

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042962**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.10

(51) Int. Cl. **C12Q 1/68** (2006.01)

(21) Номер заявки
201891636

(22) Дата подачи заявки
2017.02.15

(54) ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ УСТРОЙСТВО И СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ

(31) **1650197-5**

(32) **2016.02.15**

(33) **SE**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/SE2017/050147**

(87) **WO 2017/142467 2017.08.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЕМПЕ ДАЙАГНОСТИК АБ (SE)

(72) Изобретатель:
**Асалапурам Паванкумар, Нильссон
Бернитц Матс (SE)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В. (RU)**

(56) PAVANKUMAR A R et al., "Detection of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis by padlock probes combined with lateral flow nucleic acid biosensor", 2014, Conference paper, 35th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology & Poster downloaded from <https://f1000research.com/posters/1096372>; whole document

YETISEN A K et al., "Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices", 2013, vol 13, pages 2210-51, Lab on a Chip; whole document; page 2212, column 1, line 36 - line 44; page 2244, column 2, line 31 - line 36

WO-A2-2010079479

WO-A1-2013163353

LACOMA A et al., "GenoType MTBDRplus Assay for Molecular Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in Mycobacterium tuberculosis Strains and Clinical Samples", 2008, vol 46, pages 3660-3667, Journal of clinical Microbiology; whole document; table 1 and figure 1

FENTON EM et al., "Multiplex Lateral-Flow Test Strips Fabricated by Two-Dimensional Shaping", 2009, vol 1, pages 124-129, ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES; whole document

WO-A2-03008971

PAVANKUMAR A R et al., "Proficient Detection of Multi-Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis by Padlock Probes and Lateral Flow Nucleic Acid Biosensors", 2016, vol 88, pages 4277-4284, Anal Chem.; whole document

KAMPHEE H et al. "Rapid Molecular Detection of Multidrug-Resistant Tuberculosis by PCR-Nucleic Acid Lateral Flow Immunoassay", 2015, vol 10, e0137791, PloS ONE; whole document

KAEPHINIT T et al., "Detection of Mycobacterium tuberculosis by using loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick biosensor", 2012, Biomedical Engineering International Conference, BMEiCON-2011 pages 86-88; whole document

NIEMZ A et al., "Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases", 2011, vol 29, pages 240-249, Trends in Biotechnology; whole document

LU H-W et al., "System for Portable Nucleic Acid Testing in Low Resources Settings", 2013, vol 8615, Proceeding of SPIE; whole document

WO-A2-2015033229

(57) Настоящее изобретение относится к устройству (10; 30; 50) для анализа жидких образцов, содержащих амплифицированные нуклеиновые кислоты, где указанное устройство содержит пластину (16) для нанесения образца; первую (18) и вторую (19) полосы для анализа образца, предназначенные для анализа различных аспектов образца нуклеиновой кислоты, где указанные сегменты содержат последовательности нуклеиновых кислот, которые комплементарны заранее определенным последовательностям нуклеиновых кислот-мишеней, присутствие или отсутствие которых анализируют; и корпус (11), в котором расположены указанная пластина для нанесения образца и по меньшей мере две удлиненные полосы для анализа образца, где результат анализа обнаруживают снаружи корпуса по комбинации расположенных в линию сегментов указанных первой и второй полос для анализа. Кроме того, изобретение относится к способу определения присутствия или отсутствия нуклеиновой кислоты-мишени, обеспечивающему подтверждающие результаты, в комбинации с заранее определенной последовательностью в образце субъекта, с использованием устройства в соответствии с изобретением.

B1**042962****042962****B1**

Область изобретения

Описание настоящего изобретения относится к устройству для анализа жидких образцов и диагностическому способу, при котором используется указанное устройство.

