



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **94104** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
C12N 1/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 05849	(72) Винахідник(и): Уховський Віталій Вікторович (UA), Куликова Влада Вячеславівна (UA), Кучерявенко Олександр Олександрович (UA), Пискун Антон Володимирович (UA), Скалига Марина Леонідівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 30.05.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 27.10.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.10.2014, Бюл.№ 20	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ ДНК ПАТОГЕННИХ ЛЕПТОСПІР РОДУ LEPTOSPIRA, ВИДУ LEPTOSPIRA INTERROGANS У КЛІНІЧНОМУ І ПАТОЛОГІЧНОМУ МАТЕРІАЛІ ТА ЗРАЗКАХ ВОДИ

(57) Реферат:

Спосіб виявлення ДНК патогенних лептоспір роду *Leptospira*, виду *Leptospira interrogans* у клінічному і патологічному матеріалі та зразках води здійснюють за допомогою специфічних олігонуклеотидних праймерів *Lepto*, що кодують специфічні ділянки гена мембранного протеїну *Lip L 32* довжиною 264 пари нуклеотидних залишків, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію - ПЛР, яка включає наступні стадії: екстракцію ДНК із досліджуваних зразків, ампліфікацію за визначеними температурними режимами, електрофорез та візуалізацію результатів. Крім цього, проводять точну візуалізацію результатів реакції за допомогою специфічних олігонуклеотидних праймерів *Lepto*.

UA 94104 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, біотехнології, мікробіології, імунології, і виробництва біологічних препаратів.

Аналог корисної моделі - близьким за технічним рішенням до об'єкту, що заявляється, є реакція імуноадсорбції. Для проведення реакції імуноадсорбції вирощують в 0,2-літрових флаконах всі штами лептоспір, з якими дослідна проба сироватки крові давала позитивну реакцію мікроаглютинації.

До 5-7-добових культур лептоспір додають 0,3 % формаліну та витримують 10-12 годин. Потім лептоспіри осаджують центрифугуванням за 10000 об/хв протягом 30 хвилин.

Зливають надосадову рідину, а осад суспензують в об'ємі 0,9 см³ середовища або фізіологічного розчину. 0,1 см³ дослідної сироватки крові змішують з 0,9 см³ концентрованого антигену і витримують протягом 48 годин за температури 1-5 °С. Потім відокремлюють сироватку крові центрифугуванням за 10000 об/хв протягом 30 хвилин. Адсорбовану сироватку перевіряють в РМА на наявність залишкових антитіл до штаму-адсорбенту, а потім досліджують з лептоспірами всіх серогруп, з якими реагувала сироватка до адсорбції.

В процесі адсорбції лептоспіри, що є збудниками інфекції у даної тварини, вилучали із сироватки антитіла до лептоспір інших серологічних груп, в той час як антитіла до штаму - збудника лептоспірозу не адсорбувались з сироватки гетерологічними типами лептоспір.

Збудником інфекції вважали лептоспіри тієї серогрупи, антигени якої видаляли із сироватки всі лептоспірознні антитіла.

Недоліком вказаного методу є те, що він тривалий (5-7 діб), недостатньо чутливий та специфічний [1].

Найближчим аналогом корисної моделі є найбільш близька за технічним рішенням до корисної моделі реакція мікроаглютинації та лізису (РМА).

При постановці РМА як антиген використовують штами лептоспір 26 серогруп.

При проведенні досліджень використовують культури лептоспір 7-14 добового віку з накопленням 50-100 лептоспір у полі зору мікроскопа, з характерною морфологією, активною рухомістю та без ознак аутоаглютинації.

Реакцію ставлять на пластинах із органічного скла з лунками, змішуючи 0,1 см³ досліджуваної сироватки крові тварин з кожного розведення з 0,1 см³ антигену (таблиця 1).

Таблиця 1

Схема постановки РМА

Об'єм, см ³		Розведення сироватки	
фізіологічного розчину	сироватки	без антигену	з антигеном
4,8	0,2 нативної	1:25	1:50
2,0	2,0 з розведення 1:25	1:50	1:100
2,0	0,5 з розведення 1:50	1:250	1:500
2,0	0,5 з розведення 1:250	1:1250	1:2500

При дослідженні імунного статусу лабораторних тварин (кролів) та при дослідженні імуногенності вакцини на сільськогосподарських тваринах (свинях) РМА ставили у 8-ми розведеннях: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280.

