



Использование ПЦР-РВ как теста, подтверждающего отсутствие остаточной нейровирулентности штаммов для живых противовирусных вакцин

Шамсутдинова О.А.^{1✉}, Карал-оглы Д.Д.¹, Лаврентьева И.Н.²

¹Научно-исследовательский институт медицинской приматологии, Сочи, Россия

²Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Учитывая особую важность заключения о безопасности применения противовирусных вакцин, содержащих хоть и ослабленные, но живые вирусы, с возможным сохранением остаточной нейровирулентности весьма актуальной представляется разработка дополнительных, подтверждающих стабильность аттенуации тестов, основанных на современных методах лабораторной диагностики.

Цель исследования — оценка возможности использования метода ПЦР-РВ в качестве дополнительного теста при контроле остаточной нейровирулентности аттенуированных вакцинных штаммов вируса краснухи.

Материалы и методы. В работе использовали живые аттенуированные вакцинные штаммы вируса краснухи «Орлов-В» и RA27/3. Исследование проводили на 11 клинически здоровых обезьянах вида *Macaca mulatta* массой 3–5 кг, родившихся и содержащихся в питомнике НИИМП. Клиническим материалом служили образцы тканей различных отделов ЦНС, региональных лимфатических узлов, паренхиматозных органов, плазма и спинномозговая жидкость экспериментальных животных. Контроль экстраневральной диссеминации вакцинных штаммов проводили с использованием вирусологического (реакция цитопатического действия) и молекулярно-биологического методов (ПЦР-РВ).

Результаты. Установлено отсутствие инфекционного вируса в ЦНС, периферических органах и плазме крови обезьян, заражённых вакцинными штаммами, что свидетельствует о высоком уровне аттенуации штаммов «Орлов-В» и RA27/3 вируса краснухи. Также выявлено, что аналитическая чувствительность метода ПЦР-РВ превышает аналитическую чувствительность реакции цитопатического действия на 1,7–3,3 Ig при определении содержания вируса краснухи в тканях ЦНС и периферических органах инокулированных животных.

Заключение. Сравнительный анализ экспериментальных данных показал, что выявление вируса краснухи методом ПЦР-РВ имеет ряд преимуществ — это специфичность, чувствительность и меньшая длительность реакции. В связи с этим метод ПЦР-РВ может быть использован в качестве дополнительного теста при доклинической оценке специфической безопасности, а именно экстраневральной диссеминации аттенуированных вакцинных штаммов, что крайне необходимо при контроле качества и безопасности применения живых краснушных вакцин.

Ключевые слова: аттенуация, вирус краснухи, вакцинные штаммы, цитопатическое действие, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23.07.2010). Обращение с животными проводилось в строгом соответствии с Правилами содержания и ухода за нечеловекообразными приматами (ГОСТ 33216-2014). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике НИИМП (протокол № 16 от 14.08.2019).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Шамсутдинова О.А., Карал-оглы Д.Д., Лаврентьева И.Н. Использование ПЦР-РВ как теста, подтверждающего отсутствие остаточной нейровирулентности штаммов для живых противовирусных вакцин. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(2):185–192.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-238>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-238>

The utility of real-time PCR as a test for confirmation of the absence of residual neurovirulence of strains for live antiviral vaccines

Olga A. Shamsutdinova^{1✉}, Dgina D. Karal-ogly¹, Irina N. Lavrent'eva²¹Research Institute of medical Primatology, Sochi, Russia²Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Taking into account the particular importance of the assurance of the safety of antiviral vaccines containing, albeit attenuated, but live viruses, that can possibly retain the residual neurovirulence, it is important to develop additional tests to confirm the stability of attenuation using modern methods of laboratory diagnostics. **The aim** of the study was to assess the possibility of using the RT-PCR method as an additional test for monitoring the residual neurovirulence of attenuated rubella virus vaccine strains.

Materials and methods. We used live attenuated vaccine strains of rubella virus "Orlov-V" and RA27/3. The study was carried out on 11 clinically healthy monkeys of the species *Macaca mulatta* weighing 3–5 kg, born and kept in the nursery of the Research Institute of Medical Primatology. The clinical material studied was tissue samples from various parts of the central nervous system (CNS), regional lymph nodes, parenchymal organs, plasma and cerebrospinal fluid of experimental animals. Control of extraneural dissemination of vaccine strains was carried out using virological (cytopathic action) and molecular biological methods (RT-PCR).

