



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Q 1/68 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019136587, 13.11.2019

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.11.2019

Дата регистрации:
24.09.2020

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 13.11.2019

(45) Опубликовано: 24.09.2020 Бюл. № 27

Адрес для переписки:

450008, г.Уфа, Ленина, 3,
БАШГОСМЕДУНИВЕРСИТЕТ, Патентный
отдел

(72) Автор(ы):

Мавзютов Айрат Радикович (RU),
Бижбалова Лина Олеговна (RU),
Матниязов Рустам Тахирович (RU),
Тимербулатов Махмуд Вилевич (RU),
Щекин Влас Сергеевич (RU),
Ярмухаметова Эльвина Дамировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Башкирский государственный
медицинский университет" Министерства
здравоохранения Российской Федерации
(RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2509804 C2, 20.03.2014. TRACEY
A. et al. Speciating *Campylobacter jejuni* and
Campylobacter coli isolates from poultry and
humans using six PCR-based assays, *Fems
microbiology letters* 216, 2002, p.201-209. SU
1576558, 07.07.1990.

(54) СПОСОБ И НАБОР ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ БАКТЕРИЙ РОДА *CAMPYLOBACTER* У БОЛЬНЫХ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области биотехнологии. Согласно изобретению проводят исследование фиксированных формалином и залитых в парафин срезов биоптатов пораженных участков кишки, полученных в процессе колоноскопии у пациентов с неспецифическим язвенным колитом и болезнью Крона, при помощи ПЦР с родоспецифичными праймерами,

гомологичными родоспецифичному фрагменту 16S рРНК бактерии рода *Campylobacter*: *C. jejuni*, *C. coli* и *C. upsaliensis*. Набор для обнаружения бактерий рода *Campylobacter* содержит 6 компонентов. Использование группы изобретений упрощает и сокращает продолжительность исследования. 2 н.п. ф-лы, 2 ил., 2 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12Q 1/68 (2020.02)(21)(22) Application: **2019136587, 13.11.2019**(24) Effective date for property rights:
13.11.2019Registration date:
24.09.2020

Priority:

(22) Date of filing: **13.11.2019**(45) Date of publication: **24.09.2020 Bull. № 27**

Mail address:

**450008, g. Ufa, Lenina, 3,
BASHGOSMEDUNIVERSITET, Patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Mavzyutov Ajrat Radikovich (RU),
Bizhbalova Lina Olegovna (RU),
Matniyazov Rustam Takhirovich (RU),
Timerbulatov Makhmud Vilevich (RU),
Shchekin Vlas Sergeevich (RU),
Yarmukhametova Elvina Damirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Bashkirskij gosudarstvennyj
meditsinskij universitet" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)**(54) **METHOD AND KIT FOR DETECTING CAMPYLOBACTER BACTERIA IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY INTESTINAL DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: group of inventions relates to biotechnology. According to the invention, formalin-fixed sections of biopsy materials fixed by formalin and paraffin-embedded biopsies of affected intestinal areas, obtained by colonoscopy in patients with nonspecific ulcerative colitis and Crohn's disease, using PCR with the genus specific primers homologous to the genus

specific fragment of 16S rRNA bacteria of the genus *Campylobacter*: *C. jejuni*, *C. coli* and *C. upsaliensis*. Kit for detecting *Campylobacter* bacteria contains 6 components.

EFFECT: use of group of inventions simplifies and reduces duration of analysis.

2 cl, 2 dwg, 2 ex

RU 2 732 923 C1

RU 2 732 923 C1

Группа изобретений относится к медицине, а именно к медицинской микробиологии и может использоваться для обнаружения патогенных для человека и животных (термофильных) бактерий рода *Campylobacter* в образцах ткани кишки, заключенных в парафин (ТПФ), у больных с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК).

