

# СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ 146S КОМПОНЕНТА ВИРУСА ЯЩУРА В СЫРЬЕ ДЛЯ ВАКЦИНЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИИ И ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

М. И. Доронин<sup>1</sup>, А. М. Тимина<sup>2</sup>, Д. А. Лозовой<sup>3</sup>, В. А. Стариков<sup>4</sup>, Д. В. Михалишин<sup>4</sup>, Н. Н. Медведева<sup>6</sup>, А. В. Борисов<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Научный сотрудник, кандидат биологических наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: doronin@arriah.ru

<sup>2</sup> Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: timina@arriah.ru

<sup>3</sup> Директор, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: lozovoy@arriah.ru

<sup>4</sup> Ведущий научный сотрудник, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: starikov@arriah.ru

<sup>5</sup> Заведующий лабораторией, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: mihalishindv@arriah.ru

<sup>6</sup> Биолог, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: medvedeva@arriah.ru

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

## РЕЗЮМЕ

Разработан способ определения концентрации 146S компонента вируса ящура в сырье для вакцины с применением метода обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Предложена отрицательная регрессионная модель вида  $C_{146S} = (30,269 - C_i)/4,155$ , позволяющая определять значение концентрации 146S частиц вируса ящура на основании установленной величины порогового цикла амплификации ( $C_i$ ). Экспериментально доказано, что количество 146S компонента, определенного методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием разработанной регрессионной модели и заложенного в прививную дозу противоящурной вакцины, позволяет защитить вакцинированных животных от генерализованной формы ящура типов А, О, Азия-1. Метод ОТ-ПЦР-РВ является высокочувствительным, позволяет быстро и с высокой степенью достоверности оценивать концентрацию 146S антигена в противоящурной вакцине. Способ определения количества 146S частиц методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием регрессионной модели является надежным и характеризуется высокой корреляцией (95,5–99,0%) с результатами реакции связывания комплемента.

Ключевые слова: вирус ящура, концентрация 146S компонента, ОТ-ПЦР-РВ, пороговый цикл амплификации.

## ВВЕДЕНИЕ

Ящур – высококонтагиозное везикулярное вирусное заболевание парнокопытных животных, которое относится к категории трансграничных инфекций [3, 11]. Возбудителем является безоболочечный РНК-содержащий вирус, принадлежащий к порядку *Picornavirales*, роду *Aphthovirus* семейства *Picornaviridae* [11]. Вирус ящура характеризуется высокой антигенной изменчивостью за счет мутаций в генах капсидных белков и представлен 7 типами и множеством подтипов [11, 13].

Ящур наносит огромный экономический ущерб, который связан с затратами на ликвидацию болезни и введением строгих ограничений, налагаемых на внутреннюю и международную торговлю продукцией животноводства. Система мер для борьбы с ящуром и его

профилактики предусматривает массовую иммунизацию животных, а также контроль уровня напряженности поствакцинального иммунитета [6, 13].

При репродукции в суспензионной перевиваемой клеточной линии из почки новорожденного сирийского хомяка (ВНК-21/2-17) вирус ящура образует 4 варианта специфических компонентов: 146S компонент (полные частицы), состоящий из одной молекулы вирусной РНК и 60 копий полипептида, каждая из которых представляет собой комплекс белков  $VP_1$ - $VP_2$ - $VP_3$ - $VP_4$ ; 75S частицы, лишенные РНК и включающие в себя 60 копий полипептида  $VP_1$ - $VP_3$ - $VP_4$ ; 12S компонент, состоящий из белков  $VP_1$ ,  $VP_2$ ,  $VP_3$ ; 3,8S субъединицы, представленные неструктурным белком  $VP_9$  [8, 10].

При производстве противоящурных вакцин большое значение имеет концентрация в исходном сырье 146S частиц, обладающих высокой иммуногенностью и устойчивостью [3, 12]. Поэтому каждую партию сырья для производства противоящурных вакцин исследуют на определение концентрации 146S компонента, применяя количественный вариант реакции связывания комплемента (РСК). Однако данный метод имеет ряд недостатков: трудоемкость и продолжительность проводимого анализа (не менее 2–3 сут), особенно при одновременном исследовании большого количества проб [1].

