

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

34 900

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

C12Q 1/68 (2018.01)

C12Q 1/6888 (2018.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2020-38137**
(22) Přihlášeno: **20.10.2020**
(47) Zapsáno: **09.03.2021**

- (73) Majitel:
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
České Budějovice, České Budějovice 2, CZ
- (72) Původce:
prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D., Dobrá Voda u
Českých Budějovic, CZ
Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D., Borovany, CZ
- (74) Zástupce:
Mgr. Aleš Lang, Horní Slověnice 15, 373 72 Lišov

- (54) Název užitého vzoru:
Mobilní sada pro odhalení virové nákazy

Mobilní sada pro odhalení virové nákazy

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká mobilní sady pro realizaci testů k odhalení virové nákazy, zejména mimo specializované laboratorní prostředí.

Dosavadní stav techniky

10

V současné době se ukazuje, že při pandemické virové naze je jedním ze slabých míst společnosti nedostatečná kapacita a flexibilita testování obyvatel pro řízení účinných protiepidemických opatření.

15

Aktuální hrozbou společnosti je SARS-CoV-2, který je novým typem vysoce infekčního koronaviru způsobujícího onemocnění COVID-19. Toto onemocnění se může projevat i závažným onemocněním dýchacích cest a vážným zánětem plic, přičemž je velice rizikové pro osoby trpící jinými dalšími zdravotními problémy. Jedním z charakteristických rysů SARS-CoV-2 je velmi vysoká přenositelnost, to znamená, že infikovaní jedinci bez jakýchkoli příznaků mohou virus dále přenést na ostatní. Pro další omezení šíření pandemie je proto velmi zásadní připravit rychlé, přesné a ideálně na speciální laboratoři nezávislé testovací sady, tak aby bylo možné tyto časně infekce účinně identifikovat (provést tzv. skrining populace), a tím kontrolovat šíření nemoci.

25

Vzhledem k celosvětové pandemii je důležité mít propracovaný rychlý a zároveň spolehlivý detekční postup k včasnému zachytu onemocnění, resp. infikovaných osob. Výhoda navrhované molekulárně-biologické metody s názvem „loop mediated isothermal amplification“ – česky izotermální amplifikace zprostředkované smyčkou (dále v textu jen LAMP) spočívá ve vysoké procesivitě LAMP reakce, dále v rychlosti (např. kolorimetrická LAMP analýza trvá cca 20 min s okamžitým vizuálním vyhodnocením výsledku), a dále v modularitě, protože LAMP analýza může využít templát ze stávajících izolátů, čímž je proveditelná v modifikacích např. na odběrovém místě, nebo v laboratoři, a to jak se základním, tak i se sofistikovaným vybavením.

30

Použití metody LAMP bylo poprvé zdokumentováno a ověřeno při detekci viru hepatitidy B v roce 2000. Metoda byla vyvinuta k rychlé amplifikaci DNA se zachováním vysoké specifičnosti, účinnosti a za izotermických podmínek. Na rozdíl od známé a primárně používané metody PCR (česky polymerázová řetězová reakce) tedy nevyžaduje cyklování, přičemž ve srovnání s tradičními detekčními metodami je specifita LAMP extrémně vysoká. Bylo zjištěno, že metoda LAMP je 10 až 100x citlivější než metoda PCR. Ve srovnání s metodami PCR a PCR v reálném čase má LAMP výhody v jednoduchosti reakce a ve vyšší účinnosti amplifikace. Obrovská výhoda LAMP je i v úspoře času. DNA se amplifikuje 10^9 až 10^{10} x za 15 až 60 minut, což může ve srovnání s PCR ušetřit i jednu hodinu. Od svého zavedení byla metoda LAMP optimalizována k detekci patogenů humánních, živočišných i rostlinných (viry, bakterie, protozoa), či nejrůznějších potravinových kontaminantů. Vstupní materiál metody LAMP je pak získáván z nejrůznějších tkání (krev, faeces, atd.). K amplifikaci je používána termostabilní DNA polymeráza z bakterie *Bacillus stearothermophilus* nebo *Geobacillus stearothermophilus* s dislokázovou aktivitou, které mají 5'-3' endonukleázovou aktivitu. Sada primerů pro amplifikaci LAMP zahrnuje optimálně šest primerů, a to vnější přední primer (Forward outer primer; F3), vnější zadní (Backward outer primer; B3), vnitřní přední (Forward internal primer; FIP) a vnitřní zadní (Backward internal primer; BIP). Pro urychlení reakce jsou navrženy dva smyčkové primery Loop B (Backward loop primer; BLP) a Loop F (Forward loop primer; FLP). Tyto primery odpovídají sekvenci 6 různých oblastí cílového genu. Na 3' konci to jsou oblasti F3c, F2c, F1c a na 5' konci oblasti B1, B2, B3. Vzhledem ke specifickému působení těchto primerů, je množství amplifikované DNA vyšší než u reakcí založených na PCR.