Results. The absence of an infectious virus in the CNS, peripheral organs and blood plasma of monkeys infected with vaccine strains was demonstrated, which indicates a high level of attenuation of rubella virus strains "Orlov-B" and RA27/3. The analytical sensitivity of the RT-PCR method was found to exceed the analytical sensitivity of the cytopathic reaction by 1.7–3.3 lg when determining the content of rubella virus in the tissues of the CNS and peripheral organs of inoculated animals.

Conclusion. Comparative analysis of experimental data showed that the detection of rubella virus by real-time PCR has a number of advantages due its specificity, sensitivity and a shorter turnaround time. In this connection, the RT-PCR method can be used as an additional test in the preclinical assessment of specific safety, namely, extraneural dissemination of attenuated vaccine strains, which is essential for quality and safety control of live rubella vaccines.

Keywords: *attenuation, rubella virus, vaccine strains, cytopathic action, PCR-RT*

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Bioethics Commission of the Research Institute of Medical Primatology (Protocol 16, August 14, 2019).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Shamsutdinova O.A., Karal-ogly D.D., Lavrent'eva I.N. The utility of real-time PCR as a test for confirmation of the absence of residual neurovirulence of strains for live antiviral vaccines. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(2):185–192.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-238>

Введение

Золотым стандартом оценки специфической безопасности аттенуированных штаммов живых вакцин является гистологическое исследование головного и спинного мозга экспериментальных животных в тесте интрацеребрального заражения [1]. При этом важным показателем уровня их аттенуации признан контроль экстраневральной диссеминации вакцинных штаммов. Так, по данным ранее проведённых исследований, при низком уровне аттенуации штаммов вируса краснухи (ВК) вирус может не только размножаться в клетках ЦНС, распространяться по отделам ЦНС, но и преодолевать

гематоэнцефалический барьер, поражая периферические органы обезьян. Для выявления ВК в вирусосодержащем материале исследователи применяют классический прямой метод индикации — реакцию цитопатического действия (ЦПД) [2].

Особенностью индикации ВК является вариабельность проявления его цитодеструктивного действия на клетки. Размножение аттенуированных штаммов ВК с отчётливо выраженным ЦПД наблюдается лишь в культурах клеток ВНК-21 и РК-13 [3]. Другой недостаток этого метода — длительность; реакция ЦПД ВК на чувствительную клеточную линию занимает 10–12 сут.

Актуальной представляется разработка дополнительных подтверждающих стабильность аттенуации тестов на базе современных методов лабораторной диагностики. Молекулярно-биологический метод — ПЦР-РВ, основанный на прямой идентификации генетического материала возбудителя и характеризующийся высокой чувствительностью и специфичностью, широко используется в различных диагностических и научно-исследовательских центрах. Так, показана возможность использования метода ПЦР-РВ для контроля титра вакцинных штаммов РНК-содержащих вирусов в процессе производства вакцин и оценки подлинности живых вакцин [4–6].

Целью данного исследования является оценка возможности использования метода ПЦР-РВ в качестве дополнительного теста при контроле остаточной нейровирулентности аттенуированных вакцинных штаммов ВК.

Материалы и методы

В работе использовали живые аттенуированные вакцинные штаммы ВК: «Орлов-В» [7] из коллекции НИИЭМ им. Пастера и RA27/3, входящий в состав коммерческой живой аттенуированной вакцины производства НПО «Микроген».

Перевиваемая клеточная линия — культура клеток почки хомяка (ВНК-21) — была получена из музея культур клеток НИИЭМ им. Пастера.

Исследование проводили на 11 клинически здоровых обезьянах вида *Macaca mulatta* массой 3–5 кг, родившихся и содержащихся в питомнике НИИМП. В опыт отбирали животных, не содержащих в сыворотке крови нейтрализующих антител к ВК. Обезьяны были рандомизированы на 3 группы методом случайных чисел. Обращение с животными проводилось в строгом соответствии с Правилами содержания и ухода за нечеловекообразными приматами (ГОСТ 33216-2014). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБНУ «НИИ МП» (Протокол № 16 от 14.08.2019).