В связи с этим целесообразно было предложить способ определения концентрации полных частиц вируса ящура в сырье для вакцины на основе обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), который отличается высокой чувствительностью и специфичностью, является более экспрессным методом, что позволит одновременно исследовать несколько десятков проб вирусосодержащего сырья и сократить время проведения анализа до 4 ч [7, 9]. Учитывая преимущества ОТ-ПЦР-РВ по сравнению с РСК, актуально установить отрицательную линейную корреляцион-

Таблица 1

Соотношение результатов определения концентрации 146S компонента вируса ящура в РСК и величины порогового цикла амплификации в ОТ-ПЦР-РВ

$n = 3$

| Исследуемый образец                                                                              | Концентрация<br>146S компонента в РСК, мкг/см <sup>3</sup> |       |       |                                    | Пороговый цикл амплификации<br>ОТ-ПЦР-РВ |          |          |                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-------|-------|------------------------------------|------------------------------------------|----------|----------|-------------------------------------|
|                                                                                                  | $C_1$                                                      | $C_2$ | $C_3$ | $C_{cp}$                           | $C_{11}$                                 | $C_{12}$ | $C_{13}$ | $C_{1cp}$                           |
| Контрольные образцы                                                                              |                                                            |       |       |                                    |                                          |          |          |                                     |
| Положительный контроль                                                                           |                                                            |       |       |                                    |                                          |          |          |                                     |
| Концентрация 146S компонента:                                                                    |                                                            |       |       |                                    |                                          |          |          |                                     |
| 0,1 мкг/см <sup>3</sup>                                                                          | 0,10                                                       | 0,10  | 0,15  | $0,12 \pm 0,03$<br>( $p < 0,005$ ) | 29,78                                    | 29,84    | 29,73    | $29,78 \pm 0,06$<br>( $p < 0,005$ ) |
| 0,5 мкг/см <sup>3</sup>                                                                          | 0,60                                                       | 0,58  | 0,60  | $0,59 \pm 0,01$<br>( $p < 0,001$ ) | 27,84                                    | 27,81    | 27,72    | $27,79 \pm 0,06$<br>( $p < 0,005$ ) |
| 1,0 мкг/см <sup>3</sup>                                                                          | 1,05                                                       | 1,10  | 1,10  | $1,08 \pm 0,03$<br>( $p < 0,001$ ) | 25,78                                    | 25,84    | 25,86    | $25,83 \pm 0,04$<br>( $p < 0,001$ ) |
| 2,0 мкг/см <sup>3</sup>                                                                          | 1,90                                                       | 1,85  | 2,10  | $1,95 \pm 0,13$<br>( $p < 0,005$ ) | 22,09                                    | 22,14    | 22,19    | $22,14 \pm 0,05$<br>( $p < 0,005$ ) |
| 3,0 мкг/см <sup>3</sup>                                                                          | 3,00                                                       | 2,91  | 3,13  | $3,01 \pm 0,11$<br>( $p < 0,005$ ) | 17,77                                    | 17,69    | 17,81    | $17,76 \pm 0,06$<br>( $p < 0,005$ ) |
| 4,0 мкг/см <sup>3</sup>                                                                          | 4,10                                                       | 3,95  | 3,95  | $4,00 \pm 0,09$<br>( $p < 0,005$ ) | 13,66                                    | 13,6     | 13,74    | $13,67 \pm 0,07$<br>( $p < 0,005$ ) |
| 5,0 мкг/см <sup>3</sup>                                                                          | 4,85                                                       | 5,00  | 4,95  | $4,93 \pm 0,08$<br>( $p < 0,005$ ) | 9,78                                     | 9,88     | 9,85     | $9,84 \pm 0,06$<br>( $p < 0,005$ )  |
| Отрицательный контроль                                                                           | н/о                                                        | н/о   | н/о   | н/о                                | н/в                                      | н/в      | н/в      | н/в                                 |
| Неинактивированный антиген для противоящурной вакцины                                            |                                                            |       |       |                                    |                                          |          |          |                                     |
| Сырье для эмульсионной вакцины против ящура типа А из штамма А № 2029/Турция/2006                | 1,39                                                       | 1,55  | 1,51  | $1,48 \pm 0,08$<br>( $p < 0,01$ )  | 23,91                                    | 23,74    | 23,79    | $23,81 \pm 0,09$<br>( $p < 0,005$ ) |
| Сырье для эмульсионной вакцины против ящура типа О из штамма О № 2212/Приморский/2014            | 0,92                                                       | 1,10  | 1,06  | $1,03 \pm 0,09$<br>( $p < 0,01$ )  | 25,91                                    | 26,16    | 25,99    | $26,02 \pm 0,13$<br>( $p < 0,005$ ) |
| Сырье для эмульсионной вакцины против ящура типа Азия-1 из штамма Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011 | 3,31                                                       | 3,09  | 3,27  | $3,22 \pm 0,12$<br>( $p < 0,01$ )  | 17,01                                    | 16,68    | 16,64    | $16,78 \pm 0,20$<br>( $p < 0,005$ ) |