55

Stávající postupy přímé detekce SARS-CoV-2 jsou založeny na relativně složitém, časově a finančně náročném postupu zahrnujícím izolaci virové RNA, reverzní transkripci a tvorbu cDNA a analýzu RT-PCR (česky kvantitativní polymerázová řetězová reakce). Urychlení používané metody nabízejí postupy, kde PCR detekce je prováděna bez reverzní transkripce přímo z templátu virové RNA. V obou případech jsou ale tyto postupy vázané na kvalitně vybavené laboratoře s přístrojovou technikou umožňující RT-PCR analýzu. Nevýhodou uvedeného postupu je vyšší cena, potřeba sofistikovaného přístrojového vybavení a časová náročnost. Používané tzv. „rychlometry“ jsou založeny na sérologické detekci protilátek vůči SARS-CoV-2, nejedná se tedy o přímou detekci infekčního agens, a tyto metody nejsou použitelné pro skrínig potenciálně infikovaných pacientů a neodhalí infikované osoby v počátečních fázích infekce.

Úkolem technického řešení je přinést veřejnosti mobilní sadu pro odhalení virové nákazy, která by byla použitelná především mimo speciální laboratoře, kterou by bylo možné distribuovat na místa potřeby, či ji mezi místy potřeby jednoduše přenášet, dále která by dokázala odhalit virovou nákazu rychle a s dostatečnou jistotou, která by měla především malé provozní náklady na provedené testy a kterou by dokázal obsluhovat i proškolený neodborník na mikrobiologii/molekulární biologii.

20 Podstata technického řešení

Vytčený úkol je vyřešen pomocí mobilní sady pro odhalení virové nákazy vytvořené podle níže uvedeného technického řešení.

Podstata technického řešení spočívá v tom, že mobilní sada pro odhalení virové nákazy zahrnuje vybavení vhodné pro využití molekulárně-biologické metody LAMP, která je rychlá, jednoduchá, procesivní a dostatečně sensitivní, přičemž není potřeba nákladných laboratorních vybavení. Je velice výhodné, že potřebné vybavení k odhalení virové nákazy, mezi které patří prostředek pro odběr vzorku, alespoň jedna odběrová zkumavka, alespoň jedna pipeta a alespoň jedna mikrozkuhavka, inaktivační roztok, extrakční pufr, alespoň jeden analytický roztok pro provedení LAMP metody, alespoň jedno třepadlo, alespoň jedna centrifuga, a alespoň jeden prostředek pro řízený ohřev vzorku, je možné snadno transportovat do vybrané lokality, že toto vybavení dokáže obsluhovat pouze proškolená osoba, nikoliv specialista, a že je toto vybavení, oproti vybavení speciální laboratoře, ekonomicky a logisticky dostupnější. S výhodou se jedná o základní vybavení, které lze snadno pořídit, se kterým zvládne pracovat průměrně zručný člověk, a jehož pořizovací cena je vhodná pro masové nasazení mobilních sad podle technického řešení.

Rovněž je výhodné provedení mobilní sady podle technického řešení, ve kterém je analytický roztok pro provádění LAMP metody vytvořen z mastermixu s termostabilní polymerázou a z alespoň čtyř LAMP primerů. V nejvýhodnějším provedení je použito v analytickém roztoku šest LAMP primerů, čímž dojde ke zkrácení doby vyhodnocení testu ke dvaceti minutám.

S výhodou je prostředek pro řízený ohřev vzorku opatřen termostatem pro udržování stabilní teploty v rozmezí od 63 °C do 65 °C. Tento interval teploty, na který je testovaný vzorek ohříván, je ideální pro LAMP metodu.

