

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2020-665

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10.12.2020**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **22.06.2022**
(Věstník č. 25/2022)

- (71) Přihlašovatel:
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ
AUMED, a.s., Praha 4, Modřany, CZ
- (72) Původce:
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D., Norberčany, CZ
MUDr. Petr Džubák, Ph.D., Citov, CZ
Mgr. Hana Jaworek, Ph.D., Olomouc, Povel, CZ
Mgr. Ondřej Bouška, Otradov, CZ
Bc. Kateřina Kubáňová, Ostrava, Poruba, CZ
RNDr. Juraj Vronka, Praha 6, Řepy, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název přihlášky vynálezu:
Transportní médium pro vzorky obsahující nukleové kyseliny a/nebo proteiny

- (57) Anotace:
Předkládané řešení se týká transportního média pro vzorky obsahující nukleové kyseliny a/nebo proteiny, obsahující pufrovací roztok, alespoň jedno antibiotikum, alespoň jedno antitumorigenní činidlo, a dále obsahující polymer, kterým je dextran nebo polyvinylpyrrolidon nebo jejich směs, použití tohoto média pro transport a skladování vzorků patogenů a/nebo vzorků tkání či tělních tekutin, způsobu detekce nukleové kyseliny ve vzorku od pacienta a způsobu detekce nukleové kyseliny patogenu ze vzorku z ústní dutiny a/nebo respiračního traktu pacienta, které zahrnují použití uvedeného média.

Transportní médium pro vzorky obsahující nukleové kyseliny a/nebo proteiny

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká transportního média pro transport a skladování vzorků obsahujících nukleové kyseliny a/nebo proteiny, zejména vzorků obsahujících patogeny, například viry, a zejména například virus SARS CoV-2, ale i vzorků hostitelské DNA i RNA a proteinů.

Dosavadní stav techniky

V současné době se k vyšetření přítomnosti SARS-CoV-2 viru (SARS, Wuhan 2019 CoV pneumonia viru) a dalších virů napadajících respirační trakt používají nasofaryngeální nebo orofaryngeální výtěry. Stěr se provádí syntetickým tamponem, který se následně vloží do zkumavky s transportním médiem. Obdobně se transportní médium používá i pro transport vzorků odebraných z jiných tkání určených pro diagnostiku virů. Transportní médium se používá i pro transport vzorků určených pro diagnostiku jiných patogenů, nebo i vzorků určených pro detekci DNA, RNA či proteinů pacienta. Takto transportované a skladované vzorky se používají k izolaci nukleových kyselin a následné detekci (např. detekci virů či jiných patogenů) pomocí amplifikace nukleových kyselin (například PCR či LAMP metodami).

Používaným transportním médiem je tzv. transportní virologické médium (VTM, viral transport medium), které obsahuje fetální bovinní sérum a popřípadě i sérový albumin, a dále antibiotika a antimykotika. Typické složení VTM je například: 2% fetální bovinní sérum (FBS), 100 µg/ml gentamycin nebo jiné antibiotikum; 0,5 µg/ml amphotericin B nebo jiné antibiotikum, Hank's balanced salt solution (HBSS). Složení transportního virologického média není chemicky definovatelné a reprodukovatelné. Fetální bovinní sérum je směs obsahující tisíce proteinů, která se získává z nenarozených telat. Jedná se tedy o produkt s proměnlivým složením, který navíc může obsahovat inhibitory polymerace anebo reverzní transkripce, což dále snižuje reprodukovatelnost jakýchkoliv amplifikačních testů prováděných s nukleovými kyselinami ve vzorcích skladovaných či transportovaných ve VTM. Použití FBS navíc značně komplikuje či přímo znemožňuje stanovení proteinů v transportovaných či skladovaných vzorcích, neboť je obtížné je odlišit od proměnlivých zastoupení proteinů vyskytujících se v FBS. Dále již samotný způsob získávání fetálního bovinního séra je považován za problematický z etického hlediska a vyžaduje použití zvířat, je tedy žádoucí jej nahrazovat jinými produkty, kdekoliv je to možné.

Biologické vzorky odebrané do VTM jsou podle údajů výrobců i podle zkušeností původců předkládaného vynálezu stabilní při teplotě 4 °C až 5-7 dní, jejich zpracování se však doporučuje nanejvýš do 3 dnů od odběru. Transport vzorků ve VTM také může probíhat v zamraženém stavu, ve kterém jsou patogeny stabilní až 6 měsíců.

