



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115268** (13) **U**  
(51) МПК**C12Q 1/68** (2006.01)**G01N 33/50** (2006.01)**A61K 35/68** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки:	<b>u 2016 10662</b>	<b>(73)</b> Власник(и):	<b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",</b> вул. Пушкінська, 14-16, м. Харків, 61057 (UA), <b>Похил Сергій Іванови,</b> пр-т Індустріальний, 26, кв. 99, м. Харків, 61007 (UA), <b>Білозоров Олексій Павлович,</b> вул. Данилевська, 22, кв. 37, м. Харків, 61058 (UA), <b>Тимченко Олена Миколаївна,</b> вул. Бучми, 30-а, кв. 29, м. Харків, 61136 (UA), <b>Торяник Інна Іванівна,</b> вул. Івана Камишева, 39, кв. 9, м. Харків, 61038 (UA), <b>Чигиринська Ніла Анатоліївна,</b> пров. Васнецова, 6, м. Харків, 61046 (UA), <b>Костиця Ірина Анатоліївна,</b> пр-т Науки, 45-а, кв. 82, м. Харків, 61086 (UA), <b>Круглова Тетяна Анатоліївна,</b> вул. Ахсарова, 1-б, кв. 37, м. Харків, 61202 (UA), <b>Лець Вікторія Василівна,</b> вул. Малопідвальна, 1, кв. 10, м. Київ, 01001 (UA), <b>Казмірчук Віктор Володимирович,</b> вул. Молодіжна, 5, кв. 47, смт Пісочин, Харківський р-н, Харківська обл., 62401 (UA)
<b>(22)</b> Дата подання заявки:	<b>24.10.2016</b>		
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	<b>10.04.2017</b>		
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>10.04.2017, Бюл.№ 7</b>		
<b>(72)</b> Винахідник(и):	<b>Похил Сергій Іванови (UA), Білозоров Олексій Павлович (UA), Тимченко Олена Миколаївна (UA), Торяник Інна Іванівна (UA), Чигиринська Ніла Анатоліївна (UA), Костиця Ірина Анатоліївна (UA), Круглова Тетяна Анатоліївна (UA), Лець Вікторія Василівна (UA), Казмірчук Віктор Володимирович (UA)</b>		

**(54) СПОСІБ ДЕТЕКЦІЇ ПАТОГЕННИХ ДЛЯ ЛЮДИНИ БАБЕЗІЙ ЗА ДОПОМОГОЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ****(57) Реферат:**

Спосіб детекції патогенних для людини бабезій за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) включає виявлення специфічних ампліконів (копій фрагментів гена 18S rRNA *Babesia microti*, *B. divergens* + *B. venatorum*), попередньо одержаних за допомогою мультиплексної ПЛР. Для відтворення цієї реакції використовують праймери BabUnF, BabMicR і BabDivR.

UA 115268 U



Корисна модель належить до галузі медичної і ветеринарної мікробіології, паразитології та інфектології, а саме - створення системи праймерів, які є необхідним специфічним компонентом тест-системи для виявлення/ідентифікації з допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) найпростіших роду *Babesia* - збудників babesіозу. Ця корисна модель може бути використана для лабораторної діагностики babesієвих інвазій у людей і теплокровних тварин, а також для контролю біобезпечності донорської крові та її компонентів щодо контамінації babesіями.

Бабесіоз людини (B60.0 babesіоз, МКХ-10) - маловивчена (емерджентна), трансмісивна (кліщова), гемопаразитарна хвороба, спричинена найпростішими роду *Babesia*, які характеризуються здатністю до інвазії і паразитування в еритроцитах та органах гемопоезу, спричинюючи інфекційний процес, клінічний перебіг якого може варіювати від асимптомних, субклінічних, легких або середньої важкості грипоподібних форм - до тяжкого прогресуючого захворювання (фульмінантна форма) із летальним наслідком.

Бабесіоз (широко застосовувана попередня назва цих хвороб - піроплазмоз) у свійських і диких тварин був відомим ще із біблейських часів, а науковий період його вивчення розпочався у 1888 році, коли угорський патолог та мікробіолог Victor Babes (пізніше на його честь були названі паразити і обумовлені ними хвороби) ідентифікував та описав інтраеритроцитарні мікроорганізми як причину гемоглобінурійної гарячки великої рогатої худоби (ВРХ) [1]. Незабаром, у 1893 році Theobald Smith і Frederick Kilborne встановили значення кліщів як вектора передачі *Babesia bigemina* - вірогідного основного збудника babesіозу ВРХ у штаті Техас, США. Це перше науково обґрунтоване повідомлення, яким було доведено здатність гемотрофних членистоногих (у даному випадку - кліщів) передавати збудників інфекційних хвороб хребетному хазяїну [2].

Перший випадок захворювання на babesіоз людини було достовірно діагностовано у 1957 році в Європі (колишня республіка Югославія) у хорватського пастуха із аспленією (пацієнт із видаленою селезінкою і, як наслідок, імунокомпрометованим станом). Етіологія хвороби була асоційована із *Babesia divergens*, а її перебіг призвів до швидкої загибелі людини [1]. Початком виявлення babesіозу людей у США (штат Каліфорнія) вважається 1966 рік, хоча у даному випадку не було остаточно ідентифіковано вид *Babesia*, який відіграв роль збудника захворювання. Трьома роками пізніше - у 1969 році описано перший випадок babesіозу в імунокомпетентного хворого із острова Нантакет (штат Массачусетс, США). При цьому збудником захворювання були паразити виду *B. microti*, а вектором їх передачі іксодовий кліщ - *Ixodes scapularis* [2].

