

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Марданлы С.Г.^{1,2}, Вилисова А.Н.¹, Ермолаев И.И.^{1,2}

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ СИСТЕМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПАРАФИНА ДЛЯ ПЦР

¹АО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия;

²ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГГТУ»), 142611, г. Орехово-Зуево, Россия

Классические наборы для выявления инфекционных заболеваний методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), как правило, требуют проведения нескольких манипуляций: начиная от внесения самого образца в каждую пробирку, до раскапывания и приготовления реакционной смеси, с их последующим добавлением к образцу. Проведения всех этих этапов удлиняет работу работников лабораторий и увеличивает время выдачи результатов. В данном исследовании для наборов ПЦР был внедрен метод разделения смеси с помощью высокоочищенного парафина. Используя этот метод, все компоненты были предварительно разделены в виде "сэндвича", к которым можно добавить сразу образец. Поскольку такое разделение не требует дополнительных процедур, рабочие этапы при подготовке к постановке в прибор упрощены, что уменьшает ошибки дозирования реакционной смеси. В ходе исследования было протестировано несколько различных комбинаций как самого чистого парафина и воска в пастиллах EMPROVE® ESSENTIAL, так и их смесей с другими веществами. Проведено доказательное сравнение работоспособности и валидация системы композиции парафина с TWEEN® 85 по сравнению с классической подготовкой ПЦР перед постановкой в прибор, а также сравнение разрабатываемой композиции относительно очищенного воска Chill-out™ Liquid Wax. Кроме того, 2 смеси с парафином, используемые для обнаружения различных мишеней рибонуклеиновой кислоты (РНК) и дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) оказались стабильными при температуре хранения при -20 °С. Периоды оценки смесей с парафином для ПЦР проводились с периодичностью 3 раза в неделю в течение четырех месяцев. По результатам данных, полученных в ходе проводимых разработок, доказана возможность использования разработанной композиции парафина с TWEEN® 85. Это исследование и его результаты важны для развития молекулярной диагностики и использования данной системы, как в крупных лабораториях, так и в лабораториях с небольшой загруженностью.

Ключевые слова: парафин; воск; композиция парафина; график амплификации; стабильность; валидация

Для цитирования: Марданлы С.Г., Вилисова А.Н., Ермолаев И.И. Разработка и валидация высокоэффективной системы с использованием парафина для ПЦР. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (4):159-168.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-4-159-168>

Для корреспонденции: Вилисова Анна Николаевна, старший микробиолог научно-производственного отдела ПЦР АО «ЭКОлаб»; e-mail: 4101500@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование финансировалось АО "ЭКОлаб".

Благодарность. Авторы выражают благодарность компании АО «ЭКОлаб», предоставившей оборудование для исследования и оказанной финансовой поддержке.

Поступила	21.02.2024
Принята к печати	12.03.2024
Опубликовано	26.03.2024

Mardanly S.G.^{1,2}, Vilisova A.N.¹, Ermolaev I.I.^{1,2}

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HIGH-PERFORMANCE PARAFFIN-EMBEDDED SYSTEM FOR PCR

¹JSC «EKOLab», 142530, Elektrogosk, Russia;

²State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia

Classic kits for detection of infectious diseases by polymerase chain reaction (PCR) usually require several manipulations: from pipetting the sample itself into each tube, to the introduction and preparation of the reaction mixture, and their subsequent addition to the sample. Carrying out all these steps lengthens the work of laboratory staff and increases the time it takes to issue results. In this study, a method of mixture separation using highly purified paraffin wax was implemented for PCR kits. Using this method, all components were pre-separated as a "sandwich" to which the sample can be added at once. Since this separation does not require additional procedures, the work steps in preparation for staging in the device are simplified, reducing the dosing errors of the reaction mixture. Several different combinations of both the purest paraffin and wax in EMPROVE® ESSENTIAL pastilles and their mixtures with other substances were tested. A proof-of-concept comparison of the performance and validation of the paraffin wax composition system with TWEEN® 85 versus the classical PCR preparation prior to staging in the instrument was performed, as well as a comparison of the developed composition relative to purified Chill-out™ Liquid Wax. In addition, 2 paraffin wax mixtures used for the detection of different targets (ribonucleic acid (RNA) and deoxyribonucleic acid (DNA)) were shown to be stable at storage temperatures of -20 °C. Evaluation periods of the paraffin-embedded PCR mixtures were carried out at a frequency of 3 times per week for four months. Based on the results of the data obtained from the ongoing development work, the feasibility of the developed paraffin wax composition with TWEEN® 85 was proven. This study and its results are important for the development of molecular diagnostics and the use of this

system both in large laboratories and in laboratories with small workloads.

Key words: paraffin; wax; paraffin composition; amplification schedule; stability; validation

For citation: Mardanly S.G., Vilisova A.N., Ermolaev I.I. Development and validation of a high-performance paraffin-embedded system for PCR. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (4): 159-168 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-4-159-168>

For correspondence: Vilisova Anna Nikolaevna, senior microbiologist of the Innovative Development Department PCR JSC «EKOLab»; e-mail: 4101500@mail.ru

Information about authors:

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>;

Vilisova A.N., <https://orcid.org/0000-0002-8812-3165>;

Ermolaev I.I., <https://orcid.org/0000-0003-0982-3970>.

Conflict of interests. The authors declare the absence of conflict of interests.

Funding. The study was funded by JSC «EKOLab».

Acknowledgments. The authors are grateful to the company JSC "EKOLab", which provided equipment for the study and financial support.

Received 21.02.2024

Accepted 12.03.2024

Published 26.03.2024

Введение. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) - одна из самых передовых технологий в молекулярной биологии. С помощью ПЦР специфические последовательности в шаблоне ДНК/РНК или комплементарной кДНК могут быть скопированы, или "амплифицированы", от тысячи до миллиона раз с использованием специфических для последовательностей олигонуклеотидов, термостабильной ДНК-полимеразы и термоциклирования [1,2]. В традиционной ПЦР обнаружение и качественная/количественная оценка амплифицированной последовательности осуществляется в конце реакции после последнего цикла ПЦР и включает в себя анализ, такой как гель-электрофорез. В качественной и количественной ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) продукт ПЦР измеряется в каждом цикле [3,4]. Контролируя реакцию на этапе экспоненциальной амплификации, пользователи могут с высокой точностью определить исходное количество целевого продукта. В настоящее время ПЦР с конечной точкой используется в основном для амплификации специфической ДНК для секвенирования, клонирования и использования в других методах молекулярной биологии.

