

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245078 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **433269**

(22) Data zgłoszenia: **2020.03.17**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.09.20 BUP 25/2021**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.05.06 WUP 19/2024**

(51) MKP:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/689 (2018.01)

C12Q 1/6844 (2018.01)

(73) Uprawniony z patentu:

GENOMTEC SPÓŁKA AKCYJNA, Wrocław, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MIRON TOKARSKI, Brzeg, PL

IZABELA PIELKA, Łaziec, PL

**MAŁGORZATA MAŁODOBRA-MAZUR,
Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Andrzej Witek, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Zestaw starterów do powielania sekwencji nukleotydowej genu *dnaE* Mycoplasma pneumoniae, sposób wykrywania bakterii Mycoplasma pneumoniae, sposób wykrywania infekcji bakterią Mycoplasma pneumoniae oraz zestaw do wykrywania infekcji bakterią Mycoplasma pneumoniae

PL 245078 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zestaw starterów do powielania sekwencji nukleotydowej genu *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae*, sposób wykrywania bakterii *Mycoplasma pneumoniae*, sposób wykrywania infekcji bakterią *Mycoplasma pneumoniae* oraz zestaw do wykrywania infekcji bakterią *Mycoplasma pneumoniae*. Wynalazek ma zastosowanie w diagnostyce medycznej.

Mycoplasma pneumoniae należy do bakterii atypowych, charakteryzujących się brakiem ściany komórkowej. Poza tym bakterie atypowe zalicza się do patogenów wewnątrzkomórkowych, wykorzystujących energię w postaci ATP z komórek gospodarza.

Mycoplasma pneumoniae stanowi jedną z najczęstszych przyczyn infekcji górnych i dolnych dróg oddechowych; uważa się, że jest odpowiedzialna za około 40% pozaszpitalnych zapaleń płuc (CAP – *Community Acquired Pneumoniae*) u dzieci oraz w grupie osób starszych. Ze względu na brak ściany komórkowej, bakterie te są odporne na antybiotyki β -laktamowe (najczęściej stosowana grupa antybiotyków w pierwszym rzucie leczenia), co stanowi jedną z głównych trudności w leczeniu infekcji wywołanych przez *Mycoplasma pneumoniae*. Kolejną trudność stanowi proces diagnostyczny infekcji wywołanych przez *Mycoplasma pneumoniae*. Bakterie atypowe wymagają specyficznych warunków wzrostu (linie komórkowe lub specjalistyczne podłoża), co znacząco utrudnia wykrycie bakterii w materiale biologicznym klasycznymi metodami mikrobiologicznymi. Z kolei metody serologiczne cechują się niską czułością, generując szereg wyników fałszywie ujemnych spowodowanych głównie okienkiem serologicznym (opóźnienie we wzroście miana przeciwciał klasy IgM) lub przejściem infekcji w fazę przewlekłą (wzrost miana przeciwciał w klasie IgA).

Stąd istnieje konieczność opracowania nowych, szybszych, czulszych i bardziej specyficznych metod diagnostyki infekcji wywołanych przez *Mycoplasma pneumoniae*, co pozwoli znacznie przyspieszyć skuteczne leczenie infekcji. Badania molekularne, polegające na wykryciu specyficznych fragmentów genomu bakterii *Mycoplasma pneumoniae*, stanowią jedno z najszybszych, najczulszych i najbardziej specyficznych metod diagnostyki patogenów. Idealnym rozwiązaniem byłby test opracowany na potrzeby podstawowych jednostek opieki zdrowotnej, przy pierwszym kontakcie pacjenta z lekarzem, umożliwiający szybkie wykonanie badania diagnostycznego (w czasie nieprzekraczającym 15 min), co pozwoli na dobranie terapii celowanej.

