

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042747**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.03.21

(51) Int. Cl. **G01N 33/558** (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

(21) Номер заявки
202091301

(22) Дата подачи заявки
2018.05.15

(54) **СПОСОБ И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ОТ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

(31) **17203120.5**

(32) **2017.11.22**

(33) **EP**

(43) **2020.08.19**

(86) **PCT/EP2018/062466**

(87) **WO 2019/101370 2019.05.31**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЕВАКТ ЛАБС ГМБХ (DE)

(72) Изобретатель:
Якчис Детлеф (DE)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) **WO-A2-2010033963**

WO-A2-2007082259

HALLER OTTO: "Dynamins Are Forever: MxB Inhibits HIV-1", CELL HOST & MICROBE, ELSEVIER, NL, vol. 14, no. 4, 7 October 2013 (2013-10-07), pages 371-373, XP028757457, ISSN: 1931-3128, DOI: 10.1016/J.CHOM.2013.10.002, cited in the application, page 351, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 1 page 373, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 1
WO-A1-9421280

(57) Изобретение относится к анализу по месту оказания медицинской помощи для выявления и дифференцировки вирусных от бактериальных инфекций, который эффективно способствует быстрой дифференцировке вирусных и бактериальных инфекций. Более конкретно, изобретение относится к иммуноанализу, который быстро различает вирусные и/или бактериальные инфекции, где вирусным маркером является индуцированный интерфероном белок Мх-В, а бактериальными маркерами являются СРБ/ПКТ/ВРІ.

B1**042747****042747****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области анализов осуществляемых по месту оказания медицинской помощи (РОС) для дифференцировки вирусных от бактериальных инфекций. Более конкретно, изобретение относится к иммуноанализу, который быстро различает вирусные и/или бактериальные инфекции.

Предшествующий уровень техники

Лихорадка является частой причиной обращений у детей в центрах неотложной помощи как для семейных врачей, так и для педиатрических отделений. Чаще всего это касается респираторной инфекции или гастроэнтерита. Высокая частота лихорадки у детей и предупредительное введение ненужных антибиотиков является причиной для разработки быстрого скринингового теста на биомаркеры, которые указывают на вирусную и/или бактериальную инфекцию.

Тяжелая внебольничная пневмония вызывается бактериальными инфекциями примерно в 60% случаев, требуя госпитализации в отделение интенсивной терапии (ОИТ) примерно для 10% пациентов. Остальные 40% связаны с респираторными вирусами. Большинство респираторных инфекций связано с фарингитом, из которых 40% вызваны вирусами, а 25-50% - бета-гемолитическим стрептококком группы А. Последний вызывает острый бронхолит и пневмонию.

Около 80% всех противомикробных препаратов назначаются в первичной медицинской помощи, и до 80% из них предназначены для лечения заболеваний дыхательных путей. Инфекции дыхательных путей являются наиболее распространенной причиной кашля при первичной медицинской помощи. Антибиотики широкого спектра действия часто назначают при кашле, включая острый бронхит, и многие из этих назначений приносят лишь незначительную пользу пациентам, если вообще полезны, и могут вызывать побочные эффекты и способствовать развитию устойчивости к антибиотикам. Факторы, которые побуждают врачей назначать антибиотики, включают отсутствие адекватного диагностического маркера бактериальных инфекций, беспокойство по поводу отсутствия наблюдения за пациентом и нехватку времени.

По-прежнему сложно быстро отличить вирусную инфекцию от бактериальной. Совсем недавно было выявлено много новых диагностических маркеров. Некоторые из этих маркеров демонстрируют большой потенциал в дифференцировке вирусных инфекций от бактериальных инфекций. Такие белки включают Мх-ГТФазы и С-реактивный белок (СРБ).

Мх-гомологичные белки являются членами суперсемейства высокомолекулярных ГТФаз. Соответственно, эти ГТФазы активируются интерферонами I типа альфа/бета или II типа (ИФН). Мх-ГТФазы экспрессируются исключительно в клетках, обработанных ИФН-альфа/бета, но не ИФН-гамма. Интерфероны I типа играют важную роль в реакциях врожденного иммунитета и выполняют иммуномодулирующую, антипролиферативную и противовирусную функции.

Собственные исследования показали, что Мх-гомологичные белки человека имеют следующие преимущества:

(1) Мх-гомологичные человеческие белки у человека экспрессируются в основном внутриклеточно. Они могут быть видны при внутриклеточном окрашивании в большинстве клеточных компартментов [16].

(2) Мх-гомологичные белки индуцируются дозозависимым образом [6].

(3) Мх-гомологичные белки человека специфически индуцируются интерферонами I типа, но не ИФН-гамма, ИЛ-1, ФНО-альфа или любыми другими цитокинами при бактериальной инфекции [8, 12].

(4) Мх-гомологичные белки человека обнаруживаются гораздо дольше по сравнению с интерфероном I типа в периферической крови [6]. Следовательно, эти белки являются маркером для выявления вирусных заболеваний [7, 14, 15]. Кроме того, эти белки могут быть использованы в качестве маркера для проверки успешности лечения пациентов, получавших интерфероны I типа [5, 9, 10, 11]. В ранних исследованиях мы выявляли эти белки с помощью вестерн-блоттинга после ДСН-ПАГЭ [12]. Но для этой процедуры требуется более двух дней. Поэтому мы разработали ИФА для выявления этих белков в течение двух дней [13].

На основании этих фактов и предположения о том, что интерфероны I типа остаются в пределах нормальных уровней у пациентов с бактериальными инфекциями, экспрессия Мх-гомологичного белка в периферической крови является чувствительным и специфическим маркером вирусной инфекции.