Předkládaný vynález si klade za cíl vyvinout dobře chemicky definované a dobře reprodukovatelné transportní médium pro transport a skladování vzorků nukleových kyselin a proteinů, což mohou být viry a/nebo dalších patogenů a nukleových kyselin a proteinů hostitele. Dále má toto médium být zejména vhodné pro transport a skladování vzorků získaných samoodběrem kloktáním.

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je transportní médium, které obsahuje pufovací roztok, alespoň jedno antibiotikum, alespoň jedno antimykotikum, a polymer, kterým je dextran nebo polyvinylpyrrolidon nebo jejich směs.

V rámci vývoje nového transportního média bylo zjištěno, že proteiny fetálního bovinního séra lze nahradit některými polymery. Polymery musí zajistit vhodný onkotický tlak, a musí být rovněž zajištěna správná rovnováha onkotického a osmotického tlaku pro stabilizaci virů a dalších patogenů, ale i somatických buněk v médiu. Kombinace těchto parametrů vytvoří prostředí obdobné prostředí organismu, v němž je vzorek stabilní.

Nahrazením proteinů vhodnými neproteinovými polymery se odstraní problémy s přítomností proteinů, zejména s přítomností špatně definovaných směsí proteinů. V médiu tak nejsou přítomny degradační enzymy, které by mohly virus či jiný vzorek rozložit, zničit, nebo které by mohly inhibovat polymeraci, amplifikaci nebo například reverzní transkripci v dalších krocích diagnostického či identifikačního postupu. Rovněž lze u vzorku transportovaného nebo skladovaného v takovémto médiu bez problémů detekovat či stanovovat proteiny. Médium má jednoznačně chemicky definované složení, je opakovaně připravitelné se stabilním a opakovatelným přesným složením, a to vede k lepší reprodukovatelnosti a menší chybovosti veškerých navazujících metod.

Oproti standardnímu VTM není v transportním médiu podle předkládaného vynálezu zapotřebí používat fetální bovinní sérum (FBS) nebo sérový albumin, jejich funkce je plně nahrazena syntetickými nebo rekombinantními polymery. To odstraňuje i etické problémy spojené s používáním FBS, a zároveň odstraňuje potřebu využívání živých zvířat, což je v souladu s principy tzv. 3Rs – nahrazování (replacement) živých zvířat, snížení (redukce) množství využívaných zvířat, zlepšení (refinement) metod tak, aby způsobovala zvířatům co nejnižší míru bolesti či stresu. Zde se tedy jedná o úplné nahrazení produktu, jehož výroba zahrnuje využití zvířat.

Dextran a polyvinylpyrrolidon jsou polymery schválené pro farmaceutické použití jako pomocné látky. Případný kontakt média s organismem pacienta tak není rizikový a polymery jsou organismy dobře snášeny.

Navíc bylo v rámci předkládaného vynálezu zjištěno, že dextran a polyvinylpyrrolidon stabilizují odebraný virový materiál i za laboratorní teploty, a zároveň neinhibují amplifikaci nukleových kyselin metodou PCR, ani metodou LAMP. Stabilizace za laboratorní teploty je podstatnou výhodou proti standardnímu VTM.

Množství polymeru v transportním médiu může být s výhodou v rozmezí 0,05 až 5 % hmotn., výhodněji 0,1 až 2 % hmotn., ještě výhodněji 0,1 až 1 % hmotn.

Relativní molekulová hmotnost polymerů by měla být alespoň 10 000, například v rozmezí 10 000 až 100 000, výhodněji 10 000 až 70 000. Při relativní molekulové hmotnosti polymerů pod 10 000 už nemusí docházet k vytvoření potřebného onkotického tlaku. Horní hranice relativní molekulové hmotnosti polymerů nemá technické omezení.

Pufrovacím roztokem v transportním médiu podle vynálezu může být v některých provedeních pufrovaný fyziologický roztok (PBS, phosphate buffered saline) nebo Hankův vyvážený fyziologický roztok (HBSS, Hank's balanced salt solution). Obecněji je pufrovacím roztokem pufrovaný fyziologický roztok.

V transportním médiu podle vynálezu lze používat antibiotika a antimykotika, která se používají ve standardním VTM. Nejčastěji používanými antibiotiky ve VTM jsou gentamycin, penicilin či streptomycin, ale lze použít i jiná antibiotika. Nejčastěji používaným antimykotikem ve VTM je amphotericin B, ale lze použít i jiná antimykotika. Antibiotikum může být s výhodou přítomno v množství 50 až 200 µg/ml. Antimykotikum může být s výhodou přítomno v množství 0,1 až 2 µg/ml.

