

Федеральная служба по интеллектуальной
собственности

Федеральное государственное бюджетное
учреждение



"Федеральный институт
промышленной собственности"
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993

Телефон (499) 240-60-15. Факс (495) 531-63-18

ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н.
Блохиной Роспотребнадзора, ОНПИАР
ул. Малая Ямская, 71
г. Нижний Новгород
603950

Исх. № 6/23-17-6713 от 03.02.23

пат. № 2789353 (заявка № 2022102701/10)

Направляю Вам патент No **2789353** на изобретение.

Запись о регистрации патента внесена в Государственный реестр изобретений
Российской Федерации 01.02.23.

Начальник
отдела 17

Г.К. Горячев

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2789353

Способ детекции генотипов 1 и 2 вируса Эпштейна-Барр

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

Авторы: *Уткин Олег Владимирович (RU), Попкова Мария Игоревна (RU), Сенатская Анна Олеговна (RU), Брызгалова Дарья Алексеевна (RU), Сахарнов Николай Александрович (RU)*

Заявка № 2022102701

Приоритет изобретения 03 февраля 2022 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 01 февраля 2023 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 03 февраля 2042 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
C12Q 1/686 (2022.08)

(21)(22) Заявка: 2022102701, 03.02.2022

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
03.02.2022

Дата регистрации:
01.02.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 03.02.2022

(45) Опубликовано: 01.02.2023 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

603950, г. Нижний Новгород, ул. Малая
Ямская, 71, ФБУН ННИИЭМ им. академика
И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, ОНПИАР

(72) Автор(ы):

Уткин Олег Владимирович (RU),
Попкова Мария Игоревна (RU),
Сенатская Анна Олеговна (RU),
Брызгалова Дарья Алексеевна (RU),
Сахарнов Николай Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

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

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: SMATTI M.K., YASSINE H.M., ABU
ODEH R., AL MARAWANI A., TALEB S.A.,
ALTHANI A.A., NASRALLAH G.K. Prevalence
and molecular profiling of Epstein Barr virus
(EBV) among healthy blood donors from
different nationalities in Qatar // PLoS One.
Vol.12, N 12, 2017. ПРОХОРОВА НАТАЛЬЯ
АЛЕКСАНДРОВНА Автореф. диссертации
на соискание учёной степени кандидата (см.
прод.)

(54) Способ детекции генотипов 1 и 2 вируса Эпштейна-Барр

(57) Реферат:

Изобретение относится к области клинической лабораторной диагностики вирусных инфекций и может быть использовано для генотипирования вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ). Способ может быть применен для исследований популяционной характеристики ВЭБ и клинико-эпидемиологических особенностей ассоциированных с ним заболеваний человека. Для генотипирования вируса ВЭБ ПЦР с электрофоретической визуализацией продуктов амплификации в агарозном геле проводят в один раунд по единому протоколу амплификации с соблюдением следующих режимов: инициация

95°C - 1 мин 30 сек, 45 циклов: 95°C - 30 сек, 59°C - 40 сек, 72°C - 1 мин 30 сек, финальная элонгация 72°C - 8 мин. При этом используют специфические пары праймеров: Ap1 (5'-TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA-3') и Ap2 (5'-ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C-3'), амплифицирующие фрагмент 497 п.н., Bp1 (5'-CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA-3') и Bp2 (5'-AGA CTT AGT TGA TGC CCT AG-3'), амплифицирующие фрагмент 150 п.н., детектирующие ВЭБ-1 и ВЭБ-2, соответственно. Осуществление способа позволяет сократить время, упростить процедуру анализа, уменьшить расход реактивов. 1 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

медицинских наук. Диагностические возможности ПЦР в верификации диагноза инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна-Барр. - Москва, 30.09.2008. RU 2678041 C1, 22.01.2019.