- 5 Бактерии рода *Campylobacter* в настоящее время рассматриваются в качестве основной причины гастроэнтеритов бактериальной природы во всем мире [Anonymous Monitoring the Incidence and Causes of Diseases Potentially Transmitted by Food in Australia: Annual Report of the OzFoodNet Network, 2010. Communicable Diseases Intelligence. 2012; 36: E213-E241; Eurosurveillance Editorial Team. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2010. Euro Surveillance. 2012; 17: 21]. Наиболее этиологически значимыми среди них являются *Campylobacter jejuni* и *Campylobacter coli* [Skirrow M.B. Diseases Due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and Related Bacteria. Journal of Comparative Pathology. 1994; 111: 113-149. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9975\(05\)80046-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9975(05)80046-5)]. Не исключается эпидемиологическое значение и ряда других
- 15 представителей *Campylobacter* spp., таких как *Campylobacter concisus*, *Campylobacter upsaliensis*, *Campylobacter hyointestinalis* и *Campylobacter fetus*, которые также могут вызывать заболевания у людей [Linton D., Owen R.J. and Stanley J. Rapid Identification by PCR of the Genus *Campylobacter* and of Five *Campylobacter* Species Enteropathogenic for Man and Animals. Research in Microbiology. 1996; 147: 707-718. [http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508\(97\)85118-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0923-2508(97)85118-2); Kulkarni S.P., Lever S., Logan J.M., Lawson A.J., Stanley J., Shafi M.S. Detection of *Campylobacter* Species: A Comparison of Culture and Polymerase Chain Reaction Based Methods. Journal of Clinical Pathology. 2002; 55: 749-753; Sarnie A., Obi C.L., Barrett L.J., Powell S.M., Guerrant R.L. Prevalence of *Campylobacter* Species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* Species in Stool Samples from the Venda Region, Limpopo, South Africa: Studies Using Molecular Diagnostic Methods. Journal of Infection. 2007; 54: 558-566].

- Наряду с этим имеются указания на то, что *Campylobacter* spp., имеют значение и в этиологии ВЗК, таких как неспецифический язвенный колит и/или болезнь Крона [Mahendran V., Riordan S.M., Grimm M.C., Tran T.A.T., Major J. et al. Prevalence of *Campylobacter* Species in Adult Crohn's Disease and the Preferential. Colonization Sites of *Campylobacter* Species in the Human Intestine. PLoS ONE. 2011; 6(9): e25417. doi: 10.1371/journal.pone.0025417]. В пользу вышеуказанного свидетельствует тот факт, что в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника доказана ведущая роль аутоиммунного компонента повреждения тканей кишки, который может инициироваться бактериями рода *Campylobacter*, а именно, их способностью к проникновению в
- 35 слизистую с последующей ее сенсибилизацией [Mahendran V., Riordan S.M., Grimm M.C., Tran T.A.T., Major J. et al. Prevalence of *Campylobacter* Species in Adult Crohn's Disease and the Preferential. Colonization Sites of *Campylobacter* Species in the Human Intestine. PLoS ONE. 2011; 6(9): e25417. doi: 10.1371/journal.pone.0025417; Kaakoush N.O., Mitchell H.M. *Campylobacter concisus* - a new player in intestinal disease. Front. Cell. Infect. Microbiol., 03 February 2012 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00004>; Rubin D.C., Shaker A., Levin M.S. Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer. Front. Immunol., 08 May 2012 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00107>]. Соответственно, аутоиммунные эффекты *Campylobacter* spp. могут быть предупреждены и/или остановлены своевременным проведением этиотропной антибактериальной терапии вследствие
- 45 раннего обнаружения и последующей эрадикации этих микроорганизмов. Однако для этого необходимо их надежное выявление непосредственно в тканях пораженных участков кишки, в которых *Campylobacter* spp. могут длительно сохраняться даже при отсутствии или не обнаружении их в фекалиях.

Известны способы детекции и идентификации *Campylobacter* spp. при использовании микроскопии или культурального метода [Методические рекомендации (МР) 01/15702-8-34. Микробиологическая диагностика кампилобактериоза. 2008; Санитарные правила (СП) 3.1.7.2816-10. Профилактика кампилобактериоза среди людей. 2010]. Однако