У подальші роки поступово, але невпинно кількість повідомлень про реєстрацію випадків babesіозу у людей зростала, як і постійно розширювався перелік географічних територій та країн, у яких це захворювання виявляли. Проте, майже до кінця XX-го століття babesіоз у людей розглядався з позиції рідкісного, малоймовірного (казуїстичного), територіально-обмеженого у поширенні (природно-осередкового) протозойного зоонозу. Але в останнє десятиріччя відмічено вибухоподібне зростання кількості випадків babesіозу у людей, їх убівквітаре поширення на усіх континентах Землі (за виключенням Антарктиди), розширення спектра різновидів *Babesia*, які здатні викликати захворювання у людей (*B. microti*, *B. divergens*, *B. venatorum*, *B. bovis*, *B. canis*, *B. odocoilei*, *B. caballi*), вірогідне домінування безсимптомних і легких форм перебігу хвороби із відносно низьким рівнем ( $\leq 1\%$ ) паразитемії (відсоток уражених паразитами еритроцитів периферійної крові), що суттєво ускладнює її вчасне виявлення, лікування та профілактику і потребує розробки сучасних, високоефективних методів лабораторної діагностики [3, 4]. Крім цього встановлена можливість зараження паразитами не лише при укусі (присмоктуванні) кліща, але й вертикальним шляхом - від матері до плоду та дитини (під час вагітності і пологів) та при гемотрансфузії - внаслідок переливання інфікованої babesіями донорської крові або її компонентів, що обумовлює необхідність здійснення лабораторного контролю біобезпечності останніх [5, 6]. В Україні перший випадок захворювання на babesіоз у шестирічного хлопчика (м. Київ) було діагностовано (нажалі посмертно) фахівцями США у 2011 році, проте і до теперішнього часу для вітчизняної медичної спільноти потенціал сучасних методів лабораторної діагностики цього паразитозу залишається малодоступним [7].

Сучасна діагностика babesіозу у людей ґрунтується на результатах комплексного обстеження: епідеміологічного, клінічного та лабораторного. Останньому, з урахуванням поліетіологічності та політипності клінічної картини хвороби відводиться вирішальна роль. Для лабораторної діагностики babesіозу можуть застосовуватись п'ять груп методів: мікроскопічні, культуральні, імунологічні, біологічні, молекулярно-генетичні, кожні з яких мають свої переваги і недоліки [1-4]. В останні роки фахівці високорозвинених країн світу (США, Канади, Китаю, Японії, Європи) надають перевагу молекулярно-генетичним методам діагностики babesіозу, серед яких домінуюче положення посідає полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, англійською

polymerase chain reaction-PCR) [8-11]. Головна ідея цього діагностичного методу полягає у виявленні (детекції/ідентифікації) в зразках досліджуваного біологічного матеріалу визначених фрагментів геному бабезій (ділянок молекул ДНК або РНК) із наступним багатократним (у  $10^5$ - $10^8$  разів) його копіюванням *in vitro* (у пробірці) за допомогою термостабільної ДНК-полімерази та праймерів, які обмежують - тобто ідентифікують ці ділянки геному паразита, з подальшою візуалізацією ампліфікованих (багаторазово синтезованих) копій зазначеного фрагменту (амплікону) [8, 12]. Типовий протокол лабораторного дослідження методом ПЛР зразку біоматеріалу з метою детекції/ідентифікації у ньому збудників інфекційних захворювань (у тому числі бабезій) включає такі основні етапи:

- підготовку для дослідження зразку біоматеріалу, виділення із нього нуклеїнових кислот (найчастіше ДНК), їх очищення та внесення до реакційної суміші;

- багаторазове (25-40 разів) відтворення циклу ампліфікації специфічного фрагменту ДНК збудника, який підлягає детекції/ідентифікації (послідовними етапами ампліфікації є: денатурація досліджуваного зразку ДНК, відпал праймерів на гомологічних ділянках із фланкуванням обмеженого ними фрагменту зазначеної ДНК, комплементарний синтез копій цього фрагменту з допомогою термостабільної ДНК-полімерази) із зростанням у геометричній прогресії кількості (до  $10^6$ - $10^8$ ) його копій;

- виявлення (візуалізація) результату ПЛР - наявності багаторазово синтезованих специфічних ампліконів за допомогою проведення електрофорезу в агарозному гелі (у теперішній час можливо здійснювати візуалізацію ампліконів іншими методами, наприклад флуоресцентною реєстрацією при відтворенні формату ПЛР у реальному часі) [8, 11, 12].

Спосіб ПЛР-детекції збудників бабезіозу у зразках досліджуваного біоматеріалу характеризується задовільною швидкістю проведення досліджень (2-4 години) для одержання їх результатів, більш високим рівнем чутливості - мінімальної кількості клітин збудника (копій його геному), яка дає позитивний результат аналізу (дозволяє виявляти близько 0,0001 % паразитемії при відтворенні ПЛР у стандартному, гніздовому, мультиплексному форматі, а у варіанті реального часу - близько 50-100 копій фрагменту геному бабезій у 5 мкл досліджуваного зразку крові), специфічності - точності виявлення конкретного виду збудника серед будь-яких інших мікроорганізмів та клітин організму хазяїна (становить  $\geq 95$  %), відтворюваності - однотипності результатів досліджень при тестуванні ідентичних зразків (сягає  $> 90$  %) у порівнянні із мікроскопічним та іншими методами виявлення цих паразитів [1, 2, 4, 8]. Тому, ПЛР рекомендують застосовувати для діагностики бабезіозу, коли є стійка підозра щодо ймовірності у пацієнта цієї інвазії, а мікроскопічне дослідження мазків крові дало негативний або сумнівний результат. Крім цього метод ПЛР також рекомендують використовувати при контролі біобезпечності донорської крові та її компонентів, для виявлення хронічних та субклінічних бабезійних інвазій, контролю ефективності протипаразитарної терапії, точної ідентифікації видів *Babesia*, у тому числі при відкритті їх нових представників, тощо [2, 6, 8]. Також важливо відзначити, що сама технологія відтворення ПЛР є зручною для її автоматизації та різнопланової модифікації [2, 6, 8].

