



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110759** (13) **C2**
(51) МПК**C12Q 1/68** (2006.01)**C12Q 1/04** (2006.01)**C12N 15/11** (2006.01)**C12R 1/90** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД****(21)** Номер заявки: **а 2015 01255****(22)** Дата подання заявки: **16.02.2015****(24)** Дата, з якої є чинними
права на винахід: **10.02.2016****(41)** Публікація відомостей
про заявку: **26.10.2015, Бюл.№ 20****(46)** Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.02.2016, Бюл.№ 3****(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:

UA 83126 U, 27.08.2013

UA 58647 U, 26.04.2011

WO 2003085403 A1, 16.10.2003

RU 2269573 C2, 10.02.2006

Madhumati J Patil et al. Diagnosis of
Trichomonas Vaginalis from Vaginal
Specimens by Wet Mount Microscopy, In
Pouch TV Culture System, and PCR. Journal
of Global Infectious Diseases, Jan-Mar 2012,
Vol. 4 (1), p. 22-25

RU 2389016 C2, 10.05.2010

Crucitti T et al. Detection of Pentatrichomonas
hominis DNA in biological specimens by PCR.
Lett Appl Microbiol., 2004; Vol. 38 (6), p. 510-
516Lisa F. Lawing et al. Detection of
Trichomonosis in Vaginal and Urine
Specimens from Women by Culture and PCR.
JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,
Oct. 2000, Vol. 38 (10), p. 3585-3588
UA 39256 U, 25.02.2009**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПРИСУТНОСТІ PENTATRICHOMONAS HOMINIS У ДОСЛІДЖУВАНОМУ
ЗРАЗКУ ТА НАБІР ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ ЙОГО ЗДІЙСНЕННЯ****(57) Реферат:**

Винахід належить до набору праймерів для детекції присутності *Pentatrichomonas hominis* та до способу визначення присутності *Pentatrichomonas hominis* у досліджуваному зразку методом полімеразної ланцюгової реакції, при якому як набір праймерів застосовують високоточні прямий і зворотний праймери.

UA 110759 C2

Винахід належить до мікробіології, вірусології, молекулярної біології та медицини і може бути використаний для виявлення *Pentatrichomonas hominis* 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 *Pentatrichomonas hominis*.

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 полягає 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 *Pentatrichomonas hominis* у сечостатевої системі пацієнтів, хворих на інфекції, що передаються статевим шляхом, пов'язана як з високим рівнем захворювання на трихомоніаз, 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 *Pentatrichomonas hominis* у досліджуваному зразку методом полімеразної ланцюгової реакції, зокрема (Crucitti T., Abdellati S., Ross D.A., Changelucha J., van Dyck E., Buve A. Letters in Applied Microbiology 2004, 38, 510-516. [8]). За даним способом присутність *Pentatrichomonas hominis* у досліджуваному зразку визначається опосередковано, оскільки методом полімеразної ланцюгової реакції здійснюють визначення *Trichomonas vaginalis*, однак, при визначенні цього виду трихомонад враховують присутність *Pentatrichomonas hominis*, отриману експериментально-розрахунковим шляхом за молекулярно-генетичними даними, отриманими за допомогою 6-ти штамів *Trichomonas vaginalis* і одного штаму *Pentatrichomonas hominis*.

Однак, такий спосіб не дає можливості отримати точні результати щодо наявності *Pentatrichomonas hominis* у досліджуваному зразку тому, що детекцію проводили за допомогою методу електрофорезу. Відповідна неточність негативно впливає на діагностування трихомоніазу та ефективність його лікування.

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

Задачею винаходу є також створення набору праймерів для детекції *Pentatrichomonas hominis*, що дозволяє отримати дані щодо присутності цього мікроорганізму у досліджуваному зразку за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом визначення присутності *Pentatrichomonas hominis* у досліджуваному зразку методом полімеразної ланцюгової реакції, в якому при проведенні полімеразної ланцюгової реакції як набір праймерів використовують прямий і зворотний праймери для детекції *Pentatrichomonas hominis* нуклеотидного складу:

Forvard 5'-GGAGGAGGTAATGACCAGTT-3' (SEQ ID NO: 1), та

Revers 5'-CTCTGTCTGGCATCGTTTACA-3' (SEQ ID NO: 2)

як інкубаційну суміш використовують склад з 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 0,02 % 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 - 35 с, 94 °C - 10 с, 62 °C - 30 с - 45 циклів, 72 °C - 20 с,

при цьому ампліфікацію і детекцію *Pentatrichomonas hominis* здійснюють в режимі реального часу.

