



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **87312**

(13) **U**

(51) МПК

C12Q 1/70 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 03496**

(22) Дата подання заявки: **21.03.2013**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.02.2014**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.02.2014, Бюл.№ 3**

(72) Винахідник(и):

**Кулібаба Роман Олександрович (UA),
Юрко Поліна Сергіївна (UA),
Білецька Ганна Василівна (UA),
Терещенко Олександр Володимирович
(UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ТВАРИННИЦТВА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ
НАУК УКРАЇНИ,
вул. 7-ї Гвардійської Армії, 3, смт Кулиничі,
Харківський р-н, Харківська обл., 62404 (UA)**

(54) СПОСІБ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ ДІАГНОСТИКИ ЕНТЕРИТІВ ГУСЕЙ З ВИКОРИСТАННЯМ ДУПЛЕКСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

(57) Реферат:

Спосіб диференційної діагностики ентеритів гусей різної вірусної етіології включає ідентифікацію фрагментів геномів збудників ентеритів гусей за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Проводять дуплексну ПЛР в "одній пробірці", у результаті якої можливе одночасне визначення фрагментів геномів парвовірусу та поліомавірусу, що дозволяє розрізнити захворювання, симптомокомплекси яких однакові.

UA 87312 U

Вірусний ентерит гусей (ВЕГ) є одним із розповсюджених захворювань молодняку гусей та, завдяки високій смертності, що досягає 100 %, наносить істотні економічні збитки. Традиційно вважається, що збудник захворювання - вірус (goose parvovirus - GPV), який належить до родини Parvoviridae, підродини Parvovirinae, рід Dependovirus. Клінічна картина характеризується нервовими явищами, відмовленням від корму, ринітом, кон'юнктивітом, проносом (діареєю) і таке інше. При розтині спостерігається кутикуліт, катаральний, геморагічний або фібринозний ентерит (патогномонічною ознакою вважається наявність так званої "ялинки" - геморагічне запалення слизової оболонки прямої кишки), асцит, ураження серця, печінки, нирок і таке інше. Однак подібна клінічна та патологоанатомічна картина проявляється й при іншому захворюванні - геморагічному нефрит-ентериті гусей (ГНЕГ; Hemorrhagic Nephritis Enteritis of Geese, HNEG) або інакше поліомавірусній геморагічній інфекції гусей, яку викликає поліомавірус (goose hemorrhagic polyomavirus - GHPV), що належить до родини Polyomaviridae, рід Avipolyomavirus. Таким чином, під вірусним ентеритом гусей може бути як хвороба Держі (парвовірусна інфекція), так і геморагічний нефрит-ентерит гусей (поліомавірусна інфекція). Обидва віруси ДНК-утримуючі, мають схожі морфологічні та фізико-хімічні властивості, особливості реплікації та транскрипції генетичного матеріалу. Труднощі диференційної діагностики полягають у складності і довготривалості точної ідентифікації вірусу (парвовірус/поліомавірус) за допомогою стандартних методів, оскільки вони передбачають вірусовиділення на гусячих ембріонах або в культурі клітин та потребують ідентифікації вірусу, так як обидва патогени викликають загибель гусячих ембріонів з подібними патологоанатомічними ознаками та однакову цитопатичну дію у культурі фібробластів ембріонів гусей.

Відомі способи ідентифікації вірусу в реакції нейтралізації (РН) та реакції дифузної преципітації (РДП) [1]. Проте, для проведення РН необхідна наявність гусячих ембріонів або культур клітин фібробластів гусячих ембріонів та специфічної сироватки з антитілами до збудника хвороби. Методи, що базуються на використанні культур клітин або ембріонів гусей, достатньо затратні, потребують багато часу та відчутних трудовитрат.

В свою чергу, реакція дифузної преципітації достатньо складна у проведенні, також потребує неабияких навиків; постановка реакції можлива лише при використанні високоочищеного антигену без сторонніх білкових домішок, що суттєво впливає на відтворюваність результатів.