V některých provedeních transportní médium podle vynálezu dále obsahuje sérový albumin. S výhodou může médium obsahovat 0,05 až 2 % hmotn. sérového albuminu, výhodněji 0,1 až 0,5 % hmotn. sérového albuminu. Sérové albuminy lze připravit rekombinantními nebo purifikačními procesy. V některých provedeních se použije bovinní sérový albumin (BSA) nebo lidský sérový albumin.

Sérový albumin je čistý, jednoznačně definovaný protein. Lze jej vyrábět rekombinantně, např. v kvasinkových kulturách, není potřeba jej získávat ze zvířat nebo lidí. Albumin v médiu podle vynálezu zvyšuje onkotický tlak, lze jej tedy použít pro optimalizaci parametrů média, je-li to potřeba. Sérový albumin v uvedených koncentracích neinhibuje amplifikaci či jiné kroky následných identifikačních či diagnostických metod.

Médium podle předkládaného vynálezu může být v kapalně formě nebo v lyofilizované pevně formě. Lyofilizovaná pevná forma se získá lyofilizací (mrazovým sušením) kapalné formy média.

Médium podle předkládaného vynálezu je dobře chemicky definované, neobsahuje směs bílkovin. Toto médium má stabilizační funkci i při skladování vzorků za laboratorní teploty. Zároveň dovoluje bezproblémovou následnou detekci nukleových kyselin pomocí technik založených na amplifikaci nukleových kyselin, kvalitativních i kvantitativních, včetně jejich modifikací v reálném čase. Dovoluje i bezproblémovou detekci proteinů.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále použití výše popsaného média pro transport a skladování vzorků obsahujících nukleové kyseliny nebo protein, např. vzorků patogenů či vzorků tkání či tělních tekutin. S výhodou se jedná o vzorky odebrané pacientovi kloktáním vody, tzv. vzorky kloktací samoodběrů.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále způsob detekce nukleové kyseliny ve vzorku odebraném z těla pacienta, v němž se odebraný vzorek umístí do média podle předkládaného vynálezu, v tomto médiu se transportuje a/nebo skladuje, a následně se metodou PCR nebo LAMP stanoví přítomnost a/nebo množství detekované nukleové kyseliny ve vzorku.

Předmětem předkládaného vynálezu je dále způsob detekce viru ve vzorku odebraném z těla pacienta, v němž se odebraný vzorek umístí do média podle předkládaného vynálezu, v tomto médiu se transportuje a/nebo skladuje, a následně se metodou PCR nebo LAMP stanoví přítomnost a/nebo množství viru ve vzorku.

Médium je, obdobně jako standardní VTM, vhodné pro transport a skladování virů, a to jak DNA virů, tak RNA virů. Zejména může být virem virus SARS-CoV-2, HPV a další viry způsobující onemocnění u člověka nebo zvířat, jako jsou viry hepatitidy, chřipky, koronaviry, viry klíšťové encefalitidy, neštovic, mononukleózy, HIV, apod. Médium je dále vhodné pro transport a skladování jiných patogenů vyšetřitelných technikou PCR, například mycoplasmy, chlamýdie, apod.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: Výběr polymerů

S ohledem na možnost kontaktu pacienta se složkami média byly testovány zejména polymery, které jsou využívány ve farmaceutických formulacích, a jsou tedy spolehlivě zdravotně nezávadné.

Jednotlivé polymery byly testovány na inhibici amplifikace metodou LAMP a PCR. Pro testování byly použity komerční kity AUMED test RT-LAMP Assay SARS-CoV-2 od společnosti AUMED, a.s., Praha, Česká republika, Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit

(Detection 3 genes) od společnosti Liferiver, Shanghai ZJ Bio-Tech Co.), dále bylo postupováno podle instrukcí výrobce. Amplifikovaným vzorkem byla nukleová kyselina viru SARS-CoV-2.

Výsledky tohoto testování uvádí Tabulka 1, z níž je zřejmé, že pouze polymery dextran a polyvinylpyrrolidon neinhibovaly amplifikaci metodou LAMP.

