар RA-27/3) производства ГлаксоСмитКляйн Байолоджиалз, Бельгия.

В работе были использованы отраслевые стандартные образцы (ОСО):

- ОСО 42-28-426-2013 активности вакцины против краснухи (штамм вируса краснухи RA-27/3);

- ОСО 42-28-348-2016 активности живой паротитной вакцины (штамм вируса паротита Ленинград-3);

- ОСО 42-28-347-2013 активности живой коревой вакцины (штамм вируса кори Ленинград-16);

- стандартный образец предприятия — СОП № 1 активности вируса краснухи (штамм вируса краснухи RA-27/3).

Все указанные вакцины предварительно были исследованы по показателю «Подлинность» в РН на культуре клеток с помощью специфических иммунных сывороток в соответствии с нормативной документацией (НД) на препараты^{4,5,6} и соответствовали требованиям НД.

При проведении исследований с применением метода ПЦР все образцы вакцин испытывали без разведения.

Для амплификации и учета результатов использовали прибор Rotor- Gen 6000 (Corbett Life Science) и CFX96/384 Touch™ (BioRad). Результаты реакции считали достоверными при отсутствии положительного сигнала в отрицательном контрольном образце (ОКО), что свидетельствовало об отсутствии контаминации в исследуемых образцах.

Прибор Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) использовали при амплификации и учете результатов при использовании китайских наборов и набора АмплиСенс® Rubella virus-FL.

Амплификацию и учет результатов при использовании набора реагентов РеалБест РНК Rubella, комплект 1, проводили на приборе CFX96/384 Touch™ (BioRad).

Статистическая обработка полученных результатов была проведена общепринятыми методами [4], расчеты проведены с помощью программы Microsoft Office Excel 2007.

⁴ Фармакопейная статья предприятия «Вакцина коревая культуральная живая» ЛС-002140-141116.

⁵ Фармакопейная статья предприятия «Вакцина паротитная культуральная живая» Р N000262/01-200217.

⁶ Фармакопейная статья предприятия «Вакцина против краснухи культуральная живая» ЛП-000463-281216.

Результаты и обсуждение

Проведено экспериментальное изучение коммерческих наборов реагентов, предназначенных для выявления РНК вирусов кори, паротита и краснухи в клиническом материале методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, для определения подлинности вакцин против кори, паротита и краснухи.

I. Исследование вакцин против краснухи

1. С помощью набора реагентов АмплиСенс® Rubella virus-FL были исследованы 8 серий отечественной вакцины против краснухи (АО «НПО «Микроген»), 2 серии комбинированной вакцины против кори, паротита и краснухи ММР II® и Приорикс®. Одновременно исследовали ОСО 42-28-426-2013 активности вакцины против краснухи и СОП № 1 активности вируса краснухи.

Для подтверждения специфичности метода параллельно с образцами вакцины против краснухи было исследовано по одной серии вакцины против кори и против паротита.

Использовали программу амплификации согласно инструкции по применению набора (табл. 1).

Внутренний контрольный образец (ВКО) добавлялся на этапе выделения во все исследуемые пробы. На рисунке 1 представлены средние значения порогового цикла (Ct) исследованных образцов. Значение Ct в положительном контрольном образце 1 (ПКО 1) составляет 20, что меньше значения 24, указанного как предельная величина во вкладыше к набору реагентов. Значение порогового цикла для ВКО равно 23, что не превышает предельного значения 28, указанного в инструкции к набору.

Как видно на рисунке 1, для большинства исследованных образцов вакцины против краснухи пороговый цикл был меньше 24 и находился в диапазоне от 15 до 20.

Таким образом, положительный сигнал в образцах вакцины с краснушным компонентом показал наличие РНК вируса краснухи в исследуемых образцах.

Одновременно с образцами вакцины против краснухи были исследованы образцы вакцин против кори и паротита, в которых, так же как в отрицательных контрольных образцах, пороговый цикл не определялся, следовательно, специфические участки для отжига праймеров, предназначенных для РНК вируса краснухи, в образцах этих вакцин отсутствовали.