Аналогичным образом сообщается, что большинство вирусных инфекций вызывают небольшие концентрации белков острой фазы и низкие концентрации С-реактивного белка (СРБ), уровни прокальцитонина (ПКТ) и бактерицидного белка, повышающего проницаемость (ВРП). Таким образом, эти белки будут использоваться для дифференцировки болезней вирусной и бактериальной этиологии. Поскольку концентрация СРБ в плазме быстро увеличивается после стимуляции и быстро уменьшается с коротким периодом полувыведения, СРБ может быть очень полезным инструментом для диагностики и мониторинга инфекций и воспалительных заболеваний.

В Скандинавии анализ СРБ по месту оказания медицинской помощи является частью обычной оценки пациентов с респираторными инфекциями в общей практике, и его использование оказалось экономически эффективным. В общей практике СРБ считается полезным в диагностике бактериальных за-

болеваний и в частичной дифференцировке бактериальных и вирусных инфекций. Часто диагностическая ценность СРБ оказывается выше, чем у скорости оседания эритроцитов (СОЭ), и такой же, как у определения количества лейкоцитов (БКК) (белых кровяных клеток), или выше. Недостатком данного исследования по месту оказания медицинской помощи является длительное время анализа. Эти тесты должны длиться от 30 мин до 2 ч.

Клинически может быть сложно дифференцировать определенные системные вирусные и бактериальные инфекции. Бактериальные посевы обычно проводят в случаях тяжелой инфекции, такой как пневмония, или в случае, когда отсутствие диагноза может привести к серьезным осложнениям, таким как острый фарингит. Часто культуры трудно получить. К сожалению, культивирование вирусов обычно не проводят из-за значительной задержки в получении результатов. Новые ПНР-панели для вирусного скрининга полезны, но они дороги и не предоставляют информацию в месте оказания медицинской помощи, поскольку результаты могут быть получены только через 24 ч. Таким образом, остается потребность в простом, легком в использовании диагностическом тесте, который способен дифференцировать вирусные и бактериальные инфекции в короткие сроки.

В WO 2010/033963 раскрыт латеральный проточный иммуноанализ для выявления и дифференцировки вирусных и бактериальных инфекций. Бактериальным маркером является СРБ, а вирусным маркером является Мх-А-белок. Анализ продается в Европе под торговым названием FebriDx®. Однако, согласно исследованию, FebriDx® имеет только точность 63 и 84% для идентификации бактериальных и вирусных инфекций соответственно [17]. Следовательно, все еще существует необходимость в быстром диагностическом анализе по месту оказания медицинской помощи для более точной и надежной дифференцировки бактериальных инфекций от вирусных инфекций у пациентов.

Краткое изложение сущности изобретения

Целью настоящего изобретения является создание усовершенствованного и более точного и специфического диагностического анализа для надежной дифференцировки бактериальных от вирусных инфекций у пациентов в короткие сроки. Задача решается предметом настоящего изобретения.

Согласно изобретению, предложено устройство для иммунологического анализа по месту оказания медицинской помощи (РОС), включающее:

- (a) зону нанесения образца и
- (b) зону детекции с первым детектирующим реагентом с аффинностью связывания с Мх-В-белком (Мх-В) и вторым детектирующим реагентом с аффинностью связывания с С-реактивным белком (СРБ/ПКТ); и где устройство выполнено с возможностью обнаружения Мх-В и СРБ/ПКТ в образце от субъекта для дифференцировки бактериальной от вирусной инфекции.

В соответствии с дополнительным вариантом осуществления изобретения предложено устройство для иммунологического исследования по месту оказания медицинской помощи (РОС), включающее:

- (a) зону нанесения образца и
- (b) зону детекции с первым детектирующим реагентом с аффинностью связывания с Мх-В-белком (Мх-В) и вторым детектирующим реагентом аффинного связывания с С-реактивным белком (СРБ), и третьим детектирующим реагентом с аффинностью связывания с прокальцитонином (ПКТ) и/или четвертым детектирующим реагентом с аффинностью связывания с бактерицидным белком, повышающим проницаемость (ВРІ); и где устройство выполнено с возможностью обнаружения Мх-В и СРБ/ПКТ в образце от субъекта для дифференцировки бактериальной от вирусной инфекции.

Один вариант осуществления изобретения относится к устройству, как описано в данном документе, дополнительно содержащему детектирующий реагент с аффинностью связывания с ВРІ.

Один вариант осуществления изобретения относится к устройству, как описано в настоящем документе, в котором указанные детектирующие реагенты выбраны из синтетических молекул, нуклеотидов, нуклеиновых кислот, аптамеров, пептидов, белков, ферментов и антител.

Один вариант осуществления изобретения относится к устройству, как описано в настоящей заявке, где указанные детектирующие реагенты помечены детектируемым маркером.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к устройству, как описано в настоящей заявке, где детектируемый маркер выбран из ферментной метки, флуоресцентной метки, радиоактивной метки, метки в виде частицы, цветной латексной частицы, цветной пластиковой частицы, цветной люминофорной частицы и флуоресцентной частицы.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к устройству, описанному в настоящей заявке, дополнительно содержащему тестовое окно, сконструированное для обеспечения возможности наблюдения за результатами теста.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к устройству, описанному в настоящей заявке, где детектирующие реагенты химически конъюгированы с детектируемым маркером для образования постоянного необратимого комплекса реагент-маркер.