Tabulka 1. Test inhibice LAMP kandidátními polymery*

Polymer	SARS ředění	
	10 ⁻⁵ / 10 ⁻² / 0	Koncentrace
SoluPlus	+ / 0 / 0	1.00 %
Lutrol F 68	++ / 0 / 0	1.00 %
Kollidon 17 PF	++ / ++ / 0	1.00 %
Kolliphor RH40	++ / 0 / 0	1.00 %
Dextran (MW 40000)	++ / + / 0	1.00 %
Polyvinylpyrrolidone (MW 40000)	++ / + / 0	1.00 %
Polyethylenglykol (MW 6000)	+ / 0 / 0	1 μM
PCR voda	+ / 0 / 0	
Fosfátový pufr (PBS)	+ / 0 / 0	

++- vysoce pozitivní, +- slabě pozitivní, 0- negativní;

*- PCR reakce testovanými polymery inhibovaná nebyla.

Příklad 2: Příprava médií pro testování

K pufrovanému fyziologickému roztoku (PBS) byl přidán zásobní roztok gentamycinu na finální koncentraci 100 μg/ml gentamycinu, zásobní roztok amphotericinu B na finální koncentraci 0,5 μg/ml amphotericinu B, a dále polymer (dextran nebo polyvinylpyrrolidon, relativní molekulová hmotnost 40 000) v množství uvedeném v jednotlivých testech (typicky na finální koncentraci 0,1 % hmotn., 0,5 % hmotn., nebo 1 % hmotn.). Média byla přímo použita nebo skladována za laboratorní teploty.

Příklad 3: Testování stability SARS-CoV-2 v médiích

V tomto experimentu byla testována stabilita SARS-CoV-2 v médiích podle vynálezu, ve srovnání se standardním transportním virologickým médiem. Média podle vynálezu obsahovala 0,1 % hmotn. 0,5 % hmotn. nebo 1 % hmotn. polymeru, kterým byl PVP40 nebo dextran.

Stabilita byla testována při laboratorní teplotě (24-27 °C) a při 4 °C po dobu 15 dní. V den 0 bylo do každého testovaného média inokulováno 6223 PFU/ml a 62,23 PFU/ml viru SARS-CoV-2. (PFU = plaque forming units, plaky tvořící jednotky). Z každé alternativy média byl za daných podmínek testován pouze jeden replikát.

Izolace nukleových kyselin byla provedena pomocí kitu RNA-VIRAL-PREP-96 (Palacky University Olomouc, IMTM) nebo VIRAL-RNA-Prep (ITA-Intertact). K detekci koronavirů jsme použili Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Liferiver, Shanghai ZJ Bio-Tech Co.). Test detekuje 3 geny, a to ORF1, gen N, gen E. Dále byla detekována interní kontrola (IC). Při izolaci i detekci bylo postupováno podle instrukcí výrobce. Testy byly provedeny i s negativní a pozitivní kontrolou, byly použity kontroly z uvedeného komerčního kitu.

Výsledky jsou uvedeny níže v Tabulce 2, uvedené hodnoty jsou v jednotkách Ct. Je zřejmé, že virové transportní médium podle vynálezu stabilizovalo virus po dobu 2 týdnů, a to i při laboratorní teplotě nebo teplotě 37°C.

Příklad 4: Testování stability SARS-CoV-2 v médiích

V tomto experimentu byla testována stabilita SARS-CoV-2 v médiích podle vynálezu, ve srovnání se standardním transportním virologickým médiem. Pro toto testování byla vybrána média s 0,5% dextranem a 0,5% dextranem s 0,25% BSA (bovinní sérový albumin). Stabilita byla testována při 4 °C, pokojové teplotě (24 °C) a 37 °C po dobu 15 dní. V den 0 bylo do každého testovaného média inukolováno 62,23 PFU/ml SARS-CoV-2. Z každé alternativy média byly za daných podmínek testovány tři replikáty.

Izolace nukleových kyselin byla provedena pomocí kitu RNA-VIRAL-PREP-96 (Palacky University Olomouc, IMTM) nebo VIRAL-RNA-Prep (ITA-Intertact). K detekci koronavirů jsme použili Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Liferiver, Shanghai ZJ Bio-Tech Co.). Test detekuje 3 geny, a to ORF1, gen N, gen E. Dále byla detekována interní kontrola (IC). Při izolaci i detekci bylo postupováno podle instrukcí výrobce.

Výsledky jsou uvedeny níže v Tabulce 3, uvedené hodnoty jsou v jednotkách Ct. Je zřejmé, že virové transportní médium podle vynálezu stabilizovalo virus po dobu 2 týdnů, a to i při laboratorní teplotě.