До теперішнього часу для детекції/ідентифікації збудників бабезіозу у зразках біоматеріалу крім стандартного формату ПЛР вже розроблено й інші варіанти цієї реакції: з гарячим стартом (hot start PCR), у реальному часі (англійською real-time PCR), з використанням зворотної транскрипції (англійською reverse transcription PCR-RT-PCR), гніздова (або вкладена) (англійською nested PCR), мультиплексна (множинна, мультипраймерна) (англійською multiplex PCR), а також комбінації ПЛР із наступним визначенням поліморфізму довжини фрагментів рестрикції (англійською PCR-restriction fragment length polymorphism-PCR-RFLP) або з секвенуванням послідовності нуклеотидів утворюваних ампліконів (англійською PCR amplicon sequencing followed) та інші [3, 8-11]. В останні роки зростає увага науковців різних країн світу до розробки мультиплексного формату ПЛР із одночасною (в одній пробірці) ампліфікацією декількох відмінних фрагментів ДНК, що дозволяє в одному і тому ж самому зразку біоматеріалу одразу виявляти декілька різновидів збудників бабезіозу [13-15].

У цьому сенсі ефективність діагностики бабезіозу за допомогою мультиплексної ПЛР ґрунтується на визначенні найбільш клінічно-значущих (домінуючих) у конкретній країні/регіоні видів бабезій, які обумовлюють захворювання у людей. Тривалий час уважалось, що основним збудником бабезіозу людини в США (та в інших країнах Північної Америки) є *B. microti*, а у країнах Європи - *B. divergens* [1-4]. Але з 2003 року стало зрозуміло, що в країнах Європи значну кількість випадків захворювання людей на бабезіоз спричиняють види *B. microti* та *B. venatorum* [16, 17]. Останній вид характеризується суттєвим рівнем подібності до *B. divergens*, тому на початковому етапі вивчення *B. venatorum* отримав назву *B. divergens-like* (або *Babesia* sp. European Union 1, у скороченому написанні - EU1) [17]. Результати проведених нами у 2015

році досліджень зразків сироваток крові від людей і тварин, які постраждали від укусу кліщів підтвердили наявність на території України інвазій, обумовлених різними видами бабезій (*B. microti* у 2,3 %, *B. divergens* і подібними бабезіями у 5,4 %) [18]. Точна лабораторна ідентифікація зазначених видів бабезій має важливе практичне значення, так як кожний із них характеризується суттєвими відмінностями епідемічного процесу, рівнем вірулентності для людини, тяжкістю перебігу і прогнозу спричиненої хвороби, що необхідно враховувати для проведення адекватної терапії та профілактики цього паразитозу [1-3, 7]. Природним джерелом *B. microti* (тобто основним організмом-хазяїном для цих паразитів у природі) є мишоподібні гризуни, а для *B. divergens* і *B. venatorum* - свійська велика рогата худоба (ВРХ) та дикі парнокопитні тварини. Перебіг хвороби спричиненої *B. microti* більш легкий (домінують асимптомні та субклінічні форми), а рівень летальності не перевищує 5 %. Навпроти, при бабезіозі, обумовленому *B. divergens* і *B. venatorum* часто спостерігались тяжкі (фульмінантні) форми хвороби, які у 40 % пацієнтів призводять до летальних наслідків [1-3, 7].

Для ПЛР-детекції різних видів бабезій (як і збудників інших інфекційних хвороб) використовують подібні за компонентним складом тест-системи. При високому рівні уніфікованості основних компонентів ПЛР-тест-систем винятком є набори (системи) праймерів, що, як правило, повинні бути специфічними для виявлення конкретних видів збудників [8, 12]. Праймери (затравки) - синтезовані хімічним способом олігонуклеотиди (однониткові фрагменти ДНК із довжиною, як правило, від 18 до 24 нуклеотидів) гомологічні визначеним ділянкам полімерної молекули ДНК (детектованому фрагменту геному збудника) і орієнтовані за послідовністю нуклеотидів таким чином, що синтез термостабільною ДНК-полімеразою цього фрагменту геному, який праймери фланкують після відпалу, відбувається в геометричній прогресії (а інших необмежених праймерами фрагментів ДНК - в арифметичній прогресії). Послідовність нуклеотидів у праймерах призначених для детекції/ідентифікації *Babesia* spp. є об'єктом інтелектуальної власності і для захисту стосовно їх авторського права видаються патенти в Україні та у інших країнах світу: Пат. 48336 U, UA, МПК (2009) C12Q 1/68. Спосіб детекції *Babesia canis* у біологічних зразках за допомогою полімеразної ланцюгової реакції [Текст] /Ю.О. Приходько, О.В. Нікіфорова, В.І. Семеренко [та ін.]. - № 200910524, заяв.: 16.10.2009, опуб.: 10.03.2010, Бюл. № 5; Pat. 0015360 A1, US, C12Q 1/68. Compositions for use in identification of *Babesia* bioagents [Text] /M.W. Eshoo, S. Beach, C. Crowder [et al.] - Appl. №: 12/960,647, filed: 06.12.2010, publ.: 19.01.2012; Pat. 2015218657 A1, US, C12Q 1/68. Real-time PCR assay for detection *Babesia microti* and clinical utilization in diagnosis and treatment of babesiosis [Text] /G. Wang and J.T. Fallon. - Appl. №: 201514613431, filed: 04.02.2015, publ.: 06/08/2015; Pat. 20140026592 A, KR, C12N 15/11, C12Q 1/68. PCR diagnostic kits including primers for the genus-specific detection for *Babesia* [Text] /P.H. Oh, K.N. Il, K.H. Bai [et al.]. - Appl. №: 20140009642, filed: 27.01.2014, publ.: 05.03.2014.

