



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110363** (13) **C2**
(51) МПК
C12Q 1/04 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 10223	(72) Винахідник(и): Климнюк Сергій Іванович (UA), Кованова Ельвіра Миколаївна (UA), Творко Михайло Стефанович (UA), Луцук Олексій Спіридонович (UA)
(22) Дата подання заявки: 19.08.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.12.2015	
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.12.2013, Бюл.№ 24	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО" МОЗ УКРАЇНИ, Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.12.2015, Бюл.№ 24	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга 2. Под редакцией А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой. Москва, изд. БИНОМ - 2010. - с. 584-621. Zhang Y. Lack of correlation of vacA genotype, cagA gene of Helicobacter pylori and their expression products with various gastroduodenal diseases / Y. Zhang, H. Liu, K. Zhou // Chin Med J. – 2001. - №114(7). – P.703-6.

(54) СПОСІБ ГЕНОТИПУВАННЯ HELICOBACTER PYLORI

(57) Реферат:

Винахід стосується медицини, зокрема мікробіології, генетики бактерій, і може бути використаний для лабораторної діагностики і епідеміологічного аналізу.
Спосіб генотипування Helicobacter pylori полягає у введенні фільтрату бульйонної чистої культури Helicobacter pylori у пробірки з перещеплюваною одношаровою лінією культури клітин HeLa. На лінії культури HeLa вивчають вакуолізуючу цитотоксичну активність Helicobacter pylori і на основі позитивного або негативного вакуолізуючого тесту роблять висновок про наявність в геномі бактерії генів cagA, vacA, генотип cagA vacA бактерії (cagA+vacA+ або cagA-vac A+), а також cagA статус (cagA+ або cagA-), наявність в геномі бактерії острівця патогенності cag PAI, алелі гена vacA(vacAs1 або інші), експресію гена vacA.

UA 110363 C2

Винахід стосується медицини, зокрема мікробіології, генетики бактерій, і може бути використаний для лабораторної діагностики і епідеміологічного аналізу.

За відомими способом вивчення вакуолізуючої цитотоксичної активності *Helicobacter pylori* проводять на перещеплюваній одношаровій лінії культури HeLa, що дає можливість встановити тох фенотип і тип культури *Helicobacter pylori* [1].

Недоліком відомого способу є недостатній рівень інформативності, зумовлений тим, що за відомим способом визначають лише тох фенотип і тип культури, і не встановлюють наявності у *Helicobacter pylori* генів *cagA*, *vacA*, генотип *cagA vacA* культури (*cagA+vacA+* або *cagA-vacA-*), а також статус *cagA* (*cagA+* або *cagA-*), алелі *vacA* (*vacAs1* або інші), наявності у геномі бактерії острова патогенності *cag PAI*, не визначають експресію гена *vacA*. Для генотипової ідентифікації та генотипування *Helicobacter pylori* необхідно застосовувати методи молекулярного зондування, полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), рестрикційного, ампліфікаційного аналізу та їх комбінацію, що є надто громіздким і потребує затрати значних коштів, що зумовлює недоступність їх для практичних мікробіологічних лабораторій.

В основу винаходу поставлено задачу вдосконалити відомий спосіб диференціації тох фенотипів *Helicobacter pylori* за вакуолізуючим тестом шляхом додаткового застосування генетичного аналізу, що дає можливість встановити наявності у *Helicobacter pylori* генів *cagA*, *vacA*, генотип *cagA vacA* культури (*cagA+vacA+* або *cagA-vacA+*), а також статус *cagA* (*cagA+* або *cagA-*), алелі *vacA* (*vacAs1* або інші), наявності в геномі бактерії острова патогенності *cag PAI*, визначити експресію гена *vacA*.

При вирішенні поставленого завдання брали до уваги те, що *VacA* екзотоксин (продукт експресованого гена *vacA*), має здатність формувати в цитоплазмі клітин HeLa вакуолі, які, зливаючись між собою, приводять клітини до набухання і руйнування.

Конкретно спосіб генотипування *Helicobacter pylori* за запропонованим нами способом здійснюють шляхом введення фільтрата бульйонної чистої культури *Helicobacter pylori* у пробірку з перещеплюваною одношаровою лінією культури клітин HeLa з наступною інкубацією у термостаті при 37 °C упродовж 18-24 годин. В подальшому за допомогою світлового мікроскопа спостерігають за наявністю вакуолізації цитоплазми клітин HeLa - не менше 50 % клітин HeLa при позитивному результаті.