Животным интрацеребрально вводили по 0,5 мл следующих препаратов: в 1-й группе ($n = 4$) — вакцинный штамм «Орлов-В» с инфекционной активностью $4,7 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,5 \text{ мл}$; во 2-й ($n = 2$) — вакцинный штамм RA27/3 с инфекционной активностью $4,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,5 \text{ мл}$, входящий в состав культуральной живой вакцины против краснухи («НПО «Микроген»); в 3-й ($n = 1$) — растворитель для лиофилизированной коммерческой вакцины против краснухи (вода для инъекций); в 4-й ($n = 4$) — низкоаттенуированный штамм ВК «Орлов-14» с инфекционной активностью $3,8$ и $4,7 \lg \text{ТЦД}_{50}/0,5$. Вирусосодержащий материал вводили обезьянам по методу [8].

После эксперимента обезьян выводили из опыта под глубоким наркозом, вводя в паховую вену животного 1 мл золетила («Valdepharm») и 4 мл кси-

лы («Interchemie Werken de Adelaar Eesti AS»). После того как животное входило в глубокий сон, в эту же вену вводили 5 мл листенона («Takeda Austria GmbH»), что приводило к полной остановке сердца.

Клиническим материалом исследования от экспериментальных животных служили образцы тканей различных отделов ЦНС (головной мозг, шейный и поясничный отделы спинного мозга), региональных лимфатических узлов (подчелюстных и заднешейных), паренхиматозных органов (лёгкое, печень, селезёнка), плазма и спинномозговая жидкость. Забор спинномозговой жидкости (ликвора) проводили непосредственно перед выделением головного и спинного мозга из мозжечково-мозговой цистерны (*cisternamagna, c. cerebellomedullaris*). Во время проведения аутопсии образцы исследуемых тканей помещали в индивидуальные стерильные пробирки типа «Эппендорф» и хранили при температуре не выше -68°C для проведения вирусологического и молекулярно-биологического исследований.

Титрование штаммов ВК по ЦПД проводили в культуре клеток ВНК-21. С этой целью из различных отделов ЦНС и паренхиматозных органов готовили 10% суспензию, растерев образцы ткани в стерильной фарфоровой ступке, после чего к суспензии добавляли физиологический раствор в соотношении 1 : 9 и центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость использовали для приготовления последовательных 10-кратных разведений от 10^{-1} до 10^{-8} . Каждое из разведений вносили по 100 мкл в 4 лунки 96-луночного планшета. Инфицированные и контрольные культуры клеток инкубировали в термостате с 5% CO_2 при 35°C . Учет результатов проводили на 12-е сутки по реакции ЦПД. Титр ВК рассчитывали по методу Рида и Менча.

Для проведения молекулярно-биологического исследования использовали метод ПЦР с гибридизационно-флюоресцентной детекцией, состоящий из трех этапов: экстракции РНК из исследуемого материала, обратной транскрипции РНК и амплификации фрагмента кДНК с гибридизационно-флюоресцентной детекцией.

Ткани головного мозга, шейный и поясничный отделы спинного мозга, подчелюстные и заднешейные лимфатические узлы, лёгкое, печень и селезёнку гомогенизировали в стерильной ступке, готовили 10% суспензию на физиологическом растворе («МОСФАРМ») и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученную надосадочную жидкость использовали для проведения экстракции РНК.

Выделение РНК из 10% суспензии образцов тканей ЦНС, паренхиматозных органов, а также спинномозговой жидкости и плазмы периферической крови проводили с помощью коммерческих наборов: «РИБО-сорб», «РИБО-золь-С», «РИБО-

Таблица 1. Наборы, используемые для проведения экстракции РНК из исследуемого материала**Table 1.** Kits used for RNA extraction from test material

Клинический материал Clinical material	Название набора Name of the kit
Головной мозг, спинной мозг (шейный и поясничный отделы) Brain, spinal cord (cervical and lumbar sections)	«AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit»
Периферические органы: лёгкое, печень, селезёнка, заднешейные и подчелюстные лимфатические узлы, а также спинномозговая жидкость Peripheral organs: lung, liver, spleen, posterior cervical and submandibular lymph nodes, and cerebrospinal fluid	«РИБО-золь-С» + «РИБО-преп» "RIBO-sol-S" + "RIBO-prep"
Плазма периферической крови Plasma of peripheral blood	«РИБО-сорб» "RIBO-sorb"

преп» (ЦНИИ Эпидемиологии) и «AllPrepDNA/RNA/miRNA Universal Kit» («Qiagen») (табл. 1). Все этапы экстракции РНК выполняли согласно инструкции производителя для соответствующего комплекта реагентов.

