

УДК 579.62+636.4

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА «СУХОЙ КАПЛИ КРОВИ» ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ НА АЧС МЕТОДОМ ПЦР

Барсукова Т.А., студент 4 курса ветеринарного факультета и биотехнологии

*Научный руководитель – Синдрякова И.П., кандидат биологических наук, зав. лаб. ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии
Калдыркаев А.И., кандидат биологических наук, старший преподаватель
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА*

Ключевые слова: *выделение ДНК, африканская чума свиней, ПЦР, детекция в реальном времени*

Изучена возможность использования метода «сухой капли крови» для исследований на АЧС методом ПЦР с детекцией в реальном времени. Для приготовления СКК использовали серию последовательных десятикратных разведений крови (10^0 - 10^5) от подсвинка, экспериментально заражённого вирусом АЧС (штамм «Ставрополь 2009», $6,0 \text{ Ig GAE}_{50/\text{cm}^3}$).

Африканская чума свиней (АЧС, болезнь Монтгомери) - контагиозная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, вызываемая вирусом, который представляет собой ДНК-содержащий вирус из семейства *Asfarviridae*, род *Asfivirus* [1-3]. Целью выполнения НИР является: изучение возможности использования метода «сухой капли крови» для исследований на АЧС методом ПЦР. В качестве бумажного носителя для проб крови применяли специальные карточки из набора «NUCLEIC-CARD». При приготовлении СКК каплю крови объёмом 100 мкл нанесли по центру карточки, убеждаясь, что кровь впиталась в рабочую зону до достижения метки. Карточку высушивали в течение 2 часов при комнатной температуре и использовали для проведения дальнейшего анализа. С целью определения оптимальной схемы исследова-

Таблица 1 - Результаты отработки оптимальной схемы исследования «сухих капель крови» и определения аналитической чувствительности метода

№ пробы	Характеристика пробы	Среднее значение C_t
1.	СКК из вирус-крови с титром 6,0 lg ГАЕ _{50/см³} , схема исследования № 1	21,83
2.	СКК из 1 разведения вирус-крови (5,0 lg ГАЕ _{50/см³}), схема № 1	20,47
3.	СКК из 2 разведения вирус-крови (4,0 lg ГАЕ _{50/см³}), схема № 1	25,08
4.	СКК из 3 разведения вирус-крови (3,0 lg ГАЕ _{50/см³}), схема № 1	28,81
5.	СКК из 4 разведения вирус-крови (2,0 lg ГАЕ _{50/см³}), схема № 1	-
6.	СКК из 5 разведения вирус-крови (1,0 lg ГАЕ _{50/см³}), схема № 1	-
7.	СКК из вирус-крови с титром 6,0 lg ГАЕ _{50/см³} , схема исследования № 2	11,08
8.	СКК из 1 разведения вирус-крови (5,0 lg ГАЕ _{50/см³}), схема № 2	15,65
9.	СКК из 2 разведения вирус-крови (4,0 lg ГАЕ _{50/см³}), схема № 2	18,57
10.	СКК из 3 разведения вирус-крови (3,0 lg ГАЕ _{50/см³}), схема № 2	24,71
11.	СКК из 4 разведения вирус-крови (2,0 lg ГАЕ _{50/см³}), схема № 2	-
12.	СКК из 5 разведения вирус-крови (1,0 lg ГАЕ _{50/см³}), схема № 2	-
13.	вирус-кровь с титром 6,0 lg ГАЕ _{50/см³}	9,43
14.	1 разведение вирус-крови (5,0 lg ГАЕ _{50/см³})	11,14
15.	2 разведение вирус-крови (4,0 lg ГАЕ _{50/см³})	14,20
16.	3 разведение вирус-крови (3,0 lg ГАЕ _{50/см³})	16,86
17.	4 разведение вирус-крови (2,0 lg ГАЕ _{50/см³})	20,42
18.	5 разведение вирус-крови (1,0 lg ГАЕ _{50/см³})	24,26
19.	Отрицательный контроль выделения НК (ОКВ)	-
20.	Положительный контроль выделения НК (ПКВ)	13,17
21.	Отрицательный контроль постановки ПЦР-РВ (К-)	-
22.	Положительный контроль постановки ПЦР-РВ (К+)	15,89

ния «сухих капель крови» для выявления генома вируса АЧС в ПЦР-РВ были выбраны 2 схемы: 1. Без этапа нуклеосорбции (пробы № 1-6). 2. С этапом нуклеосорбции (пробы № 7-12). В качестве группы сравнения использовали ту же панель десятикратных разведений цельной крови (по 100 мкл) (пробы № 13-18). Для подтверждения достоверности данных исследования проводили в 3 повторностях. В ходе отработки оптимальной схемы исследования «сухих капель крови» было установлено, что более эффективной является схема № 2.

Также следует отметить, что при использовании обеих схем анализа ДНК вируса АЧС обнаружили в 4 пробах СКК из 6 (67 %) (таблица №1). Это может быть объяснено снижением чувствительности метода, связанной с видом объекта исследования (в процессе высушивания СКК может происходить частичное снижение концентрации вируса в пробе). При оценке аналитической чувствительности выявления ДНК вируса АЧС на основе схем № 1 и № 2 установили, что их применение позволяет обнаружить геном вируса в пробах с минимальным титром $3,0 \text{ lg GAE}_{50/\text{см}^3}$ (рис.1, таблица №1).

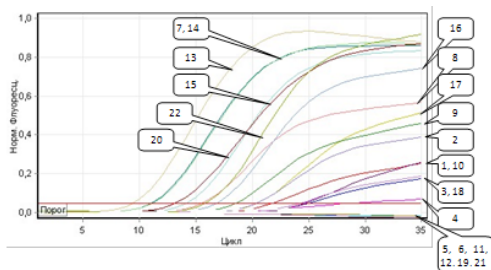


Рисунок 1 - График накопления флуоресцентного сигнала при исследовании проб «сухих пятен крови» и цельной крови.

Примечание: расшифровка цифрового обозначения проб приведена в таблице.

Библиографический список

1. Разработка параметров ПЦР для идентификации *Desulfovibrio desulfuricans* / С.Н. Золотухин, Д.А. Васильев, А.М. Семёнов и [др.] // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012. - №2 (18). - С. 45-49.

2. Моноклональные антитела к рекомбинантному белку Р30 вируса африканской чумы свиней для диагностики АЧС / А.С.Першин, А.С.Казакова, Н.Н.Власова, О.В.Капустина//Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2013. - № 2 (22). - С. 30-35.
3. Рыжаков, А.В. Выявление мест концентрации и переходов кабана в Вологодской области при угрозе заноса африканской чумы / А.В.Рыжаков, С.С.Русецкий // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2015. - № 1 (29). - С. 85-88.

STUDY OF THE USE OF THE METHOD “DRY DROP OF BLOOD” FOR RESEARCH ON THE ASF BY PCR

Barsukova T.A.

Key words: *Dry drop of blood, DNA isolation, African swine fever, PCR detection in real time*

Work was carried out on the basis of laboratory gene diagnostics of viral diseases of animals GNU VNIIVViM RAAS. The possibility of using the method of “dry drop of blood” for research on the ASF detection by PCR in real time. For the preparation of SCC used a series of ten-fold serial dilutions of blood ($10^0 - 10^5$) of gilt experimentally infected ASF virus (strain “Stavropol in 2009», 6,0 lg GAE_{50/cm}³).