При детекції/ідентифікації збудників бабезіозу методом ПЛР вітчизняні та іноземні науковці використовують як більш універсальні родоспецифічні, так і видоспецифічні системи праймерів, тобто певною мірою унікальні за послідовністю нуклеотидів для конкретного виду *Babesia*. Слід враховувати, що наявність одного неспареного нуклеотиду у комплексі праймер - однонитковий продукт ПЛР (праймер - одноланцюговий амплікон) веде до зниження температури відпалу (англійською annealing T-Tan), наближено, на 5 °C, двох неспарених нуклеотидів - на 10 °C і так далі: Rychlik, W. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro [Text] /W. Rychlik, W.J. Spencer and R.E. Rhoads //Nucleic Acids Research. - 1990. - Vol. 18, № 21. - P. 6409-6417. Крім цього, за даними експериментальних досліджень плавлення нуклеїнових кислот відомо, що діапазон температури плавлення (англійською  $\Delta$ melting temperature -  $\Delta$ Tm) коротких олігонуклеотидів із довжиною 20-25 нуклеотидів, які найбільш часто застосовуються як праймери для ПЛР-детекції збудників інфекцій, наближено складає 10 °C: Нарицин, Д.Б., Любченко Ю.Л. Плавление коротких фрагментов ДНК. Определение зависимости константы нуклеации спирального участка от ионной силы [Текст] /Д.Б. Нарицин и Ю.Л. Любченко //Молекулярная биология. - 1988. - Т. 22, Вып. 1. - С. 242-248. Це свідчить про те, що праймери будуть відпалюватись на гомологічних за нуклеотидним складом ділянках одноланцюгового амплікону та буде здійснюватись ПЛР із синтезом нових копій амплікону за умови вибору оптимальної Tan, наявності гомології не менше чотирьох 3'-кінцевих нуклеотидів у комплексі праймер - одноланцюговий амплікон і не більше двох негомологічних (неспарених) нуклеотидів у середині цього комплексу. Можливість деякого варіювання послідовностями нуклеотидів у середній ділянці праймерів дозволяє конструювати їх "виродженими", тобто здатними при відтворенні мультиплексної ПЛР виявляти фрагменти геному різних видів бабезій навіть за наявності у їх нуклеотидних послідовностях певної варіабельності. Отже, саме послідовність нуклеотидів визначає ступінь гомології праймерів і є ключовим параметром, що обумовлює

специфічність, чутливість та відтворюваність результату ПЛР визначаючи ефективність діагностики бабезіозу методом ПЛР у цілому.

Геном найпростіших роду *Babesia* представлений чотирма хромосомами загальним розміром від 6,5 до 11,5 мільйонів пар нуклеотидів (п. н.), він характеризується вмістом G+C близько 40 % і включає близько 3,5 тисяч генів, що кодують поліпептиди (структурні білки і ферменти). Для ПЛР-детекції бабезій у теперішній час розробляються і застосовуються системи праймерів із послідовністю нуклеотидів гомологічною фрагментам різних генів паразитів: ITSs (internal transcribed spacers 1, 2), tufA (elongation factor Tu),  $\beta$ -tubulin (beta tubulin), SA1 (surface antigen 1), CCT7 (chaperonin-containing t-complex protein 1), hsp70 (heat shock protein 70), phosphoprotein PO, тощо [3, 8, 14]. При цьому найбільш активно вітчизняними та іноземними науковцями створюються системи праймерів для виявлення фрагменту гена малої субодиниці рибосомної РНК (англійською small subunits rRNA-SSU rRNA, синонім 18S rRNA) [1-3, 9, 11, 13, 15].

Відомим аналогом є Couturier, B. Detection and Differentiation of *Babesia microti* and Other Pathogenic *Babesia* Species by a Single-Amplicon, Dual-Probe Real-Time PCR Assay [Electronic resource] /B. Couturier, K. Kalp, C. Ginocchio C. [et al.] //Open Forum Infect. Dis. (Fall 2014)1 (suppl 1): S. 378. - S. 379. Session: 191. - Mode to access: [http://ofid.oxfordjournals.org/content/1/suppl\\_1/S378.4.full.pdf+html](http://ofid.oxfordjournals.org/content/1/suppl_1/S378.4.full.pdf+html) [13]. Для детекції і диференціації різних видів бабезій у зразках біоматеріалу науковці США розробили одношаблонний варіант мультиплексної ПЛР із використанням набору універсальних праймерів та двох типів ДНК-зондів. Спільними ознаками цього аналога із корисною моделлю, яка заявляється, є мультиплексний формат ПЛР, що дозволяє одночасно виявляти/ідентифікувати *B. microti* та інші патогенні для людини *Babesia* spp., а також використання праймерів гомологічних за послідовністю нуклеотидів фрагменту гена 18S rRNA збудників. Суттєвими недоліками, які заважають досягти бажаного технологічного результату при застосуванні аналога є використання як ідентифікаційного критерію різних видів бабезій спеціально синтезованих і мічених флуороформними барвниками ДНК-зондів, котрі при включенні у амплікон (під час його ПЛР-синтезу) повинні забезпечити відмінну флуоресценцію цих ампліконів для візуалізації результатів ПЛР. Зазначене потребує додаткового спеціального обладнання (вимірювачів флуоресценції) і витрат на отримання відповідних ДНК-зондів, що суттєво збільшує вартість досліджень. Крім цього, позиція (яка визначена фахівцями США) відпаду зворотного універсального праймера на гені 18S rRNA містить відносно довгий повтор із п'яти G, що є небажаним для ефективного відтворення ПЛР.

Відомим аналогом є Liu, J. A PCR method targeting internal transcribed spacers: the simultaneous detection of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle [Text] /J. Lui, G. Guan, A. Liu [et al.] //Acta Parasitol. - 2014. -Vol. 59, № 1. -P. 132-138 [14]. Для одночасної детекції/ідентифікації двох найбільш поширених видів збудників бабезіозу ВРХ *B. bigemina* і *B. bovis* науковці Китайської Народної Республіки розробили мультиплексну ПЛР із використанням чотирьох видоспецифічних праймерів (двох прямих і двох зворотних) гомологічних до фрагменту ITSs геному паразитів. Спільними ознаками цього аналогу із корисною моделлю, яка заявляється, є мультиплексний формат ПЛР, а також використання як видового ідентифікаційного критерію видів бабезій розмірів специфічних ампліконів, які утворюються при позитивному результаті ПЛР і визначаються шляхом електрофорезного розділення у 2 % гелі агарози. Суттєвими недоліками, які не дозволяють досягти бажаного технологічного результату при використанні аналога, є: неможливість за допомогою створених фахівцями Китаю систем праймерів (призначених для видової ідентифікації збудників бабезіозу ВРХ) виявляти ті різновиди бабезій, які найчастіше обумовлюють захворювання у людей - *B. microti*, *B. divergens* і *B. venatorum*.