Для проведения реакции обратной транскрипции использовали набор реагентов для получения кДНК на матрице РНК «РЕВЕРТА-Л» (ЦНИИ Эпидемиологии).

Для проведения ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией продуктов амплификации использовали набор реагентов «АмплиСенс® Rubellavirus-FL» (ЦНИИ Эпидемиологии). Аналитическая чувствительность тест-системы составляла 400 копий/мл. Исследование проводили на амплификаторе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research»).

Учёт результатов ПЦР-анализа проводили на основании наличия или отсутствия пересечения кривой флюоресценции с установленной на уровне 0,03 пороговой линией и последующего сравнения величины сигнала (Ct) в исследуемых образцах относительно контрольных (ПКО Rubellavirus-rec и ВКО STI-87-rec). Положительными считали образцы, у которых кривая флюоресценции имела типичный для ПЦР-РВ S-образный вид, однократно пересекалась с пороговой линией в области достоверного прироста флюоресценции и значение порогового цикла (Ct) не превышало 35. Отрицательными по содержанию РНК ВК считали образцы, кривая флюоресценции которых не пересекала пороговую линию [9].

В качестве положительного контроля (помимо контролей, заложенных в тест-системах) параллельно с исследуемыми образцами методом ПЦР-РВ были исследованы образцы тканей ЦНС и внутренних органов обезьян *M. mulatta*, интрацеребрально получивших 0,5 мл жидкости с низкоаттенуированным штаммом ВК «Орлов-14». Обезьяны ($n = 2$), получившие штамм с инфекци-

онной активностью 4,7 lg ТЦД₅₀/0,5 мл, были выведены из эксперимента на 2-е и 12-е сутки; получившие штамм с инфекционной активностью 3,8 lg ТЦД₅₀/0,5 мл ($n = 2$) были выведены из эксперимента на 21-е и 28-е сутки (4-я группа).

Результаты

Выявление ВК в исследуемых отделах ЦНС и периферических органах обезьян проводили стандартным методом по ЦПД. У животных 1-й группы ВК был выявлен только в головном мозге у 1 обезьяны, умерщвлённой на 2-е сутки после заражения (табл. 2). В то же время на 12, 21 и 28-е сутки после интрацеребральной инокуляции вакцинным штаммом «Орлов-В» ВК не был выявлен ни в одном из исследуемых органов. Результаты, полученные при исследовании органов животных 2-й и 3-й групп, указывают на отсутствие ВК в различных отделах ЦНС и периферических органах обезьян.

При анализе результатов молекулярно-биологического метода выявлено, что среди животных 1-й группы, заражённых вакцинным штаммом «Орлов-В», РНК ВК была выявлена только в головном мозге у обезьяны, умерщвлённой на 2-е сутки после инокуляции (табл. 3). При этом у других животных данной группы РНК ВК не выявлена ни в исследованных отделах ЦНС, ни во внутренних органах и плазме обезьян.

Сходные данные были получены при исследовании клинического материала от обезьян 2-й группы. Так, на 12-е и 28-е сутки эксперимента в образцах тканей экспериментальных животных, как и в образцах тканей отрицательной контрольной обезьяны (3-я группа), пороговый цикл не определялся, что свидетельствовало об отсутствии РНК ВК в исследуемых образцах.

У животных 4-й группы во все сроки наблюдения РНК ВК отсутствовала в лёгких и печени. На 2, 12 и 21-е сутки эксперимента РНК ВК была выявлена в исследованных отделах ЦНС, внутренних органах и плазме крови обезьян. В то же время на 28-е сутки после заражения ни в одном из исследуемых образцов не выявлено РНК ВК.

Таким образом, полученные результаты показывают отсутствие ВК в ЦНС, периферических органах и плазме крови обезьян, заражённых вакцинными штаммами, что свидетельствует о высоком уровне аттенуации штаммов «Орлов-В» и RA27/3 ВК. Получено также хорошее совпадение результатов определения содержания ВК в тканях ЦНС и периферических органах инокулированных животных вирусологическим и молекулярно-биологическим методами исследования.