W chińskim zgłoszeniu patentowym CN101665826A ujawniono zastosowanie techniki LAMP do detekcji *Mycoplasma pneumoniae* w zastosowaniach klinicznych. Rozwiązanie obejmuje wykrywanie produktów amplifikacji, prowadzonej w czasie jednej godziny, według jednego ze sposobów: odwirowanie, aż do uzyskania białego osadu, dodanie barwnego wywoływacza oraz elektroforezę na żelu agarozowym. W chińskich zgłoszeniach patentowych CN101665827A, CN102618655A, CN107236798A, CN106282381A. Sposoby opisane w tych zgłoszeniach wymagają do 30 do 90 min na przeprowadzenie reakcji amplifikacji. Natomiast z opisu innego chińskiego zgłoszenia patentowego, CN108642196A, czas potrzebny na reakcję amplifikacji wynosi 16, przy kolejne 20 min konieczne do dezaktywacji polimerazy. W kolejnym chińskim zgłoszeniu patentowym CN105349672A ujawniony sposób detekcji produktów amplifikacji obejmuje rejestrację sygnału fluorescencyjnego (SYBR Green, kalceina). Reakcję amplifikacji można przeprowadzić wg rozwiązania w 13, przy czym czas optymalny wynosi 60 min. Minimalne stężenie DNA *M. pneumoniae*, które umożliwia wykrycie, to 1.5×10^{-7} ng/ μ L. W innym chińskim zgłoszeniu patentowym CN105238860A ujawniono zastosowania dwóch sposobów detekcji produktów reakcji amplifikacji, prowadzonej w czasie 45 min. Pierwszy ze sposobów obejmuje dodanie do mieszaniny poreakcyjnej kalceiny i obserwację zmiany barwy. Natomiast drugi jest oparty na obserwacji różnic w zmętnieniu przed i po reakcji bez dodatku kalceiny. Podobnie w następnym chińskim zgłoszeniu patentowym CN103276083A wynik reakcji, na którą potrzeba 60 min, jest oznaczony metodą turbidymetryczną. W kolejnym chińskim zgłoszeniu patentowym CN109609603A opisano sposób wykrywania Metodą wykrywania genu P1, swoistego *Mycoplasma pneumoniae* poprzez połączenie amplifikacji izotermicznej (LAMP) nanoczuJNIKA. Wykrywanie produktów amplifikacji, w czasie 60 min, według tej metody, ukierunkowanej na gen P1, prowadzi się za pomocą nanoczuJNIKA. Metoda ma zakres czułości 60 ng–600 fg zawartości DNA w mieszaninie reakcyjnej. W następnym chińskim zgłoszeniu patentowym CN104818333A został ujawniony zestaw primerów m.in. do przeprowadzania reakcji amplifikacji metodą LAMP i detekcji *Mycoplasma pneumoniae*, przy czym są one umieszczone chipie mikrofluidycznym, przy czym reakcja amplifikacji zajmuje 50 min, a liczba kopii wynosi 5×10^2 / μ L. Również w chińskim zgłoszeniu patentowym CN109666752A wykorzystano metodę LAMP, z tym że etap amplifikacji zajmuje 20–30 min do godziny, przy czym rezultat reakcji w jest oznaczany metodą turbidymetryczną.

Podobnie w kanadyjskim zgłoszeniu patentowym CA2461950A1 reakcję hybrydyzacji z sondą prowadzi się w czasie 30 min zawartość, po której następuje hydroliza w wobec odczynnika zasadowego w czasie 10 min. Natomiast reakcja amplifikacji jest prowadzona w czasie 40 min. Amerykański opis patentowy US10233504B2 ujawnia zestawy primer'ów do zastosowania w reakcji LAMP do wykrywania *M. pneumoniae*. Reakcja amplifikacji jest prowadzona w czasie od 30 do 60 min i zostaje przerwana przez inkubację materiału genetycznego w czasie 2–10 min oraz w temperaturze 80–95°C. Natomiast produkty reakcji mogą być wykrywane poprzez obserwację fluorescencji (kalceina). Natomiast w japońskim zgłoszeniu patentowym JP2006158220A reakcja amplifikacji (LAMP) jest prowadzona w czasie 60 min, przy minimalnej zawartości 0,01 pg DNA bakteryjnego, co odpowiada ilości 12 bakterii w próbce. Postęp reakcji jest monitorowany poprzez pomiar zmętnienia roztworu reakcyjnego (turbidymetria).

Metoda LAMP została przykładowo ujawniona w opisach patentowych WO0028082, WO0224902. Wspomniane zgłoszenia patentowe w większości przypadków nie opisują natomiast jaka jest czułość i limit detekcji bakterii *Mycoplasma pneumoniae*. Metoda detekcji w części wymienionych zgłoszeń patentowych nie pozwala na ilościowy pomiar, a detekcja jest rodzaju end-point, z wykorzystaniem żelu agarozowego lub innych znaczników bazujących na zmianie barwy mieszaniny reakcyjnej w przypadku dodatniego wyniku reakcji amplifikacji (Hydroxy-Naphthol-Blue, Calceine). Część zgłoszeń patentowych realizowana jest w technologii Real-Time, umożliwiającą ilościowy pomiar. Jednak wciąż opracowane i opisane zestawy nie mają zastosowania w diagnostyce typu POC (point of care), a ich główne zastosowanie dotyczy laboratoriów.

Nadal więc istnieje potrzeba zapewnienia takiego zestawu starterów wykorzystywanych w celu diagnostyki *Mycoplasma pneumoniae* z wykorzystaniem metody LAMP, przeznaczony do zastosowania w przychodniach podstawowej opieki medycznej, który umożliwi detekcję bakterii o bardzo niskim limicie detekcji (≥ 5 kopii/ μ l) w krótkim czasie (≤ 15 min). Nieoczekiwanie powyższy problem rozwiązał prezentowany wynalazek.