Контролем реакції слугувала суміш антигену з фізіологічним розчином по 0,1 см³, в якій лептоспіри повинні залишатись рухомими, без видимих змін морфології та ознак аглютинації і лізису.

Пластини, які містили суміш сироваток з антигеном, ставили в термостат і витримували одну годину при температурі 28-30 °С.

Реакцію враховували під мікроскопом з конденсором "темного поля" при збільшенні 20 × 10 × 15 і оцінювали в хрестах за чотирибальною системою:

++++ - чотири хрести - аглютиновані 100 % лептоспір;

+++ - три хрести - аглютиновані 75 % лептоспір;

++ - два хрести - аглютиновані 50 % лептоспір;

+ - один хрест - аглютиновані 25 % лептоспір;

- - мінус - аглютинація лептоспір відсутня.

Титром вважали найбільше розведення сироватки крові, в якому реакція була оцінена не менше ніж на два хрести при відсутності аглютинації в контролі.

Наявність специфічних антитіл у сироватці крові свиней в титрі 1:50 у невакцинованих, 1:100 - у вакцинованих вважали за позитивну реакцію на лептоспіроз, згідно з чинної настанови лабораторної діагностики лептоспірозу [2].

Недоліком реакції мікроаглютинації та лізису є те, що результат враховується візуально шляхом перегляду у темнопольному мікроскопі, що дає можливість виникнення суб'єктивної думки та інтерпретації отриманих результатів, використання значних об'ємів реагентів та культури лептоспір, великої кількості посуду та трудомісткість, а також необхідність працювати з живими культурами лептоспір як антигенів.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб виявлення, який би усував перераховані недоліки прототипу і мав нові якісні показники, а саме: точна візуалізація результатів реакції за допомогою контрольного позитивного та негативного зразків, скорочення витрат реагентів, посуду, спрощення постановки реакції.

Принцип методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) був розроблений американським біохіміком Кері Мюллісом, співробітником фірми "Cetus" [3].

Правильний вибір олігонуклеотидних праймерів визначає ефективність та відтворюваність ПЛР.

В основу корисної моделі поставлено наступну задачу:

створити новий спосіб виявлення ДНК патогенних лептоспір роду *Leptospira*, виду *Leptospira interrogans* у клінічному і патологічному матеріалі та зразках води. Технічний результат корисної моделі полягає в усуненні перерахованих недоліків прототипу і володіння новими якісними показниками, а саме: скорочення витрат реагентів, часу обліку результатів дослідження, спрощення постановки реакції та відсутність суб'єктивності в реєстрації та інтерпретації отриманих результатів.

Викладена задача вирішується тим, що у досліджуваних зразках виявляємо специфічні фрагменти нуклеїнових кислот (ДНК) за допомогою полімеразної ланцюгової реакції - ПЛР - ферментативної реакції та специфічні ділянки гена мембранного протеїну Lip L 32 довжиною 264 пари нуклеотидних залишків за допомогою специфічних олігонуклеотидних праймерів Lepto, які синтезовані штучно, які дозволяють багаторазово копіювати специфічні ділянки ДНК інфекційних агентів при температурних та часових параметрах та кількості циклів. В межах роду *Leptospira* виділяють два види - *Leptospira interrogans* (паразитичні) і *Leptospira biflexa* (вільноживучі), котрі диференціюються на основі певних не цілком достовірних фенотипічних ознак (патогенність для лабораторних тварин, т тварин і культурально-біохімічні тести).

Ідентифікація та диференціація лептоспір у межах роду *Leptospira* можлива шляхом проведення молекулярно-генетичного аналізу ДНК з визначенням видоспецифічних маркерів патогенних лептоспір (праймерів) (таблиця 2).

Таблиця 2

Праймери для індикації ДНК патогенних лептоспір *Leptospira interrogans*

Таргетний ген	Назва праймеру	Послідовності олігонуклеотидів (праймерів), 5'→3'	Довжина амплікону
Ген ліпопротеїну зовнішньої мембрани Lip L 32	Lepto F	CGC-TTG-TGG-TGC-TTT-CGG-TGG-T	264
	Lepto R	CTC-ACC-GAT-TTC-GCC-TGT-TGG-G	

Матеріалом для лабораторної діагностики лептоспірозу методом ПЛР є кров і сеча; трупи дрібних тварин; від трупів великих тварин - серце, шматочки паренхіматозних органів, нирка, транссудат з грудної та черевної порожнини, перикардальна рідина, сечовий міхур із вмістом, спинномозкова рідина; абортований плід (цілий або з нього відбирають шлунок із вмістом та паренхіматозні органи); вода.