При ПЦР тестируемый образец, предположительно содержащий одну или несколько целевых последовательностей нуклеиновых кислот, объединяют в общем объеме обычно около 20-200 мкл со следующими реагентами: водно-солевой буфер с pH 8-9, который обычно также содержит приблизительно 0,05 М KCl, четыре распространенных нуклеозидтрифосфата (например, для ДНК-полимеразы dNTP: dATP, dTTP, dCTP и dGTP) в концентрациях примерно 10^{-5} М до 10^{-3} М, также обычно соединения магния $MgCl_2$, полимеразы, предпочтительно термостабильная ДНК-полимераза *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза) в концентрации от 10^{-10} до 10^{-8} М; и одноцепочечные олигонуклеотидные праймеры, обычно длиной от 15 до 30 нуклеотидов [5].

Практические преимущества ПЦР-амплификации нуклеиновых кислот оценены, и в настоящее время используются в областях генетики, молекулярной биологии, клеточной биологии, клинической химии,

судебной медицины и аналитической биохимии. Несмотря на быстрое и широкое внедрение ПЦР оно по-прежнему обладает рядом практических ограничений, которые необходимо решить для полной реализации потенциала процесса.

Одним из таких ограничений является невозможность смешивания буферной смеси, праймеров и других компонентов вместе в большие объемы, а также аликвотирование их готовой смеси в небольшие реакционные пробирки (обычно объемом от 0,5 до 1 мл, в некоторых случаях больше) и хранения в течение длительного периода между приготовлением и использованием без потери эффективности амплификации. В этом случае при дальнейшем хранении смеси наблюдается уменьшение работоспособности данной смеси праймеров с буфером. Наблюдаемый эффект скорее всего связан с разрушением зонда в щелочной среде буфера при длительном хранении.

Ранее используемая методика в области ПЦР требовала нанесения на одну из частей реакционной смеси минерального масла, которое препятствовало испарению растворителя во время проводимой реакции [6]. Однако покрытие минеральным маслом создает несколько практических проблем:

- замедление термического равновесия во время термоциклирования (из-за значительной теплоемкости масляного слоя), что увеличивает общее время цикла;

- случайное попадание из некоторых партий минерального масла примесей, которые, могут препятствовать ПЦР, что может привести к увеличению продолжительности цикла.

Поскольку могут наблюдаться нежелательные эффекты, указанные нами выше, в том числе при отсутствии термоциклирования и в отсутствии ДНК-мишени, то достижение разделения по крайней мере одного реагента от других таким образом, чтобы все реагенты не соединялись до первого цикла амплификации, может существенно уменьшить влияние негативных эффектов и, таким образом может значительно продлить срок хранения смеси реагентов без существенного усложнения самой ПЦР.

Учитывая опыт с использованием чистого минерального масла, приведённый в научной литературе, в статье приводятся несколько отличных модификаций методики ПЦР и материалов, а именно, использование в качестве альтернативы композиций с парафином.

Использование парафина обеспечивает особенно эффективный способ разделения реагентов, являясь альтернативой покрытию минеральным маслом. Нагревание в приборе способствует превращению твердого барьера в жидкость, плотность которой легче воды, тем самым вытесняя расположенный выше водный слой. Следовательно, реагенты, предварительно разделенные, смешиваются для проведения полной реакции с помощью значительной тепловой конвекции, которая сопровождает нагрев реакционной пробирки.

На современном рынке присутствует множество как отечественных, так и иностранных компаний, которые могут предложить готовое решение для конечных пользователей, особенно это актуально для лабораторий с высоким потоком, где оптимизация процесса существенно облегчит работу сотрудникам и ускорит выдачу результатов [7].

Цель - разработка и валидация высокоэффективной системы с использованием парафина в ПЦР для диагностики выделенных нуклеиновых кислот из клинического материала.

Материал и методы. При разработке системы было использовано в общей сложности 44 образца (по 22 образца на каждую инфекцию), предоставленные ООО «ИНВИТРО-Объединенные коммуникации» (Москва). Полученные образцы представляют собой 44 положительных образца охарактеризованные по наборам: «ГепаЭК В», «ГепаЭК С» компании АО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск). Все образцы хранились при температуре -20°C .

При проведении исследования для защиты от контаминации и согласно правилам проведения ПЦР использовались наконечники, с маркировкой «RNase-free / DNase-free».

При разработке набора были использованы реактивы:

- Парафиновый воск, номер CAS: 8002-74-2;
- Минеральное масло, номер CAS: 8042-47-5;
- Chill-out™ Liquid Wax for PCR Tubes and Plates, 100 ml, Каталожный № CHO1404;
- TWEEN® 85, номер CAS: 9005-70-3;
- Белый воск в пастилах EMPROVE® ESSENTIAL, номер CAS: 8012-89-3.

Дальнейшая амплификация и детекция готовых смесей с парафином после добавления к нему образцов проводилась с помощью термоциклера Bio-Rad CFX 96, ФСЗ 2008/03399, производитель «Bio-Rad Laboratories, Inc.» (США).

Результаты и обсуждение. Разработка системы началась с изменения способа смешивания реагентов ПЦР до запуска ферментативной реакции. Для достижения этого были использованы как сами чистые компоненты - воск в пастилах EMPROVE® ESSENTIAL, парафиновый воск, так и их композиции на основе минерального масла и TWEEN® 85. Использование таких компонентов в чистом виде и их смесей позволяет отложить смешивание реагентов до первого этапа нагревания ПЦР-амплификации, тем самым уменьшая

ферментативное образование неспецифических продуктов, которое происходит, когда полная смесь ПЦР-реагентов, с образцом или без него, стоит при комнатной температуре или ниже.

Проверка использования чистых компонентов.

В процессе создания системы, которая обеспечила бы разделение смеси жидкостей без последующего их смешения, экспериментально были протестированы чистые компоненты: воск в пастилах EMPROVE® ESSENTIAL и парафиновый воск.