Příklad 4: Testování stability vzorků z kloktacích testů s SARS-CoV-2 v médiích

Pro konečné ověření stability vzorku odebraného do média obsahujícího 0,5% Dextran byl testován simulovaný vzorek. Po kloktání 10 až 20 ml pitné vody po dobu 10 až 30 s byl obsah vyplivnut do odběrové nádoby s lyofilizovaným médiem a po uzavření důkladně protřepán. Po přidání 10 až 20 ml kloktání by měl vzorek v odběrové nádobce obsahovat přibližně stejné množství složek média jako při předchozích stabilitních testech. Simulovaný vzorek vznikl smícháním vzorku kloktání od tří jedinců. Stabilita byla testována při 4 °C, pokojové teplotě (24 °C) a 37 °C po dobu 15 dní. V den 0 bylo do každého testovaného média inukolováno 62,23 PFU/ml SARS-CoV2. Z každé alternativy média byly za daných podmínek testovány tři replikáty.

Izolace nukleových kyselin byla provedena pomocí RNA-VIRAL-PREP-96 (Palacky University Olomouc, IMTM) nebo VIRAL-RNA-Prep (ITA-Intertact). K detekci koronavirů jsme použili Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Liferiver, Shanghai ZJ Bio-Tech Co.). Test detekuje 3 geny, a to ORF1, gen N, gen E. Dále byla detekována interní kontrola (IC). Při izolaci i detekci bylo postupováno podle instrukcí výrobce.

Byla prokázána stabilita SARS-CoV-2 pro jeho následnou detekci pomocí real-time PCR v čistém médiu obsahujícím 0,5% dextran i v simulovaném reálném vzorku. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4, uvedené hodnoty jsou v jednotkách Ct.

Tabulka 2. Test stability detekce SARS-CoV-2 ve virových transportních médiích obsahujících polyvinylpyrrolidon nebo dextran

médiu	teplota (°C)	koncentrace viru (PFU/ml)	Den 0				Den 4				Den 10				Den 15			
			ORF1	N gen	E gen	IC	ORF1	N gen	E gen	IC	ORF1	N gen	E gen	IC	ORF1	N gen	E gen	IC
PVP40 1%	4	6223	19.35	15.95	14.51	13.14	20.86	18.41	17.40	18.52	23.04	20.85	20.00	20.91	22.76	20.60	19.79	20.03
PVP40 1%	24-27	6223	19.53	16.65	15.48	14.37	20.93	18.60	17.48	18.67	22.12	19.93	19.10	19.74	20.92	19.45	18.89	19.29
PVP40 0.5%	4	6223	19.34	16.56	15.30	13.96	21.00	18.69	17.60	18.72	24.77	26.27	20.94	20.63	22.77	20.66	19.93	20.44
PVP40 0.5%	24-27	6223	19.47	16.40	15.30	13.91	20.58	18.33	17.24	18.44	22.85	19.92	19.29	19.58	21.86	19.80	19.35	19.73
PVP40 0.1%	4	6223	19.63	16.65	15.43	14.77	20.74	18.46	17.41	18.51	23.49	20.81	19.96	20.79	22.41	20.17	19.62	19.94
PVP40 0.1%	24-27	6223	19.86	16.87	15.80	14.49	21.02	18.72	17.63	18.63	21.98	19.46	18.84	19.80	21.55	19.50	18.99	19.40
DEX 1%	4	6223	19.12	16.59	15.07	14.39	20.37	17.87	16.45	17.58	24.94	22.37	20.12	19.69	22.19	20.29	19.81	19.92
DEX 1%	24-27	6223	19.44	16.63	14.87	14.56	20.13	18.39	16.94	17.95	22.99	23.72	19.94	19.52	20.87	19.96	19.09	18.83
DEX 0.5%	4	6223	19.26	16.32	14.94	14.32	19.72	17.47	16.44	17.54	21.86	19.87	19.13	19.93	21.41	19.67	19.09	19.44
DEX 0.5%	24-27	6223	19.20	16.28	14.92	14.06	20.38	18.14	16.92	17.93	21.59	19.92	18.86	18.91	21.19	19.38	18.92	19.07
DEX 0.1%	4	6223	19.12	16.34	14.98	13.85	20.13	17.71	16.69	17.82	22.12	23.35	19.46	19.08	21.28	19.37	18.81	19.10
DEX 0.1%	24-27	6223	19.46	16.39	15.22	14.27	20.33	17.93	16.89	17.99	21.34	19.26	18.60	19.13	21.02	19.31	18.81	19.03
PVP40 1%	4	6223	28.25	25.25	23.66	21.24	30.87	28.78	27.70	28.51	30.58	29.24	28.62	28.58	31.47	30.23	29.58	29.35
PVP40 1%	24-27	6223	28.55	25.36	23.97	20.79	30.73	28.81	27.59	28.45	31.75	30.23	29.21	28.13	30.93	29.10	28.70	28.64
PVP40 0.5%	4	6223	28.35	25.14	23.58	20.88	30.51	28.25	26.95	27.92	32.20	38.66	29.85	28.47	30.84	29.36	28.88	28.80
PVP40 0.5%	24-27	6223	28.39	25.43	23.98	21.78	30.36	28.34	27.21	27.85	31.78	29.56	28.87	28.18	31.20	29.79	29.14	28.92
PVP40 0.1%	4	6223	27.83	24.88	23.59	21.71	29.88	27.62	26.60	27.53	31.76	29.22	28.79	28.97	31.41	29.61	29.03	28.99
PVP40 0.1%	24-27	6223	27.65	24.80	23.43	18.93	28.94	26.43	24.75	26.86	32.29	30.12	29.55	28.89	31.60	30.07	29.65	29.10
DEX 1%	4	6223	27.18	24.93	23.74	21.40	30.95	29.85	27.84	27.98	30.94	29.18	28.50	28.78	31.06	29.52	29.01	29.11
DEX 1%	24-27	6223	27.53	25.28	23.66	12.70	29.43	30.66	27.31	27.29	30.97	36.24	30.05	28.88	30.01	29.98	28.87	28.77

