



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113776** (13) **U**
(51) МПК

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 09035**

(22) Дата подання заявки: **25.08.2016**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.02.2017**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.02.2017, Бюл.№ 3**

(72) Винахідник(и):

**Зарічна Ольга Зіновіївна (UA),
Тарасюк Олександра Олександрівна
(UA),**

**Кушнір Зенон Григорович (UA),
Чіпак Наталія Іванівна (UA),
Топорович Оксана Іванівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ЛЬВІВСЬКИЙ
НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ
ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ГІГІЄНИ МОЗ
УКРАЇНИ",**

вул. Зелена, 12, м. Львів, 79005 (UA),

Зарічна Ольга Зіновіївна,

вул. Наукова, 116/139, м. Львів-71, 79071
(UA),

Тарасюк Олександра Олександрівна,

вул. Коротка, 3/7, м. Львів-18, 79018 (UA),

Кушнір Зенон Григорович,

вул. Меблярська, 16/4, м. Львів-35, 79035
(UA),

Чіпак Наталія Іванівна,

вул. Майорівка, 1/24, м. Львів-38, 79038
(UA),

Топорович Оксана Іванівна,

вул. Патона, 2/53, м. Львів-40, 79040 (UA)

(74) Представник:

Буцяк Ганна Андріївна

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ RICKETTSIA PROWAZEKII

(57) Реферат:

Спосіб виділення *Rickettsia prowazekii*, при якому при виділенні збудника з біологічного матеріалу для його ідентифікації використовують полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі з метою контролю кількості ДНК збудника висипного тифу на етапах підбору оптимальної інфікуючої дози, виявлення *R. prowazekii* в інфікованих вошах *Pediculus humanus corporis* (de Geer) та в патологічному матеріалі від лабораторних тварин.

UA 113776 U

Корисна модель належить до галузі мікробіології та стосується виділення *R. prowazekii* - збудника висипного тифу для подальшого вивчення його біологічних властивостей, культивування, виготовлення діагностичних і профілактичних препаратів, диференційної діагностики висипнотифозної інфекції.

Епідемічний висипний тиф залишається актуальною проблемою охорони здоров'я населення багатьох країн світу, особливо тих, де спостерігались епідемічні спалахи протягом останніх десятиліть. В різних країнах світу зареєстровано всього три значні спалахи епідемічного висипного тифу: у 1997 році у Бурунді, яким було охоплено 100 тисяч осіб, невеликий спалах в Перу та спалах у січні 1998 року в м. Липецьку Російської Федерації (Шандала М.Г., 2011). В найближчій до України Російській Федерації протягом 1999-2009 років щорічно реєструвалось від 10 до 15 випадків хвороби Бриля і лише у 2010 році було зареєстровано 4 її випадки у людей старшого віку (Шандала М.Г., 2011; Лопатіна Ю.В., 2010). Спорадичні випадки висипного тифу та перенесена висипнотифозна інфекція реєструються серед безпритульних осіб у Франції, у Північній Африці (Руанда, Бурунді, Алжир), Південній Америці (Болівія, Перу) (Bechav V., 2010; Mokrani K., 2012). Окрім можливості занесення висипнотифозної інфекції хворими, існує також можливість її проникнення з інфікованими вошами під час переміщення громадян. Виявлення *Rickettsia prowazekii* у переносниках - вошах, на фоні відсутності захворювань на епідемічний висипний тиф в Україні, згідно теорії саморегуляції паразитарних систем відповідає перебуванню популяції збудника у фазі резервації в міжепідемічний період і є актуальним питанням епідеміологічного нагляду за цим захворюванням та необхідною ланкою вивчення циркулюючих штамів. Це вимагає модернізації існуючої лабораторної діагностики, з застосуванням сучасного молекулярно-генетичного методу, для оптимізації епідеміологічного нагляду за висипнотифозною інфекцією в Україні та вжиття необхідних протиепідемічних заходів.

Суть корисної моделі полягає у виділенні збудника висипного тифу - *R. prowazekii* з біологічного матеріалу шляхом якісного та кількісного визначення специфічних нуклеотидних послідовностей його ДНК на етапах підбору оптимальної інфікуючої дози, виявлення *R. prowazekii* в інфікованих вошах *Pediculus humanus corporis* (de Geer) та в патологічному матеріалі від лабораторних тварин.

Прототипом запропонованого способу є виділення *R. prowazekii* із застосуванням традиційних методів ідентифікації збудника - мікроскопії та специфічної імунодетекції.

Запропонований спосіб виділення *R. prowazekii* включає наступний алгоритм:

- 1) зараження вошей *Pediculus humanus corporis* (de Geer) біологічним матеріалом;
- 2) пасажування на морських свинках та/або лабораторних білих мишах отриманого ізоляту.

