



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 107910

(13) C2

(51) МПК

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

- (21) Номер заявки: а 2014 07161
- (22) Дата подання заявки: 25.06.2014
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 25.02.2015
- (41) Публікація відомостей про заяву: 27.10.2014, Бюл.№ 20
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2015, Бюл.№ 4
- (72) Винахідник(и):
**Федорич Павло Володимирович (UA),
Зелений Сергій Борисович (UA)**
- (73) Власник(и):
**Федорич Павло Володимирович,
вул. Богатирська, 6/1, кв. 144, м. Київ,
04209 (UA),
Зелений Сергій Борисович,
вул. Семашка, 8-а, кв. 10, м. Київ, 03142
(UA)**

- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
- Holger Mayta. 18S Ribosomal DNA-Based PCR for Diagnosis of Trichomonas vaginalis / Holger Mayta, Robert H. Gilman, Maritza M. Calderon, Aren Gottlieb, Giselle Soto, Iskra Tuero, Sixto Sanchez, Aldo Vivar // J Clin Microbiol. - Jul 2000. - 38(7). - p. 2683-2687
- Peter Kleina. Molecular phylogeny of Trichomonadidae family inferred from ITS-1, 5.8S rRNA and ITS-2 sequences / Peter Kleina, Josiane Bettim-Bandinelli, Sandro Luis Bonatto, Marlene Benchimol, Mauricio Reis Bogo // International Journal for Parasitology. 2004. - № 34. - p. 963-970
- T. Crucitti. Detection of Pentatrichomonas hominis DNA in biological specimens by PCR / T. Crucitti, S. Abdellati, D.A. Ross, J. Chagalucha, E. van Dyck, A. Buve // Letters in Applied Microbiology. - 2004. - № 38. - p. 510-516
- WO 2012075317 A2, 07.06.2012
- K. Dimasuay. First report of Trichomonas tenax infections in the Philippines / K. Dimasuay, W. Rivera // Parasitology International. - April 2014. - V. 63. - Is. 2. - p. 400-402
- RU 2389016 C2, 10.05.2010
- П.В. Федорич. Визначення деяких найпростіших у хворих з урогенітальними інфекціями методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі / П.В. Федорич, С.Б. Зелений, Л.С. Зайцева, О.В. Мазій // Український журнал дерматології, венерології, косметології. - № 4 (47). - 2012. - с. 132-138

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПРИСУТНОСТІ TRICHOMONAS TENAX У ДОСЛІДЖУВАНОМУ ЗРАЗКУ ТА НАБІР ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ ЙОГО ЗДІЙСНЕННЯ

(57) Реферат:

Винахід належить до мікробіології та медицини і може бути використаний для виявлення Trichomonas tenax при діагностиці та лікуванні трихомоніазу. Спосіб включає проведення полімеразної ланцюгової реакції. Як набір праймерів використовують прямий і зворотний праймери для детекції Trichomonas tenax нуклеотидного складу: CCATCGATGCCATTTCGGTATTG (SEQ ID NO:1) та CTTCGTCTAAGTCCTTAGATGCAAG (SEQ ID

UA 107910 C2

NO:2). Заявлений спосіб є чутливим і специфічним і забезпечує високу точність виявлення трихомонад *Trichomonas tenax*.

Винахід належить до мікробіології, вірусології, молекулярної біології та медицини і може бути використаний для виявлення *Trichomonas tenax* при діагностиці та лікуванні трихомоніазу.

Трихомоніаз, що є захворюванням сечостатевої системи, викликається найпростішим одноклітинним паразитом *Trichomonas vaginalis* і передається переважно статевим шляхом або, в окремих випадках, шляхом контамінації (Адаскевич В.П. Инфекции, передаваемые половым путем. - М.: Медицинская книга. - 2006. - 425 с. [1]). Щорічно у світі захворювання трихомоніазом діагностується приблизно у 170 млн. випадків (Туркевич О.Ю. Деякі питання етіопатогенетичного обґрунтування комплексного лікування бактеріального вагінозу. /Український журнал дерматології, венерології, косметології. - Київ, 2010, № 1 (36), - С. 92-96 [2]). Це захворювання не має сезонного характеру та здатне вражати усі шари населення.