médium	tepnota (°C)	koncentrace viro (PFU/ml)	Den 0					Den 4					Den 10					Den 15				
			ORF1	N gen	E gen	IC	ORF1	N gen	E gen	IC	ORF1	N gen	E gen	IC	ORF1	N gen	E gen	IC	ORF1	N gen	E gen	IC
DEX 0.5%	4	62.23	27.73	24.68	23.47	21.63	30.59	28.28	26.93	27.89	32.30	ND	30.99	29.38	31.32	29.43	29.12	29.28				
DEX 0.5%	24.27	62.23	27.76	24.98	23.54	21.56	29.71	27.61	26.42	27.36	30.57	29.42	28.47	28.05	29.49	27.68	27.47	27.81				
DEX 0.1%	4	62.23	28.62	26.87	24.79	22.00	30.68	27.90	26.94	27.80	31.85	29.24	28.89	29.07	31.89	29.95	29.56	29.51				
DEX 0.1%	24.27	62.23	28.74	25.99	24.42	20.37	28.99	26.41	25.00	26.71	30.99	28.93	28.40	28.36	30.88	29.52	29.10	28.98				
NTC_PCR			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND				
POZ_PCR			26.38	24.88	23.86	23.18	26.44	24.86	24.33	25.88	28.10	27.48	26.99	28.32	26.86	26.54	26.37	26.77				

DEX- dextran (MW 40000), IC- interní kontrola, ND- nedetekováno, NTC_PCR- negativní kontrola polymerázové řetězové reakce, POZ_PCR-pozitivní kontrola polymerázové řetězové reakce, PVP40- Polyvinylpyrrolidone (MW 40000)

Tabulka 3. Test stability detekce SARS-CoV2 ve virových transportních médiích obsahujících 0,5% dextran nebo 0,25% dextran s 0,5% boviním sérovým albuminem

