



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **125669**

(13) **C2**

(51) МПК

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

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

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2020 03675	(72) Винахідник(и):	Якчіс Детлеф (DE)
(22) Дата подання заявки:	15.05.2018	(73) Володілець (володільці):	ДЕВАКТ ЛАБС ГМБХ,
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	12.05.2022		Bertha-Benz-Str. 5, 10557 Berlin, Germany (DE)
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	17203120.5	(74) Представник:	Слободянюк Алла Василівна,
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	22.11.2017		реєстр. №25
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2010/033963 A2, 25.03.2010
(41) Публікація відомостей про заявку:	12.10.2020, Бюл.№ 19		WO 2007/082259 A2, 19.07.2007
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	11.05.2022, Бюл.№ 19		WO 94/21280 A1, 29.09.1994
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2018/062466, 15.05.2018		Dynamins Are Forever: MxB Inhibits HIV-1 / Haller O. // Cell Host & Microbe. - 2013. - Vol. 14. - № 4. - P. 371-373

(54) СПОСІБ І ОБЛАДНАННЯ ДЛЯ ДИФЕРЕНЦІЮВАННЯ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ І БАКТЕРІАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЙ

(57) Реферат:

Винахід стосується обладнання для аналізу на місці надання медичної допомоги та способу диференціювання вірусних і бактеріальних інфекцій.

UA 125669 C2

Галузь техніки, до якої відноситься винахід

Даний винахід відноситься до аналізів, які виконуються на місці надання медичної допомоги (РОС) для диференціювання вірусних та бактеріальних інфекцій. Більш конкретно, винахід відноситься до імуноаналізу, який дозволяє швидко розрізнити вірусні та/або бактеріальні інфекції.

Попередній рівень техніки

Лихоманка дітей є типовою причиною звернень в центрах невідкладної допомоги як до сімейних лікарів, так і до педіатричних відділень. Найчастіше це стосується респіраторної інфекції або гастроентерита. Висока частота лихоманки в дітей і попереджувальне введення непотрібних антибіотиків є причиною розробки швидкого скринінгового тесту на біомаркери, які вказують на вірусну й/або бактеріальну інфекцію.

Важка позалікарняна пневмонія приблизно в 60 % випадків спричинена бактеріальними інфекціями і приблизно для 10 % пацієнтів вимагає госпіталізації у відділення інтенсивної терапії (ВІТ). Інші 40 % пов'язані з респіраторними вірусами. Більшість респіраторних інфекцій пов'язана з фарингітом, з яких 40 % спричинені вірусами, а 25-50 % - бета-гемолітичним стрептококом групи А. Останній викликає гострий бронхіоліт і пневмонію.

Близько 80 % усіх протимікробних препаратів призначаються при первинній медичній допомозі, і до 80 % з них призначені для лікування захворювань дихальних шляхів. Інфекції дихальних шляхів є найпоширенішою причиною кашлю при первинній медичній допомозі. Антибіотики широкого спектра дії часто призначають при кашлі, включаючи гострий бронхіт, і багато із цих призначень приносять лише незначну користь пацієнтам, якщо взагалі корисні, і можуть викликати побічні ефекти й сприяти розвитку стійкості до антибіотиків. Фактори, які спонукають лікарів призначати антибіотики, включають відсутність адекватного діагностичного маркера бактеріальних інфекцій, занепокоєння із приводу відсутності можливості спостереження за пацієнтом і нестача часу.

Як і раніше складно швидко відрізнити вірусну інфекцію від бактеріальної. Зовсім недавно було виявлено багато нових діагностичних маркерів. Деякі із цих маркерів мають значний потенціал для диференціювання вірусних інфекцій і бактеріальних інфекцій. Такі білки включають Мх-ГТФази й С-реактивний білок (СРБ).

Мх-гомолігічні білки є представниками суперродина високомолекулярних ГТФаз. Відповідно, ці ГТФази активуються інтерферонами I типу альфа/бета або II типу (ІФН). Мх-ГТФази експресуються винятково в клітинах, оброблених ІФН-альфа/бета, але не ІФН-гама. Інтерферони I типу відіграють важливу роль у реакціях вродженого імунітету й виконують імуномодуючу, антипроліферативну й противірусну функції.

Власні дослідження показали, що Мх-гомолігічні білки людини мають наступні переваги: (1) Мх-гомолігічні людські білки в людини експресуються в основному внутрішньоклітинно. Їх можна спостерігати при внутрішньоклітинному фарбуванні в більшості клітинних компартментів [16]. (2) Мх-гомолігічні білки дозозалежно індукуються [6]. (3) Мх-гомолігічні білки людини специфічно індукуються інтерферонами I типу, але не ІФН-гама, ІЛ-1, ФНО-альфа або будь-якими іншими цитокінами при бактеріальній інфекції [8,12]. (4) Мх-гомолігічні білки людини виявляються набагато довше в порівнянні з інтерфероном I типу в периферійній крові [6]. Отже, ці білки є маркером для виявлення вірусних захворювань [7,14,15]. Крім того, ці білки можуть використовуватись як маркер перевірки успішності лікування пацієнтів, які отримували інтерферони I типу [5,9,10,11]. У минулих дослідженнях ми виявляли ці білки за допомогою вестерн-блотинга після ДСН-ПАГЕ [12]. Але для цієї процедури потрібно більше двох днів. Тому ми розробили ІФА для виявлення цих білків протягом двох днів [13].

Виходячи з даних фактів і припущення про те, що інтерферони I типу залишаються в межах нормальних рівнів у пацієнтів з бактеріальними інфекціями, експресія Мх-гомолігічного білка в периферійній крові є чутливим і специфічним маркером вірусної інфекції.