2. С помощью этого набора были исследованы 3 серии отечественной вакцины против краснухи (АО «НПО «Микроген» Минздрава России), 2 серии комбинированной вакцины против

Таблица 1. Программа амплификации набора АмплиСенс® Rubella virus-FL
Table 1. Amplification step using AmpliSens® Rubella virus-FL reagent kit

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Удержание температуры	50	15 мин	-	1
Удержание температуры 2	95	15 мин	-	1
Циклирование	95	5 с	-	5
	60	20 с	-	
	72	15 с	-	
Циклирование 2	95	5 с	-	40
	60	20 с	FAM — для ВКО, JOE — для вируса краснухи	
	72	15 с	-	

Примечание. FAM, JOE — каналы детекции результатов амплификации, ВКО — внутренний контрольный образец.

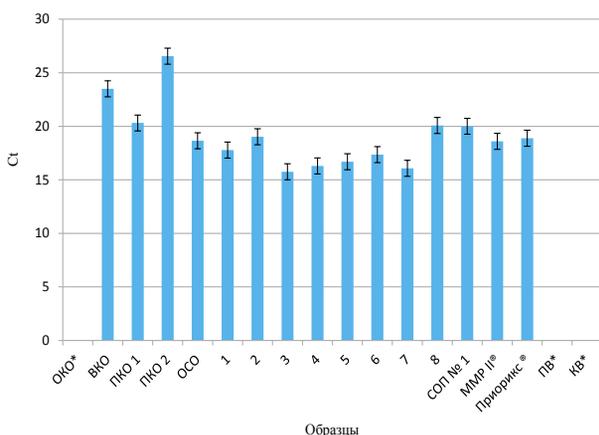


Рис. 1. Среднее значение порогового цикла исследованных образцов при использовании набора реагентов АмплиСенс® Rubella virus-FL: 1–8 — серии вакцины против краснухи; MMP II® — вакцина против кори, паротита и краснухи производства MSD; Приорикс® — вакцина против кори, паротита и краснухи производства GSK; СОП № 1 — стандартный образец предприятия активности вируса краснухи; ПВ — паротитная вакцина; KB — коревая вакцина; OKO — отрицательный контрольный образец; ВКО — внутренний контрольный образец; ПКО 1 — положительный контрольный образец на этапе выделения; ПКО 2 — положительный контрольный образец на этапе амплификации; ОСО — отраслевой стандартный образец.

Fig. 1. Average threshold cycle values of the samples tested using AmpliSens Rubella virus-FL reagent kit. 1–8 — rubella vaccine batches; MMP II® — measles, mumps and rubella vaccine produced by MSD; Приорикс® — measles, mumps and rubella vaccine produced by GlaxoSmithKline; СОП № 1 — in-house reference standard of rubella virus activity; ПВ — mumps vaccine; KB — measles vaccine; OKO — negative control sample; ВКО — internal control sample; ПКО 1 — positive control sample at the isolation step; ПКО 2 — positive control sample at the amplification step; ОСО — industry reference standard.

* Пороговый цикл не определяется.

кори, паротита и краснухи MMP II® и Приорикс®, а также образцы ОСО 42-28-426-2013 активности вакцины против краснухи и СОП № 1 активности вируса краснухи.

Для подтверждения специфичности метода параллельно с образцами вакцины против краснухи исследовали по одной серии вакцины против кори и паротита.

Программирование амплификатора проводили в соответствии с инструкцией к набору (табл. 2).

В наборе РеалБест РНК Rubella предусмотрены контрольные образцы — OKO, ПКO, ВКО, необходимые для оценки приемлемости результатов, только на этапе выделения. Значение Ct исследуемых образцов не должно превышать значения порогового цикла, равного 40, указанного в инструкции к набору.

