

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036766**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2020.12.18**

**(51)** Int. Cl. *C12Q 1/04* (2006.01)  
*C12Q 1/32* (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201891195**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2018.06.15**

---

**(54) СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОГЕНОВ**

---

**(31)** 2019074

**(32)** 2017.06.15

**(33)** NL

**(43)** 2019.01.31

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**НОРТ-ВЕСТ ЮНИВЕРСИТИ (ZA)**

**(72)** Изобретатель:  
**Тауте Корнелиус Йоханнес Франкоис,  
Лотс Дю Тоит (ZA)**

**(74)** Представитель:  
**Ловцов С.В., Левчук Д.В., Вилесов  
А.С., Коптева Т.В., Ясинский С.Я.  
(RU)**

**(56)** MIA D. UNSON et al. Improved Methods for Immunoassay of Mycothiol, Journal Of Clinical Microbiology, 1999, Vol. 37, No. 7, pp. 2153-2157

SOUMITESH CHAKRAVORTY et al. Novel Multipurpose Methodology for Detection of Mycobacteria in Pulmonary and Extrapulmonary Specimens by Smear Microscopy, Culture, and PCR. Journal Of Clinical Microbiology, 2005, Vol. 43, No. 6, pp. 2697-2702

LENNART LESSMEIER et al. Formaldehyde degradation in Corynebacterium glutamicum involves acetaldehyde dehydrogenase and mycothiol-dependent formaldehyde dehydrogenase. Microbiology, 2013, Vol. 159, pp. 2651-2662

---

**(57)** Изобретение предусматривает способ выявления специфического для *Mycobacterium* метаболита в форме микотиола в биологическом образце *in vitro*, предусматривающий стадии приготовления реакционной смеси в результате комбинирования биологического образца с ферментативным раствором, содержащим реакционный буфер, никотинамидадениндинуклеотид (NAD) и микотиолзависимую формальдегиддегидрогеназу (FD-MDH); восстановления NAD в реакционной смеси в результате взаимодействия FD-MDH с заранее определенным специфическим для *Mycobacterium* метаболитом в форме микотиола в случае наличия в биологическом образце; и выявления восстановленного NAD в образце, свидетельствующего о наличии микотиола в биологическом образце и, таким образом, инфекции, вызываемой *Mycobacterium*, в источнике биологического образца.

---

**B1**

**036766**

**036766  
B1**

### **Область техники, к которой относится настоящее изобретение**

Настоящее изобретение относится к способу и набору для выявления специфического для *Mycobacterium* метаболита в биологическом образце.

### **Предшествующий уровень техники настоящего изобретения**

Заболевание, вызываемое микобактериями, и, в частности, туберкулез ("ТВ"), ассоциированный с *Mycobacterium tuberculosis*, приводит к более миллиону смертей в год; при этом смертность особенно ассоциирована со случаями ВИЧ-инфекции. Ранее выявление и положительная идентификация инфекции, вызываемой *Mycobacterium*, является главным компонентом лечения заболевания, поскольку оно может переноситься при помощи взвешенных в воздухе частиц, и, таким образом, характеризуется высокими темпами распространения в случае активной инфекции. Кроме того, в настоящее время известны штаммы *M. tuberculosis* с множественной лекарственной резистентностью, в том числе штаммы с множественной лекарственной резистентностью (MDR), требующие незамедлительной идентификации в целях обеспечения последующего подходящего курса лечения.

Обычным способом диагностики инфекции, вызываемой *Mycobacterium*, является выявление кислотоустойчивых бактерий в мокроте при помощи прямого микроскопического исследования и культивирования. Несмотря на то, что микроскопическое исследование с применением окрашивания по методу Циля-Нильсена (ZN) для выявления ТВ является быстрым и недорогим, при надлежащем исполнении при нем выявляется лишь от 60 до 70% всех взрослых лиц с легочным ТВ, по сравнению с посевом мокроты. Однако при практической реализации эти цифры являются намного более низкими. Культивирование в настоящее время классифицируют в качестве "золотого стандарта" для диагностики ТВ, и в настоящее время рекомендуют для этой цели во всех развивающихся странах. Однако оно также имеет ограничения; при этом основным является время, требуемое для диагностики, а именно, 2-8 недель. Методики молекулярной биологии для генотипирования содержимого бактерий в мокроте предусматривают кропотливое приготовление образцов в целях разрушения сложной микроструктуры мокроты, а также клеточных стенок микобактерий с получением генетического материала микобактерий с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР). В последнее время технологию ПЦР использовали для практического применения в диагностике ТВ. Однако она также имеет ограничения, учитывая ее высокую стоимость и необходимость высокотехнологичной инфраструктуры и высококвалифицированных специалистов. Высокая частота ложно-положительных результатов вследствие лабораторного перекрестного загрязнения также ограничивает ее результативность в полевых условиях, и, как сообщалось, ее чувствительность в образцах с подтвержденным отрицательным мазком мокроты составляла 47-68%. ПЦР является дорогим, высокочувствительным и точным средством молекулярной биологии, чувствительным к ошибкам обработки образцов и действию ингибиторов в результате ненадлежащего приготовления образцов, что исключает ее применение в бедных и малообразованных регионах, при этом требуются лишь квалифицированные специалисты. Такие несоответствия приводят к длительному воздействию индивидуума, не получавшего лечение по поводу инфекций, на его/ее окружение, и как считается, являются основным фактором, способствующим повышенному распространению инфекций, заболеваний ТВ и MDR-TV и смертности от таковых.