Обсуждение

Классическим прямым вирусологическим методом индикации ВК является культуральный

Таблица 2. Инфекционная активность ВК в ЦНС и периферических органах обезьян, ТЦД₅₀/мл
Table 2. Infectious activity of the rubella virus in the CNS and peripheral organs of monkeys, TCD₅₀/ml

Исследуемый образец Tested sample	Группа / Group											
	1-я / 1 st			2-я / 2 nd			3-я / 3 rd		4-я / 4 th			
ID животного Animal ID	44154	38976	43764	39029	41876	38429	36518	42716	42884	43389	43419	
Срок исследования, сут Day of experiment	2	12	21	28	12	28	28	2	12	21	28	
Головной мозг Brain	2,5	0	0	0	0	0	0	3,1	4,0	0	0	
Шейный отдел спинного мозга Cervical spinal cord	0	0	0	0	0	0	0	2,9	3,2	0	0	
Поясничный отдел спинного мозга Lumbar spinal cord	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	0	0	
Спинально-мозговая жидкость Cerebrospinal fluid	0	0	0	0	0	0	0	0	2,4	0	0	
Подчелюстные лимфатические узлы Submandibular lymph nodes	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	0	0	2,6	0	
Заднешейные лимфатические узлы Posteriorcervical lymph nodes	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	0	2,3	1,8	0	
Лёгкое Lung	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Селезёнка Spleen	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	0	2,0	2,0	0	
Печень Liver	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Примечание. Н/д — образец ткани не исследовался.
Note. N/a — tissue sample was not tested.

метод (выделение вируса на модели чувствительных клеточных культур). По данным литературы, выделение ВК *in vitro* обеспечивает широкий круг первичных, диплоидных и перевиваемых клеточных культур птичьего, животного и человеческого происхождения [10]. Основной причиной ЦПД ВК в культуре клеток является нарушение метаболизма клеток. Неструктурные вирусные белки р150 и р90 блокируют синтез РНК клетки-хозяина, что ведёт к подавлению синтеза клеточных белков, нарушению структуры клеточных мембран, лизосом и митохондрий [11]. В результате освобождаются и активируются клеточные лизосомальные ферменты, которые и вызывают деструкцию клеточных компонентов и развитие ЦПД в культуре клеток.

Однако особенностью индикации ВК является вариабельность проявления его цитодеструктивного действия на клетки. Так, при использовании невысококочувствительных культур клеток ВК может вызвать нелитическую продуктивную инфекцию. Отчётливая реакция клеток на заражение ВК может наблюдаться лишь в весьма ограниченном круге клеточных культур. ЦПД ВК на монослой клеток наблюдают в первичной культуре клеток почки кролика и амниона человека. Из перевиваемых линий клеток это клетки почек детёнышей хомяка (ВНК-21), а также обезьяньего (Vero) и кроличьего (RK-13) происхождения.

Преимущество метода выделения ВК на модели чувствительных клеточных культур заключается в том, что данный метод обеспечивает выделение живого возбудителя, что является достоверным подтверждением результата. По данным различных авторов, чувствительность культурального метода диагностики ВК колеблется в пределах 50–80%, при этом специфичность метода составляет 100% [12]. К недостаткам метода относятся длительность и субъективность оценки результата, необходимость проведения слепых пассажей, вариабельность и интенсивность проявления ЦПД ВК в культуре клеток.

Развитие молекулярной биологии — открытие генетического кода, изучение структуры и роли РНК как хранилища генетической информации у ряда вирусов — дало новые возможности в изучении и диагностике ВК.

Разработка метода ПЦР послужила поворотным моментом в развитии молекулярной диагностики постнатальной и врожденной краснухи. В настоящее время для выявления РНК ВК в образцах биологического материала метод амплификации нуклеиновых кислот остаётся наиболее распространённым в клинической лабораторной практике [13, 14]. Разработано значительное количество коммерческих тест-систем как для качественной, так и для количественной идентификации РНК ВК.

