



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **147270** (13) **U**
(51) МПК (2021.01)
A61B 5/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2020 05119	(72) Винахідник(и): Нітін Джейн (IN)
(22) Дата подання заявки: 06.08.2020	(73) Володілець (володільці): ВАН 99 ЛІМІТЕД, 604 Tower A, New Trade Plaza, 6 On Ping Street, Shatin, N. T., Hong Kong, China (HK)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 29.04.2021	(74) Представник: Якобчук Олена Миколаївна, реєстр. №268
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 28.04.2021, Бюл.№ 17	

(54) СПОСІБ ВИЯВЛЕННЯ В ЗРАЗКУ РНК АБО ДНК ТАКИХ ВІРУСІВ ЯК ВІРУС ГРИПУ А, ВІРУС ГРИПУ В, РЕСПІРАТОРНО-СИНЦИТІАЛЬНИЙ ВІРУС, АДЕНОВІРУС, РИНОВІРУС ЛЮДИНИ, ВІРУС МІКОПЛАЗМЕННОЇ ПНЕВМОНІЇ

(57) Реферат:

Спосіб виявлення в зразку РНК або ДНК таких вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії включає взяття досліджуваного зразку, екстракцію з досліджуваного зразку РНК або ДНК вірусів з одержанням підготовленого досліджуваного зразку, ампліфікацію РНК або ДНК вірусів шляхом додавання до порції підготовленого досліджуваного зразку таких реагентів як реагент, який містить РНК-полімеразу або ДНК-полімеразу, та праймерного реагенту, детектування продуктів ампліфікації шляхом виміру інтенсивності флуоресцентного сигналу. При ампліфікації РНК або ДНК вірусів додають один або два праймерних реагенти. Причому у випадку додавання одного праймерного реагенту до одної порції підготовленого досліджуваного зразку додають праймерний реагент, який містить суміш праймерів до РНК або ДНК всіх таких видів вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії. У випадку додавання двох праймерних реагентів до одної порції підготовленого досліджуваного зразку додають перший праймерний реагент, який містять суміш праймерів до РНК або ДНК трьох різних видів вірусів обраних із переліку вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, до другої порції підготовленого досліджуваного зразку додають другий праймерний реагент, який містять суміш праймерів до РНК або ДНК трьох різних видів вірусів обраних із переліку вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, при цьому кожний із праймерів до РНК або ДНК вірусу грипу А, вірусу грипу В, респіраторно-синцитіального вірусу, аденовірусу, риновірусу людини, вірусу мікоплазменної пневмонії, може бути лише у одному із двох праймерних реагентів.

UA 147270 U

UA 147270 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме, до способів визначення наявності чи відсутності вірусної інфекції в організмі людини.

Одним із сучасних методів виявлення вірусів в організмі людини є метод ПЦР – полімерно-ланцюгової реакції.

Метод ПЛР використовує принципи молекулярної біології. Його суть полягає в застосуванні особливих ферментів, які багаторазово копіюють фрагменти РНК і ДНК збудників хвороби, які знаходяться в пробах біоматеріалу, наприклад в крові. Процес ПЛР проводять в ампліфікаторі - приладі, що охолоджує і нагріває пробірки з пробами біоматеріалу. Нагрівання і охолодження потрібні для проведення реплікації. Точність температурного режиму впливає на точність результату.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР, PCR-polymerase chain reaction) - метод отримання безлічі копій певних фрагментів ДНК або РНК у біологічному зразка.

Суть ПЛР як методу молекулярної біології полягає у багаторазовому виборчому копіюванні певного гена (ділянки ДНК або РНК) за допомогою спеціальних ферментів в умовах *in vitro*. Важливою особливістю ПЛР є отримання копій конкретної ділянки ДНК або РНК, що відповідає заданим умовам. Синонімом процесу копіювання ДНК або РНК є "ампліфікація". Реплікація ДНК або РНК *in vivo* також може вважатися ампліфікацією. Проте на відміну від реплікації, в процесі полімеразної ланцюгової реакції ампліфікуються короткі ділянки ДНК або РНК (максимум 40 000 пар нуклеотидів). Утворення нуклеотидної ланцюга здійснюється ферментом ДНК-полімеразой або РНК-полімеразой. Проте для початку роботи ферменту потрібний стартовий майданчик. Майданчиками виступають праймери (приманки) - синтетичні олигонуклеотиди довжиною 15-20 нуклеотидів. Праймерів повинно бути два (прямий і зворотний), вони комплементарні ділянкам ДНК або РНК, і саме фрагмент ДНК або РНК, обмежений праймерами, багаторазово копіюватиметься ДНК-полімеразою або РНК-полімеразою. Робота полімерази полягає в послідовному додаванні нуклеотидів, комплементу послідовності ДНК або РНК. Тим самим в одному температурному циклі знову синтезується два нові фрагменти ДНК або РНК (оскільки молекула ДНК - двучепочечная, то і матриць спочатку дві). Таким чином, за 25-35 циклів в пробірці накопичуються мільярди копій ділянки ДНК або РНК, визначеної праймерами. Структуру окремого циклу можна представити таким чином:

денатурація ДНК або РНК (плавлення, розбіжність ланцюгів ДНК або РНК) - 95 °C -1 або 2 хвилини;

відпал праймерів (приманки зв'язуються з ДНК або РНК, температура цієї стадії визначається нуклеотидним складом праймера) - 60 °C (приміром) - 1 хвилина;

елонгація ДНК або РНК (полімераза синтезує ланцюг ДНК або РНК) - 72 °C -1 хвилина (час залежить від довжини фрагмента, що синтезується).

База приладів для здійснення методу полімеразної ланцюгової реакції в лабораторії повинна складатися з:

ампліфікатора;

ПЛР-боксу (для підготовки проб);

вортекса;

мікроцентрифуги;

набору автоматичних дозаторів (механічних або електронних).

Реагентна база в звичайній ПЛР-лабораторії для проведення повноцінної полімеразної ланцюгової реакції включає реагент, що містить фермент ДНК-полімеразу або РНК-полімеразу з буфером, реагент, що містить праймер до ДНК або РНК, наприклад, вірусу.

Відомий спосіб виявлення в зразка РНК такого вірусу як вірус грипу А (дивитись документ "Инструкция по применению набора реагентов для выявления РНК вируса гриппа А/Н1N1(sw2009) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией"), який затверджений наказом Росздравнадзором № 10914-Пр/09 від 31.12.2009, веб-сторінка з адресою [https://interlabservice.ru/upload/iblock/a07/Influenza%20virus%20A-H1-swine-FL%20\(зарегистр\)_lvl_060819.pdf](https://interlabservice.ru/upload/iblock/a07/Influenza%20virus%20A-H1-swine-FL%20(зарегистр)_lvl_060819.pdf)), який включає такі дії як взяття досліджуваного зразка, екстракцію з досліджуваного зразка РНК вірусу з одержанням підготовленого досліджуваного зразка, ампліфікацію РНК вірусу грипу А шляхом додавання до порції підготовленого досліджуваного зразка таких реагентів як реагент, який містить РНК-полімеразу, та праймерного реагенту, детектування продуктів ампліфікації шляхом виміру інтенсивності флуоресцентного сигналу.

Взяття досліджуваного зразка може бути здійснено шляхом взяття мазка з порожнини носа і ротоглотки, взяття мокроти або аспіратів з носоглотки і трахеї. Екстракцію з досліджуваного зразка РНК вірусу з одержанням підготовленого досліджуваного зразка здійснюють шляхом

занурення досліджуваного зразка, наприклад, занурення мазка, у спеціальний розчин, або додавання до досліджуваного спеціального розчину. Ампліфікацію РНК вірусу грипу А здійснюють шляхом додавання до порції підготовленого досліджуваного зразка таких реагентів як реагент, який містить РНК-полімеразу, та праймерного реагенту. Праймерний реагент

5 містить праймер до РНК вірусу грипу А. Детектування продуктів ампліфікації здійснюють шляхом виміру інтенсивності флуоресцентного сигналу у такому приладі як ампліфікатор, який підтримує певні умови для проведення ампліфікації РНК або ДНК цільових вірусів – так як ампліфікація РНК або ДНК вірусів триває певний час, і можливі варіанти детектування флуоресценції продуктів ампліфікації як під час самого процесу ампліфікації, так і по закінченні

10 процесу ампліфікації.

Недоліками відомого процесу є те, що він дозволяє виявляти в зразка лише один вид вірусу - вірус грипу А. Існують інші подібні способи виявлення РНК або ДНК вірусів у зразка – які дають змогу виявляти по одному виду вірусу, наприклад, виявляти вірус грипу В тощо.