методы микроскопии отличает крайне низкая чувствительность и специфичность. Методы культивирования, предполагающие выделение чистых культур *Campylobacter* spp. и их идентификацию, преимущественно ориентированы на исследование нативных фекалий, которые должны доставляться в лабораторию в специальных транспортных средах (Среда Кэри-Блер (Cary-Blair), среда Эймса (Amies)). Высевы производятся после предварительного обогащения исследуемого материала методом «мембранных» фильтров [Бойцов А.Г., Порин А.А. Устройство для выделения *Campylobacter* spp. из пробы. Авторское свидетельство СССР, №01576558 от 07.07.1990], на селективные среды, содержащие антибиотики в различных комбинациях Skirrow M. (ванкомицин + полимиксин В + триметоприм), Blaser M. (ванкомицин + полимиксин В + триметоприм + цефалотин + амфотерицин), Karmali M. (цефоперазон + ванкомицин + циклогексимид), Матвеева З. (рифампицин + полимиксин В + ристомицин + амфотерицин), Минаев В. (рифампицин + фузидин + цефалотин + амфотерицин) и др.). Для культивирования *Campylobacter* spp. предложены сложные кровяные питательные среды, включающие факторы роста, селективные добавки (антибиотики) и хромогенные субстраты, а потому дорогостоящие и имеющие ограниченные сроки хранения, например, среды Campy Food ID (Biomerieux, Франция) и Brilliance CampyCount (Oxoid, США). Вне зависимости от используемых питательных сред посеы инкубируются в специальной газовой среде для микроаэрофильных бактерий (5-7% O₂, 10% CO₂, 83-85% N₂ или 6% O₂, 7% CO₂, 7% H₂, 80% N₂), в CO₂-инкубаторах или анаэробных. Предложены модификации культурального метода для количественного определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах [Методические указания (МУК 4.2.2321-08) Методы определения бактерий рода *Campylobacter* в пищевых продуктах]. Указанные выше способы отличает исключительно высокая материалоемкость и трудоемкость, продолжительность исследования варьирует от 3 до 7 дней. Более того ни один из этих способов не может использоваться для выявления бактерий рода *Campylobacter* в биоптатах, заключенных в парафин, поскольку этому обязательно предшествует фиксация ткани в формалине и гибель жизнеспособных бактерий. Это полностью исключает возможность последующего культивирования *Campylobacter* spp. и выделения их в чистой культуре [Kirk K.F., Nielsen H.L., Thorlacius-Ussing O., Nielsen H. Optimized cultivation of *Campylobacter concisus* from gut mucosal biopsies in inflammatory bowel disease. Gut Pathog. 2016; 8: 27. DOI 10.1186/s13099-016-0111-7].

К разряду экспресс-тестов для обнаружения *Campylobacter* spp., не предполагающих культивирования искомым микроорганизмов, можно отнести агглютинационные (Microscreen (Lucron), INDX-Campy (Biotrading), Dryspot *Campylobacter* Test (Oxoid), BBL-Campyslide (BD)) и иммунохроматографические тесты [МР 24 ФЦ/976-2004. Методы выявления патогенных микроорганизмов с использованием иммунохроматографических экспресс-тестов производства компании «Merck» (Германия)]. Однако они могут использоваться только для исследования сыворотки или нативных фекалий, но не образцов ткани, заключенных в парафин.

Известен способ определения инфицированности желудка *Campylobacter pyloridis* путем измерения концентрации мочевины в базальной и стимулированной гистамином или пентагастрином фракциях желудочного сока до и после проведения антибактериальной терапии [Авторское свидетельство SU 1659850 A1, МПК G01N 33/

48, БИ N 24, 1991], но он имеет низкую специфичность, чувствительность и также неприменим для ТПФ.

Известен набор реагентов для выявления ДНК *Campylobacter* spp. в продуктах питания методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Campylobacter* spp.-FL» методом ПЦР [<https://www.interlabservice.ru/upload/iblock/dc9/Campylobacter%20spp.-FL%20060219.pdf>]. Однако способ рассчитан на исследование проб ДНК, выделенных из жидких селективных питательных сред для культивирования бактерий рода *Campylobacter* с целью первичного обогащения исследуемого материала и выделения указанных микроорганизмов из продуктов питания. Это исключает возможность исследования данным способом с применением предлагаемого набора реагентов фиксированных в формалине и заключенных в парафин образцов ткани.

Наиболее близким аналогом способа обнаружения бактерий рода *Campylobacter* является способ определения в биологическом образце ДНК вызывающих острые кишечные инфекции патогенных микроорганизмов, в том числе *Campylobacter jejuni*, включающий выделение ДНК из биологического образца, содержащего патоген, получение прямых и обратных праймеров, специфичных к ДНК одного или более маркеров ОКИ, и микрочипа, проведение ПЦР в присутствии образца ДНК и праймеров, специфичных к указанному одному или более маркерам, нанесение ПЦР-продуктов на рабочую зону биочипа, инкубацию в условиях гибридизации, детекцию образованных гибридизационных комплексов на биочипе, который содержит дифференцирующие олигонуклеотиды определенной последовательности [патент RU 2509804, 2014 г.]. Недостатками прототипа являются продолжительность, высокая стоимость и трудоемкость способа.