Дополнительный вариант осуществления изобретения относится к описанному в настоящей заявке, где детектируемый маркер, конъюгированный с детектирующим реагентом, сконструирован так, чтобы быть видимым для пользователя, когда образец является положительным по Мх-В и/или СРБ и/или ПКТ

и/или ВРІ.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к устройству, как описано в настоящей заявке, где устройство сконструировано для выявления ПКТ и/или ВРІ в образцах крови человека.

Один из вариантов осуществления изобретения относится к способу дифференцировки бактериальной от вирусной инфекции у субъекта, включающему стадии:

- (a) получение образца от указанного субъекта;
- (b) обеспечение тест-системы, как описано в настоящей заявке;
- (c) внесение образца в тест-систему;
- (d) наблюдение отсутствия или присутствия обнаруживаемого комплекса реагент-маркер для определения наличия в образце Мх-В и/или СРБ, и/или ПКТ, и/или ВРІ и
- (e) определение инфекционного статуса пациента.

Один вариант осуществления изобретения относится к способу, как описано в настоящей заявке, где:

- (a) наличие Мх-В и отсутствие и/или низкое обнаружение СРБ/ПКТ/ВРІ указывает на вирусную инфекцию;
- (b) отсутствие Мх-В и присутствие СРБ/ПКТ/ВРІ указывает на бактериальную инфекцию и
- (c) присутствие Мх-В и присутствие СРБ/ПКТ/ВРІ указывает на смешанную инфекцию.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к способу, как описано в настоящей заявке, дополнительно предусматривающему анализ отсутствия или присутствия детектируемого комплекса реагент-маркер для определения наличия в образце СРБ/ПКТ/ВРІ.

Один вариант осуществления изобретения относится к способу, как описано в настоящей заявке, где:

- (a) наличие Мх-В и отсутствие СРБ/ПКТ и ВРІ указывает на вирусную инфекцию;
- (b) отсутствие Мх-В и наличие СРБ/ПКТ и ВРІ указывает на бактериальную инфекцию и
- (c) наличие Мх-В и наличие СРБ/ПКТ и ВРІ указывает на смешанную инфекцию. Еще один вариант осуществления изобретения относится к способу, описанному в настоящей заявке, в котором образец представляет собой образец крови.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к способу, описанному в настоящей заявке, где присутствие Мх-В, СРБ/ПКТ и/или ВРІ видно невооруженным глазом.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1А изображает примерный тестовый набор, состоящий из трех тест-полосок, покрытых мечеными антителами.

Фиг. 1В изображает различные тестовые изображения для вирусных инфекций, бактериальной инфекции, смешанных инфекций или неопределенной инфекции.

Фиг. 2 показывает результаты для различных вирусных и бактериальных патогенов.

Описание вариантов осуществления

Настоящее изобретение обеспечивает анализ по месту оказания медицинской помощи (РОС), который способен дифференцировать вирусные инфекции от бактериальных инфекций за короткое время. В частности, предложено диагностическое устройство для исследования по месту оказания медицинской помощи (РОС), содержащее тестовые маркеры для вирусной и бактериальной инфекции, которое эффективно помогает врачу в быстрой дифференцировке вирусных от бактериальных инфекций. Анализ по месту оказания медицинской помощи имеет следующие преимущества:

- 1) Этот анализ позволяет значительно сократить расходы на здравоохранение за счет снижения ошибочной диагностики и, следовательно, чрезмерного и неправильного использования антибиотиков.
- 2) Эффективность и достоверность этого анализа таковы, что устойчивость к антибиотикам будет снижена, поскольку антибиотики будут использоваться только при наличии бактериальной инфекции.
- 3) Этот анализ увеличит диагностический пакет врачебного кабинета и фармацевтов.

Таким образом, настоящее изобретение способствует правильному применению антибиотиков. Это означает использование антибиотиков только при необходимости и их правильное применение в случае, когда они требуются.

Антибиотики не противодействуют инфекциям, вызванным вирусами, таким как простуда, грипп, большинство видов ангины и бронхит. Даже многие инфекции синуса и ушей можно лечить без антибиотиков. Вместо этого облегчение симптомов может быть лучшим вариантом лечения этих инфекций. Прием антибиотиков при вирусных инфекциях, таких как простуда, грипп, боль в горле и бронхит

- не лечит инфекцию;
- не препятствует заболеванию других людей;
- не поможет вам или вашему ребенку чувствовать себя лучше;
- может вызвать ненужные и вредные побочные эффекты; а также
- может способствовать развитию устойчивости к антибиотикам, когда бактерии способны противостоять воздействию антибиотика и продолжают причинять вред.

Неправильно назначенные антибиотики имеют сомнительную терапевтическую пользу и подвергают пациентов потенциальным осложнениям терапии антибиотиками. Таким образом, быстрый результат,

полученный в ходе исследования по месту оказания медицинской помощи, позволяет поставить правильный диагноз и поддержать практикующего врача в его решении назначить правильное лекарство.

Для анализа в месте оказания медицинской помощи могут применяться различные устройства, например, устройство для латерального проточного иммуноанализа или система оптических датчиков, которая предназначена для взаимодействия с мобильным компьютерным устройством, как описано в WO 2016/116181.

Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения используется устройство для анализа образцов, например тест-полоска, для определения того, является ли инфекция бактериальной или вирусной. Тест-полоска включает зону нанесения образца и зону детекции. В этом способе берут образец и переносят на тест-полоску. Зона детекции включает по меньшей мере один реагент, специфичный для бактериального маркера, и по меньшей мере один реагент, специфичный для вирусного маркера.