Предшествующий уровень техники

Инфекционные заболевания приводят к больше чем 56 млн смертей ежегодно (>153000 в сутки), тогда как оставшиеся миллиарды пораженных людей страдают от послеинфекционных болезненных состояний, таких как истощение, недостаточное умственное и физическое развитие, нарушение развития когнитивных функций и т.п. Преобладающие инфекции, такие как диарея, вирус иммунодефицита человека (HIV) и туберкулез (TB) составляют больше чем половину от общего уровня смертности и требуют незамедлительного медицинского внимания. В соответствии с Всемирной Организацией Здравоохранения (WHO) и UNICEF (Детский фонд Организации Объединенных Наций) приблизительно 2 миллиарда людей страдают от диарейных заболеваний и 1,9 млн детей в возрасте младше 5 лет умирают каждый год. Последний показатель составляет до 18% от всех смертей детей (>5000 смертей в сутки). В 2014 году у приблизительно 36,9 млн человек был выявлен HIV, из которых 2,6 млн составляют дети. Хотя уровни смертности в развитых странах низки, о 50-80% сообщают для развивающихся стран в регионах Африки и Юго-Восточной Азии, где люди лишены хороших медицинских учреждений и надлежащей диагностики инфекционных заболеваний.

В качестве примера TB поражает больше чем 9 миллионов людей, приводя к смертям 1,5 млн людей ежегодно. Вызывающий заболевание TB агент *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) как правило приводит к развитию устойчивости за счет приобретения мутаций последовательности в хромосоме. Мутировавшие штаммы MTB, которые приобрели устойчивость к по меньшей мере двум основным лекарственным средствам первой линии против TB изониазиду (INH) и рифампицину (RIF), классифицируются как мультирезистентные TB (MDR-TB). Дополнительные мутации в MTB вносят вклад в расширенную устойчивость к лекарственным средствам (XDR-TB) в отношении большинства из оставшихся антибиотиков, что затрудняет диагностику и лечение. Прежде всего, MTB обнаруживают при помощи микроскопии мокроты, но этот способ не может идентифицировать штаммы, устойчивые к лекарственным средствам. Культуральные способы тестирования чувствительности к лекарственным средствам (DST) являются трудоемкими и времязатратными (для получения правильных результатов потребуется время от недель до месяцев) вследствие медленного роста MTB. В противоположность, тесты путем амплификации нуклеиновой кислоты (NAAT), основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР) обеспечивают быстрые результаты обнаружения устойчивых к лекарственным средствам штаммов MTB при помощи различных автоматических и полуавтоматических способов. Например, основанный на ПЦР анализ GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) обеспечивает результаты в течение менее чем 2 ч путем непосредственного анализа образцов мокроты. Анализ GeneType MTBDRplus с гибридизацией с зондом (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Germany) способен параллельно обнаруживать маркеры множественной устойчивости, но по оценке система обнаруживает только 95% и 74% штаммов, устойчивых к RIF и INH, соответственно. Кроме того, эти два теста трудны в исполнении в лабораториях с ограниченными ресурсами вследствие требований к подготовленному лабораторному персоналу и инфраструктуре. Таким образом, из-за затрат и требований к приборной базе и подготовленному персоналу существующие в настоящее время тесты, основанные на амплификации нуклеиновых кислот (NAAT) затрудняют надлежащее обнаружение MDR-TB в условиях с ограниченными ресурсами.

Правильная и надежная идентификация микробов, вызывающих заболевания, и их генетической структуры, приводящей к лекарственной устойчивости, остается затруднительной, особенно в периферийных клинических условиях. Таким образом, в области диагностики различных бактериальных инфекций сохраняется потребность в улучшенных диагностических устройствах и способах. В частности, сохраняется потребность в простом и надежном устройстве, которое может быть использовано в комбинации с качественным молекулярным способом, который может преодолеть технические, а также клинические трудности в обнаружении бактериальных инфекций, например MDR-TB, для того, чтобы обеспечить подходящее решение для периферийных учреждений здравоохранения с ограниченными возможностями.

Примеры отличающихся типов устройства, предназначенного для тестирования образцов, раскрыты в WO 2010/079479 и WO 2013/163353, которые могут обеспечить один сигнал с одного образца-мишени последовательным образом. Тем не менее, эти результаты являются полуколичественными и не могут быть подтверждающими, что особенно влияет на антибиотическое лечение. Таким образом, существует потребность в более хороших и удобных в эксплуатации устройствах, обеспечивающих множество результатов для образца и обеспечивающих подтверждающие результаты для того, чтобы начать подходящее лечение даже после первичного клинического осмотра.