Аналогічним чином, повідомляється, що більшість вірусних інфекцій викликають невисокі концентрації білків гострої фази й низькі концентрації С-реактивного білка (СРБ), рівні прокальцитоніну (ПКТ) і бактерицидного білка, що підвищує проникність (ВРІ). Таким чином, ці білки будуть використовуватись для диференціювання хвороб вірусної й бактеріальної етіології. Оскільки концентрація СРБ у плазмі швидко збільшується після стимуляції й швидко зменшується з коротким періодом напіввиведення, СРБ може бути дуже корисним інструментом для діагностики й моніторингу інфекцій і запальних захворювань. У Скандинавії аналіз СРБ на місці надання медичної допомоги є частиною звичайної оцінки пацієнтів з респіраторними інфекціями в загальній практиці, і його використання виявилось економічно ефективним. У загальній практиці СРБ вважається корисним при діагностиці бактеріальних захворювань і в частковому диференціюванні бактеріальних і вірусних інфекцій. Часто діагностична цінність

СРБ виявляється вищою, ніж для швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ), і такою ж, як у визначення кількості лейкоцитів (БКК) (білих кров'яних клітин), або вище. Недоліком даного дослідження на місці надання медичної допомоги є тривалий час аналізу. Такі тести повинні тривати від 30 хвилин до 2 годин.

Клінічно може бути складно диференціювати певні системні вірусні й бактеріальні інфекції. Бактеріальні посіви звичайно проводять у випадках важкої інфекції, такої як пневмонія, або у випадку, коли відсутність діагнозу може привести до серйозних ускладнень, таких як гострий фарингіт. Часто культури одержати важко. На жаль, культивування вірусів зазвичай не проводять через значну затримку в одержанні результатів. Нові ПЛР-панелі для вірусного скринінга є корисними, але вони дорогі й не забезпечують інформацію на місці надання медичної допомоги, оскільки результати можуть бути отримані тільки через 24 години. Таким чином, залишається необхідність розробки простого, легкого у використанні діагностичного тесту, який протягом короткого часу дозволяв би відрізнити вірусні інфекції від бактеріальних інфекцій.

В WO 2010/033963 розкритий латеральний проточний імуоаналіз для виявлення й диференціювання вірусних і бактеріальних інфекцій. Бактеріальним маркером є СРБ, а вірусним маркером є Мх-А-білок. Аналіз продається в Європі під торговельною назвою Febridx®. Однак, згідно з дослідженням, Febridx® має точність лише 63 % і 84 % для ідентифікації бактеріальних і вірусних інфекцій, відповідно [17]. Отже, усе ще існує необхідність проведення швидкого діагностичного аналізу на місці надання медичної допомоги для більш точного й надійного диференціювання бактеріальних інфекцій і вірусних інфекцій у пацієнтів.

Короткий виклад сутності винаходу

Метою даного винаходу є створення вдосконаленого й більш точного й специфічного діагностичного аналізу для надійного диференціювання протягом короткого часу бактеріальних і вірусних інфекцій у пацієнтів. Вирішення завдання є предметом даного винаходу.

Згідно з винаходом, запропоноване обладнання для імунологічного аналізу на місці надання медичної допомоги (РОС), що включає:

(а) зону нанесення зразка; і

(b) зону детекції з першим детектуючим реагентом з афінністю зв'язування з Мх-В-білком (Мх-В) і другим детектуючим реагентом з афінністю зв'язування з С-реактивним білком (СРБ/ПКТ); і

де обладнання виконане з можливістю виявлення Мх-В і СРБ/ПКТ у зразку від суб'єкта для диференціювання бактеріальної і вірусної інфекцій.

Відповідно до додаткового варіанту здійснення винаходу запропоноване обладнання для імунологічного дослідження на місці надання медичної допомоги (РОС), яке включає:

(а) зону нанесення зразка; і

(b) зону детекції з першим детектуючим реагентом з афінністю зв'язування з Мх-В-білком (Мх-В) і другим детектуючим реагентом з афінністю зв'язування з С-реактивним білком (СРБ), і третім детектуючим реагентом з афінністю зв'язування із прокальцитоніном (ПКТ) і/або четвертим детектуючим реагентом з афінністю зв'язування з бактерицидним білком, який підвищує проникність (BPI); і

де обладнання виконане з можливістю виявлення Мх-В і СРБ/ПКТ у зразку від суб'єкта для диференціювання бактеріальної і вірусної інфекцій.

Один варіант реалізації винаходу відноситься до обладнання, описаного в даному документі, яке додатково містить детектуючий реагент із афінністю зв'язування з BPI.

Один варіант реалізації винаходу відноситься до обладнання, описаного в даному документі, у якому зазначені детектуючі реагенти обрані із синтетичних молекул, нуклеотидів, нуклеїнових кислот, аптамерів, пептидів, білків, ферментів і антитіл.

Один варіант реалізації винаходу відноситься до обладнання, описаного в даній заявці, де зазначені детектуючі реагенти позначені детектованим маркером.

Ще один варіант реалізації винаходу відноситься до обладнання, описаного в даній заявці, де детектований маркер обраний з поміж ферментної мітки, флуоресцентної мітки, радіоактивної мітки, мітки у вигляді частки, кольорової латексної частки, кольорової пластикової частки, кольорової люмінофорної частки й флуоресцентної частки.

Ще один варіант реалізації винаходу відноситься до обладнання, описаного в даній заявці, що додатково містить тестове вікно, сконструйоване для забезпечення можливості спостереження за результатами тесту.

Ще один варіант реалізації винаходу відноситься до обладнання, описаного в даній заявці, де детектуючі реагенти хімічно кон'юговані з детектованим маркером для утворення постійного незворотного комплексу реагент-маркер.

Додатковий варіант реалізації винаходу відноситься до обладнання, описаного в даній заявці, де детектований маркер, кон'югований з детектуючим реагентом, сконструйований так, щоб бути видимим для користувача, коли зразок є позитивним за Мх-В і/або СРБ і/або ПКТ і/або ВРІ.

5 Ще один варіант реалізації винаходу відноситься до обладнання, описаного в даній заявці, де обладнання сконструйоване для виявлення ПКТ і/або ВРІ у зразках крові людини.

Один з варіантів здійснення винаходу відноситься до способу диференціювання бактеріальної і вірусної інфекцій в суб'єкта, який включає стадії:

- (а) одержання зразка від зазначеного суб'єкта;
- 10 (b) забезпечення тест-системи, описаної в даній заявці;
- (с) внесення зразка в тест-систему;
- (d) відслідковування відсутності або наявності детектованого комплексу реагент-маркер для визначення присутності в зразку Мх-В і/або СРБ, і/або ПКТ, і/або ВРІ; і
- (е) визначення інфекційного статусу пацієнта.