Ранняя диагностика туберкулеза могла бы приводить к 1) предупреждению его распространения и образования новых штаммов MDR-TV, 2) сниженной смертности и 3) более эффективным результатам лечения. Разработке устройств для экспресс-диагностики (РОС) было уделено больше внимания со стороны исследователей в последние несколько лет, в частности, в связи с возрастающим интересом в области нанотехнологий и наночастиц. Коммерческие РОС характеризуются высокой специфичностью (90-95%), однако их ограничениями в настоящее время являются низкие пределы обнаружения и низкая или умеренная чувствительность.

Класс тиолов, известных как микотиолы, был признан в качестве уникального для актиномицетов (Gerald et al (1996) *Journal of Bacteriology* 178(7): 1990-1995), группы организмов, которые включают патогенные микобактерии, вызывающие ТВ, при этом последние являются единственным родом *Actinomyces*, приводящим к ассоциированным с ТВ симптомам, в связи с его специфичностью при идентификации этих организмов в мокроте пациентов с ТВ. В свою очередь, это привело к разработке ряда методов иммунологического анализа для выявления микотиолов в биологических образцах (Unson et al (1998) *Journal of Immunological Methods* 214: 29-39 and Unson et al (1999) *Journal of Clinical Microbiology* 37(7): 2153-2157). Эти методы могут характеризоваться высокой чувствительностью при применении в подходах на основе твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), однако, чтобы достичь таких результатов, для них требуются длительные стадии настройки и обработки (по меньшей мере 10 ч).

Учитывая вышеуказанное, очевидно, что в настоящее время существует необходимость в быстром, чувствительном и высокоспецифическом анализе в целях выявления инфекций, вызываемых *Mycobacterium*, у субъектов-людей.

### **Цель настоящего изобретения**

Соответственно целью настоящего изобретения является предусмотрение способа выявления специфического для *Mycobacterium* метаболита в биологическом образце, при помощи которого вышеуказанные недостатки можно было бы преодолеть или по меньшей мере свести к минимуму.

### Краткое раскрытие настоящего изобретения

В соответствии с его первым аспектом предусмотрен способ выявления специфического для *Mycobacterium* метаболита в форме микотиола в биологическом образце *in vitro*, предусматривающий стадии приготовления реакционной смеси в результате комбинирования биологического образца с ферментативным раствором, содержащим реакционный буфер, никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и микотиолзависимую формальдегиддегидрогеназу (МЗ-ФДГ);

восстановления НАД в целях образования НАДН в реакционной смеси в результате взаимодействия МЗ-ФДГ с заранее определенным специфическим для *Mycobacterium* метаболитом в форме микотиола, в случае наличия в биологическом образце; и

выявления восстановленного НАД (НАДН) в образце, свидетельствующего о наличии микотиола в биологическом образце и, таким образом, инфекции, вызываемой *Mycobacterium*, в источнике биологического образца.

Инфекция, вызываемая микобактериями, обычно, хотя и не исключительно, представляет собой инфекцию, вызываемую *Mycobacterium tuberculosis*, или инфекцию, вызываемую другими видами *Mycobacterium*, которая обычно подлежит лечению аналогичным образом.

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением стадия выявления восстановленного НАД (т.е., НАДН) в образце, предусматривает стадию выявления изменения посредством любого одного или нескольких методов, выбранных из группы, состоящей из колориметрических реакций, ферментативных анализов, хроматографических методов, масс-спектрометрических и спектрофотометрических методов.

Биологический образец можно выбрать из группы, состоящей из чистых метаболитов, клеточных экстрактов, крови, мокроты, мочи, спинно-мозговой жидкости, жидкостных культур и их комбинаций.

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением, где ферментативный раствор включает вспомогательные средства, выбранные из группы, состоящей из солей, альдегидов, аминов, гидроксидов, восстанавливающих средств и их комбинаций.

Предпочтительно ферментативный раствор выбирают из группы, состоящей из хлорида натрия, формальдегида, трис(гидроксиэтил)аминометана, дитиотреитола и их комбинаций.

Ферментативную реакцию можно проводить при температуре от приблизительно 25 до 40°C и в течение периода времени, составляющего от 2 до 840 мин. Альтернативно ферментативную реакцию проводят в течение периода времени, составляющего от 2 до 80 мин. Кроме того, альтернативно ферментативную реакцию можно проводить в течение периода времени, составляющего от 2 до 20 мин.

Ферментативную реакцию можно проводить в кюветах, прозрачном многолуночном планшете или стеклянных флаконах с образцом, при этом суммарный объем отдельных реакционных смесей составляет менее 250 мкл. Альтернативно реакцию проводят в стандартной лабораторной химической посуде.

В соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения предусмотрен набор для выявления специфического для *Mycobacterium* метаболита в биологическом образце *in vitro*, содержащий ферментативный раствор, содержащий реакционный буфер, никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и микотиолзависимую формальдегиддегидрогеназу (МЗ-ФДГ); а также подходящий контейнер для получения биологического образца и ферментативного раствора для образования реакционной смеси.

Эти и другие цели, характеристики и преимущества настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области после подробного описания настоящего изобретения.

### Краткое описание чертежей

Предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения описаны ниже с отсылкой на прилагаемые фигуры, где

на фиг. 1 представлен график, обозначающий стандартизацию ферментативной реакции MSH и МЗ-ФДГ в Трис-буфере, где повышение оптической плотности линейно связано с повышением НАДН, измеряемым при 340 нм;

на фиг. 2 представлен график, обозначающий стандартизацию ферментативной реакции MSH и МЗ-ФДГ в целях применения футильного цикла в присутствии низких концентраций MSH и МЗ-ФДГ в Трис-буфере для 14 ч, при этом на (а) представлено применение анализа в отношении к культивируемым клеточным лизатам для 14 ч, и на (b) представлено изображение в увеличенном масштабе, показывающее, что нижний предел обнаружения составляет 0,05 мкг (или 50 нг) эквивалента клеточного экстракта. Повышение оптической плотности линейно связано с повышением НАДН, измеряемым при 340 нм; и

на фиг. 3 представлен график, обозначающий (а) повышение оптической плотности при 340 нм в случае анализа MSH-МЗ-ФДГ с применением образцов мокроты (положительный результат посева; положительный результат микроскопического исследования мазка (C+ve; SM +ve); положительный результат посева и отрицательный результат микроскопического исследования мазка (C+ve; SM-ve)) и образцов мокроты с отрицательным результатом на ТВ (результат анализа мокроты -ve) и (b) участок графика в увеличенном масштабе, указывающий подлежащий выявлению сигнал для ТВ+ образцов при отсутствии различного сигнала в случае контролей или ТВ- образцов (b).

Раскрываемый в настоящем изобретении предмет изобретения будет описан более подробно далее в настоящем документе с отсылкой на прилагаемые примеры, в которых показаны иллюстративные варианты осуществления. Однако раскрываемый в настоящем изобретении предмет изобретения может быть

воплощен в других формах и не должен ограничиваться вариантами осуществления, изложенными в настоящем документе. Наоборот, эти варианты осуществления предусмотрены для того, чтобы настоящее раскрытие было обстоятельным и полным и полностью передавало объем вариантов осуществления специалистам в данной области.

#### **Описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения**

Способ в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения для выявления специфического для *Mycobacterium* метаболита в форме микотиола в биологическом образце *in vitro* предусматривает стадии

приготовления реакционной смеси в результате комбинирования биологического образца с ферментативным раствором, содержащим реакционный буфер, никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и микотиол-зависимую формальдегиддегидрогеназу (МЗ-ФДГ);

восстановления НАД в целях образования НАДН в реакционной смеси в результате взаимодействия МЗ-ФДГ с заранее определенным специфическим для *Mycobacterium* метаболитом в форме микотиола, в случае наличия в биологическом образце; и

выявления восстановленного НАД (НАДН) в образце, свидетельствующего о наличии микотиола в биологическом образце и, таким образом, инфекции, вызываемой *Mycobacterium*, в источнике биологического образца.

Способ является особенно подходящим без ограничения для выявления инфекции, вызываемой микобактериями, в том числе таковой, вызываемой *Mycobacterium tuberculosis*, однако предполагается, что наличие любых актиномицентов, имеющих распределение микотиола, можно было бы выявлять в биологическом образце при помощи способа в соответствии с настоящим изобретением. Однако учитывая, что образец пациента будут собирать на основе симптомов, ассоциированных исключительно с таковыми, вызываемыми патогенными микобактериями, он будет специфическим в отношении туберкулеза.

Биологический образец выбирают из группы, состоящей из чистых метаболитов, клеточных экстрактов, крови, мокроты, мочи, спинно-мозговой жидкости, жидкостных культур и их комбинаций.

Стадия выявления восстановленного НАД (т.е., НАДН) в образце, предусматривает выявление изменения посредством любого одного или нескольких методов, выбранных из группы, состоящей из колориметрических реакций, ферментативных анализов, хроматографических методов, масс-спектрометрических и спектрофотометрических методов.

Ферментативный раствор выбирают из группы, состоящей из солей и буферов, в частности, альдегидов, аминов, гидроксидов, восстанавливающих средств и их комбинаций. Предпочтительно ферментативный раствор содержит хлорид натрия, формальдегид, трис(гидроксиэтил)аминометан, дитиотреитол.

