



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2008125383/13, 23.06.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.06.2008

(45) Опубликовано: 10.12.2009 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2307168 C2, 27.09.2007. 2186388 C2,
27.07.2002.

Адрес для переписки:
603950, г.Нижний Новгород, ул. Грузинская,
44, ФГУН "Нижегородский НИИ
эпидемиологии и микробиологии им. акад.
И.Н. Блохиной" ФС по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия
человека

(72) Автор(ы):

Блохин Константин Викторович (RU),
Быстрова Татьяна Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное учреждение
науки "Нижегородский
научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии имени
академика И.Н. Блохиной" Федеральной
службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека (RU)

(54) СПОСОБ ОБНАРУЖЕНИЯ МИНИМАЛЬНЫХ КОЛИЧЕСТВ ВИРУСА ГЕПАТИТА А В ВОДНЫХ ОБЪЕКТАХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к способу обнаружения минимальных количеств вируса гепатита А в водных объектах с помощью метода ОТ-ПЦР. Способ обнаружения минимальных количеств вируса гепатита А в водных объектах с помощью метода ОТ-ПЦР осуществляют следующим образом. К исследуемым образцам проб воды добавляют оттитрованный вирус гепатита А из расчета конечного разведения, содержащего подпороговую дозу. Затем в подготовленных предлагаемым способом пробах проводят

определение РНК ВГА методом ОТ-ПЦР. Параллельно с опытными исследуют контрольные пробы, представляющие собой суспензию ВГА на дистиллированной воде, содержащей его в пороговой - титр вируса 10^{-5} и подпороговой - титр вируса 10^{-6} концентрациях. Оценку результата производят путем сравнения данных, полученных в опыте и контроле. Изобретение позволяет повысить чувствительность метода обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) при обнаружении вируса гепатита А в водных концентрациях. 1 ил.

RU 2 375 455 C1

RU 2 375 455 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

C12Q 1/00 (2006.01)*C12Q 1/68* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2008125383/13, 23.06.2008**(24) Effective date for property rights:
23.06.2008(45) Date of publication: **10.12.2009 Bull. 34**

Mail address:

**603950, g.Nizhnij Novgorod, ul. Gruzinskaja, 44,
FGUN "Nizhegorodskij NII ehpidemiologii i
mikrobiologii im. akad. I.N. Blokhinoj" FS po
nadzoru v sfere zashchity prav potrebitelej i
blagopoluchija cheloveka**

(72) Inventor(s):

**Blokhin Konstantin Viktorovich (RU),
Bystrova Tat'jana Nikolaevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe uchrezhdenie nauki
"Nizhegorodskij nauchno-issledovatel'skij
institut ehpidemiologii i mikrobiologii imeni
akademika I.N. Blokhinoj" Federal'noj sluzhby po
nadzoru v sfere zashchity prav potrebitelej i
blagopoluchija cheloveka (RU)**

(54) METHOD FOR DETECTION OF MINIMUM AMOUNTS OF HEPATITIS A VIRUS IN WATER OBJECTS

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention is related to the field of biotechnology, precisely to method for detection of minimum amounts of hepatitis A virus in water objects with the help of RT-PCR method. Method for detection of minimum amounts of hepatitis A virus in water objects with the help of RT-PCR method is carried out as follows. Titrated virus of hepatitis A is added to researched samples of water based on final dilution, containing below-threshold dose. Then in samples prepared by suggested method, RNA of

HAV is defined by RT-PCR method. Parallel to test samples, control samples are investigated, which represent a suspension of HAV on distilled water, containing it in threshold - virus titre 10^{-5} and below-threshold - virus titre 10^{-6} - concentrations. Assessment of result is carried out by comparison of data generated in process of experiment and control.

EFFECT: invention makes it possible to improve sensitivity of method of reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) in detection of hepatitis A virus in water concentrations.