RU 2789353 C1

RU 2789353 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12Q 1/686 (2022.08)

(21)(22) Application: **2022102701, 03.02.2022**

(24) Effective date for property rights:
03.02.2022

Registration date:
01.02.2023

Priority:

(22) Date of filing: **03.02.2022**

(45) Date of publication: **01.02.2023** Bull. № 4

Mail address:

**603950, g. Nizhnij Novgorod, ul. Malaya
Yamskaya, 71, FBUN NNIEM im. akademika
I.N. Blokhinoj Rospotrebnadzora, ONPIAR**

(72) Inventor(s):

**Utkin Oleg Vladimirovich (RU),
Popkova Mariya Igorevna (RU),
Senatskaya Anna Olegovna (RU),
Bryzgalova Darya Alekseevna (RU),
Sakharnov Nikolaj Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe byudzhethnoe uchrezhdenie nauki
"Nizhegorodskij nauchno-issledovatel'skij institut
epidemiologii i mikrobiologii im. akademika
I.N. Blokhinoj" Federalnoj sluzhby po nadzoru
v sfere zashchity prav potrebitel'j i
blagopoluchiya cheloveka (RU)**

(54) **METHOD FOR DETECTION OF GENOTYPES 1 AND 2 OF EPSTEIN-BARR VIRUS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of clinical laboratory diagnostics of viral infections and can be used for genotyping the Epstein-Barr virus (EBV). The method can be used to study the population characteristics of EBV and the clinical and epidemiological features of human diseases associated with it. For the genotyping of the EBV virus, PCR with electrophoretic visualization of amplification products in agarose gel is carried out in one round according to a single amplification protocol in compliance with the following modes: initiation 95°C 1 min 30 sec, 45 cycles: 95°C 30 sec, 59°C 40 sec, 72°C 1 min 30 sec,

final elongation 72°C 8 min. In this case, specific pairs of primers are used: Ap1 (5'-TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA-3') и Ap2 (5'-ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C-3'), amplifying a fragment of 497 bp, Bp1 (5'-CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA-3') and Bp2 (5'-AGA CTT AGT TGA TGC CCT AG-3'), amplifying a fragment of 150 bp, detecting EBV-1 and EBV-2, respectively.

EFFECT: implementation of the method reduces the time, simplifies the analysis procedure, and reduces the consumption of reagents.

1 cl, 1 dwg, 1 ex

Изобретение относится к области клинической лабораторной диагностики вирусных инфекций, касается способа генотипирования вирусов методом ПЦР с электрофоретической визуализацией продуктов амплификации в агарозном геле и может быть использовано для генотипирования вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) при изучении его популяционной характеристики и клинико-эпидемиологических особенностей, ассоциированных с ним заболеваний человека.

ВЭБ впервые описан в 1964 году, когда М. Epstein и Y. Barr визуализировали вирусные частицы в ходе электронной микроскопии клеток культуры лимфомы Беркитта [Epstein M.A., Achong B.G., Barr Y.M. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma // *Lancet* (London, England). - 1964. - Vol. 1, №7335. - P. 702-703.]. В последующий период была установлена повсеместная распространенность этого вируса (серопревалентность в разных странах мира превышает 90% взрослого населения) [Шарипова Е.В., Бабаченко И.В. Герпес-вирусные инфекции и инфекционный мононуклеоз (обзор литературы) // *Журнал инфектологии*. - 2013. - Т. 5, №2. - С. 5-12.]. В настоящее время ВЭБ занимает основное место в этиологической структуре заболеваемости инфекционным мононуклеозом (ИМ), составляя 76,6% случаев, постоянно расширяется спектр ВЭБ-ассоциированных заболеваний [Демина О.И., Тихомиров Д.С., Чеботарева Т.А., Мазанкова Л.Н., Туполева Т.А. Клиническая значимость вирусологических методов верификации этиологии инфекционного мононуклеоза // *Детские инфекции*. - 2020. - Т. 19, №2. - С. 29-37.]. ВЭБ привлекает особое внимание специалистов в связи с высоким онкогенным потенциалом, и, согласно классификации Международного агентства по изучению рака (IARC), относится к 1-ой группе канцерогенов [Khan G., Fitzmaurice C., Naghavi M., Ahmed L.A. Global and regional incidence, mortality and disability-adjusted life-years for Epstein-Barr virus-attributable malignancies, 1990-2017 // *BMJ Open*. - 2020. - Vol. 10, №8: e037505]. Кроме того, уровень заболеваемости отдельными нозологическими формами резко различается в некоторых географических регионах мира: высокая заболеваемость раком носоглотки регистрируется среди жителей Южного Китая, лимфомой Беркитта в Африке к югу от Сахары, а ИМ в западных странах [Tzellos S., Farrell P.J. Epstein-Barr virus sequence variation-biology and disease // *Pathogens*. - 2012. - Vol. 1, №2. - P. 156-174.]. В России встречаются различные типы ВЭБ-ассоциированных патологий, но они не носят эпидемического характера [Гончарова Е.В., Сенюта Н.Б., Смирнова К.В., Щербак Л.Н., Гурцевич В.Э. Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ) в России: инфицированность населения и анализ вариантов гена LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированными патологиями и здоровых лиц // *Вопросы вирусологии*. - 2015. - Vol. 60, №2. - P. 11-17.]. Остается малоизученным вопрос, какую роль при этом может играть генетическая вариабельность ВЭБ, продолжается поиск ассоциации между геновариантами вируса и определенными заболеваниями человека [Jenkins P.J., Farrell P.J. Are particular Epstein-Barr virus strains linked to disease? // *Semin. Cancer Biol.* - 1996. - Vol. 7. - P. 209-215.].