Після проведення підготовки матеріалу, для дослідження необхідно відібрати надосадову рідину у кількості 100 мкл та додати до лізуючого буферу.

Екстракцію ДНК проводили за допомогою комерційного набору для екстракції нуклеїнових кислот "ДНК-сорб-В" виробництва "Центрального науково-дослідного інституту епідеміології" (Російська Федерація). Полімеразна ланцюгова реакція

Реакцію ампліфікації проводили за допомогою комерційного набору "PCR-Core" виробництва фірми IsoGene (Російська Федерація).

Беруть необхідну для проведення досліджень кількість пробірок для проведення ампліфікації ємністю 0,5 мл. (або 0,2 мл.), включаючи пробірку для негативного контролю. За

20-30 хвилин до приготування ампліфікаційної суміші виймають базовий набір для проведення ПЛР з морозильника, розморожують вміст.

У кожен пробірник вносять:

5 мкл реакційного буфера;

2,5 мкл розчину дНТФ;

2,5 мкл 50ММ/мл розчину магнію сульфату;

по 1 мкл розчинів праймерів (по 20 пМ/пробу);

0,5 мкл розчину Тоq-полімераза;

до 20 мкл деіонізованої води.

Пробірки обережно струшують для перемішування вмісту і додають в усі пробірки по 1 краплі мінерального масла (якщо ампліфікатор з верхнім нагрівом - додавати не треба). Вносять 5 мкл зразка з підготовленої аналізованої проби у відповідну пробірку з ампліфікаційною сумішшю під шар масла для проведення ампліфікації. Також під шар масла вносять в пробірку для негативного контрольного зразка - 5 мкл. деіонізованої води.

Переносять пробірки в ампліфікатор (Thermocycler T 3000, Biometra) і проводять ампліфікацію за наступною програмою (таблиця 3).

Таблиця 3

Температурні параметри проведення ампліфікації з праймерами Lepto

№	Температура	Час	Кількість
1	95 °C	3 хв	1
2	94 °C	30 с.	40
	55 °C	30 с.	
	72 °C	30 с.	
	72 °C	5 хв	1

Аналіз результату ПЛР проводиться в 1,5 % гелі агарози з барвником - бромистим етидієм. В лунки агарозного геля вносять 10-12 мкл ампліфікованої суміші. Після проведення електрофорезу фрагменти ДНК згруповуються у смужки, які виявляють флуоресцентно при опроміненні ультрафіолетом.

Облік результатів

У негативному контрольному зразку (К-) смужки повинні бути відсутні. Поява смужки на рівні позитивного контролю свідчить про контамінацію (забруднення) компонентів набору.

У позитивних зразках щодо патогенних лептоспир повинна виявлятися одна смужка жовтогарячого кольору з розміром 264 нуклеотидних залишків.

Отримані результати можна документувати фотографуванням гелів з використанням світлофільтра або використовувати комп'ютерні системи з цифровими відеокамерами.

Джерела інформації:

1. Малахов Ю. А. Лептоспироз животных / Ю. А. Малахов, А. Н. Панин, Г.Л. Соболева. -Я.: ДИА-пресс, 2000. – С. 411-416.

2. Настанова з лабораторної діагностики лептоспірозу. - Київ, 1996. - 25 с.

3. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, and Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.51 Pt 1: 263-273 [PubMed].

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб виявлення ДНК патогенних лептоспир роду *Leptospira*, виду *Leptospira interrogans* у клінічному і патологічному матеріалі та зразках води, який здійснюють за допомогою специфічних олігонуклеотидних праймерів Lepto, що кодують специфічні ділянки гена мембранного протеїну Lip L 32 довжиною 264 пари нуклеотидних залишків, використовуючи полімеразну ланцюгову реакцію - ПЛР, яка включає наступні стадії: екстракцію ДНК із досліджуваних зразків, ампліфікацію за визначеними температурними режимами, електрофорез та візуалізацію результатів, який **відрізняється** тим, що проводять точну візуалізацію результатів реакції за допомогою специфічних олігонуклеотидних праймерів Lepto.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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