

На правах рукописи



Лазарева Екатерина Германовна

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОВИРУСНОЙ ДНК *BOVINE LEUKEMIA VIRUS* В
МОЛОКЕ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ**

Специальность: 4.3.3 – Пищевые системы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук

Москва, 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

Научный руководитель: **Фоменко Олег Юрьевич**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Вострикова Наталья Леонидовна**
доктор технических наук, руководитель научно-исследовательского испытательного центра ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем имени В. М. Горбатова» РАН

Алексеев Яков Игоревич
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Защита состоится «12» декабря 2024 г. в 10 часов 00 минут на заседании объединенного совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук 99.0.092.02 по научной специальности 4.3.3 Пищевые системы (технические науки) при ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» по адресу 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11, корп. А, Зал А-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеках ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)» и на официальном сайте ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» <http://www.mgupp.ru/>.

С авторефератом можно ознакомиться на официальных сайтах ВАК Минобрнауки РФ (<http://vak.ed.gov.ru>) и ФГБОУ ВО «РОСБИОТЕХ» (<http://www.mgupp.ru>).

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
Совета 99.0.092.02, к.т.н., доц.



Ю. В. Николаева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Пищевые продукты животного происхождения оказывают воздействие на самые разные аспекты здоровья и питания населения. Последствия такого воздействия определяются социальными условиями, этапом жизненного цикла человека и характером животноводческой продукции. Согласно докладу Всемирной организации здравоохранения, здоровое питание связано с употреблением качественных пищевых продуктов. Кроме того, положения «Стратегии повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года» показывают важность разработки новых критериев оценки качества и безопасности пищевых продуктов. Одним из основных мировых источников продуктов питания животного происхождения является скотоводство. В числе вопросов, имеющих отношение к устойчивому производству безопасных пищевых продуктов животного происхождения – новые инфекционные заболевания, запущенные зоонозные болезни, болезни пищевого происхождения, связанная с сельским хозяйством устойчивость к противомикробным препаратам. Поэтому в настоящее время особенно остро стоит вопрос о возможном негативном влиянии на здоровье человека различных инфекционных заболеваний крупного рогатого скота. В этой связи особую озабоченность вызывает проблема вирусного лейкоза крупного рогатого скота, находящегося в тесной филогенетической связи с вирусом Т-клеточного лейкоза человека 1-го типа (HTLV-1).

Энзоотический вирусный лейкоз крупного рогатого скота (ВЛКРС) – хроническая инфекционная болезнь, характеризующаяся лимфоцитозом или образованием опухолей в кроветворных и других органах и тканях. Возбудителем заболевания является вирус лейкоза крупного рогатого скота (*Bovine leukemia virus*) из семейства *Retroviridae*, который в естественных условиях передается крупному рогатому скоту, зебу, буйволам и овцам. Вирус интегрируется в геномную ДНК В-лимфоцитов, и способен годами пребывать в латентном состоянии, ожидая ослабления иммунитета носителя. Данное заболевание регистрируется почти во всех странах мира и наносит значительный экономический ущерб за счёт выбраковки продукции, полученной от больных животных, и их вынужденного убоя. Из-за биологических особенностей вируса заболевание характеризуется продолжительным бессимптомным периодом и в отсутствие проведения специфической диагностики остаётся не выявленным. Данный факт препятствует возможности оперативного выявления вирусоносителей, что приводит к сбору и промышленному использованию молока от инфицированных животных.

Помимо устойчивого роста распространённости вируса лейкоза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации, по мере совершенствования аналитических методов в последние десятилетия всё чаще появляются сообщения об обнаружении вируса BLV и антител к нему у людей. При этом точные пути трансмиссии вируса от животных человеку всё ещё остаются невыясненными. Некоторые из гипотез связывают попадание BLV в организм человека с употреблением продукции животноводства, в частности - молока. Поэтому несмотря на отсутствие убедительных доказательств о влиянии BLV на общественное здоровье, присутствие этого онкогенного ретровируса в различных биологических образцах человека потенциально может стать проблемой для системы здравоохранения, что делает актуальной необходимость дальнейшего

изучения путей его передачи человеку и выявление вируса и его генома в продуктах питания.

Аспекты биологической безопасности использования молока от инфицированных животных до сих пор до конца не изучены. Отчасти данный пробел может быть связан с тем, что согласно законодательству многих стран, молоко для дальнейшей переработки подвергается предварительной термизации и обязательной пастеризации на производстве при различной температуре и времени выдержки, обеспечивающих разрушение микроорганизмов с сохранением технологических свойств сырья. Однако оценка эффективности инактивации вируса бычьего лейкоза при термической обработке молочных продуктов и, следовательно, уровня их безопасности, требует проведения дополнительных исследований.

Таким образом, разработка методов качественного и количественного определения провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота в продукции молочной промышленности является актуальной для обеспечения населения безопасными и полноценными продуктами питания.

Степень разработанности темы исследований. Исследованиям факторов качества и безопасности сырого молока, эпизоотической ситуации по лейкозу КРС, влиянию вируса лейкоза КРС на показатели молока и способов диагностики посвящены работы ряда отечественных и зарубежных ученых: Валихов А.Ф., Вафин Р.Р., Галстян А.Г., Гильманов Х.Х., Гулюкин М.И., Донник И. М., Красникова Е.С., Свириденко Г.М., Тюлькин С.В., Юрова Е.А., Ahmed M., Wojarójc-Nosowicz V., Buehring G.C., Gutiérrez S.E., Nakanishi R., Olaya-Galán N. N. и др.

Целью работы является разработка методического подхода к количественному определению провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Для достижения цели исследования были сформулированы и решены следующие основные **задачи**:

1. Провести анализ научно-технической информации в области безопасности молока, в частности, полученного от коров, зараженных *Bovine leukemia virus*;

2. Исследовать существующие альтернативные методы выделения ДНК из сырого молока и продуктов его переработки;

3. Провести биоинформатический анализ геномных последовательностей-мишеней *Bovine leukemia virus* и разработать дизайн олигонуклеотидных праймеров для проведения количественного анализа провирусной ДНК, интегрированной в геном коров-вирусоносителей, методом полимеразной цепной реакции в реальном времени;

4. Оценить эффективность сконструированных олигонуклеотидных праймеров по отношению к молоку и молочным продуктам;

5. Создать и исследовать тест-систему для количественного определения содержания провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах и определить её аналитические характеристики;

6. Разработать метод количественного определения содержания провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* в молоке и молочных продуктах молекулярно-генетическими методами и провести оценку его эффективности.

Научная новизна:

- предложена пара олигонуклеотидных праймеров, обеспечивающая оптимальный выход специфического ПЦР-продукта при использовании различного стартового материала;

- установлено, что зависимость порогового цикла от исходной концентрации ДНК сохраняет линейность до предела, соответствующего 28 молекулам-мишеням на реакцию;

- показана возможность эффективной амплификации фрагмента провирусной ДНК, интегрированной в геном хозяина, выделенной из молочных продуктов, в диапазоне от 10 нг до 1 пг на реакцию.

Практическая значимость:

- расширена область оценочных критериев безопасности молока и молочных продуктов за счет внедрения ПЦР-анализа, направленного на выявление и количественное определение провирусной ДНК;

- впервые создана отечественная тест-система, позволяющая производить неинвазивный скрининг животных-вирусоносителей и контроль качества молочной продукции;

- разработан и утверждён СТО 00419785-075-2024 «Молоко и молочная продукция. Методика выполнения измерений по выявлению и количественному определению провирусной ДНК вируса лейкоза КРС».

Методология и методы исследования.

При выполнении работы использовали стандартизованные и общепринятые в контроле молочных продуктов методы исследований, изложенные в специализированной литературе, а также оригинальные методы, комплексно обеспечивающие выполнение поставленных задач.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Комплект специфических олигонуклеотидов для эффективной амплификации фрагментов провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота, выделенной из различных пищевых матриц.
2. Тест-система для детекции провирусной ДНК ВLV, включающий в себя все необходимые для проведения анализа реагенты и стандартные образцы.
3. Метод количественного определения провирусной ДНК ВЛКРС в молочных продуктах.

Степень достоверности и апробация работы.

Работа выполнена в лаборатории прикладной микробиологии и геномики микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»). Исследования проведены на современном аттестованном аналитическом оборудовании, внесённом в Реестр средств измерений и прошедшем поверку. Достоверность полученных результатов основана на выполнении измерений в адекватном поставленным задачам количестве технических и биологических повторностей. Результаты исследований и научные положения основаны на фактических данных и подтверждены на практике опытно-промышленной апробацией разработанной методики.

Основные положения и результаты работы доложены, обсуждены и одобрены на IX и XI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2021, 2023), VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молодые исследователи агропромышленного и лесного комплексов – регионам» (Вологда, 2022), IV научно-практической конференции с международным участием "Зоотехническая наука в условиях современных вызовов" (Киров, 2022), Международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.В. Рудакова (Санкт-Петербург, 2023), Международной научно-практической конференции «Производство сыра, масла и другой молочной продукции в современных условиях. Проблемы и пути решения» (Углич, 2023), XVI Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Фуд-бум: новые технологии для будущего пищевой отрасли» (Москва, 2023).

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно и включает анализ научно-технической литературы, выбор, постановку целей и задач исследований, обоснование экспериментальных методов исследования, выполнение эксперимента, анализ и обобщение полученных результатов, выводы по работе.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе: 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, 1 статья в журнале, индексируемом в международной базе Web of Science, 3 статьи в журналах РИНЦ и 7 публикаций в сборниках трудов конференций.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, аналитического обзора, методической части, результатов собственных исследований и их анализа, а также выводов, списка использованных источников литературы и приложений. Основной текст работы изложен на 127 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц, 36 рисунков, 153 литературных источника.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, изложены научная новизна, практическая значимость, положения, выносимые на защиту, представлены результаты апробации и публикации, а также данные по структуре и объему диссертационной работы.