В одном варианте осуществления маркер для вирусной инфекции представляет собой Мх-В, а маркер для бактериальной инфекции представляет собой С-реактивный белок (СРБ). Высокие уровни белка Мх-В тесно связаны с системной вирусной инфекцией. Белки устойчивости к миксовирусам (Мх), индуцируемые интерфероном, играют важную роль в борьбе с широким спектром вирусных инфекций. Мх-гомологичные белки ингибируют РНК и ДНК-содержащие вирусы.

Недавно было обнаружено, что Мх-В-белок является важным белком, который транспортирует вирусные компоненты из клетки [2]. Например, ВИЧ-белок транспортируется и уничтожается белком Мх-В, но не белком Мх-А [1]. Таким образом, в данном анализе по месту оказания медицинской помощи используют Мх-В-белок, поскольку он имеет только 63% гомологии с белком Мх-А и, следовательно, является функциональным Мх-белком в семействе Мх ГТФаз [3]. Было показано, что Мх-В сильно ингибирует вирусные инфекции за счет снижения уровня интегрированной вирусной ДНК. Кроме того, белок Мх-В находится внутри ядра и цитоплазмы. Напротив, белок Мх-А находится только в цитоплазме [4]. На основании новых результатов авторы настоящего изобретения выбрали Мх-В в качестве надежного маркера вирусных инфекций.

С-реактивный белок (СРБ), белок острой фазы, продуцируемый печенью в ответ на инфекцию, является надежным биомаркером бактериальных инфекций. Уровни СРБ у здоровых людей составляют менее 0,5 мг/л и повышены при инфекционных состояниях.

Прокальцитонин (ПКТ) представляет собой полипептидный гормон из 116 аминокислот. Этот белок в основном вырабатывается С-клетками щитовидной железы. Обычно уровень ПКТ в крови очень ограничен. Напротив, во время бактериальной инфекции этот белок экспрессируется и находится в диапазоне от 0,5 до 2 нг/мл. Преимущество этого белка состоит в том, что он обнаруживается через 6 ч после заражения, тогда как СРБ обнаруживается, самое раннее, в момент времени 12-16 ч.

Согласно одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к быстрому скрининговому тесту для идентификации Мх-В и/или СРБ/ПКТ/ВРІ в образце пациента. Образец может быть, например, образцом периферической крови, аспиратами из носоглотки, слезой, спинномозговой жидкостью и аспиратами из среднего уха.

Бактерицидный белок, повышающий проницаемость (ВРІ) представляет собой плюрипотентный белок, расположенный в нейтрофилах и тканях, который, вероятно, играет ключевую роль в защите хозяина от грамотрицательных бактерий и их эндотоксинов посредством своих свойств в качестве антибиотика и способности к нейтрализации и удалению эндотоксинов. ВРІ считается дополнительным биологическим маркером для усовершенствованного теста по месту оказания медицинской помощи с целью повышения надежности и точности теста. Во время бактериальной инфекции этот белок экспрессируется и находится в диапазоне от 1 до 20 мкг/мл.

Таким образом, дополнительный вариант осуществления изобретения относится к тесту по месту оказания медицинской помощи для идентификации Мх-В, ВРІ и/или СРБ/ПКТ в образце пациента.

В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения зона детекции включает по меньшей мере один реагент с аффинностью связывания с вирусным маркером Мх-В и по меньшей мере один реагент с аффинностью связывания с бактериальным маркером СРБ/ПКТ, и при необходимости по меньшей мере один реагент с аффинностью связывания с ВРІ, так что при контакте маркеров, присутствующих в образце, с соответствующими реагентами образуется меченый комплекс. Зона детекции включает партнера по связыванию бактериального маркера, который связывается с первым меченым комплексом, и партнера по связыванию вирусного маркера, который связывается со вторым меченым комплексом. Затем образец анализируют на наличие вирусного маркера и/или бактериального маркера.

Зона детекции может быть функционализирована путем иммобилизации различных рецепторных молекул, которые специфически связываются с соответствующими маркерами. Рецепторные молекулы могут быть выбраны из молекул природного происхождения, например антител, фрагментов антител или тому подобного. Рецепторные молекулы могут быть синтетическими молекулами, например аптамерами. Зона детекции содержит по меньшей мере одну сенсорную область, на которой в качестве рецепторов для определения соответствующих маркеров расположены антитела или другие обеспечивающие специфичность рецепторы, такие как аптамеры, которые специфически связываются с соответствующими

маркерами, подлежащими обнаружению. Таким образом, обеспечивается эффективная, простая в применении функционализация поверхности сенсорной области.

Антитела или другие рецепторы, обеспечивающие специфичность, такие как, например, аптамеры, обладают высокой селективностью при обнаружении специфических анализируемых веществ; следовательно, они особенно подходят для распознавания специфических маркеров заболевания. Что касается возможных рецепторов, антител, расположенные на сенсорной поверхности, или другие обеспечивающие специфичность рецепторы, такие как аптамеры, например, связывают аналит, который нужно выявить, и затем приводят к изменению свойств. В некоторых вариантах осуществления аптамеры имеют то преимущество, что они более стабильны и, следовательно, постоянно функционируют.

Поскольку аптамеры имеют сходные применения с антителами, многочисленные методы обнаружения, которые используют преимущества антител, могут быть превращены в методы на основе аптамеров. Например, большинство иммуноанализов для малых молекул представляют собой конкурентные анализы, основанные на замене поверхностно-связанных антител анализируемым веществом в растворе.

Один из вариантов осуществления устройства по настоящему изобретению включает зону нанесения образца.