Согласно современной таксономии вирусов, ВЭБ относится к семейству Herpesviridae, подсемейству Gammaherpesvirinae, роду Lymphocryptoviruses, виду Human gammaherpesvirus 4 [Adams M.J., Lefkowitz E.J., King A.M., Harrach B., Harrison R.L., Knowles N.J., Kropinski A.M., Krupovic M., Kuhn J.H., Mushegian A.R., Nibert M., Sabanadzovic S., Sanfaçon H., Siddell S.G., Simmonds P., Varsani A., Zerbini F.M., Gorbalenya A.E., Davison A.J. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016) // *Arch. Virol.* - 2016. - Vol. 161, №10. - P. 2921-2949.]. Геном ВЭБ представлен двунитевой ДНК размером около 172 т.п.н. Хотя общее сходство нуклеотидных последовательностей между штаммами вируса варьирует от 97,45% до 99,74%, в

определенных генах или их отдельных участках были выявлены существенные различия [Zhou L., Chen J.-N., Qiu X.-M., Pan Y.-H., Zhang Z.-G., Shao C.-K. Comparative analysis of 22 Epstein-Barr virus genomes from diseased and healthy individuals // J. Gen. Virol. - 2017. - Vol. 98, №1. - P. 96-107.]. Базовой характеристикой генетического разнообразия ВЭБ является его классификация на два основных типа - тип 1 (ВЭБ-1) и тип 2 (ВЭБ-2) (также известные как типы А и В соответственно). Проведенные исследования показали, что различия между изолятами ВЭБ-1 и ВЭБ-2 четко прослеживаются для генов ядерного антигена вируса, главным образом, EBNA-2, в меньшей степени - EBNA-3. Идентичность между двумя типами вируса по нуклеотидным и аминокислотным последовательностям в гене EBNA-2 составляет 70% и 54%, в генах EBNA-3A, -3B, -3C - 90% и 84%, 88% и 80%, 81% и 72% соответственно [Dambaugh T., Hennessy K., Chamnankit L., Kieff E. U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1984. - Vol. 81. - P. 7632-7636; Sample J., Young L., Martin B., Chatman T., Kieff E., Rickinson A. et al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA3B, and EBNA-3C genes // J. Virol. - 1990. - Vol. 64. - P. 4084-4092.; Tzellos S., Farrell P.J. Epstein-Barr virus sequence variation-biology and disease // Pathogens. -2012. - Vol. 1, №2. - P. 156-174; Palser A.L., Grayson N.E., White R.E., Corton C, Correia S., Ba Abdullah M.M., Watson S.J., Cotten M., Arrand J.R., Murray P.G., Allday M.J., Rickinson A.B., Young L.S., Farrell P.J., Kellam P. Genome diversity of Epstein-Barr virus from multiple tumor types and normal infection // J. Virol. - 2015. - Vol. 89, №10. - P. 5222-5237.].

Основное фенотипическое различие между двумя типами вируса заключается в том, что ВЭБ-1 трансформирует В-лимфоциты человека в лимфобластоидную клеточную линию более эффективно, чем ВЭБ-2 [Rickinson A.B., Young L.S., Rowe M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells // J. Virol. - 1987. - Vol. 61, №5. - P. 1310-1317.]. Недавние исследования показали, что в отличие от ВЭБ-1, ВЭБ-2 преимущественно инфицирует первичные Т-клетки как в культуре, так и *in vivo*, что приводит к активации и пролиферации Т-клеток, а также к изменению профиля экспрессии цитокинов [Coleman C.B., Wohlford E.M., Smith N.A., King C.A., Ritchie J.A., Baresel P.C., Kimura H., Rochford R. Epstein-Barr virus type 2 latently infects T cells, inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines // J. Virol. - 2015. - Vol. 89, №4. - P. 2301-2312.; Coleman C.B., Daud I.I., Ogolla S.O., Ritchie J.A., Smith N.A., Sumba P.O., Dent A.E., Rochford R. Epstein-Barr virus type 2 infects T cells in healthy Kenyan children // J. Infect. Dis. - 2017. - Vol. 216, №6. - P. 670-677.].

