



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **31041** (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 ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО ЛАРИНГОТРАХЕЇТУ ПТИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**

1

2

(21) u200712267

(22) 05.11.2007

(24) 25.03.2008

(46) 30.12.1899, Бюл.№ , 1899 р.

(72) ГЕРІЛОВИЧ АНТОН ПАВЛОВИЧ, UA,  
СТЕГНІЙ БОРИС ТИМОФІЙОВИЧ, UA(73) ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І  
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ, UA

(56)

(57) Спосіб виявлення вірусу інфекційного ларинготрахеїту птиці за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, що включає ампліфікацію гена ТК вірусу ІЛТ як ПЛР-мішені, який **відрізняється** тим, що використовують праймери ILTV\_F (5' GAA ACG GTC GAC TGG ACG TAT TTG') і ILTV\_gE\_R (5' GGA ACA GTA GCA GTT TCT AAG CAC 3'), за температури відпалу 57 °C, і синтезують фрагмент довжиною 176 п.н.

Корисна модель відноситься до ветеринарної вірусології, зокрема до розробки молекулярно-генетичних способів діагностики герпесвірусних інфекцій, а саме, до виявлення вірусу інфекційного ларинготрахеїту птиці (ІЛТ) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Інфекційний ларинготрахеїт птиці - це гостре респіраторне захворювання, що спричиняється альфагерпесвірусом курей 1 типу [родина Herpesviridae, підродина Alphaherpesvirinae, вид Gallid herpesvirus 1]. Хвороба як правило реєструється серед курей, хоча може вражати також перепелів, куріпок, фазанів та інші види птиці. Клінічні ознаки можуть бути різноманітними від надзвичайно гострих випадків, що охоплюють численне поголів'я, до помірного перебігу, у вигляді легких респіраторних розладів. При будь-якій формі перебігу основним патологоанатомічним проявом хвороби є трахеїт.

Лабораторний діагноз встановлюється на основі ізоляції вірусу, індикації вірусу чи його антигенів, а також шляхом виявлення антитіл до нього в сироватці крові птиці. Також діагностичною ознакою є виявлення тілець-включень при гістологічному дослідженні зразків трахеї враженої птиці.

У відповідності до діючих рекомендацій МЕБ полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) застосовують при індикації вірусу ІЛТ та при визначенні патотипу збудника (з залученням методик визначення поліморфізму патернів рестрикції продуктів ПЛР). Існуючі методики ПЛР-діагностики ІЛТ ґрунтуються на виявленні вірусу за генами глікопротеїдів та тимідинкінази

(www.oie.int). Недоліком методик є дороговартість та низька чутливість.

Відомий спосіб виявлення 500 п.н.(пар нуклеотидів) ділянки гену ТК за допомогою ПЛР-аналізу (Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis vims using the polymerase chain reaction/ R. A. Williams, M. Bennett, J.M. Bradbury, R.M. Gaskell, R.C. Jones, F.T.W. Jordan // Journal of General Virology. - 1992. - 73. - P. 2415-2420.). Цей спосіб ґрунтується на застосуванні системи праймерів при температурі відпалу 47°C. Це рішення може бути прототипом. Недоліком прототипу є низька специфічність способу детекції та вища собівартість за рахунок більшого реакційного об'єму (50 мкл) за спосіб, що пропонується.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виявлення вірусу інфекційного ларинготрахеїту птиці за допомогою полімеразної ланцюгової реакції, що включає ампліфікацію гена ТК вірусу ІЛТ, як ПЛР - мішені шляхом використання праймерів ILTV\_F (5' GAA ACG GTC GAC TGG ACG TAT TTG') і ILTV\_gE\_R (5' GGA ACA GTA GCA GTT TCT AAG CAC 3'), за температури віджигу 57°C і синтезу фрагменту довжиною 176 п.н., щоб забезпечити ефективність способу.