Еще один вариант осуществления изобретения относится к устройству, которое дополнительно включает зону реагента. Зона реагента содержит по меньшей мере один реагент, специфичный для вирусного бактериального маркера, так что, когда вирусный маркер, присутствующий в образце, контактирует с указанным реагентом, образуется меченый комплекс вирусного реагента. Кроме того, зона реагента содержит по меньшей мере один реагент, специфичный для бактериального маркера, так что, когда бактериальный маркер, присутствующий в образце, контактирует с указанным реагентом, образуется меченый комплекс бактериального реагента. В одном варианте осуществления изобретения зона реагента содержит один реагент, специфичный для бактериального маркера СРБ/ПКТ, и один реагент, специфичный для бактериального маркера ВРІ, так что, когда указанные бактериальные маркеры, присутствующие в образце, контактируют с указанными реагентами, образуются меченые комплексы.

Зона детекции на устройстве включает партнера по связыванию вирусного маркера, который связывается с меченым комплексом вирусного реагента, и партнера по связыванию бактериального маркера, который связывается с меченым комплексом бактериального реагента. Устройство может представлять собой тест-полоску для хроматографии.

В предпочтительном варианте осуществления присутствие вирусного маркера или бактериального маркера проявляется тестовой линией, видимой невооруженным глазом. Присутствие вирусного маркера может указываться первой тестовой линией, в то время как присутствие бактериального маркера указывается второй и/или третьей тестовой линией. В некоторых вариантах осуществления первая тестовая линия отображает первый цвет при положительной реакции, а вторая тестовая линия отображает второй цвет, отличающийся от первого цвета, при положительной реакции, и/или третья тестовая линия отображает третий цвет, отличный от первого и второго цвета, при положительной реакции. В вариантах осуществления, в которых первая, вторая и третья тестовые линии расположены в одном и том же месте на устройстве анализа образцов, они предпочтительно имеют разные цвета, проявляющиеся, когда первая, вторая и/или третья тестовые линии являются положительными.

В одном варианте осуществления две или три тестовые линии пространственно отделены друг от друга на устройстве. В таком варианте осуществления цвет может быть одинаковым, когда тестовые линии являются положительными.

В одном варианте осуществления изобретения анализируемый образец наносят на носитель. Носитель может быть изготовлен из одного хроматографического материала или предпочтительно нескольких капиллярных активных материалов, изготовленных из одинаковых или разных материалов и закрепленных на несущей подложке. Эти материалы находятся в тесном контакте друг с другом, образуя транспортный путь, по которому жидкость, движимая капиллярными силами, течет из зоны нанесения, проходя зону реагента, к одной или нескольким зонам детекции.

Предпочтительно образец непосредственно наносят на носитель путем погружения зоны нанесения носителя в образец. Альтернативно, нанесение образца на носитель может быть осуществлено путем сбора образца с сухим или смоченным элементом для отбора проб, из которого образец может быть перенесен, при необходимости после увлажнения, в зону нанесения носителя. Обычно элемент для отбора проб стерилен и может быть сухим или предварительно обработанным жидкостью перед стадией сбора. Материалы, пригодные для элементов для отбора проб согласно изобретению, могут включать синтетические материалы, тканые материалы или волокнистые материалы.

В зависимости от типа способа обнаружения в зоне реагентов, которая находится между зоной нанесения и зоной детекции, присутствуют разные реагенты. В сэндвич-иммуноанализе предпочтительно присутствует меченый, не иммобилизованный реагент в зоне реагента, который специфичен для определяемого вирусного и бактериального маркера. Таким образом, когда вирусный или бактериальный маркер, присутствующий в образце, контактирует с соответствующим меченым вирусным или бактериальным реагентом, присутствующим в зоне реагента, между маркером и соответствующим меченым реагентом образуется меченый комплекс. Меченый комплекс, в свою очередь, способен формировать дополни-

тельный комплекс с иммобилизованным партнером по связыванию вирусного или бактериального маркера в зоне детекции. В конкурентном иммуноанализе зона реагента предпочтительно содержит меченый, не иммобилизованный аналог маркера, который конкурирует с маркером за иммобилизованного партнера по связыванию маркера в зоне детекции. Партнерами по связыванию маркера в зоне реагента и в зоне детекции предпочтительно являются моноклональные, поликлональные или рекомбинантные антитела или фрагменты антител, способные специфически связываться с соответствующим маркером.

Обнаружение маркера может быть достигнуто в зоне детекции. Иммобилизованная молекула связывает меченый комплекс или меченый маркер-аналог посредством иммунной реакции или другой реакции в зоне детекции, создавая тем самым видимую тестовую линию в зоне детекции во время процесса. Предпочтительно метка является оптически выявляемой меткой. Формирование комплекса в зоне детекции иммобилизует метку, и тестовая линия становится видимой невооруженным глазом, что указывает на положительный результат теста. Подходящими являются прямые метки, например, особенно золотые метки, которые лучше всего узнаются невооруженным глазом. Кроме того, электронно-считывающее устройство (например, на основе фотометрического, акустического, импедиметрического, потенциометрического и/или амперометрического преобразователя) может использоваться для получения более точных результатов и полуколичественного определения анализируемого вещества. Другими подходящими метками могут быть латекс, флуорофоры или люминофоры.

В одном варианте осуществления чувствительность визуально считываемых латеральных проточных иммуноанализов повышают путем добавления небольшого количества конъюгатов флуоресцентного красителя или флуоресцентных латексных гранул к исходному материалу конъюгата. Когда визуально присутствует тестовая линия видимого спектра, результат теста наблюдают и регистрируют.