В главе 1 представлены основные характеристики молока от различных сельскохозяйственных животных, факторы, оказывающие влияние на формирование качества и безопасности сырого молока. Особое внимание уделяется эпизоотической ситуации в целом, лейкозу КРС в частности. Кроме того, освещены такие аспекты, как влияние вируса лейкоза КРС на показатели молока, способы его диагностики.

В главе 2 изложена структура, организация и схема проведения исследования (рисунок 1). На различных этапах работы объектами исследований являлись: сырое молоко и молочные продукты; сырое молоко, полученное от коров-вирусоносителей, а также продукты его переработки: пастеризованное молоко, обезжиренное молоко, сливки, йогурт, сухое обезжиренное молоко. В качестве объектов исследования использовали, также, препараты вируса лейкоза кошек, лейкоза КРС и препараты, содержащие типичную для молочной отрасли патогенную и условно-патогенную микрофлору.

ДНК из образцов выделяли двумя различными способами с использованием коммерчески доступных наборов для выделения, основанных на адсорбционных методах с использованием сорбентов на основе диоксида кремния «ДНК-сорб-С-М» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно рекомендациям производителя, и основанных на жидкофазных методах с солевым осаждением «ДНК-Экстран-2» (ООО «НПФ Синтол», Россия) с незначительными изменениями протокола выделения – время лизирования образцов составляло 1 час. Объем буфера TE, использованного для элюции ДНК, в обоих случаях составлял 50 мкл. Указанные наборы реагентов далее в тексте автореферата обозначаются как «набор №1» и «набор №2» соответственно.

Концентрацию ДНК в полученных препаратах измеряли на флуориметре Qubit 4 («Invitrogen», США) с использованием набора реагентов Qubit dsDNA BR Assay Kit («Invitrogen», США). Объем исследуемой пробы составлял 5 мкл. Кроме того, производилось определение ряда качественных параметров образцов ДНК (A260, A280, A230) и их соотношений с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Fisher Scientific», США) в объеме 1 мкл.

Специфические праймеры для количественного определения содержания провирусной ДНК *Bovine leukemia virus* разработаны с использованием специализированного программного обеспечения на основе полных нуклеотидных последовательностей генома вируса BLV, депонированных в публичной базе данных GenBank. Молекулярно-генетические исследования проводились при помощи методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей электрофоретической детекцией результатов анализа и полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Статистическая обработка и визуализация экспериментальных данных проводилась с применением методов математической статистики с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 10.0.

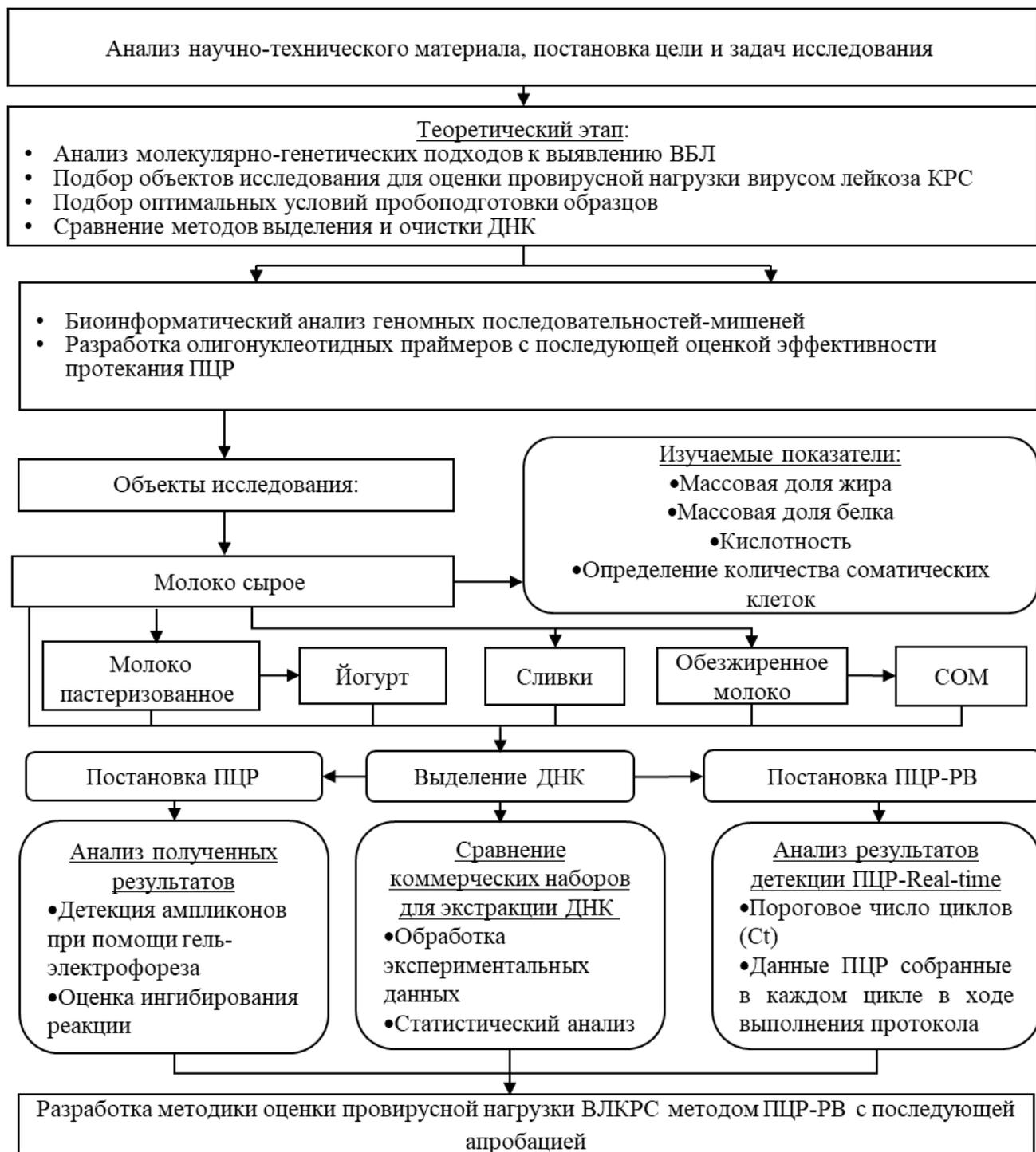


Рисунок 1 - Общая схема исследований

В главе 3 даны результаты собственных исследований. Проведен анализ эффективности методов выделения ДНК из сырого молока. ДНК выделялась из образцов сырого молока объемом 2 мл с использованием коммерчески доступных наборов № 1 и № 2, Результаты статической обработки полученных данных приведены на рисунке 2.

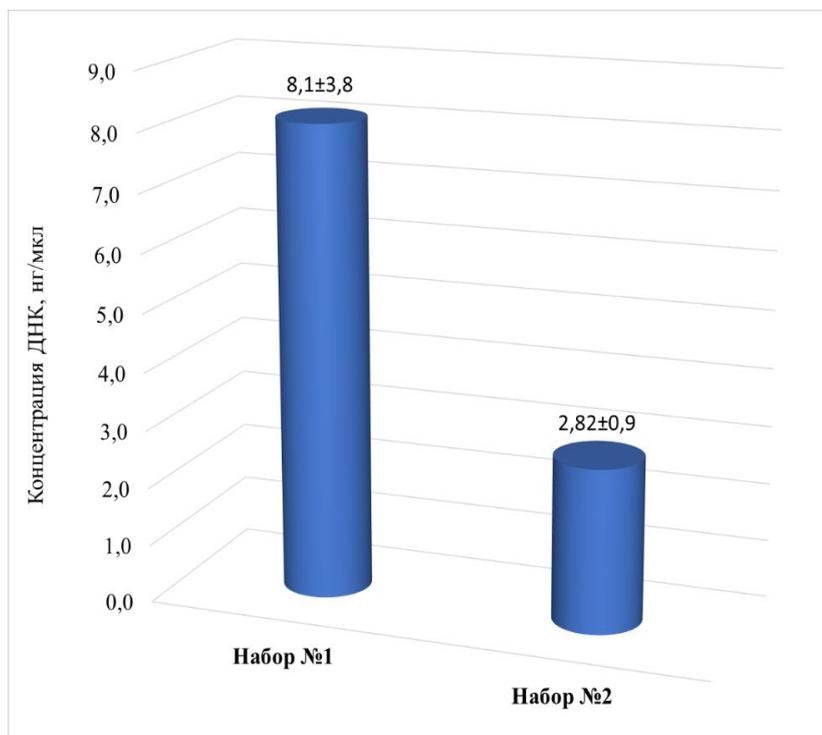


Рисунок 2 - Средние значения концентраций ДНК, выделенной исследуемыми наборами из сырого коровьего молока. В качестве погрешностей указаны стандартные отклонения

цитохромоксидазу I коровы, и последующей детекции результатов выявлено, что в обоих случаях были получены продукты теоретически ожидаемой длины в 311 пар оснований (рисунок 3). Ингибирования реакции ПЦР при этом не наблюдалось, что позволяет избежать получения ложноотрицательных результатов анализа.