Оба типа ВЭБ встречаются повсеместно, но их распределение имеет географические особенности. ВЭБ-1 является основным типом, распространенным во всем мире, преобладает в популяции жителей Европы, Америки, Китая и Южной Азии, в то время как ВЭБ-2 менее распространен на этих территориях и чаще встречается в регионе Африки к югу от Сахары и Папуа-Новой Гвинеи. Небольшой процент представителей европеоидной расы инфицированы ВЭБ-2 [Smatti M.K., Al-Sadeq D.W., Ali N.H., Pintus G., Abou-Saleh H., Nasrallah G.K. Epstein-Barr virus epidemiology, serology, and genetic variability of LMP-1 oncogene among healthy population: an update // Front. Oncol. - 2018. - Vol.8. - P. 211.; Correia S., Palser A., Elgueta Karstegl C, Middeldorp J.M., Ramayanti O., Cohen J.L., Hildesheim A., Fellner M.D., Wiels J., White R.E., Kellam P., Farrell P.J. Natural variation of Epstein-Barr virus genes, proteins, and primary MicroRNA // J. Virol. - 2017. - Vol. 91, №15: e00375-17.]. Отличия отмечаются также среди отдельных социальных групп. Например, в когорте гомосексуальных мужчин в западных странах по сравнению с общей популяцией наблюдается более высокая частота инфицирования ВЭБ-2, в частности, в группах ВИЧ-инфицированных индивидов. Предполагается, что инфицирование

ВЭБ-2 может происходить в условиях хронической иммунной активации, например, в тех частях Африки, где много сопутствующих инфекций, включая малярию, или у иммунокомпрометированных лиц [van Baarle D., Hovenkamp E., Dukers N.H., Renwick N., Kersten M.J., Goudsmit J. et al. High prevalence of Epstein-Barr virus type 2 among homosexual men is caused by sexual transmission // *J. Infect. Dis.* - 2000. - Vol. 181. - P. 2045-2049.; Traore L., Nikiema O., Ouattara A.K., Compaore T.R., Soubeiga S.T., Diarra B., Obiri-Yeboah D., Sorgho P.A., Djigma F.W., Bisseye C., Yonli A.T., Simpore J. EBV and HHV-6 circulating subtypes in people living with HIV in Burkina Faso, impact on CD4 T cell count and HIV viral load // *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* - 2017. - Vol. 9, №1: e2017049; Smith N.A., Baresel P.C., Jackson C.L., Ogolla S., Toko E.N., Heit S., Piriou E., Sumba O.P., Middeldorp J.M., Colborn K.L., Rochford R. Differences in the Epstein-Barr virus gp350 IgA antibody response are associated with increased risk for coinfection with a second strain of Epstein-Barr virus // *J. Infect. Dis.* - 2019. - Vol. 219, №6. - P. 955-963.]. В России только начинают появляться первые данные относительно распространенности основных типов ВЭБ [Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Лубенская А.К., Душенькина Т.Е., Гурцевич В.Э. Древние варианты вируса Эпштейна-Барр (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): гипотезы и факты // *Вопросы вирусологии.* - 2020. - Т. 65, №2. - С. 77-86.].

