

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **234898**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **417948**

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6888 (2018.01)

(22) Data zgłoszenia: **13.07.2016**

(54) **Sekwencje oligonukleotydów oraz ich zastosowanie, sposób wykrywania
obecności DNA pasożyta we krwi oraz zestaw**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
15.01.2018 BUP 02/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.04.2020 WUP 04/20

(73) Uprawniony z patentu:

**ZAWISTOWSKA-DENIZIAK ANNA,
Legionowo, PL
INSTYTUT PARAZYTOLOGII
IM. WITOLDA STEFAŃSKIEGO POLSKIEJ
AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANNA ZAWISTOWSKA-DENIZIAK,
Legionowo, PL
DANIEL MŁOCICKI, Warszawa, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Piotr Godlewski

PL 234898 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są sekwencje oligonukleotydów scharakteryzowane jako SEQ. ID No. 1 do SEQ. ID No. 8, sposób wykrywania obecności pasożyta we krwi, zestaw do wykrywania obecności DNA *Trichinella* spp. oraz zastosowanie opisanych powyżej oligonukleotydów do produkcji zestawu.

Choroby zakaźne są jednym z najbardziej istotnych i narastających zagrożeń zdrowia publicznego. Zaliczane do nich zoonozy pasożytnicze występują powszechnie u ludzi. Zarażenie ludzi następuje na skutek kontaktu ludzi z zanieczyszczoną żywnością, wodą lub glebą. Chociaż dokładne dane dotyczące liczby zarażonych osób nie są dostępne, szacuje się że najczęstszymi zoonozami pasożytniczymi są toksoplazmoza, echinokokoza, *trichinelloza* i schistosomatoza.

Włośnię (*Trichinella*) to rodzaj robaków obłych z gromady *Nematoda* o pasożytniczym sposobie życia. Pośrednimi i ostatecznymi gospodarzami są ssaki, ptaki, płazy, gady, ryby i ludzie. Głównymi nosicielami przenoszącymi je na ludzi są zwierzęta, których mięso jest zakażone włośniami albo surowe mięso tych zwierząt bądź też mięso niedostatecznie ugotowane, w szczególności świń, koni i zwierząt łownych. Włośnię można zniszczyć poprzez gotowanie oraz bardzo niskie temperatury. Włośnię występują jako różne gatunki na całym świecie. Istnieje osiem gatunków, a najważniejszymi występującymi w Europie są *Trichinella spiralis*, *Trichinella britovi*, *Trichinella pseudospiralis* i *Trichinella nativa*.

Pasożytniczy nicien *Trichinella* spp. jest zdolny do zakażenia wielu gatunków, między innymi ludzi, świń, szczurów, dzików, niedźwiedzi, koni i ptaków. W krajach Europy Zachodniej, włośnię występują przede wszystkim w „cyklu zwierząt dzikich”, gdzie lisy i gryzonie roznoszą robaki poprzez zjadanie zakażonych zwierząt. W regionach północnych, również niedźwiedzie, psy pociągowe i foki mogą być gospodarzami pośrednimi. Istnieje również „cykl miejski”, w którym organizmy patogenne są roznoszone przede wszystkim przez szczury i świnię. Dojrzały włosień może mieć długość, odpowiednio do 4 mm (samice) i 1,5 mm (samce). Zgrubiała część tylna zawierająca jelito jest wyraźnie rozróżnialna. Larwa tworzy cystę w tkance mięśniowej i tworzy tam „kompleks komórki odżywczej”, tj. otoczkę, która jest zaopatrzona w liczne naczynia krwionośne, a zatem utrzymuje larwę przy życiu. Larwa może mieć długość około jednego milimetra i jest wysoce zakaźna. Cysty z tkanki mięśniowej rozpuszczają się w jelicie cienkim, gdzie dochodzi do uwolnienia larwy. Larwy penetrują do nabłonka jelita cienkiego i rozwijają się w dorosłe stadium w ciągu 30 godzin, po czym się krzyżują. W skutek namnażania się pasożyta w jelicie cienkim do mięśni poprzecznie prążkowanych trafia wielokrotnie więcej larw niż zostało spożytych z zarażonym mięsem. Każda samica może być zapłodniona kilka razy, a jej potencjał rozrodczy wynosi od 200 do 1500 larw, zależnie od gatunku. Obraz kliniczny powodowany przez włośnię jest określany jako *trichinellosis* – włośnica. Objawy kliniczne i patogeneza choroby są podobne w przypadku różnych gatunków *Trichinella*, a choroba może skończyć się śmiercią, gdy do organizmu trafi duża liczba larw z surowym mięsem lub wyrobem poddanym niedostatecznej obróbce termicznej (np. wędzenie na zimno). Zarówno niebezpieczne są skutki reakcji alergicznej (obrzęk powiek i twarzy, nastrzyknięcie spojówek) jak i objawy grypopodobne występujące w fazie jelitowej w pierwszych dniach po spożyciu zarażonego mięsa i uszkodzenia wielonarządowe w trakcie wędrówki larw drogą krwionośną i osiedlania w mięśniach szkieletowych. W tym czasie mogą pojawiać się objawy zapalenia płuc i opon mózgoworzeniowych, może dojść również do uszkodzenia nerek i mięśnia sercowego.