Наиболее близким аналогом набора для идентификации бактерий рода *Campylobacter* является набор для обнаружения ДНК вызывающих острые кишечные инфекции патогенных микроорганизмов, в том числе *Campylobacter jejuni*, включающий матрицу, содержащую аминокислоты с плотностью 1-2 групп/нм²; реакционную смесь, содержащую 1 мкМ олигонуклеотида и 60 мМ гидрохлорида 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида в 0,1 М 1-метилимидазоле, рН 7,0; промывочные растворы - 0,5 мМ NaCl, содержащий 0,1 % додецилсульфат натрия и дистиллированную воду; олигонуклеотиды, модифицированные фосфатной группой (р) по 5'-положению ID SEQ No: 59, 68, 90 и 91; для лизиса - физиологический раствор, лизирующий буфер на деионизованной воде (Трис-НСl, рН 6,8 - 0,05 М, гуанидинтиоцианата - 3,13 М, GTC, этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) - 0,025 М, саркозил - 1, буфер 1 (Трис-НСl, рН 6,8 - 0,0585 М, гуанидингидрохлорид - 2,34 М, и ЭДТА - 0,0243 М), буфер 2 (1 М Трис-НСl, рН 8,0 с конечной концентрацией 0,05 М); буфера для элюции (Chelex 100 - 5%, Трис-НСl, рН 8,0 - 0,05 М); ПЦР-смесь - композиции олигонуклеотидных праймеров SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, и 1 мкл Таq ДНК-полимеразы, 2х реакционный буфер готовят на деионизованной воде (1 М Трис-НСl, рН 8,8-0,16 М; (NH₄)₂SO₄ - 0,032 М; MgCl₂ - 0,004 М; смесь дНТФ - 0,004 М; твин 20 - до конечной концентрации 0,04%); ПК-положительный контрольный образец - смесь рекомбинантных плазмид, полученных на основе pUC18 и содержащих последовательность маркерных генов каждого возбудителя в концентрации 5 пг/мкл (или 1,5×10⁶ молекул ДНК в 1 мкл); отрицательный контрольный образец - рекомбинантная плазида, полученная на основе pUC18 и содержащая последовательность маркера GE13 в концентрации 50 пг/мкл (или 15×10⁶ молекул ДНК в 1 мкл). После окончания программы амплификации - раствор

экзонуклеазы в буферном растворе в концентрации 2 ед. активности/мкл; стоп-раствор - ЭДТА на деионизованной воде в концентрации 0,020 М. Для гибридизации продуктов ПЦР на биочипах смесь (2,5 мкл 20×SSC, 2 мкл 1% додецилсульфат натрия); растворы для чипов: 2×SSC, 0,1% SDS - 1 раз 5 минут; 1×SSC, 0,1% додецилсульфат натрия - 1 раз 5 минут; 0,5×SSC - 2 раза по 5 минут [патент RU 2509804, 2014 г.]. Набор обеспечивает выявление $10\text{-}10^3$ копий ДНК, наряду с рядом патогенов лишь одного вида кампилобактерий - *Campylobacter jejuni*.

Задачей настоящей группы изобретений является разработка высокочувствительного и специфичного способа и набора для ускоренной лабораторной детекции патогенных представителей бактерий рода *Campylobacter* в образцах ткани кишечника, заключенных в парафин, у больных с воспалительными заболеваниями кишечника.

Технический результат, достигаемый при использовании группы изобретений, - упрощение и сокращение продолжительности исследования.

Сущность предлагаемой группы изобретений заключается в следующем.

При колоноскопии проводят забор биоптата пораженного участка кишки, фиксируют биоптат в формалине и заключают в парафин общепринятым способом [Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. - 5-е изд., испр. и доп. Ленинград: Медицина. Ленингр. отд-ние, 1969.- 423 с.]. Для выделения ДНК *Campylobacter* spp. из образцов ткани кишки, заключенных в парафин, изготавливают срезы толщиной 1-2 мм (по 4-6 срезов на 1 образец), помещают их в пробирки типа эппендорф, которые инкубируют в портативном термостате при 93°C для плавления парафина. Не вынимая пробирки из термостата, в каждую пробу с анализируемым образцом быстро вносят компонент 1-10 мкл магнитных частиц («Sileks» MagNA, Россия) и суспендируют на вортексе. Помещают пробирки в портативный термостат (93°C) и, не вынимая, вносят в каждую по 100 мкл компонента 2 - связывающий буфер для лизиса, содержащий 4М гуанидинтиоцианата, 100 мМ Трис-НСl буфера (pH 7.4), 2 мМ этилендиаминтетраацетата (ЭДТА) (pH 8.0), 2% Triton X-100. Затем пробирки ресуспендируют на вортексе и снова помещают в портативный термостат (93°C). Далее каждую из пробирок поочередно помещают в магнитный штатив. С помощью дозатора из пробирок отбирают и отбрасывают светлую фазу (остатки парафина и детрит ткани), не задевая при этом осадка из магнитных частиц. Затем в каждый образец вносят по 200 мкл компонента 3 - отмывочный раствор, содержащий 70% Этанол, 20 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 2 мМ ЭДТА (pH 8.0), перемешивают на вортексе в течение 10-15 секунд. Помещают пробирки в магнитный штатив, после чего отбирают и отбрасывают прозрачную фазу, не задевая осадка из магнитных частиц. Пробирки с открытой крышкой подсушивают при 65°C 5-10 мин. В каждую пробирку вносят по 50 мкл компонента 4 - буфера для элюции, содержащего 10 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 1 мМ ЭДТА (pH 8.0), перемешивают 5-10 сек и осаждают магнитные частицы в магнитном штативе. Отбирают надосадочную жидкость, содержащую очищенную ДНК, в чистые промаркированные пробирки. Проводят ПЦР.