Первым этапом было проведение растапливания каждого реагента на термощейкере для микропробирок и ПЦР планшетов TS-100 (SIA «Biosan», Латвия). В соответствии с сертификатом анализа, поставляемом вместе с реагентами, каждый компонент имеет свою температуру плавления. Полученные растопленные компоненты путем раскапывания автоматической пипеткой вносились в стрипы для последующего разделения реакционной смеси (праймеры и буфер). Однако использование чистых компонентов по результатам наблюдений не представляется удобным по некоторым факторам. Во-первых, растопленный парафиновый воск (температура плавления $56 - 58^{\circ}\text{C}$) и воск в пастилах EMPROVE® ESSENTIAL (температура плавления $61 - 66^{\circ}\text{C}$) имеют очень тягучую консистенцию, усложняющую их отбор и дозирование. Во-вторых, после отбора компонентов наблюдается быстрое их застывание в кончиках пипеток, что делает невозможным их раскапывание в пробирки.

Увеличение температуры плавления была повышена и рассматривалась в диапазоне от 80°C до 95°C , выше указанных в сертификате качества, что позволило частично нивелировать проблему моментального застывания в кончиках наконечников объемом от 100 мкл. Дозирование воскового компонента при температуре 80°C , сделало возможным дозирование в пробирки восковых компонентов, однако при этом всё равно наблюдалась сложность в раскапывании для получения ожидаемого кольца.

После полученных экспериментальных результатов на чистой воде, которая заменяла нижний слой праймеров, и верхний слой буфер, было приготовлено 2 смеси в пробирках 0,2 мл с праймером и буфером для качественного определения вируса гепатита В (ВГВ) и вируса гепатита С (ВГС). Полученные пробирки с внесённым восковым компонентом после приготовления хранились при $+6^{\circ}\text{C}$, $+25^{\circ}\text{C}$ и -20°C в течение недели, после чего исследовались методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на одном образце для ВГС и ВГВ (рис. 1, а, б).

По результатам полученных данных можно сказать, что использование чистых компонентов нецелесообразно, поскольку возникает ряд проблем, описанных выше, а так же, как видно на рис. 1, данные композиции являются нерабочими, скорее всего по причине смешивания реагентов между собой вследствие неполного покрытия слоем воска поверхности реагентов. Такие выводы были сделаны после недельного хранения при температурах, указанных выше. Отмечая вышеназванные параметры, дальнейшая работа была направлена на возможность замены чистых восковых компонентов их композиций с другими веществами.

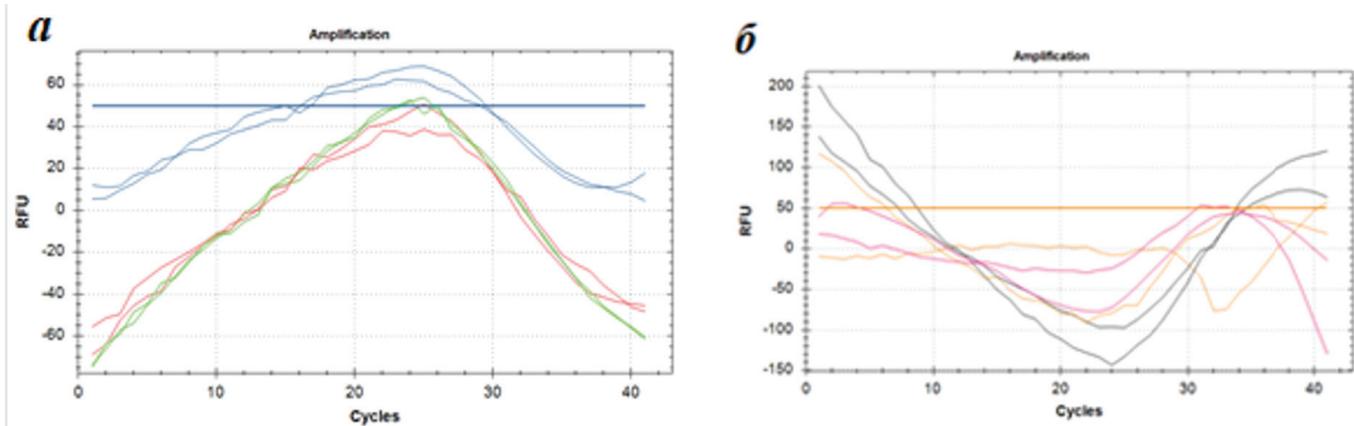


Рис. 1. Результаты сравнения вариантов под восковой композицией ВГС и ВГБ.

По оси абсцисс – количество циклов (Cycles), по оси ординат – уровень флуоресценции (RFU).

a – результат детекции ВГС под воском в пастилах EMPROVE® ESSENTIAL при хранении: красный цвет – хранение при +6 °С, зеленый цвет – хранение при +25 °С, синяя кривая - хранение при -20 °С; *б* – результат детекции ВГБ под парафиновым воском при хранении: оранжевый цвет - при хранении +6 °С, черный цвет +25 °С, розовый цвет – хранение при -20 °С.

Подбор композиций с использованием чистых компонентов. Первым этапом при разработке являлась замена чистого воска и парафина на их композиции с минеральным маслом для размягчения парафина и воска (для удобства дозирования) и достижения полного покрытия водного раствора набора ПЦР-реагентов ("предварительная смесь"), не беспокоясь

о том, что достаточно трудное раскапывание, хоть и нагретого до температуры 80 °С густого чистого воска, может привести к перемешиванию реагентов до начала термоциклирования ввиду образования между ними пор.

В ходе исследования были подобраны композиции, представленные в табл. 1.

Таблица 1

Композиции парафинового воска

Варианты композиций	
Парафиновый воск + Минеральное масло	Воск EMPROVE® ESSENTIAL + Минеральное масло

Все указанные в табл. 1 композиции были приготовлены м/об способом, где по массе брался парафиновый воск и воск EMPROVE® ESSENTIAL, по объему минеральное масло для получения следующих концентраций: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 %. Из всех, проверенных нами концентраций в композиции веществ, выбор был остановлен на использовании 75 % и 80 % парафино-

вого воска с минеральным маслом. Также давление на микропипетку, необходимое для раскапывания парафина в концентрациях ниже 75 % и 80 %, часто приводило к внезапному разбрызгиванию разносимого материала, потенциально увеличивая риск неравномерного покрытия водным слоем и образования пор. Выбранные концентрации в композиции были проверены на образцах ВГБ и ВГС (рис. 2).