н/о – 146S компонент вируса ящура не обнаружен;

н/в – геном вируса ящура не выявлен.

ную зависимость между содержанием 146S компонента вируса ящура в сырье для вакцины и пороговым циклом амплификации ( $C_t$ ) в виде регрессионной модели. В ОТ-ПЦР-РВ значение  $C_t$  зависит от концентрации вируса ящура, в свою очередь, количество копий вирусной РНК пропорционально содержанию 146S частиц. Экспериментальное подтверждение корреляции результатов ОТ-ПЦР-РВ и РСК позволит разработать быстрый и экономичный способ определения концентрации полных вирусных частиц в сырье для вакцины.

Целью исследования была оценка возможности применения метода ОТ-ПЦР-РВ для определения концентрации 146S компонента вируса ящура в сырье для вакцины.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирус.** В работе использовали культуральный вирус ящура вакцинных штаммов А № 2029/Турция/2006, О № 2212/Приморский/2014, Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011, которые депонированы в Коллекцию штам-

мов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ». Репродукцию вируса осуществляли в суспензионной перевиваемой культуре клеток ВНК-21/2-17.

**Реакция связывания комплемента (РСК).** Для определения концентрации 146S компонента (в мкг/см<sup>3</sup>) применяли количественный вариант РСК с использованием антигена вируса ящура и штаммспецифических сывороток крови морских свинок на указанные выше штаммы вируса ящура [1].

**Выделение РНК** вируса ящура из сырья для вакцины проводили с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя.

**ОТ-ПЦР-РВ.** Обнаружение генома вируса ящура и определение концентрации 146S частиц в вирусосодержащей суспензии проводили с помощью ОТ-ПЦР-РВ. Для проведения анализа использовали праймеры и TagMan ДНК-зонд, рассчитанные на высококонсервативный участок 3D-гена вируса ящура. Результаты реакции анализировали с помощью программного обеспечения Rotor-Gene 1.8.17.5, определяющего величину порогового цикла амплификации, которая об-



Рис. График корреляционной зависимости пороговых циклов амплификации и концентрации 146S компонента культурального вируса ящура ( $n = 3$ )

ратно пропорциональна количеству копий вирусной РНК и концентрации 146S компонента [4].

**Вакцины.** В работе использовали 3 эмульсионные моновалентные вакцины «АРИАХ-ВАК» против ящура типов А, О, Азия-1. Вакцина против ящура типа А, по результатам РСК, содержала 146S компонент в количестве  $6,15 \pm 0,11$  мкг в дозе, против типа О –  $6,03 \pm 0,12$  мкг в дозе, против типа Азия-1 –  $6,43 \pm 0,12$  мкг в дозе; по данным ОТ-ПЦР-РВ, против типа А – 6,20 мкг в дозе, против типа О – 6,12 мкг в дозе, против типа Азия-1 – 6,50 мкг в дозе.