Наразі існує проблема лікування респіраторних інфекцій – респіраторні інфекції із схожими

15 симптомами можуть бути викликані такими різними видами вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії. Тому для діагностування та правильного лікування людини із певними симптомами необхідне перевірка людини на наявність чи відсутність в організмі людини зазначених шести видів респіраторних вірусів. Виявлення зазначених шести видів респіраторних вірусів шляхом

20 здійснення шість разів взяття зразка та аналізу кожного зразка на один вірус вимагає значних витрат часу та таких реагентів як праймерні реагенти.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробки ефективного способу виявлення в зразка РНК або ДНК таких вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, для здійснення якого не

25 треба багато часу та не треба багато праймерних реагентів.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб виявлення в зразка РНК або ДНК таких вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, що включає взяття досліджуваного зразка, екстракцію з досліджуваного зразка РНК або ДНК вірусів з одержанням підготовленого досліджуваного

30 зразка, ампліфікацію РНК або ДНК вірусів шляхом додавання до порції підготовленого досліджуваного зразка таких реагентів як реагент, який містить РНК-полімеразу або ДНК-полімеразу, та праймерного реагенту, детектування продуктів ампліфікації шляхом виміру інтенсивності флуоресцентного сигналу, згідно з корисною моделлю, при ампліфікації РНК або ДНК вірусів додають один або два праймерних реагенти, причому у випадку додавання одного

35 праймерного реагенту до одної порції підготовленого досліджуваного зразка додають праймерний реагент, який містить суміш праймерів до РНК або ДНК всіх таких видів вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, у випадку додавання двох праймерних реагентів до одної порції підготовленого досліджуваного зразка додають перший праймерний реагент, який містить суміш

40 праймерів до РНК або ДНК трьох різних видів вірусів вибраних із переліку вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, до другої порції підготовленого досліджуваного зразка додають другий праймерний реагент, який містить суміш праймерів до РНК або ДНК трьох різних видів вірусів вибраних із переліку вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус

45 людини, вірус мікоплазменної пневмонії, при цьому кожний із праймерів до РНК або ДНК вірусу грипу А, вірусу грипу В, респіраторно-синцитіального вірусу, аденовірусу, риновірусу людини, вірусу мікоплазменної пневмонії, може бути лише у одному із двох праймерних реагентів.

Крім того, за одним із варіантів здійснення запропонованої корисної моделі, перший праймерний реагент містить суміш праймерів до РНК або ДНК трьох таких видів вірусів як вірус

50 грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, другий праймерний реагент містить суміш праймерів до РНК або ДНК трьох таких видів вірусів як аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії.

Спосіб виявлення в зразка РНК або ДНК таких вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної

55 пневмонії, здійснюють наступним чином.

Спочатку здійснюють взяття досліджуваного зразка – яке може бути здійснено або шляхом взяття мазка з порожнини носа і ротоглотки, або взяття мокроти або аспіратів з носоглотки і трахеї. Досліджуваний зразок зберігають та транспортують відповідно до рекомендацій та

60 нормативних настанов, затверджених компетентними органами. Як правило, тривале (більше 48 годин) зберігання та транспортування досліджуваних зразків здійснюють при температурі -

20 °C. У випадку мазка ватний тампон може бути поміщений у рідину для зберігання зразків. Потім здійснюють екстракцію з досліджуваного зразка РНК або ДНК вірусів з одержанням підготовленого досліджуваного зразка - це здійснюють шляхом занурення досліджуваного зразка, наприклад, занурення мазка, у спеціальний розчин, або додавання до досліджуваного спеціального розчину. Склади такого спеціального розчину можуть бути різними, та описані у літературі. У результаті екстракції одержують підготовлений досліджуваний зразок, який є розчином. Потім здійснюють ампліфікацію РНК або ДНК вірусів, які є у підготовленому досліджуваному зразку, шляхом додавання до порції підготовленого досліджуваного зразка таких реагентів як реагент, який містить РНК-полімерази або ДНК-полімерази, та одного або двох праймерних реагентів. Праймерний реагент містить декілька праймерів до РНК або ДНК певних видів вірусів. Додавання до підготовленого досліджуваного зразка РНК-полімерази або ДНК-полімерази та праймерів до РНК або ДНК певних видів вірусів запускає процес полімерно-цепної реакції.

Особливістю технічного рішення є використання або одного праймерного реагента, який містить суміш праймерів до РНК або ДНК всіх таких видів вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, або використання двох праймерних реагентів, з яких перший праймерний реагент містить суміш праймерів до РНК або ДНК трьох різних видів вірусів вибраних із переліку вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, і другий праймерний реагент містить суміш праймерів до РНК або ДНК трьох різних видів вірусів вибраних із переліку вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, при цьому кожний із праймерів до РНК або ДНК вірусу грипу А, вірусу грипу В, респіраторно-синцитіального вірусу, аденовірусу, риновірусу людини, вірусу мікоплазменної пневмонії, може бути лише у одному із двох праймерних реагентів. Тобто праймери до РНК або ДНК всіх таких шести видів респіраторних вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, знаходяться або у одному праймерному реагенті, або у двох праймерних реагентах.