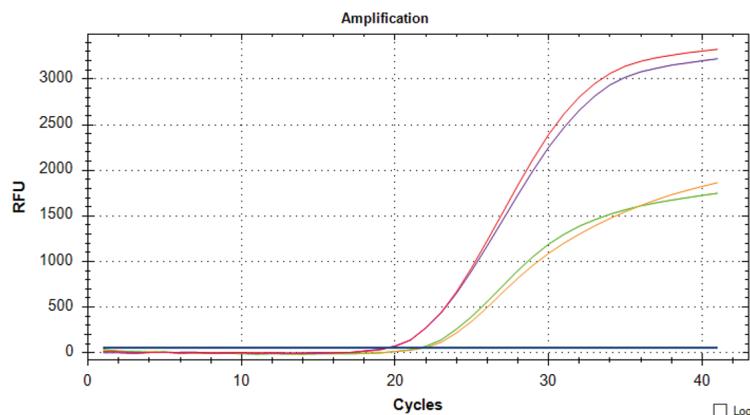


Рис. 2. График амплификации ВГС и ВГБ в композиции парафина с минеральным маслом.

Красный цвет - ВГС с 75 % парафином, фиолетовый цвет – ВГС с 75 % парафином; зеленый цвет – ВГБ с 80 % парафином, оранжевый цвет - ВГБ с 80 % парафином.

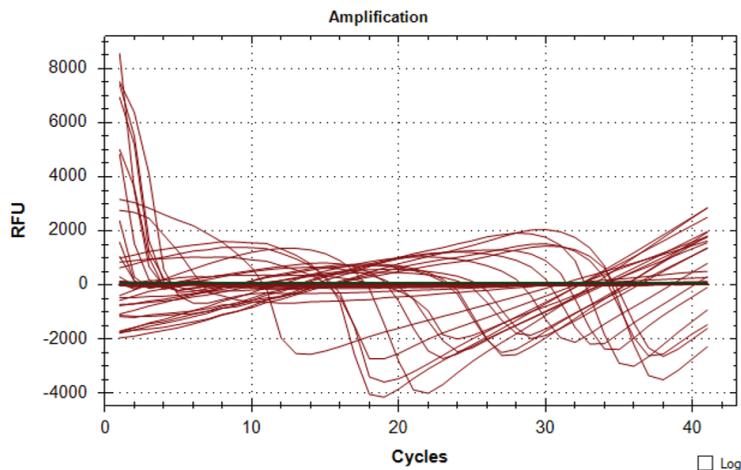


Рис. 3 Результаты амплификации различных концентраций воска EMPROVE® ESSENTIA.

Далее полученные смеси под парафином были поставлены нами на хранение при температуре +6 °С, +25 °С и -20 °С.

По результатам серии постановок ПЦР смесь воска EMPROVE® ESSENTIA в различных концентрациях с минеральным маслом оказалась нерабочей композицией (рис. 3).

Стоит также отметить, что композиции с воском EMPROVE® ESSENTIA, несмотря на перевод их в

композиции с минеральным маслом, сохранили свою вязкую консистенцию, что усложняет их раскапывание и является неактуальным в использовании.

При проведении исследования также было обращено внимание, что минимальное количество раскапываемого парафинового воска для получения «Сандвича», который последовательно бы разделял слои - праймер | парафиновый воск | буфер | парафиновый воск, составляет 15 и 20 мкл соответственно (рис. 4).

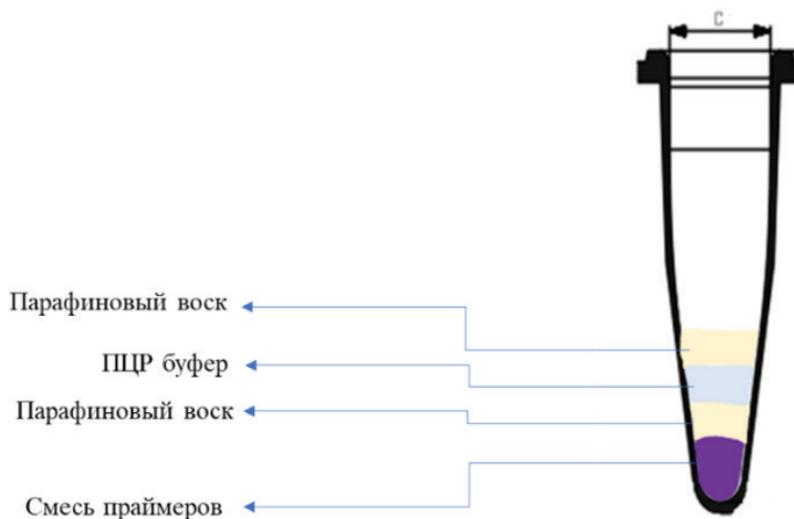


Рис. 4. Вариант внешнего вида смеси под слоем композиции парафина с минеральным маслом.

Оценивая результаты дальнейших наблюдений было установлено, что при хранении полученной композиции парафинового масла в концентрациях 75 % и 80 % в течение 4 месяцев с периодичностью оценки 3 раза в неделю, показало, что смесь, хранящаяся при -20 °С, показала лучшую воспроизводимость с незначительным уровнем падения флуоресцирующего сигнала (RFU) и смещение порогового цикла на диапазон до 1 единицы. Остальные варианты смесей, хранящихся при температуре +6 °С, +25 °С, показали неудовлетворительные результаты, при дальнейшем их анализе

наблюдалось значительное снижение RFU и смещение Ct на диапазон 3-4 единицы. По нашему мнению, это может быть связано с нестабильностью самих праймеров при хранении в течение времени при указанных температурах.

В связи с этим после полученных результатов, вторым этапом стало улучшение функции парафинового воска несколькими способами. По анализу литературы был проведен поиск веществ, которые могли бы уменьшить глубину парафинового компонента, тем самым уменьшая его массу, необходимую для полного покры-

тия водного слоя, что позволило бы сделать композицию более стабильной. К таким веществам, применяемым в настоящее время, относятся поверхностно-активные вещества, т.е. это вещества, которые снижают межфазное натяжение между водой или водными растворами и гидрофобными твердыми веществами или жидкостями, такими как масла, пластичные смазки и воски. Для исследования было выбрано неионное поверхностно-активное вещество TWEEN® 85 (полиоксиэтиленсорбитантриолеат).