Применение двухвыборочного *t*-теста показало, что концентрация ДНК, выделенной двумя различными методами достоверно отличается: при уровне значимости α , равном 0,001, значение *p*-value составило $1,17 \times 10^{-11}$. Таким образом установлено, что использование для выделения суммарной ДНК из сырого молока набора №1 позволяет получить более высокий выход нуклеиновых кислот ($8,1 \pm 3,8$ нг/мкл против $2,82 \pm 0,9$ нг/мкл).

При постановке ПЦР с использованием праймеров, специфических фрагменту митохондриального гена *cox1*, кодирующего фермент

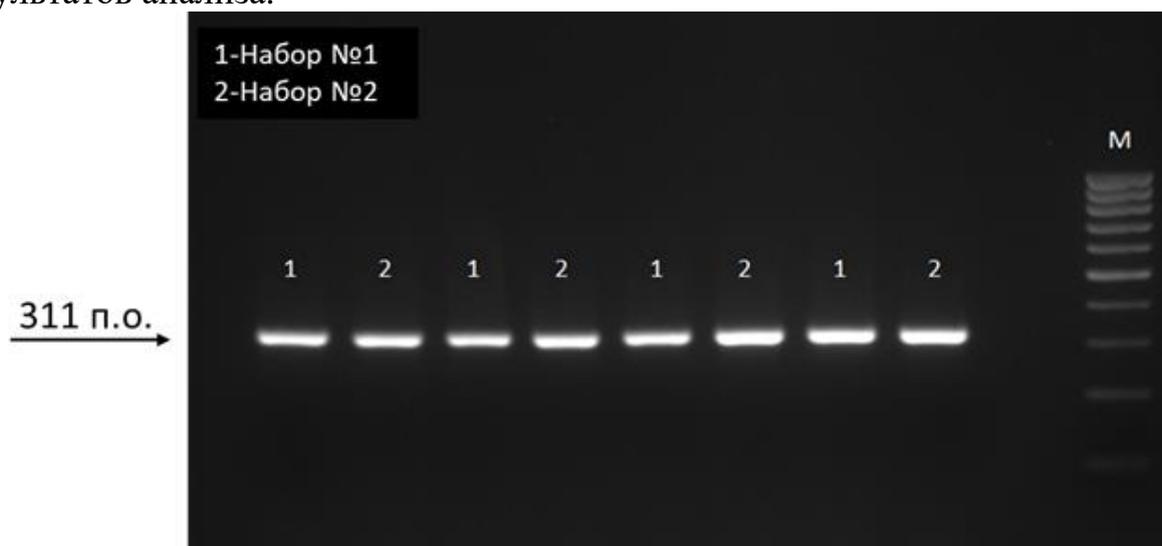


Рисунок 3 - Результаты типовой реакции ПЦР при использовании ДНК, выделенной из сырого молока набором №1 и набором №2. М – маркер длин ДНК 100-1000 п.н. (ЗАО «Синтол»)

Проведен анализ эффективности методов выделения ДНК из сухого молока. ДНК выделялась из образцов СОМ массой 100 мг также с использованием наборов №1 и №2. Произведена предварительная оценка фрагментации молекул при помощи

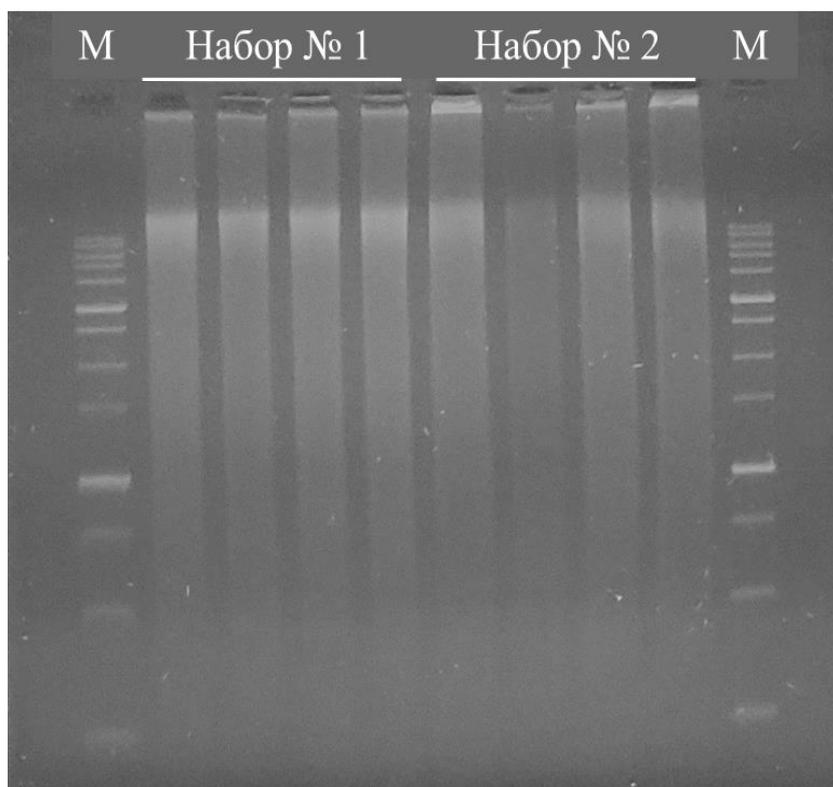


Рисунок 4 - Типовая электрофореграмма анализа уровня фрагментирования ДНК в препаратах, выделенных различными методами. М – маркер длин ДНК «1 kb DNA Ladder»

электрофоретического анализа препаратов ДНК (рисунок 4).

Результаты аналитического электрофореза показали, что, несмотря на достаточно высокую степень фрагментации молекул ДНК (наличие шмеров размером от 1000 п.о. и менее), большая её часть остаётся высокомолекулярной (50000 п.о. и выше), с длиной, достаточной для постановки ПЦР. При этом установлено, что степень деградации ДНК в полученных препаратах не зависит от используемого набора для выделения.

На следующем этапе проведён сравнительный количественный анализ эффективности выделения ДНК двумя указанными

выше коммерческими наборами. С использованием каждого из наборов было выделено по 72 препарата ДНК из навесок сухого молока массой 100 мг. Полученные данные приведены на рисунке 5 в виде средних значений концентрации выделенной ДНК \pm стандартное отклонение. Полученные данные показали, что набор №1 обеспечивает более высокий выход ДНК по сравнению с набором №2. При этом разбросы, обусловленные обоими методами, схожи - относительные стандартные отклонения отличаются всего на 1,5% (15,1% и 16,6% соответственно).

Оценка степени чистоты полученных препаратов ДНК проведена в микрообъёмах спектрофотометрическим методом путём измерения оптической плотности растворов ДНК при 260 нм (A_{260}), 280 нм (A_{280}) и 230 нм (A_{230}) (таблица 1).

Таблица 1 - Показатели чистоты препаратов ДНК, получаемых при использовании различных методов выделения

Набор реагентов	A_{260} , ое	A_{280} , ое	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Набор №1	$1,32 \pm 0,29$	$0,61 \pm 0,18$	$2,28 \pm 0,46$	$0,16 \pm 0,05$
Набор №2	$7,67 \pm 1,96^*$	$8,62 \pm 2,24^*$	$0,89 \pm 0,03^*$	$0,56 \pm 0,16^*$

* различия между методами выделения ДНК статистически достоверны ($p < 0,001$).

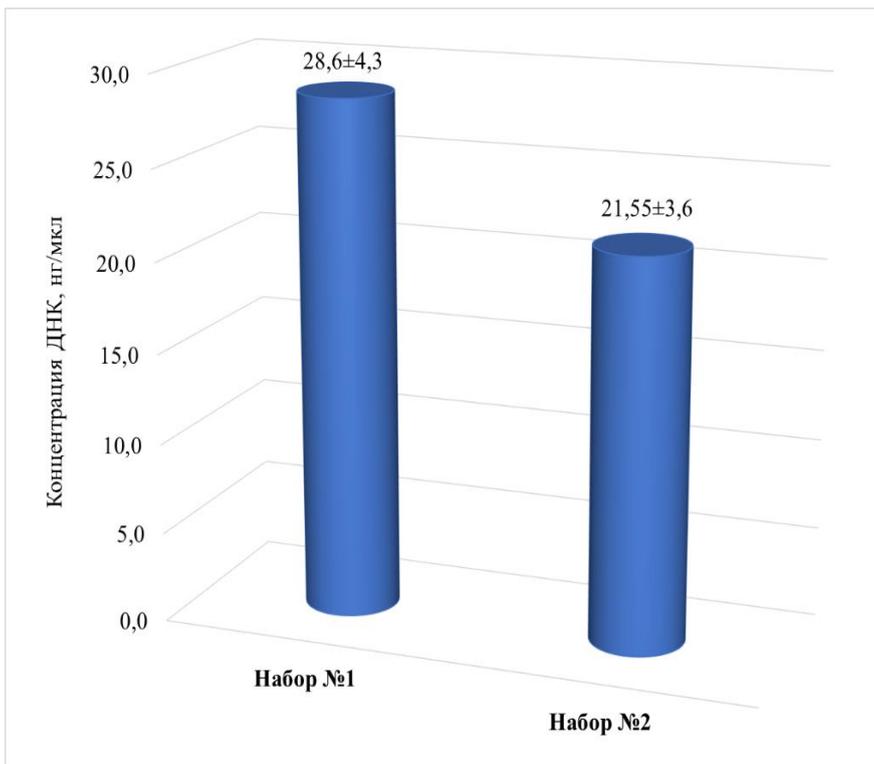


Рисунок 5 - Средние значения концентраций ДНК сухого коровьего молока, выделенной исследуемыми методами. В качестве погрешностей указаны стандартные отклонения. Разница средних значений достоверна с уровнем значимости $p < 0,001$

Из приведенных в таблице 1 данных следует, что препараты ДНК, выделенные из сухого молока с применением набора №2 сильно загрязнены, в том числе – различными полипептидами, о чём позволяет судить экстремально низкое значение соотношения A260/A280. В тоже время, уровень показателя A260/A230 позволяет предположить, что данный набор обеспечивает более качественную отмывку выделяемой ДНК от хаотропных солей, используемых на этапе лизиса образцов, по сравнению с набором №1.