**Животные.** В исследовании использовали подсвинков пород ландрас и дюрок массой 30–40 кг в количестве 21 головы.

**Иммунизация и контрольное заражение животных.** Все животные были разделены на 3 опытные группы по 5 голов в каждой. Животных первой группы иммунизировали эмульсионной моновалентной вакциной против ящура типа А, второй – против ящура типа О, третьей – против ящура типа Азия-1. Также были сформированы 3 контрольные группы по 2 головы в каждой для контроля вируса ящура типов А, О, Азия-1. Вакцину вводили внутримышечно в верхнюю треть шеи в дозе  $2 \text{ см}^3$  без разведения. Контрольное заражение в первой группе осуществляли адаптированным к подсвинкам гомотичным штаммом А № 2029/Турция/2006, во второй группе – штаммом О № 2212/Приморский/2014, в третьей группе – штаммом Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011 под слизистую языка в дозе  $10^4 \text{ ИД}_{50}/0,2 \text{ см}^3$  через 28 сут после иммунизации. Патологоанатомический осмотр животных проводили через 7 сут после заражения.

**Определение титра антител в сыворотках крови животных** после иммунизации осуществляли с помощью реакции нейтрализации в соответствии с утвержденными методическими указаниями [2].

**Статистическая обработка данных.** Полученные результаты обрабатывали, определяя средние арифметические значения, степень достоверности статистической разницы между средними величинами, определенными по разностному методу Стьюдента-Фишера, а также коэффициент детерминации [5]. Построение диаграмм проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2010.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы для выявления связи между значениями концентрации 146S частиц в РСК и пороговых циклов амплификации в ОТ-ПЦР-РВ подготавливали калибровочную панель контрольных положительных образцов с содержанием РНК вируса ящура, эквивалентным следующим концентрациям 146S компонента: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкг/см³, а также отрицательный контроль, представляющий собой суспензию клеток линии ВНК-21/2-17, не зараженную вирусом ящура. Из каждого образца отбирали по 2 пробы: одну – для определения величины порогового цикла амплификации ( $C_t$ ) в ОТ-ПЦР-РВ, другую – для измерения концентрации 146S компонента вируса ящура ( $C_{146S}$ ) в РСК. Эксперимент повторяли 3 раза. По итогам анализа получали выборки параллельно установленных значений концентрации 146S частиц и пороговых циклов амплификации, представленных в таблице 1.

Из данных таблицы 1 видно, что значения пороговых циклов амплификации для всех разведений 146S компонента вируса ящура с концентрациями от 0,1 до 5,0 мкг/см³ находились в диапазоне от  $29,78 \pm 0,06$  до  $9,84 \pm 0,06$  соответственно. В отрицательном контрольном образце геном вируса ящура не выявлен. На основании полученных данных была выявлена отрицательная линейная корреляционная зависимость между  $C_{146S}$  и  $C_t$  в виде регрессионной модели  $C_{146S} = (30,269 - C_t) / 4,155$ , представленной графиком линейной функции на рисунке. Фактический коэффициент детерминации ( $R^2$ ) для данной зависимости стремится к единице и составляет 0,9891, что подтверждает высокую достоверность полученных результатов.

На следующем этапе работы проводили тестирование предложенной регрессионной модели, определяя концентрацию 146S частиц в неинaktivированном сырье для вакцин против ящура трех типов (А, О, Азия-1) с помощью метода ОТ-ПЦР-РВ.

Исследовали неинaktivированный вирусосодержащий материал для производства вакцины против ящура типа А из штамма А № 2029/Турция/2006. Пробу параллельно анализировали в трех повторениях методом ОТ-ПЦР-РВ и в РСК. Полученные результаты отражены в таблице 1, из которой следует, что значение порогового цикла амплификации составило  $23,81 \pm 0,09$ . В соответствии с регрессионной моделью  $C_{146S} = (30,269 - C_t) / 4,155$  значение концентрации 146S компонента в данной пробе –  $1,55 \pm 0,02$  мкг/см³, что соотносится с данными РСК ( $1,48 \pm 0,08$  мкг/см³). Иными словами, разработанная модель с помощью метода ОТ-ПЦР-РВ позволяет оценивать содержание 146S компонента в неинaktivированном сырье для вакцины против ящура типа А.