Вважається, що трихомонада, що здатна існувати у уrogenітальному тракті, є *Trichomonas vaginalis*. Однак, здатність найпростіших до патоморфозу та, з іншого боку, суттєві зміни стереотипу сексуальної поведінки сучасної людини, зокрема, збільшення практики орального та анального сексу, - призвели до можливості існування у уrogenітальному тракті іншого типу трихомонад, а саме *Trichomonas tenax*.

З рівня техніки відомі способи діагностики трихомоніазу, що базуються на фазово-контрастній мікроскопії, зокрема: Клименко Б.В. Трихомониаз. - Л.: Медицина, 1987 [3], UA, патент на корисну модель № 39256 U [4], RU, 2466731 [5], - проте, чутливість цього методу є недостатньо високою (не перевищує 65 %).

Відомі способи діагностики трихомоніазу методом полімеразної ланцюгової реакції, зокрема: L.F. Lawing, S.R.Hedgers, J.R.Schwebke. Detection of Trichomonosis in Vaginal and Specimens from Woman by Culture and PCR (Journal of clinical microbiology. - 2000. - v. 38, N. 10-p. 3585-3588 [6]), RU, патент № 2389016 ([7]).

В основі методу полімеразної ланцюгової реакції лежить можливість збільшити малі концентрації визначених фрагментів нуклеїнової кислоти ДНК у біологічному матеріалі шляхом багатократного вибіркового копіювання визначеної ділянки нуклеїнової кислоти ДНК за допомогою ферменту у штучних умовах. При цьому, за допомогою набору праймерів: прямого і зворотного, відбувається копіювання тільки тієї ділянки ДНК-матриці, яка задовольняє заданим умовам, і тільки у тому випадку, якщо ця ділянка присутня у досліджуваному зразку.

Молекулярно-генетичні методи діагностики трихомоніазу є більш чутливими, розробка їх пов'язана з підбором компонентів реакції: вибір праймерів, комплементарних протилежним кінцям різних ланцюгів потрібного фрагмента ДНК, складу інкубаційної суміші, - а також підбору програми ампліфікації.

Проте, відомі способи діагностики трихомоніазу методом полімеразної ланцюгової реакції також не забезпечують потрібної чутливості, причому, проблема не тільки у виборі компонентів для проведення ампліфікації і її умов, а також і в тому, що у зазначених способах здійснюється ідентифікація тільки трихомонад *Trichomonas vaginalis*.

Актуальність виявлення трихомонад типу *Trichomonas tenax* у сечостатевої системі пацієнтів, хворих на інфекції, що передаються статевим шляхом, пов'язана як з високим рівнем захворювання трихомоніазом, так і з можливістю більш точного діагностування трихомоніазу і, в результаті, проведення більш спрямованого лікування, що підвищує його ефективність.

Найбільш близьким є спосіб визначення присутності *Trichomonas tenax* у досліджуваному зразку методом полімеразної ланцюгової реакції (міжнародна заявка PCT/US2011/062933 [8]). За даним способом присутність *Trichomonas tenax* у досліджуваному зразку визначається опосередковано, оскільки методом полімеразної ланцюгової реакції здійснюють визначення *Trichomonas vaginalis*, однак, при визначенні цього виду трихомонад враховують присутність *Trichomonas tenax*, отриману експериментально-розрахунковим шляхом за молекулярно-генетичними даними, отриманими за допомогою 6-ти штамів *Trichomonas vaginalis* і одного штаму *Trichomonas tenax*.

Однак, такий спосіб не дає можливості отримати точні результати щодо наявності *Trichomonas tenax* у досліджуваному зразку, що негативно впливає на діагностування трихомоніазу та ефективність його лікування.

Задачею винаходу є удосконалення способу визначення присутності *Trichomonas tenax* у досліджуваному зразку, в якому за рахунок підібраних праймерів і умов здійснення ампліфікації забезпечується точність у виявленні наявності трихомонад *Trichomonas tenax*.