Многие исследовательские группы используют классификацию ВЭБ, основанную на выделении двух основных генотипов (ВЭБ-1 и ВЭБ-2). Вместе с тем, доказательств о связи генотипов с развитием различных заболеваний недостаточно. В некоторых исследованиях ВЭБ-1 чаще идентифицируется при ИМ по сравнению с ВЭБ-2, при этом особенности клинических проявлений и варианты его течения при инфицировании разными штаммами вируса остаются малоизученным вопросом [Лядова Т.И. Генотипы вируса Эпштейна-Барр у пациентов с различными формами инфекции // *Проблемы безперервної медичної освіти та науки.* - 2017. - №4. - С.60-65.; Monteiro T.A.F, Costa I.B., Costa I.B., Correa T.L.D.S., Coelho B.M.R., Silva A.E.S., Ramos F.L.P., Filho A.J.M., Monteiro J.L.F., Siqueira J.A.M., Gabbay Y.B., Sousa R.C.M. Genotypes of Epstein-Barr vims (EBV1/EBV2) in individuals with infectious mononucleosis in the metropolitan area of Belem, Brazil, between 2005 and 2016 // *Braz. J. Infect. Dis.* - 2020. - Vol. 24, №4. - P. 322-329.].

Для дифференциальной детекции ВЭБ-1 и ВЭБ-2 исследователи применяют лабораторные протоколы преимущественно на основе качественной двухраундовой «гнездовой» полимеразной цепной реакции (ПНР). В основе метода лежит анализ гипервариабельных генов вируса или их участков. Наиболее часто в качестве ДНК-мишени для генотипирования ВЭБ используется ген EBNA-2 [Mendes T.M., Oliveira L.C., Yamamoto L., Del Negro G.M., Okay T.S. Epstein-Barr virus nuclear antigen-2 detection and typing in immunocompromised children correlated with lymphoproliferative disorder biopsy findings // *The Brazilian Journal of Infectious Diseases.* - 2008. - Vol. 12, №3. - P. 186-191.; Smatti M.K., Yassine H.M., Abu Odeh R., Al Marawani A., Taleb S.A., Althani A.A., Nasrallah G.K. Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar // *PLoS One.* - 2017. - Vol. 12, №12: e0189033.; Parra B., Slots J. Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction // *Oral. Microbiol. Immunol.* - 1996. - Vol. 11, №5. - P. 289-293.; Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Лубенская А.К., Душенькина Т.Е., Гурцевич В.Э. Древние варианты вируса Эпштейна-Барр (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): гипотезы и факты // *Вопросы вирусологии.* - 2020. - Т. 65, №2. - С. 77-86.].

В качестве ближайшего аналога рассматривается способ генотипирования ВЭБ методом двухраундовой «гнездовой» ПЦР с последующей электрофоретической детекцией продуктов амплификации гена EBNA-2 в агарозном геле [Smatti M.K., Yassine

Н.М., Abu Odeh R., Al Marawani A., Taleb S.A., Althani A.A., Nasrallah G.K. Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar // PLoS One. - 2017. - Vol.12, №12: e0189033.]. В первом раунде используют внешнюю пару праймеров E2p1 (5'-AGG GAT GCCT GGA CAC AAG A-3') и E2p2 (5'-TGG TGC TGC TGG TGG TGG CAA T-3') и амплифицируют фрагмент гена EBNA-2 размером 596 п.н. Условия амплификации для первого раунда: инициация 95°C - 15 мин, 40 циклов (95°C - 5 мин, 58°C - 1 мин, 72°C - 1 мин.), финальная элонгация 72°C - 10 мин. Второй раунд ПЦР проводят для каждой пробы в двух отдельных пробирках с использованием специфических пар праймеров Ap1 (5'-TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA-3'), Ap2 (5'-ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C-3'), амплифицирующих фрагмент 497 п.н., и Bp1 (5'-CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA-3'), Bp2 (5'-AGA CTT AGT TGA TGC CCT AG-3'), амплифицирующих фрагмент 150 п.н., которые детектируют ВЭБ-1 и ВЭБ-2 соответственно. Для второго раунда ПЦР используют те же условия амплификации, за исключением температуры отжига: 63°C для праймеров Ap1 и Ap2 и 53°C для праймеров Bp1 и Bp2. Объем реакционной смеси составляет 50 мкл на реакцию.

Недостатками метода являются проведение ПЦР в два раунда, продолжительность протокола амплификации суммарно не менее 10 часов 10 минут, разные условия амплификации для ВЭБ-1 и ВЭБ-2 и необходимость работы с ампликонами в качестве матрицы во втором раунде, что приводит к значительным затратам труда, времени и средств на выполнение анализа.

Задачей, на решение которой направлено изобретение, является разработка способа детекции генотипов 1 и 2 вируса Эпштейна-Барр методом однораундовой ПЦР с электрофоретической визуализацией продуктов амплификации в агарозном геле.