Матеріалом для досліджень на висипний тиф можуть бути:

- а) кров (сироватка) від хворих чи підозрілих на захворювання людей;
- б) секційний матеріал померлих людей;
- в) матеріал від лабораторних тварин (кров, внутрішні органи);
- г) воші та їх екскременти.

Методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі досліджено 300 пулів головних та одяжних вошей, зібраних з інвестованих осіб в різних регіонах України. Для виділення ДНК збудника використовували комерційні набори реактивів Ultra Glean™ Tissue & Cells DNA Isolation Kit та Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc., USA). Для детекції в досліджуваних пробах ДНК *R. prowazekii* використовували прямий R_prow_337_For (5'-TCTTAACATAACAGGGCAGGGTAT-3') і зворотній R_prow_455_Rev (5'-GCCCCGCTAAGATCATTAGCGT-3') праймери (Sigma-Aldrich, Germany), зонд RP428BProbe ([6FAM]CCGAGCCAGCGCCACCATGCACTTTTGTAAAGAGG CTCGG[TAM]) SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X). Ампліфікацію проводили на циклері Rotor-Gene™ 6000 в режимі послідовно зв'язаних програм при температурах: 94 °C - 3 хв., 94 °C - 5 сек. (50 циклів), 60 °C - 30 сек. (Jiang J., 2003). Аналіз даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення Thermal Cycler System. ДНК *R. prowazekii* виявлено у 5 пулах вошей, що становить 1,7 % від загальної кількості досліджених проб. Отримані позитивні результати підтвердили і доповнили дані імунолюмінесцентної мікроскопії, при яких збудник висипного тифу був виявлений в чотирьох пробах при головному та платяному педикульозі. Інфіковані воші були зібрані з дорослих осіб без певного місця проживання, місця роботи або осіб похилого віку, серологічне обстеження яких не представлялося можливим. Позитивні результати лабораторних досліджень вказують на збереження висипнотифозного потенціалу серед певних контингентів населення та необхідності більш широкого використання методу ПЛР в реальному часі при здійсненні епідеміологічного моніторингу. Використання даного методу при виділенні *R. prowazekii* з біологічного матеріалу дозволяє проводити не лише якісне, але й кількісне

визначення ДНК збудника та оптимізує диференційну діагностику висипнотифозної інфекції. Дослідження можна проводити як з чистими культурами збудника, так і безпосередньо з біологічним матеріалом на фоні іншої мікрофлори.

Всі роботи з матеріалом, підозрілим на зараження збудником висипного тифу, включно зі збором, транспортуванням і підготовкою матеріалу для дослідження, проводяться відповідно до діючого нормативного документу, який регламентує роботу зі збудниками I-II груп патогенності (Державні санітарні правила ДСП 9.9.5.035-99 "Безпека роботи з мікроорганізмами I-II груп патогенності". - Київ, 1999 р.).

При зараженні вошей *Pediculus humanus corporis* (de Geer) біологічним матеріалом застосовують удосконалений метод Вейгля (Методичні рекомендації "Культивування *Rickettsia prowazekii*, *Bartonella quintana* та вошей *Pediculus corporis* (de Geer) лабораторної популяції". - Київ, 2007 р.). Продуктивність культивування *R. prowazekii* в пасажжах на вошах багато в чому залежить від вибраної інфікуючої дози. Для проведення пасажів інфікуючу дозу підбирають з таким розрахунком, щоб викликати максимальну загибель вошей на 6-7-му добу після зараження. При цьому використовують відповідні ДНК-стандарті для побудови калібрувальних кривих після проведення реакції, що дозволяє вирахувати вихідну кількість копій ДНК у зразках. Суспензії зберігають протягом однієї години в холодильнику при температурі +4 °C (дозволяється протягом тривалого часу в рефрижераторі при температурі нижче -20 °C), або використовують стандартний ліофілізований посівний матеріал.

Для виявлення ДНК рикетсій та їх корпускул у вошах досліджують вміст кишечника, де рикетсії розмножуються в епітеліальних клітинах, а також фекалії вошей, в яких концентрація рикетсій може бути більшою, ніж в кишечнику. Перед препаруванням кишечника кожну вошу промивають в стерильному фізіологічному розчині та виготовляють проби наступним методом. На стерильне предметне скло наносять декілька крапель стерильного фізіологічного розчину, в кожну з яких вносять по одній воші. Препарувальною голкою притримують голову воші, а маленьким препарувальним ножом злегка надрізають тіло нижче голови, не зачіпаючи кишечник. Потім пересувають ніж, легенько натискаючи на тіло, розтягують голову і тіло в різні сторони. Кишечник, таким чином, випадає з хітинової оболонки (кутикули) і відривається в нижньому відділі. Після цього відсікають кишечник від голови. Голову і кутикулу відсувають на край краплі, а кишечник розтирають препарувальним ножом у краплі. Суспензію переносять мікропіпеткою в стерильну мікропробірку. Об'єм фізіологічного розчину для кожного кишечника становить 300 мкл, що достатньо для наступних процедур, а саме дослідження проб методами світлової (за Маккіавело, Здродовським, Gimenez) та імунолюмінесцентної мікроскопії (прямий і непрямий), ПЛР в реальному часі та біологічної проби на лабораторних тваринах (Інформаційний лист № 53 "Сучасний алгоритм виявлення *Rickettsia prowazekii* та *Bartonella quintana* у вошах *Pediculus humanus*". - Київ, 2015 р.).

