

Корисна модель відноситься до ветеринарної мікробіології, зокрема до розробки молекулярно-генетичних способів діагностики мікоплазмозу свиней, а саме, до виявлення *M. hyorheumoniae* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Ензоотична пневмонія свиней, що спричиняється збудником *M. hyorheumoniae*, реєструється на всіх континентах світу та завдає щорічно великих економічних збитків. Діагностика захворювання ускладнюється в першу чергу його субклінічним перебігом, завдяки чому відсутня можливість виявлення носіїв мікоплазм та своєчасного впровадження профілактичних заходів.

Існуючі дані щодо молекулярно-генетичної організації збудників мікоплазмозів сільськогосподарських тварин, особливо, які базуються на вивченні послідовностей основних генів мікоплазм, ізольованих у різних країнах світу, надають змогу проводити роботу з удосконалення розроблених ПЛР-тест-систем та впровадження їх в практику лабораторної діагностики.

Діагноз на ензоотичну пневмонію свиней встановлюється на основі виділення збудника, індикації його антигенів, а також специфічних антитіл в діагностичних титрах.

У відповідності до діючих рекомендацій МЕБ полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) застосовують з метою індикації генетичного матеріалу збудників мікоплазмозів свиней а також для визначення виду та штаму мікоплазм (з залученням методик визначення поліморфізму патернів рестрикції продуктів ПЛР). Існуючі методики ПЛР-діагностики ензоотичної пневмонії свиней ґрунтуються на виявленні мікоплазмених антигенів за високо консервативними генами ([www.oie.int](http://www.oie.int)).

Відомий спосіб виявлення 476п.н. (пар нуклеотидів) ділянки гену 16s rRNA за допомогою ПЛР-аналізу [Detection of *Mycoplasma hyorheumoniae*. Mattsson JG, Bergstrom K, Wallgren P, Johansson KE:1995, - J. Clin. Microbiol., 33:893-897]. Цей спосіб ґрунтується на застосуванні системи праймерів при температурі відпалу 47°C. Це рішення може бути прототипом. Недоліком прототипу є низька специфічність способу детекції внаслідок низької температури відпалу праймерів та вища собівартість за рахунок більшого реакційного об'єму (50мкл) за спосіб, що пропонується.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виявлення ДНК *M. hyorheumoniae* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, що включає ампліфікацію теоретично розрахованого високоспецифічного гена *M. hyorheumoniae*, як ПЛР - мішені шляхом використання пари праймерів oMhyoFor (TAAGTTCATTCGCGCTAGCCC) та oMhyoRev (TGCTCCTACTCCATATTGCC) за температури віджигу 56°C і синтезу фрагменту довжиною 455п.н., щоб забезпечити ефективність способу.

Спосіб виконується наступним чином.

Пробопідготовка. Як матеріал для дослідження використовують кров, стабілізовану цитратом натрію або розчином глюкози та назальні змиви від інфікованих свиней.

Екстракція загальної ДНК проводиться за допомогою набору для екстракції загальної ДНК- Сорб-А або ДНК-Сорб-Б (Амплісенс, Москва, Росія), або аналогічного. Процедура складається із лізису клітин та їх детриту, сорбції ДНК на сорбенті, дво-триразового відмивання сорбованої ДНК та екстракції ДНК із сорбенту за допомогою ТЕ-буферу.

Ампліфікація. Готують загальну (для усієї кількості проб) суміш реагентів для ампліфікації з розрахунку (на 1 пробу):

- 13,0мкл деіонізованої води;
- 2,0мкл 50мМ Mg<sup>++</sup>;
- 5,0мкл реакційного буферу;
- 2,5мкл суміші dNTP;
- по 1мкл праймерів;
- 0,5мкл Taq-полімерази.

Після додавання Taq-полімерази, що проводиться в останню чергу, одержану суміш ретельно перемішують на вортексі. Після чого, суміш у дозі 20мкл вносять в усі пробірки підготовлені для ампліфікації. Потім додають в усі пробірки по 1 краплі (близько 25мкл) мінерального масла. Для проведення ампліфікації у відповідну пробірку з реакційною сумішшю під шар масла вносять 5мкл розчину сумарної ДНК проби. Для негативного контрольного зразку в пробірку вносять - 5мкл деіонізованої води, а в пробірку для позитивного контрольного зразку - 5мкл розчинної ДНК *M. hyorheumoniae*. Пробірки закривають й центрифугують протягом 3-5 секунд при 2000об/хв на мікроцентрифузі. Переносять пробірки в нагрітий до температури 95°C програмний термостат (ампліфікатор) і проводять ампліфікацію за наступною програмою (табл.)

Після закінчення реакції проводять аналіз продуктів ПЛР, шляхом поділу фрагментів ДНК в агарозному гелі. Потім проводять електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР.