Найближчим аналогом до корисної моделі є: Грубіч П.Ю. Розробка ПЛР тест-системи для видової ідентифікації збудників бабезіозу тварин [Текст] /П.Ю. Грубіч, А.Ф. Курман, Л.В. Лепета, Є.А. Пархоменко //Вісник Полтавської державної аграрної академії. - 2013. - № 2. - С. 98-101 [15]. Для ідентифікації видів бабезій, що здатні викликати захворювання у сільськогосподарських і домашніх тварин, вітчизняними науковцями розроблено системи олігонуклеотидних праймерів, використання яких при відтворенні ПЛР дозволяє виявляти у зразках досліджуваного біоматеріалу фрагменти геному трьох видів паразитів: *B. canis* (переважно вражає домашніх собак), *B. bovis* і *B. divergens* (найчастіше обумовлюють захворювання ВРХ). Ознаками прототипу, які збігаються із ознаками способу, що заявляється, є: застосування мультиплексної ПЛР для одночасної детекції/ідентифікації трьох патогенних різновидів бабезій; створення систем праймерів, які дозволяють ампліфікувати встановлені для кожного із зазначених видів паразитів ділянки гена 18S rRNA; використання як видового ідентифікаційного критерію бабезій розмірів специфічних ампліконів, котрі утворюються при

позитивному результаті ПЛР і визначаються шляхом електрофорезного розділення у 2 % гелі агарози. Причинами, що перешкоджають одержанню очікуваного технічного результату за допомогою прототипу, є: неможливість за допомогою ПЛР тест-системи для видової ідентифікації збудників бабезіозу тварин виявляти такі найбільш клінічно-значущі у

5 захворюваності людини (окрім *B. divergens*) різновиди паразитів як *B. microti* та *B. venatorum*; відносно мала дискримінантна відмінність розмірів специфічних ампліконів, за оцінкою яких здійснюється ідентифікація видів бабезій ( $\leq 92$  п. н. між розмірами продуктів ампліфікації фрагментів гена 18S rRNA *B. canis* і *B. bovis* та  $\leq 87$  п. н. між розмірами специфічних ампліконів *B. bovis* і *B. divergens*).

10 В основу корисної моделі поставлена задача створити таку систему праймерів (трьох олігонуклеотидів) для мультиплексної ПЛР, використання якої дозволяло б (із достатнім рівнем специфічності, чутливості та відтворюваності результатів досліджень) одночасно детектувати/ідентифікувати у досліджуваних зразках біологічного матеріалу домінуючі у патології людини бабезії видів *B. microti* і *B. divergens* + *B. venatorum* із дискримінантною

15 відмінністю розмірів утворюваних специфічних ампліконів  $> 100$  п. н.

Для конструювання авторської системи праймерів була створена підбаза секвенованих послідовностей гена 18S rRNA бабезій видів *B. microti*, *B. divergens* та *B. venatorum* із біоінформаційних баз даних: European Molecular Biology Laboratory Data Library (EMBL: [www.ebi.ac.uk/emb1/index.html](http://www.ebi.ac.uk/emb1/index.html)), National Center of Biotechnology Information (GenBank: [www.ncbi.nlm.gov/Web/GenBank/index.html](http://www.ncbi.nlm.gov/Web/GenBank/index.html)) і DNA Data Bank of Japan (DDBJ: [www.nig.ac.jp/home.html](http://www.nig.ac.jp/home.html)). Повна довжина кодуєчої частини гена 18S rRNA складає: у *B. microti* близько 1750 п. н. (з коливанням довжини представлених у біоінформаційних базах послідовностей нуклеотидів від 1615 до 1774 у різних ізолятів), а у *B. divergens* та *B. venatorum* близько 1720 п. н. (з коливанням довжини репрезентованих послідовностей нуклеотидів у різних

20 штамів цих видів паразитів від 1518 до 1728). Для аналізу послідовностей нуклеотидів гена 18S rRNA у ізолятів *B. microti*, *B. divergens* і *B. venatorum*, конструювання системи праймерів та оцінки їх параметрів (технологічно важливих для відтворення мультиплексної ПЛР) використовували пакет прикладних програм "Vector NTI Advance 11.0" [Електронний ресурс]. Minimal System Requirements: Microsoft Windows: Windows NT 4.0 Workstation (service pack 6a), 2000, ME, or Windows XP (Professional), 500 Mb HD space, 128 Mb RAM, Microsoft Installer Version 2, minimum screen resolution 1280×800. - Режим доступу: <http://vector-nti.software.informer.com/11.0/>. Множинне вирівнювання та його статистичний аналіз для визначення консервативних і варіабельних ділянок гена 18S rRNA проводили з допомогою програмного компонентного модулю "AlignX". При конструюванні системи праймерів застосовували модуль "Primer design", а для аналізу технологічно важливих характеристик праймерів - "Oligo Analysis" (для оцінки їх термодинамічних властивостей, наявності паліндромів, повторів та можливості утворення шпильок і димерів - "Thermodynamic properties-Dimers and Hairpin Loops", а для визначення вірогідності утворення дуплексів - "Oligo Duplexes"). За результатами програмного конструювання було створено список потенційно придатних систем праймерів, серед яких відібрано систему з трьох праймерів (BabUnF, BabMicR і BabDivR) із автоматично визначеним найвищим рейтингом - 171, що відображає повну відповідність характеристик праймерів параметрам, які було задано при їх конструюванні. Подальша оптимізація зазначеної системи праймерів полягала в їх ручній корекції: підвищення рівня універсальності прямого (forward-F) праймера BabUnF шляхом його виродження (із варіацією у

25 центральній ділянці його нуклеотидної послідовності А/Т, позначено W); підвищення рівня дискримінантної специфічності зворотного (reverse-R) праймера BabDivR шляхом вибору його варіанту послідовності нуклеотидів із насиченим С і G 3' кінцем.