Таблица 2. Программа амплификации набора РеалБест РНК Rubella, комплект 1
Table 2. Amplification step using RealBest RNA Rubella reagent kit, set 1

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Удержание температуры	45	30 мин	-	1
Денатурация	94	1 мин	-	1
Денатурация	94	10 с	-	50
Элонгация	60	20 с	FAM — для ВКО, JOE — для РНК вируса краснухи	

Примечание. FAM, JOE — каналы детекции результатов амплификации, ВКО — внутренний контрольный образец.

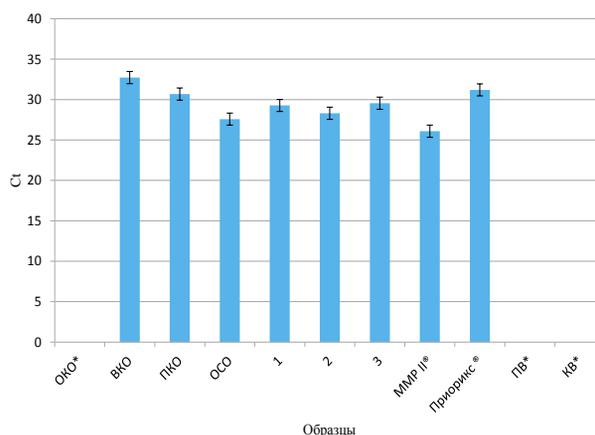


Рис. 2. Средние значения Ct исследованных образцов при использовании набора реагентов «РеалБест РНК Rubella». 1, 2, 3 — серии вакцины против краснухи; MMP II® — вакцина против кори, паротита и краснухи производства MSD; Приорикс® — вакцина против кори, паротита и краснухи производства GSK; ПВ — паротитная вакцина; KB — коревая вакцина; OKO — отрицательный контрольный образец; ВКО — внутренний контрольный образец; ПКO — положительный контрольный образец; ОСО — отраслевой стандартный образец.

* Пороговый цикл не определяется.

Fig. 2. Average threshold cycle values of the samples tested using Realbest RNA Rubella reagent kit. 1, 2, 3 — rubella vaccine batches; MMP II® — measles, mumps and rubella vaccine produced by MSD; Приорикс® — measles, mumps and rubella vaccine produced by GlaxoSmithKline; ПВ — mumps vaccine; KB — measles vaccine; OKO — negative control sample; ВКО — internal control sample; ПКO — positive control sample; ОСО — industry reference standard.

* The threshold cycle is not detected.

Отсутствие положительного сигнала в OKO свидетельствует об отсутствии контаминации в исследуемых образцах на этапе выделения. Значение порогового цикла меньше 40 свидетельствует о наличии специфического участка. В ходе эксперимента ВКО добавляли на этапе выделения во все исследуемые пробы, значения порогового цикла для ВКО суммировали и вычисляли среднее значение ($Ct_{ВКО_{cp}}$), исключая из анализа образцы, значения Ct которых отличались больше чем на 2 цикла от $Ct_{ВКО_{cp}}$. На рисунке 2 представлены средние значения Ct исследованных образцов. Полученные результаты соответствовали требованиям инструкции к набору и свидетельствовали о правильности проведения реакции.

Как видно на рисунке 2, для большинства исследуемых образцов Ct находился в диапазоне от 25 до 35, что свидетельствовало о возможности использования набора для выявления РНК вируса краснухи в вакцинах против краснухи.

Параллельно с образцами вакцины против краснухи были исследованы образцы коревой и паротитной вакцин. В образ-

цах вакцин против кори и паротита, так же как в отрицательном контрольном образце, пороговый цикл не определялся.

Таким образом, положительный сигнал в образцах вакцин против краснухи показал наличие РНК искомого вируса в исследуемых образцах и отсутствие его в вакцинах против кори и паротита.

3. Набор реагентов Rubella Virus Real Time RT-PCR Kit производства Liferiver. С помощью этого набора были исследованы 3 серии отечественной вакцины против краснухи (АО «НПО «Микроген» Минздрава России), 2 серии ММР II® и Приорикс®, и образцы СОС 42-28-426-2013 активности вакцины против краснухи.

Для подтверждения специфичности метода параллельно с образцами вакцины против краснухи исследовали по одной серии вакцины против кори и паротита (табл. 3).