Полученный материал инаktivировали, концентрировали в 2 раза и определяли количество 146S антигена в расчете на дозу  $2 \text{ см}^3$ . Результаты исследования отражены в таблице 2, из которой видно, что, по теоретическим расчетам ОТ-ПЦР-РВ, с учетом исходного содержания полных вирусных частиц и кратности концентрирования, количество 146S компонента в инаktivированном материале – 6,20 мкг в дозе, что соотносится с экспериментальными данными РСК ( $6,15 \pm 0,11$  мкг в дозе).

Полученной моновалентной эмульсионной вакциной против ящура типа А прививали 5 подсвинков

Таблица 2

Оценка иммуногенности трех инактивированных эмульсионных моновалентных вакцин против ящура типов А, О, Азия-1

n = 5

| Группа животных | Наименование вакцины                                                      | Концентрация 146S компонента вируса ящура в вакцине, мкг в дозе |                                     | Номер животного | Титр антител против вируса ящура, $\log_2$ | Наличие генерализации |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|--------------------------------------------|-----------------------|
|                 |                                                                           | РСК                                                             | по теоретическим расчетам ОТ-ПЦР-РВ |                 |                                            |                       |
| Опытная № 1     | Вакцина против ящура типа А из штамма А № 2029/Турция/2006                | $6,15 \pm 0,11$<br>( $p < 0,010$ )                              | 6,20                                | 1               | 6,00                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 2               | 6,25                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 3               | 6,00                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 4               | 6,25                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 5               | 6,00                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | $M \pm m$       | $6,10 \pm 0,14$ ( $p < 0,010$ )            |                       |
| Контрольная № 1 | Не иммунизировали                                                         | –                                                               | –                                   | 6               | <0,5                                       | +                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 7               | <0,5                                       | +                     |
| Опытная № 2     | Вакцина против ящура типа О из штамма О № 2212/Приморский/2014            | $6,03 \pm 0,12$<br>( $p < 0,010$ )                              | 6,12                                | 8               | 6,25                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 9               | 6,00                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 10              | 5,75                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 11              | 6,00                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 12              | 5,75                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | $M \pm m$       | $5,95 \pm 0,21$ ( $p < 0,010$ )            |                       |
| Контрольная № 2 | Не иммунизировали                                                         | –                                                               | –                                   | 13              | <0,5                                       | +                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 14              | <0,5                                       | +                     |
| Опытная № 3     | Вакцина против ящура типа Азия-1 из штамма Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011 | $6,43 \pm 0,12$<br>( $p < 0,010$ )                              | 6,50                                | 15              | 6,25                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 16              | 6,25                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 17              | 6,00                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 18              | 6,50                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 19              | 6,25                                       | –                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | $M \pm m$       | $6,25 \pm 0,18$ ( $p < 0,010$ )            |                       |
| Контрольная № 3 | Не иммунизировали                                                         | –                                                               | –                                   | 20              | <0,5                                       | +                     |
|                 |                                                                           |                                                                 |                                     | 21              | <0,5                                       | +                     |

Указаны значения титров антител в сыворотках крови животных, иммунизированных противоящурной вакциной без разведения.

и оценивали ее иммуногенную активность по стандартной методике. При иммунизации животных первой группы титр накопления вируснейтрализующих антител в организме животных составил  $6,10 \pm 0,14 \log_2$  (табл. 2). По итогам контрольного заражения животных экспериментально доказали, что количество иммуногенных компонентов, заложенных в дозу противоящурной вакцины с помощью ОТ-ПЦР-РВ, позволяло защитить 5 из 5 иммунизированных свиней от генерализованной формы ящура типа А. У всех контрольных животных наблюдали генерализацию ящура.

На следующем этапе работы исследовали неинaktivированный вирусосодержащий материал для вакцины против ящура типа О из штамма О № 2212/Приморский/2014 с помощью РСК и в ОТ-ПЦР-РВ с применением предложенной регрессионной модели, значение  $C_i$  для

образца составило  $26,02 \pm 0,13$  (табл. 1). В соответствии с разработанной моделью  $C_{146S} = (30,269 - C_i)/4,155$  концентрация 146S компонента –  $1,02 \pm 0,03$  мкг/см<sup>3</sup>, что соотносится с данными РСК ( $1,03 \pm 0,09$  мкг/см<sup>3</sup>). На основании этого предложенная модель с применением метода ОТ-ПЦР-РВ позволяет оценивать содержание 146S компонента в неинaktivированном антигене для вакцины против ящура типа О.