Можно оценить, что скорость ферментативной реакции зависит от исходной концентрации специфического для *Mycobacterium* метаболита в биологическом образце. Соответственно, время, необходимое для образования определенной концентрации НАДН во время реакции, будет также зависеть от исходной концентрации специфического для *Mycobacterium* метаболита в биологическом образце.

Ферментативную реакцию проводят при температуре от приблизительно 25 до 40°C и в течение периода времени, составляющего от 2 до 840 мин. Альтернативно ферментативную реакцию проводят в течение периода времени, составляющего от 2 до 80 мин. Кроме того, альтернативно ферментативную реакцию проводят в течение периода времени, составляющего от 2 до 20 мин.

Можно оценить, что ферментативную реакцию можно проводить в ряде устройств и объемов, с различными вариантами, общеизвестными специалистам в данной области. В соответствии с настоящим изобретением ферментативную реакцию проводят в кювете, прозрачном многолуночном планшете или небольших стеклянных флаконах с образцом, при этом суммарный объем отдельных реакционных смесей составляет менее 250 мкл. В соответствии с альтернативным вариантом осуществления реакцию проводят в стандартной лабораторной химической посуде.

В соответствии с вторым аспектом настоящего изобретения предусмотрен набор для выявления специфического для *Mycobacterium* метаболита в биологическом образце *in vitro*, содержащий ферментативный раствор, содержащий реакционный буфер, никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и микотиол-зависимую формальдегиддегидрогеназу (МЗ-ФДГ); а также подходящий контейнер для получения биологического образца и ферментативного раствора для образования реакционной смеси.

Неограничивающий пример предпочтительного варианта осуществления настоящего изобретения описан более подробно ниже, с ссылкой на фиг. 1-3.

#### **Пример**

Визуальный анализ для выявления *M. tuberculosis*.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения микотиол-зависимую формальдегиддегидрогеназу (МЗ-ФДГ) применяли для образования восстановленного переносчика энергии (НАДН) в присутствии формальдегидных аддуктов микотиола (MSH). Буфер в составе ферментативного раствора являлся зависимым от pH, температуры, содержания микотиола (восстановленного), а также содержания формальдегида.

Анализ можно было выполнять в высокопроизводительном формате 96-луночного планшета с об-

щим объемом реакционной смеси 200 мкл. Реакция занимала от 2 мин до 14 ч при 30°C.

Стандартизация ферментативного анализа.

В целях стандартизации применяли чистый синтетический микотиол (соль трифторуксусной кислоты). Его доводили до 10 мМ исходного раствора без экстракции, поскольку соль трифторуксусной кислоты предупреждала самоокисление микотиола. Проверку активности МЗ-ФДГ осуществляли в 96-луночном микропланшете (с общей схемой которой можно ознакомиться в табл. 1). Готовили предварительную смесь, содержащую все компоненты для проверки ферментативной активности (Lessmeier et al; 2013). Композиция на основе предварительно приготовленной смеси состояла из 100 мМ Трис-буфера (рН 8,25), 500 мМ NaCl, 5 мМ НАД<sup>+</sup>, 1 мМ DTT, 1-5 мМ формальдегида и 0,001-0,05 мг/мл МЗ-ФДГ. "Образец" должен был содержать смесь компонентов для воспроизведения консистенции используемого материала образца реального пациента или содержать матрицу образца реального пациента, лишенную инфекционного патогена и/или биологического соединения, подлежащего выявлению (в данном случае микотиола).

Таблица 1. Пример общей схемы и подготовки к стандартизации предлагаемого анализа микотиола и предварительных исследований клеточных экстрактов при помощи *M. tuberculosis* H37Rv, выделенного из жидкостных культур

	Холо стой раств ор	Конт роль для анал иза	Стан дарт 1	Стан дарт 2	Стан дарт 3	Стан дарт 4	Обра зец 1	Обра зец 2	Конт роль для образ ца
Предваритель ная смесь (мкл)	0	150	150	150	150	150	150	150	150
MSH (мМ)	0	0	0,5	0,25	0,125	0,06	0	0	0
Образец (мкл)	0	0	0	0	0	0	20	20	0
ddH <sub>2</sub> O (мкл)	150	0	50	50	50	50	30	30	50
Общий объем	200 мкл								

Повышение оптической плотности измеряли при 340 нм (НАДН) при помощи планшет-ридера на основе спектрометра УФ- и видимой областей спектра BioTEK Synergy или инструмента аналогичной модели, при температуре инкубатора, установленной на 30°C. Все коррекции с учетом холостых растворов и длины волны выполняли при помощи пакета программного обеспечения Gen5. Кинетический интервал считывали при интервалах, равных 30-90 с, в зависимости от числа образцов. Для всех кинетических анализов чистый MSH применяли в качестве стандарта для повышения оптической плотности (340 нм). Все считывания проводили в трех повторностях. Для всех целей, при необходимости, стандарты MSH растворяли в одной и той же матрице, что и патогенсодержащие образцы, например, средах для выращивания жидкостных культур или буфере для экстракции в случае образцов мокроты.