Проводимые эксперименты по подбору минимальной массы парафинового воска, способного полностью покрыть нижний слой праймера, показали, что для полного покрытия необходимо от 40 до 55 мг парафина. При проведении эксперимента не требовалось использования амплификатора, визуальный просмотр слоев воска на наличие отверстий с последующим нагреванием закрытых пробирок до 80 °С проводили на термощейкере для микропробирок и ПЦР планшетов TS-100 (ОО «Биосан», Латвия) в течение 5 минут. Такие условия к количеству добавляемого воска обусловлены тем фактом, что парафин образует вогнутый книзу мениск с водной средой под ним и вогнутый вверх мениск с воздухом над ним в момент формирования слоя. В этом случае для получения полного покрытия пробирки требуется гораздо более толстый слой на стенке пробирки. Усилия по приданию парафиновому слою толщины

для практического применения были сосредоточены на композициях, которые уменьшали бы глубину мениска, создавая более равномерное распределение воска по верхней части, формируя тонкий слой, обеспечивающий равномерное покрытие.

Влияние 1 % Tween® 85 на эффективность ПЦР.

Включение в композицию парафина с минеральным маслом подобранной концентрации - 1 % Tween® 85 (полиоксиэтиленсорбитантриолеат), позволило уменьшить минимальную массу воска для полного покрытия с 40-55 мг до 10-25 мг. Дальнейшее исследование включало добавление 1 % Tween® 85 в композицию парафина 75 % и 80 % с минеральным маслом.

Для проведения анализа расплавляли парафин в эпепдорфе на 2 мл, вносили 1,5 мл минерального масла для получения соответствующих нужных концентраций 75 % и 80 % и вносили в него Tween® 85 до концентрации 1 % по массе. Расплавленный воск с помощью автоматических пипеток вносили в пробирки объемом до 0,2 мл следующим образом: праймер | парафиновый воск + 1 % Tween® 85 | буфер | парафиновый воск + 1 % Tween® 85. Подобранное соотношение реагентов позволило сократить соотношение раскапываемого парафина для разделения нижнего и верхнего слоев с 15 и 20 мкл до 8 и 10 мкл в новом формате. После застывания слоев парафина и просматривания при увеличении во всех слоях, нами не было отмечено отверстий (рис. 5).

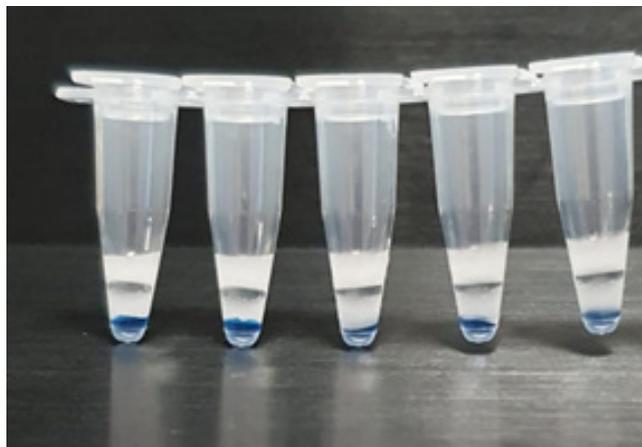


Рис. 5. Внешний вид разрабатываемой системы праймер | парафиновый воск + 1 % Tween® 85 | буфер | парафиновый воск + 1 % Tween® 85.

Поверх верхнего слоя добавляли 5 мкл выделенных образцов, после готовые реакционные пробирки помещали в прибор Bio-Rad CFX 96 и подвергали следующей программе амплификации: 55 °С в течение 10 мин, 95 °С в течение 10 мин, затем пять циклов 95 °С в течение 5 с, 60 °С в течение 15 с и 67 °С в течение 15 с, затем 40 циклов 95 °С в течение 5 с, 60 °С в течение 15 с и 67 °С в течение 15 секунд. Параллельно были поставлены контрольные пробирки, которые представляли собой те же самые образцы, но внесенные не в парафиновую композицию, а в свежеприготовленный master mix (буферная смесь + праймер) с объемом добавляемого образца 5 мкл. Результаты ПЦР представлены на рис. 6, а, б.

Полученные данные свидетельствуют о работоспособности системы. Дальнейшие испытания с 1 %

Tween® 85 были направлены на изучение стабильности, полученных смесей под парафином при температуре -20 °С в течение 4 месяцев. По результатам наблюдений, начиная с 3-го месяца хранения, у композиции парафинового воска 80 % с 1 % Tween® 85, наблюдался спад уровня флуоресценции и постепенное возрастание Ct, что свидетельствует о нестабильности композиции при длительном хранении и делает ее использование непригодным в дальнейших исследованиях.

Проведенный эксперимент по результатам стабильности продемонстрировал приемлемо воспроизводимую ПЦР для парафина 75 % + 1 % Tween® 85. По результатам анализа графиков наблюдалось незначительное снижение уровня флуоресценции в пределах до 100 единиц для ВГС и 60 единиц для ВГБ, уровень Ct во время изучения стабильности не смещался.

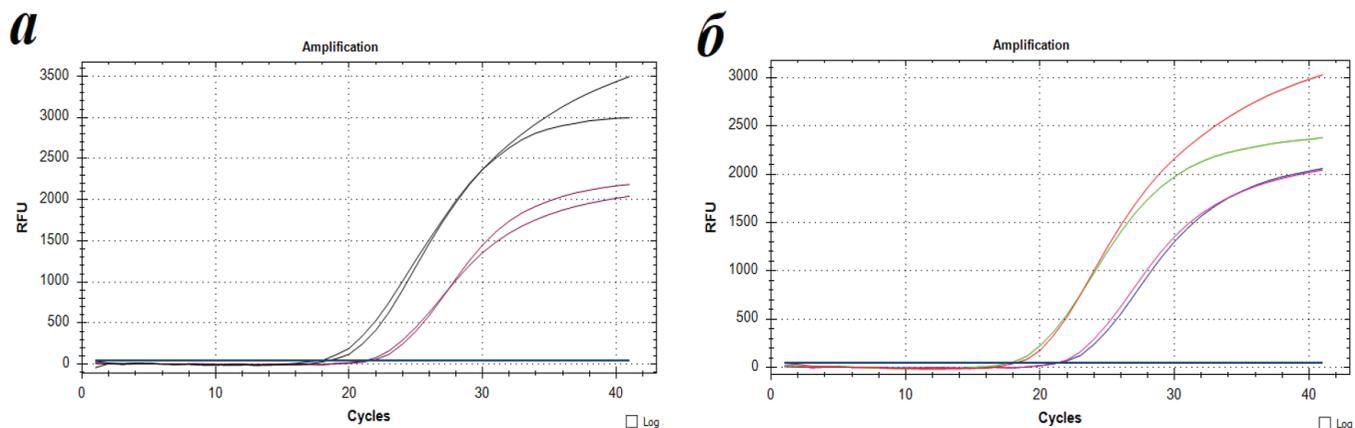


Рис. 6. Результаты амплификации ВГС и ВГБ в композиции парафинового масла с добавлением 1 % Tween® 85 в сравнении с master mix + (буферная смесь + праймер).