Полученный материал инактивировали, концентрировали в 3 раза и определяли количество 146S антигена в дозе вакцины 2 см<sup>3</sup>. Результаты исследования представлены в таблице 2, из которой следует, что по теоретическим расчетам ОТ-ПЦР-РВ, с учетом содержания полных вирусных частиц и кратности концентрирования, содержание 146S компонента – 6,12 мкг в дозе, что соотносится с данными РСК ( $6,03 \pm 0,12$  мкг в дозе).

Изготовленной эмульсионной моновалентной вакциной против ящура типа О вакцинировали 5 свиней. В результате иммунизации животных второй группы титр накопления вируснейтрализующих антител составил  $5,95 \pm 0,21 \log_2$  (табл. 2). Проведя контрольное заражение животных, доказали, что количество иммуногенных компонентов, заложенных в дозу противоящурной вакцины с помощью ОТ-ПЦР-РВ, позволяет защитить 5 из 5 иммунизированных свиней от генерализованной формы ящура типа О. У всех контрольных животных отмечали генерализацию заболевания.

Далее с помощью ОТ-ПЦР-РВ с использованием разработанной регрессионной модели и РСК исследовали неинактивированный вирусосодержащий материал для изготовления вакцины против ящура типа Азия-1 из штамма Азия-1 № 2145/Таджикистан/2011. Величина порогового цикла амплификации для пробы составила  $16,78 \pm 0,20$  (табл. 1). В соответствии с регрессионной моделью вида  $C_{146S} = (30,269 - C_f)/4,155$  концентрация 146S компонента равна  $3,25 \pm 0,05$  мкг/см<sup>3</sup>, что соотносится с результатами РСК ( $3,22 \pm 0,12$  мкг/см<sup>3</sup>). Таким образом, предложенная модель с использованием метода ОТ-ПЦР-РВ дает возможность определять содержание 146S компонента в неинактивированном сырье для вакцины против ящура типа Азия-1.

Полученный материал инактивировали и оценивали количество 146S антигена в дозе 2 см<sup>3</sup>. Результаты исследования представлены в таблице 2, в которой указано, что, по теоретическим расчетам ОТ-ПЦР-РВ, с учетом исходного содержания полных вирусных частиц и кратности концентрирования, содержание 146S компонента – 6,50 мкг в дозе, что согласуется с результатами РСК ( $6,43 \pm 0,12$  мкг в дозе).

Полученную эмульсионную моновалентную вакцину использовали для иммунизации 5 подсвинков. При иммунизации животных третьей группы титр накопления противоящурных антител составил  $6,25 \pm 0,18 \log_2$  (табл. 2). Проведя контрольное заражение животных, доказали, что количество 146S компонента, определенное в ОТ-ПЦР-РВ с помощью регрессионной модели и заложенное в дозу противоящурной вакцины, позволяет защитить 5 из 5 иммунизированных свиней от генерализованной формы ящура типа Азия-1. У всех контрольных животных наблюдали генерализацию ящура.

Таким образом, способ определения концентрации 146S компонента методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием регрессионной модели  $C_{146S} = (30,269 - C_f)/4,155$  является надежным и быстрым. Тест-система для выявления вакцинных штаммов вируса ящура высокочувствительна и обеспечивает высокую корреляцию (95,5–99,0%) с результатами РСК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен новый подход к определению концентрации 146S частиц в сырье для вакцины против ящура разных типов с применением метода ОТ-ПЦР-РВ и разработанной на его основе регрессионной модели. По результатам РСК и ОТ-ПЦР-РВ между содержанием 146S компонента и пороговым циклом амплификации выявлена отрицательная корреляционная зависимость в виде регрессии, представленной графиком линейной функции  $C_{146S} = (30,269 - C_f)/4,155$ . В ОТ-ПЦР-РВ значение порогового цикла зависит от концентрации РНК вируса ящура, в свою очередь, количество копий вирусной РНК пропорционально содержанию 146S час-

тиц. Экспериментальное подтверждение корреляции результатов ОТ-ПЦР-РВ и РСК позволило разработать быстрый и экономичный способ определения концентрации полных вирусных частиц в сырье для вакцины.