Для этого смешивают выделенную ДНК (1 мкл/образец) и детекционную смесь (25 мкл/образец), включающую 2,5 мкл Taq-буфера, 2,5 мкл DNTP, 16,5 мкл деионизованной воды, 0,5 мкл Taq-полимеразы, по 1 мкл праймеров CampF (5'-AGAACACGCGGACCTATATA-3') и CampR (5'-CGATGCATCCAGGTAATGTAT-3') - родоспецифичных праймеров, гомологичных родоспецифичному фрагменту 16S рРНК бактерий рода *Campylobacter* (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* и *Campylobacter upsaliensis*). На поверхность каждой реакционной смеси наслаивают 50 мкл минерального масла. Режим амплификации: денатурация (95°C, 1 мин), затем - 30 циклов амплификации

(денатурация ДНК (95°C, 30 сек), отжиг (60°C, 30 сек), элонгация (72°C, 30 сек).

После чего осуществляют детекцию продуктов амплификации горизонтальным электрофорезом в агарозном геле путем сравнения электрофоретической подвижности полученных ампликонов с подвижностью маркера молекулярных весов DNA Ladder Mix ("Fermentas", Литва). При наличии продукта амплификации, соответствующего размеру 256 пар нуклеотидов (п.н.), делают вывод о наличии в исследованных образцах ткани основных патогенных представителей *Campylobacter* spp. (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* и *Campylobacter upsaliensis*).

Набор для ПЦР-детекции *Campylobacter* spp. в образцах ткани, заключенных в парафин, содержит компонент 1: 10 мкл суспензии магнитных частиц («Sileks» MagNA, Россия)); компонент 2: связывающий буфер для лизиса, содержащий 4М Гуанидинтиоцианата, 100 мМ Трис-HCl буфера (pH 7.4), 2 мМ ЭДТА (pH 8.0), 2% Triton X-100; компонент 3: отмывочный раствор, содержащий 70% Этанол, 20 мМ NaCl, 10 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 2 мМ ЭДТА (pH 8.0), компонент 4: буфер для элюции, содержащий 10 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 1 мМ ЭДТА (pH 8.0); компонент 5: детекционная смесь, содержащая 2,5 мкл Taq-буфера, 2,5 мкл смеси нуклеотидов (dNTP), 16,5 мкл деионизованной воды, 0,5 мкл Taq-полимеразы, по 1 мкл праймеров CampF (5'-AGAACACGCGGACCTATATA-3') и CampR (5'-CGATGCATCCAGGTAATGTAT-3') и компонент 6: маркер молекулярных весов DNA Ladder Mix ("Fermentas", Литва).

Использование предлагаемой группы изобретений позволяет обнаруживать в ТПФ даже следы присутствия основных патогенных представителей рода *Campylobacter*.

Изобретение иллюстрируется следующими фигурами: на фиг. 1 представлена электрофореграмма результатов амплификации ДНК, выделенной из образца пациента М. с градиентом температур от 53°C до 60°C, на которой видно, что при температуре 60°C образовался продукт амплификации, соответствующий размеру 256 п.н.; на фиг. 2 - электрофореграмма результатов амплификации участка гена 16s РНК *Campylobacter* spp. 256 п.н.

Способ осуществляется следующим образом.

Для ПЦР-детекции *Campylobacter* spp. в образцах ткани, заключенных в парафин, реализуются следующие этапы: 1) подготовка срезов образцов ткани, заключенных в парафин, и депарафинизация 2) выделение ДНК; 3) приготовление реакционной смеси; 4) амплификация; 5) детекция результатов путем горизонтального электрофореза в агарозном геле.

1. Из блоков ТФП, изготовленных из биоптатов пораженных участков кишки, полученных в процессе колоноскопии у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, одноразовыми скальпелями готовят срезы толщиной 1-2 мм (по 4-6 срезов на 1 образец), помещают их в предварительно промаркированные пробирки типа эппендорф, которые инкубируют в портативном термостате при 93°C до полного расплавления парафина.