Je výhodné, pokud je prostředek pro řízený ohřev vzorku tvořený termoblokem, nebo jednoduchou mobilní platformou, nebo složitou mobilní platformou. Termoblok je nejjednodušším a nejdostupnějším známým vybavením pro kontrolovaný ohřev laboratorních vzorků. Mobilní platformy, ať už jednoduché, nebo složité, jsou rovněž známým pracovním vybavením, které umožňuje lepší a přesnější vyhodnocení LAMP metody, avšak toto vybavení je již ekonomicky nákladnější, tudíž je o něco méně vhodné pro použití v mobilních sadách podle technického řešení zaměřených na odhalení nákazy, tzv. skrínig populace. Pokud je ale potřeba nejenom zjistit, zda je osoba nakažená, ale o jakou fázi nebo intenzitu nákazy jde, jsou mobilní platformy vhodným nástrojem pro mobilní sadu dle technického řešení.

S výhodou může mobilní sada zahrnovat alespoň jeden zdroj elektrické energie pro provádění testů v lokalitách mimo dosah elektrické distribuční sítě.

- 5 Jako poslední, ale neméně výhodné, provedení mobilní sady podle technického řešení obsahuje transportní kufr, který umožňuje mobilní sadu přenášet mezi vybranými lokalitami.

Mezi výhody technického řešení patří umožnění provádět LAMP metodu téměř kdekoli, kde je možné udržet teplotu ohřevu připraveného vzorku a kam je možné mobilní sadu přenést. Mobilní sada obsahuje relativně málo vybavení, což ji dělá dobře přenositelnou, a současně srozumitelnou pro pouze proškolené osoby. Díky tomu, že mobilní sada umožňuje provádět LAMP metodu, je možné odhalit virovou nákazu i během dvaceti minut, s tím, že osoby nemusí na hromadná odběrná místa, ale proškolená obsluha může za osobami dorazit např. do místa bydliště. Navíc je provoz mobilní sady podle technického řešení levný, neboť náklady na jedno otestování mobilní sadou vyjdou zhruba na třetinu nákladů testu prováděného ve specializované laboratoři. Je tedy výhodné, že detekce SARS-CoV-2 založená na metodě LAMP umožňuje rychlý skrining potenciálně infikovaných pacientů, a to i např. přímo na odběrových místech. Metoda LAMP je časově nenáročná, vlastní analýza bez odběru a přípravy vzorku se pohybuje v řádu 20 až 30 minut s okamžitým vyhodnocením pozitivita/negativity, metoda je sensitivní, je méně finančně náročná a modulární, tj. může využít stávající templáty izolované z klinických vzorků, či může být použita v kombinaci se stávající detekcí.

Objasnění výkresů

25

Uvedené technické řešení bude blíže objasněno na následujících vyobrazeních, kde:

obr. 1 je grafem prezentujícím míru intenzity zbarvení vzorku v reálném čase při různé intenzitě virové nákazy testované osoby během 30 min inkubace při teplotě 63 až 65 °C

30

Příklad uskutečnění technického řešení

Rozumí se, že dále popsané a zobrazené konkrétní případy uskutečnění technického řešení jsou představovány pro ilustraci, nikoliv jako omezení technického řešení na uvedené příklady. Odborníci znalí stavu techniky najdou nebo budou schopni zajistit za použití rutinního experimentování větší či menší počet ekvivalentů ke specifickým uskutečněním technického řešení, která jsou zde popsána.

40 Popis vybavení mobilní sady:

Prostředek pro odběr vzorku může být sterilní výtěrový tampon či jemu podobný ekvivalent pro provedení výtěru. Mobilní sada obsahuje laboratorní potřeby, mezi které patří zkumavky, mikrozkušavky, špičky a pipety. Odborník na laboratorní práci je schopen navrhnout další vhodné nástroje a nádoby do mobilní sady pro usnadnění pracovní činnosti. Dále je součástí mobilní sady minicentrifuga, třepadlo (tzv. vortex), a prostředek pro řízený ohřev vzorku.

Prostředek pro řízený ohřev vzorku může být nádobou pro vodní lázeň s topným tělesem a s termostatem, či běžným termoblokem nebo mobilní platformou, kterou lze koupit např. pod označením BioRanger™. V podstatě je možné použít jakýkoliv zdroj tepla, který dokáže vzorek stabilně ohřívat v intervalu 63 až 65 °C, a to po předepsanou dobu.

Co se týče roztoků, tak mobilní sada obsahuje libovolný komerčně dostupný inaktivační roztok, dále vhodný extrakční pufr, který je rovněž možné zakoupit, a v neposlední řadě analytický roztok, který obsahuje alespoň čtyři LAMP primery a termostabilní polymerázu.

55

Pokud je mobilní sada určena k nasazení mimo dosah elektrické distribuční soustavy, je opatřena nabíjecími bateriemi a měničem el. proudu a napětí pro připojení elektrického vybavení mobilní sady.