В наборе Rubella Virus Real Time RT-PCR Kit, так же как и в наборе РеалБест РНК Rubella, предусмотрены контрольные образцы ОК0, ВКО, ПК0, необходимые для оценки приемлемости результатов, только на этапе амплификации. Отсутствие положительного сигнала в отрицательном контрольном образце свидетельствовало об отсутствии контаминации в исследуемых образцах; значение порогового цикла в положительном образце меньше 35 свидетельствовало о наличии специфического участка. Внутренний контрольный образец добавляли на этапе амплификации во все исследуемые пробы, значение порогового цикла для ВКО должно находиться в диапазоне 25–35. Полученные результаты соответствовали требованиям инструкции к набору и свидетельствовали о правильности проведения реакции. На рисунке 3 представлены средние величины значений порогового цикла исследованных образцов.

Как видно на рисунке 3, для всех исследуемых образцов, кроме ПВ и КВ, пороговый цикл находился в диапазоне от 15 до 20.

Одновременно с образцами вакцины против краснухи были исследованы образцы вакцин против кори и паротита, в которых так же, как в отрицательных контрольных образцах, пороговый цикл не определялся, следовательно, специфические участки для отжига праймеров, предназначенных для РНК вируса краснухи, в образцах этих вакцин отсутствовали.

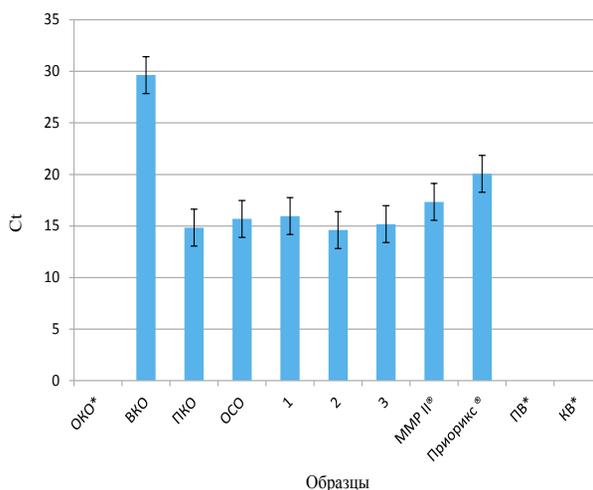


Рис. 3. Средние значения порогового цикла исследованных образцов при использовании набора реагентов Rubella Virus Real Time RT-PCR Kit: 1, 2, 3 — серии вакцины против краснухи; ММР II® — вакцина против кори, паротита и краснухи производства MSD; Приорикс® — вакцина против кори, паротита и краснухи производства GSK; ПВ — паротитная вакцина; КВ — коревая вакцина; ОК0 — отрицательный контрольный образец; ВКО — внутренний контрольный образец; ПК0 — положительный контрольный образец; СОС — отраслевой стандартный образец.

* Пороговый цикл не определяется.

Fig. 3. Average threshold cycle values of the samples tested using Rubella Virus Real Time RT-PCR Kit. 1, 2, 3 — rubella vaccine batches; ММР II® — measles, mumps and rubella vaccine produced by MSD; Приорикс® — measles, mumps and rubella vaccine produced by GlaxoSmithKline; ПВ — mumps vaccine; КВ — measles vaccine; ОК0 — negative control sample; ВКО — internal control sample; ПК0 — positive control sample; СОС — industry reference standard.

* The threshold cycle is not detected.

Таблица 3. Программа амплификации набора Rubella Virus Real Time RT-PCR Kit производства Liferiver
Table 3. Amplification step using Rubella Virus Real Time RT-PCR Kit produced by Liferiver

Этап	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
Удержание температуры	45	10 мин	-	1
Денатурация	95	15 мин	-	1
Денатурация	94	15 с	-	40
Элонгация	60	1 мин	FAM — для ВКО, JOE — для РНК вируса краснухи	

Примечание. FAM, JOE — каналы детекции результатов амплификации, ВКО — внутренний контрольный образец.