2. Не вынимая пробирок из термостата, в каждую пробу с анализируемым образцом быстро вносят 10 мкл компонента 1 из набора, суспендируют на вортексе. Помещают пробирки в портативный термостат (93°C) и, не вынимая, вносят в каждую по 100 мкл компонента 2 из набора. Затем пробирки ресуспендируют на вортексе и повторно инкубируют в портативном термостате (93°C). Далее каждую из пробирок поочередно помещают в магнитный штатив. С помощью дозатора из пробирок отбирают и отбрасывают светлую фазу (остатки парафина и тканевой детрит), не задевая при этом осадка. Затем в каждый образец вносят по 200 мкл компонента 3, перемешивают на вортексе в течение 10-15 секунд. Помещают пробирки в магнитный штатив, после чего

отбирают и отбрасывают прозрачную фазу, не задевая осадка. Пробирки с открытой крышкой подсушивают при 65°C 5-10 мин. В каждую пробирку вносят по 50 мкл компонента 4, перемешивают 5-10 сек и помещают в магнитный штатив. Отбирают надосадочную жидкость, содержащую очищенную ДНК, в чистые пробирки.

5 3. Приготовление реакционной смеси: отбирают необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб, маркируют. В каждую пробирку вносят 25 мкл компонента 5 из набора, затем - 3 мкл ДНК пробы, полученной после экстракции из клинического и/или контрольного образца; добавляют 1 каплю минерального масла.

10 4. Приготовленные пробы помещают в амплификатор МС-16 «Терцик» («ДНК-технология», Россия) или иной термоциклер. Режим амплификации: денатурация (95°C, 1 мин), затем - 30 циклов амплификации (денатурация ДНК (95°C, 30 сек), отжиг (60°C, 30 сек), элонгация (72°C, 30 сек)).

15 5. Детекцию результатов реакции осуществляют в горизонтальном электрофорезе в агарозном геле. Заранее готовят 1,7% агарозный гель. Полученные амплификаты в объеме 10 мкл смешивают с лидирующим красителем, вносят в лунки агарозного геля и подключают к источнику электрического тока. Электрофорез проводят в режиме 110 В в течение 40 мин. Результат реакции выявляют с помощью УФ-трансиллюминатора и фотографируют. Для контроля размеров ампликонов используют маркер
20 молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва). После окончания электрофореза гель окрашивают бромистым этидием и фотографируют на фотодокументационной системе Gel Camera System (UVP, Inc. США). Детекцию результатов осуществляют путем сравнения размеров исследуемого ДНК-образца с маркером молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва). Если размер
25 ожидаемого продукта составляет 256 п.н., то данные образцы регистрируются как содержащие ДНК *Campylobacter* spp. Напротив, в образцах, не содержащих ДНК *Campylobacter* spp. после проведения ПЦР продукт амплификации не определяется.

Сущность изобретения поясняется следующими примерами.

Пример №1.

30 Пациент М., 54 года. Диагноз: неспецифический язвенный колит в стадии обострения. Жалобы на стул с кровью, сильные боли в брюшной области, лихорадка, повышенная температура. Исследуемый материал: парфиновые блоки биоптатов толстого кишечника размером 1,5×1,0×0,5 см, №7.

35 Из ТПФ биоптата толстого кишечника размером 1,5×1,0×0,5 см, полученного из пораженных участков кишки в процессе колоноскопии, одноразовыми скальпелями приготовили 5 срезов толщиной 1-2 мм, поместили их в пробирки типа эппендорф, промаркировали и инкубировали при 93°C до полного расплавления парафина.

40 Не вынимая пробирок из термостата, в каждую пробу с анализируемым образцом быстро внесли 10 мкл компонента 1 из набора и суспендировали на вортексе. Не прекращая инкубации при 93°C внесли 100 мкл компонента 2 из набора.

Ресуспендировали на вортексе и инкубировали при 93°C. Пробирку поместили в штатив с магнитом. С помощью дозатора из пробирок отобрали и отбросили светлую фазу (остатки парафина и детрит ткани), не задевая при этом осадка из компонента 1. Затем в каждый образец внесли 200 мкл компонента 3, ресуспендировали на вортексе в течение
45 10-15 секунд. Поместили пробирку в штатив с магнитом, после чего отобрали и отбросили прозрачную фазу, не задевая осадка. Пробирку с открытой крышкой подсушили при 65°C 10 мин. Внесли в пробирку 50 мкл компонента 4, перемешали 10 сек и поместили в магнитный штатив. Отобрали надосадочную жидкость, содержащую

очищенную ДНК, в чистую пробирку. Далее внесли в пробирку сначала 25 мкл компонента 5 из набора, затем 3 мкл ДНК пробы и добавили 1 каплю минерального масла.