Спосіб виконується наступним чином:

Пробопідготовка. Як матеріал для дослідження використовують кров, стабілізовану цитратом натрію або розчином глюкози та трахеальні змиви від інфікованої птиці, а також культуральні розплідки вірусу.

Екстракція загальної ДНК проводиться за

(13) **U**  
(11) **31041**  
(19) **UA**

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):

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

Після додавання Taq-полімерази, що проводиться в останню чергу, одержану суміш ретельно перемішують на вортексі. Після чого, суміш у дозі 40 мкл вносять в усі пробірки підготовлені для ампліфікації. Потім додають в усі пробірки по 1 краплі (близько 25 мкл) мінерального масла. Для проведення ампліфікації у відповідну пробірку з реакційною сумішшю під шар масла вносять 5 мкл розчину сумарної ДНК проби. Для негативного контрольного зразку в пробірку вносять - 5 мкл деіонізованої води, а в пробірку для позитивного контрольного зразку - 5 мкл розчину ДНК з інактивованої формаліном культуральної розплідки вірусу ІЛТ. Пробірки закривають й центрифугують протягом 3-5 секунд при 2000 об/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 1000,0 см<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 250 см<sup>3</sup> вносять вміст одного пакета з агарозою, додають 100,0 см<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 вмішувати окремих нерозчинених часток. Після чого у колбу з розчином агарози вносять 50,0 мкл розчину броміду етидія.

Підготовка електрофоретичної камери до заливання агарозного гелю. Встановлюють гребінку на платформу, розміщуючи її на відстані 3 см одна від одної та заливають у неї охолоджену до температури 50°C агарозу. Після застигання агарози (приблизно через 25-30 хв.) 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 4-5 мм. Для нанесення проби відбирають у кількості 10 мкл 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 8 В/см. Потім виймають платформу з агарозним гелем з електрофоретичної камери, дають рідині стекти з гелю та промивають агарозний гель дистильованою водою у кількості 200 см<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 310 нм.

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 176 нуклеотидний залишок (н.з.).

Відсутність смужки жовтогарячого кольору на рівні позитивного контролю (К+) (176 н.з.) свідчить про відсутність вірусу ІЛТ. Наявність смужки, що відповідає за електрофоретичною рухливістю позитивному контролю (176 п.н.), свідчить про присутність вірусу ІЛТ. 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 вірусу ІЛТ досліджували проби, що містили штами ВНИИБП-У та G вірусу ІЛТ з активністю 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6 та 8 EID 50/мл. Їх було досліджено з використанням способу - прототипу та розробленого способу. Встановлено, що спосіб - прототип придатний до виявлення вірусу ІЛТ лише штаму ВНИИБП-У з активністю 1, 2, 4, 6 та 8 EID 50/мл. Розроблений спосіб дозволяв детектувати ДНК в пробах обох штамів з активністю вірусу 0,5, 1, 2, 4, 6 та 8 EID 50/мл. Дослідження були проведені триразове, при повтореннях результати відтворені.

Приклад 2. Для визначення специфічності способу було використано 10 проб клінічного матеріалу від інфікованих курей і 5 - від інтактних.

Для контролю специфічності способу використовували зразки ДНК герпесвірусів індичок, хвороби Марека та інфекційного ринотрахеїту ВРХ.

Після ампліфікації встановлено наявність специфічних смуг різної інтенсивності у всіх 10 пробах клінічного матеріалу, а також в треку позитивного контрольного зразку ДНК вірусу ІЛТ (штам G). З пробами ДНК клінічного матеріалу від здорових свиней після ампліфікації не утворювалось смуг ампліконів.

Проби сумарної ДНК гетерогенних контролів також не утворювали специфічних смуг після реакції за способом, що пропонується.

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	2 хв	1
2	95°C	0,5 хв	40
	57°C	0,5 хв	
	72°C	0,5 хв	
3	72°C	2 хв	1