Таблица 4. Оценка порогового цикла при исследовании СОС активности вакцины против краснухи наборами реагентов различных производителей

Table 4. Threshold cycle values detected during evaluation of the industry reference standard of rubella vaccine activity using reagent kits by different manufacturers

Статистический показатель оценки порогового цикла	Значение порогового цикла		
	АмплиСенс® Rubella virus-FL	РеалБест РНК Rubella	Rubella Virus Real Time RT-PCR Kit
Среднее арифметическое значение	18,6 (n = 10)	27,6 (n = 8)	15,7 (n = 5)
Стандартное отклонение	0,10	0,78	0,42
Коэффициент вариации, %	0,53	2,85	2,66

Примечание. n — количество испытаний.

Так же как и отечественные наборы для выявления вируса краснухи в клиническом материале, коммерческий набор производства Liferiver выявляет РНК вируса краснухи в образцах исследованных вакцин с краснушным компонентом.

Для оценки приемлемости результатов идентификации вируса краснухи в исследуемых профилактических препаратах с помощью указанных трех наборов реагентов для ПЦР исследовали образцы ОСО активности вакцины против краснухи (ОСО 42-28-426-2013) с аттестованным значением активности. Результаты представлены в таблице 4.

Из данных, представленных в таблице 4, видно, что применительно к набору реагентов одного производителя стандартное отклонение значения C_t не превышает 1 цикл, что позволяет использовать ОСО 42-28-426-2013 для оценки приемлемости результатов испытаний вакцины против краснухи по показателю «Подлинность».

II. Исследование вакцин против паротита

Отечественных коммерческих наборов для выявления РНК вируса паротита, зарегистрированных в Российской Федерации, нет. В связи с этим в работе использован набор реагентов для выявления РНК вируса паротита в клинических образцах производства Liferiver. С помощью этого набора были исследованы 5 серий отечественной паротитной вакцины.

Набор Mumps Virus Real Time RT-PCR Kit не отличается по условиям проведения реакции (табл. 3) и компонентам коммерческого набора от Rubella Virus Real Time RT-PCR Kit. В наборе также предусмотрены контрольные образцы на этапе амплификации. Значение C_t исследуемых образцов не должно превышать значения порогового цикла (C_t — менее 35), указанного во вкладыше к набору, на этапе амплификации. Требования к C_t в ОКО, ПКО и ВКО аналогичны требованиям к контрольным образцам для набора Rubella Virus Real Time RT-PCR Kit. На рисунке 4 представлены средние величины значений порогового цикла исследованных образцов.

Как видно на рисунке 4, для всех исследуемых образцов пороговый цикл находился в диапазоне от 15 до 20.

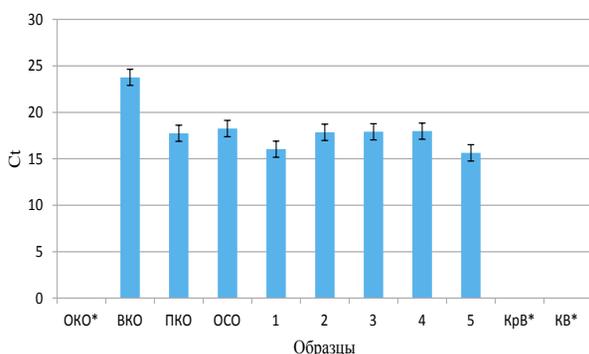


Рис. 4. Средние величины значений порогового цикла исследованных образцов при использовании набора реагентов Mumps Virus Real Time RT-PCR Kit: 1–5 — серии паротитной вакцины; КрВ — вакцина против краснухи; КВ — коревая вакцина; ОКО — отрицательный контрольный образец; ВКО — внутренний контрольный образец; ПКО — положительный контрольный образец; ОСО — отраслевой стандартный образец.

* Пороговый цикл не определяется.