Приготовленные пробы разделили на 8 частей, каждую из которых амплифицировали в амплификаторе МС-16 «Терцик» («ДНК-технология», Россия), изменяя температуру отжига в градиенте от 53°C до 60°C для подбора оптимальной. Режим амплификации: денатурация (95°C, 1 мин), затем - 30 циклов амплификации (денатурация ДНК (95°C, 30 сек), отжиг (60°C, 30 сек), элонгация (72°C, 30 сек).

Детекцию результатов реакции осуществили в горизонтальном электрофорезе в 1,7% агарозном геле. Полученные амплификаты в количестве 10 мкл вносят в лунки агарозного геля и подключают к источнику электрического тока. Электрофорез проводят в режиме 110 V в течение 40 мин. Результат реакции выявляют с помощью УФ-трансиллюминатора и фотографируют. Для контроля качества электрофореза используют маркер молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва). После окончания электрофореза гель окрашивают бромистым этидием и фотографируют на фотодокументационной системе Gel Camera System (UVP, Inc. США). Детекцию результатов осуществляют путем сравнения размеров исследуемого ДНК-образца со маркер молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва).

Закключение. Температурный оптимум отжига для получения ожидаемого продукта составил 256 п.н. при 60°C (фиг. 1). Определяют наличие в исследованном образце ткани патогенных представителей рода *Campylobacter*. *C. jejuni* и/или *C. coli* и/или *Cupsaliensis*.

Пример №2.

Исследовали заключенные в парафиновые блоки биоптаты пораженных участков толстой кишки, полученные в процессе колоноскопии 9 пациентов с диагнозом «Неспецифический язвенный колит» (образцы №1-9) и 8 пациентов с клиническим диагнозом «Болезнь Крона» (образцы №10-17).

Из них одноразовыми скальпелями приготовили срезы толщиной 1-2 мм (по 4-6 срезов на 1 образец) и поместили их в пробирки типа эппендорф, промаркировали и инкубировали при 93°C до полного расплавления парафина.

Не вынимая пробирок из термостата, в каждую пробу с анализируемым образцом быстро внесли по 10 мкл компонента 1 из набора и суспендировали на вортексе. Поместили пробирки в портативный термостат (93°C) и, не вынимая, внесли в каждую по 100 мкл компонент 2 из набора. Затем пробирки ресуспендировали на вортексе и снова проинкубировали в портативном термостате (93°C). Далее каждую из пробирок поочередно поместили в штатив с магнитом. С помощью дозатора из пробирок отобрали и отбросили светлую фазу (остатки парафина и детрит ткани), не задевая при этом осадка. Затем в каждый образец внесли по 200 мкл компонента 3, перемешали на вортексе в течение 10-15 секунд. Поместили пробирки в штатив с магнитом, после чего отобрали и отбросили прозрачную фазу, не задевая осадка. Пробирки с открытой крышкой подсушили при 65°C 5-10 мин. В каждую пробирку внесли по 50 мкл компонента 4, перемешали 5-10 сек и поместили в магнитный штатив. Отобрали надосадочную жидкость, содержащую очищенную ДНК, в чистые пробирки.

Приготовление реакционной смеси: отобрали необходимое количество пробирок для амплификации ДНК исследуемых проб, промаркировали. В каждую пробирку внесли сначала по 25 мкл компонента 5 из набора, затем по 3 мкл ДНК исследуемых проб, полученных после экстракции из заключенных в парафин биоптатов; добавили по 1 капле минерального масла.

Приготовленные пробы поместили в амплификатор МС-16 «Терцик» («ДНК-

технология», Россия) или иной термоциклер. Режим амплификации: денатурация (95°C, 1 мин), затем - 30 циклов амплификации (денатурация ДНК (95°C, 30 сек), отжиг (60°C, 30 сек), элонгация (72°C, 30 сек).

5 Детекцию результатов реакции осуществили в горизонтальном электрофорезе в 1,7% агарозном геле. Полученные амплификаты в количестве по 10 мкл внесли в лунки агарозного геля и подключили к источнику электрического тока. Электрофорез проводили в режиме 110 V в течение 40 мин. Для контроля размеров ампликонов использовали маркер молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва). Результат реакции были учтены с помощью УФ-трансиллюминатора и
10 сфотографированы. Детекцию результатов осуществляли путем сравнения размеров исследуемого ДНК-образца со маркер молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва). Если размер ожидаемого продукта составляет 256 п.н., то данные образцы регистрировали, как содержащие ДНК *Campylobacter* spp. Напротив, в образцах, не содержащих ДНК *Campylobacter* spp. после проведения ПЦР продукт амплификации
15 не определялся.

