



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **31039** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
C12N 7/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**  
**ДО ПАТЕНТУ**  
**НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під  
відповідальність  
власника  
патенту**(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ РНК ВІРУСУ ДІАРЕЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

1

2

(21) u200712241

(22) 05.11.2007

(24) 25.03.2008

(46) 25.03.2008, Бюл. № 6, 2008 рік

(72) GERILOVICH ANTON PAVLOVICH, UA,  
STEGNIY BORIS TIMOFIYOVICH, UA,  
LIMANSKYA OLYGA YURIYVNA, UA, STEGNIY  
MARINA YURIYVNA, UA(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І  
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ, UA

(56)

(57) Спосіб виявлення РНК вірусу діареї ВРХ, що  
включає екстракцію РНК, її зворотну транскрипцію  
та ампліфікацію кДНК вірусу ВД, який  
**відрізняється** тим, що використовують праймери  
BVDV\_F (5' AGG CGA GCC ATG CCC TTA GT 3')  
та BVDV\_R (5' TCT GCA GCA CCC TAT CAG G 3'),  
які фланкують ділянку UTR 5' за температури  
відпалу 56 °C і синтезують фрагмент довжиною  
244 п.н.

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології, зокрема до розробки молекулярно-генетичних способів діагностики пестивірусних інфекцій великої рогатої худоби, а саме, вірусної діареї ВРХ (ВД) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, а також до методів оцінки контамінації сперми ВРХ, ветеринарних імунобіологічних препаратів та культур перещеплюваних і первинних клітин вірусом діареї ВРХ.

Вірусна діарея великої рогатої худоби є надзвичайно широко розповсюдженим факторним вірусним захворюванням великої рогатої худоби, яке спричиняє значні економічні збитки за рахунок зниження м'ясної продуктивності, загибелі молодняка ВРХ, витрат на санітарно-оздоровчі заходи. Вірус діареї ВРХ є одним з найбільш розповсюджених контамінантів клітинних культур та біопрепаратів.

Для індикації збудника та його антигену запропоновані численні тести, у т.ч. реакція нейтралізації (РН), реакція імунофлуоресценції (РІФ), імуноферментні методи (ІФА) тощо [В.Н.Сюрин. Діагностика вірусних болезней животных. - М.: «Агропромиздат». - 1991. - 564с].

Суттєвим недоліком згаданих тестів є недостатньо висока чутливість (РІФ) при дослідженні контамінації сперми або клітинних культур, висока собівартість (ІФА) та велика трудомісткість (РН).

Кодекс з інфекційних хвороб тварин Міжнародного епізоотичного бюро серед перерахованих вище тестів пропонує

використання ПЛР з метою скринінгу наявності РНК ВД для встановлення попереднього діагнозу та оцінки контамінації сперми ВРХ і клітинних культур [www.oie.int, www.ars.usda.gov]. Недоліком тестів є дороговартість та низька чутливість.

Відомий спосіб виявлення РНК ВД за NS3 геном у multiplex-ПЛР [Houe H., Lindberg A., Moennig V. Test Strategies in Bovine Viral Diarrhea Virus Control and Eradication Campaigns in Europe//Journal of Veterinary Diagnostic Investigation - 2005. - Vol.18, №5. - P.427-436.]. Цей спосіб ґрунтується на екстракції РНК вірусу ВД, її зворотній транскрипції та застосуванні системи праймерів. Це рішення може бути прототипом. Недоліком прототипу є нижча чутливість та вища собівартість за спосіб, що пропонується.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виявлення РНК вірусу діареї великої рогатої худоби, що включає екстракцію РНК, її зворотню транскрипцію та ампліфікацію кДНК вірусу ВД шляхом використання праймерів BVDV\_F (5' AGG CGA GCC ATG CCC TTA GT 3') та BVDV\_R (5' TCT GCA GCA CCC TAT CAG G 3'), які фланкують ділянку UTR 5' за температури відпалу 56°C і синтезу фрагменту довжиною 244 п.н., щоб забезпечити ефективність способу.

Спосіб виконується наступним чином:

Пробопідготовка.