15 Один варіант реалізації винаходу відноситься до описаного в даній заявці способу, де:

- (а) наявність Мх-В і відсутність і/або низьке виявлення СРБ/ПКТ/ВРІ указує на вірусну інфекцію;
- (b) відсутність Мх-В і присутність СРБ/ПКТ/ВРІ указує на бактеріальну інфекцію; і
- (с) присутність Мх-В і присутність СРБ/ПКТ/ВРІ указує на змішану інфекцію.

20 Ще один варіант реалізації винаходу відноситься до описаного в даній заявці способу, який додатково передбачає аналіз відсутності або присутності детектованого комплексу реагент-маркер для визначення наявності в зразку СРБ/ПКТ/ВРІ.

Один варіант реалізації винаходу відноситься до описаного в даній заявці способу, де:

- (а) наявність Мх-В і відсутність СРБ/ПКТ і ВРІ указує на вірусну інфекцію;
- 25 (b) відсутність Мх-В і наявність СРБ/ПКТ і ВРІ указує на бактеріальну інфекцію; і
- (с) наявність Мх-В і наявність СРБ/ПКТ і ВРІ указує на змішану інфекцію.

Ще один варіант реалізації винаходу відноситься до описаного в даній заявці способу, у якому зразок є зразком крові.

30 Ще один варіант реалізації винаходу відноситься до описаного в даній заявці способу, де присутність Мх-В, СРБ/ПКТ і/або ВРІ можна спостерігати неозброєним оком.

Короткий опис креслень

Фігура 1А зображає приблизний тестовий набір, який складається із трьох тест-смужок, покритих міченими антитілами.

35 Фігура 1В зображає різні зображення тестів для вірусних інфекцій, бактеріальних інфекцій, змішаних інфекцій або інфекцій невизначеної природи.

Фігура 2 показує результати для різних вірусних і бактеріальних патогенів.

Опис варіантів здійснення

40 Даний винахід забезпечує аналіз на місці надання медичної допомоги (РОС), який протягом короткого часу дозволяє відрізнити вірусні інфекції від бактеріальних інфекцій. Зокрема, запропоновано діагностичне обладнання для дослідження на місці надання медичної допомоги (РОС), яке містить тестові маркери для вірусної й бактеріальної інфекції, яке ефективно допомагає лікареві швидко відрізнити вірусні від бактеріальних інфекцій. Аналіз на місці надання медичної допомоги має наступні переваги:

- 1) цей аналіз дозволяє значно скоротити витрати на охорону здоров'я за рахунок зниження помилкової діагностики й, отже, надмірного й неправильного використання антибіотиків.
- 2) ефективність і вірогідність цього аналізу такі, що резистентність до антибіотиків буде знижена, оскільки антибіотики будуть використовуватися лише за наявності бактеріальної інфекції.

3) цей аналіз збільшить діагностичний пакет лікарського кабінету й фармацевтів.

50 Таким чином, даний винахід сприяє правильному застосуванню антибіотиків. Це означає використання антибіотиків тільки за необхідності, та їх правильне застосування у випадку, коли вони потрібні.

Антибіотики не протидіють інфекціям, які викликаються вірусами, таким як застуда, грип, більшість видів ангіни й бронхіт. Навіть багато інфекцій синуса й вух можна лікувати без антибіотиків. Замість цього полегшення симптомів може бути кращим варіантом лікування цих інфекцій. Приймання антибіотиків при вірусних інфекціях, таких як застуда, грип, біль у горлі й бронхіт:

- не лікує інфекцію;
- не перешкоджає захворюванню інших людей;
- 60 не допоможе вам або вашій дитині почувати себе краще;

може викликати непотрібні й шкідливі побічні ефекти; а також може сприяти розвитку стійкості до антибіотиків, коли бактерії здатні протистояти впливу антибіотика й продовжують заподіювати шкоду.

Неправильно призначені антибіотики мають сумнівну терапевтичну користь і піддають пацієнтів потенційним ускладненням терапії антибіотиками. Таким чином, швидкий результат, отриманий у ході дослідження на місці надання медичної допомоги, дозволяє поставити правильний діагноз і підтримати практикуючого лікаря в його рішенні щодо правильного призначення ліків.

Для аналізу на місці надання медичної допомоги можуть застосовуватися різні обладнання, наприклад, обладнання для латерального проточного імуноаналіза або система оптичних датчиків, призначена для взаємодії з мобільним комп'ютерним обладнанням, як описано в WO2016/116181.

Таким чином, відповідно до одного варіанту здійснення даного винаходу використовується обладнання для аналізу зразків, наприклад, тест-смужка, для визначення того, чи є інфекція бактеріальною або вірусною. Тест-смужка має зону нанесення зразка й зону детекції. У цьому способі беруть зразок і переносять на тест-смужку. Зона детекції включає щонайменше один реагент, специфічний для бактеріального маркера, і щонайменше один реагент, специфічний для вірусного маркера.

В одному варіанті здійснення маркер для вірусної інфекції є Мх-В, а маркер для бактеріальної інфекції є С-реактивним білком (СРБ). Високі рівні білка Мх-В тісно пов'язані із системною вірусною інфекцією. Білки стійкості до міксовірусів (Мх), індуковані інтерфероном, відіграють важливу роль у боротьбі із широким спектром вірусних інфекцій. Мх-гомологічні білки інгібують РНК і ДНК-вмісні віруси.

Недавно було виявлено, що Мх-В-білок є важливим білком, який транспортує вірусні компоненти із клітини [2]. Наприклад, ВІЛ-білок транспортується й знищується білком Мх-В, але не білком Мх-А [1]. Таким чином, у даному аналізі на місці надання медичної допомоги використовують Мх-В-білок, оскільки він має тільки 63 % гомології з білком Мх-А і, отже, є функціональним Мх-білком у родині Мх ГТФаз [3]. Було показано, що Мх-В сильно інгібує вірусні інфекції за рахунок зниження рівня інтегрованої вірусної ДНК. Крім того, білок Мх-В перебуває усередині ядра й цитоплазми. Напроти, білок Мх-А перебуває тільки в цитоплазмі [4]. Виходячи з нових результатів автори даного винаходу обрали Мх-В як надійний маркер вірусних інфекцій.

С-реактивний білок (СРБ), білок гострої фази, який продукується печінкою у відповідь на інфекцію, є надійним біомаркером бактеріальних інфекцій. Рівні СРБ у здорових людей становлять менше 0,5 мг/л, і підвищені у станах інфекції.