Pierwszym przedmiotem wynalazku jest zestaw starterów do powielania sekwencji nukleotydowej genu *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae*, znamienne tym, że zawierają zestawy starterów wewnętrznych o następujących sekwencjach nukleotydowych a) i b), a także zestawy starterów zewnętrznych zawierający następujące sekwencje nukleotydowe c) i d) a także zestaw sekwencji starterów loop:

- a) sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 3 lub sekwencja odwrotna i komplementarna połączona lub nie mostkiem TTTT z sekwencją nukleinową SEQ ID NO: 5 lub sekwencja odwrotna i komplementarna
- b) sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 4 lub sekwencja odwrotna i komplementarna połączona lub nie mostkiem TTTT z sekwencją nukleinową SEQ ID NO: 6 lub sekwencja odwrotna i komplementarna
- c) sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 1 lub sekwencja odwrotna i komplementarna
- d) sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 2 lub sekwencja odwrotna i komplementarna przy czym zestaw sekwencji starterów loop zawiera sekwencje nukleinowe zawierające się albo odwrotne i komplementarne do genu *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae* o numerach SEQ ID NO: 7 i SEQ ID NO: 8.

Drugim przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania bakterii *Mycoplasma pneumoniae*, charakteryzujący się tym, że powiela się wybrany region sekwencji nukleinowej genomu bakterii z wykorzystaniem zestawu starterów jak w pierwszym przedmiocie wynalazku, przy czym metodą powielania jest metoda LAMP. Równie korzystnie sposób wg wynalazku charakteryzuje się tym, że powielanie prowadzi się przy profilu temperaturowym: 67,5°C, 40 min. Korzystnie sposób wg wynalazku charakteryzuje się tym, że reakcję typu end-point prowadzi się przy profilu temperaturowym 80°C, 5 min.

Trzecim przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania infekcji bakterią *Mycoplasma pneumoniae*, charakteryzujący się tym, że obejmuje sposób wykrywania jak zdefiniowano w drugim przedmiocie wynalazku.

Czwartym przedmiotem wynalazku jest zestaw do wykrywania infekcji bakterią *Mycoplasma pneumoniae*, charakteryzujący się tym, że zawiera zestaw starterów jak zdefiniowano w pierwszym przedmiocie wynalazku. Równie korzystnie zestaw wg wynalazku charakteryzuje się tym, że zawiera 5,0 μ l WarmStart LAMP Master Mix (NEB). Najkorzystnie zestaw wg wynalazku charakteryzuje się tym, zawiera startery do powielania, jak zdefiniowano w zastrz. 1 i w zastrz. 2, przy czym startery mają następujące stężenia: 0,12 μ M F3, 0,12 μ M B3, 0,93 μ M FIP, 0,93 μ M BIP, 0,23 μ M LoopF, 0,23 μ M LoopB; BSA – 0,25 mg/ml; D-(+)-Trehalose dihydrate – 6%; znacznik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA – EvaGreen ≤ 1 X albo Fluorescent Dye w ilości $\leq 0,5$ ul albo GreenFluorescent Dye

w ilości ≤ 1 ul albo Syto-13 ≤ 16 μM lub SYTO-82 ≤ 16 μM albo inny barwnik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA w stężeniu niewykazującym inhibicji reakcji amplifikacji.

Zaletą zestawów starterów, według wynalazku, do detekcji *Mycoplasma pneumoniae*, a także metody detekcji infekcji *Mycoplasma pneumoniae* i sposobu detekcji produktów amplifikacji jest możliwość ich użycia w diagnostyce medycznej w miejscu opieki nad pacjentem (POC) w docelowym zastosowaniu na przenośnym analizatorze genetycznym. Liofilizacja mieszanin reakcyjnych według wynalazku umożliwia przechowywanie zestawów diagnostycznych w temperaturze pokojowej, nie zmniejszając parametrów diagnostycznych testów. Z kolei użycie barwnika fluorescencyjnego do detekcji produktu amplifikacji zwiększa czułość metody, pozwala na obniżenie limitu detekcji (do 5 kopii/ μl), a także umożliwia ilościowy pomiar bakterii w próbce badanej.

Przykładowe realizacje wynalazku przedstawiono na rysunkach, na których fig. 1 przedstawia charakterystykę czułości metody, gdzie specyficzny sygnał uzyskano z matrycą: Amplirun® *Mycoplasma Pneumoniae* DNA Control, (Vircell Microbiologist) w zakresie 1 000 – 5 kopii/ μl , brak natomiast produktu w NTC; Fig. 1: Linia 1.: marker mas (Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder, NewEngland Biolabs); linia 2.: NTC; linia 3.: 5 kopii MP; linia 4.: 10 kopii MP; linia 5.: 20 kopii MP; linia 6.: 25 kopii MP; Linia 7.: 50 kopii MP; linia 8.: 100 kopii MP; linia 9.: 1000 kopii MP.