На основі позитивного вакуолізуючого теста роблять висновок, що досліджувана культура бактерії є токсигенною, тобто має фенотип *tox+* і належить до 1 типу. При негативному тесті - відсутність вакуолізації або вакуолізація менше ніж 50 % клітин - культура є нетоксигенною, має фенотип *tox-* і належить до 2-го типу.

Подальший генетичний аналіз отриманих результатів проводять з урахуванням генетичних структур, які беруть участь у процесі продукції вакуолізуючого екзотоксину, і за відсутністю яких токсиноутворення неможливе. Таким способом за результатами генетичного аналізу вакуолізуючого теста встановлюють наявності генів *cagA*, *vacA*, генотип *cagA vacA* культури (*cagA+vacA+* або *cagA-vacA+*), а також статус *cagA* (*cagA+* або *cagA-*), алелі *vacA* (*vacAs1* або інші), присутності у геномі бактерії острова патогенності *cag PAI*, визначають експресію гена *vacA*, отже, проводять генотипування і одночасно виявляють генетичні детермінанти *Helicobacter pylori* без застосування спеціальних генетичних методів дослідження.

Приклад 1. Хвора М., 47 років, обстежена з приводу виразкової хвороби шлунка, з біоптатів шлунка якої виділено *Helicobacter pylori* і за запропонованим нами способом проведено фенотипування і генотипування культури. За позитивним вакуолізуючим тестом встановили, що виділена від хворої *Helicobacter pylori* має фенотип *tox+* і належить до 1 типу.

За генетичним аналізом визначили, що культура містить гени *cagA*, *vacA* і має генотип *cagA+vacA+*, *cagA* статус її позитивний *cagA+*, в геномі бактерії міститься *cag PAI*, а її експресований ген *vacA* має алелі *vacAs1*.

Приклад 2. Пацієнт М., 14 років. Досліджували зубний наліт, з якого виділили *Helicobacter pylori*. За даними фено-, генотипування дослідженого фільтрата культури встановили, що фенотип культури *tox-* і вона належить до другого типу. *Helicobacter pylori* з фенотипом *tox-* може мати генотип *cagA-vacA+* з алелями *vacA* гена *vacA s1* або генотип *cagA+vacA+* з іншими, ніж *vacAs1* алелями гена *vacA*. За позитивним тестом "колібрі фенотипу" встановили, що *Helicobacter pylori* виділена від пацієнта М. має генотип *cagA+*, *vacA+* з іншими, ніж *vacAs1*, алелями гена *vacA*.

Таким способом за результатами генотипування є можливість встановити різні генотипи *Helicobacter pylori* у *tox+* і *tox-* бактерій, що дозволяє визначити джерела інфікування.

Отже, запропонований нами спосіб фено-, генотипування *Helicobacter pylori* можна використовувати в широкій лабораторній практиці, при наукових дослідженнях і проведенні епідеміологічного аналізу.

Джерела інформації:

1. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций. Книга 2. Под редакцией А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой. - Москва, изд. БИНОМ - 2010. - С. 584-621.

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб генотипування *Helicobacter pylori*, який включає встановлення наявності в геномі бактерії генів *sagA*, *vacA*, генотипу *sagA vacA Helicobacter pylori* (*sagA+vacA+* або *sagA-vacA+*), а також *sagA* статусу (*sagA+* або *sagA-*), наявності в геномі культури острівця патогенності *sag* PAI, алелів гена *vacA* (*vacAs1* або інші), експресії гена *vacA*, який **відрізняється** тим, що на перещеплюваній лінії культури HeLa вивчають вакуолізуючу цитотоксичну активність *Helicobacter pylori* і при позитивному вакулізуючому тесті роблять висновок, що *Helicobacter pylori* містить гени *sagA*, *vacA* і має генотип *sagA+vacA+*, *sagA* статус її позитивний *sagA+*, в геномі бактерії міститься *sag* PAI, а її експресований ген *vacA* має алелі *vacAs1*; а при негативному вакулізуючому тесті роблять висновок, що *Helicobacter pylori* має генотип *sagA-vacA+* з алелями *vacA* гена *vacA s1* або генотип *sagA+vacA+* з іншими, ніж *vacAs1* алелями гена *vacA*.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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