a – график амплификации свежеприготовленной master mix с внесением образца, где черным цветом обозначен – ВГС, поставленный в двух повторях, бордовым цветом – ВГБ, поставленный в двух повторях; *б* – график амплификации ВГС и ВГБ в композиции парафинового масла с добавлением 1 % Tween® 85, где красным цветом обозначен – ВГС с 75 % парафином, зеленым цветом – ВГС с 80 % парафином; розовым цветом – ВГБ с 75 % парафином, синим цветом – ВГБ с 80 % парафином.

Сравнительный анализ разработанной композиции парафина с Chill-out™ Liquid Wax. Сравнительный анализ оценивался путем постановки разрабатываемой системы с парафином относительно воска Chill-out™ Liquid Wax for PCR по следующим показателям:

- значение уровня флуоресценции испытуемых образцов;
- значение порогового цикла (Ct) для каждого из образцов.

Как и в случае с разрабатываемой системой с использованием парафина для разделения слоев, нами

был использован жидкий воск Chill-out™ Liquid Wax. В исследовании для формирования «сэндвича» было использовано 9 и 15 мкл воска для формирования нижнего и верхнего слоя соответственно. Жидкий воск Chill-out™ Liquid Wax является простым в использовании. Поскольку он остаётся жидким при комнатной температуре, как указано в паспорте производителя, то для его застывания использовали термостат с выставленной температурой 10 °С. Сам воск, произведённый компанией Bio-Rad, выпускается в прозрачном виде для оптического анализа (рис. 7).

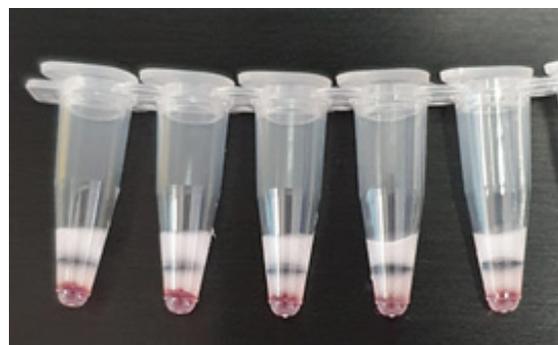
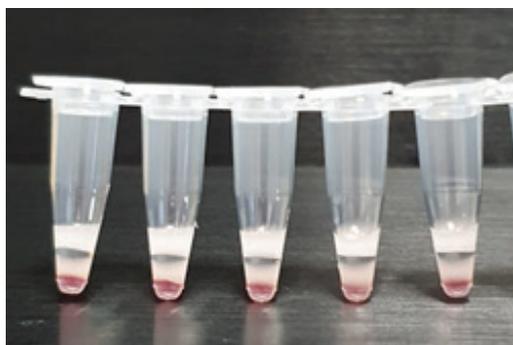


Рис. 7. Жидкий воск Chill-out™ Liquid Wax с праймерами и буфером в виде «сэндвича» при температуре +10 °С.

Для постановки ПЦР анализа использовались 4 образца ВГС (НСVA1-НСVA4) и 4 образца ВГБ (НВVA1-НВVA4) (рис. 8, *a, б, в, г*).

По результатам проведенного сравнительного анализа постановки ПЦР можно сделать вывод, что разрабатываемая система с парафином не уступает по своим характеристикам жидкому воску Chill-out™ Liquid Wax for PCR. Результаты сравнения основных показателей приведены в табл. 2 и табл. 3.

По результатам полученных нами данных можно

сделать вывод, что разрабатываемая парафиновая система не уступает по своим возможностям воску Chill-out™ Liquid Wax и может использоваться как его альтернатива.

Валидация разрабатываемой парафиновой системы. По разрабатываемой ПЦР-РВ системе с использованием парафинового компонента для диагностики инфекций, выпускаемых компанией АО «ЭКОлаб», был валидирован формат наборов реагентов «ПарафЭК...», где вместо многоточия предлагается в дальнейшем ука-