В одном варианте осуществления изобретения реагенты сконструированы так, что видимая тестовая линия, соответствующая присутствию вирусного маркера, будет отделена от тестовых линий, соответствующих присутствию бактериальных маркеров. Следовательно, можно легко определить, содержит ли образец бактериальные или вирусные маркеры (или оба) просто по месту расположения тестовых линий в зоне детекции. В другом предпочтительном варианте осуществления реагенты могут быть выбраны таким образом, чтобы формировались тестовые линии разного цвета. То есть присутствие вирусного маркера будет вызывать развитие линии, окрашенной в иные цвета, чем при наличии бактериального маркера. Например, метка, соответствующая реагенту, распознающему вирусный маркер, может быть красной, тогда как метка, соответствующая реагенту, распознающему бактериальные маркеры, может быть зеленой. Дифференциально окрашенные метки, которые могут быть прикреплены к неиммобилизованным реагентам, хорошо известны. Некоторые примеры включают коллоидное золото, коллоидный селен, коллоидный углерод, латексные гранулы, парамагнитные гранулы, флуоресцентные и хемилюминесцентные агенты, и их смеси, но не ограничиваются ими.

На фиг. 1 показана хроматографическая тест-полоска с тест-линией, соответствующей присутствию вирусного маркера, второй отдельной тест-линией, которая обнаруживает присутствие первого бактериального маркера и третьей, отдельной тест-линией, которая обнаруживает присутствие второго бактериального маркера. Образец наносят на зону нанесения тест-полоски. Как показано на фиг. 1, образец затем проходит зону реагента, содержащую по меньшей мере один меченый партнер по связыванию вируса и по меньшей мере один меченый партнер по связыванию бактерий. Меченый партнер по связыванию вируса способен специфически связываться с представляющим интерес вирусным маркером с образованием конъюгата, который, в свою очередь, способен специфически связываться с другим специфическим реагентом или партнером по связыванию в зоне детекции. Меченый партнер по связыванию бактерий способен специфически связываться с представляющим интерес бактериальным маркером с образованием конъюгата, который, в свою очередь, способен специфически связываться с другим специфическим реагентом или партнером по связыванию в зоне детекции.

Тест-полоска также включает зону детекции, содержащую по меньшей мере одну первую секцию для обнаружения вирусного маркера, например тестовую линию, включающую иммобилизованный специфический партнер по связыванию, комплементарный комплексу вирусных реагентов, образованному вирусным маркером и его меченым партнером по связыванию. Таким образом, на тестовой линии партнеры по связыванию из зоны детекции захватывают меченые партнеры по связыванию вируса из зоны реагента вместе со своими связанными вирусными маркерами. Эта локализация вирусного маркера с его мечеными партнерами по связыванию вызывает проявление тестовой линии. На тестовой линии присутствие вирусного маркера определяют качественным и/или количественным считыванием показаний тестовой линии, полученных в результате накопления меченых партнеров по связыванию.

Зона детекции также включает по меньшей мере один участок для обнаружения по меньшей мере одного бактериального маркера, например тестовую линию, включающую иммобилизованный специфический партнер по связыванию, комплементарный комплексу бактериальных реагентов, образованному бактериальным маркером и его меченым партнером по связыванию. Таким образом, на тестовой линии партнеры по связыванию из зоны детекции захватывают меченые партнеры по связыванию бактерий из зоны реагента вместе со своими связанными бактериальными маркерами. Эта локализация бактериального маркера с его мечеными партнерами по связыванию обеспечивает индикацию на тестовой линии.

На тестовой линии присутствие бактериального маркера определяется качественным и/или количественным считыванием показаний тестовой линии, возникающих в результате накопления меченых партнеров по связыванию.

В одном варианте осуществления изобретения зона детекции может содержать дополнительную тестовую линию для обнаружения второго бактериального маркера.

Один пример теста по месту оказания медицинской помощи для дифференцировки вирусной и бактериальной инфекции показан на фиг. 1. Как обсуждалось выше, Мх-В является диагностическим маркером вирусной инфекции, тогда как СРБ и ВРІ являются диагностическими маркерами бактериальной инфекции. Положительный результат для белка Мх-В, с отрицательным результатом для белка СРБ/ПКТ и ВРІ указывает на вирусную инфекцию. Положительный результат для СРБ/ПКТ и ВРІ с отрицательным результатом для белка Мх-В указывает на бактериальную инфекцию. Слабый положительный результат для Мх-В, СРБ/ПКТ и ВРІ указывает на инфицирование как бактерией, так и вирусом (смешанная инфекция). Отсутствие бактериальной или вирусной инфекции указывается отрицательным результатом на Мх-В, СРБ/ПКТ и ВРІ. Хотя конкретные цветовые линии обсуждаются в этом примере, другие цвета или одинаковые цвета в разных местах на тест-полоске для обозначения вирусных или бактериальных маркеров находятся в пределах сущности настоящего изобретения.

Когда используют разноцветные линии, линии могут быть разделены или не разделены промежуток. В последнем случае метки выбираются таким образом, чтобы цвет, видимый при наличии обоих маркеров, отличался от цветов, видимых при наличии отдельных маркеров. Например, наличие вирусного маркера может быть обозначено красной линией; наличие бактериального маркера может быть обозначено синей линией; и наличие обоих маркеров обозначено фиолетовой линией (от сочетания красного и синего цвета).