De médium	teplota (°C)	koncentrace viru (PFU/ml)	Den 0				Den 8				Den 15			
			ORF1	N gen	E gen	IC	ORF1	N gen	E gen	IC	ORF1	N gen	E gen	IC
DEX 0.5%	4	62.23	28	27.98	26.6	26.52	29.73	27.34	26.76	26.92	29.70	29.07	27.34	28.89
DEX 0.5%	4	62.23	27.91	27.69	26.66	26.56	29.47	27.21	26.78	26.83	30.06	29.67	27.85	28.77
DEX 0.5%	4	62.23	28.08	27.85	26.75	26.59	29.43	27.43	26.98	26.99	30.08	29.76	28.06	28.92
DEX 0.5%	24-27	62.23	27.56	27.92	26.73	26.59	29.19	27.33	26.81	27	29.44	29.38	27.43	28.63
DEX 0.5%	24-27	62.23	28.06	27.95	26.75	26.66	28.75	27.14	26.66	26.82	29.85	29.70	27.69	28.75
DEX 0.5%	24-27	62.23	27.8	27.56	26.11	25.96	29.51	27.51	26.85	26.95	30.16	30.22	28.12	28.72
DEX 0.5%	37	62.23	28	27.75	26.58	26.47	28.72	26.97	26.55	26.78	29.87	29.49	27.80	28.85
DEX 0.5%	37	62.23	27.8	28.13	26.82	26.63	28.52	27.24	26.77	26.97	29.95	29.65	27.70	28.71
DEX 0.5%	37	62.23	27.71	27.76	26.62	26.44	28.8	27.03	26.57	26.86	30.12	29.90	28.08	28.70
DEX 0.25%+0.25% BSA	4	62.23	27.22	27.47	26.34	26.45	27.99	25.91	25.4	25.77	28.37	27.39	26.06	28.76
DEX 0.25%+0.25% BSA	4	62.23	27.61	27.8	26.58	26.63	27.92	26.04	25.63	25.95	28.37	27.39	26.07	28.87
DEX 0.25%+0.25% BSA	4	62.23	27.87	27.71	26.53	26.54	28.38	26.28	25.72	25.97	28.17	27.38	25.91	28.80
DEX 0.25%+0.25% BSA	24-27	62.23	28.06	27.69	26.76	26.99	28.04	26.19	25.65	25.93	28.32	27.55	26.08	28.88
DEX 0.25%+0.25% BSA	24-27	62.23	27.66	27.68	26.49	26.58	27.63	26	25.53	25.81	28.18	27.37	26.02	29.16
DEX 0.25%+0.25% BSA	24-27	62.23	27.64	27.58	26.48	26.56	28.3	26.19	25.72	25.96	28.15	27.21	25.86	28.85
DEX 0.25%+0.25% BSA	37	62.23	27.91	27.52	26.4	26.53	28.49	26.45	25.83	26.02	28.32	27.65	26.24	28.74
DEX 0.25%+0.25% BSA	37	62.23	27.7	27.76	26.55	26.59	28.39	26.6	25.97	25.96	28.20	27.45	26.16	28.67
DEX 0.25%+0.25% BSA	37	62.23	26.98	26.91	25.91	26.11	28.13	26.43	25.79	26.01	27.83	27.39	26.02	28.68
NTC_PCR			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
POZ_PCR			29.37	29.76	28.96	29.37	26.86	26.54	26.37	26.77	29.38	29.14	28.90	ND

BSA-boviní sérový albumin, DEX- dextran (MW 40000), IC- interní kontrola, ND- nedetekováno, NTC_PCR- negativní kontrola polymerázové řetězové reakce,

POZ_PCR-pozitivní kontrola polymerázové řetězové reakce

Tabulka 4. Test stability detekce SARS-CoV2 v simulovaném vzorku a virovém transportním médiu obsahujícím 0,5% dextran

Médium	teplota (°C)	koncentrace virus (PFU/ml)	Den 0				Den 10				Den 15			
			ORF1	N gen	E gen	IC	ORF1	N gen	E gen	IC	ORF1	N gen	E gen	IC
Simulovaný vzorek	4	62.23	28.30104	26.27271	24.93232	32.6511	27.72	27.3	25.61	25.32	27.4	26.64	26.08	26.62
Simulovaný vzorek	4	62.23	27.81531	25.96016	24.47147	31.80365	27.39	25.9	24.6	24.59	27.43	26.83	26.29	26.87
Simulovaný vzorek	4	62.23	27.57232	25.54524	24.28279	31.91608	26.73	25.35	23.87	23.95	27.58	26.86	26.2	26.8
Simulovaný vzorek	24-27	62.23	28.30497	26.33928	24.82027	30.03663	27.43	25.64	24.47	24.45	28.05	26.98	26.59	26.93
Simulovaný vzorek	24-27	62.23	28.44377	26.35123	25.06617	32.61991	27.23	25.75	24.5	24.49	28.96	27.64	26.94	27.38
Simulovaný vzorek	24-27	62.23	28.17863	25.98015	24.83246	31.53025	27.47	26.32	24.63	24.79	29.98	28.62	27.98	28.36
Simulovaný vzorek	37	62.23	28.21349	26.20653	24.67084	33.34145	28.78	27.32	26.23	25.68	31.87	30.07	29.66	29.6
Simulovaný vzorek	37	62.23	28.21293	26.24546	24.97092	31.11663	28.9	27.71	26.55	25.79	31.96	30.5	30.13	29.73
Simulovaný vzorek	37	62.23	29.36083	27.05949	25.80214	31.90566	28.64	26.94	25.72	25.8	29.76	28.44	28.08	28.23
DEX 0.5%	24-27	62.23	28.45057	25.36855	24.33951	31.70112	27.71	26.28	25.38	25.48	31.03	30.55	30.26	29.13
DEX 0.5%	24-27	62.23	28.85078	26.00466	24.45164	31.2165	27.88	26.63	25.72	25.6	31	30.6	30.3	29.2
DEX 0.5%	24-27	62.23	28.49731	25.62587	24.26845	31.02895	27.76	26.53	25.57	25.64	30.75	29.77	29.68	28.84
NTC_PCR			ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
POZ_PCR			25.97505	24.93557	24.65564	ND	26.8	27.16	26.17	26.43	35.37	33.48	34.19	ND