1 dwg, 3 ex

RU 2 3 7 5 4 5 5 C 1

RU 2 3 7 5 4 5 5 C 1

Изобретение относится к области вирусологии, может быть использовано в эпидемиологическом надзоре за гепатитом А и научно-исследовательской работе для обнаружения ВГА.

Известны следующие способы определения вируса гепатита А.

1. Радиоиммунный анализ (РИА) обладает высокой специфичностью и чувствительностью на уровне 0,01-10 нг/мл при определении антигена ВГА в клинических областях [И.В.Шахгильдян // Автореф. дис... докт. мед. наук. - М.,1980.- 56 с.]. Для реализации этого метода требуется дорогостоящая аппаратура, специальные лабораторные помещения, оборудованные для работы с радиоизотопами, что ограничивает его применение.

2. Иммуноферментный метод (ИФА) обеспечивает обнаружение антигена ВГА в образцах клинического материала и объектах внешней среды [М.Д.Алейник с соавт. // Вирусные гепатиты.- М., 1980. - с.69-73]. Он получил широкое распространение в лабораторной диагностике и эпидемиологических исследованиях. Метод обладает специфичностью и высокой чувствительностью на уровне РИА. Прост в реализации, не требует дорогостоящего оборудования, налажен выпуск коммерческих тест-систем. Все это в комплексе обеспечило распространение метода в широкой практике. В последние годы детекция антигена ВГА и уровень чувствительности его перестали соответствовать современным требованиям.

3. Обратная транскрипция-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Метод обеспечивает определение отдельных фрагментов нуклеиновой кислоты вируса гепатита А (РНК ВГА) с помощью специфических праймеров [А.И.Глухов с соавторами. // ЖМЭИ. - 2004. - №4. - С.50-54]. ОТ-ПЦР обладает самой высокой чувствительностью из всех известных ныне методов детекции ВГА.

Наиболее близким к предлагаемому изобретению (прототипом) является способ определения РНК вируса гепатита А в воде и слюне методом ОТ-ПЦР [Быстрова Т.Н., Попкова М.И., Блохин К.В. // патент на изобретение №2307168, С12Q 1/68, опубл. 27.09.2007]. В нем используется коммерческая тест-система, выпускаемая ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (г.Москва). Данный способ заключается в том, что исследуемые субстраты подвергаются предварительной обработке, включающей центрифугирование при 12000 об/мин в течение 5-10 мин, отбор супернатанта, добавление к осадку стерильной тридистиллированной воды в исходном объеме исследуемого субстрата, перемешивание на вортексе, прогревание до 60°C 3 мин, повторное перемешивание и центрифугирование с последующим объединением полученного супернатанта с первым для последующей детекции РНК вируса гепатита А методом ОТ-ПЦР. Этот метод по сравнению со всеми известными на сегодняшний день способами определения ВГА обладает самой высокой чувствительностью. Вместе с тем имеются теоретические предположения о том, что порог чувствительности его находится на уровне 10-100 вирионов. В более низких концентрациях вирус этим методом не определяется.

Целью изобретения является повышение чувствительности метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) при обнаружении вируса гепатита А в водных концентратах.

Сущность изобретения и техническое решение заключается в том, что минимальные дозы ВГА, не определяемые с помощью метода ОТ-ПЦР, выявляются на основе «суммарного эффекта» при добавлении в пробы подпороговых доз ($ПК \times 10^{-1}$) ВГА с последующей постановкой реакции на наличие РНК вируса.