Технический результат, достигаемый при реализации заявленного изобретения, заключается в упрощении способа генотипирования ВЭБ путем сокращения времени постановки реакции и снижения расходов реактивов на проведение дифференциальной детекции генотипов 1 и 2 вируса Эпштейна-Барр.

Способ осуществляется следующим образом.

ПЦР проводят в один раунд по единому протоколу амплификации с соблюдением следующих режимов: инициация 95°C - 1 мин 30 сек, 45 циклов: 95°C - 30 сек, 59°C - 40 сек, 72°C - 1 мин 30 сек, финальная элонгация 72°C - 8 мин, при этом используют специфические пары праймеров: Ap1 (5'-TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA-3') и Ap2 (5'-ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C-3'), амплифицирующие фрагмент 497 п.н., Bp1 (5'-CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA-3') и Bp2 (5'-AGA CTT AGT TGA TGC CCT AG-3'), амплифицирующие фрагмент 150 п.н., детектирующие ВЭБ-1 и ВЭБ-2, соответственно.

Сущность заявленного изобретения поясняется чертежом, где:

на Фиг. 1 изображено сравнение результатов двухраундового и однораундового вариантов ПЦР для детекции ВЭБ-1 и ВЭБ-2: А) первый раунд «гнездовой» ПЦР: 1 - ВЭБ(+) (596 п.н., проба 1), 2 - ВЭБ(+) (596 п.н., проба 2); Б) второй раунд «гнездовой» ПЦР: 1 - ВЭБ-1(+) (497 п.н., проба 1), 2 - ВЭБ-2(-) (проба 1), 3 - ДНК ВЭБ-1(-) (проба 2), 4 - ВЭБ-2(+) (150 п.н., проба 2); В) оптимизированная однораундовая ПЦР: 1 - ВЭБ-1(+) (497 п.н., проба 1), 2 - ВЭБ-2(-) (проба 1), 3 - ДНК ВЭБ-1(-) (проба 2), 4 - ВЭБ-2(+) (150 п.н., проба 2). М - маркер длин фрагментов. К-, К₁-, К₂- - отрицательный контроль.

Сущность способа поясняется примерами.

Пример 1. Осуществление способа

Подготовительный этап.

Выделение ДНК ВЭБ из образцов биологического материала проводили согласно инструкции, прилагаемой к используемому набору для экстракции ДНК.

Ход анализа.

Раздельную идентификацию ВЭБ-1 и ВЭБ-2 методом ПЦР проводили в один раунд.

5 При этом использовали специфические пары праймеров, которые исходно (по прототипу) предназначались для второго раунда ПЦР: Ap1 (5'-TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA-3') и Ap2 (5'- ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C-3'), амплифицирующие фрагмент 497 п.н., Bp1 (5'-CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA-3') и Bp2 (5'-AGA CTT AGT TGA TGC CCT AG-3'), амплифицирующие фрагмент 150 п.н.,
10 детектирующие ВЭБ-1 и ВЭБ-2, соответственно. ПЦР проводили в разных пробирках для ВЭБ-1 и ВЭБ-2. Состав реакционной смеси общим объемом 25 мкл на реакцию включал: праймеры (5 пМ в реакцию), 5-кратный Taq Red буфер 12,5 мМ Mg²⁺, 5 е.а. HS Taq ДНК-полимеразы, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов до конечной концентрации 0,1 мМ; деионизированную воду I типа. В качестве матрицы использовали
15 выделенную ДНК в объеме 5 мкл на реакцию. Для дифференциации ВЭБ-1 и ВЭБ-2 применяли оптимизированный единый лабораторный протокол амплификации. Условия амплификации: инициация 95°C - 1 мин 30 сек, 45 циклов (95°C - 30 сек, 59°C - 40 сек, 72°C - 1 мин 30 сек), финальная элонгация 72°C - 8 мин. Продукты ПЦР амплификации визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в агарозном геле,
20 содержащем бромид этидия. Результаты детектировали на трансиллюминаторе с использованием программного обеспечения к нему.

Оценка результатов.