Прокальцитонін (ПКТ) є поліпептидним гормоном, який складається із 116 амінокислот. Цей білок в основному виробляється С-клітинами щитовидної залози. Зазвичай рівень ПКТ у крові дуже обмежений. Напроти, під час бактеріальної інфекції цей білок експресується й перебуває в діапазоні від 0,5 нг/мл до 2 нг/мл. Перевага цього білка полягає в тому, що він виявляється через 6 годин після зараження, тоді як СРБ виявляється, найраніше, через 12-16 годин.

Відповідно до одного варіанту здійснення даний винахід відноситься до швидкого скринінгового тесту для ідентифікації Мх-В і/або СРБ/ПКТ/ВРІ у зразку пацієнта. Зразок може бути, наприклад, зразком периферійної крові, аспіратами з носоглотки, слизою, спинномозковою рідиною й аспіратами із середнього вуха.

Бактерицидний білок, який підвищує проникність (ВРІ) є плюрипотентним білеом, розташованим у нейтрофілах і тканинах, який, імовірно, відіграє ключову роль у захисті хазяїна від грамнегативних бактерій і їх ендотоксинів внаслідок своїх властивостей як антибіотика й здатності до нейтралізації й видалення ендотоксинів. ВРІ вважається додатковим біологічним маркером для вдосконаленого тесту на місці надання медичної допомоги з метою підвищення надійності й точності тесту. Під час бактеріальної інфекції цей білок експресується, і перебуває в діапазоні від 1 мкг/мл до 20 мкг/мл.

Таким чином, додатковий варіант реалізації винаходу відноситься до тесту на місці надання медичної допомоги для ідентифікації Мх-В, ВРІ і/або СРБ/ПКТ у зразку пацієнта.

Відповідно до одного варіанту здійснення винаходу зона детекції включає щонайменше один реагент із афінністю зв'язування з вірусним маркером Мх-В і щонайменше один реагент із афінністю зв'язування з бактеріальним маркером СРБ/ПКТ, і за необхідності щонайменше один реагент із афінністю зв'язування з ВРІ, так що при контакті присутніх у зразку маркерів з відповідними реагентами утворюється мічений комплекс. Зона детекції має партнера по зв'язуванню бактеріального маркера, який зв'язується з першим міченим комплексом, і партнера по зв'язуванню вірусного маркера, який зв'язується із другим міченим комплексом. Потім зразок аналізують на наявність вірусного маркера й/або бактеріального маркера.

Зона детекції може бути функціоналізована шляхом іммобілізації різних рецепторних молекул, які специфічно зв'язуються з відповідними маркерами. Рецепторні молекули можуть бути обрані з поміж молекул природного походження, наприклад, антитіл, фрагментів антитіл або тому подібного. Рецепторні молекули можуть бути синтетичними молекулами, наприклад, аптамерами. Зона детекції містить щонайменше одну сенсорну область, на якій як рецептори для визначення відповідних маркерів розташовані антитіла або інші рецептори, що забезпечують специфічність, такі як аптамери, які специфічно зв'язуються з відповідними маркерами, що підлягають виявленню. Таким чином, забезпечується ефективна, проста в застосуванні функціоналізація поверхні сенсорної області.

Антитіла або інші рецептори, які забезпечують специфічність, такі як, наприклад, аптамери, мають високу селективність при виявленні специфічних аналізованих речовин; отже, вони є особливо придатними для розпізнавання специфічних маркерів захворювання. Що стосується можливих рецепторів, антитіла, розташовані на сенсорній поверхні, або інші рецептори, що забезпечують специфічність, такі як аптамери, наприклад, зв'язують аналіт, який потрібно виявити, і потім призводять до зміни властивостей. У деяких варіантах здійснення аптамери мають ту перевагу, що вони є більш стабільними й, отже, постійно функціонують.

Оскільки аптамери мають подібне до антитіл застосування, численні методи виявлення, які використовують переваги антитіл, можуть бути перетворені на методи на основі аптамерів. Наприклад, більшість імуноаналізів для малих молекул є конкурентними аналізами, в основі яких є заміна поверхнево-зв'язаних антитіл аналізованою речовиною в розчині.

Один з варіантів реалізації обладнання запропонованого даним винаходом має зону нанесення зразка.

Ще один варіант реалізації винаходу відноситься до обладнання, яке додатково має зону реагенту. Зона реагенту містить щонайменше один реагент, специфічний для вірусного маркера, так що, коли присутній у зразку вірусний маркер контактує із зазначеним реагентом, утворюється мічений комплекс вірусного реагенту. Крім того, зона реагенту містить щонайменше один реагент, специфічний для бактеріального маркера, так що, коли присутній у зразку бактеріальний маркер контактує із зазначеним реагентом, утворюється мічений комплекс бактеріального реагенту. В одному варіанті здійснення винаходу зона реагенту містить один реагент, специфічний для бактеріального маркера СРБ/ПКТ, і один реагент, специфічний для бактеріального маркера ВРІ, так що, коли зазначені присутні у зразку бактеріальні маркери контактують із зазначеними реагентами, утворюються мічені комплекси.

Зона детекції на обладнанні має партнера по зв'язуванню вірусного маркера, який зв'язується з міченим комплексом вірусного реагенту, і партнера по зв'язуванню бактеріального маркера, який зв'язується з міченим комплексом бактеріального реагенту. Обладнання може бути тест-смужкою для хроматографії.

У кратшому варіанті здійснення присутність вірусного маркера або бактеріального маркера проявляється у вигляді тестової лінії, яку можна бачити неозброєним оком. Присутність вірусного маркера може вказуватися першою тестовою лінією, у той час як присутність бактеріального маркера вказується другою і/або третьою тестовою лінією. У деяких варіантах здійснення перша тестова лінія має перший колір при позитивній реакції, а друга тестова лінія має другий колір, який відрізняється від першого кольору, при позитивній реакції, і/або третя тестова лінія має третій колір, відмінний від першого й другого кольору, при позитивній реакції. У варіантах здійснення, у яких перша, друга й третя тестові лінії розташовані в тому самому місці на обладнанні аналізу зразків, вони переважно мають різні кольори, які проявляються, якщо перша, друга й/або третя тестові лінії є позитивними.