5

Mobilní sadu lze uskladnit do transportního kufru s pevnou skořepinou, který je uvnitř opatřen polstrováním a přihrádkami pro uložení součástí mobilní sady, a který je opatřen madly pro ruce a pojezdovými koly.

10 Pracovní postup s mobilní sadou pro odhalení virové nákazy:

- a) Uživatel mobilní sady provede odběr vzorku prostředkem pro odběr vzorku.
- b) Uživatel mobilní sady inaktivuje odebraný vzorek inaktivačním roztokem a vloží jej do určené nádoby, která je připravena.
- c) Následně uživatel mobilní sady vzorek připraví pro metodu LAMP za pomoci roztoků, nástrojů a nádob, třepadla a centrifugy.
- d) Uživatel mobilní sady do nahřátého prostředku pro řízený ohřev vzorku vloží nachystaný vzorek, který ohřívá při teplotě v rozmezí od 63 °C do 65 °C.
- e) Uživatel mobilní sady alespoň po 20 minutách zkontroluje vzorky nacházející se v prostředku pro ohřev vzorku, přičemž vyhodnotí virovou nákazu přítomnou ve vzorku zápisem ano / ne.

25

Podrobnosti k výše uvedenému postupu jsou následující:

Odběr a zpracování vzorku

30 Virová RNA se izoluje z nasofaryngeálních výtěrů. Vzorky se homogenizují v 0,5 ml TRI Reagent® (MRC, Inc.) a inkubují se po dobu 5 minut při pokojové teplotě, aby se umožnila úplná disociace nukleoproteinových komplexů. Vzorky se centrifugují, aby se odstranil zbytek buněk, a supernatant se mohl přenést do nové zkumavky. K supernatantu se přidá 0,1 ml chloroformu, promíchá se na vortexu a inkubuje se po dobu 3 minut při pokojové teplotě. Vzorky se centrifugují 15 minut v mini-centrifuze. Horní vodná fáze se přenese do nové zkumavky. RNA se vysráží 0,25 ml isopropylalkoholu a inkubuje 10 minut při pokojové teplotě. Vzorky se centrifugují 10 minut. Sraženina RNA se promyje 0,5 ml 75% etanolem.

35

40 Vzorky se centrifugují 5 minut a odstraní se veškerý zbylý etanol. Pelety RNA se usuší na vzduchu po dobu 5 až 10 minut a RNA se rozpustí ve vodě ošetřené DEPC.

LAMP analýza/detekce

45 Jako cílové geny pro detekci SARS-CoV-2 byly vybrány geny ORF1ab a N. Primery pro tyto cílové geny byly navrženy pomocí online softwaru PrimerExplorer V5 (k dispozici pro bezplatné použití na: <https://primerexplorer.jp/e/>) a testovány byly také dříve publikované primery (Yu et al. 2020; Zhang et al. 2020). Všechny primery byly porovnány s jinými koronaviry a publikovanými sekvencemi SARS-CoV-2 v genové bance pomocí nástrojů BLAST. Sady primerů byly syntetizovány společností Macrogen (Korejská republika).

50

Kolorimetrická LAMP detekce

55 Kolorimetrické reakce LAMP se provádějí v objemu 25 µl obsahujícím 1,6 µM každého z vnitřních primerů FIP a BIP, dále obsahujícím 0,2 µM každého z vnějších primerů F3 a B3, dále obsahujícím 0,4 µM smyčkových primerů LF a LB, dále obsahujícím 12,5 µl 2x kolorimetrického

LAMP MasterMixu (např. kat. č. M1800, New England Biolabs), a dále obsahujícím 1,5 µl RNA. Reakční směs se upraví na konečný objem 25 µl PCR vodou. Analyzovaný vzorek je inkubován při 65 °C po dobu 20 až 30 minut v termobloku a poté je vyhodnocena změna barvy a pozitivita/negativita reakce. Všechny testy LAMP jsou replikovány alespoň dvakrát a všechny experimenty obsahují negativní kontroly (bez templátu).