Приготування робочого розчину буфера (ТБЕ) для електрофорезу.

У мірну колбу ємністю 1000,0см<sup>3</sup> вносять вміст пакета з буфером для електрофорезу, доводять до мітки дистильованою водою та ретельно перемішують до повного розчинення осаду.

Приготування агарозного гелю. У конічну колбу ємністю 250см<sup>3</sup> вносять вміст одного пакета з агарозою, додають 100,0см<sup>3</sup> робочого розчину буфера ТБЕ і ставлять колбу на водяну баню. Вміст колби доводять до кипіння, повністю розтоплюють, помішуючи скляною паличкою та охолоджують до температури 50-60°C. Отриманий розчин агарози повинен бути прозорим і не вміщувати окремих нерозчинених часток. Після чого у колбу з розчином агарози вносять 50,0мкл розчину броміду етидія.

Підготовка електрофоретичної камери до заливання агарозного гелю. Встановлюють гребінку на платформу, розміщуючи її на відстані 3см одна від одної та заливають у неї охолоджену до температури 50°C агарозу. Після застигання агарози (приблизно через 25-30хв.) обережно витягають гребінку; платформу з агарозним гелем переносять до електрофоретичної камери.

В електрофоретичну камеру заливають необхідну кількість розчину буфера ТБЕ так, щоб він покривав агарозний гель шаром завтовшки 4-5мм.. Для нанесення проби відбирають у кількості 10мкл продукту ампліфікації та вносять у відповідну лунку агарозного гелю, під шар буфера ТБЕ так, щоб вміст одного кармана агарозного гелю не перетікав у інший.

Електрофорез проводять у градієнті напруги 8В/см. Потім виймають платформу з агарозним гелем з електрофоретичної камери, дають рідині стекти з гелю та промивають агарозний гель дистильованою водою у кількості 200см<sup>3</sup> 2-3 рази. Агарозний гель вміщують на скло УФ- трансліюмінатору. Фрагменти аналізованої ДНК

виявляються у вигляді смужок жовтогарячого кольору при проходженні УФ- випромінювання з довжиною хвилі 310нм.

Облік результатів. У негативному контрольному зразку (К-) смужки відсутні. Поява смужки на рівні позитивного контролю свідчить про контамінацію (забруднення) компонентів набору.

У позитивних контрольних зразках (К+) одна смужка жовтогарячого кольору розміром 455 нуклеотидний залишок (п. н.).

Відсутність смужки жовтогарячого кольору на рівні позитивного контролю (К+) (455п.н.) свідчить про відсутність збудника ензоотичної пневмонії свиней. Наявність смужки, що відповідає за електрофоретичною рухливістю позитивному контролю (455п.н.), свідчить про наявність в зразку ДНК *M.hyorneumoniae*. Результат аналізу не можна вважати достовірним, якщо на доріжці будь-якого негативного контролю виявляється специфічна смужка. Необхідно поставити не менше трьох негативних контролів на етапі виділення ДНК і стільки ж на етапі постановки ПЛР для виявлення джерела контамінації.

Ефективність способу розкривається в прикладах.

Приклад 1. Для оцінки чутливості та відтворюваності способу щодо індикації ДНК збудника досліджували клінічний матеріал в кількості 12 проб від хворих свиней, що були інфіковані штамом *M. hyorneumoniae* 232. Для контролю специфічності способу використовували зразки хромосомної ДНК *M. hyorneumoniae*. Їх було досліджено з використанням способу-прототипу та розробленого способу. Встановлено, що за допомогою способу-прототипу ДНК збудника виявляється лише в 9 випадках з 12. Розроблений спосіб дозволяв детектувати ДНК в усіх досліджуваних пробах від хворих свиней. Дослідження були проведені триразово, при повтореннях результати відтворені.

Приклад 2. Для контролю внутрішньовидової специфічності способу було використано такі штами *M. hyorneumoniae*, як 232А, 7448 та J. Для контролю специфічності способу використовували хромосомальні ДНК *M.hyorhinis* BTS-7, *M.flocculare* та *M.hyosinoviae*.

Після ампліфікації встановлено наявність специфічних смуг різної інтенсивності у всіх трьох зразків ДНК різних штамів *M.hyorneumoniae*. З пробами хромосомальної ДНК *M.hyorhinis* BTS-7, *M.flocculare* та *M.hyosinoviae* після ампліфікації не утворювалось смуг ампліконів.

Розроблено спосіб виявлення ДНК збудника ензоотичної пневмонії свиней за допомогою ПЛР, який може успішно використовуватись у ветеринарній практиці та при лабораторних дослідженнях.

Таблиця

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	94°C	4хв	1
2	94°C	1хв	45
	56°C	1хв	
	72°C	1хв	
3	72°C	7хв	1