В результате исследования было доказано, что количество 146S компонента, определенного в ОТ-ПЦР-РВ с помощью предложенной регрессионной модели и заложенного в прививную дозу противоящурной вакцины, позволяет защитить вакцинированных животных от генерализованной формы ящура типов А, О, Азия-1.

Метод ОТ-ПЦР-РВ является высокочувствительным, позволяет быстро и с высокой степенью достоверности оценивать концентрацию 146S антигена в противоящурной вакцине. Предложенный способ определения количества 146S частиц является надежным и характеризуется высокой корреляцией (95,5–99,0%) данных с результатами РСК.

Показано, что данный способ можно применять для определения содержания 146S компонента культурального вируса ящура в сырье для вакцины.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко А. Ф. Качественный и количественный иммунохимический анализ вирусных белков. – Суздаль, 1994. – 92 с.
2. Методические указания по постановке реакции нейтрализации для определения иммунного статуса животных при ящуре: утв. МСХ СССР 26.12.1983.
3. Пономарев А. П., Узюмов В. Л., Груздев К. Н. Вирус ящура: структура, биологические и физико-химические свойства. – Владимир: Фолиант, 2006. – 250 с.
4. Применение ОТ-ПЦР-РВ для определения концентрации 146S компонента вируса ящура типов О/Саудовская Аравия и Asia-1/Shamir в полуфабрикате вакцины / Д. А. Лозовой, А. А. Шишкова, Д. В. Михалишин [и др.] // Ветеринария. – 2017. – № 6. – С. 57–61.
5. Статистические методы анализа в клинической практике / П. О. Румянцев, В. А. Саенко, У. В. Румянцева, С. Ю. Чекин. – Обнинск: ГУ РМНЦ РАМН. – 46 с. – URL: <http://www.kantiana.ru/medicinal/help/StatMethodsInClinics.pdf>.
6. Annual OIE/FAO FMD Reference Laboratory Network Report. – Pirbright, 2007. – URL: [http://www.wrlfmd.org/ref\\_labs/fmd\\_ref\\_lab\\_reports.htm](http://www.wrlfmd.org/ref_labs/fmd_ref_lab_reports.htm).
7. Enhanced laboratory diagnosis of foot and mouth disease by real-time polymerase chain reaction / A. E. Shaw, S. M. Reid, D. P. King [et al.] // Rev. Sci. Tech. OIE. – 2004. – Vol. 23, No. 3. – P. 1003–1009.
8. Cartwright B., Chapman W. G., Brown F. Serological and immunological relationships between the 146S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus // J. Gen. Virol. – 1980. – Vol. 50, No. 2. – P. 369–375.
9. Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease / A. E. Shaw, S. M. Reid, K. Ebert [et al.] // J. Virol. Methods. – 2007. – Vol. 143, No. 1. – P. 81–85. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.02.009>.
10. Lubroth J., Rodriguez L., Dekker A. Vesicular diseases // Diseases of Swine / ed. B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, D. J. Taylor. – 9th ed. – Ames, Iowa, 2006. – P. 517–536.
11. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals / OIE. – 7th ed. – Paris, France, 2012. – Vol. 1, Chap. 2.1.5. – P. 166–169.
12. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease / S. Alexandersen, Z. Zhang, A. I. Donaldson, A. J. M. Garland // J. Comp. Pathol. – 2003. – Vol. 129, No. 1. – P. 1–36.
13. Wernike K., Beer M., Hoffmann B. Rapid detection of foot-and-mouth disease virus, influenza A virus and classical swine fever virus by high-speed real-time RT-PCR // J. Virol. Methods. – 2013. – Vol. 193, No. 1. – P. 50–54. – DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.05.005.

Поступила 20.03.18

Принята в печать 19.04.18