В одному варіанті здійснення дві або три тестові лінії просторово відділені одна від одної на обладнанні. У такому варіанті здійснення колір може бути однаковим, коли тестові лінії є позитивними.

В одному варіанті здійснення винаходу аналізований зразок наносять на носій. Носій може бути виготовлений з одного хроматографічного матеріалу або краще кількох капілярних активних матеріалів, виготовлених з однакових або різних матеріалів і закріплених на основі носія. Ці матеріали перебувають у тісному контакті один з одним, утворюючи транспортний шлях, по якому рідина, під впливом капілярних сил, тече із зони нанесення, проходячи зону реагенту, до однієї або кількох зон детекції.

Бажано зразок безпосередньо наносять на носій шляхом занурення зони нанесення носія в зразок. Альтернативно, нанесення зразка на носій може бути здійснене шляхом збору зразка сухим або змоченим елементом для відбору проб, з якого зразок може бути перенесений, за необхідності після зволоження, у зону нанесення носія. Звичайно елемент для відбору проб є стерильним, і може бути сухим або попередньо обробленим рідиною перед процесом відбору.

Матеріали, придатні для елементів для відбору проб відповідно до винаходу, можуть включати синтетичні матеріали, ткани матеріали або волокнисті матеріали.

Залежно від типу способу виявлення в зоні реагентів, яка перебуває між зоною нанесення й зоною детекції, присутні різні реагенти. У сендвіч-імуноаналізі бажано присутній мічений, не іммобілізований реагент у зоні реагенту, який є специфічним для обумовленого вірусного й бактеріального маркера. Таким чином, коли вірусний або бактеріальний маркер, присутній у зразку, контактує з відповідним міченим вірусним або бактеріальним реагентом, присутнім у зоні реагенту, між маркером і відповідним міченим реагентом утворюється мічений комплекс. Мічений комплекс, у свою чергу, здатний формувати додатковий комплекс із іммобілізованим партнером по зв'язуванню вірусного або бактеріального маркера в зоні детекції. У конкурентному імуноаналізі зона реагенту бажано містить мічений, не іммобілізований аналог маркера, який конкурує з маркером за зв'язування маркера з іммобілізованим партнером в зоні детекції. Партнерами по зв'язуванню маркера в зоні реагенту й у зоні детекції бажано є моноклональні, поліклональні або рекомбінантні антитіла або фрагменти антитіл, здатні специфічно зв'язуватися з відповідним маркером.

Виявлення маркера може бути досягнуте в зоні детекції. Іммобілізована молекула зв'язує мічений комплекс або мічений маркер-аналог за допомогою імунної реакції або іншої реакції в зоні детекції, створюючи тим самим видиму тестову лінію в зоні детекції під час процесу. Переважно мітка є придатною для оптичного виявлення міткою. Формування комплексу в зоні детекції іммобілізує мітку, і тестова лінія стає видимою неозброєним оком, що вказує на позитивний результат тесту. Придатними є прямі мітки, наприклад, особливо золоті мітки, які найкраще розпізнаються неозброєним оком. Крім того, пристрій для електронного зчитування (наприклад, на основі фотометричного, акустичного, імпедиметричного, потенціометричного і/або амперометричного перетворювача) може використовуватись для отримання більш точних результатів і напівкількісного визначення аналізованої речовини. Іншими придатними мітками можуть бути латекс, флуорофори або люмінофори.

В одному варіанті здійснення чутливість візуально зчитуваних латеральних проточних імуноаналізів підвищують шляхом додавання невеликої кількості кон'югатів флуоресцентного барвника або флуоресцентних латексних гранул до вихідного матеріалу кон'югата. Коли тестова лінія видимого спектра є візуально наявною, результат тесту спостерігають і реєструють.

В одному варіанті здійснення винаходу реагенти сконструйовані так, що видима тестова лінія, яка свідчить про присутність вірусного маркера, буде відділена від тестових ліній, які свідчать про присутність бактеріальних маркерів. Отже, можна легко визначити, чи містить зразок бактеріальні або вірусні маркери (або їх обидва) просто за місцем розташування тестових ліній у зоні детекції. В іншому кращому варіанті здійснення реагенти можуть бути обрані таким чином, щоб формувалися тестові лінії різного кольору. Тобто присутність вірусного маркера буде викликати проявлення лінії, забарвленої в інші кольори, ніж при наявності бактеріального маркера. Наприклад, мітка, яка відповідає реагенту, що розпізнає вірусний маркер, може бути червоною, тоді як мітка, яка відповідає реагенту, який розпізнає бактеріальні маркери, може бути зеленою. Пофарбовані у різний спосіб мітки, які можуть бути прикріплені до не-іммобілізованих реагентів, добре відомі. Деякі приклади включають колоїдне золото, колоїдний селен, колоїдний вуглець, латексні гранули, парамагнітні гранули, флуоресцентні й хемілюмінесцентні агенти, та їх суміші, але не обмежуються ними.

На Фігурі 1 показана хроматографічна тест-смужка з тест-лінією, яка відповідає присутності вірусного маркера, другою окремою тест-лінією, яка свідчить про присутність першого бактеріального маркера й третьою, окремою тест-лінією, яка свідчить про присутність другого бактеріального маркера. Зразок наносять на зону нанесення тест-смужки. Як показано на Фігурі 1, зразок потім проходить зону реагенту, що містить щонайменше один мічений партнер по зв'язуванню вірусу й щонайменше один мічений партнер по зв'язуванню бактерій. Мічений вірусний партнер по зв'язуванню здатний специфічно зв'язуватися з вірусним маркером, який представляє інтерес, з утворенням кон'югата, який, у свою чергу, здатний специфічно зв'язуватися з іншим специфічним реагентом або партнером по зв'язуванню в зоні детекції. Мічений бактеріальний партнер по зв'язуванню здатний специфічно зв'язуватися з бактеріальним маркером, який представляє інтерес, з утворенням кон'югата, який, у свою чергу, здатний специфічно зв'язуватися з іншим специфічним реагентом або партнером по зв'язуванню в зоні детекції.