В другом варианте осуществления тест-полоска также может включать контрольную секцию, которая указывает на функциональность тест-полоски. При наличии контрольная секция может быть предназначена для передачи пользователю сигнала о том, что устройство сработало. Например, контрольная секция может содержать реагент (например, антитело), который будет связываться с мечеными реагентами из зоны реагентов. В качестве дополнительной альтернативы контрольная секция может содержать иммобилизованные вирусные и бактериальные маркеры, которые будут реагировать с избытком меченого реагента из зоны реагента. Контрольная секция может быть расположена выше или ниже по потоку от зоны детекции. Индикатор положительного контроля сообщает пользователю, что образец прошел необходимое расстояние через тестовое устройство.

Мх-гомологи также могут быть обнаружены примерно при 10% бактериальных инфекций, связанных с лихорадкой. Чтобы повысить надежность теста, пороговое значение для белка Мх-В устанавливается в диапазоне 0,01-0,05 Ед./10 000 лейкоцитов, предпочтительно 0,025 Ед./10 000 лейкоцитов. Для СРБ пороговое значение устанавливается в диапазоне 5-100 мг/л или в диапазоне 25-75 мг/л, или составляет 40 мг/л. Для ПКТ пороговое значение устанавливается в диапазоне от 0,5 нг/мл до >2 нг/мл. Для ВРІ пороговое значение устанавливается в диапазоне от 1 мкг/мл до >10 мкг/мл.

Примеры

Примеры, которые приведены ниже, изложены, чтобы помочь в понимании изобретения, но не предназначены и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения каким-либо образом. Примеры не включают подробного описания традиционных способов. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области техники.

Пример 1. Описание анализа

Анализ по месту оказания медицинской помощи выполняют с помощью устройства с латеральным потоком. Соответствующие реагенты, необходимые для каждого анализа, уже включены в картридж.

Этап А: Под действием адгезивной силы капля крови (приблизительно 0,005-0,010 мл) переносится из картриджа в устройство.

Этап В: Прежде всего, клетки в капле крови лизируются за счет действия примерно 0,001 мл литического буфера, который состоит из 20% NP-40, 100 мМ Трис-HCL, pH 7,2, 0,05% азида натрия).

Этап С. Лизированная кровь направляется по двум тест-полосками и, таким образом, инкубируется.

Этап D: Раствор антител 1 против Мх-В связывает возможный присутствующий белок Мх-В в крови. Это антитело уже конъюгировано с меченым маркером.

Этап D: Связанный белок Мх-В направляется через раствор второго носителя, в котором находится второе антитело против Мх-В. Только уже связанный белок Мх-В с первым меченым антителом будет связан со вторым антителом.

Этап E: После промывания несущим раствором первое меченое и связанное антитело становится видимым в форме цветной реакции на полоске.

Этап F: Детекцию СРБ/ПКТ/ВРІ проводят, как описано на этапах А-Е, где на второй тест-полоске используют одно антитело против СРБ/ПКТ и одно антитело против ВРІ.

Пример 2. Процедура анализа

В двух разных отделениях скорой помощи у неизвестных пациентов тестировали белок Мх-А, бе-

лок Мх-В, СРБ/ПКТ и ВРІ в цельной крови. Все пациенты дали информированное согласие согласно Хельсинкскому соглашению, что их данные предназначены исключительно для исследований. Впоследствии в ходе исследований был продолжен анамнез и определено происхождение инфекции. Таким образом, можно различить 120 вирусных инфекций и 50 бактериальных инфекций. Результат этого исследования документирован на фиг. 2. С помощью белка Мх-В было выявлено 92% вирусных инфекций. Напротив, только 77% идентичных вирусных заболеваний были обнаружены с использованием белка Мх-А. С помощью определения белков СРБ/ПКТ/ВРІ спектр для выявления бактериальных заболеваний был увеличен до 90%. Если бы были измерены только белок СРБ и ПКТ, было бы обнаружено только 80% бактериальных заболеваний. Таким образом, комбинация маркеров белка Мх-В для вирусных заболеваний и СРБ/ПКТ/ВРІ для бактериальных заболеваний приводит к чувствительности или специфичности детекции более 90%.

Пример 3. Результаты

Описание результатов вирусной инфекции: чтобы доказать, что цветовая реакция функционирует, обе контрольные полоски на левой стороне являются контрольными. Средняя полоска сверху окрашивается, полоска внизу остается бесцветной. Обе полоски справа остаются бесцветными.

Описание результатов для бактериальной инфекции: обе полоски в середине остаются бесцветными, одна верхняя тоже, но нижняя полоска справа окрашивается.

Описание результатов для смешанной инфекции: средняя полоска сверху, а также нижняя полоска справа окрашиваются.

Ссылки

- [1] Haller, O., Dynamin is forever Mx-B 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 Capsid 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 anti 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. Int. 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. *Mol Pathol*. 1997 Feb;50(1):9-14.
- [17] Self W.H., et al., Diagnostic Accuracy of Febrile Dx: A Rapid Test to Detect Immune Responses to Viral and Bacterial Upper Respiratory Infections. *J Clin Med*. 2017 Oct 7;6(10).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устройство для дифференцировки между бактериальной и вирусной инфекциями для анализа по месту оказания медицинской помощи (РОС), включающее:

- (a) зону нанесения образца и
- (b) зону детекции с первым детектирующим реагентом с аффинностью связывания с Мх-В-белком (Мх-В) и вторым детектирующим реагентом с аффинностью связывания с С-реактивным белком (СРБ) и/или прокальцитонином (ПКТ); и

где устройство содержит необходимые реагенты для обнаружения Мх-В и СРБ и/или ПКТ в образце крови субъекта для дифференцировки между бактериальной и вирусной инфекциями.

2. Устройство по п.1, дополнительно включающее третий детектирующий реагент с аффинностью связывания с бактерицидным белком, повышающим проницаемость (ВРІ).