У кінцевому варіанті для детекції/ідентифікації домінуючих в патології людини різновидів бабезій (*B. microti* і *B. divergens* + *B. venatorum*) методом мультиплексної ПЛР запропонована

30 система праймерів (BabUnF, BabMicR і BabDivR) із такою послідовністю нуклеотидів:

BabUnF 5' - GCT CTT TCT TGA TTC TWT GGG TGG-3',

BabMicR 5' - TGT AAG ATT ACC CGG ACC CGA-3',

BabDivR 5' - AGA AGC AAA CCG TAA CGG ACG-3'.

Інші технологічно важливі характеристики цих праймерів наведено в таблиці 1.

35 Праймери BabUnF, BabMicR і BabDivR були синтезовані ПП "Лабораторія провідних біотехнологій Нео-Ген" (Україна, [www.neogene.com.ua](http://www.neogene.com.ua)). Для постановки мультиплексної ПЛР із зазначеними праймерами використовували комерційні універсальні набори виробництва ТОВ "IsoGene Lab. Ltd." (РФ, [www.infobel.com/en/.../isogen\\_lab\\_ltd](http://www.infobel.com/en/.../isogen_lab_ltd)): "Diatom® DNA Prep 100" - набір реагентів для виділення ДНК із біологічного матеріалу; "GenePak® PCR Core" - набір реагентів

40 для ампліфікації ДНК; "GenePak™ DNA Ladder M50" - маркер молекулярної маси, який містить

набір фрагментів ДНК розміром 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 і 500 п. н.; комплект реактивів для детекції ДНК методом електрофорезу у 1,5 % агарозному гелі. Зазначені набори реактивів застосовували у відповідності до рекомендацій інструкцій виробника.

Таблиця 1

Найважливіші характеристики праймерів BabUnF, BabMicR і BabDivR

Праймер	Довжина (п. н.)	Універсальність, специфічність	Вид бабезій, номер послідовності в базі даних GenBank, місце відпалу на послідовності гена 18S rRNA	Рівень гомології до місця відпалу (%)	Молекулярна маса (г/моль)	Tm (°C)	Пара праймерів, розмірів утворених специфічних ампліконів (п. н.)
BabUnF	24	універсальний для <i>B. microti</i> , <i>B. divergens</i> і <i>B. venatorum</i>	<i>B. microti</i> , XR001160982.1, 1209-1232; <i>B. divergens</i> , FJ944822.1, 1171-1194; <i>B. venatorum</i> , AY046575.1, 1169-1192	100	7367	61,0	-
BabMicR	21	видоспецифічний для <i>B. microti</i>	<i>B. microti</i> , XR001160982.1, 1476-1496	100	6415	59,8	BabUnF+BabMicR, 288
BabDivR	21	видоспецифічний для <i>B. divergens</i> + <i>B. venatorum</i>	<i>B. divergens</i> , FJ944822.1, 1291-1311; <i>B. venatorum</i> , AY046575.1, 1290-1310	100	6482	59,8	BabUnF+BabDivR, 141/142

5

Для відпрацювання оптимального протоколу відтворення мультиплексної ПЛР емпіричним шляхом було визначено кінцеву концентрацію в реакційній суміші кожного праймера (досліджено концентрації від 0,1 до 0,5 мкМ) та Tan системи праймерів (досліджено Tan у діапазоні від 54 до 58 °C).

10 Оптимальною кінцевою концентрацією в реакційній суміші кожного праймера визначено 0,2 мкМ, а їх Tan-56 °C.

Ампліфікацію фрагментів гена 18S rRNA видів *B. microti*, *B. divergens* і *B. venatorum* з використанням праймерів BabUnF, BabMicR та BabDivR проводили за програмою (контроль температури у режимі "Block"):

15 1-ий цикл  
94 °C-120 с  
56 °C-40 с  
73 °C-60 с  
2-ий - 44 цикли  
20 94 °C-60 с  
56 °C-40 с  
73 °C-60 с  
45-ий цикл  
94 °C-60 с  
25 56 °C-40 с  
73 °C-180 с

Детекцію ампліконів, утворених за результатом мультиплексної ПЛР здійснювали методом електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі у трис-боратному буфері. Для цього 10 мкл ампліфікованого зразку вносили у лунку пластинки гелю і здійснювали електрофорез при рівні напруги 15 В/см упродовж 30 хв. Для забарвлення гелю використовували 0,1 % (маса/об'єм) розчин бромистого етидію (тривалість фарбування 5 хв.). Розмір виявлених ампліконів визначали за допомогою маркеру молекулярної маси M50.

30 Визначення рівнів чутливості і специфічності мультиплексної ПЛР проведено шляхом не менше трьох паралельних тестувань 81 модельного зразку. Останні включали: неінфіковану



цільну кров людини (*Homo sapiens*, n=5), ВРХ (*Bos taurus*, n=3), полівки звичайної (*Microtus arvalis*, n=3), сірійського хом'ячка (*Mesocricetus auratus*, n=3), монгольської піщанки (*Meriones unguiculatus*, n=3) та зразки крові: *Mesocricetus auratus*, які містили *B. microti* із рівнем паразитемії від близько 10 до близько 0,0001 % (n=6); *Meriones unguiculatus*, що містили *B. divergens* із рівнем паразитемії від близько 5 до близько 0,0005 % (n=6); *Bos taurus*, які містили *B. bovis* із рівнем паразитемії близько 7, 5 і 3 % (n=3); *Canis lupus Familiaris*, котрі містили *B. canis* із рівнем паразитемії близько 25, 14 і 6 % (n=3); *Homo sapiens*, що були контаміновані клітинами (з концентрацією  $\geq 10^5$  клітин/мл) збудників трансмісивних кліщових інфекцій *Borrelia burgdorferi* (повний корпускулярний антиген, ПКАг, n=1), *B. afzelii* (ПКАг, n=1), *Anaplasma marginale* (ПКАг, n=1), *Ehrlichia* sp. (ПКАг, n=1), *Bartonella henselae* (ПКАг, n=1), *B. quintana* (ПКАг, n=1), а також інших мікроорганізмів різних таксономічних груп, які найчастіше виявляються при лабораторних діагностичних дослідженнях крові людей: *Staphylococcus aureus* (n=2), *S. epidermidis* (n=3), *Escherichia coli* (n=3), *Streptococcus pyogenes* (n=1), *S. pneumoniae* (n=1), *Enterococcus faecalis* (n=2), *E. faecium* (n=1), *Klebsiella pneumoniae* (n=2), *K. oxytoca* (n=1), *Salmonella enteritidis* (n=1), *S. typhimurium* (n=1), *Serratia marcescens* (n=2), *Enterobacter aerogenes* (n=1), *E. cloacae* (n=1), *Proteus vulgaris* (n=1), *P. mirabilis* (n=1), *Pseudomonas aeruginosa* (n=2), *Citrobacter freundii* (n=1), *Yersinia enterocolitica* (n=1), *Bacteroides fragilis* (n=1), *Listeria monocytogenes* (n=1), *Haemophilus influenzae* (n=1), *Neisseria sicca* (n=1), *Bacillus subtilis* (n=1), *Coxiella burnetii* (ПКАг n=1) *Rickettsia prowazekii* (ПКАг, n=1), *Mycobacterium tuberculosis* (ПКАг, n=1), *Brucella abortus* (ПКАг, n=1), *Human herpesvirus 1* (n=1), *Plasmodium falciparum* (n=1), *Toxoplasma gondii* (n=1).