Задачею винаходу є також створення набору праймерів для детекції *Trichomonas tenax*, що дозволяє отримати дані щодо присутності *Trichomonas tenax* у досліджуваному зразку в режимі реального часу.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом визначення присутності *Trichomonas tenax* у досліджуваному зразку методом полімеразної ланцюгової реакції, в якому

при проведенні полімеразної ланцюгової реакції як набір праймерів, використовують прямий і зворотний праймери для детекції *Trichomonas tenax* нуклеотидного складу:

CCATCGATGCCATTCCGGTATTG (SEQ ID NO:1) та
CTTCGTCTAAGTCCTTAGATGCAAG (SEQ ID NO:2),

як інкубаційну суміш використовують склад, кінцевим об'ємом 35 мкл, що включає: 6 мМ Tris-HCl (pH 8,5, 25 °C), 3 мМ MgSO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 2 мМ dNTP, 10 пМ праймерів, 1 нг ДНК матриці, 1 од. Taq-ДНК полімерази та буфер Tween-20,

ампліфікацію здійснюють за програмою: 94 °C-2 хв. - 1 цикл, 94 °C-30 с, 59 °C-20 с - 5 циклів, 72 °C-25 с, 94 °C-10 с, 62 °C-10 с - 45 циклів, 72 °C-20 с,

при цьому ампліфікацію і детекцію *Trichomonas tenax* здійснюють в режимі реального часу.

Поставлена задача вирішується також набором праймерів для детекції *Trichomonas tenax*, що включає прямий і зворотний праймери нуклеотидного складу: CCATCGATGCCATTCCGGTATTG (SEQ ID NO:1) та CTTCGTCTAAGTCCTTAGATGCAAG (SEQ ID NO:2).

Експериментально підібраний нами авторський діагностикум, що був створений спеціально для визначення присутності *Trichomonas tenax* у досліджуваному зразку методом полімеразної ланцюгової реакції, за рахунок підбраного набору праймерів для детекції *Trichomonas tenax* (олігонуклеотиди SEQ ID NO:1 та SEQ ID NO:2), підбраного складу інкубаційної суміші та підбраної програми аплікації дозволив отримати точні дані щодо присутності *Trichomonas tenax* у досліджуваному зразку.

Набір праймерів для детекції *Trichomonas tenax* був підібраний з послідовності нуклеїнових кислот *Trichomonas tenax* gene for SrRNA, отриманих з бази даних "GenBank" Ref. D49495.1 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> [9]). Для перевірки унікальності праймерів використовувалася on-line програма (www.ucsc.edu [10]).

Спосіб визначення присутності *Trichomonas tenax* у досліджуваному зразку методом полімеразної ланцюгової реакції здійснюється таким чином.

Здійснюють забір біологічного матеріалу для дослідження на присутність *Trichomonas tenax*. Досліджуваний зразок вводять в контакт з інкубаційною сумішшю кінцевим об'ємом 35 мкл, що включає: 6 мМ Tris-HCl (pH 8,5, 25 °C), 3 мМ MgSO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 2 мМ dNTP, 10 пМ праймерів, 1 нг ДНК матриці, 1 од. Taq-ДНК полімерази та буфер Tween-20, де як набір праймерів, використовують прямий праймер CCATCGATGCCATTCCGGTATTG (SEQ ID NO:1) і зворотний праймер CTTCGTCTAAGTCCTTAGATGCAAG (SEQ ID NO:2). У реакційну суміш додають барвник і переносять в умови, придатні для ампліфікації, детектуючий ампліфікатор. Проведення ампліфікації здійснюють за програмою: 94 °C-2 хв. - 1 цикл, 94 °C-30 с, 59 °C-20 с - 5 циклів, 72 °C-25 с, 94 °C-10 с, 62 °C-10 с - 45 циклів, 72 °C-20 с Проведення ампліфікації і детекції *Trichomonas tenax* здійснюють в режимі реального часу.

Відомості, що підтверджують можливість здійснення винаходу.

Нами у м. Києві (Україна) у період 2013-2014 року здійснювався запропонований спосіб визначення присутності *Trichomonas tenax* у досліджуваному зразку. Дослідження проводилися на групі пацієнтів за їх згодою, що звернулися до дерматовенерологічної установи на обстеження з приводу інфекцій, що передаються переважно статевим шляхом. Для чистоти дослідження у цю групу були відібрані тільки ті пацієнти, у яких методом полімеразної ланцюгової реакції було виключено інфікування *Trichomonas vaginalis*. Група складалася з 72 пацієнтів, серед яких 30 жінок (41,7 %) і 42 чоловіки (58,3 %). Вік пацієнтів - від 20 до 65 років, у середньому - 32 роки). У всіх пацієнтів було встановлено хронічне протікання уrogenітальної інфекції.