W wielu krajach europejskich, włośnica została uznana za chorobę, która musi być monitorowana, a dla państw członkowskich Unii Europejskiej, jest to obowiązkowe zgodnie z dyrektywą Unii Europejskiej w sprawie chorób odzwierzęcych, 2003/99/WE. Przypadki włośnicy muszą być zgłaszane, ale dalsze działania nie muszą być podjęte. Komisja Europejska (KE) zmieniła prawo ustanawiające przepisy dotyczące kontroli urzędowych dla włośni obecnych w mięsie, w celu poprawy bezpieczeństwa żywności dla konsumentów w krajach europejskich.

Zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 2075/2005, inspekcje mięsa są wymagane dla trzody chlewnej, koni, dzików oraz innych gatunków hodowlanych i dzikich zwierząt, które są podatne na zakażenie *Trichinella* i które są ubijane w celu spożycia.

Włośnica jest nie tylko zagrożeniem dla zdrowia publicznego, ale także stanowi duży problem ekonomiczny w produkcji świń i dla bezpieczeństwa żywności. W oficjalnej inspekcji mięsnej, używane są tylko bezpośrednie sposoby wykrywania tego pasożyta. Jedynymi zalecanymi procedurami wykrywania larw *Trichinella* w tkance mięśniowej są sposoby trawienia. Inne sposoby nie są zalecane ze względu na brak skuteczności lub wiarygodności.

Aktualnie w diagnostyce człowieka stosowane są głównie sposoby takie jak: ELISA, Western Blot, testy immunoprecypitacji. Istniejące sposoby serologiczne niestety nie sprawdzają się w przypadku

wczesnej i gatunkowo specyficznej diagnostyki. Zalecane sposoby wykrywania *Trichinella* spp. z próbek mięśni (sposób kompresji, trawienie) są pracochłonne, czasochłonne, niewystarczająco czułe i nie różnicują na poziomie gatunku, a ponadto trudne do wykonania u ludzi.

Oprócz standardowych procedur diagnostycznych i badań serologicznych, zostały również opracowane sposoby molekularne do wykrywania i typowania włośni takie jak: multiplex PCR lub PCR w czasie rzeczywistym. Wszystkie dostępne sposoby molekularne pozwalają na diagnostykę do której niezbędna jest biopsja mięśnia.

U ludzi z podejrzeniem włośnicy ostateczne postawienie diagnozy uwzględnia: wywiad środowiskowy, objawy kliniczne i serodiagnostykę. Jednym ze sposobów wykorzystywanych do diagnozowania włośnicy u ludzi jest test immunoenzymatyczny ELISA. Polega on na oznaczeniu w surowicy krwi specyficznych przeciwciał (głównie klasy IgG) przeciwko antygenom pasożyta. Ponadto, w ostateczności wymagana jest znaczna interwencja chirurgiczna, a czułość diagnozy zależy od ilości próbki badanego mięśnia. Zwykle od 0,2 do 0,5 g tkanki mięśniowej bez tłuszczu i skóry pobrane z mięśnia naramiennego lub innego szkieletowego.