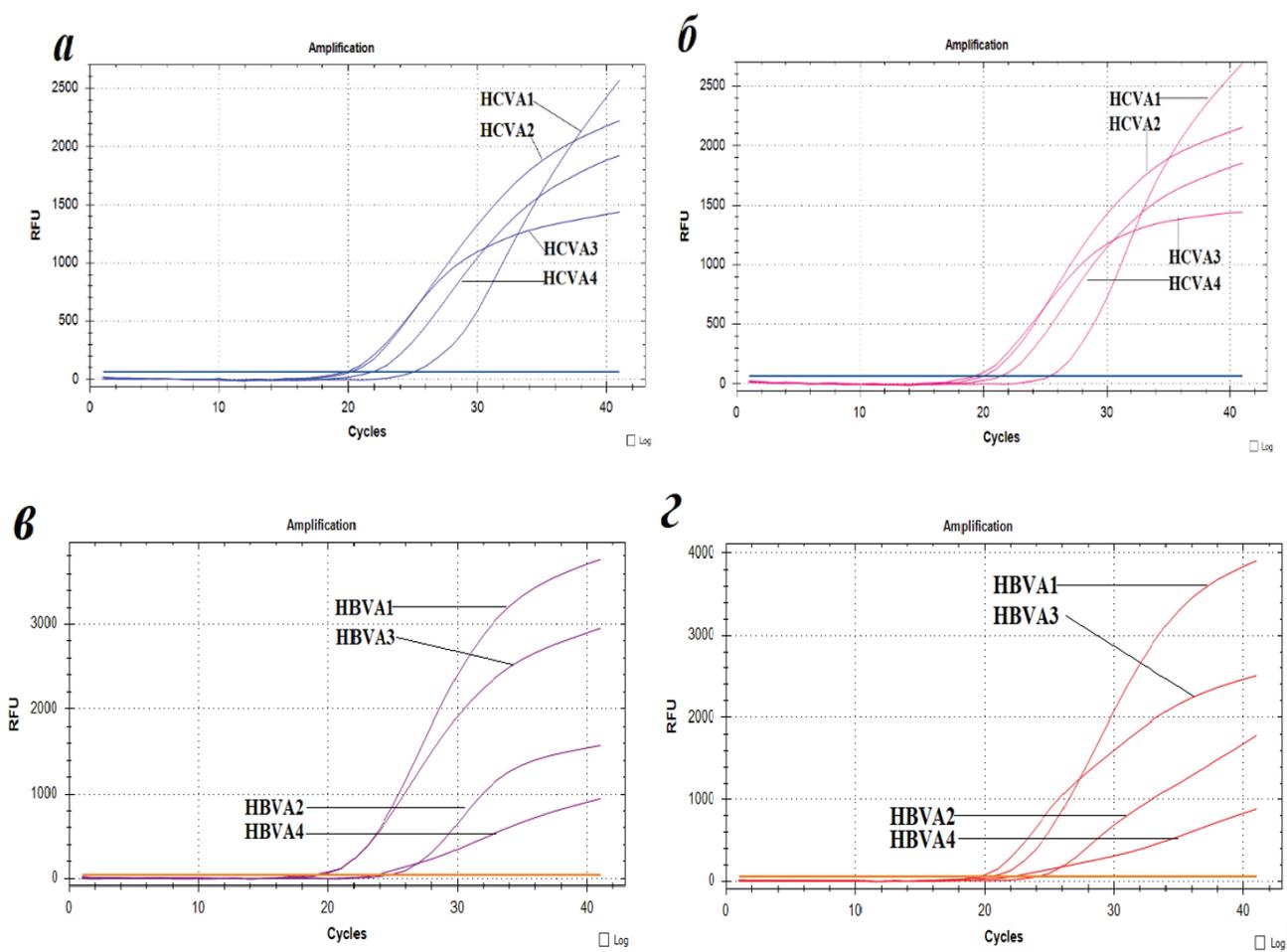


Рис. 8. Результаты сравнения эффективности разрабатываемой системы парафина в сравнении красного воска Chill-out™ Liquid Wax for PCR на образцах ВГС и ВГБ.

а – график амплификации образцов HCVA1-HCVA4 с разрабатываемой нами системой парафина; б - график амплификации образцов HCVA1-HCVA4 с использованием воска Chill-out™ Liquid Wax for PCR; в - график амплификации образцов HBVA1-HBVA4 с использованием воска Chill-out™ Liquid Wax for PCR; г - график амплификации образцов HBVA1-HBVA4 с разработанной нами системой парафина.

Таблица 2

Сравнение показателей Ct и RFU для ВГС по разрабатываемой парафиновой системы с жидким воском Chill-out™ Liquid Wax

Название образца	ВГС			
	Разрабатываемая система		Chill-out™ Liquid Wax	
	Ct	RFU	Ct	RFU
HCVA1	24,97	2572	25,28	2694
HCVA2	20,08	2223	19,87	2156
HCVA3	19,62	1438	19,15	1443
HCVA4	21,72	1923	21,29	1855

зывать используемый набор для диагностики той или инфекции, например «ПараФЭК Гепа В». Согласно ГОСТ ISO 13485—2017¹ целью проводимой валидации является подтверждение того, что разрабатываемая парафиновая система позволяет подтвердить повторяемость/воспроизводимость результатов испытаний, которые бы соответствовали предварительно заданным спецификациям и качественным характеристикам [8]. Для исследования

¹Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения (ГОСТ ISO 13485-2017. Межгосударственный стандарт. Изделия медицинские. Системы менеджмента качества. Требования для целей регулирования). Режим доступа: <https://roszdravnadzor.gov.ru/spec/medproducts/documents/70478> (22 февраля 2024).

повторяемости результатов анализа, полученных с использованием разрабатываемой парафиновой системы, нами была приготовлена серия из образцов относительно стандарта WHO International Standard for hepatitis C virus RNA for nucleic acid amplification techniques (NAT) NIBSC code: 18/184, разведенного до концентрации 100 000 МЕ/мл, 1000 МЕ/мл и компонентов набора «ПКО» и «ПКО2» в 5-ти повторях и WHO International Standard for HBV DNA for NAT NIBSC code: 10/266 разведенного до концентрации 100000 МЕ/мл, 1000 МЕ/мл и компонентов набора «ПКО» и «ПКО2» в 5-ти повторях. Исследование повторяемости проводили с использованием прибора «CFX96».

Воспроизводимость результатов исследовали при параллельных экспериментах с участием разных операторов, с использованием разных моделей амплифи-

каторов: «CFX96», «Quant Studio 5», «ДТпрайм» на одной и той же серии набора реагентов для определения ВГС, ВГБ в разные дни (табл. 4,5).

Таблица 3

Сравнение показателей Ct и RFU для ВГБ по разрабатываемой парафиновой системы с жидким воском Chill-out™ Liquid Wax

Название образца	ВГБ			
	Chill-out™ Liquid Wax		Разрабатываемая система	
	Ct	RFU	Ct	RFU
HBVA1	19,14	3768	20,08	3916
HBVA2	24,91	1577	23,84	1786
HBVA3	19,53	2955	19,26	2508
HBVA4	23,86	947	21,87	883