Fig. 4. Average threshold cycle values of the samples tested using Mumps Virus Real Time RT-PCR Kit. 1–5 — mumps vaccine batches; КрВ — rubella vaccine; КВ — measles vaccine; ОКО — negative control sample; ВКО — internal control sample; ПКО — positive control sample; ОСО — industry reference standard.

* The threshold cycle is not detected.

Параллельно с образцами вакцины против паротита была проведена амплификация образцов вакцин против краснухи и против кори. В указанных образцах, так же как в отрицательных контрольных образцах, пороговый цикл не определялся, что свидетельствовало о специфичности набора Mumps Virus Real Time RT-PCR Kit.

Для оценки приемлемости результатов определения вируса паротита в исследуемых профилактических препаратах с помощью указанного набора реагентов исследовали образцы ОСО активности живой паротитной вакцины (ОСО 42-28-348-2016) с аттестованным значением активности. Результаты представлены в таблице 5.

Из данных таблицы 5 видно, что применительно к набору реагентов производителя колебания значения порогового цикла не превышают 1 цикл, что позволяет использовать ОСО 42-28-348-2016 для оценки приемлемости результатов испытаний вакцины против краснухи по показателю «Подлинность».

III. Исследование вакцин против кори

Отечественные коммерческие наборы для выявления РНК вируса кори в клиническом материале в России отсутствуют, поэтому в работе был использован набор реагентов Measles Virus Real Time RT-PCR Kit для выявления РНК вируса кори в клинических образцах производства Liferiver. С помощью этого набора были исследованы 4 серии отечественной коревой вакцины, 2 серии паротитно-коревой вакцины, 2 серии комбинированной вакцины против кори, паротита и краснухи Приорикс® и 1 серия MMP II®.

Набор Measles Virus Real Time RT-PCR Kit не отличается по условиям постановки реакции (табл. 3), компонентам набора и критериям оценки приемлемости результатов от коммерческих наборов Rubella Virus Real Time RT-PCR Kit и Mumps Virus Real Time RT-PCR Kit. На рисунке 5 представлены средние величины значений порогового цикла исследованных образцов.

Как видно на рисунке 5, для всех исследуемых образцов пороговый цикл находился в диапазоне от 10 до 20.

Вместе с образцами вакцины против кори были исследованы образцы вакцин против паротита и краснухи. В последних так же, как в отрицательных контрольных образцах, пороговый цикл не определялся. Таким образом, положительный сигнал в образцах вакцин против кори показал наличие РНК искомого вируса в исследуемых образцах и отсутствие его в вакцинах против паротита и краснухи.

Для оценки приемлемости результатов идентификации вируса паротита в исследуемых профилактических препаратах с помощью указанного набора реагентов для ПЦР исследовали образцы ОСО активности живой коревой вакцины (ОСО 42-28-347-2013) с аттестованным значением активности. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 5. Оценка порогового цикла при исследовании ОСО активности живой паротитной вакцины набором реагентов зарубежного производителя

Table 5. Threshold cycle values detected during evaluation of the industry reference standard of live mumps vaccine activity using foreign-made reagent kits

Статистический показатель оценки порогового цикла	Значение порогового цикла
Среднее арифметическое значение	18,2 ($n = 11$)
Стандартное отклонение	0,63
Коэффициент вариации, %	3,49

Примечание. n — количество испытаний.

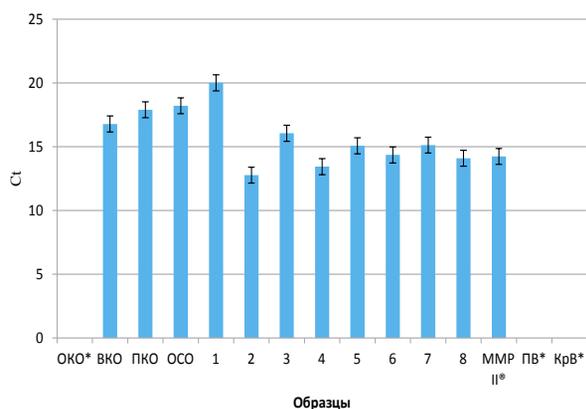


Рис. 5. Средние величины значений порогового цикла исследованных образцов при использовании набора реагентов Measles Virus Real Time RT-PCR Kit: 1–4 — серии коревой вакцины; 5, 6 — серии паротитно-коревой вакцины; 7, 8 — серии комбинированной вакцины против кори, паротита и краснухи Приорикс®; MMR II® — вакцина против кори, паротита и краснухи производства MSD; PB — паротитная вакцина; KpB — вакцина против краснухи; OKO — отрицательный контрольный образец; BKO — внутренний контрольный образец; PKO — положительный контрольный образец; OCO — отраслевой стандартный образец.