Таблица 3. Результаты выявления РНК ВК в аутопсийном материале от обезьян, Сt**Table 3.** Results of detection of rubella virus RNA in autopsy material from monkeys, Сt

Исследуемый образец Tested sample	Группа / Group											
	1-я / 1 st				2-я / 2 nd		3-я / 3 rd		4-я / 4 th			
ID животного Animal ID	44154	38976	43764	39029	41876	38429	36518	42716	42884	43389	4341	
Срок исследования, сут Day of experiment	2	12	21	28	12	28	28	2	12	21	28	
Головной мозг Brain	26,3	0	0	0	0	0	0	26,7	30,4	0	0	
Шейный отдел спинного мозга Cervical spinal cord	0	0	0	0	0	0	0	38,3	34,6	0	0	
Поясничный отдел спинного мозга Lumbar spinal cord	0	0	0	0	0	0	0	0	36,4	0	0	
Спинальная жидкость Cerebrospinal fluid	0	0	0	0	0	0	0	0	27,2	0	0	
Подчелюстные лимфатические узлы Submandibular lymph nodes	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	Н/д N/a	0	26,7	0	
Заднешейные лимфатические узлы Posteriorcervical lymph nodes	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	Н/д N/a	27,1	33,3	0	
Лёгкое Lung	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	Н/д N/a	0	0	0	
Селезёнка Spleen	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	Н/д N/a	27,2	27,0	0	
Печень Liver	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	Н/д N/a	0	0	0	
Плазма Plasma	Н/д N/a	0	0	0	0	0	0	0	27,1	33,5	0	

Примечание. Н/д — образец ткани не исследовался.

Note. N/a — tissue sample was not tested.

Наиболее распространённым методом детекции ВК является метод ПЦР-РВ. Одним из преимуществ данного метода является то, что процессы амплификации и детекции амплификации ВК происходят одновременно в одной пробирке, что сокращает вероятность ложноположительных результатов из-за перекрёстной контаминации исследуемых образцов. Данному методу также присущи высокая чувствительность, специфичность, быстрота получения результатов и возможность автоматизации процесса постановки реакции [15]. Метод ПЦР-РВ активно применяется для оценки безопасности и эффективности живых противовирусных вакцин, в частности, для аттенуированных вакцинных штаммов вирусов гриппа, кори и краснухи [16–18].

В данной работе мы провели сравнительный анализ результатов, полученных при определении ВК в исследуемых образцах по ЦПД и методом ПЦР-РВ. Полученные данные указывают, что аналитическая чувствительность метода ПЦР-РВ превышает аналитическую чувствительность реакции ЦПД на 1,7–3,3 Ig. Классический метод выделения ВК имеет ряд недостатков: длительность, субъективность анализа и зависимость от внешних факторов. В отличие от него, выявление ВК методом

ПЦР-РВ имеет ряд преимуществ: специфичность, чувствительность и меньшую длительность реакции. Таким образом, метод ПЦР-РВ может быть использован в качестве дополнительного теста при доклинической оценке специфической безопасности, а именно экстраневральной диссеминации аттенуированных вакцинных штаммов, что крайне необходимо при контроле качества живых противовирусных вакцин.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Максимова О.А., Попов В.Ф., Бектемиров Т.А., Григорьева Л.В., Юнасова Т.Н., Каплунова О.П. и др. Сравнительная оценка нейровирулентности отечественной и зарубежных живых паротитных вакцин. *Вопросы вирусологии*. 2001; 46(5): 31–5.
2. Шамсутдинова О.А., Булгин Д.В., Карал-оглы Д.Д., Лаврентьева И.Н. Изучение морфологических изменений в ЦНС и внутренних органах обезьян *Macaca mulatta* при интрацеребральном введении низкоаттенуированного штамма вируса краснухи. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021; 171(5): 651–5. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-171-5-651-655>
3. Ziyaeifar F., Soleimani S. Characterizing the BHK-21 C5 cell line and determining cellular sensitivity to rubella virus compared with the routine cell(RK13). *Arch. Razi. Inst.* 2021; 76(3): 461–9. <https://doi.org/10.22092/ari.2020.342274.1458>