Забір біологічного матеріалу для дослідження на присутність *Trichomonas tenax* здійснювався у відповідності до діючих рекомендацій (Мавров І.І. Уніфікація лабораторних методів дослідження в діагностиці захворювань, що передаються статевим шляхом. /І.І. Мавров, О.П. Белозоров, Л.С. Тацька. - Харків: Факт. - 2000. - 120 с [11]). У чоловіків брали зскрібки з уретри одноразовими зондами і забір секрету передміхурової залози після її пальцевого масажу, у жінок брали забір піхвових виділень, а також зскрібки з уретри і цервікального каналу. Досліджуваний зразок вводили в контакт з інкубаційною сумішшю кінцевим об'ємом 35 мкл, що включала: 6 мМ Tris-HCl (pH 8,5, 25 °C), 3 мМ MgSO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 2 мМ dNTP, 10 пМ праймерів, 1 нг ДНК матриці, 1 од. Taq-ДНК полімерази та буфер Tween-20. Як набір праймерів, використовували: CCATCGATGCCATTCCGGTATTG (SEQ ID No:1) і CTTCGTCTAAGTCCTTAGATGCAAG (SEQ ID NO:2). У реакційну суміш додавали барвник: N'-диметил-N-[4-[(E)-(3-метил-1,3-бензотіазол-2-уліден)метил]-1-фенілхінолін-1-фум-2-іл]-N-пропілпропан-1,3-діамін (ціаніновий барвник SYBR Green I), і переносили у детектуючий ампліфікатор ДТ-96 (виробник - "ДНК-Технологія", Росія). Проведення ампліфікації здійснювали

за програмою: 94 °C-2 хв. - 1 цикл, 94 °C-30 с, 59 °C-20 с - 5 циклів, 72 °C-25 с, 94 °C-10 с, 62 °C-10 с - 45 циклів, 72 °C-20 с Проведення ампліфікації і детекції *Trichomonas tenax* здійснювали в режимі реального часу.

В результаті *Trichomonas tenax* був виявлений у 23 пацієнтів (32 %), а саме: у 13 жінок (56,5 % пацієнтів) і у 10 чоловіків (43,5 %) (рисунк). Призначене в результаті виявленого типу трихомонад лікування, специфічного до *Trichomonas tenax*, виявилось ефективним.

Заявлений спосіб визначення присутності *Trichomonas tenax* у досліджуваному зразку методом полімеразної ланцюгової реакції є чутливим і специфічним і забезпечує високу точність виявлення наявності трихомонад *Trichomonas tenax*.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб визначення присутності *Trichomonas tenax* у досліджуваному зразку методом полімеразної ланцюгової реакції, який **відрізняється** тим, що при проведенні полімеразної ланцюгової реакції як набір праймерів використовують прямий і зворотний праймери для детекції *Trichomonas tenax* нуклеотидного складу:

CCATCGATGCCATTTCGGTATTG (SEQ ID NO:1) та
CTTCGTCTAAGTCCTTAGATGCAAG (SEQ ID NO:2),

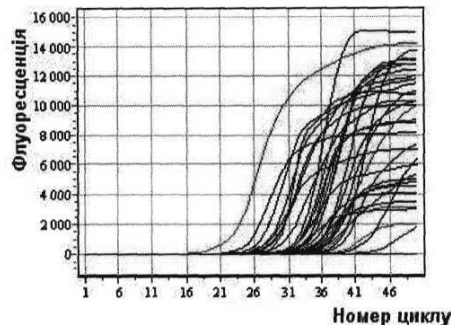
як інкубаційну суміш використовують склад, кінцевим об'ємом 35 мкл, що включає: 6 мМ Tris-HCl (pH 8,5, 25 °C), 3 мМ MgSO₄, 2,5 мМ MgCl₂, 2 мМ dNTP, 10 pM праймерів, 1 нг ДНК матриці, 1 од. Taq-ДНК полімерази та буфер Tween-20,

ампліфікацію здійснюють за програмою: 94 °C - 2 хв. - 1 цикл, 94 °C - 30 с, 59 °C - 20 с - 5 циклів, 72 °C - 25 с, 94 °C - 10 с, 62 °C - 10 с - 45 циклів, 72 °C - 20 с,

при цьому ампліфікацію і детекцію *Trichomonas tenax* здійснюють в режимі реального часу.

2. Набір праймерів для детекції *Trichomonas tenax*, що включає прямий і зворотний праймери нуклеотидного складу:

CCATCGATGCCATTTCGGTATTG (SEQ ID NO:1) та
CTTCGTCTAAGTCCTTAGATGCAAG (SEQ ID NO:2).



Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

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