У випадку використання одного праймерного реагенту, який містить суміш праймерів до РНК або ДНК всіх таких видів вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, його додають до одної порції підготовленого досліджуваного зразка, і у цю же порцію підготовленого досліджуваного зразка додають реагент, який містить РНК-полімерази або ДНК-полімерази.

У випадку використання двох праймерних реагентів можливі різні комбінації праймерів до ДНК або РНК зазначених шести вірусів у кожному із двох праймерних реагентів. У цьому випадку перший праймерний реагент додають до одної порції підготовленого досліджуваного зразка, і у цю же порцію підготовленого досліджуваного зразка додають реагент, який містить РНК-полімерази або ДНК-полімерази, другий праймерний реагент додають до другої порції підготовленого досліджуваного зразка, і у цю же порцію підготовленого досліджуваного зразка додають реагент, який містить РНК-полімерази або ДНК-полімерази. Як приклад одної із можливих комбінацій праймерів до ДНК або РНК зазначених шести вірусів у кожному із двох праймерних реагентів, перший праймерний реагент може містити суміш праймерів до РНК або ДНК трьох таких видів вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, другий праймерний реагент може містити суміш праймерів до РНК або ДНК трьох таких видів вірусів як аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії.

Використання одного або двох праймерних реагентів для шести зазначених респіраторних вірусів дозволяє за один процес здійснення способу визначити наявність чи відсутність одночасно шести респіраторних вірусів, що значно скорочує час виявлення РНК або ДНК вірусів, та скорочує об'єм і кількість реагентів, які необхідні для виявлення цих шести вірусів.

Продуктами процесу ампліфікації є фрагменти РНК або ДНК вірусів, і завдяки цьому процесу у розчині відбувається значне збільшення кількості фрагментів РНК або ДНК вірусів. Продукти ампліфікації можна детектувати шляхом виміру інтенсивності флуоресцентного сигналу – флуоросценції, яка відбувається під час процесу ампліфікації, або по закінченню процесу ампліфікації. Ампліфікацію та вимірювання флуоросценції здійснюють у таких приладах ампліфікатори. Відомими моделями ампліфікаторів є прилади під торговими назвами ABI7500 та SLAN-96P, ці прилади призначені для виявлення ДНК і РНК вірусів за допомогою проведення полімеразної ланцюгової реакції з флуоросцентним детектуванням результатів в режимі реального часу.

Технічний результат, який досягається запропонованою корисною моделлю – спосіб дозволяє провести за один процес здійснення корисної моделі, виявлення шести різних видів

респіраторних вірусів, значно зменшити витрати часу та кількості реагентів для виявлення зазначених вірусів.

Наведені приклади здійснення запропонованої корисної моделі лише ілюструють технічне рішення, але не обмежують його.

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб виявлення в зразка РНК або ДНК таких вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, який включає взяття досліджуваного зразка, екстракцію з досліджуваного зразка РНК або ДНК вірусів з одержанням підготовленого досліджуваного зразка, ампліфікацію РНК або ДНК вірусів шляхом додавання до порції підготовленого досліджуваного зразка таких реагентів як реагент, який містить РНК-полімеразу або ДНК-полімеразу, та праймерного реагента, детектування продуктів ампліфікації шляхом виміру інтенсивності флуоресцентного сигналу, який **відрізняється** тим, що при ампліфікації РНК або ДНК вірусів додають один або два праймерних реагенти, причому у випадку додавання одного праймерного реагента до одної порції підготовленого досліджуваного зразка додають праймерний реагент, який містить суміш праймерів до РНК або ДНК всіх таких видів вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, у випадку додавання двох праймерних реагентів до одної порції підготовленого досліджуваного зразка додають перший праймерний реагент, який містить суміш праймерів до РНК або ДНК трьох різних видів вірусів, вибраних із переліку вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, до другої порції підготовленого досліджуваного зразка додають другий праймерний реагент, який містить суміш праймерів до РНК або ДНК трьох різних видів вірусів, вибраних із переліку вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії, при цьому кожний із праймерів до РНК або ДНК вірусу грипу А, вірусу грипу В, респіраторно-синцитіального вірусу, аденовірусу, риновірусу людини, вірусу мікоплазменної пневмонії може бути лише у одному із двох праймерних реагентів.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перший праймерний реагент містить суміш праймерів до РНК або ДНК трьох таких видів вірусів як вірус грипу А, вірус грипу В, респіраторно-синцитіальний вірус, другий праймерний реагент містить суміш праймерів до РНК або ДНК трьох таких видів вірусів як аденовірус, риновірус людини, вірус мікоплазменної пневмонії.

35