Для определения возможного ингибирующего действия компонентов молока, которые могли остаться в препаратах после ряда последовательных отмывок, осуществляемых в соответствии с протоколами производителей, было поставлено две серии ПЦР, в которых объём вносимой пробы ДНК составлял 4% и 20% от конечного объёма реакционной смеси (1 мкл и 5 мкл соответственно), со всеми полученными в ходе исследования препаратами ДНК. Результаты амплификации фрагмента митохондриального гена *cox1* длиной 311 пар нуклеотидов представлены на рисунке 6.

На приведённой типовой электрофореграмме видно, что, растворы ДНК, выделенной с использованием набора №2 при внесении в реакционную смесь для проведения полимеразной цепной реакции в объёме 20% от общего (5 мкл), полностью ингибировали протекание ПЦР в 100% случаев. При уменьшении относительного объёма образца до 4% (1 мкл), данный эффект существенно снижался, что приводило к синтезу специфического ПЦР-продукта ожидаемой длины также в 100% случаев. Когда же в качестве матрицы использовали ДНК, выделенную набором №1, подавления активности Таq-полимеразы не наблюдалось ни в одной из серий эксперимента.

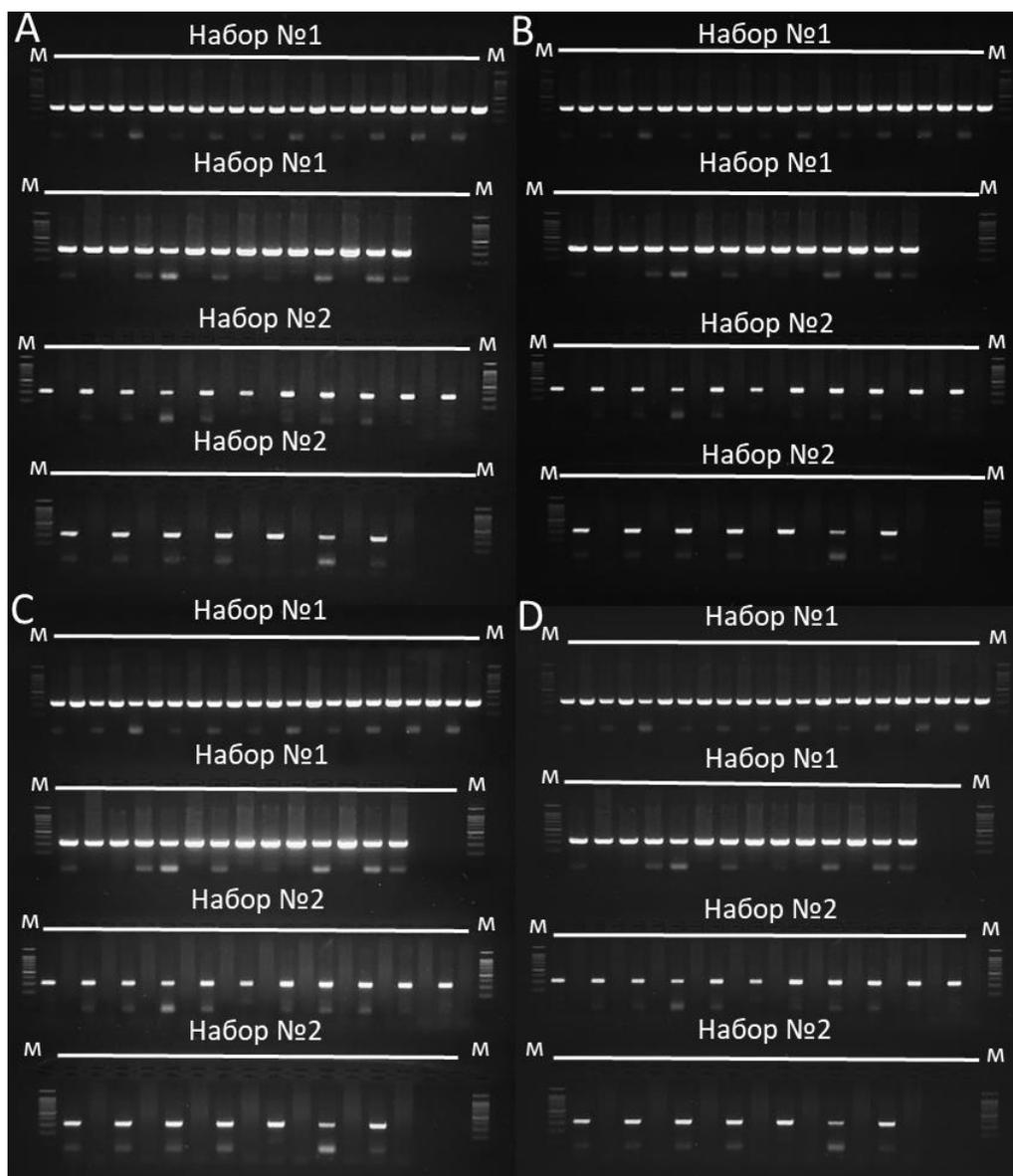


Рисунок 6 -
Зависимость
эффекта
ингибирования ПЦР
от объёма
препаратов ДНК,
выделенных из
сухого молока
различными
методами.
Результаты ПЦР
сгруппированы
парами
«1 мкл / 5 мкл
матрицы»
слева направо для
каждого из
образцов.
А – образцы 1-18;
В – образцы 19-36;
С – образцы 37-54;
D – образцы 55-72

Таким образом, результаты свидетельствуют в пользу того, что использование набора №1 обеспечивает качественную отмывку от потенциально ингибирующих компонентов исходного материала, что исключает нарушение протекания полимеразной цепной реакции.

Представлены результаты разработки олигонуклеотидных праймеров, специфичных к провирусному геному BLV. Разработка праймеров, обеспечивающих амплификацию фрагментов генома вируса BLV осуществлялась с помощью специализированного программного обеспечения Primer3 и Primer-BLAST. Сведения о праймерах приведены в таблице 2 и на рисунке 7.

Таблица 2 - Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность	T _m , °C	Длина ампликона, п.о.
BVL_f	TTTCCACAACGSCTGCCTC	55,9	294
BLV_r	GCGGTCCAGKTGATACGG	52,2	
BBPF	GCAAGTGTGTTGGTTGGGG	55,1	119
BBPR	AATTGGAGTCGTTACGGGG	56,1	
PBPF	GTCCAATGACGTCACCATCG	53,3	111
PBPR	CAGGTGATACGGTGGGTCTC	51,5	

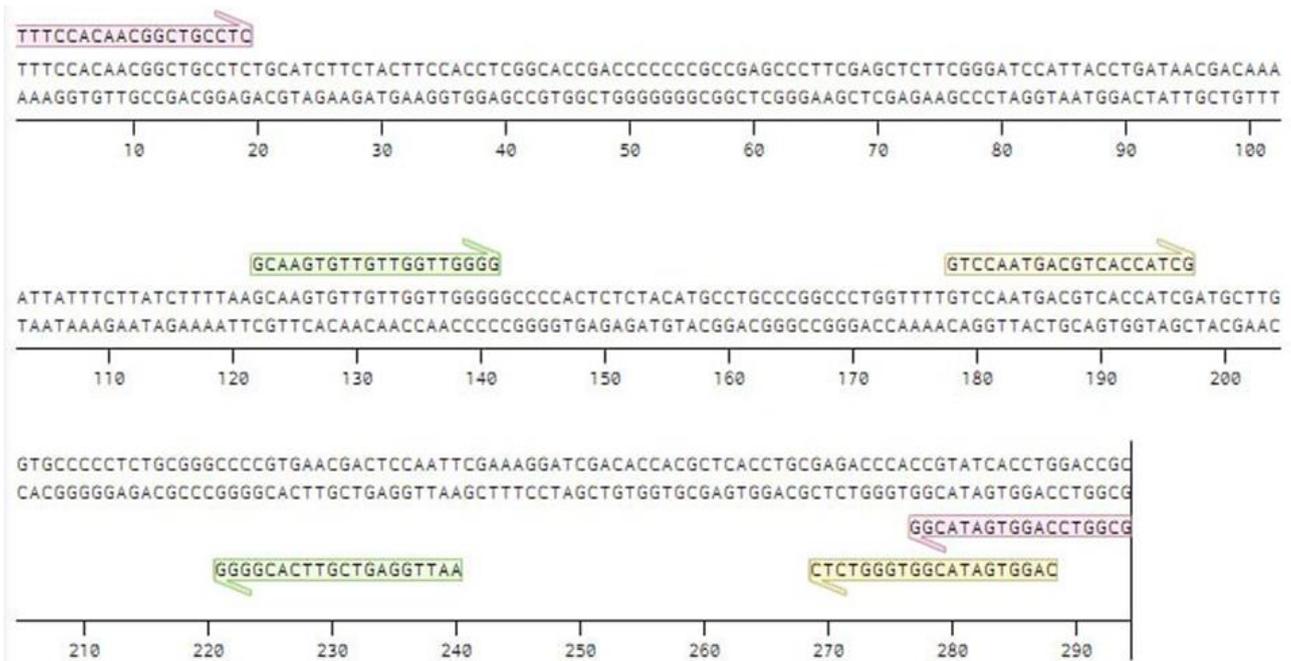


Рисунок 7 – Расположение сайтов связывания праймеров с провирусной ДНК вируса BLV (BLV – розовый, VBP – зелёный, RBP – желтый)

Представлен анализ эффективности протекания ПЦР-РВ с разработанными для выявления вируса лейкоза КРС праймерами. Эффективность реакции с использованием разработанных праймеров определена с использованием метода последовательных разбавлений образца. В качестве образца использовали генно-инженерную конструкцию, состоящую из вектора рAL2-ТА и клонированного в нём фрагмента генома вируса BLV длиной 294 пар оснований, амплифицированного с помощью праймеров BLV_f и BLV_r. Хроматограмма типового секвенирования приведена на рисунке 8.