Для целей данного анализа отсутствие NaCl или замена Трис-буфера на HEPES/MOPS не оказывали значимого эффекта на повышение оптической плотности при 340 нм со временем. Было обнаружено, что определяющий фактор был исключительно зависимым от рН, в то время как оптимальная активность соответствовала таковой, описанной Lessmeier et al (2013) в литературе (рН 8,25). Повышение оптической плотности при 340 нм (НАДН) можно наблюдать на фиг. 1 и 2а, где в случае стандартов представлено повышение оптической плотности смеси, содержащей чистый микотиол, для 4 ч и 14 ч, как описано ранее, соответственно. Композиция стандартов, применяемых для результатов, полученных на фиг. 1, включала применение 0,05 мг/мл МЗ-ФДГ с серией стандартов MSH, составляющих 0,5, 0,25, 0,125 и 0,06 мМ соответственно. Композиция стандартов, применяемых для результатов, полученных на фиг. 2а, включала применение 0,002 мг/мл МЗ-ФДГ с серией стандартов MSH, составляющих 0,032, 0,016 и 0,008 мМ.

Повышение оптической плотности при 340 нм (НАДН) в результате ферментативной реакции, выполненной на клеточных лизатах жидкостной культуры *M. tuberculosis* H37Rv, можно наблюдать на фиг. 1 и фиг. 2б, для 4 ч и 14 ч соответственно, они обозначены и помечены как эквиваленты клеточных экстрактов, составляющие 0,5, 1 и 5 мг). Контроль образцов относился в настоящем документе к образцу воды/матрицы, который проходил те же самые стадии приготовления, что и образцы, которые не содержали микотиола или фермента.

В случае клеточных экстрактов (лизатов), полученных из *M. tuberculosis* жидкостной культуры, разрабатывали новый буфер для экстракции. Буфер составляли на основе многочисленных протоколов, в частности, протоколов для выделения геномной ДНК из растительных материалов. Буфер выглядел безвато-мутным в присутствии клеточного материала, в то время как раствор становился оптически прозрачным. Буфер (рН 8) состоял из 100 мМ буфера на основе 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты (HEPES), 500 мМ NaCl, 5% раствора додецилсульфата натрия (SDS), 5% раствора бромиды цетилтриметиламмония (СТАВ). Далее представлен общий протокол для применения буфера для лизиса.

Избыточное количество буфера для лизиса (100-500 мкл) добавляли к 50 мг осажденной влажной массы клеток *M. tuberculosis*, выделенной из жидкостных культур. Клеточный осадок механически повреждали при помощи повторного микропипетирования в том же самом флаконе до тех пор, пока твердые частички не становились видимыми и образец приобретал текстуру и внешний вид крема. Затем смесь клеточного осадка и буфера для лизирования интенсивно перемешивали на вортексе в течение 60 с, после чего нагревали при 65°C в течение 30-45 мин или при 90°C в течение 20 мин. Последнюю стадию перемешивания на вортексе выполняли в течение 10 с. Клеточный осадок осаждали при помощи центрифугирования (при относительном центробежном ускорении (RCF), составляющем 4000 g), а супернатант использовали для последующего анализа. Альтернативно образцы осаждали в результате снижения температуры смеси (например, в результате помещения на лед или в холодильник или морозильник) или в результате гравитационного осаждения. В табл.2 представлено типичное применение в соответствии с экспериментальным протоколом буфера для лизиса, описанного в настоящем документе выше.

Таблица 2. Пример общей схемы и подготовки к определению границ обнаружения предлагаемого анализа микотиола при помощи клеток, выделенных из жидкостных культур *M. tuberculosis* H37Rv

	Холостой раствор	Контроль для анализа	Стандарт 1	Стандарт 2	Стандарт 3	Образец 1	Образец 2	Контроль для образца
Предварительная смесь (мкл)	0	150	150	150	150	150	150	150
MSH (мМ)	0	0	0,032	0,016	0,008	0	0	0
Образец (мкл)	0	0	0	0	0	20	20	0
ddH <sub>2</sub> O (мкл)	150	0	50	50	50	30	30	50
Общий объем	200 мкл							

В примере ниже в целях определения нижнего предела обнаружения (т.е. минимального числа микобактерий, которые должны присутствовать в образце) 5 мг влажной массы клеток суспендировали в 500 мкл буфера для лизиса и обрабатывали, как описано выше. Затем клеточный лизат разводили с получением серий разведений, эквивалентных 5 мг, 1 мг, 0,05 мг, 50 мкг, 5 мкг, 0,5 мкг, 0,05 мкг, 0,005 мкг влажной массы клеток и 20 мкл каждого использовали для приготовления аналитических растворов, как указано в столбце с образцом в табл. 2. Этот эксперимент повторяли три раза с каждым образцом, подлежащим измерению в трех повторностях, и аналогичные результаты получали для каждого повтора, результаты которых представлены на фигуре 1 (для эквивалентов массы клеток, составляющих 5 мг, 1 мг и 0,5 мг) и фиг. 2a и b (500 мкг - 0,005 мкг (или 0,5 нг)).