Виділення *R. prowazekii* з біологічного матеріалу з застосуванням ПЛР в реальному часі є найбільш репрезентативним методом підтвердження рикетсійної етіології захворювання. Проведення реакції включає три основні етапи: підготовка досліджуваної проби і виділення ДНК, власне ампліфікація та детекція ампліфікованої ДНК, облік та інтерпретація результатів реакції. Для виділення ДНК зразків використовують комерційні набори реактивів, призначені для дослідження різного виду біологічного матеріалу, з дотриманням техніки проведення процедури та вимог інструкцій виробника. Для проведення ПЛР-РЧ необхідні наступні компоненти: ДНК-матриця, дезоксирибонуклеозидтрифосфати (діапазон робочих концентрацій 50-500 μ M), два праймери, термостабільна ДНК-полімераза, $MgCl_2$ (0,5-5,0 mM), буферний розчин.

Основна ланка ПЛР - підбір чутливих і специфічних праймерів, оскільки саме вони забезпечують можливість ампліфікації та індикації необхідної послідовності. Набори праймерів для виявлення різних генів рикетсій відомі та можуть використовуватися в будь-якій лабораторії за наявності відповідного обладнання та кваліфікованого персоналу (Наказ МОЗ України від 24.01.2008 № 26 "Про затвердження державних санітарних норм і правил "Організація роботи лабораторій при дослідженні матеріалу, що містить біологічні патогенні агенти I-IV груп патогенності молекулярно-генетичними методами"). Отримати інформацію про нуклеотидну послідовність рикетсій групи висипного тифу можна із міжнародних комп'ютерних банків даних GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/), EMBL (www.ebi.ac.uk/embl.html) через мережу Internet.

Ампліфікацію проводять в режимі послідовно зв'язаних програм, з врахуванням температури плавлення олігонуклеотидів, на ампліфікаторі для ПЛР-РЧ (RotorGene, ABI Prism 7000, iCycler iQ та ін.), особливістю яких є можливість детектувати флуоресценцію. Існує два основних підходи до детекції результатів ПЛР-РЧ: за допомогою інтеркалюючих барвників і на основі флуоресцентно-мічених олігонуклеотидних зондів. Найпопулярніший барвник на сьогоднішній день SYBR Green 1 - це чутливий флуоресцентний індикатор дволанцюгової ДНК.

Більш високої специфічності детекції результатів ПЛР-РЧ можна досягти за рахунок наявності в реакційній суміші додаткового олігонуклеотиду - гібридизаційного зонда. Такий зонд комплементарно з'єднується з ДНК на ділянці амплікону між прямим і зворотнім праймерами. Для забезпечення високої ефективності аналізу використовують концентрації зонда - 250 nM, праймерів - 50-900 nM.

Облік і інтерпретація результатів реакції здійснюється автоматично за допомогою програмного забезпечення, що поставляється із ПЛР-детектором. Вимірюється інтенсивність флуоресценції і результат реакції виноситься на екран монітора у вигляді графіка залежності флуоресценції від кількості циклів в реакції.

При накопиченні отриманого ізоляту проводять пасажування на морських свинках та/або лабораторних білих мишах для відтворення експериментальних форм висипного тифу у тварин за методом біопроб. При наявності характерної гарячкової реакції проводять забір інфікованого матеріалу (мозок, нирки, серце) для кількісного визначення ДНК *R. prowazekii* в ПЛР в реальному часі. Постановка серологічних реакцій дає позитивні результати при наявності достатньої концентрації антитіл у сироватці крові лабораторних тварин. Забір крові проводять на 7-й, 14-й, 21 -й та 28-й дні після зараження.

Запропонований нами спосіб рекомендується використовувати для виділення *R. prowazekii* з метою диференційної діагностики висипнотифозної інфекції, що є необхідною ланкою постановки діагнозу, проведення епідеміологічного моніторингу циркулюючих штамів та основою для приготування як діагностичних, так і профілактичних препаратів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виділення *Rickettsia prowazekii*, який **відрізняється** тим, що при виділенні збудника з біологічного матеріалу для його ідентифікації використовують полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі з метою контролю кількості ДНК збудника висипного тифу на етапах підбору оптимальної інфікуючої дози, виявлення *R. prowazekii* в інфікованих вошах *Pediculus humanus corporis* (de Geer) та в патологічному матеріалі від лабораторних тварин.

Комп'ютерна верстка Т. Вахричева

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

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