4. Забияка Ю.И., Файзулов Е.Б., Борисова Т.К., Никонова А.А., Зверев В.В. Экспресс-метод оценки титра вируса краснухи в вирусосодержащей жидкости с помощью ПЦР-РВ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2010; (5): 57–62.
5. Бинятова А.С., Мыца Е.Д., Чертова Н.В., Волкова Р.А., Саркисян К.А., Ильясова Т.Н. и др. Использование наборов реагентов для ОТ-ПЦР в реальном времени для оценки подлинности вакцин против кори, паротита и краснухи. *БИО-препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(4): 249–56.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-249-256>
6. Mantel N., Aguirre M., Gulia S., Girerd-Chambaz Y., Colombani S., Moste C., et al. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J. Virol. Methods*. 2008; 151(1): 40–6.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.03.026>
7. Лаврентьева И.Н., Сухобаевская Л.П., Жебрун А.Б. Штамм вируса краснухи для получения медицинских иммунологических препаратов (МИБП). Патент РФ № 2081912; 1995.
8. Общая фармакопейная статья ОФС.1.7.2.0010.15. Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусосов кори, паротита и краснухи. М.; 2018.
9. Домонова Э.А., Шипулина О.Ю., Куведя Д.А., Ларичев В.Ф., Сафонова А.П., Бурчик М.А. и др. Выявление РНК вируса краснухи в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2012; (1): 60–7.
10. Юнасова Т.Н., Бинятова А.С., Фадейкина О.В., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А., Игнатъев Г.М. и др. Анализ качества отечественной вакцины для профилактики краснухи. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(2): 90–6.
<https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-90-96>
11. Sakata M., Katoh H., Otsuki N., Okamoto K., Nakatsu Y., Lim C.K., et al. Heat shock protein 90 ensures the integrity of rubella virus p150 protein and supports viral replication. *J. Virol.* 2019; 93(22): e01142–19.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01142-19>
12. Best J.M. Rubella. *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* 2007; 12(3): 182–92. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2007.01.017>
13. Cooray S., Warren L., Jin L. Improved RT-PCR for diagnosis and epidemiological surveillance of rubella. *J. Clin. Virol.* 2006; 35(1): 73–80.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.020>
14. Mace M., Cointe D., Six C., Levy-Bruhl D., du Chatelet I.P., Ingrand D., et al. Diagnostic value of reverse transcription-PCR of amniotic fluid for prenatal diagnosis of congenital rubella infection in pregnant women with confirmed primary rubella infection. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(10): 4818–20.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4818-4820.2004>
15. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. *ПЦР в реальном времени*. М.: БИНОМ, Лаборатория знаний; 2009.
16. Osterholm M.T., Kelley N.S., Sommer A., Belongia E.A. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12(1): 36–44. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70295-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70295-X)
17. Greenwood K.P., Hafiz R., Ware R.S., Lambert S.B. A systematic review of human-to-human transmission of measles vaccine virus. *Vaccine*. 2016; 34(23): 2531–6.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.092>
18. Лаврентьева И.Н., Шамсутдинова О.А., Чугуева И.И., Карал-оглы Д.Д., Вышемирский О.И. Изучение тератогенности вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В» (*Matonaviridae: Rubivirus: Rubellavirus*) в опыте на обезьянах макак-резус. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(6): 357–63.
<https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-6>