Поставлена задача вирішується також набором праймерів для детекції *Pentatrichomonas hominis*, що включає прямий і зворотний праймери нуклеотидного складу: Forvard 5'-GGAGGAGGTAATGACCAGTT-3' (SEQ ID NO: 1), та Revers 5'-CTCTGTCTGGCATCGTTTACA-3' (SEQ ID NO: 2)

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

Набір праймерів для детекції *Pentatrichomonas hominis* був підібраний з послідовності нуклеїнових кислот *Pentatrichomonas hominis* 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 *Pentatrichomonas hominis* у досліджуваному зразку методом полімеразної ланцюгової реакції здійснюється таким чином.

Здійснюють забір біологічного матеріалу для дослідження на присутність *Pentatrichomonas hominis*. 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 Forvard 5'-GGAGGAGGTAATGACCAGTT-3' (SEQ ID NO:1) і зворотний праймер Revers 5'-CTCTGTCTGGCATCGTTTACA-3' (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 - 35 с, 94 °C - 10 с, 62 °C - 30 с - 45 циклів, 72 °C - 20 с. Проведення ампліфікації і детекції *Pentatrichomonas hominis* 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 *Pentatrichomonas hominis* у досліджуваному зразку. Дослідження проводилися на групі пацієнтів за їх згодою, що звернулися до дерматовенерологічну установу 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 на *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 хронічний перебіг урогенітальної інфекції.

Забір біологічного матеріалу для дослідження на присутність *Pentatrichomonas hominis* 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 зіскоби з уретри одноразовими зондами і секрет передміхурової залози після її пальцевого масажу, у жінок брали забір піхвових виділень, а також зіскоби 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 pM праймерів, 1 нг ДНК матриці, 1 од. Taq-ДНК полімерази та буфер Tween-20. Як набір праймерів, використовували: Forward 5'-GGAGGAGGTAATGACCAGTT-3' (SEQ ID NO:1), та Revers 5'-CTCTGTCTCGGCATCGTTTACA-3' (SEQ ID NO:2). У реакційну суміш додавали барвник: N',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 *Pentatrichomonas hominis* здійснювали в режимі реального часу.

В результаті *Pentatrichomonas hominis* було виявлено у 12 пацієнтів (16,4 %), а саме: у 7 жінок (58,3 % пацієнтів), і у 5 чоловіків (41,7 %) (Фіг.). Призначене в результаті виявленого типу трихомонад лікування, специфічного до *Pentatrichomonas hominis*, виявилось ефективним.

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

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб визначення присутності *Pentatrichomonas hominis* 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 *Pentatrichomonas hominis* нуклеотидного складу:

Forward 5'-GGAGGAGGTAATGACCAGTT-3' (SEQ ID NO: 1), та

Revers 5'-CTCTGTCTCGGCATCGTTTACA-3' (SEQ ID NO: 2),

як інкубаційну суміш використовують склад з 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 0,02 % буфер Tween-20,

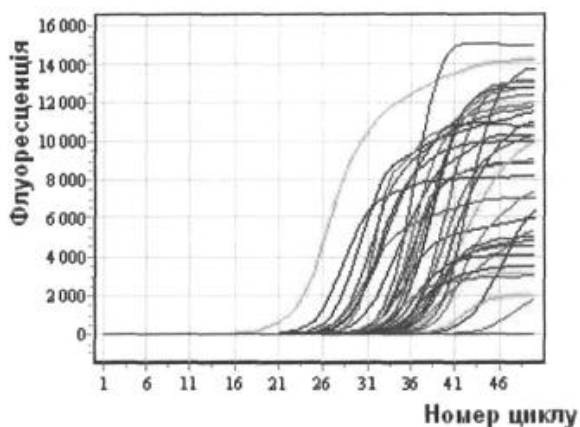
ампліфікацію здійснюють за програмою: 94 °C - 2 хв. - 1 цикл, 94 °C - 30 с, 59 °C - 20 с - 5 циклів, 72 °C - 35 с, 94 °C - 10 с, 62 °C - 30 с - 45 циклів, 72 °C - 20 с,

при цьому ампліфікацію і детекцію *Pentatrichomonas hominis* здійснюють в режимі реального часу.

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

Forward 5'-GGAGGAGGTAATGACCAGTT-3' (SEQ ID NO: 1), та

Revers 5'-CTCTGTCTCGGCATCGTTTACA-3' (SEQ ID NO: 2).



Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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