Fig. 2 ilustruje czułość metody wg wynalazku mierzonej przez nastawienie serii rozcieńczeń standardu Amplirun® *Mycoplasma Pneumoniae* DNA Control, (Vircell Microbiologist) w zakresie 1 000 – 5 kopii/ μl standardu DNA, gdzie przyrost produktu mierzono w czasie rzeczywistym. Wyniki detekcji *Mycoplasma pneumoniae* w czasie rzeczywistym przedstawiono w tabeli nr 1, podając minimalny czas niezbędny do wykrycia sygnału fluorescencji.

Fig. 3 oraz 4 ilustrują specyficzność metody według wynalazku ze standardowymi matrycami szeregu patogenów potencjalnie obecnych w badanym materiale biologicznym jako naturalna flora fizjologiczna, mogących być wynikiem ko-infekcji lub które posiadają zbliżone sekwencje genomowe. Fig 3: Linia 1: marker mas (Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder, NewEngland Biolabs); Linia 2 i 3: *Mycoplasma genitalium*; Linia 4 i 5: *Klebsiella pneumoniae*; Linia 6 i 7: *Bordetella pertussis*; Linia 8 i 9: *Streptococcus pyogenes*; Linia 10 i 11: *Staphylococcus aureus* wrażliwy na metycylinę (MSSA); Linia 12 i 13: *Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę (MRSA); Linia 14 i 15: *Enterococcus faecalis*; Linia 16 i 17: *Enterococcus faecium*; Linia 18 i 19: *Pseudomonas aeruginosa*; Linia 20 i 21: *Moraxella catarrhalis*; Linia 22 i 23: *Acinetobacter baumannii*; Linia 24 i 25: *Listeria monocytogenes*; Linia 26 i 27: *Legionella pneumophila*; Linia 28 i 29: *Mycoplasma hominis*; Linia 30 i 31: *Haemophilus ducreyi*; Linia 32 i 33: *Escherichia coli*; Linia 34 i 35: *Ureoplasma urealyticum*; Linia 36 i 37: *Campylobacter jejuni*; Linia 38 i 39: *Candida albicans*; Linia 40 i 41: *Haemophilus influenzae*; Linia 42 i 43: *Chlamydia pneumoniae*; Linia 44 i 45: *Mycoplasma pneumoniae*; Linia 46, 47, 48, 49: NTC; Linia 50: marker mas (Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder, NewEngland Biolabs).

Fig. 4 Linia 1: marker mas (Quick-Load® Purple 100 bp DNA Ladder, NewEngland Biolabs); linia 2 i 3: NTC; linia 4 i 5: ludzkie DNA; linia 6 i 7: *Mycoplasma pneumoniae*.

Przykład 1 Sekwencje starterów

Sekwencje specyficznych oligonukleotydów wykorzystywanych do detekcji materiału genetycznego *Mycoplasma pneumoniae* z wykorzystaniem technologii LAMP przedstawiono i scharakteryzowano poniżej.

1. Sekwencja oligonukleotydu MP *dnaEF3*: 5' GCTATTACAAGAGTTAAACGCAC 3' stanowi sekwencję identyczną z genem *DnaE* *Mycoplasma pneumoniae* (nić 5'–3'), który od strony 3' końca sąsiaduje ze starterem F2.
2. Sekwencja oligonukleotydu MP *dnaEB3*: 5' GTCGATAACTTTATTGACGGTAA 3' stanowi komplementarny fragment genu *DnaE* *Mycoplasma pneumoniae* (nić 5'–3') oddalona o 169 nukleotydów od końca 3' oligonukleotydu 1.
3. Sekwencja oligonukleotydu MP *dnaEF2*: 5' ACGGCATTATTGTGGAAGTG 3' stanowi sekwencję identyczną z genem *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae* (nić 5'–3') bezpośrednio przylegająca do końca 3' oligonukleotydu 1.
4. Sekwencja oligonukleotydu MP *dnaEB2*: 5' CGCTCATCAAAGCCCTTG 3' stanowi komplementarny fragment genu *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae* (nić 5'–3') oddalona o 149 nukleotydów od końca 3' oligonukleotydu 1.
5. Sekwencja oligonukleotydu MP *dnaEF1c*: 5' CAGCTAAAAACAACATCCAGTC 3' stanowi komplementarny fragment genu *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae* (nić 5'–3') oddalona o 49 nukleotydów od końca 3' oligonukleotydu 1.

6. Sekwencja oligonukleotydu MP *dnaEB1c*: 5' TGC GGTTAAAGCTAAGACTCACAG 3' stanowi sekwencję identyczną z genem *DnaE* *Mycoplasma pneumoniae* (nić 5'–3') oddalona o 83 nukleotydy od końca 3' oligonukleotydu 1.

7. Sekwencja oligonukleotydu MP *dnaELoopF*: 5' AGCGGCTTGGTTTCAATCG 3'

8. Sekwencja oligonukleotydu MP *dnaELoopB*: 5' AAACCTCGTGGAATACTTAGTGGC 3'

Sekwencje oligonukleotydów F1c i F2 zostały korzystnie połączone mostkiem TTTT i wykorzystane w postaci FIP.

