

ლეპტოსპიროზის სადეტექციო მოლეკულური ტესტის შემუშავება და ოპტიმიზაცია

მერი ფანცულაია

*სამაგისტრო ნაშრომი წარმოდგენილია ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებების და მედიცინის ფაკულტეტზე მოლეკულური
ბიომეცნიერების მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მინიჭების მოთხოვნის შესაბამისად*

მოლეკულური ბიომეცნიერებების სამაგისტრო პროგრამა

ხელმძღვანელი: მარინე კიკვიძე, ასოცირებული პროფესორი

თანახელმძღვანელი: თამარ ჯაშიაშვილი, მკვლევარი

ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თბილისი, 2019

განაცხადი

როგორც წარდგენილი სამაგისტრო ნაშრომის ავტორი, ვაცხადებ, რომ აღნიშნული ნაშრომი წარმოადგენს ჩემს ორიგინალურ ნამუშევარს და იგი არ შეიცავს გამოქვეყნებულ, გამოსაქვეყნებლად მიღებულ ან დასაცავად წარდგენილ მასალებს, რომლებიც არ არის მოხსენიებული და დამოწმებული შესაბამისი წესების მიხედვით.

მერი ფანცულაია

12.07.2019

აბსტრაქტი

ლეპტოსპიროზი მსოფლიოში, მათ შორის საქართველოში, ფართოდ გავრცელებული ანთროპო-ზოონოზური, მწვავე ინფექციური დაავადებაა. მისი გამომწვევი *Leptospira*-ს გვარის წარმომადგენელი პათოგენური ბაქტერიაა. ადამიანებში ლეპტოსპიროზის დაავადება ფართო სპექტრის სიმპტომებით ხასიათდება. ლაბორატორიული დადასტურების გარეშე, შესაძლებელია მისი არასწორი დიაგნოსტიკა, გვიანმა მკურნალობამ კი შესაძლოა მძიმე დარღვევები და ლეტალური შედეგიც გამოიწვიოს. დაავადების გავრცელებიდან და დიაგნოსტიკის სირთულიდან გამომდინარე, ლეპტოსპიროზის სადეტექციო თანამედროვე მეთოდის დანერგვა მნიშვნელოვან საკითხს წარმოადგენს.

ნაშრომში აღწერილია, საქართველოში პირველად, ლეპტოსპიროზის სადეტექციო მოლეკულური ტესტის შემუშავება რაოდენობრივი პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (რ-პჯრ) მეთოდით. იგი წარმოადგენს ყველაზე ოპერაბელურ მიდგომას ადრეულ დიაგნოსტიკაში, მაღალ-სენსიტიური, მაღალ-სპეციფიკური და სწრაფი რეაქციიდან გამომდინარე. კვლევა გულისხმობს ლეპტოსპიროზის გამომწვევი აგენტის დეტექციას რაოდენობრივი პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის მეთოდით, ბუნდესვერის მიკრობიოლოგიური ინსტიტუტის მიერ მოწოდებული პროტოკოლის მიხედვით. პათოგენის სადეტექციო სამიზნედ შერჩეულ იქნა მაღალ-კონსერვატიული, ვირულენტობის მარკერი *LipL32* გენი. რ-პჯრ რეაქციების ჩასატარებლად, სტანდარტული ნიმუშები მიღებულ იქნა სპეციალური დიზაინის მქონე მოლეკულური ინჟინერიით დამზადებული პლაზმიდიდან, სადაც სამიზნე ფრაგმენტს *LipL32* წარმოადგენდა. სამუშაოს გარკვეული ნაწილი ბუნდესვერის მიკრობიოლოგიური ინსტიტუტში განხორციელდა. ნაწილი კი - რიჩარდ ლუგარის სახელობის საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის კვლევითი ცენტრის ლაბორატორიაში. შედეგების სტატისტიკურმა ანალიზმა აჩვენა ტესტის 95 %-იანი ეფექტურობა და თითოეული რეაქციისთვის 95%-იანი სარწმუნოებით 3 სამიზნე მოლეკულის დეტექციის შესაძლებლობა, 2.2 - 4.8 (მოლეკულა/რეაქცია) სარწმუნოების ინტერვალში.