В результате проведенных исследований в полученных путем колоноскопии и заключенных в парафин биоптатах 9 пациентов с диагнозом «Неспецифический язвенный колит» (образцы №1-9) в образцах №1, 3-9 обнаружена ДНК *Campylobacter* spp. Образец №2 - отрицательный. В заключенных в парафин биоптатах 8 пациентов с клиническим
20 диагнозом «Болезнь Крона» (образцы №10-17) в образцах 11-17 обнаружена ДНК *Campylobacter* spp. Образец №10 - отрицательный (фиг. 2).

(57) Формула изобретения

1. Способ обнаружения бактерий рода *Campylobacter* у больных с воспалительными
25 заболеваниями кишечника, включающий выделение ДНК из биологического образца, предположительно содержащего патоген, проведение ПЦР в присутствии специфичных праймеров, амплификацию, отличающийся тем, что в качестве биологического образца используют заключенные в парафин образцы ткани кишки больных с воспалительными
30 заболеваниями кишечника, из них готовят 4-6 срезов толщиной 1-2, проводят депарафинизацию срезов, затем лизис, для чего добавляют магнитные частицы и связывающий буфер для лизиса, содержащий 4М гуанидинтиоцианата, 100 мМ Трис-НCl буфера, 2 мМ этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), 2% Triton X-100, после чего проводят спиртовое осаждение и элюцию выделенной ДНК, для этого добавляют отмывочный раствор, содержащий 70% этанол, 20 мМ NaCl, 10 мМ Tris-НCl, 2 мМ
35 ЭДТА, после высушивания добавляют по 50 мкл буфера для элюции, содержащего 10 мМ Tris-НCl, 1 мМ ЭДТА, ПЦР проводят с использованием праймеров CampF (5'-AGAACACGCGGACCTATATA-3') и CampR

(5'-CGATGCATCCAGGTAATGTAT-3'), для детекции продукта амплификации
40 проводят электрофорез в агарозном геле, и при наличии продукта амплификации размером 256 пар нуклеотидов определяют наличие в исследованном образце ткани патогенных представителей рода *Campylobacter*: *C. jejuni* и/или *C. coli* и/или *C. upsaliensis*.

2. Набор для обнаружения бактерий рода *Campylobacter* у больных с воспалительными заболеваниями кишечника, включающий связывающий буфер для лизиса, содержащий
45 гуанидинтиоцианат, Трис-НCl буфер и ЭДТА, буфер для элюции, содержащий Трис-НCl, а также реакционную смесь, содержащую Taq-полимеразу, воду, смесь нуклеотидов и праймеры, отличающийся тем, что дополнительно содержит 10 мкл суспензии магнитных частиц, отмывочный раствор, содержащий 70% этанол, 20 мМ NaCl, 10 мМ

Tris-HCl (pH 7.4), 2 mM ЭДТА (pH 8.0), маркер молекулярных весов DNA Ladder Mix, при этом связывающий буфер для лизиса содержит 4М гуанидинтиоцианата, 100 mM Трис-HCl буфера (pH 7.4), 2 mM ЭДТА (pH 8.0), 2% Triton X-100, буфер для элюции содержит 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM ЭДТА (pH 8.0), а реакционная смесь содержит 2,5 мкл Taq-буфера, 2,5 мкл смеси нуклеотидов, 16,5 мкл деионизованной воды, 0,5 мкл Taq-полимеразы, по 1 мкл праймеров CampF (5' - AGAACACGCGGACCTATATA-3') и CampR (5' - CGATGCATCCAGGTAATGTAT-3').

10

15

20

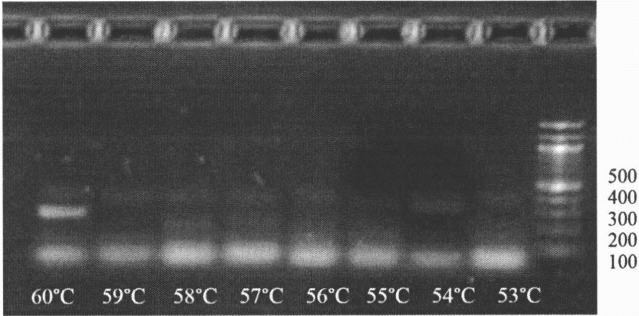
25

30

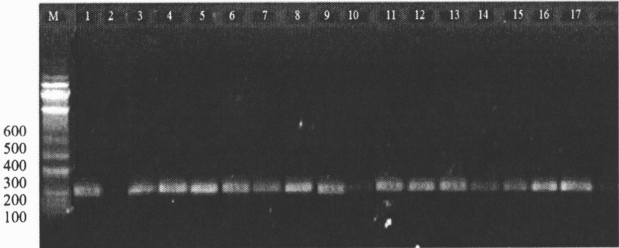
35

40

45



Фиг. 1



Фиг. 2