Sekwencje oligonukleotydów B1c i B2 zostały korzystnie połączone mostkiem TTTT i wykorzystane w postaci BIP

Przykład 2

Metoda amplifikacji genu *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae* z wykorzystaniem oligonukleotydów scharakteryzowanych w przykładzie 1 w technologii LAMP o następującym składzie mieszaniny reakcyjnej.

5,0 µl WarmStart LAMP 2X Master Mix

0,12 µM F3

0,12 µM B3

0,93 µM FIP

0,93 µM BIP

0,23 µM LoopF

0,23 µM LoopB

BSA – 0,25 mg/ml

D-(+)-Trehalose dihydrate – 6%

Znacznik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA – EvaGreen $\leq 1X$ lub Fluorescent dye 50X (New England Biolabs) w ilości 0,5 µl lub GreenFluorescent Dye (Lucigen) w ilości ≤ 1 µl lub Syto-13 ≤ 16 µM lub SYTO-82 ≤ 16 µM lub inny barwnik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA w stężeniu niewykazującym inhibicji reakcji amplifikacji.

Matryca DNA ≥ 5 kopii/reakcję

Całkowita objętość reakcyjna dopełniona do 10 µl wodą wolną od DNaz i RNaz.

Znacznik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA – EvaGreen $\leq 1X$ lub Fluorescent dye 50X (New England Biolabs) w ilości 0,5 µl lub GreenFluorescent Dye (Lucigen) w ilości ≤ 1 µl lub Syto-13 ≤ 16 µM lub SYTO-82 ≤ 16 µM lub inny barwnik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA w stężeniu niewykazującym inhibicji reakcji amplifikacji.

Matryca DNA $\mu 5$ kopii/reakcję

Całkowita objętość reakcyjna dopełniona do 10 µl wodą wolną od DNaz i RNaz.

Przykład 3

Metoda amplifikacji genu *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae* z wykorzystaniem oligonukleotydów scharakteryzowanych w przykładzie 1 w technologii LAMP o składzie mieszaniny reakcyjnej scharakteryzowanej w przykładzie 2 o następującym profilu temperaturowym:

1) 67,5°C, 40 min

2) korzystnie przy reakcjach typu end-point 80°C, 5 min.

Przykład 4

Metoda amplifikacji i detekcji genu *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae* z wykorzystaniem oligonukleotydów scharakteryzowanych w przykładzie 1 w technologii LAMP o składzie mieszaniny reakcyjnej scharakteryzowanej w przykładzie 2 o profilu temperaturowym scharakteryzowanym w przykładzie 3 i sposobie detekcji opisanym poniżej.

Użyty barwnik fluorescencyjny wykazujący zdolność oddziaływania z dwuniciowym DNA dodany do mieszaniny reakcyjnej w ilości 0,5 µl EvaGreen 20X; 0,5 µl lub stężeniu $\leq 1X$; ≤ 16 µM odpowiednio dla barwnika GreenFluorescent Dye (Lucigen); SYTO-13 i SYTO-82 przed rozpoczęciem reakcji, pomiar w czasie rzeczywistym i/lub typu end-point. Długość fali wzbudzenia w zakresie zbliżonym do barwnika FAM – 490–500 nm (optymalnie 494 nm) dla barwników EvaGreen; Fluorescent dye 50X (New England Biolabs), GreenFluorescent Dye (Lucigen); SYTO-13 oraz dla barwnika SYTO-82 535 nm (optymalnie 541 nm) długość fali emisji w zakresie 509–530 nm (optymalnie 518 nm) dla barwników EvaGreen; GreenFluorescent Dye (Lucigen); SYTO-13 oraz dla barwnika SYTO-82 556 nm (optymalnie 560 nm), sposób detekcji, czas rejestracji zmian począwszy od 8 minuty od rozpoczęcia reakcji dla *Mycoplasma pneumoniae* oraz kontroli negatywnej.

Przykład 5

Metoda przygotowania i liofilizacji odczynników do detekcji amplifikacji i detekcji genu *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae* z wykorzystaniem oligonukleotydów scharakteryzowanych w przykładzie 1 w technologii LAMP o składzie mieszaniny reakcyjnej scharakteryzowanej w przykładzie 2 o profilu temperaturowym scharakteryzowanym w przykładzie 3 i sposobie detekcji opisanym w przykładzie 4.

Przykład 6 Opis procesu liofilizacji

Komponenty reakcji mieszano zgodnie ze składem opisanym w przykładzie 2, poza matrycą DNA, do całkowitej objętości 10 μ l. Mieszaninę przeniesiono do probówek o pojemności 0,2 ml i poddano procesowi liofilizacji zgodnie z poniższymi parametrami.

Mieszanina umieszczona w probówkach została wstępnie schłodzona do -20°C przez 2 godzin. Następnie prowadzono proces liofilizacji w temperaturze -80°C przez 3 godzin pod ciśnieniem 5⁻² mBar.