Тест-смужка також включає зону детекції, яка містить щонайменше одну першу секцію для виявлення вірусного маркера, наприклад, тестову лінію, що включає іммобілізований специфічний партнер по зв'язуванню, комплементарний до комплексу вірусних реагентів,

утвореного вірусним маркером і його міченим партнером по зв'язуванню. Таким чином, на тестовій лінії партнери по зв'язуванню із зони детекції захоплюють мічені вірусні партнери по зв'язуванню із зони реагенту разом зі своїми зв'язаними вірусними маркерами. Така локалізація вірусного маркера з його міченими партнерами по зв'язуванню викликає проявлення тестової лінії. На тестовій лінії присутність вірусного маркера визначають якісним і/або кількісним зчитуванням показань тестової лінії, отриманих у результаті накопичення мічених партнерів по зв'язуванню.

Зона детекції також включає щонайменше одну ділянку для виявлення щонайменше одного бактеріального маркера, наприклад, тестову лінію, яка містить іммобілізований специфічний партнер по зв'язуванню, комплементарний до комплексу бактеріальних реагентів, утвореного бактеріальним маркером і його міченим партнером по зв'язуванню. Таким чином, на тестовій лінії партнери по зв'язуванню із зони детекції захоплюють бактеріальні мічені партнери по зв'язуванню із зони реагенту разом зі своїми зв'язаними бактеріальними маркерами. Ця локалізація бактеріального маркера з його міченими партнерами по зв'язуванню забезпечує індикацію на тестовій лінії. На тестовій лінії присутність бактеріального маркера визначається якісним і/або кількісним зчитуванням показань тестової лінії, яка виникає у результаті накопичення мічених партнерів по зв'язуванню.

В одному варіанті здійснення винаходу зона детекції може містити додаткову тестову лінію для виявлення другого бактеріального маркера.

Один приклад тесту на місці надання медичної допомоги для диференціювання вірусної й бактеріальної інфекції показано на Фігурі 1. Як обговорювалося вище, Мх-В є діагностичним маркером вірусної інфекції, тоді як СРБ і ВРІ є діагностичними маркерами бактеріальної інфекції. Позитивний результат для білка Мх-В, з негативним результатом для білка СРБ/ПКТ і ВРІ указує на вірусну інфекцію. Позитивний результат для СРБ/ПКТ і ВРІ з негативним результатом для білка Мх-В указує на бактеріальну інфекцію. Слабкий позитивний результат для Мх-В, СРБ/ПКТ і ВРІ указує на інфікування як бактерією, так і вірусом (змішана інфекція). Відсутність бактеріальної або вірусної інфекції вказується негативним результатом за Мх-В, СРБ/ПКТ і ВРІ. Хоча конкретні кольори ліній обговорюються в цьому прикладі, інші кольори або однакові кольори в різних місцях на тест-смужці для позначення вірусних або бактеріальних маркерів перебувають у межах сутності даного винаходу.

Коли використовують різнокольорові лінії, лінії можуть бути розділені або не розділені проміжком. В останньому випадку мітки вибираються таким чином, щоб колір, видимий при наявності обох маркерів, відрізнявся від кольорів, видимих при наявності окремих маркерів. Наприклад, наявність вірусного маркера може бути позначена червоною лінією; наявність бактеріального маркера може бути позначена синьою лінією; і наявність обох маркерів позначена фіолетовою лінією (як комбінація червоного й синього кольору).

В іншому варіанті здійснення тест-смужка також може включати контрольну секцію, яка вказує на функціональність тест-смужки. При її наявності контрольна секція може сигналізувати користувачеві про те, що обладнання спрацювало. Наприклад, контрольна секція може містити реагент (наприклад, антитіло), який буде зв'язуватися з міченими реагентами із зони реагентів. Як додаткова альтернатива контрольна секція може містити іммобілізовані вірусні й бактеріальні маркери, які будуть реагувати з надлишком міченого реагенту із зони реагенту. Контрольна секція може бути розташована вище або нижче за ходом потоку від зони детекції. Індикатор позитивного контролю повідомляє користувача, що зразок пройшов необхідну відстань через тестове обладнання.

Мх-гомологи також можуть бути виявлені приблизно при 10 % бактеріальних інфекцій, пов'язаних з лихоманкою. Щоб підвищити надійність тесту, граничне значення для білка Мх-В встановлюється в діапазоні 0,01-0,05 Од./10 000 лейкоцитів, бажано 0,025 Од./10000 лейкоцитів. Для СРБ граничне значення встановлюється в діапазоні 5-100 мг/л або в діапазоні 25-75 мг/л, або становить 40 мг/л. Для ПКТ граничне значення встановлюється в діапазоні від 0,5 нг/мл до >2 нг/мл. Для ВРІ граничне значення встановлюється в діапазоні від 1 мкг/мл до >10 мкг/мл.

Приклади

Наведені нижче Приклади повинні допомогти зрозуміти винахід, але не призначені й не повинні розглядатися як такі, що обмежують будь-яким чином обсяг винаходу. Приклади не включають докладного опису традиційних способів. Такі способи добре відомі фахівцям у даній галузі техніки.

Приклад 1 - Опис аналізу

Аналіз на місці надання медичної допомоги виконують за допомогою обладнання з латеральним потоком. Відповідні реагенти, необхідні для кожного аналізу, уже включені в картридж.

Етап А: Під дією адгезивної сили крапля крові (приблизно 0,005 мл - 0,010 мл) переноситься з картриджа в обладнання.

Етап В: Насамперед, клітини в краплі крові лізуються за рахунок дії приблизно 0,001 мл літичного буфера, який складається з 20 % NP-40, 100 мМ Трис-HCL, рН 7,2, 0,05 % азиду натрію).

Етап С. Лізована кров спрямовується по двом тест-смужками й, таким чином, інкубується.

Етап D: Розчин антитіл 1 проти Мх-В зв'язує можливий присутній білок Мх-В у крові. Це антитіло вже кон'юговане з міченим маркером.

Етап D: Зв'язаний білок Мх-В направляється через розчин другого носія, у якому перебуває друге антитіло проти Мх-В. Тільки вже зв'язаний білок Мх-В з першим міченим антитілом буде зв'язаний із другим антитілом.

Етап Е: Після промивання розчином носія перше мічене й зв'язане антитіло стає видимим у формі кольорової реакції на смужці.

Етап F: Детекцію СРБ/ПКТ/ВРІ проводять, як описано на етапах А-Е, де на другій тест-смужці використовують одне антитіло проти СРБ/ПКТ і одне антитіло проти ВРІ.