Способ осуществляется следующим образом. Вместо предварительной обработки

перед постановкой ОТ-ПЦР к исследуемым образцам проб воды, обращающим на себя внимание с эпидемиологической и (или) санитарно-гигиенической точки зрения, добавляют заранее оттитрованный вирус гепатита А из расчета конечного разведения, содержащего подпороговую дозу ($ПК \times 10^{-1}$). Затем в подготовленных предлагаемым способом пробах проводят определение РНК ВГА методом ОТ-ПЦР, руководствуясь инструкцией к тест-системе «Ампли Сене НАV-430» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г.Москва. Параллельно с опытными исследуют контрольные пробы, представляющие собой суспензию ВГА на дистиллированной воде, содержащей его в пороговой (ПК) и подпороговой ($ПК \times 10^{-1}$) концентрациях. Оценку результата производят путем сравнения данных, полученных в опыте и контроле. Положительным считается результат, при котором определена РНК ВГА в опытной пробе с использованием подпороговой концентрации вируса ($ПК \times 10^{-1}$) в случае отрицательного ответа в соответствующем контроле и положительного ответа при применении пороговой концентрации (ПК).

Способ поясняется следующими примерами.

1. В экспериментах с вирусом гепатита А (штамм НАS-15) показано, что методом ОТ-ПЦР (прототипом) удается обнаружить РНК ВГА в концентратах дистиллированной воды, полученных с помощью любого способа концентрирования, содержащий вирус в исходном разведении до $1 \cdot 10^{-6}$ (100%) и $1 \cdot 10^{-7}$ (около 30%). В более высоких разведениях ВГА никогда не определялся.

Для реализации предлагаемого способа готовят концентраты из одного литра дистиллированной воды с помощью мембран ММПА⁺ - 0,2 «Технофильтр» и прибора ПВФ-142 при исходном разведении вируса $1 \cdot 10^{-8}$. В них вносят расчетные количества, заранее оттитрованного ВГА с тем, чтобы в конечном итоге получить разведения его в концентрациях: пороговой ($1 \cdot 10^{-5}$) и подпороговых ($1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-7}$ и $1 \cdot 10^{-8}$). Затем методом ОТ-ПЦР определяют РНК ВГА. Электрофореграмма опыта представлена на фиг.1. Положительными оказались пробы за №№3, 4 и 8.

Пробы №№4 и 8 содержали вирус НАS-15 после его добавления в пороговой концентрации (конечное разведение $1 \cdot 10^{-5}$) и с помощью ОТ-ПЦР была определена РНК ВГА. В пробе №3 вирус НАS-15 находился в подпороговой концентрации ($1 \cdot 10^{-6}$), при которой он методом ОТ-ПЦР определяться не должен (см. пробу №7 контрольного ряда). Положительный ответ в этой пробе свидетельствует о том, что в концентрате содержался ВГА в минимальных количествах, которые привели к эффекту сложения и обеспечили его выявление. Следовательно, обнаружение РНК ВГА в пробе, содержащей в добавке вирус в подпороговой концентрации, свидетельствует о присутствии в «негативном» водном концентрате агента, обеспечивающего феномен сложения, в результате которого обнаруживается искомая РНК.

2. При исследовании концентрата сточной воды, отобранной с помощью «ловушек» на основе макропористого стекла 5.07.07 г. из 1 канала входного коллектора биологических очистных сооружений г.Балахны Нижегородской области с помощью метода по прототипу был получен «отрицательный» результат. После добавления в этот концентрат вируса (штамм НАS-15) в подпороговой концентрации ($1 \cdot 10^{-6}$) с помощью метода ОТ-ПЦР удалось получить положительный эффект. Минимальные количества вируса, содержащиеся в основе (концентрате) и добавке, не выявляемые методом-прототипом в результате эффекта сложения дали положительный результат.

В общей сложности было исследовано таких 16 проб сточной воды, отобранных до обработки из входного коллектора различных очистных сооружений с помощью «ловушек» на основе макропористого стекла. Методом-прототипом в 5 из них была обнаружена РНК ВГА. Остальные пробы оказались отрицательными.

Дополнительные исследования «негативных» образцов с помощью заявляемого способа выявили еще в 5 из них РНК ВГА. Таким образом, комплексное исследование 16 проб сточной воды, не прошедшей обработку на очистных сооружениях, позволило обнаружить вирус гепатита А в 10 образцах.