Testy ELISA są stosowane do wykrywania specyficznych przeciwciał anti-*Trichinella* w surowicy lub soku mięsnym. Jednak okazują się niewystarczające, by zaświadczyć, że człowiek lub zwierzę jest wolne od włośni, nawet w ciężkich zakażeniach, gdyż przeprowadzone badania sugerowały opóźnienie w wytwarzaniu specyficznych przeciwciał, co może prowadzić do fałszywych wyników negatywnych. Techniki takie jak PCR, PCR w czasie rzeczywistym charakteryzują się bardzo wysoką czułością i specyficznością. Chociaż sposoby te wydają się być obiecujące, wymagają użycia specjalistycznych, drogich urządzeń. Dodatkowo aktywność polimerazy Taq stosowanej w PCR jest często hamowana przez inhibitory reakcji PCR występujące w materiale biologicznym.

Międzynarodowe zgłoszenie WO2014/071946 ujawnia sposób oparty na wykrywaniu SSU rDNA za pomocą amplifikacji wszystkich SSU rDNA różnych od ludzkiego w ludzkich próbkach klinicznych za pomocą odpowiednio trzech lub czterech zestawów primerów, próbki o dużej zawartości ludzkiego DNA oraz próbki o małej zawartości ludzkiego DNA.

Z kolei w zgłoszeniu CN102424841 ujawnia się sposób diagnostyki włośnia za pomocą LAMP PCR przy użyciu wskazanych primerów oraz zestaw diagnostyczny. Primery zostały zaprojektowane zgodnie z powtarzającą się sekwencją *Trichinella spiralis* swoistą dla genu SB4.

W stanie techniki są zatem znane sposoby diagnozowania włośnia za pomocą technik PCR. Jednak ciągle dużym problemem pozostaje diagnostyka włośnicy ludzi, szczególnie w początkowym okresie inwazji.

Celem wynalazku jest zatem opracowanie sposobu, który umożliwia wykrywanie pasożyta na każdym etapie inwazji, co pozwoli w sposób czuły i specyficzny diagnozować ludzi i zwierzęta. Proponowane rozwiązanie pozwoli ograniczyć zarówno koszt jak i czas, a dodatkowo charakteryzować się będzie większą czułością i specyficznością. Co więcej opracowany sposób pozwala na diagnostykę patogenów bezpośrednio z krwi bez potrzeby stosowania kosztownego sprzętu laboratoryjnego i wykwalifikowanego personelu dzięki czemu mógłby również znaleźć szerokie zastosowanie w inspekcji mięsa przeznaczonego do spożycia, co z kolei pozwoliłoby na sprawniejsze monitorowanie i eliminowanie czynników zakaźnych w kraju.

Przedmiotem wynalazku są zatem sekwencje oligonukleotydów posiadające sekwencję przedstawioną jako: SEQ. ID No. 1, SEQ. ID No. 2, SEQ. ID No. 3, SEQ. ID No. 4, SEQ. ID No. 5, SEQ. ID No. 6, SEQ. ID No. 7 albo SEQ. ID No. 8.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania obecności DNA pasożyta we krwi żywiciela, charakteryzujący się tym, że pasożytem jest *Trichinella* spp. a sposób obejmuje następujące etapy: pobiera się krew na antykoagulant, następnie wiruje się krew w celu uzyskania osocza, po czym izoluje się DNA z osocza i ostatecznie przeprowadza się reakcję PCR lub LAMP PCR z zastosowaniem polimerazy Taq lub polimerazy Bst oraz odpowiednich oligonukleotydów opisanych powyżej.

Korzystnie DNA namnażanym w reakcji jest wolne DNA pasożyta (cfDNA) obecnego we krwi, którym jest DNA mitochondrialne.

Korzystnie, gdy do amplifikacji stosuje się wstępną denaturację w temp. 98°C, a następnie cykle termiczne w temp. 56°C.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zestaw do wykrywania obecności DNA *Trichinella* spp., składający się z przynajmniej dwóch oligonukleotydów opisanych zastrzeżeniem numer 1 oraz ewentualnie odpowiednich odczynników do amplifikacji DNA.

Jeszcze kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie oligonukleotydów przedstawionych w zastrzeżeniu numer 1 do produkcji zestawu do wykrywania obecności DNA *Trichinella* spp.

Podstawową kwestią realizacji wynalazku jest namnażanie wolnego DNA pasożyta (cfDNA) obecnego we krwi, którym jest DNA mitochondrialne.

Na figurach przedstawiono wyniki reakcji PCR oraz LAMP PCR.