Як матеріал для дослідження використовують кров, стабілізовану цитратом натрію або розчином глюкози, внутрішні органи від загиблих та вимушено забитих тварин та змиви слизових

(19) **UA** (11) **31039** (13) **U**

оболонки від інфікованих тварин, проби фекалій, сперму ВРХ, культуральні розплідки вірусу та зразки клітинних культур і готових ветеринарних імунобіологічних препаратів при контролі щодо контамінації вірусом діареї ВРХ.

Екстракція загальної РНК проводиться за допомогою набору для екстракції Рибосорб (Амплісенс, Москва, Росія), або аналогічного. Процедура складається із лізису клітин та їх детриту, сорбції РНК на сорбенті, дво-триразового відмивання сорбованої РНК та екстракції РНК із сорбенту за допомогою DEPS-води.

Зворотна транскрипція сумарної РНК проводиться за допомогою набору Реверта-Л (Амплісенс, Москва, Росія), або аналогічного. Продукт зворотної транскрипції - кДНК застосовують як досліджувану пробу в реакції ампліфікації.

Ампліфікація.

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

деіонізованої води	12,5мл
50мМ Mg <sup>++</sup>	2,5мл
реакційного буферу	5,0мл
суміші dNTP	2,5мл
праймерів	по 1мл
Taq-полімерази	0,5мл

Після додавання Taq-полімерази, що проводиться в останню чергу, одержану суміш ретельно перемішують на вортесі. Після чого, суміш у дозі 25мл вносять в усі пробірки підготовлені для ампліфікації. Потім додають в усі пробірки по 1 краплі (близько 25мл) мінерального масла. Для проведення ампліфікації у відповідну пробірку з реакційною сумішшю під шар масла вносять 5мл розчину сумарної кДНК проби. Для негативного контрольного зразку в пробірку вносять - 5мл деіонізованої води, а в пробірку для позитивного контрольного зразку - 5мл розчину кДНК з інактивованої формаліном розплідки вірусу діареї. 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 ампліфікованої кДНК у 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 50,0мл розчину броміду етидія.

Підготовка електрофоретичної камери до заливання агарозного гелю. Встановлюють гребінку на платформу, розміщуючи її на відстані 3см одна від одної та заливують 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 заливують необхідну кількість розчину буфера ТБЕ так, щоб він покривав агарозний гель шаром завтовшки 4-5мм.. Для нанесення проби відбирають у кількості 10мл 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-трансілюмінатору. 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 244 нуклеотидний залишок (н.з.).

Відсутність смужки жовтогарячого кольору на рівні позитивного контролю (К+) (244н.з.) свідчить про відсутність вірусу діареї ВРХ. Наявність смужки, що відповідає за електрофоретичною рухливістю позитивному контролю (244п.н.), свідчить про присутність вірусу. 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

З метою визначення специфічності, чутливості та точності розробленого способу була використана панель з 12 РІФ-позитивних та 12 РІФ-негативних щодо вірусу діареї проб. У результаті ампліфікації РНК ВД ВРХ була виявлена в 12 РІФ-позитивних та 2 РІФ-негативних щодо вірусу діареї зразках, що свідчить про вищу чутливість способу за РІФ.

Дослідження були проведені дворазово, при повтореннях результати відтворені.

Приклад 2

Для визначення внутрішньовидової специфічності способу було використано зразки РНК вірусу класичної чуми свиней та клітинну РНК ВРХ.

Після ампліфікації встановлено відсутність смуг в усіх гетеро логічних контролях. Специфічні продукти реакції утворювались лише з пробами РНК з матеріалу від інфікованих тварин.

#### Приклад 3

Були досліджені зразки 12 ліній та субліній культур перещеплюваних клітин (РК-15, MDBK, MDCK, ВНК-21, FLK, SPEV, Vero, PO-2, СТ, CEF). РНК ВД виявлено в одному зразку. Пізніше вірус ідентифікували за ПЛР з праймерами комерційної тест-системи для виявлення ВД ВРХ методом ПЛР (НВО «Нарвак», Російська Федерація).

Розроблений спосіб виявлення ДНК вірусу інфекційного ларинготрахеїту за допомогою ПЛР, має більш виражену специфічність, вищу собівартість і може успішно використовуватись у практиці лабораторних досліджень.

Таблиця

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95°C	2хв	1
2	95°C	1хв	40
	56°C	1хв	
	72°C	1хв	
3	72°C	2хв	1