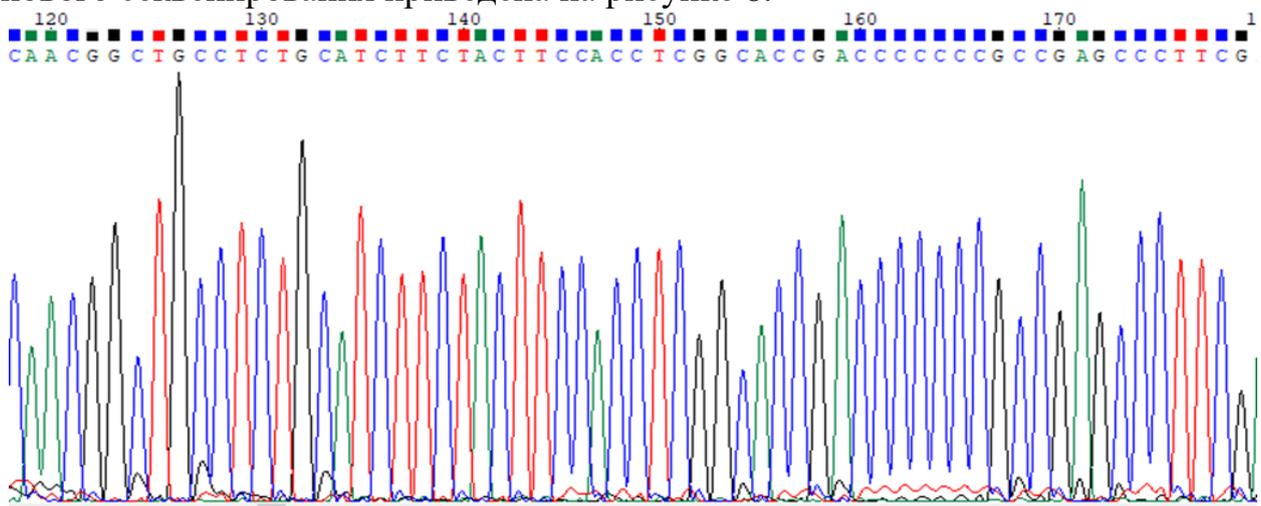


Рисунок 8 - Фрагмент хроматограммы, полученной при секвенировании рекомбинантного вектора с использованием пары стандартных праймеров M13.

Было использовано пять десятикратных разведений исходной матрицы

Стартовая концентрация плазмы составляла 0,1 нг/мкл, что соответствует числу 28074592,1 копий плазмиды и, соответственно, фрагмента вируса BLV, на микролитр. Разведения с шагом в 10 раз осуществлялись до нижнего порога концентрации в 0,00001 нг/мкл. Установлено, что амплификация клонированного в

вектор фрагмента провирусной ДНК вируса BLV наблюдалась при использовании всех трёх пар праймеров в динамическом диапазоне от 0,1 нг/мкл до 0,1 пг/мкл ДНК (рисунок 9).

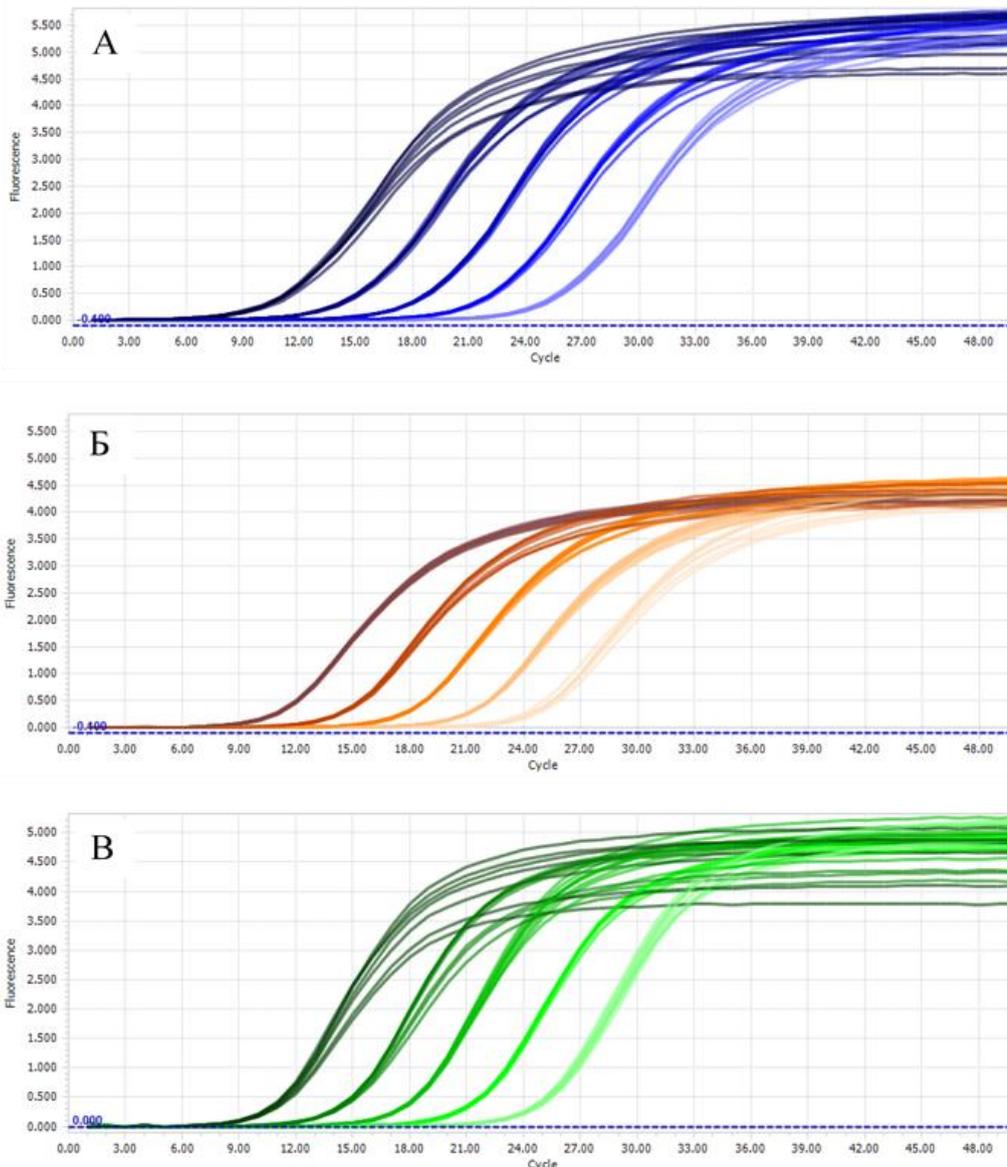


Рисунок 9 –
Зависимость
динамики
накопления
ПЦР-продуктов,
определяемого
по росту
флуоресцентного
сигнала,
от степени
разведения
стандарта.
А – праймеры
BLV,
Б – праймеры
BVP,
В – праймеры
RVP

Для дальнейших исследований была выбрана пара праймеров BVP, обеспечивающая максимальную эффективность протекания ПЦР. Установлено, что зависимость порогового цикла от исходной концентрации ДНК сохраняет линейность до предела в 0,0000001 нг/мкл, что соответствовало количеству молекул-мишеней в 28,07 копий/мкл (рисунок 10). При этом предел обнаружения провирусной ДНК вируса энзоотического лейкоза крупного рогатого скота составляет 2,8 копий на реакцию.

Дальнейшее изучение практической применимости системы разработанных праймеров проводили с использованием суммарной геномной ДНК *Bos taurus*, выделенной из молока коров с диагностированным энзоотическим лейкозом КРС. Выполнено 5 серийных 10-ти кратных разведений геномной ДНК, полученной от двух больных животных с неизвестной вирусной нагрузкой.