3. Устройство по п.1 или 2, где указанные детектирующие реагенты выбраны из синтетических молекул, нуклеотидов, нуклеиновых кислот, аптамеров, пептидов, белков, ферментов и антител.

4. Устройство по п.3, где указанные детектирующие реагенты маркированы детектируемым маркером.

5. Устройство по п.4, где детектируемый маркер выбран из ферментной метки, флуоресцентной метки, радиоактивной метки, метки в виде частицы, цветной латексной частицы, цветной пластмассовой частицы, цветной люминофорной частицы и флуоресцентной частицы.

6. Устройство по любому из пп.1-5, дополнительно включающее тестовое окно, выполненное с возможностью наблюдения за результатами теста.

7. Устройство по любому из пп.1-6, где детектирующие реагенты химически конъюгированы с детектируемым маркером для образования постоянного необратимого комплекса реагент-маркер.

8. Устройство по любому из пп.1-7, где детектируемый маркер, конъюгированный с детектирующим реагентом, сконструирован так, чтобы быть видимым для пользователя, когда образец крови является положительным по Мх-В и/или СРБ, и/или ПКТ, и/или ВРІ.

9. Устройство по любому из пп.1-8, выполненное с возможностью качественного и/или количественного измерения наличия Мх-В и/или СРБ, и/или ПКТ, и/или ВРІ в образцах крови человека.

10. Способ дифференцировки бактериальной инфекции от вирусной инфекции у субъекта, включающий стадии:

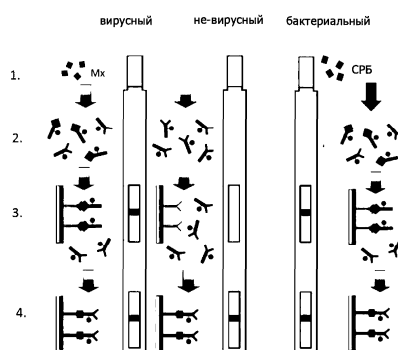
- (a) получение образца крови от указанного субъекта;
- (b) обеспечение устройства по любому из пп.1-9;
- (c) внесение образца крови в устройство;
- (d) наблюдение отсутствия или присутствия обнаруживаемого комплекса реагент-маркер для определения наличия в образце крови Мх-В и СРБ и/или ПКТ, где:
 - (i) наличие Мх-В и отсутствие СРБ и/или ПКТ указывает на вирусную инфекцию;
 - (ii) отсутствие Мх-В и наличие СРБ и/или ПКТ указывает на бактериальную инфекцию и
 - (iii) наличие Мх-В и наличие СРБ и/или ПКТ указывает на смешанную инфекцию;
- (e) определение, является ли инфекция бактериальной, вирусной или смешанной, тем самым определяя инфекционный статус пациента.

11. Способ по п.10, дополнительно предусматривающий выявление отсутствия или наличия детектируемого комплекса реагент-маркер для определения наличия в образце ВРІ.

12. Способ по п.11, где:

- (a) наличие Мх-В и отсутствие СРБ и/или ПКТ и ВРІ указывает на вирусную инфекцию;
- (b) отсутствие Мх-В и наличие СРБ и/или ПКТ и ВРІ указывает на бактериальную инфекцию и
- (c) наличие Мх-В и наличие СРБ и/или ПКТ и ВРІ указывает на смешанную инфекцию.

13. Способ по п.10, где наличие Мх-В, СРБ и/или ПКТ определяют невооруженным глазом.



Фиг. 1А

изображение
теста



вирусная инфекция



бактериальная инфекция



смешанная инфекция



неопределенная инфекция

Фиг. 1В

	Мх-pos.В	Мх-pos. +	СРБ/ПКТ	ВРІ	Мх-А белок												
ВЗВ ветряная оспа	3	0	0	0	3												
ВЗВ опоясывающий лишай	15	9	4	2	1												
Вирус Эпштейна-Барр	13	11	0	2	1												
ЦМВ	11	9	0	2	1												
Вирус Коксаки	6	6	0	1	0												
Грипп	31	30	0	1	1												
Парамиксовирус	21	18	2	2	0												
Тыф вирус	20	8	10	1	0												
Итого	120	94	16	11	4												
Процент		92		13	77												
Стафилококки	13	0	0	12	0												
Стрептококки	8	0	2	7	0												
Туберкулез	9	0	0	8	0												
Псевдомонады	4	1	0	1	1												
Энтерококки	3	0	0	3	0												
E. Coli	3	0	0	1	2												
Клебсиеллы	1	0	0	1	1												
Бранхамеллы	2	0	0	1	1												
Боррелии	2	0	0	2	0												
Коринебактерии	3	0	1	2	0												
Иерсинии	1	0	0	1	0												
Листерии	1	1	0	1	0												
Итого	50	2	3	40	5												
Процент				90													
<table><tr><td>Теоретическое количество Обнаружение</td><td>50</td><td>46</td></tr><tr><td>Вирусная инфекция</td><td>50</td><td>45</td></tr><tr><td>Бактериальная инфекция</td><td>50</td><td>45</td></tr><tr><td>Итого</td><td>91</td><td>91</td></tr></table>						Теоретическое количество Обнаружение	50	46	Вирусная инфекция	50	45	Бактериальная инфекция	50	45	Итого	91	91
Теоретическое количество Обнаружение	50	46															
Вирусная инфекция	50	45															
Бактериальная инфекция	50	45															
Итого	91	91															
Обнаружение вирусной и бактериальной инфекции при проведении обоих тестов																	

Фиг. 2

