



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 147020

(13) U

(51) МПК

A61K 39/145 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2020 05657**

(22) Дата подання заявки: **02.09.2020**

(24) Дата, з якої є чинними
права інтелектуальної
власності: **08.04.2021**

(46) Публікація відомостей
про державну
реєстрацію: **07.04.2021, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):

Герілович Антон Павлович (UA),
Солодянкін Олексій Сергійович (UA),
Стегній Борис Тимофійович (UA),
Лиманська Ольга Юріївна (UA),
Рудова Наталія Геннадіївна (UA),
Кіт Марина Юріївна (UA),
Ареф'єв Василь Львович (UA),
Сипачова Марина Артурівна (UA),
Меженська Наталія Анатоліївна (UA),
Корнієнко Леонід Євгенович (UA)

(73) Володілець (володільці):

НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР
"ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І
КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ",
вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023 (UA)

(54) ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК КАПРІПОКСВІРУСІВ (НОДУЛЯРНИЙ ДЕРМАТИТ ВРХ, ВІСПА ОВЕЦЬ, ВІСПА КІЗ) МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ "DNA-TEST-CAPRIPOXVIRUS"

(57) Реферат:

Тест-система для виявлення ДНК капріпоксвірусів (нодулярний дерматит ВРХ, віспа овець, віспа кіз) методом полімеразної ланцюгової реакції "DNA-test-Capripoxvirus" включає розчин "RT-PCR MasterMix", розчин зонда CPV_P, розчини праймерів CPV_F та CPV_R, воду деіонізовану, позитивний контрольний зразок, суміші розчинів праймерів та розчин зонда для детекції внутрішнього позитивного контролю IC-mix, стандартизований внутрішній позитивний контроль.

UA 147020 U

UA 147020 U

Корисна модель належить до ветеринарної вірусології, а саме до засобів діагностики, та може бути використана для детекції ДНК капріпоксвірусів (віруси нодулярного дерматиту ВРХ, віспи овець та віспи кіз).

5 Нодулярний дерматит великої рогатої худоби - це вірусна висококонтагіозна транскордонна хвороба великої рогатої худоби, що характеризується лихоманкою, ураженням лімфатичної системи, набряками підшкірної клітковини, утворенням шкірних вузлів (горбів), ураженням очей і слизових оболонок органів дихання і травлення.

Економічне та соціальне значення цієї хвороби зумовило необхідність розробки тест-системи для виявлення ДНК капріпоксвірусів (нодулярний дерматит ВРХ, віспа овець, віспа кіз) методом полімеразної ланцюгової реакції "DNA-test-Capripoxvirus" з метою моніторингу поширення вірусу нодулярного дерматиту та інших капріпоксвірусів у популяціях ВРХ та ДРХ, а також кровосисних двокрилих.

15 Згідно з Рекомендаціями МЕБ щодо хвороб наземних тварин (OIE Terrestrial Manual), для лабораторної діагностики нодулярного дерматиту можна використовувати такі методи як ізоляція вірусу в культурах клітин жуйних, різноманітні серологічні (ІФА, імуноблот, РІФ) та молекулярно-генетичні методи (зокрема різні формати ПЛР).

Метод ізоляції вірусу чутливий, але до його недоліків можна віднести те, що отримання результатів займає кілька днів і потребує особливих умов біозахисту та дорогих культуральних середовищ. Серологічні методи використовують здебільшого для вивчення напруженості післявакцинального імунітету та виявлення вірусу методом РІФ у тварин з яскраво вираженою симптоматикою (OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Seventh Edition. - 2017. - V. 2. - P. 1158-1171).

20 Найближчим аналогом є методика виявлення ДНК капріпоксвірусів, включаючи вірус нодулярного дерматиту ВРХ за допомогою ПЛР, описаний у Рекомендаціях МЕБ щодо хвороб наземних тварин. Методика включає набір реактивів для проведення ампліфікації включає розчини зонда, праймерів, розчин "RT-PCR MasterMix", деіонізовану воду (OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Seventh Edition. - 2017. - V. 2. - P. 1158-1171).

Це рішення може бути прототипом.

30 Суттєвим недоліком даного прототипу є те, що як позитивний контроль використовується ДНК з інфікованої капріпоксвірусами культури клітин, що ускладнює стандартизацію, та відсутній контроль екстракції ДНК.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити Тест-систему для виявлення ДНК капріпоксвірусів (нодулярний дерматит ВРХ, віспа овець, віспа кіз) методом полімеразної ланцюгової реакції "DNA-test-Capripoxvirus", що включає розчин "RT-PCR MasterMix", розчин зонда CPV_P, розчини праймерів CPV_F та CPV_R, воду деіонізовану, позитивний контрольний зразок, шляхом додавання суміші розчинів праймерів та розчину зонда для детекції внутрішнього позитивного контролю IC-mix, стандартизованого внутрішнього позитивного контролю та використання як позитивний контроль рекомбінантної плазмиди pTZ57R/T_LSD, щоб забезпечити ефективність тест-системи для виявлення ДНК капріпоксвірусів методом полімеразної ланцюгової реакції.