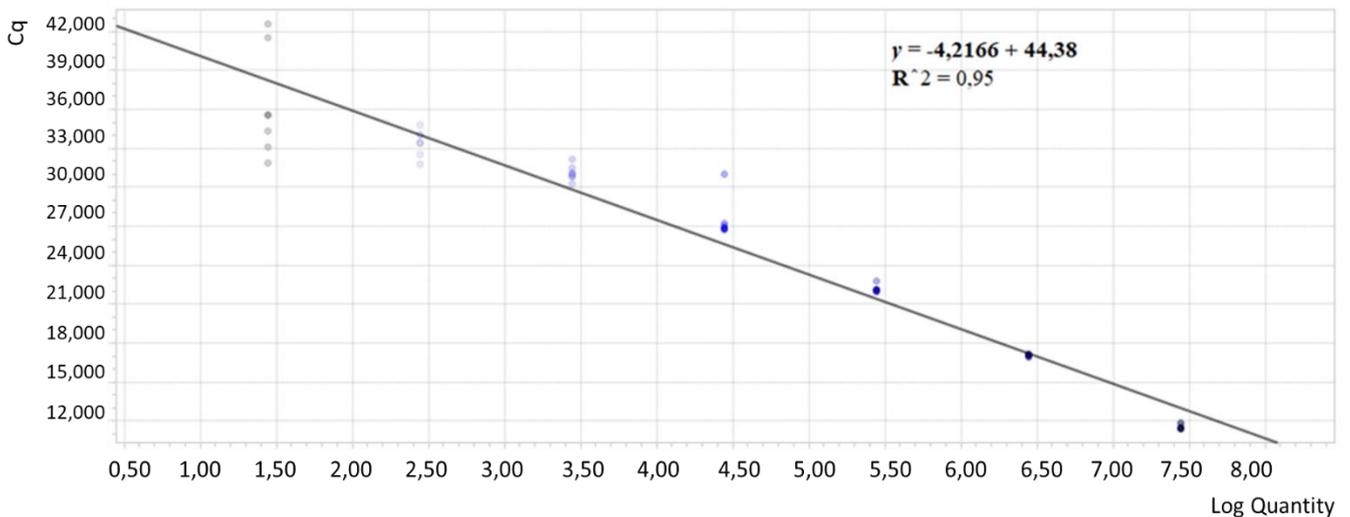


Рисунок 10 - График зависимости порогового цикла от исходной концентрации ДНК в реакционной смеси при использовании пары праймеров ВВР

В результате установлено, что испытуемые праймеры позволяют проводить эффективную амплификацию фрагмента провирусной ДНК, интегрированной в геном хозяина, в диапазоне концентрации ДНК вирусоносителя от 10 нг/мкл до 0,001 нг/мкл, что соответствует диапазону от 3090 до 0,309 копий генома *Bos taurus* на микролитр исследуемого раствора ДНК (рисунок 11).

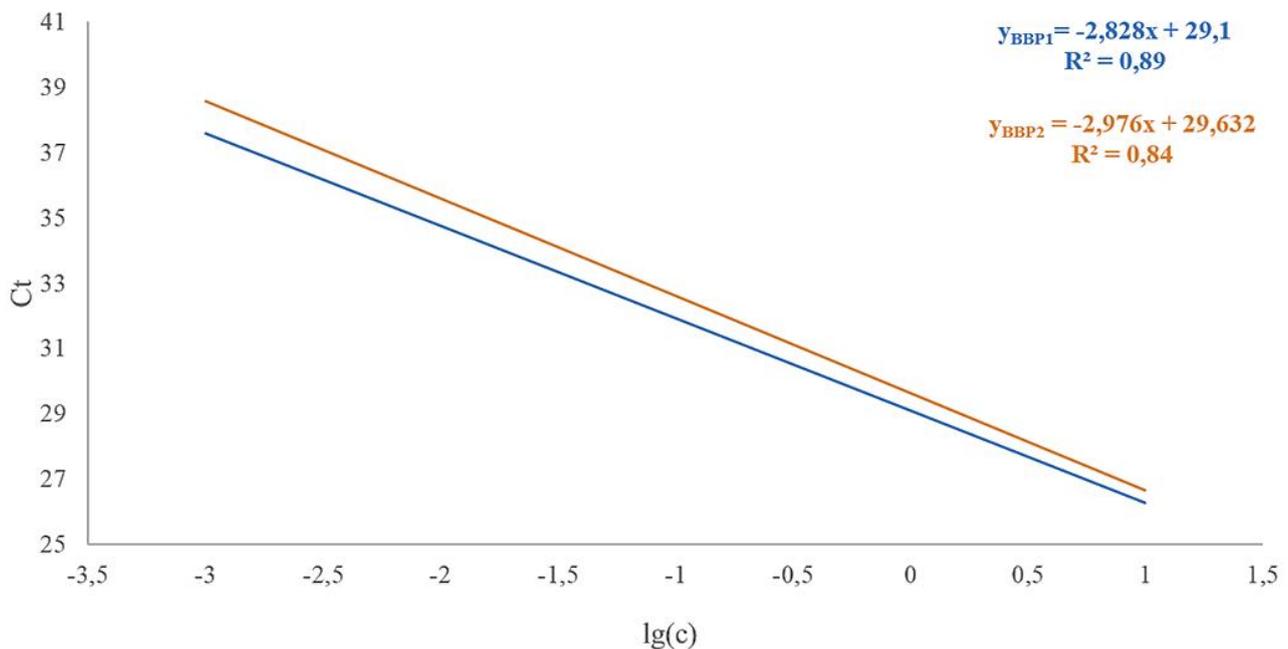


Рисунок 11 - Сравнение эффективности ПЦР при использовании пары праймеров ВВР на матрице геномной ДНК (ВВР1 – животное №1, ВВР2 – животное №2)

Приведена оценка аналитической специфичности разрабатываемой тест-системы. Исследования осуществляли посредством тестирования нуклеиновых кислот различных патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, типичных для молочной отрасли и вирусов. Результаты анализов приведены на рисунках 12 – 14.

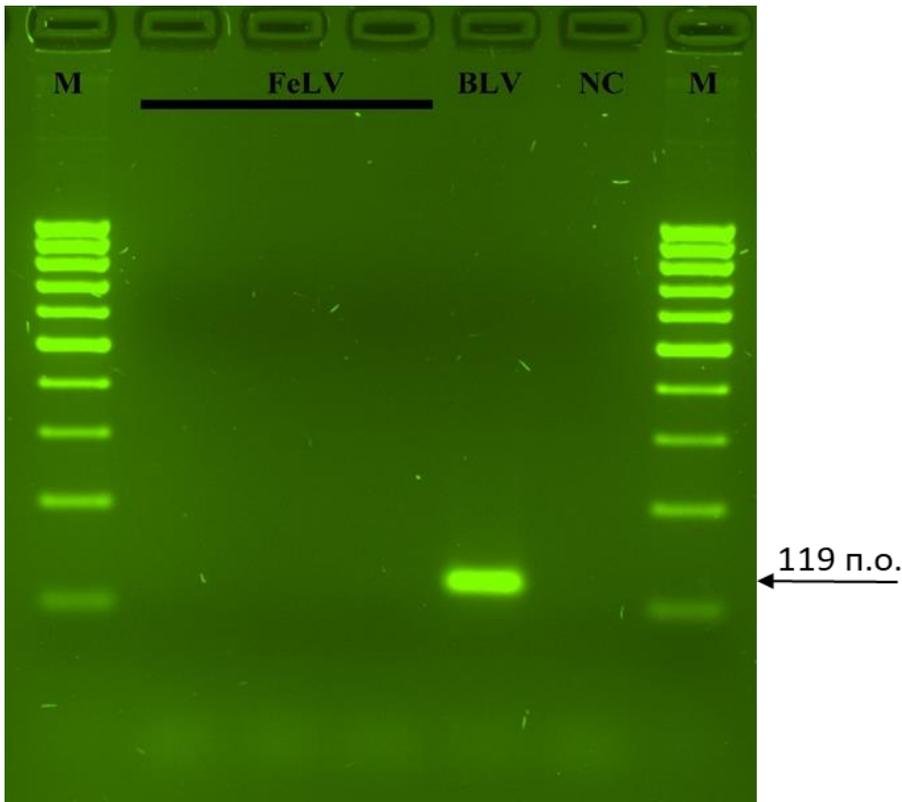


Рисунок 12 -
 Результаты типовой
 реакции
 амплификации генома
 вируса лейкоза кошек
 при помощи BLV-
 специфических
 праймеров (FeLV –
 Feline leukemia virus;
 BLV – Bovine leukemia
 virus; NC –
 отрицательный
 контроль; М – маркер
 длин ДНК 100 bp)

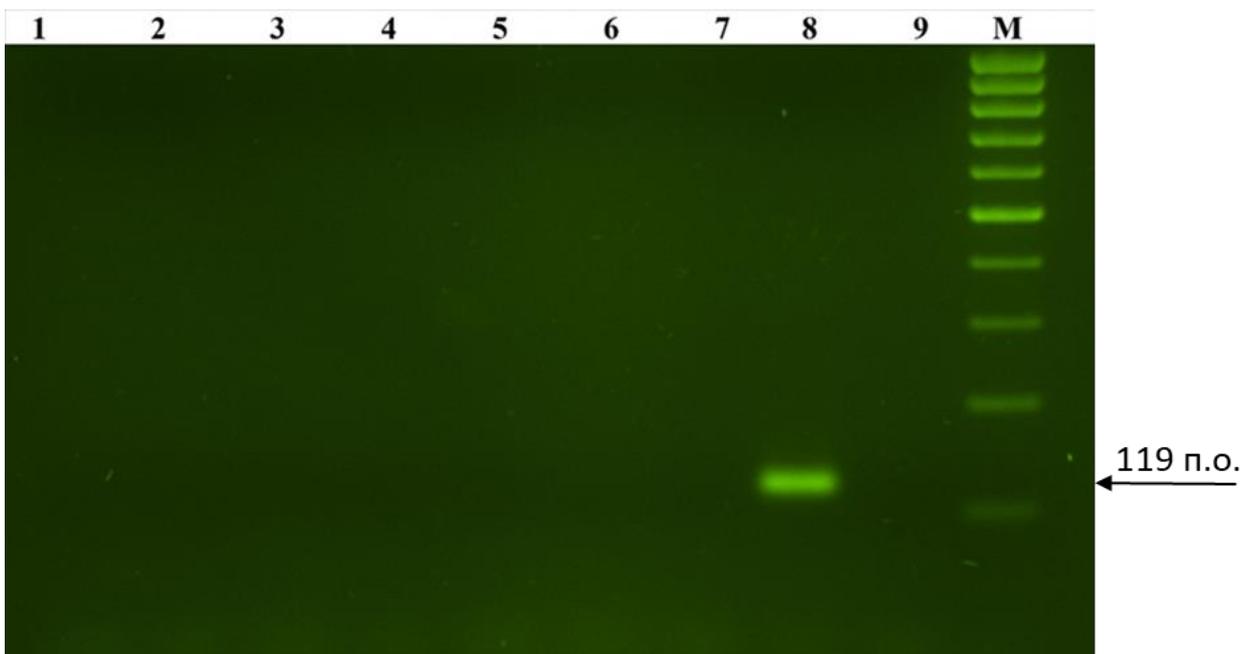


Рисунок 13 - Результаты типовой амплификации при оценке аналитической специфичности праймеров ВВР при использовании бактериальной ДНК (1 – *E.coli* 09:K99 и *E.coli* 0138:K88; 2 – *Salmonella dublin*; 3 – *Salmonella enteritidis*; 4 – *Salmonella typhimurium*; 5 – *Klebsiella pneumonia*; 6 – *Proteus vulgaris*; 7 – *Proteus mirabilis*; 8 – BLV; 9 – отрицательный контроль; М – маркер длин ДНК 100 bp)