* Пороговый цикл не определяется.

Fig. 5. Average threshold cycle values of the samples tested using Measles Virus Real Time RT-PCR Kit. 1–4 — measles vaccine batches; 5, 6 — mumps and measles vaccine batches; 7, 8 — batches of Priorix® combination measles, mumps and rubella vaccine; MMR II® — measles, mumps and rubella vaccine produced by MSD; PB — mumps vaccine; KpB — rubella vaccine; OKO — negative control sample; BKO — internal control sample; PKO — positive control sample; OCO — industry reference standard.

* The threshold cycle is not detected.

Таблица 6. Оценка порогового цикла при исследовании OCO активности живой коревой вакцины набором реагентов зарубежного производителя

Table 6. Threshold cycle values detected during evaluation of the industry reference standard of live measles vaccine activity using foreign-made reagent kits

Статистические показатели оценки порогового цикла	Значение порогового цикла
Среднее арифметическое значение	13,2 (n = 5)
Стандартное отклонение	0,49
Коэффициент вариации, %	3,76

Примечание. n — количество испытаний.

Из данных таблицы 6 видно, что применительно к набору реагентов производителя колебания значения порогового цикла не превышают 1 цикл, что позволяет использовать OCO 42-28-347-2013 для оценки приемлемости результатов испытаний вакцины против краснухи по показателю «Подлинность».

В ходе работы показана возможность выявления нуклеиновых кислот вирусов кори, паротита и краснухи во всех исследованных вакцинах с помощью примененных наборов реагентов.

Диагностические наборы реагентов АмплиСенс® Rubella virus-FL, РеалБест РНК Rubella и Rubella Virus Real Time RT-PCR Kit, предназначенные для выявления РНК вируса краснухи в клиническом материале, были использованы впервые для определения подлинности моно- и ассоциированных вакцин с краснушным компонентом отечественного и зарубежного производства.

Показана специфичность указанных наборов и возможность применения этих наборов для подтверждения подлинности вируса краснухи во всех исследованных вакцинах.

Коммерческие наборы реагентов для диагностики кори и паротита с помощью ОТ-ПЦР отечественного производства отсутствуют. В связи с этим для дальнейшего исследования были взяты наборы производства «Liferiver» для выявления РНК вирусов в клиническом материале. Показано, что изучавшиеся наборы реагентов Measles Virus Real Time RT-PCR Kit и Mumps Virus Real Time RT-PCR Kit позволяют выявлять РНК вирусов кори и паротита в вакцинах.

Для оценки приемлемости результатов идентификации вируса кори, паротита и краснухи в вакцинах с помощью указанных наборов реагентов исследовали неразведенные образцы OCO 42-28-426-2013 активности вакцины против краснухи, OCO 42-28-348-2016 активности живой паротитной вакцины, OCO 42-28-347-2013 активности живой коревой вакцины. При многократном испытании стандартных образцов показана воспроизводимость значений порогового цикла в пределах каждого набора реагентов, что свидетельствует о возможности использования OCO активности вирусов кори, паротита и краснухи для оценки приемлемости результатов при определении подлинности вакцин методом ОТ-ПЦР.

Заключение

1. Все изучавшиеся коммерческие диагностические наборы реагентов для ОТ-ПЦР в режиме реального времени, предназначенные для выявления РНК вирусов кори, паротита и краснухи в клиническом материале, позволяют выявлять РНК указанных вирусов в соответствующих вакцинах.