Fig. 1 to przedstawienie reakcji PCR ze starterami TsMT-F3, TsMT-B3 na matrycach DNA różnych gatunków *Trichinella* (1-*T. spiralis*, 2-*T. nativa*, 3-*T. britovi*, 4-*T. pseudospiralis*). 6 – wolne DNA (cfDNA) myszy zarażonej przez okres 2 lat *T. spiralis*. Ścieżka 5 – kontrola negatywna, M- DNA marker 100bp

Fig. 2 to przedstawienie reakcji LAMP PCR ze starterami TsMT-F3, TsMT-B3, TsMT-FIP, TsMT-BIP, TsMT-F2, TsMT-F1c, TsMT-B2, TsMT-B1c na matrycach DNA różnych gatunków *Trichinella* (2-*T. spiralis*, 3-*T. nativa*, 4-*T. britovi*, 5-*T. pseudospiralis*). Ścieżka 1 – kontrola negatywna, M- DNA marker 100bp

Fig. 3 to przedstawienie reakcji PCR ze starterami TsMT-F3, TsMT-B3 na matrycach (cfDNA) wyizolowanych od zwierząt zarażonych różną dawką larw *T. spiralis* (1 – szczur zarażony 50 *T. spiralis*, 2 – szczur 300 larw, 3 – szczur 700 larw, 4 – szczur 1000 larw, 7 – szczur 4000 larw). 6 – świnia zarażona 200 larwami *T. spiralis*. Ścieżka 8 – kontrola pozytywna na DNA *T. spiralis*, 9 – kontrola negatywna, M- DNA marker 100bp

Fig. 4 to przedstawienie reakcji PCR ze starterami TsMT-F3, TsMT-B3 na matrycach (cfDNA) wyizolowanych od zwierząt/człowieka zarażonych *T. spiralis*. Ścieżka 1 – kontrola negatywna, 3 – świnia zarażona 200 larwami, 4 – zarażony człowiek, M- DNA marker 100bp

Fig. 5 to przedstawienie reakcji LAMP PCR ze starterami TsMT-F3, TsMT-B3, TsMT-FIP, TsMT-BIP, TsMT-F2, TsMT-F1c, TsMT-B2, TsMT-B1c na wolnym DNA wyizolowanym od szczura zarażonego 2 – 4000 larw, 3 – 8000 larw, 1 – kontrola negatywna, M- DNA marker 100bp

Fig. 6 to przedstawienie reakcji PCR ze starterami TsMT-F3, TsMT-B3 na osoczu zwierzęcia zarażonego *T. spiralis*. Ścieżka 1 – osocze zarażonego zwierzęcia, 2 – kontrola negatywna, M- DNA marker 50bp

Wynalazek został przedstawiony w przykładach wykonania, które nie mają charakteru ograniczającego.

Przykład 1

Sprawdzono specyficzność zaprojektowanego zestawu starterów do reakcji PCR i LAMP PCR gdzie jako matrycę zastosowano DNA różnych gatunków *Trichinella* (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. britovi*, *T. pseudospiralis*) (Fig. 1, Fig. 2). Do reakcji PCR zastosowano jednakową ilość DNA.

Przykład 2

Sprawdzono czułość sposobu pod względem intensywności zarażenia. W tym celu zarażono zwierzęta (szczur rasy Lewis – samce w wieku 3 miesięcy) różnymi dawkami larw – 50, 300, 700, 1000, 4000, 8000. Zwierzęta uśmiercano i pobierano im krew na antykoagulant. Kolejnym etapem było uzyskanie osocza poprzez wirowanie w 4°C. Następnie sprawdzono skuteczność sposobu PCR na wolnym DNA (cfDNA) wyizolowanym z osocza żywicieli. W przypadku szczurów zarażonych 300, 700, 1000, 4000, 8000 uzyskano pozytywny wynik. Szczury były zarażone przez okres 2 miesięcy (Fig. 3). Dodatkowo określono intensywność zarażenia izolując larwy z mięśni metodą trawienia i przeliczając liczbę larw na całkowitą masę mięśni, którą użyto do trawienia. Intensywność była adekwatna do wyjściowej dawki zarażeniowej. 98°C – 3 min, 98°C – 30 s, 56°C – 30 s, 72°C – 40 s – 35 cykli, 72°C – 5 min.