Przykład 7 Czułość metody

Czułość określono przez nastawienie serii rozcieńczeń standardu Amplirun® *Mycoplasma Pneumoniae* DNA Control, (Vircell Microbiologist); z minimalną ilością bakterii 5 kopii w mieszaninie reakcyjnej, gdzie przyrost produktu mierzono w czasie rzeczywistym – Figura 2 (RealTime-LAMP dla serii rozcieńczeń).

Czas, po którym możliwa jest detekcja emitowanej fluorescencji dla poszczególnych próbek przedstawiono w tabeli 1.

Scharakteryzowane startery umożliwiają detekcję bakterii *Mycoplasma pneumoniae* przez wykrycie fragmentu genu *dnaE* przy minimalnej ilości 5 kopii/mieszaninę reakcyjną.

Tabela 1 Czas niezbędny do detekcji fluorescencji dla poszczególnych rozcieńczeń standardu DNA *Mycoplasma pneumoniae* (Amplirun® *Mycoplasma Pneumoniae* DNA Control, Vircell Microbiologist).

Próbka	Czas przekroczenia linii bazowej fluorescencji [min]
MP NTC	Nieokreślony
MP 5 kopii	11,77
MP 10 kopii	27,14
MP 20 kopii	13,15
MP 25 kopii	12,45
MP 50 kopii	11,13
MP 100 kopii	10,74
MP 1 000 kopii	8,05

Wyższość metody amplifikacji oraz oligonukleotydów scharakteryzowanych w niniejszym opisie patentowym nad testami bazującymi na technologii RealTime-LAMP polega na znacznie wyższej czułości, którą przedstawiono na figurze 1 oraz skróceniu czasu analiz przedstawionego na figurze tabeli 1.

Lista sekwencji

<110> Genomtec S.A.

<120> Zestaw starterów do wykrywania bakterii *Mycoplasma pneumoniae*, sposób wykrywania *Mycoplasma pneumoniae* z wykorzystaniem zestawów starterów oraz zestaw do wykrywania *Mycoplasma pneumoniae*

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1 MP *dnaEF3*

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 1

GCTATTACAAGAGTTAAACGCAC 23

<210> 2 MP *dnaEB3*

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 2

GTCGATAACTTTATTGACGGTAA 23

<210> 3 MP *dnaEF2*:

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 3

ACGGCATTATTGTGGAAGTG 20

<210> 4 MP *dnaEB2*

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 4

CGCTCATCAAAGCCCTTG 18

<210> 5 MP *dnaEF1c*

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 5

CAGCTAAAAACAACATCCCAGTC 25

<210> 6 MP *dnaEB1c*

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 6

TGCGGTTAAAGCTAAGACTCACAG 24

<210> 7 MP *dnaE*LoopF

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 7

AGCGGCTTGGTTTCAATCG 19

<210> 8 MP *dnaE*LoopB

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<223> primer

<400> 8

AAACCTCGTGGAATACTTAGTGGC 24

<210> 9 Gen *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae*

<211> 24

<212> DNA

<213>

<223> gen

<400> 9

```

1 atgaccagtc ccactagcct agatcagetc aaacagcaaa tcaaaatagc tcccatagtg
61 gagcactatg ccattaagct aaaaaagaag gggaaggact ttgtggcact ctgtcccttt
121 catgctgacc aaaacccctc gatgacggtg tcagttgcaa agaacatctt taagtgtttc
181 tcgtgtcagg tgggcgggtga tgggattgct tttatccaaa aaattgatca ggtagattga
241 aaaacggcgc tcaataaggc acttagtatt ctcaatcttg actcacaata cgctgttaac