2. При многократном испытании отраслевых стандартных образцов активности живых коревой, паротитной вакцин и вакцины против краснухи показана возможность их использования для оценки приемлемости результатов определения подлинности вакцин методом ОТ-ПЦР.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-000-23-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

Acknowledgments. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-000-23-18-02 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590046-9).

Информация об отсутствии конфликта интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература / References

1. Мовсесянц АА, Бондарев ВП, Олефир ЮВ, Меркулов ВА, Шимчук ЛФ. Стандарты качества иммунобиологических лекарственных препаратов — новое в Государственной фармакопее Российской Федерации. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения.* 2016;(2):38–41. [Movsesyants AA, Bondarev VP, Olefir YV, Merkulov VA, Shimchuk LF. Quality Standards for Immunobiological Medicinal Products — New Texts in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products.* 2016;(2):38–41 (In Russ.)]

2. Забияка ЮИ, Файзулоев ЕБ, Борисова ТК, Никонова АА, Зверев ВВ. Экспресс-метод оценки титра вируса краснухи в вирусосодержащей жидкости с помощью ПЦР-РВ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2010;(5):57–62. [Zabiyaka YI, Faizuloev EB, Borisova TK, Nikonova AA, Zverev VV. Quick Test for Measurement of Rubella Virus Titer in Virus-Containing Fluid Using RT-PCR. *Zhurnal mikrobiologii, ehpideologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2010;(5):57–62 (In Russ.)]
3. Аммури ЮИ, Борисова ТК, Файзулоев ЕБ, Зверев ВВ. Количественное определение вирусов кори, эпидемическо-

го паротита и краснухи в вирусосодержащих жидкостях на основе ПЦР с детекцией в режиме реального времени. В кн.: *Материалы конференций молодых ученых*. Киров: Международный центр научно-исследовательских проектов; 2013. С. 8–26. [Ammur YI, Borisova TK, Faizuloev EB, Zverev VV. The quantitative determination of measles, mumps and rubella in virus-containing fluids by RT-PCR. In: *Materials of conferences of young scientists*. Kirov: International center for research projects; 2013. P. 8–26 (In Russ.)]

4. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика; 1998. [Glantz S. *Primer of Biostatistics*. Moscow: Praktika; 1998 (In Russ.)]

Об авторах

Бинятова Анна Станиславовна, эксперт 2 категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-3011-2030>

Мыца Елена Дмитриевна, канд. биол. наук, эксперт 1 категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-1253-0650>

Чертова Наталия Вячеславовна, эксперт 2 категории лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9279-9408>

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук, начальник лаборатории молекулярно-биологических и генетических методов испытаний Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

Саркисян Каринэ Арташесовна, канд. мед. наук, начальник лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0445-7086>

Ильясова Татьяна Николаевна, эксперт 1 категории лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-0905-3630>

Юнаслова Татьяна Николаевна, канд. биол. наук, главный эксперт лаборатории вирусных вакцин Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1606-942X>

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, профессор, начальник Испытательного центра экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, профессор, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, профессор кафедры фармакологии ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И. М. Сеченова» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Поступила 24.05.2018
После доработки 09.11.2018
Принята к публикации 15.11.2018

Authors

Anna S. Binyatova, 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-3011-2030>

Elena D. Mytsa, Candidate of Biological Sciences, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-1253-0650>

Natalya V. Chertova, 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-9279-9408>

Rauza A. Volkova, Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Biology and Genetic Test Methods of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

Karine A. Sarkisyan, Candidate of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-0445-7086>

Tatyana N. Ilyasova, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-0905-3630>

Tatyana N. Yunasova, Candidate of Biological Sciences, Chief Expert of the Laboratory of Viral Vaccines of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1606-942X>

Artashes A. Movsesyants, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Immunobiological Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Vadim A. Merkulov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Deputy General Director for Medicinal Products Evaluation of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products; Professor of the Department of Pharmacology of I. M. Sechenov First MSMU, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Received 24 May 2018
Revised 9 November 2018
Accepted 15 November 2018