Przykład 3

Dodatkowo skuteczność sposobu potwierdzono dla myszy zarażonej (samiec szczep C3H zarażony 500 larwami) od 2 lat, świni (samiec 24 kg zarażony przez okres 60 dni) eksperymentalnie zarażonej 200 larwami *T. spiralis* i w surowicy człowieka u którego potwierdzono zarażenie pasożytem techniką ELISA i biopsją (Fig. 1, 3, 4).

Przykład 4

Następnie podjęto próbę wykonania reakcji bezpośrednio na osoczu zarażonych zwierząt, co pozwoliłoby ominąć etap izolacji wolnego DNA i ułatwiłoby zastosowanie sposobu w diagnostyce zwierząt przeznaczonych do spożycia. Wynik przedstawiono na Fig. 6.

Lista Sekwencji

SEQ. ID No. 1

TsMT-F3 TGAACAATAGCTATAACCAACC

SEQ. ID No. 2

TsMT-B3 GTTAGTGTATAACCGCGATAG

SEQ. ID No. 3

TsMT-FIP GAGAGAAGTGGTTTGTATTCCAGTACTCTATTCAACGACTAGAGAAGAC

SEQ. ID No. 4

TsMT-BIP TTGATGCATATTGCACAAACCAACTCACTTAGATCTTTAACTATGGC

SEQ. ID No. 5

TsMT-F2 CTCTATTCAACGACTAGAGAAGAC

SEQ. ID No. 6

TsMT-F1c GAGAGAAGTGGTTTGTATTCCAGTA

SEQ. ID No. 7

TsMT-B2 TCACTTAGATCTTTAACTATGGC

SEQ. ID No. 8

TsMT-B1c TTGATGCATATTGCACAAACCAAC.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sekwencje oligonukleotydów, **znamiennie tym**, że posiadają sekwencję przedstawioną jako: SEQ. ID No. 1, SEQ. ID No. 2, SEQ. ID No. 3, SEQ. ID No. 4, SEQ. ID No. 5, SEQ. ID No. 6, SEQ. ID No. 7 albo SEQ. ID No. 8.
2. Sposób wykrywania obecności DNA pasożyta we krwi żywiciela, **znamienny tym**, że pasożytem jest *Trichinella* spp., a sposób obejmuje następujące etapy: pobiera się krew na antykoagulant, następnie wiruje się krew w celu uzyskania osocza, po czym izoluje się DNA z osocza i ostatecznie przeprowadza się reakcję PCR lub LAMP PCR z zastosowaniem polimerazy Taq lub polimerazy Bst oraz odpowiednich oligonukleotydów jak zdefiniowano w zastrz. 1.
3. Sposób według zastrz. 2. przy czym DNA namnażanym w reakcji jest wolne DNA pasożyta (cfDNA) obecnego we krwi, którym jest DNA mitochondrialne.

4. Sposób według zastrz. 2 do 3, **znamienny tym**, że do amplifikacji stosuje się wstępną denaturację w temp. 98°C, a następnie cykle termiczne w temp. 56°C lub PCR izotermiczny w temp. 65°C.
5. Zestaw do wykrywania obecności DNA *Trichinella* spp., **znamienny tym**, że składa się z co najmniej dwóch oligonukleotydów opisanych zastrz. 1 oraz ewentualnie odpowiednich odczynników do amplifikacji DNA.
6. Zastosowanie oligonukleotydów przedstawionych w zastrz. 1 do produkcji zestawu do wykrywania obecności DNA *Trichinella* spp.