Приклад 2 - Процедура аналізу

У двох різних відділеннях швидкої допомоги в невідомих пацієнтів тестували білок Мх-А, білок Мх-В, СРБ/ПКТ і ВРІ у цільній крові. Усі пацієнти дали інформовану згоду згідно Хельсінкської угоди, що їх дані призначені винятково для досліджень. Згодом у ході досліджень був продовжений анамнез і визначене походження інфекції. Таким чином, можна розрізнити 120 вірусних інфекцій і 50 бактеріальних інфекцій. Результат цього дослідження задокументовано на Фігурі 2. За допомогою білка Мх-В було виявлено 92 % вірусних інфекцій. Напроти, тільки 77 % ідентичних вірусних захворювань були виявлені з використанням білка Мх-А. За допомогою визначення білків СРБ/ПКТ/ВРІ спектр для виявлення бактеріальних захворювань був збільшений до 90 %. Якби визначались лише білок СРБ і ПКТ, було б виявлено тільки 80 % бактеріальних захворювань. Таким чином, комбінація маркерів білка Мх-В для вірусних захворювань і СРБ/ПКТ/ВРІ для бактеріальних захворювань призводить до підвищення чутливості або специфічності детекції більше 90 %.

Приклад 3 – Результати.

Опис результатів вірусної інфекції: щоб довести, що кольорова реакція функціонує, обидві контрольні смужки на лівій стороні були контрольними. Середня смужка зверху забарвлюється, смужка внизу залишається безбарвною. Обидві смужки праворуч залишаються безбарвними.

Опис результатів для бактеріальної інфекції: обидві смужки в середині залишаються безбарвними, одна верхня теж, але нижня смужка праворуч забарвлюється.

Опис результатів для змішаної інфекції: середня смужка зверху, а також нижня смужка праворуч забарвлюється.

ДЖЕРЕЛА ІНФОРМАЦІЇ:

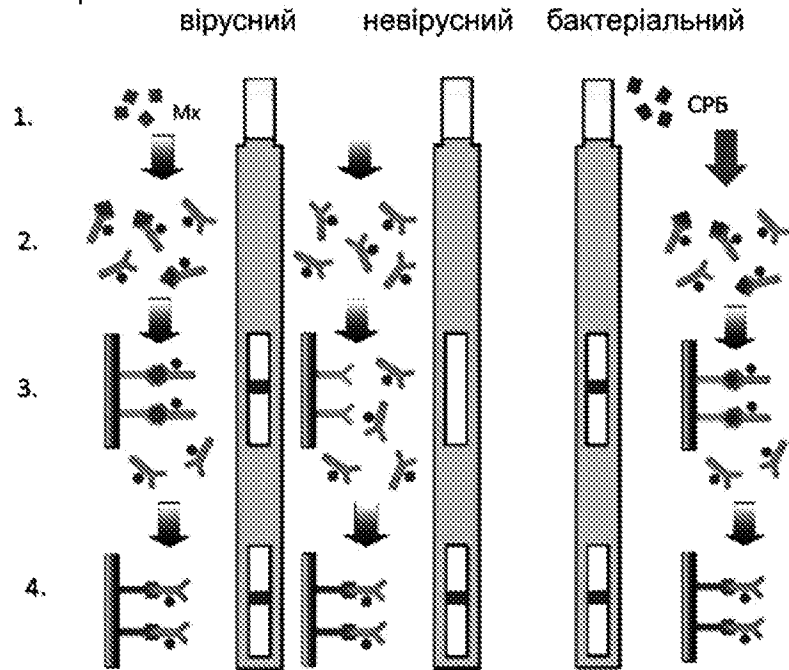
1. Haller. O., Dynamms are forever MxB inhibits HIV-1 Cell Host Microbe 2013 Oct 16;14(4) 371-3
2. Wei W, et al. Accumulation of Mx-B/Mx2-resistant HIV-1 Capstd Variants During Expansion of the HIV-1 Epidemic in human populations EBioMedicine 2016 Jun; 8 230-236.
3. Melen, K., et al. Human Mx-B protein, an interferon-alpha inducible GTPase contains a nuclear targeting signal and is localized in the heterochromatin-region beneath the nuclear envelope J Biol Chem 1996 Sep 20;271(38) 23478-86.
4. Gao, S., et al Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like Mx-A Nature 2010 May 27;465(7297)502-6.
5. Wussow, P.v., et al, Humoral response to recombinant IFN- α 2b in patients receiving recombinant IFN- α therapy J Interferon Res 1989 Sep;9 Suppl 1 S25-31.
6. Jakschies. D., et al., Emergence and decay of the human MX homolog in mononuclear cells from cancer patients during and after IFN- α therapy J Biol Response Mod 1990 Jun, 9(3) 305-12
7. Wussow. P v. et al. The interferon-induced MX-homologous protein in patients with symptomatic HIV-1 infection AIDS 1990 Feb, 4(2) 119-24.
8. Wussow, P.v., et al. The human MX-homologous protein is specifically induced by type-I-IFNs Eur. J. Immunology 1990 Sep; 20(9). 2015-2019.
9. Jakschies D, et al. Correlation of the antiproliferative effect and the Mx-homologous protein induction by IFNs in patients with malignant melanoma J Invest Dermatol 1990 Dec, 95(6 Suppl) 238S-241S.

10. Wussow, P.v., et al., Effective natural interferon-alpha therapy in recombinant interferon-alpha-resistant patients with hairy-cell leukemia Blood 1991 Jul 1;78(1):38-43.
11. Wussow, P.v., et al., Treatment of and RIFN- α -2 antibody positive CML-patients with natural IFN- α , Br J Haematol 1991 Jun;78(2) 210-6.
12. Jakschies, D., et al., The human IFN-induced Mx-homologous proteins identified by 2D SDS-PAGE is specifically induced by type I-interferons (1991) Proc 1st Meeting on 2-D-Electrophoresis London, 16-18.7.1991:163.
13. Towbin, H., et al., A whole blood immunoassay for the interferon-inducible human Mx-protein J Interferon Res 1992 Apr 12(2) 67-74
14. Jakschies, D., et al., Strong transient expression of the interferon-induced Mx A-protein in hepatitis A, but not in acute hepatitis B and C Hepatology 1994 Apr 19(4):857-65.
15. Rump, J.A., et al., Common variable immunodeficiency (CVID) and Mx-A-protein expression in blood leucocytes Clin Exp Immunol 1995 Jul, 101(1) 89-93.
16. Al-Masri, A., et al., Intracellular staining of Mx proteins in cells from peripheral blood, bone marrow and skin Mod Pathol 1997 Feb;50(1) 9-14.
17. Self W.H., et al., Diagnostic Accuracy of Febrile A Rapid Test to Detect Immune Responses to Viral and Bacterial Upper Respiratory Infections. J Clin Med 2017 Oct 7; 6 (10).