Таблица 3. Предполагаемое содержание эквивалентов клеток микобактерий на образец для анализа. Расчеты основаны на принятом в литературе значении, составляющем  $1 \times 10^8$  клеток на 3 мг влажной массы клеточной суспензии CFU = колониеобразующие единицы

Масса эквивалента влажной массы клеточной суспензии*	5 мг	1 г	0,05 мг	50 мкг	5 мкг	0,5 мкг	0,05 мкг	0,005 мкг
Предполагаемое содержание CFU	$1,6 \times 10^8$	$3,33 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2$

Предполагаемые чувствительности обнаружения ферментативного анализа, обобщенные в табл. 3, показали, что повышение оптической плотности наблюдалось при содержании всего лишь 0,05 мкг (50 нг) эквивалента клеточного лизата (фиг. 2b).

В дальнейшем в целях оценки мощности ферментативного анализа в отношении выявления наличия микотиола в собранных у пациентов диагностических образцах, содержащих микобактерий, тот же самый протокол экстракции, что и для клеточных лизатов жидкостных культур, применяли в отношении собранной у пациентов мокроты, как в качестве примера указано в табл. 4. Повышение оптической плотности (340 нм) проявлялось подлежащими выявлению сигналами в случае всех 4 ТВ+ образцов (в том числе положительный результат посева; положительный результат микроскопического исследования мазка (C+ve; SM+ve); положительный результат посева и отрицательный результат микроскопического исследования мазка (C+ve; SM-ve)) и отрицательные результаты мокроты на ТВ, при этом отсутствует активность для контролей или 5 ТВ-ve образцов (подтвержденных при помощи посева и микроскопического исследования мазка (мокрота -ve)) (фиг. 3). Увеличение определенной области графика на фигуре 3a (фигуре 3b) указывало на быстрый рост оптической плотности при быстром снижении кривизны. Возможно, это происходило благодаря остаточной ферментативной активности, исходящей из образца мокроты или небольших молекул, взаимодействующих с НАДН. Контроль для образца (фиг. 3a) подвер-

гали тем же самым подготовительным стадиям, что и образцы мокроты. Повышение оптической плотности при 340 нм в случае 4 ТВ (+) образцов было небольшим, хотя и все еще подлежащим выявлению по сравнению с 5 ТВ (-) образцами, а также контролем для образца (фиг. 3b). Можно было предпринять попытку получить результат, аналогичный клеточным лизатам, в результате оптимизации протокола клеточного лизиса, буферной системы фермента или включения "энхансеров" фермента, таких как п-йодинитротетразол фиолетовый или феназина метосульфат (Hinman and Blass, 1981), а также флуоресцентных репортерных молекул, в целях дальнейшего снижения пределов обнаружения (т.е. повышения чувствительности метода).

Таблица 4. Пример общей схемы и подготовки к выявлению микотиола в ТВ+ve и ТВ-ve образцах мокроты

	Холо стой раств ор	Конт роль для анал иза	Стан дарт 1	Стан дарт 2	Стан дарт 3	Стан дарт 4	Обр азец 1	Обр азец 2	Конт роль для образ ца
Предварите льная смесь (мкл)	0	150	150	150	150	150	150	150	150
MSH (мМ)	0	0	0,050	0,025	0,012	0,006	0	0	0
Образец (мкл)	0	0	0	0	0	0	20	20	0
ddH <sub>2</sub> O (мкл)	150	0	50	50	50	50	30	30	50
Общий объем	200 мкл								

Во время валидации ферментативный анализ с применением MSH-МЗ-ФДГ для выявления НАДН непосредственно из образцов, экстрагированных из мокроты, показал успешное распознавание всех ТВ +ve (из которых 2 имели положительный результат посева и положительный результат мазка и 2 положительный результат посева и отрицательный результат мазка) и 5 ТВ -ve образцов (фиг. 3).

Можно легко оценить, что ферментативную компоненту анализа можно легко применять для жидкостных культур, а также образцов мокроты с последующей валидацией, и можно применять в научных исследованиях, а также диагностике.

Результаты показали, что настоящее изобретение было достаточно чувствительным для выявления  $1,6 \times 10^7$   $10^4$  CFU через 10 мин после инкубации, и  $1,6 \times 10^4$  CFU - приблизительно через два с половиной часа и  $1,6 \times 10$  - примерно через 6 ч. Учитывая такую чувствительность и время выполнения диагностики, оно стало эффективным средством в качестве альтернативного способа микроскопическому исследованию мазка (требуется  $1 \times 10^4$ ). Однако при исследовании мокроты, собранной у реальных пациентов, при помощи этого способа можно было положительно идентифицировать все ТВ положительные образцы, даже таковые, которые не выявляли при помощи стандартного микроскопического исследования мазка, указывая на то, что он был более чувствительным, чем микроскопическое исследование мазка, и при помощи его с наиболее вероятно выявляли экзогенный микотиол, вырабатываемый комплексом *Mucobacterium* в матрице мокроты, что делало его вероятным кандидатом быть таким же чувствительным, как и культивирование, которое можно подтверждать лишь в когорте с наличием большого количества образца.