Результати тестування модельних зразків (n=18), які містили збудники бабезіозу (*B. microti*, *B. divergens*, *B. bovis*, *B. canis*) методом мультиплексної ПЛР з використанням праймерів BabUnF, BabMicR та BabDivR були порівняні із результатами ПЛР-детекції бабезій у цих самих зразках із застосуванням комерційних тест-систем виробництва ТОВ "IsoGene Lab.ltd.": "Набір реагентів для ампліфікації ДНК *Babesia microti*" Gene Pak®PCR test" із системою праймерів Bmi; "Набір реагентів для ампліфікації ДНК *Babesia divergens*" Gene Pak®PCR test" із системою праймерів Bdi; "Набір реагентів для ампліфікації ДНК *Babesia canis*" Gene Pak®PCR test" із системою праймерів Bca (табл. 2).

Як видно із наведених в табл. 2 даних, створена СП BabUnF, BabMicR та BabDivR для мультиплексної ПЛР-детекції домінуючих різновидів збудників бабезіозу людини (*B. microti*, *B. divergens* і *B. venatorum*) характеризується рівнем специфічності 100 %. Крім цього встановлено повну відповідність результатів детекції/ідентифікації *B. microti* і *B. divergens* у досліджених модельних зразках методом мультиплексної ПЛР із використанням запропонованої СП та ПЛР у стандартному форматі із застосуванням комерційних тест-систем виробництва ТОВ "IsoGene Lab.ltd."

Із урахуванням вихідної кількості еритроцитів у зразках цільної крові *Homo sapiens* (близько  $4,5 \times 10^9$ /мл), *Mesocricetus auratus* (близько  $7,5 \times 10^9$ /мл) та *Meriones unguiculatus* (близько  $9,7 \times 10^9$ /мл), мінімального рівня паразитемії в останніх (0,0001-0,0005 %), що забезпечував отримання позитивних результатів мультиплексної ПЛР, кратності розведення при калібруванні модельних зразків (від 10 до  $10^5$  раз), а також відповідних протоколу відтворення цієї реакції об'єму досліджуваного модельного зразку (100,0 мкл), з якого виділяли ДНК бабезій та об'єму вже виділеної ДНК (5,0 мкл), котрий вносили у буферну суміш для ампліфікації, розрахунково-аналітичним методом визначено рівень чутливості запропонованого способу детекції патогенних для людини бабезій (*B. microti*, *B. divergens* і *B. venatorum*) за допомогою мультиплексної ПЛР із використанням системи праймерів BabUnF, BabMicR, BabDivR, який становив від  $5,0 \times 10^4$  до  $1,0 \times 10^5$  клітин (копій ДНК) збудника в мл зразку цільної крові.

Таблиця 2

Результати тестування модельних зразків методом ПЛР із використанням різних систем праймерів для детекції бабезій

Модельні зразки	Кількість досліджених зразків	Позитивний результат ПЛР із СП			
		BabUnF, BabMicR, BabDivR	Bmi	Bdi	Bca
		абс. ч. (%)	абс. ч. (%)	абс. ч. (%)	абс. ч. (%)
1	2	3	4	5	6
Зразки цільної неінфікованої крові від людей та різних тварин	17	0	-	-	-
Зразки крові, які містили клітини мікроорганізмів різних таксономічних груп за виключенням бабезій	46	0	-	-	-
Зразки крові, які містили клітини бабезій, у тому числі видів:	18	12 (66,7)	6 (33,3)	6 (33,3)	3 (16,7)
<i>B. microti</i> ,	6	6 (100)	6 (100)	0	0
<i>B. divergens</i> ,	6	6 (100)	0	6 (100)	
<i>B. bovis</i> ,	3	0	0	0	0
<i>B. canis</i>	3	0	0	0	3 (100)
Всього	81	12 (14,8)	6 (7,4)	6 (7,4)	3 (4,6)

Примітка. "-" - дослідження не проводилось.

Багаторазове тестування модельних зразків, які містили клітини різних видів бабезій (*B. microti*, *B. divergens*, *B. bovis*, *B. canis*) методом мультиплексної ПЛР із використанням праймерів BabUnF, BabMicR та BabDivR (загальна кількість відтворень реакції 56), дозволило встановити рівень відтворюваності результатів таких досліджень, який коливався від 94,6 до 96,4 % у залежності від оцінки результатів ПЛР різними фахівцями.

Таким чином, за результатами проведених досліджень розроблено систему праймерів BabUnF, BabMicR і BabDivR, застосування якої дозволяє з допомогою способу мультиплексної ПЛР одночасно виявляти/ідентифікувати в зразках біоматеріалу декілька патогенних для людини видів бабезій (*B. microti*, *B. divergens* + *B. venatorum*) з рівнями специфічності 100 %, чутливості близько  $10^4$ - $10^5$  клітин збудника в мл зразку та відтворюваності результатів досліджень  $\geq 95$  %.