```

```

301 ttttacctta aggaagttga cccaaagtta aagecgtatt gggatctaca cagtgcctta
361 gtcgattact atcaaaccog gttaaaagta gagcccaaag agcaggggtt gacttactta
421 actgaaacac gaaagttaag tcctcaagta attgaacgct ttcagttggg tttagcgttt
481 actttagaag accagtattt tctaccaggt ctcttaaact atccctgaat tagcccgga
541 attgaaaagg cagagctctg ttttgctact gaaaaattcc cagaagcttt aggatttttt
601 aaccaacaaa cgcattatgc aacctttaag agccggatta tgattccgat ccatgacctt
661 aagggtaatc cagtaggttt ttcggggcgt gcactgcaaa aaacggaaaa gattaaatac
721 aaaaacagtg cagaacacca gtggtttaag aagagtgaat tgttatttaa cttccaccgg
781 attgataaaa acacactaaa gctgtattta gttgaggggt acttcgatgt ctttgccctt
841 actagcgtg ggattggtga tgtagtgggc ttaatgggtt tagccttgag tgaaagccac
901 attattgcct ttcaacagca actaaaagcg ctagaacagc tggctctggc actcgataat
961 gatacagcgg gtcacgatgc tacttttaag ctattacaag agttaaacgc acacggcatt
1021 attgtggaag tggctcgattg aaaccaagcc gcttacaaag actgggatga gttgttttta
1081 gctgaaggta gtgatgcggt taaagctaag actcacaggg ttttaaacct cgtggaatac
1141 ttagtggtctt actttaaaac caaggqcttt gatgagcgga ttaccgtcaa taaagtattc
1201 gacattattg cacaaaacca gaaagtaaca gctgacacta gcttttagccg ctttttgggt
1261 cagaaattac agcaattgtt gcaatacagt gatgtggaaa cactgttcac acaattacag
1321 cagcaaaaagc tcaaaglaaa agllaalaaa aclacaactl tlacccaaag agccccgall
1381 tacgaatcag tggttggtgt ggttgataat agtttttagaa atgaatcgca gccggttgcc
1441 attaccaagg agtttttagt cgaaaacaac tgaaaggaga ccaaggaacg tgtatttcat
1501 gctgaaatct tcgcttacgt actgttagat aagcagtttt tagtcgaatt aaagcaatct
1561 gatttagatg aattgtttgc ttcattgcaa acaccgttgt ttgatgttgc cttttttatt
1621 gataaagcgc ggctttattg agctaagggt caagagcctg attgggctgt gtttaacagt
1681 attttagggg aacaacaagc aatgtttcca acaacttttt tagcgcaaat taaggagttc
1741 tttttaaaca aatcactctc atatgacctc gaggattatg aggaagattt acagtttttt
1801 cggcaactaa ttgtgaaaca aaaagagcct ttaaaatatt ttaaaagcat ggttgagcac
1861 taa

```

Zastrzeżenia patentowe

1. Zestaw starterów do powielania sekwencji nukleotydowej genu *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae*, **znamienny tym**, że zawierają zestawy starterów wewnętrznych o następujących sekwencjach nukleotydowych a) i b), zestawy starterów zewnętrznych zawierający następujące sekwencje nukleotydowe c) i d) a także zestaw sekwencji starterów loop:
 - a) sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 3 lub sekwencja odwrotna i komplementarna połączona lub nie połączona mostkiem TTTT z sekwencją nukleinową SEQ ID NO: 5 lub sekwencja odwrotna i komplementarna
 - b) sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 4 lub sekwencja odwrotna i komplementarna połączona lub nie połączona mostkiem TTTT z sekwencją nukleinową SEQ ID NO: 6 lub sekwencja odwrotna i komplementarna
 - c) sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 1 lub sekwencja odwrotna i komplementarna oraz
 - d) sekwencja nukleinowa SEQ ID NO: 2 lub sekwencja odwrotna i komplementarna przy czym zestaw sekwencji starterów loop zawiera sekwencje nukleinowe zawierające się albo odwrotne i komplementarne do genu *dnaE* *Mycoplasma pneumoniae* o numerach SEQ ID NO: 7 i SEQ ID NO: 8.
2. Sposób wykrywania bakterii *Mycoplasma pneumoniae*, **znamienny tym**, że powiela się wybrany region sekwencji nukleinowej genomu bakterii z wykorzystaniem zestawu starterów jak zdefiniowano w zastrz. 1, przy czym metodą powielania jest metoda LAMP.
3. Sposób wg. zastrz. 2, **znamienny tym**, że w powielanie prowadzi się przy profilu temperaturowym:
 - 67,5°C, 40 min
4. Sposób wg zastrz. 3, **znamienny tym**, że reakcję typu end-point prowadzi się przy profilu temperaturowym 80°C, 5 min.

5. Sposób wykrywania infekcji bakterią *Mycoplasma pneumoniae*, **znamienny tym**, że obejmuje sposób wykrywania jak zdefiniowano w zastrz. 2.
6. Zestaw do wykrywania infekcji bakterią *Mycoplasma pneumoniae*, **znamienny tym**, że zawiera zestaw starterów jak zdefiniowano w zastrz. 1.
7. Zestaw do wykrywania infekcji wg zastrz. 6, **znamienny tym**, że zawiera 5,0 μ l WarmStart LAMP Master Mix (NEB).
8. Zestaw do wykrywania infekcji wg zastrz. 6 albo 7, **znamienny tym**, zawiera startery do powielania, jak zdefiniowano w zastrz. 1, przy czym startery mają następujące stężenia: 0,12 μ M F3, 0,12 μ M B3, 0,93 μ M FIP, 0,93 μ M BIP, 0,23 μ M LoopF, 0,23 μ M LoopB; BSA – 0,25 mg/ml; D-(+)-Trehalose dihydrate – 6%; znacznik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA – EvaGreen $\leq 1X$ albo Fluorescent Dye w ilości $\leq 0,5$ ul albo GreenFluorescent Dye w ilości ≤ 1 ul albo Syto-13 ≤ 16 μ M lub SYTO-82 ≤ 16 μ M albo inny barwnik fluorescencyjny oddziałujący z dwuniciowym DNA w stężeniu niewykazującym inhibicji reakcji amplifikacji.