Способ в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения, как описано в настоящем документе выше, имел ряд преимуществ по отношению к способам предшествующего уровня техники.

Во-первых, настоящее изобретение было простым в осуществлении и могло быть поставлено на коммерческую основу при значительно более низких затратах, чем другие существующие высокочувствительные аналитические подходы. Во-вторых, тест, описываемый в настоящем документе выше, был сравнительно более быстрым, чем другие способы, требующие по большей мере несколько часов для завершения, в случае нескольких образцов (при выполнении с применением 96-луночных планшетов) одновременно, и мог быть полностью автоматизированным. Это давало сравнительные преимущества, учитывая, что другие широко распространенные подходы для диагностики ТВ были в значительной степени длительными, при этом для существующих в настоящее время подходов на основе ПЦР требуется по меньшей мере несколько часов лишь для стадии амплификации и может в действительности потребоваться несколько дней для завершения, а для наиболее быстрых способов культивирования - по меньшей мере 2 дня (в среднем 2-8 недель). Микроскопическое исследование мазка, помимо значительно меньшей чувствительности по сравнению с анализом, описываемым в настоящем документе, также было трудозатратным, требующим квалифицированной гистологической подготовки, потенциально включало многочисленные ошибки обработки и визуальную оценку, которые могли вносить смещенную оценку при подтверждении, для него обычно требовалось несколько часов для приготовления и анализа; при этом приготовление нескольких образцов было ограничивающим по времени фактором.

Наконец, при помощи теста, описываемого в настоящем документе, выявляли метаболический мар-

кер, и он не основывался на генетическом материале. Это повышало точность настоящего изобретения по сравнению с существующими генетическими подходами, поскольку остаточный генетический материал мог давать ложно-положительные результаты.

Кроме того, выполнение данного анализа могло быть включено в устройство для экспресс-диагностики.

Будет понятно, что возможны подробные вариации способа без отклонения от объема прилагаемой формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выявления специфического для *Mycobacterium* метаболита в форме микотиола в биологическом образце *in vitro*, предусматривающий стадии

приготовления реакционной смеси в результате комбинирования биологического образца с ферментативным раствором, содержащим реакционный буфер, никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и микотиолзависимую формальдегиддегидрогеназу (МЗ-ФДГ);

восстановления НАД в целях образования НАДН в реакционной смеси в результате взаимодействия МЗ-ФДГ с заранее определенным специфическим для *Mycobacterium* метаболитом в форме микотиола в случае наличия в биологическом образце; и

выявления восстановленного НАД (НАДН) в образце, свидетельствующего о наличии микотиола в биологическом образце и, таким образом, инфекции, вызываемой *Mycobacterium*, в источнике биологического образца.

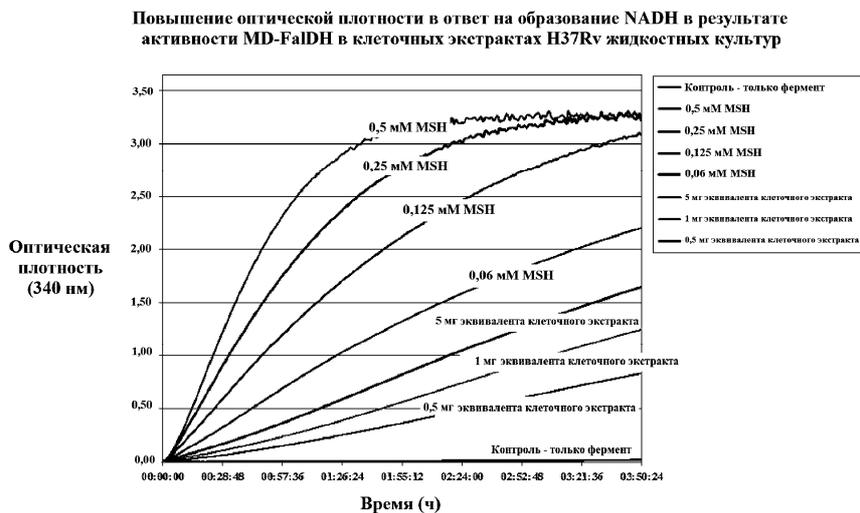
2. Способ по п.1, где микотиол вырабатывается *M. tuberculosis*.

3. Способ по п.1 или 2, где биологический образец выбирают из группы, состоящей из крови, чистых метаболитов, клеточных экстрактов, мокроты, мочи, спинно-мозговой жидкости, жидкостных культур и их комбинаций.

4. Способ по любому из пп.1-3, где ферментативный раствор включает вспомогательные средства, выбранные из группы, состоящей из солей, альдегидов, аминов, гидроксидов, восстанавливающих средств и их комбинаций.