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Обладнання для аналізу на місці надання медичної допомоги (РОС), яке включає:
 - (a) зону нанесення зразка; і
 - (b) зону детекції з першим детектуючим реагентом з афінністю зв'язування з Мх-В-білком (Мх-В) і другим детектуючим реагентом з афінністю зв'язування з С-реактивним білком (СРБ/ПКТ); і
- де обладнання виконане з можливістю виявлення Мх-В і СРБ/ПКТ у зразку від суб'єкта, що дозволяє відрізнити бактеріальну й вірусну інфекції.
2. Обладнання за п. 1, яке **відрізняється** тим, що додатково включає третій детектуючий реагент із афінністю зв'язування з ВРІ.
3. Обладнання за п. 1 або 2, яке **відрізняється** тим, що зазначені детектуючі реагенти вибрані з-поміж синтетичних молекул, нуклеотидів, нуклеїнових кислот, аптамерів, пептидів, білків, ферментів і антитіл.
4. Обладнання за п. 3, яке **відрізняється** тим, що зазначені детектуючі реагенти марковані детектованим маркером.
5. Обладнання за п. 4, яке **відрізняється** тим, що детектований маркер вибраний з-поміж ферментної мітки, флуоресцентної мітки, радіоактивної мітки, мітки у вигляді частки, кольорової латексної частки, кольорової пластмасової частки, кольорової люмінофорної частки й флуоресцентної частки.
6. Обладнання за будь-яким із пп. 1-5, яке **відрізняється** тим, що додатково включає тестове вікно, виконане з можливістю спостереження за результатами тесту.
7. Обладнання за будь-яким із пп. 4-6, яке **відрізняється** тим, що детектуючі реагенти хімічно кон'юговані з детектованим маркером для утворення постійного незворотного комплексу реагент-маркер.
8. Обладнання за будь-яким із пп. 4-7, яке **відрізняється** тим, що детектований маркер, кон'югований з детектуючим реагентом, сконструйований так, щоб бути видимим для користувача, коли зразок є позитивним за Мх-В і/або СРБ, і/або ПКТ, і/або ВРІ.
9. Обладнання за будь-яким із пп. 1-8, яке **відрізняється** тим, що виконане з можливістю якісного й/або кількісного визначення наявності Мх-В і/або СРБ, і/або ПКТ, і/або ВРІ у зразках крові людини.
10. Спосіб диференціювання бактеріальної і вірусної інфекцій в суб'єкта, який включає стадії:
 - (a) одержання зразка від зазначеного суб'єкта;
 - (b) забезпечення тест-системи за будь-яким із пп. 1-9;
 - (c) внесення зразка в тест-систему;
 - (d) спостереження відсутності або наявності детектованого комплексу реагент-маркер для визначення наявності в зразку Мх-В і/або СРБ, і/або ПКТ, і/або ВРІ; де
 - (e) наявність Мх-В і відсутність або низький рівень СРБ/ПКТ вказує на вірусну інфекцію;
 - (f) відсутність Мх-В і наявність СРБ/ПКТ вказує на бактерійну інфекцію;
 - (g) наявність Мх-В і наявність СРБ/ПКТ вказує на змішану інфекцію, і
 - (h) тим самим визначення інфекційного статусу пацієнта.
11. Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що додатково передбачає виявлення відсутності або наявності детектованого комплексу реагент-маркер для визначення наявності в зразку ВРІ.

12. Спосіб за п. 11, який **відрізняється** тим, що
- (a) наявність Мх-В і відсутність СРБ/ПКТ і ВРІ свідчить про вірусну інфекцію;
 - (b) відсутність Мх-В і наявність СРБ/ПКТ і ВРІ свідчить про бактеріальну інфекцію; і
 - (c) наявність Мх-В і наявність СРБ/ПКТ і ВРІ свідчить про змішану інфекцію.
- 5 13. Спосіб за будь-яким із пп. 10-12, який **відрізняється** тим, що зразок є зразком крові.
14. Спосіб за будь-яким із пп. 10-13, який **відрізняється** тим, що наявність Мх-В, СРБ/ПКТ і/або ВРІ визначають неозброєним оком.



Фіг. 1А



Фіг. 1В

		Mx-pos. B	Mx-pos. +	СРБ/ЛКТ	ВРІ	Мх-А білок
ВЗВ вітряна віспа	3	3	0	0	0	3
ВЗВ оперізуєчий лишай	15	9	4	2	1	9
Вірус Епіштейна-Барр	13	11	0	2	1	10
ЦМВ	11	9	0	2	1	9
Вірус Коксаки	6	6	0	1	0	4
Грип	31	30	0	1	1	28
Параміковірус	21	18	2	2	0	17
Тогавірус	20	8	10	1	0	12
Разом	120	94	16	11	4	92
Відсоток			92		13	77
Стафілококи	13	0	0	12	0	
Стрептококи	6	0	2	7	0	
Туберкульоз	9	0	0	8	0	
Псевдомонади	4	1	0	1	1	
Ентерококи	3	0	0	3	0	
E. Coli	3	0	0	1	2	
Клебсієли	1	0	0	1	1	
Бранхамелі	2	0	0	1	1	
Борелії	2	0	0	2	0	
Корінебактерії	3	0	1	2	0	
Іерсинії	1	0	0	1	0	
Лістерії	1	1	0	1	0	
Разом	50	2	3	40	5	
Відсоток				90		
	Теоретична кількість виявлення	Розрахункова кількість виявлення		Виявлення вірусної та бактеріальної інфекції при проведенні обох тестів		
Вірусна інфекція	50	46				
Бактеріальна інфекція	50	45				
		91				

Fig. 2