Джерело інформації:

1. Hunfeld, K.P. Babesiosis: recent insights into an ancient disease [Text] /K.P. Hunfeld, A. Hildebrandt, J.S. Gray //Intern. J. Parasitol. - 2008. - Vol. 38, № 11. - P. 1219-1237.

2. Vannier, E. Human Babesiosis [Text] /E. Vannier, P.J. Krause //N. Engl. J. Med. - 2012. - Vol. 366, № 25. - P. 2397-2407.

3. Schaller, J. The Diagnosis and Treatment of Babesia [Text] /James Schaller //Tampa, Florida: Hope Academic Press, 2006. - 374 p.

4. Gray, J. Zoonotic babesiosis: overview of the disease and novel aspects of pathogen identity [Text] /J. Gray, A. Zintl, A. Hildebrandt [et al.] //Ticks and Tick-borne Diseases. - 2010. - Vol. 1. - P. 3-10.

5. Fox, L.M. Neonatal Babesiosis. Case report and review of the literature [Text] /L.M. Fox, S. Wingerter, A. Ahmed [et al.] //Pediatr. Infect. Dis. - 2006. - Vol. 25, № 2. - P. 169-173.

6. Oz, H.S. "Human Babesiosis": An Emerging Transfusion Dilemma [Electronic resource] /Helieh S.Oz, Karin H. Westlund //Intern. J. Hepatol. - 2012. - Vol. 2012, Article ID 431761, 5 pages. - Mode to access: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/431761>.

7. Майданник, В.Г. Бабезиоз у дітей и подростков [Текст] /В.Г. Майданник //Междун. журн. педиатрии, акушерства и гинекологии. - 2013. - № 1. - С. 82-88.

8. Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens [Text] /Edited by Dongyou Lui //CRC Press: Taylor and Francis Group. - 2012. - 895 p.

9. Sun, Y. Babesia venatorum Infection in Child, China [Text] /Y. Sun, S.G. Li, J.F. Jiang [et al.] //Emerg. Infect. Dis. - 2014. - Vol. 20, № 5. - P. 896-897.

10. Wilson, M. Development of droplet digital PCR for the detection of Babesia microti and Babesia duncani [Text] /M. Wilson, K. Glaser, D. Adams-Fish [et al.] //Exp. Parasitol. - 2015. - Vol. 149. - P. 24-31.

11. Babesia divergens 18S ribosomal RNA gene genesig Standard Kit [Electronic resource] /Quantification of Babesia divergens genomes. Genesig Advanced kit handbook HB 10.03.09 //Primerdesign Ltd. Published Date: 26.04.2016. - Mode to access: [http://www.genesig.com/assets/files/b\\_divergens\\_std.pdf](http://www.genesig.com/assets/files/b_divergens_std.pdf).

12. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ. /Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги //М.: Мир, 1999. - 558 с.

13. Couturier, B. Detection and Differentiation of Babesia microti and Other Pathogenic Babesia Species by a Single-Amplicon, Dual-Probe Real-Time PCR Assay [Electronic resource] /B. Couturier, K. Kalp, C. Ginocchio C. [et al.] //Open Forum Infect. Dis. (Fall 2014) 1(suppl 1): S378-S379. Session: 191. - Mode to access: [http://ofid.oxfordjournals.org/content/1/suppl\\_1/S378.4.full.pdf+html](http://ofid.oxfordjournals.org/content/1/suppl_1/S378.4.full.pdf+html).

14. Liu, J. A PCR method targeting internal transcribed spacers: the simultaneous detection of Babesia bigemina and Babesia bovis in cattle [Text] /J. Lui, G. Guan, A. Liu [et al.] //Acta Parasitol. - 2014. - Vol. 59, № 1. - P. 132-138.

15. Грубіч, П.Ю. Розробка ПЛР тест-системи для видової ідентифікації збудників бабезіозу тварин [Текст] /П.Ю. Грубіч, А.Ф. Курман, Л.В. Лепета, С.А. Пархоменко //Вісник Полтавської державної аграрної академії. - 2013. - № 2. - С. 98-101.

16. Meer-Scherrer, L. Babesia microti infection in Europe [Text] /L. Meer-Scherrer, M. Adelson, E. Mordechai [et al.] //Curr. Microbiol. - 2004. - Vol. 48, № 6. - P. 435-437.

17. Herwaldt, B.L. Molecular characterization of a non-Babesia divergens organism causing zoonotic babesiosis in Europe [Text] /B.L. Herwaldt, S. Caccio, F. Gherlinzoni [et al.] //Emerg. Infect. Dis. -2003. -Vol. 9, № 8. - P. 942-948.

18. Kostyria, I.A. Application of indirect immunofluorescence reaction for diagnosis of babesiosis [Electronic resource] /I. A. Kostyria, S.I. Pokhyl, I.I. Torianyk [et al.] //Topical issues of new drugs development. Матеріали XXIII Міжнародної науково-практичної конференції молодих учених та студентів: "Актуальні питання створення нових лікарських засобів". - Kharkiv. - April 21, 2016. - Vol. 2. -P. 58. -Mode of access: [http://nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2016/04/zbirnik-tez-rkonferensii-molodux-vchenix-Vol.2\\_2016.pdf](http://nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2016/04/zbirnik-tez-rkonferensii-molodux-vchenix-Vol.2_2016.pdf).

18. Markoulatos, P. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach /P. Markoulatos, N. Sifakas and M. Moncany //J. Clin. Lab. Anal. - 2002. - Vol. 16, № 1. - P. 47-51.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб детекції патогенних для людини бабезій за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), що включає виявлення специфічних ампліконів (копій фрагментів гена 18S rRNA Babesia microti, B. divergens + B. venatorum), попередньо одержаних за допомогою мультиплексної ПЛР, який **відрізняється** тим, що для відтворення реакції використовують праймери BabUnF, BabMicR і BabDivR із такою послідовністю нуклеотидів:

BabUnF 5' - GCT CTT TCT TGA TTC TWT GGG TGG-3',

BabMicR 5' - TGT AAG ATT ACC CGG ACC CGA-3',

BabDivR 5' - AGA AGC AAA CCG TAA CGG ACG-3'.