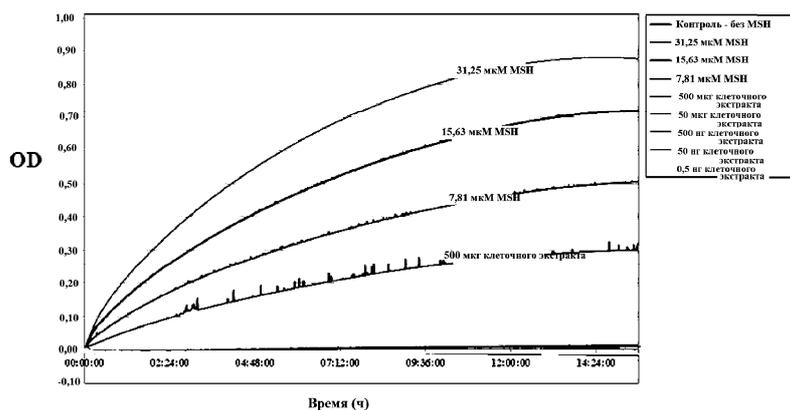
5. Способ по любому из пп.1-4, где реакцию проводят при температуре от приблизительно 25 до 40°C и в течение периода времени, составляющего от 2 до 840 мин.

6. Способ по любому из пп.1-5, где концентрацию НАД и/или восстановленного НАД измеряют при помощи способов, выбранных из группы, включающей колориметрические анализы, ферментативные анализы, хроматографические анализы, масс-спектрометрические и спектрометрические анализы, анализ латерального растекания, выявление визуальным наблюдением, тест-полосой для анализа мочи и их комбинации.



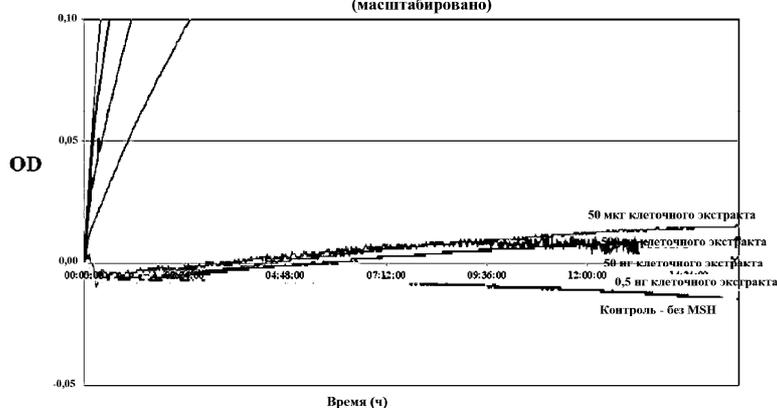
Фиг. 1

Ферментативное выявление клеточных экстрактов *M. tuberculosis* (H37Rv)  
в целях определения более низких пределов обнаружения метода



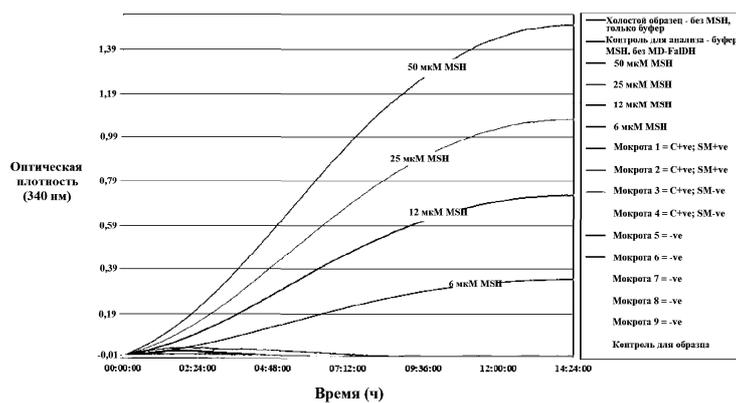
Фиг. 2а

Ферментативное выявление клеточных экстрактов *M. tuberculosis* (H37Rv)  
в целях определения более низких пределов обнаружения метода  
(масштабировано)



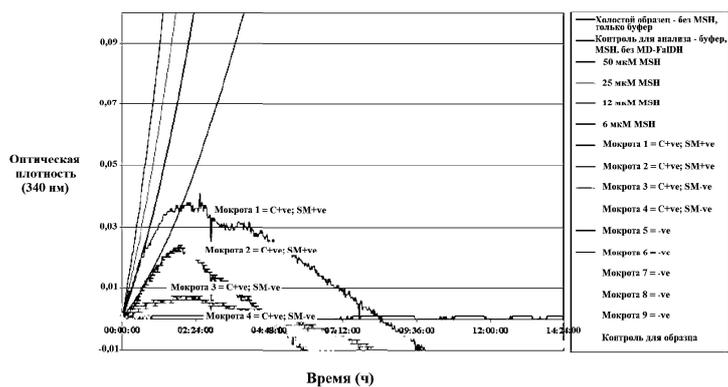
Фиг. 2б

Образование NADH при помощи анализа с применением MD-FalDH в образцах мокроты  
в целях выявления комплекса *M. tuberculosis*



Фиг. 3а

Образование NADH при помощи анализа с применением MD-FalDH в образцах мокроты  
в целях выявления комплекса *M. tuberculosis*



Фиг. 3b



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2