Неможливість швидкої постановки точного діагнозу при подібності клінічних та патологоанатомічних проявів обох захворювань, призводить до своєрідного "маскування" поліомавірусної інфекції під хворобу Держі, що тільки посилює ситуацію в цілому та сприяє широкому розповсюдженню даної хвороби у господарствах з утримання гусей на Україні. Тому, виходячи із усього вищевикладеного, доцільним являється застосування сучасних молекулярно-генетичних методів для вирішення задач диференційної діагностики вірусних ентеритів гусей різної етіології.

Прикладами можуть слугувати: спосіб виявлення РНК американського та європейського генотипів високопатогенного вірусу грипу птиці субтипу H7 [2]; метод виявлення та диференціації вірусів трансмісивного гастроентериту, ротавірусної інфекції та епідемічної діареї свиней за допомогою ПЛР; а також метод з виявлення геному *Mycoplasma gallisepticum* та *Mycoplasma synoviae* за допомогою ПЛР у форматі мультиплекс [3].

Існують способи виявлення вірусів інфекційних хвороб птиці за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) - інфекційного ларинготрахеїту [4], пташиного грипу [5], хвороби Марека [6], але способу виявлення вірусів ентеритів гусей різної етіології за допомогою полімеразної ланцюгової реакції немає.

Відомий спосіб диференціації підвидів *Fusobacterium necrophorum* за допомогою дуплексної ПЛР [7], але цей спосіб призначений для виявлення специфічних грибів, не придатний для виявлення певних вірусів.

Таким чином, аналогів способу, що пропонується, немає.

В основу корисної моделі поставлена задача - розробити спосіб проведення у одній пробірці одночасної ампліфікації фрагментів геномів парвовірусу та поліомавірусу з використанням праймерних систем, фланкуючих специфічні для кожного із вірусів ділянки ДНК, підбору оптимальних температурних режимів проведення дуплексної реакції та концентрації олігонуклеотидів з метою запобігання утворення неспецифічних продуктів реакції. Застосування методу дуплексної ПЛР (одночасної детекції двох збудників у одній пробірці) дозволяє значно знизити матеріальні та витрати часу на проведення аналізу.

Спосіб здійснюється наступним чином.

Виділення ДНК.

Для виділення ДНК обох вірусів використовують тканини серця, печінки або кишечника хворої або підозрілої на захворювання птиці. Зразки тканин охайно гомогенізують та переносять у кількості 100-200 мкг у стерильні мікропробірки. Виділення ДНК здійснюють з використанням набору реагентів "ускоренная пробоподготовка" (Амплисенс, Россия) або аналогічного, згідно з прописом. Процедура складається із інкубування проб при 56 °С у присутності протеїнази К та сорбенту з наступною інактивацією ферменту при 100 °С. Протеїназа К лізує клітини, сорбент зв'язує домішки, нуклеїнові кислоти переходять у розчин. У подальшому проби центрифугують з метою осадження сорбенту, супернатант, в якому утримується ДНК, використовують для постановки ампліфікації.

Ампліфікація.

Для детекції геному поліомавірусу використовують праймери, фланкуючі консервативні ділянки гену VP1, для детекції парвовірусу - гена VP3. Готують відповідно для кожного набору реагентів реакційну суміш. Метод ефективний при використанні наборів різних виробників, при цьому необхідно дотримуватися обов'язкової умови - концентрація праймерів, із розрахунку на об'єм реакційної суміші має складати 0,1 мкМ. Ампліфікацію проводять за такою схемою:

1) денатурація - при температурі 94 °С протягом 5 хв;

2) потім 35 циклів: денатурація - при температурі 94 °С протягом 45 с, відпал - при температурі 60 °С протягом 45 с, елонгація - при температурі 72 °С протягом 45 с;

3) фінальна стадія - при температурі 72 °С протягом 5 хв.

Як негативний контроль використовують деіонізовану воду.

Електрофорез продуктів ампліфікації.

Використовують метод горизонтального електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі. Забарвлення проводять за допомогою етидіуму броміду, який додають безпосередньо у гель при його виготовленні. Електрофорез проводять протягом 25 хв. при 120 V. Розмір ампліфікованих фрагментів визначають за допомогою маркера молекулярних мас М-100 (10 смуг від 1000 до 100 п.н. з кроком у 100 п.н.). Проби візуалізують з використанням трансільюмінатору.

Облік результатів.