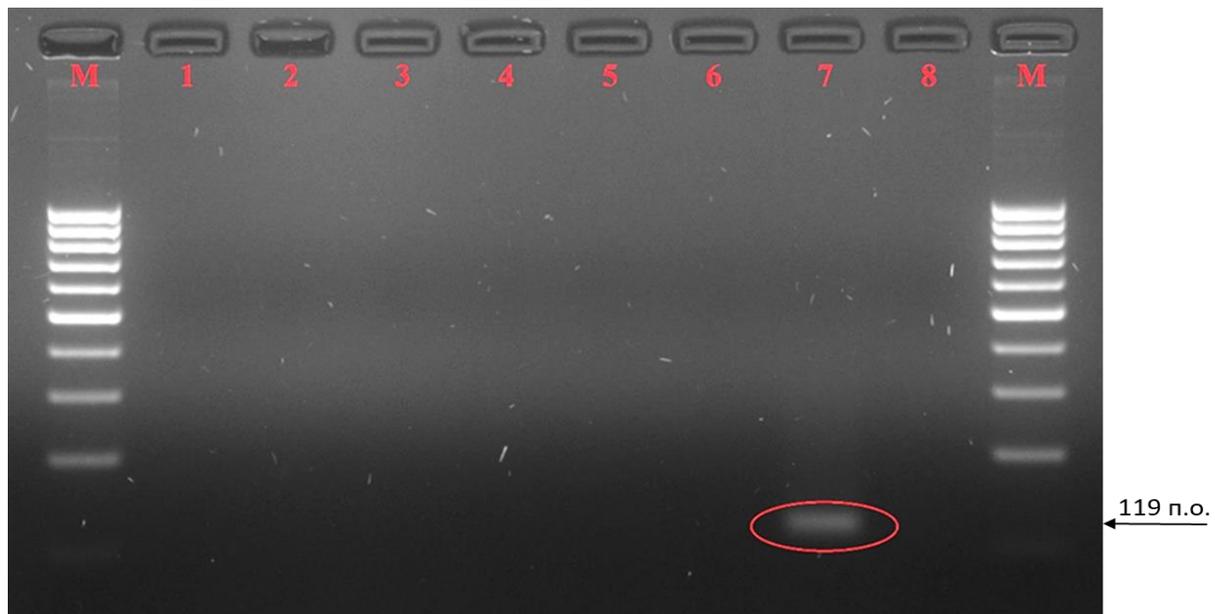


Рисунок 14 - Аналитическая специфичность тест-системы при проведении типовой ПЦР с использованием в качестве матрицы препаратов нуклеиновых кислот, полученных из культур различных вирусов КРС. Красным выделен специфический продукт длиной 119 пар оснований (1 – *Bovine alphaherpesvirus 1*; 2 – *Respirovirus bovis*; 3 – *Pestivirus bovis*; 4 – *Orthopneumovirus bovis*; 5 – *Bovine rotavirus A*; 6 – *Betacoronavirus 1*; 7 – BLV; 8 – отрицательный контроль; М – маркер длин ДНК 100 bp)

Проверка аналитической специфичности, разрабатываемой ПЦР тест-системы показала отсутствие ложноположительных результатов при тестировании ДНК 14 различных видов патогенной микрофлоры крупного рогатого скота. Таким образом, отсутствие продуктов амплификации соответствующего размера говорит о 100%-ной специфичности разрабатываемой тест-системы для исследованной панели образцов.

Проведён анализ сходимости и воспроизводимости определения значений пороговых циклов, т.е. числа циклов ПЦР, при котором наблюдается превышение пороговых значений флуоресценции. Установлено, что метрологические характеристики, описывающие сходимость результатов данного определения при использовании разработанного набора праймеров ВВР, отвечают требованиям, предъявляемым ГОСТ к тест-системам для диагностики заболеваний животных с помощью ПЦР-РВ (таблица 3).

Таблица 3 - Результаты сходимости определения провирусной ДНК вируса BLV в молочных матрицах

Источник ДНК	C_t , среднее	C_t , среднееквадратическое отклонение	CV, %
Сырое молоко	29,12	0,27	0,9
Пастеризованное молоко	28,76	0,81	2,82
Йогурт	30,38	0,57	1,89
Сливки	28,62	0,98	3,41
Обезжиренное молоко	31,17	0,21	0,68
Сухое обезжиренное молоко	25,36	0,1	0,39

Оценку воспроизводимости результатов ПЦР с использованием интеркалирующих красителей для детекции продуктов ПЦР в режиме реального времени проведена комиссионно. Среднее значение величины порогового цикла C_t составило $28,63 \pm 0,45$. Рассчитанный коэффициент вариации значений пороговых циклов составил 2,3% при допустимом по ГОСТ Р 70150-2022 уровне в 10%.

Проведено исследование стабильности выбранных праймеров в условиях циклического варьирования температуры. Для проведения испытаний стабильности разработанный набор праймеров делили на три аликвоты, которые подвергли 1, 5 и 10 циклам замораживания при минус 20 °С и оттаивания при температуре плюс 20 °С. Аликвота №1 (прошедшая только один цикл) выступала в качестве контрольной. Поскольку реактивы хранят при отрицательных температурах, каждый цикл замораживания и оттаивания включал в себя 30 минут оттаивания при комнатной температуре и 60 минут замораживания. Стабильность растворов олигонуклеотидов, входящих в состав разрабатываемого набора, оценивали по значениям коэффициентов вариации значений пороговых циклов положительных контролей, используемых для построения стандартной кривой, полученных при проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I после прохождения аликвотами соответствующего количества циклов замораживания-оттаивания. Полученные результаты приведены в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты оценки стабильности растворов после многократных циклов замораживания-оттаивания

Количество копий на реакцию	1 цикл		5 циклов		10 циклов		CV ₁₋₁₀ , %
	C_t , среднее±СКО	CV, %	C_t , среднее±СКО	CV, %	C_t , среднее±СКО	CV, %	
28125729,8	10,03±0,06	0,57	10,46±0,07	0,66	10,66±0,04	0,33	3,07
2812572,98	13,03±0,08	0,60	13,39±0,07	0,54	14,38±0,07	0,47	4,95
281257,298	16,77±0,1	0,59	17,35±0,43	2,49	17,41±0,05	0,28	1,92
28125,7298	20,07±0,06	0,28	20,45±0,12	0,59	20,43±0,07	0,35	0,96
2812,57298	24,81±0,13	0,53	25,15±0,17	0,68	25,35±0,09	0,36	1,78
281,257298	28,58±0,18	0,63	29,33±0,36	1,22	29,26±0,21	0,71	1,35
28,1257298	33,2±2,03	6,12	33,86±0,96	2,84	33,62±0,64	1,9	4,63

Результаты испытаний показали устойчивость растворов олигонуклеотидов, к используемым циклическим температурным воздействиям, о чём говорят полученные значения коэффициентов вариации C_t , не превышающие установленное значение в 10%.

В результате проведённых исследований предлагается следующий вариант комплектации прототипа тест-системы (набора реагентов) для проведения ПЦР-РВ анализа с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I:

1. «ПЦР-смесь-1», содержащая концентрированный буфер для ПЦР, содержащий 15 ммоль хлорида магния $MgCl_2$, по 0,6 ммоль/мкл каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов и термостабильную ДНК-полимеразу Taq с «горячим» стартом в количестве 5 ед./мкл (коэффициент разбавления 5);

2. «ПЦР-смесь-2», содержащую водный раствор специфических праймеров для амплификации фрагмента провирусной ДНК вируса BLV;

3. Комплект положительных стандартных образцов («ПКО С1», «ПКО С2», «ПКО С3» и «ПКО С4»), используемых для построения стандартной кривой в случае количественного определения содержания провирусной ДНК (сведения о положительных контрольных образцах приведены в таблице 4);

4. Отрицательный контрольный образец (не содержащий провирусной ДНК).

Входящие в комплект тест-системы реагенты должны быть расфасованы в пластиковые микропробирки с завинчивающимися крышками, и иметь соответствующую маркировку, обеспечивающую их идентификацию.