Таблица 4

Результаты аттестации компонента «ПКО» и «ПКО2» для ВГБ

Наименование исследуемых проб	CFX96		Quant Studio 5		ДТпрайм	
	Оператор 1	Оператор 2	Оператор 1	Оператор 2	Оператор 1	Оператор 2
WHO International Standard for HBV DNA for NAT NIBSC code: 10/266 в концентрации 100000 МЕ/мл	19,5	19,52	19,7	19,69	19,7	19,7
ПКО (повтор 1)	19,5	19,5	18,8	18,76	18,98	18,99
ПКО (повтор 2)	19,2	19,18	19,5	19,53	19,1	19,11
ПКО (повтор 3)	18,9	18,88	19,6	19,57	19,2	19,2
ПКО (повтор 4)	18,95	18,95	19,12	19,14	19,12	19,13
ПКО (повтор 5)	19,21	19,22	18,94	18,94	18,97	18,99
WHO International Standard for HBV DNA for NAT NIBSC code: 10/266 в концентрации 1000 МЕ/мл	26,7	26,71	26,75	26,77	26,74	26,70
ПКО2 (повтор 1)	26,35	26,36	26,87	26,80	26,82	26,84
ПКО2 (повтор 2)	26,34	26,30	26,98	26,96	26,90	26,92
ПКО2 (повтор 3)	26,98	26,99	26,54	26,50	26,60	26,64
ПКО2 (повтор 4)	26,84	26,80	25,79	25,78	25,73	25,70
ПКО2 (повтор 5)	26,37	26,35	25,94	25,91	25,93	25,96

Таблица 5

Результаты аттестации компонента «ПКО» и «ПКО2» для ВГС

Наименование исследуемых проб	CFX96		Quant Studio 5		ДТпрайм	
	Оператор 1	Оператор 2	Оператор 1	Оператор 2	Оператор 1	Оператор 2
WHO International Standard for HCV RNA for NAT NIBSC code: 18/184 в концентрации 100000 МЕ/мл	19,5	19,5	19,7	19,6	19,7	19,7
ПКО (повтор 1)	19,5	19,4	18,8	18,84	18,98	18,99
ПКО (повтор 2)	19,2	19,2	19,5	19,48	19,1	19,08
ПКО (повтор 3)	18,9	18,92	19,6	19,63	19,2	19,14
ПКО (повтор 4)	18,95	18,93	19,12	19,11	19,12	19,16
ПКО (повтор 5)	19,21	19,24	18,94	18,98	18,97	18,95
WHO International Standard for HCV RNA for NAT NIBSC code: 18/184 в концентрации 1000 МЕ/мл	26,7	26,69	26,75	26,74	26,74	26,73
ПКО2 (повтор 1)	26,35	26,32	26,87	26,89	26,82	26,81
ПКО2 (повтор 2)	26,34	26,34	26,98	26,97	26,90	26,93
ПКО2 (повтор 3)	26,98	26,98	26,54	26,50	26,60	26,63
ПКО2 (повтор 4)	26,84	26,81	25,79	25,74	25,73	25,77
ПКО2 (повтор 5)	26,37	26,39	25,94	25,98	25,93	25,99

По результатам испытаний на серии приготовленных образцов относительно стандартов WHO International Standard для ВГС и ВГБ с использованием ПКО и ПОК2 с целью валидации разрабатываемой парафиновой системы, нами была подтверждена 100 % повторяемость и 100 % воспроизводимость результатов.

Заключение. Разрабатываемая парафиновая система для диагностики инфекций, протестированная на ДНК вируса гепатита В и РНК вируса гепатита С, показала свою работоспособность. Подобранный композиция с использованием 75 % парафина с минеральным маслом и 1 % Tween® 85 позволила уменьшить количество добавляемого парафина для формирования «сэндвича». Проведенный анализ на стабильность подтвердил, что система при хранении –20 °С в течение 4 месяцев стабильна, дальнейшие исследования стабильности будут продолжены. Сравнительный анализ разрабатываемой композиции относительно жидкого воска показал, что система не уступает по своим возможностям воску Chill-out™ Liquid Wax. Проведённая валидация разрабатываемой парафиновой системы на ВГС и ВГБ позволила установить 100 % повторяемость и 100 % воспроизводимость результатов анализа. Дальнейшая работа будет направлена на адаптацию данного формата для других наборов по диагностике инфекций методом ПРЦ-РВ, выпускаемых компанией АО «ЭКОлаб».

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 3, 4, 6 С.М.
REFERENCES)

1. Ребриков Д.В. ПЦР в реальном времени. М.: Лаборатория знаний; 2015.
2. Жигалева О.Н., Ильин И.И., Марданлы С.Г., Марданлы С.С. Разработка набора реагентов для выделения нуклеиновых кислот из клинического материала на основе магнитной адсорбции. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (10): 650-7. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-10-650-657.
5. Жигалева О.Н., Марданлы С.Г., Гашенко Т.Ю., Ермолаев И.И.

Разработка набора реагентов для количественного определения ДНК вируса гепатита В в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2023; 22(4): 86-93. DOI: 10.31631/2073-3046-2023-22-4-86-94.

7. Федеральная служба по надзору в сфере здравоохранения (Государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий) Режим доступа: <https://www.roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (12 февраля 2024).

REFERENCES

1. Rebrikov D.V. Real-time PCR. Moscow: Laboratoriya znaniy; 2015. (in Russian)
2. Zhigaleva O.N., Il'in I.I., Mardanly S.G., Mardanly S.S. Development of a set of reagents for the isolation of nucleic acids from clinical material based on magnetic adsorption. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2023; 68 (10): 650-7. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-10-650-657. (in Russian)
3. Quantitative PCR Basics 2024. Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/technical-documents/technical-article/genomics/qpcr/quantitative-pcr> (5 February 2024).
4. Harshitha R., Arunraj D. R. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 2021; 49(5): 800–12. DOI: 10.1002/bmb.21552.
5. Zhigaleva O.N., Mardanly S.G., Gashenko T.Yu., Ermolaev I.I. Development of a reagent kit for the quantitative determination of hepatitis B virus (HBV) DNA in cMaterial by PCR with hybridization-fluorescence detection. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika*. 2023; 22(4): 86-93. DOI: 10.31631/2073-3046-2023-22-4-86-94. (in Russian)
6. Bloch W., Cerrito E., Raymond J., Oakland, Read R. A., Alameda Use of grease or wax in the polymerase chain reaction. Patent US US5411876A; 1995.
7. Federal service for Surveillance in Healthcare (State register of medical devices and organizations (individual entrepreneurs) engaged in the production and manufacture of medical devices) [Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zdavookhraneniya (Gosudarstvennyy reestr meditsinskikh izdeliy i organizatsiy (individual'nykh predprinimateley), osushchestvlyayushchikh proizvodstvo i izgotovlenie meditsinskikh izdeliy)]. Available at: <https://www.roszdravnadzor.gov.ru/services/misearch> (12 February 2024). (in Russian)