45 На відміну від найближчого аналога, до складу набору для проведення ПЛР входить рекомбінантний позитивний контрольний зразок. Сконструйована плазміда є універсальною для капріпоксвірусів, включаючи вірус нодулярного дерматиту, та містить рекомендовану МЕБ таргетну послідовність гену протеїну адгезії. Ефективність тест-системи ілюструється наступними прикладами.

Приклад 1. Для виділення нуклеїнових кислот зі зразків патматеріалу використовують комерційний набір QIAamp cador Pathogen Mini Kit.

Екстракцію проводять з 200 мкл досліджуваного матеріалу з додаванням внутрішнього позитивного контролю в об'ємі 10 мкл і елюцією ДНК в 100 мкл буферного розчину TE. Для ампліфікації ділянки ДНК капріпоксвірусів в окремій пробірці готують реакційну суміш на N зразків, у число яких входять позитивний і негативний контрольі. При цьому на одну реакцію додають 4,7 мкл стерильної H₂O для ПЛР вільної від нуклеаз, 10 мкл RT-PCR Master Mix, 0,5 мкл зонда CPV_P (10 пмоль/ мкл), по 0,4 мкл праймерів CPV_F та CPV_R (20 пмоль/ мкл) та 2 мкл суміші праймерів IC-mix. До 18,0 мкл реакційної суміші додають 2 мкл досліджуваного зразка/контролю. Переносять пробірки до ампліфікатора і проводять ампліфікацію за наступною програмою: 95 °C 3 хвилини, 95 °C 10 секунд, 58 °C 30 секунд, 60 °C 30 секунд (40 циклів). Програмують детекцію флуоресцентного сигналу по каналам FAM (492-516 нм) та JOE (HEX) (520-548 нм). За результатами аналізу встановлено флуоресцентний сигнал по каналу FAM (492-516 нм) в досліджуваних зразках номер 1 (вірус нодулярного дерматиту), 2 (капріпоксвірус)

і позитивному контролі та сигнал по каналу JOE (HEX) (520-548 нм) в досліджуваних зразках, що дає підставу констатувати наявність ДНК капріпоксвірусів у зразках номер 1 та 2.

Приклад 2. Для виділення нуклеїнових кислот зі зразків патматеріалу використовують сорбентну методику (Boom R та ін., 1990) з 100 мкл досліджуваного матеріалу з додаванням внутрішнього позитивного контролю в об'ємі 5 мкл і елюювання ДНК в 50 мкл буферного розчину TE.

Готують ампліфікаційну суміш та проводять ампліфікацію як вказано у прикладі 1.

За результатами аналізу встановлено флуоресцентний сигнал по каналу FAM (492-516 нм) в позитивному контролі та відсутність сигналу по каналу JOE(HEX) (520-548 нм) в досліджуваних зразках, що вказує на помилку в процесі екстракції ДНК.

Таким чином, тест-система для виявлення ДНК капріпоксвірусів (нодулярний дерматит ВРХ, віспа овець, віспа кіз) методом полімеразної ланцюгової реакції "DNA-test-Capripoxvirus" дозволяє підвищити специфічність, чутливість методу та скоротити час, необхідний для детекції капріпоксвірусів, а рекомбінатний контрольний зразок можна використовувати при детекції капріпоксвірусів із застосуванням різних форматів ПЛР, рекомендованих МЕМБ.

Основними споживачами тест-системи є наукові установи та лабораторії ветеринарної медицини.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20

1. Тест-система для виявлення ДНК капріпоксвірусів (нодулярний дерматит ВРХ, віспа овець, віспа кіз) методом полімеразної ланцюгової реакції "DNA-test-Capripoxvirus", що включає розчин "RT-PCR MasterMix", розчин зонда CPV_P, розчини праймерів CPV_F та CPV_R, воду деіонізовану, позитивний контрольний зразок, яка **відрізняється** тим, що додатково містить суміші розчинів праймерів та розчин зонда для детекції внутрішнього позитивного контролю IC-mix, стандартизований внутрішній позитивний контроль.

25

2. Тест-система для виявлення ДНК капріпоксвірусів за п. 1, яка **відрізняється** тим, що як позитивний контроль використовують рекомбінантну плазмиду pTZ57R/T_LSD.