Наявність у пробі ампліфікованого фрагмента розміром 539 п.н. вказує на присутність у зразку, який було аналізовано, геному парвовірусу. Відсутність даного специфічного фрагменту (539 п.н.) свідчить про відсутність у зразку геному парвовірусу.

Наявність у пробі ампліфікованого фрагмента розміром 144 п.н. вказує на присутність у зразку, який було аналізовано, геному поліомавірусу. Відсутність даного специфічного фрагмента (144 п.н.) свідчить про відсутність у зразку геному поліомавірусу.

Наявність у пробі обох ампліфікованих фрагментів 539 та 144 п.н., свідчить про присутність у зразку як парвовірусу, так і поліомавірусу. Наявність специфічних полос (539 та 144 п.н.) у негативному контрольному зразку вказує на контамінацію проб.

Ефективність методу розкривається в прикладі.

Приклад використання запропонованого методу.

Для проведення диференціальної діагностики з використанням дуплексної ПЛР використовували зразки печінки, серця та кишечника гусей, віком 4-6 тижнів із трьох господарств різних областей України, що мали виражені клінічні ознаки ентериту. За результатами патологоанатомічного розтину встановлено діагноз - вірусний ентерит. Після проведення дуплексної ПЛР показано, що у зразках, які отримано від гусей перших двох господарств, присутні геноми як парвовірусу, так і поліомавірусу (539 та 144 п.н.), у той час як у зразках, що отримані від гусей третього господарства, присутній тільки парвовірус (539 п.н.). Подібні результати були отримані при аналізі зразків усіх трьох органів (печінка, серце, кишечник). Таким чином, метод відзначається достатньою чутливістю при аналізі біологічного матеріалу різного походження.

Таким чином, вперше в Україні розроблено метод диференційної діагностики вірусних ентеритів гусей різної етіології з використанням дуплексної полімеразної ланцюгової реакції, що дозволяє визначати наявність у клінічному матеріалі геномів парвовірусу та поліомавірусу протягом 7-8 годин. Метод може успішно використовуватися у ветеринарних лабораторіях.

Джерела інформації:

1. Антонов Б.И. Борисова В.В., Каменева Л.П. Лабораторные исследования в ветеринарии: Вирусные, риккетсиозные и паразитарные болезни. Справочник. - М.: Агропромиздат, 1987. - С. 102-104.

2. Патент UA № 42434, C12N 7/00 Спосіб виявлення РНК американського та європейського генотипів високопатогенного вірусу грипу птиці субтипу Н7 та диференціація за геном гемаглютиніни. Опубл. 10.07.2009, бюл. № 13.

3. Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц с использованием полимеразной цепной реакции // под ред. Е.А. Непоклонова, Н.А. Власова, В.В. Дрыгина / ФГУ "Федеральный центр охраны здоровья животных" (ФГУ "ВНИИЗЖ"). - Владимир, 2008. - 278 с.

5 4. Патент UA № 31041, C12N 7/00 Спосіб виявлення вірусу інфекційного ларинготрахеїту птиці за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. Опубл. 25.03.2008, бюл. № 6.

5. Патент UA № 18727, C12N 7/00 Спосіб ідентифікації кДНК штамів вірусу високопатогенного пташиного грипу типу H5 за ампліфікацією специфічної ділянки на гені. Опубл. 15.11.2006, бюл. № 11.

10 6. Патент UA № 7889, C12Q 1/00, A61B 10/00, G01N 1/28, G01N 33/48, G09B 23/28. Спосіб індикації ДНК патогенних штамів вірусу хвороби Марека першого серотипу. Опубл. 15.07.2005, бюл. № 7

15 7. Заявка RU № 2004125139, C12Q 1/68, C12N 15/31. Способ дифференциации подвидов Fusobacterium necrophorum с помощью дуплексной полимеразной цепной реакции. Опубл. 27.01.2006.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб диференційної діагностики ентеритів гусей різної вірусної етіології, що включає ідентифікацію фрагментів геномів збудників ентеритів гусей за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який **відрізняється** тим, що проводять дуплексну ПЛР в "одній пробірці", у результаті якої можливе одночасне визначення фрагментів геномів парвовірусу та поліомавірусу, що дозволяє розрізнити захворювання, симптомокомплекси яких однакові.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601