3. При исследовании методом ОТ-ПЦР (прототип) ни одна из 18 проб сточной воды, прошедшей обработку на различных биологических очистных сооружениях и отобранной перед выпуском в поверхностные водоемы, не содержала РНК ВГА. Во все эти пробы был внесен вирус гепатита А (шт. HAS-15) в расчете конечного разведения $1 \cdot 10^{-6}$ (подпороговая, не выявляемая с помощью ОТ-ПЦР доза).

Повторная постановка метода-прототипа не обнаружила в исследованных пробах РНК ВГА. Таким образом, во всех случаях феномен сложения не осуществился из-за отсутствия вируса в водных концентратах. После очистки сточная вода уже не содержала вирус гепатита А.

Способ отработан и опробован в лаборатории эпидемиологии вирусных гепатитов ФГУН НИИЭМ им. акад. И.Н.Блохиной Роспотребнадзора.

Предлагаемый способ определения минимальных количеств вируса гепатита А в водных концентратах позволяет повысить чувствительность использованного метода и тем самым увеличить эффективность его при расшифровке скрытых процессов распространения вируса во внешней среде.

Чертеж. Результаты опыта по обнаружению вируса гепатита А в водном концентрате, полученном с помощью мембран ММПА⁺ - 0,2 «Технофильтр» и прибора ПВФ-142.

Примечания.

1-4 - основа пробы концентрат суспензии ВГА в разведении $1 \cdot 10^{-8}$ добавка к ней ВГА в разведениях:

1. $1 \cdot 10^{-8}$; 2. $1 \cdot 10^{-7}$; 3. $1 \cdot 10^{-6}$; 4. $1 \cdot 10^{-5}$

5-8 - контроли суспензии ВГА на дистиллированной воде в разведении

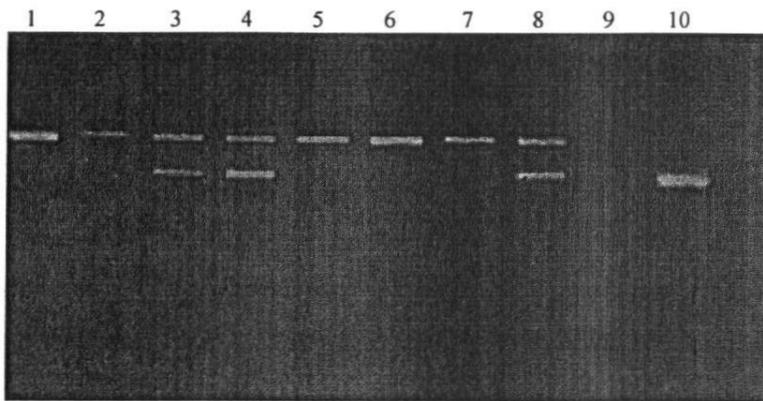
5. $1 \cdot 10^{-8}$; 6. $1 \cdot 10^{-7}$; 7. $1 \cdot 10^{-6}$; 8. $1 \cdot 10^{-5}$

9 - отрицательный контроль

10 - положительный контроль

Формула изобретения

Способ обнаружения минимальных количеств вируса гепатита А в водных объектах с помощью метода ОТ-ПЦР, отличающийся тем, что исследуемые образцы проб воды перед постановкой реакции перемешивают с предварительно оттитрованной суспензией вируса гепатита А, взятой в дозе в 10 раз меньшей порогового значения с последующим определением РНК ВГА, метод сопровождают контролями на дистиллированной воде, в которых применяют разведения вируса в пороговой - титр вируса 10^{-5} и подпороговой - титр вируса 10^{-6} концентрациях, оценку результатов проводят на основании сравнения показателей индикации РНК вируса гепатита А методом ОТ-ПЦР в исследуемых и контрольных образцах.



680 п. н.
430 п. н.