Rysunki

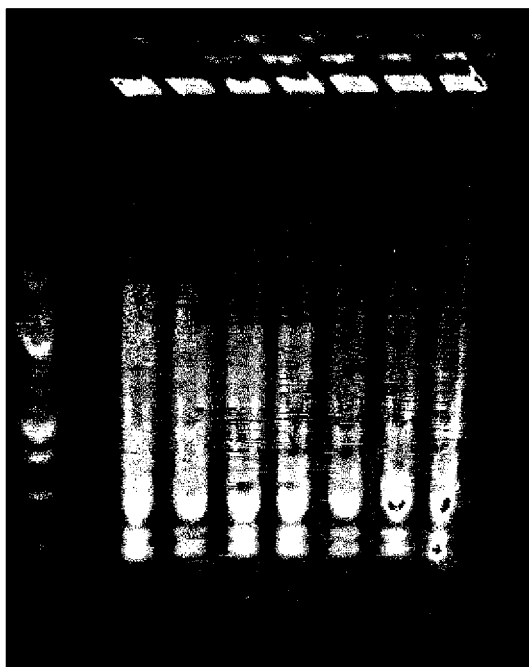


Fig. 1

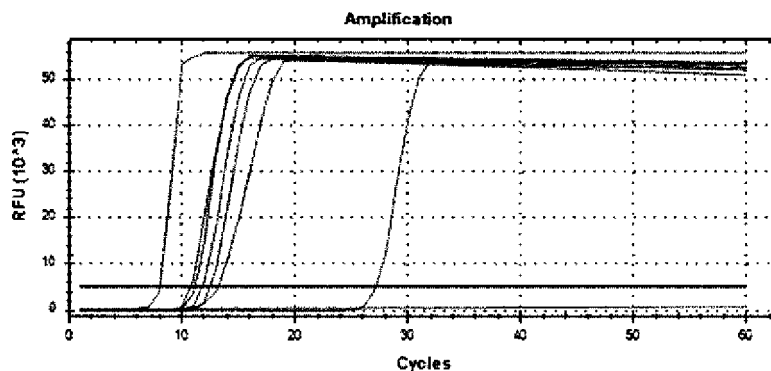


Fig. 2

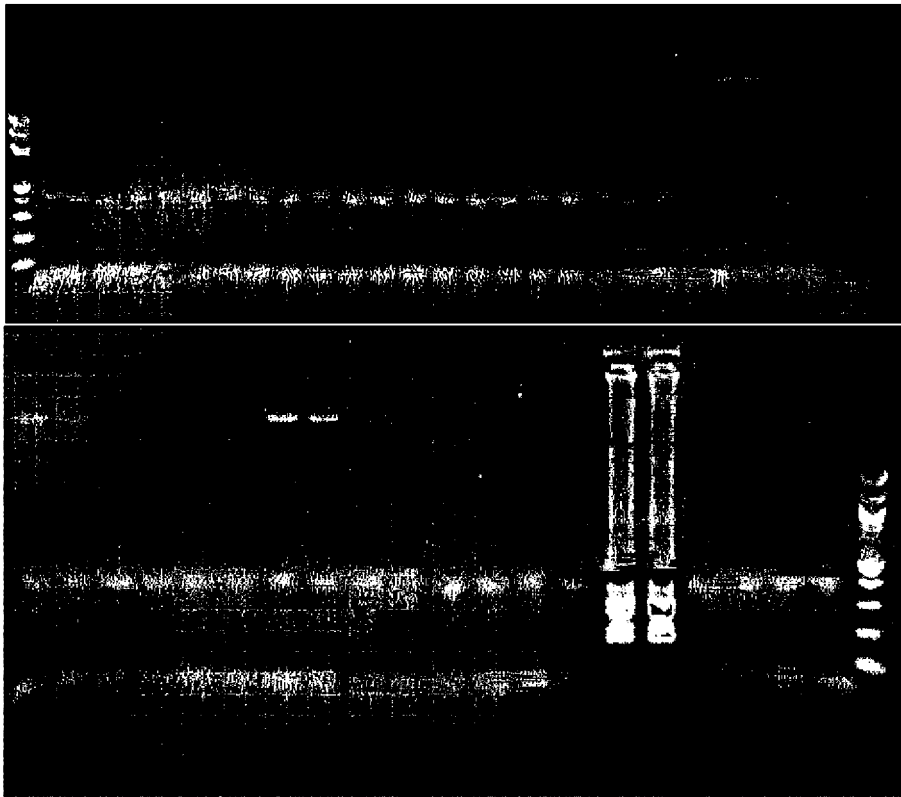


Fig. 3.

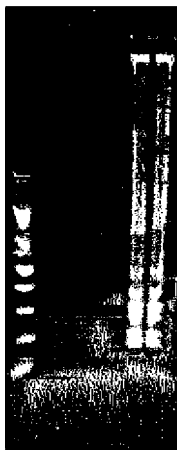


Fig. 4