Příklad 5: Klinická validační studie

Validační studie byla prováděna s kloktacím testem, který obsahuje virové transportní médium podle předkládaného vynálezu. Virové transportní médium v kloktacím testu bylo připraveno namícháním kapalného média obsahujícího 0,5 % hmotn. dextranu a lyofilizací tohoto média.

Testované osoby provedly samoodběr vzorku vykloktáním 10 až 20 ml pitné vody po dobu 10 až 30 s, následně byl obsah vyplivnut do odběrové nádoby s lyofilizovaným médiem a po uzavření důkladně protřepán.

Izolace RNA proběhla po transportu a popřípadě několika dnech skladování odběrové nádoby, pomocí izolačního kitu s paramagnetickými kuličkami VIRAL-RNA-Prep (ITA Intertact), a RT-PCR detekce byla provedena s pomocí kitu Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real Time Multiplex RT-PCR Kit (Detection 3 genes) od společnosti Liferiver, Shanghai ZJ Bio-Tech Co.). Při izolaci i detekci se postupovalo podle instrukcí výrobce.

Souhrnné výsledky PCR detekce jsou uvedeny v následující tabulce:

PCR		Vzorek		Celkem
		Pozitivní	Negativní	
Kloktání	Pozitivní	206	0	206
	Negativní	24	229	253
	Celkem	230	229	459

Na základě testování byly vypočteny následující statistické parametry kloktacího testu využívajícího virové transportní médium podle vynálezu (CI = interval spolehlivosti):

- senzitivita: SE = 89,6%, 95%CI = (84,9%, 93,2%)
- specifická: SP = 100,0%, 95%CI = (98,4%, 100,0%)
- negativní prediktivní hodnota: NPV = 90,5%, 95%CI = (86,2%, 93,8%)
- pozitivní prediktivní hodnota: PPV = 100,0%, 95%CI = (98,2%, 100,0%)
- přesnost (accuracy) = 94,8%, 95%CI = (92,3%, 96,6%).

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Transportní médium pro transport a skladování vzorků obsahujících nukleové kyseliny a/nebo proteiny, obsahující pufovací roztok, alespoň jedno antibiotikum, alespoň jedno antimykotikum, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje polymer, kterým je dextran nebo polyvinylpyrrolidon nebo jejich směs.

2. Transportní médium podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že množství polymeru v kapalném virovém transportním médiu je v rozmezí 0,05 až 5 % hmotn.

3. Transportní médium podle kteréhokoliv z nároků 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že relativní molekulová hmotnost polymeru je alespoň 10 000.

4. Transportní médium podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje sérový albumin.

5. Transportní médium podle nároku 1, 3 nebo 4, **vyznačující se tím**, že je v lyofilizované pevné formě.

6. Transportní médium podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že je v kapalně formě.

7. Použití transportního média podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6 pro transport a skladování vzorků patogenů a/nebo vzorků tkání či tělních tekutin.

8. Způsob detekce nukleové kyseliny ve vzorku odebraném z těla pacienta, **vyznačující se tím**, že se odebraný vzorek uvede do kontaktu s transportním médiem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, v tomto médiu se transportuje a/nebo skladuje, a následně se metodou PCR nebo LAMP stanoví přítomnost a/nebo množství detekované nukleové kyseliny ve vzorku.

9. Způsob detekce nukleové kyseliny patogenu, zejména viru, ve vzorku odebraném z ústní dutiny a/nebo respiračního traktu pacienta, **vyznačující se tím**, že se odebraný vzorek uvede do kontaktu s transportním médiem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, v tomto médiu setransportuje a/nebo skladuje, a následně se metodou založenou na amplifikaci nukleových kyselin stanoví přítomnost a/nebo množství nukleové kyseliny patogenu ve vzorku.

10. Použití podle nároku 7, nebo způsob podle nároku 9, kde patogenem je koronavirus, zejména virus SARS-CoV-2.