



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2016140460, 14.10.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
14.10.2016Дата регистрации:
18.05.2017

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.10.2016

(45) Опубликовано: 18.05.2017 Бюл. № 14

Адрес для переписки:

600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ
"ВНИИЗЖ", Лозовому Д.А.

(72) Автор(ы):

Лозовой Дмитрий Анатольевич (RU),
Михалишин Дмитрий Валерьевич (RU),
Доронин Максим Игоревич (RU),
Щербаков Алексей Владимирович (RU),
Тимина Анна Михайловна (RU),
Шишкова Анжела Алексеевна (RU),
Борисов Алексей Валерьевич (RU),
Стариков Вячеслав Алексеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение "Федеральный центр охраны
здоровья животных" (ФГБУ "ВНИИЗЖ")
(RU)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2332233 C1, 27.08.2008RU
2522868 C1, 20.07.2014SHAW A.E. et al.
Enhanced laboratory diagnosis of foot and
mouth disease by real-time polymerase chain
reaction. Rev Sci Tech. 2004 Dec; 23(3):
1003-1009.

(54) Способ определения концентрации 146S-компонента вируса ящура в вирусосодержащем сырье для вакцины с применением метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

(57) Формула изобретения

1. Способ определения концентрации 146S-компонента вируса ящура в сырье для производства вакцины с помощью обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), включающий следующие стадии:
- подготавливают калибровочную панель контрольных положительных образцов с концентрациями РНК вируса ящура, эквивалентными концентрациям 146S-компонента: 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 10,0, 20,0 мкг/мл;
 - выделяют РНК вируса ящура из сырья для вакцины, образцов отрицательного и положительных контролей;
 - элюаты РНК вируса ящура добавляют к смеси компонентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ в соотношении 1:10;
 - проводят ОТ-ПЦР-РВ с последующей детекцией продуктов амплификации с помощью флуоресцентного ПЦР-детектора, анализируют полученные данные для определения величины порогового цикла амплификации;
 - определяют величину порогового цикла амплификации, обратно пропорциональную

концентрации РНК вируса ящура и, соответственно, 146S-компонента;

- устанавливают зависимость между пороговым циклом амплификации и концентрацией 146S-компонента вируса ящура в сырье для вакцины в процессе построения отрицательной регрессионной модели;

- оценивают величину эффективности реакции амплификации (E), а также коэффициент детерминации (R^2);

- рассчитывают значение концентрации 146S-компонента вируса ящура в сырье для вакцины на основе разработанной регрессионной модели.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что на основании установленной в ОТ-ПЦР-РВ величины порогового цикла амплификации (C_t) рассчитывают значение концентрации 146S-компонента (C_{146S}) вируса ящура разных типов с применением разработанной регрессионной модели:

$$C_{146S} = -3,401(C_t) + 99,333.$$

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что смесь компонентов для проведения ОТ-ПЦР-РВ включает в свой состав следующие компоненты: специфичные праймеры и TagMan флуоресцентномеченые зонды (каждый) - 10 пм, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (dNTP) - 10 мМ, $MgCl_2$ - 5 мМ, Taq ДНК-полимераза - 1 ед., AMV-ревертаза - 2,5 ед.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что ОТ-ПЦР-РВ проводят с соблюдением следующих режимов:

- обратная транскрипция: 42°C в течение 15-20 мин,
- предварительная денатурация: 94-95°C в течение 4-5 мин,
- полимеразная цепная реакция:
- денатурация: 94-95°C в течение 15-20 с,
- отжиг праймеров: 55-57°C в течение 15-20 с,
- элонгация: 60-65°C в течение 20 с.