По результатам электрофореза в агарозном геле продуктов амплификации специфические фрагменты размером 497 п.н. (при использовании праймеров Ap1/Ap2)
25 соответствуют ВЭБ-1, а 150 п.н. (при использовании праймеров Bp1/Bp2) - ВЭБ-2. В качестве стандарта для определения длины двуцепочечных молекул ДНК применяли маркер длин ДНК. Полученные данные выражали в качественном формате - обнаружено или не обнаружено. другой - ВЭБ-2. При этом для ВЭБ-2 наблюдалось множество неспецифических фрагментов разных размеров. Заявленный вариант ПЦР,
30 ориентированный на детекцию ВЭБ-1 и ВЭБ-2, отличался проведением амплификации в один раунд по единому протоколу амплификации для ВЭБ-1 и ВЭБ-2 с использованием праймеров, которые исходно использовались во втором раунде ПЦР. В результате однораундовый вариант ПЦР позволил получить сопоставимые результаты для достоверной идентификации ВЭБ-1 и ВЭБ-2, что подтвердило осуществимость способа.
35

Проведенные исследования показали, что заявленный способ позволяет сократить время, упростить процедуру анализа, уменьшить расход реактивов. Способ может быть применен для исследований популяционной характеристики ВЭБ и клинико-эпидемиологических особенностей ассоциированных с ним заболеваний человека.

Перечень последовательностей

40 <110> Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ННИИЭМ им. Академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора)
45 <120> Способ детекции генотипов 1 и 2 вируса Эпштейна-Барр
<140> 2022102701/10 (005769)
<141> 03.02.2022
<160> 4

<210> 1
 <211> 24
 <212> одноцепочечная линейная ДНК
 <213> искусственная
 5 <223> праймер прямой, комплементарный генотипу 1 вируса Эпштейна-Барр
 <400> TCTTGATAGGGATCCGCTAGGATA
 <210> 2
 <211> 25
 <212> одноцепочечная линейная ДНК
 10 <213> искусственная
 <223> праймер обратный, комплементарный генотипу 1 вируса Эпштейна-Барр
 <400> ACCGTGGTCTGGACATCTGGATC
 <210> 3
 <211> 20
 15 <212> одноцепочечная линейная ДНК
 <213> искусственная
 <223> праймер прямой, комплементарный генотипу 2 вируса Эпштейна-Барр
 <400> CATGGTAGCCTTAGGACATA
 <210> 4
 20 <211> 20
 <212> одноцепочечная линейная ДНК
 <213> искусственная
 <223> праймер обратный, комплементарный генотипу 2 вируса Эпштейна-Барр
 <400> AGACTTAGTTGATGCCCTAG

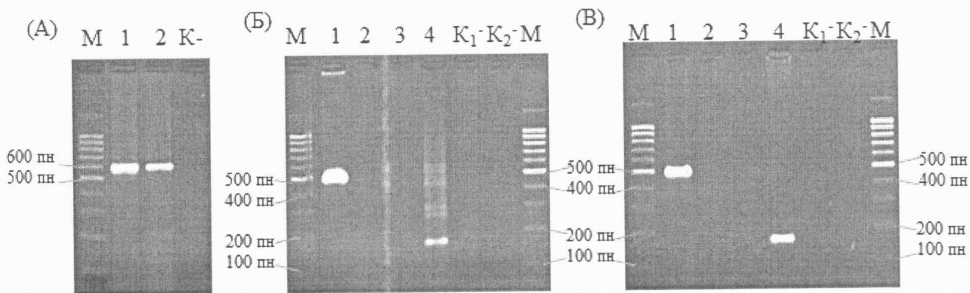
25

(57) Формула изобретения

Способ детекции генотипов 1 и 2 вируса Эпштейна-Барр, включающий проведение ПЦР с электрофоретической визуализацией продуктов амплификации в агарозном геле, отличающийся тем, что ПЦР проводят в один раунд по единому протоколу
 30 амплификации с соблюдением следующих режимов: инициация 95°C - 1 мин 30 сек, 45 циклов: 95°C - 30 сек, 59°C - 40 сек, 72°C - 1 мин 30 сек, финальная элонгация 72°C - 8 мин, при этом используют специфические пары праймеров: Ap1 5'-TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA-3' и Ap2 5'-ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C-3', амплифицирующие фрагмент 497 п.н., Bp1 5'-CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA-3' и
 35 Bp2 5'-AGA CTT AGT TGA TGC CCT AG-3', амплифицирующие фрагмент 150 п.н., детектирующие ВЭБ-1 и ВЭБ-2, соответственно.

40

45



Фиг.1