RT-LAMP detekce (izotermální amplifikace zprostředkované smyčkou s reverzní transkripcí)

Reakce RT-LAMP se provádí na přenosné mobilní platformě Smart-DART™ (Diagenetix, USA). Reakční směs obsahuje 12 µl mastermixu WarmStart LAMP 2x (např. kat. č. E1700, New England Biolabs), dále obsahuje 0,2 µM každého z vnějších primerů (F3 a B3), dále obsahuje 1,6 µM každého z vnitřních primerů (FIP a BIP), dále obsahuje 0,4 µM smyčkových primerů (LF a LB), a dále obsahuje 0,5 µl fluorescenčního barviva (50x). Nakonec se přidá 1,5 µl RNA a reakční směs se upraví na konečný objem 25 µl PCR vodou. Reakce probíhá ve stripech, např. MicroAmp™ (kat. č. A30588, ThermoFisher) s osmi izotermickými reakčními zkumavkami o objemu 0,2 ml se zajišťovacím uzávěrem. Reakční směsi LAMP se inkubují po dobu 30 minut při 65 °C v přenosné složité mobilní platformě Smart-DART™, načež následuje zahřívání na 98 °C po dobu 2 minut pro ukončení reakcí. RT-LAMP detekce umožňuje vyhodnocení positivity/negativity reakce a dle rychlosti nástupu amplifikační křivky i kvantifikaci positivity. Všechny testy LAMP jsou replikovány alespoň dvakrát a všechny experimenty obsahují negativní kontroly (bez templátu).

Průmyslová využitelnost

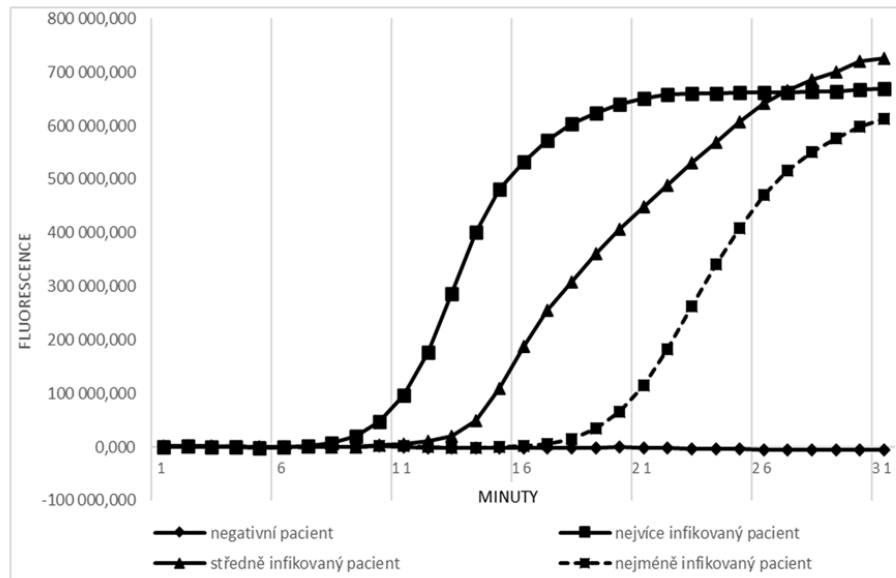
25

Mobilní sada pro odhalení virové nákazy podle technického řešení nalezne uplatnění na odběrových místech, v hygienických stanicích, ve školách, v ordinacích lékařů, v nemocnicích, ale i v terénních podmínkách.

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Mobilní sada pro odhalení virové nákazy, **vyznačující se tím**, že zahrnuje prostředek pro odběr vzorku, alespoň jednu odběrovou zkumavku, alespoň jednu pipetu, alespoň jednu mikrozkušavku, inaktivační roztok, extrakční pufr, alespoň jeden analytický roztok pro provedení metody LAMP – izotermální amplifikace zprostředkované smyčkou, alespoň jedno třepadlo, alespoň jednu centrifugu, a alespoň jeden prostředek pro řízený ohřev vzorku.
- 10 2. Mobilní sada podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že analytický roztok sestává z mastermixu s termostabilní polymerázou s dislokázovou aktivitou a z alespoň čtyř LAMP primerů.
- 15 3. Mobilní sada podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že analytický roztok pro provedení LAMP metody obsahuje šest LAMP primerů.
4. Mobilní sada podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že prostředek pro řízený ohřev vzorku je opatřen termostatem pro udržování stabilní teploty v rozmezí od 63 °C do 65 °C.
- 20 5. Mobilní sada podle některého z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že prostředek pro řízený ohřev vzorku je tvořen termoblokem, nebo mobilní platformou.
6. Mobilní sada podle některého z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že zahrnuje alespoň jeden zdroj elektrické energie.
- 25 7. Mobilní sada podle některého z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že zahrnuje transportní kufr.

1 výkres



Obr.1