აღნიშნული შედეგები ტესტის ეფექტურობასა და მაღალ-მგრძნობელობაზე მიუთითებს.

საბოლოოდ, კვლევის ფარგლებში, საქართველოში პირველად შემუშავდა ლეპტოსპიროზის სადეტექციო მოლეკულური ტესტი. შედეგად რ-პჯრ მეთოდის დანერგვით და მისი დამატებით ეროვნული ლაბორატორიის დიაგნოსტიკის ალგორითმზე, სეროლოგიურ და ბაქტერიოლოგიურ ტესტებთან ერთად, გაუმჯობესდება ლეპტოსპიროზის დიაგნოსტიკა. შესაძლოა ითქვას, რომ ეს კვლევა მნიშვნელოვანია ლეპტოსპიროზის კლინიკური შემთხვევების ადრეული და ზუსტი დიაგნოსტიკისთვის, ასევე ეპიდემიამხედველობისთვის და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობისთვის.

ძირითადი საძიებო სიტყვები: ლეპტოსპიროზი, რაოდენობრივი პჯრ, მოლეკულური დეტექცია, *LipL32* გენი.

Abstract

Leptospirosis is one of the most widely distributed zoonosis in the world, including Georgia, caused by bacteria of the genus *Leptospira*. Disease is characterized by wide range of symptoms. In the absence of laboratory confirmation it can be misdiagnosed and late treatment can lead to acute disorders and even death. Due to the complexity of its causing agent's spread and disease detection, establishment of modern diagnostic techniques of leptospirosis is a significant issue.

The study describes the development of molecular assay for detection of Leptospirosis for the first time in Georgia. Real-time PCR is the most operable approach for early diagnosis, depending on its high specific, high sensitive and time efficient assay. This study implies the detection of Leptospiral agent by the real-time PCR, according to the protocol provided by Bundeswehr Institute of Microbiology. As a target highly conserved virulence marker - *LipL32* gene was selected. For the performance of real-time PCR standard templates were produced from specifically designed plasmid with fragment of interest - *LipL32*. Processing of standard templates, efficiency and sensitivity tests, also statistical analysis were performed at the laboratory of Richard G. Lugar Center for Public Health Research. Statistical analysis demonstrated: the 95% efficiency of the test and the detection limit with a 95% probability – 2.9 copies per reaction (cps/rxn) with confidence intervall (CI) of 2.2 - 4.8cps/rxn. Specified results indicate the efficiency and high sensitivity of the assay.

In conclusion, first time in Georgia, molecular assay for the detection of leptospirosis has been developed. Laboratory diagnostic capacity for leptospirosis will be improved through establishment of real-time PCR assay that will be added to the national laboratory diagnostic algorithm along with serological and bacteriological tests. Overall, this achievement is significant for early and accurate diagnosis, epidemiological surveillance and public health.

Keywords: Leptospirosis, real-time PCR, *Leptospira*, detection, *LipL32* gene.

მადლობა

მადლობას ვუხდით ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტის მოლეკულური ბიომეცნიერებების პროგრამისა და რიჩარდ ლუგარის სახელობის საზოგადოებრივი ჯანდაცვის კვლევითი ცენტრის მოლეკულური ეპიდემიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის დეპარტამენტის თანამშრომლებს თანადგომისთვის. მადლობას ვუხდით ჩემს სამეცნიერო ხელმძღვანელს პროფ. მარინე კიკვიძესა და თანახელმძღვანელს მკვლევარ თამარ ჯაშიაშვილს განეული შრომისა და დახმარებისთვის. მადლობა, ბუნდესვერის მიკრობიოლოგიის ინსტიტუტს (BwIM), რომლის პროექტის ფარგლებში ჩატარდა წარმოდგენილი სამაგისტრო კვლევა. მადლობა ორგანიზაცია GIZ-ს (Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit), რომლის დაფინანსებით გახდა შესაძლებელი აღნიშნული კვლევის ჩატარება.