REFERENCES

1. Maksimova O.A., Popov V.F., Bektemirov T.A., Grigor'eva L.V., Yunasova T.N., Kaplunova O.P., et al. Comparative assessment of the neurovirulence of domestic and foreign live mumps vaccines. *Voprosy virusologii*. 2001; 46(5): 31–5. (in Russian)
2. Shamsutdinova O.A., Bulgin D.V., Karal-ogly D.D., Lavrent'eva I.N. Study of morphological changes in the CNS and internal organs of *Macaca mulatta* monkeys after intracerebral injection of a low-attenuated rubella virus strain. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2021; 171(5): 651–5.
<https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-171-5-651-655> (in Russian)
3. Ziyaeifar F., Soleimani S. Characterizing the BHK-21 C5 cell line and determining cellular sensitivity to rubella virus compared with the routine cell(RK13). *Arch. Razi. Inst.* 2021; 76(3): 461–9. <https://doi.org/10.22092/ari.2020.342274.1458>
4. Zabiya Yu.I., Fayzuloev E.B., Borisova T.K., Nikonova A.A., Zverev V.V. Express method for assessing the rubella virus titer in virus-containing fluid using real-time PCR. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2010; (5): 57–62. (in Russian)
5. Binyatova A.S., Mytsa E.D., Chertova N.V., Volkova R.A., Sarkisyan K.A., Ilyasova T.N., et al. Using real-time RT-PCR reagent kits for identity testing of measles, mumps and rubella vaccines. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2018; 18(4): 249–56.
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-4-249-256> (in Russian)
6. Mantel N., Aguirre M., Gulia S., Girerd-Chambaz Y., Colombani S., Moste C., et al. Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J. Virol. Methods*. 2008; 151(1): 40–6.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.03.026>
7. Lavrent'eva I.N., Sukhobaevskaya L.P., Zhebrun A.B. Rubella virus strain for the production of medical immunobiological preparations (MIBP). Patent RF N 2081912; 1995. (in Russian)
8. General pharmacopoeia article OFS.1.7.2.0010.15. Assessment of the specific safety of industrial strains and seed viruses of measles, mumps and rubella. Moscow; 2018. (in Russian)
9. Domonova E.A., Shipulina O.Yu., Kuevda D.A., Larichev V.F., Safonova A.P., Burchik M.A., et al. Detection of rubella virus RNA in clinical material by real time polymerase chain reaction method. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2012; (1): 60–7. (in Russian)
10. Yunasova T.N., Binyatova A.S., Fadeykina O.V., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A., Ignat'ev G.M., et al. Analysis of the quality of national vaccine against rubella. *Voprosy virusologii*. 2018; 63(2): 90–6. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-90-96> (in Russian)
11. Sakata M., Katoh H., Otsuki N., Okamoto K., Nakatsu Y., Lim C.K., et al. Heat shock protein 90 ensures the integrity of rubella virus p150 protein and supports viral replication. *J. Virol.* 2019; 93(22): e01142–19.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01142-19>
12. Best J.M. Rubella. *Semin. Fetal. Neonatal. Med.* 2007; 12(3): 182–92. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2007.01.017>
13. Cooray S., Warren L., Jin L. Improved RT-PCR for diagnosis and epidemiological surveillance of rubella. *J. Clin. Virol.* 2006; 35(1): 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.020>
14. Mace M., Cointe D., Six C., Levy-Bruhl D., du Chatelet I.P., Ingrand D., et al. Diagnostic value of reverse transcription-PCR of amniotic fluid for prenatal diagnosis of congenital rubella infection in pregnant women with confirmed primary rubella infection. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(10): 4818–20.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4818-4820.2004>
15. Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu. *Real-Time PCR [PcTcR v real'nom vremeni]*. Moscow: BINOM, Laboratoriya znaniy; 2009. (in Russian)

16. Osterholm M.T., Kelley N.S., Sommer A., Belongia E.A. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2012; 12(1): 36–44. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70295-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70295-X)
17. Greenwood K.P., Hafiz R., Ware R.S., Lambert S.B. A systematic review of human-to-human transmission of measles vaccine virus. *Vaccine.* 2016; 34(23): 2531–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.092>
18. Lavrent'eva I.N., Shamsutdinova O.A., Chugueva I.I., Karal-ogly D.D., Vyshemirskiy O.I. Study of the teratogenicity of the vaccine strain of the Rubella virus «Orlov-V» (*Matonaviridae: Rubivirus: Rubella virus*) in experience on rhesus macaques. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(6): 357–63. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-6> (in Russian)

Информация об авторах

Шамсутдинова Ольга Анатольевна[✉] — н.с. лаб. иммунологии и биологии клетки НИИМП, Сочи, Россия, shamsutdinova-o-a@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2742-3965>

Карал-оглы Джина Джинаровна — к.б.н., зам. директора по научной работе НИИМП, Сочи, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3606-1668>

Лаврентьева Ирина Николаевна — д.м.н., зав. лаб. экспериментальной вирусологии НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-2188-6547>

Участие авторов. Шамсутдинова О.А. — концепция и дизайн исследования, проведение эксперимента, сбор, анализ интерпретация данных, подготовка текста; Карал-оглы Д.Д. — концепция и дизайн исследования; Лаврентьева И.Н. — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста.

Статья поступила в редакцию 09.01.2022;
принята к публикации 11.03.2022;
опубликована 29.04.2022

Information about the authors

Olga A. Shamsutdinova[✉] — researcher, Laboratory of immunology and cell biology, Research Institute of Medical Primatology, Sochi, Russia, shamsutdinova-o-a@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2742-3965>

Dgina D. Karal-ogly — Cand. Sci. (Biol.), Depute Director, Research Institute of medical Primatology, Sochi, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3606-1668>

Irina N. Lavrent'eva — D. Sci. (Med.), Head, Laboratory of experimental virology, Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-2188-6547>

Author contribution. Shamsutdinova O.A. — research concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Karal-ogly D.D. — research concept and design; Lavrent'eva I.N. — research concept and design, analysis and interpretation of the data, preparing of the text.

The article was submitted 09.01.2022;
accepted for publication 11.03.2022;
published 29.04.2022