Таблица 5 - Параметры положительных стандартных образцов

Название	Концентрация, нг/мкл	Число копий фрагмента BLV на мкл
ПКО С1	0,1	28125729
ПКО С2	0,001	281257
ПКО С3	0,00001	2812
ПКО С4	0,0000001	28

В результате проведенных комплексных исследований разработан СТО 00419785-075-2024 «Молоко и молочная продукция. Методика выполнения измерений по выявлению и количественному определению провирусной ДНК вируса лейкоза КРС». В документе определены область применения методики, нормативные ссылки, термины и определения, требования к показателям точности измерений, требования к средствам измерений, оборудованию, лабораторной посуде, стандартным образцам, материалам и реактивам.

В разработанном СТО подробно описана методика выполнения измерений, начиная от процедур подготовки образцов до вычисления содержания провирусной ДНК *Bovine leukemia virus*. Установлены требования безопасности, охраны окружающей среды, а также квалификации операторов, для обеспечения правильного и безопасного выполнения измерений. Особое внимание уделено условиям измерений, отбору образцов, их транспортированию и хранению. Описан порядок выполнения измерений, включая обработку данных, оформление и интерпретацию результатов. СТО разработан с целью абсолютного количественного измерения числа копий провирусной ДНК вируса лейкоза коров BLV в анализируемых пробах методом полимеразной цепной реакции в реальном времени в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I в диапазоне измерений от 28 до 28125730 копий на реакцию включительно.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Проведён обзор научно-технической литературы, освещающей вопросы безопасности молока и молочных продуктов в частности от КРС, зараженного *Bovine leukemia virus*, а также структуры и функционирования генома вируса BLV, представляющих интерес для разработки ПЦР-тест-систем. Установлено, что в настоящее время отсутствуют отечественные наборы реагентов для количественной детекции провирусной ДНК в молоке и молочных продуктах, прошедших термическую обработку.
2. В ходе сравнительного анализа установлено, что набор для выделения ДНК «ДНК-сорб-С-М» (набор №1), основанный на сорбционной экстракции при использовании в качестве стартового материала молока и молочных продуктов показывает большую эффективность по сравнению с основанным на селективном осаждении набором «ДНК-Экстран-2» (набор №2) по следующим характеристикам: концентрация и чистота препаратов ДНК, ингибирование протекания полимеразной цепной реакции.
3. В результате биоинформатического анализа геномных последовательностей разработан комплект специфических олигонуклеотидов для амплификации фрагмента провирусной ДНК вируса лейкоза крупного рогатого скота, выделенной из различных источников. Установлено, что амплификация клонированного в вектор фрагмента провирусной ДНК вируса BLV наблюдалась при использовании всех трёх пар праймеров в динамическом диапазоне от 0,1 нг/мкл до 0,1 пг/мкл ДНК.
4. Доказано, что праймеры ВВР, разработанные в рамках исследования для выявления провирусной ДНК *Bovine leukemia virus*, имеют 100% специфичность, на что указывает отсутствие ложноположительных результатов при тестировании ДНК различных видов патогенной микрофлоры крупного рогатого скота. Произведена оценка ключевых метрологических характеристик разработанной пары праймеров для тест-системы: сходимость результатов амплификации составляет от 0,39% до 3,41% в зависимости от типа исходного образца, воспроизводимость результатов составила 2,3%.
5. Предложена тест-система для детекции провирусной ДНК BLV, включающий в себя все необходимые для проведения анализа реагенты и стандартные образцы. Установлено, что разработанная тест-система устойчива к многократному замораживанию-оттаиванию (коэффициент вариации C_t между 1 и 10 циклами не превышает 4,95%).
6. Разработан и утверждён СТО 00419785-075-2024 «Молоко и молочная продукция. Методика выполнения измерений по выявлению и количественному определению провирусной ДНК вируса лейкоза КРС».

Список трудов, опубликованных по материалам диссертации
Публикации в рецензируемых научных журналах и изданиях

1. Vafin, R. R. Technology of bovine leukemia virus genodiagnostics in cattle, in produced raw materials and products / R. R. Vafin, Kh. Kh. Gilmanov, A. G. Galstyan, N. S. Pryanichnikova, A. V. Bigaeva, **Е. Г. Лазарева**, V. S. Kazakova // Известия Национальной академии наук Республики Казахстан. Серия химии и технологии. – 2021. – № 1. – Р. 119-125. – DOI: 10.32014/2021.2518-1491.15.
2. Михайлова, И. Ю. Влияние генетических факторов на продуктивность коров и качество молока / И. Ю. Михайлова, **Е. Г. Лазарева**, А. В. Бигаева [и др.] // Пищевая промышленность. – 2021. – № 1. – С. 36-40. – DOI: 10.24411/0235-2486-2021-10007.
3. **Лазарева, Е. Г.** К вопросу актуальности исследования молока на наличие вируса лейкоза крупного рогатого скота / Е. Г. Лазарева // Пищевая промышленность. – 2022. – № 7. – С. 45-48. – DOI 10.52653/PPI.2022.7.7.008.
4. Сравнительная эффективность методов выделения ДНК из сухого коровьего молока / А. В. Бигаева, **Е. Г. Лазарева**, А. В. Хан, О. Ю. Фоменко // Пищевая промышленность. – 2023. – № 5. – С. 87-90. – DOI: 10.52653/PPI.2023.5.5.025.
5. **Лазарева, Е. Г.** Исследование методов экстракции ДНК из сырого молока / Е. Г. Лазарева, А. В. Хан, О. Ю. Фоменко // Молочная промышленность. – 2023. – № 5. – С. 115-116. DOI:10.21603/1019-8946-2023-5-8

Публикации в Трудах НИИ, материалах конференций, симпозиумов, в специализированных журналах

6. Бигаева, А. В. Современные молекулярно-генетические методы идентификации вируса бычьего лейкоза / А. В. Бигаева, **Е. Г. Лазарева**, И. В. Ржанова // Актуальные вопросы индустрии напитков. – 2019. – № 3. – С. 41-44. – DOI: 10.21323/978-5-6043128-4-1-2019-3-41-44.
7. **Лазарева, Е. Г.** Вирус бычьего лейкоза: потенциальные риски / Е. Г. Лазарева, А. В. Бигаева, Х. Х. Гильманов // Пищевые инновации и биотехнологии: сборник тезисов VIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 25–27 мая 2020 года / Под общей редакцией А. Ю. Просекова. Том 1. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2020. – С. 117-119.
8. **Лазарева, Е. Г.** К вопросу пробоподготовки сухого молока для выявления вируса бычьего лейкоза / Е. Г. Лазарева, Х. Х. Гильманов // Пищевые инновации и биотехнологии: сборник тезисов IX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» в рамках III международного симпозиума «Инновации в пищевой биотехнологии», Кемерово, 17–19 мая 2021 года. Том 1. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2021. – С. 446-448.
9. **Лазарева, Е. Г.** Влияние вируса лейкоза КРС на качественные показатели молока / Е. Г. Лазарева, А. В. Бигаева // Молодые исследователи агропромышленного и лесного комплексов – регионам, Вологда-Молочное, 21 апреля 2022 года. Том 2. – Вологда-Молочное: Вологодская государственная молочнохозяйственная академия им. Н.В. Верещагина, 2022. – С. 61-64.
10. **Лазарева, Е. Г.** Потенциал методики молекулярно-генетической оценки безопасности молока и молочных продуктов / Е. Г. Лазарева // Зоотехническая наука в условиях современных вызовов: Сборник трудов IV научно-практической

конференции с международным участием, Киров, 30 ноября 2022 года. – Киров: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Вятский государственный агротехнологический университет, 2022. – С. 90-94.

11. **Лазарева, Е. Г.** Анализ необходимости расширения критериев оценки безопасности молока-сырья/ Е. Г. Лазарева // Актуальные вопросы ветеринарной медицины и лабораторной диагностики: материалы международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения профессора В.В. Рудакова, Санкт-Петербург, 25–26 мая 2023 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2023. – С. 177-180.

12. **Лазарева, Е. Г.** Влияние процесса распылительной сушки коровьего молока на содержание суммарной ДНК/ Е. Г. Лазарева // Производство сыра, масла и другой молочной продукции в современных условиях. Проблемы и пути решения: сборник материалов Международной молочной недели. 20–22 июня 2023 г. – Углич, ВНИИМС – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, 2023. – С. 155-158

13. **Лазарева, Е. Г.** Диагностирование качества молока с помощью метода ПЦР: новый подход к анализу / Е. Г. Лазарева // Пищевые инновации и биотехнологии: сборник тезисов XI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 18 мая 2023 года / Под общей редакцией А.Ю. Просекова. Том 1. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2023. С 396-397

14. **Лазарева, Е. Г.** Оценка влияния технологических процессов на ДНК молока и молочных продуктов / Е. Г. Лазарева, А. В. Хан // Международная научно-практическая конференция молодых учёных и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук. – 2023. – № 1. – С. 163-166.

15. **Лазарева, Е. Г.** Идентификация *Bovine Leukemia Virus* (BLV) в молоке: обзор предметного поля / Е. Г. Лазарева, О. Ю. Фоменко // Пищевая Метаинженерия. – 2023. – Т. 1, № 1. – С. 89-106. – DOI: 10.1234/fme.2023.4.

Список сокращений и условных обозначений

КРС – крупный рогатый скот.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

СОМ – сухое обезжиренное молоко.

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота.

НК – нуклеиновая кислота.

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени.

BLV

ВБЛ

ВЛКРС

} вирус энзоотического лейкоза крупного рогатого скота.

ЛКРС – лейкоз крупного рогатого скота.

РНК – рибонуклеиновая кислота.

СКО – среднее квадратическое отклонение.

М.д. – массовая доля.

П.о. – пары оснований.

FeLV – вирус лейкоза кошек.