Rysunki

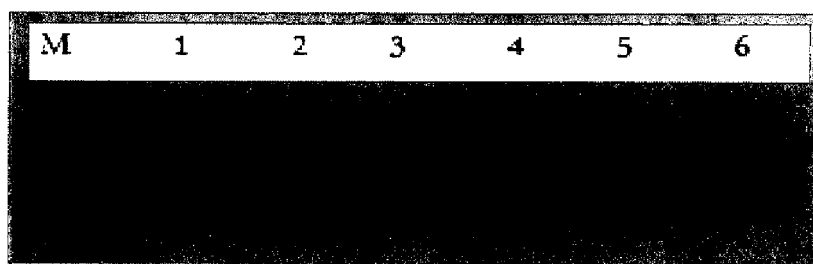


Fig. 1

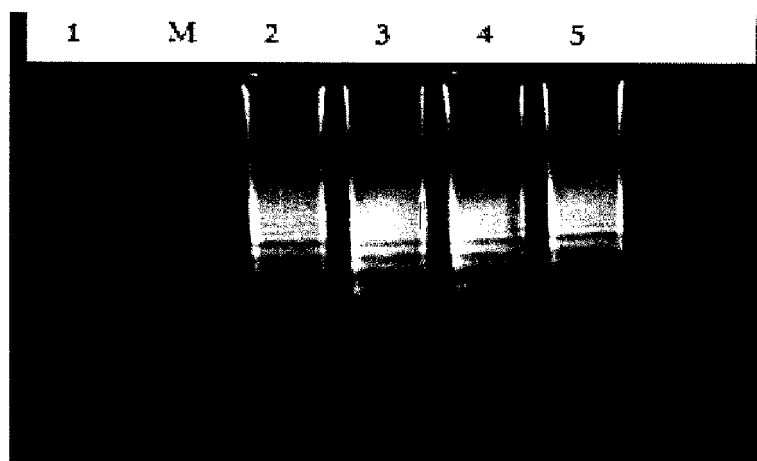


Fig. 2

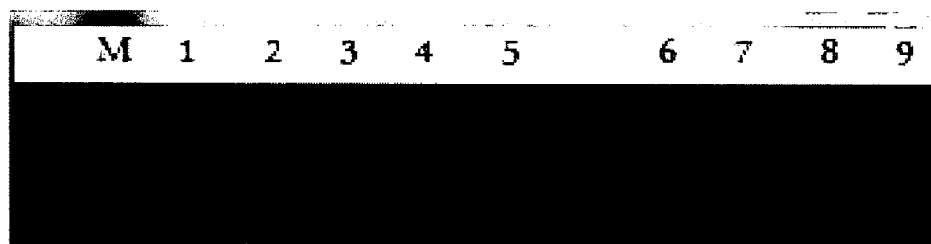


Fig. 3

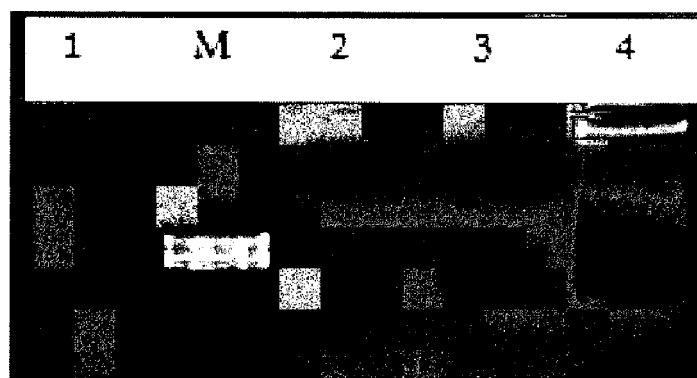


Fig.4

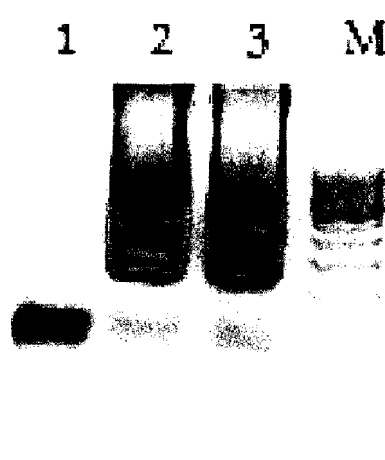


Fig.5

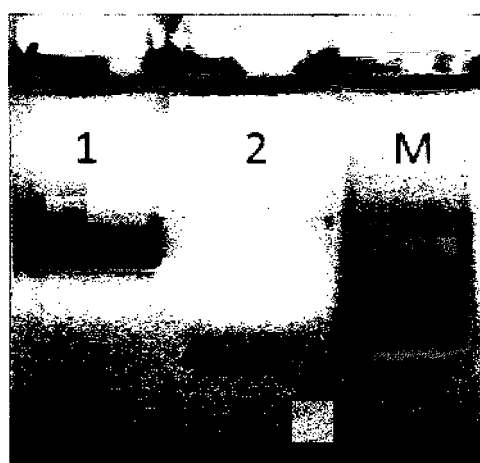


Fig.6