Краткое изложение сущности изобретения

Задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить новое устройство для анализа жидких образцов, содержащих амплифицированные нуклеиновые кислоты.

Задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить устройство, которое преодолевает недостатки, известные для предшествующего уровня техники.

Задача настоящего изобретения также заключается в том, чтобы предложить устройство, которое

обеспечивает возможность для одновременного обнаружения множества заранее определенных последовательностей нуклеиновых кислот.

Задача настоящего изобретения также заключается в том, чтобы предложить устройство, которое является простым, удобным для использования и обеспечивает надежный результат.

Кроме того, задача настоящего изобретения также заключается в том, чтобы предложить устройство, которое подходит для периферийных лабораторий и лабораторий с ограниченными условиями.

Также задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить комбинированный способ для обнаружения множества заранее определенных последовательностей нуклеиновых кислот.

Также задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить способ обнаружения присутствия бактерий, устойчивых к лекарственному средству и/или антибиотику, нацеленных на мутации гена у субъекта.

Этим и другим задачам, которые очевидны для специалиста в данной области техники из описания настоящего изобретения, удовлетворяют различные аспекты изобретения, заявленные в формуле изобретения и в общем раскрытые здесь.

Таким образом, в первом аспекте описания настоящего изобретения предложено устройство для анализа жидких образцов, содержащих амплифицированные нуклеиновые кислоты, где указанное устройство содержит

пластину для нанесения образца;

первую и вторую полосы для анализа образца, предназначенные для анализа различных аспектов образца нуклеиновой кислоты, где первая и вторая полосы являются удлиненными и проходят от пластины для нанесения образца, и каждая из указанных первой и второй полос содержит по существу прямой участок для анализа, разделенный на множество сегментов, каждый из которых выполнен таким образом, чтобы указывать на присутствие или отсутствие в указанном образце нуклеиновой кислоты-мишени с заранее определенной последовательностью, где нуклеиновая кислота-мишень с определенной последовательностью непосредственно или опосредованно связана с детектирующей молекулой, и

где участки для анализа указанных первой и второй полос для анализа образца, содержат поддерживающую пленку, покрытую прозрачным слоем толщиной по меньшей мере 0,1 мм, где указанные участки для анализа выполнены для анализа присутствия или отсутствия нуклеиновых кислот с различными заранее определенными последовательностями, где указанные участки для анализа первой и второй полос для анализа образца имеют по существу одинаковую длину и расположены параллельно, так что результат анализа обнаруживают на основе комбинации трехмерных маркеров, появляющихся в прозрачном слое расположенных в линию сегментов указанных первой и второй полос для анализа,

где указанные сегменты содержат последовательности нуклеиновых кислот, которые комплементарны заранее определенным последовательностям нуклеиновых кислот-мишеней, присутствие или отсутствие которых анализируют; и

корпус, в котором расположена указанная пластина для нанесения образца, и по меньшей мере две удлиненные полосы для анализа образцов, где указанный корпус имеет лицевую сторону, в которой выполнен канал для введения образца, обеспечивающий возможность доступа к пластине для нанесения образца снаружи корпуса, и по меньшей мере одно отверстие, обеспечивающее возможность обнаружения результата анализа снаружи корпуса.

В устройстве в соответствии с описанием настоящего изобретения могут, например использоваться биосенсоры нуклеиновых кислот для латерального проточного анализа (LFNAB). В LFNAB маркеры, содержащие последовательности нуклеиновых кислот, которые комплементарны определенной последовательности нуклеиновой кислоты, иммобилизованы на мембране, например нитроцеллюлозной мембране или нейлоновой мембране. По мере того, как образец движется вдоль полосы для анализа, молекулы нуклеиновых кислот, содержащие определенную последовательность нуклеиновой кислоты, будут связываться с комплементарными им иммобилизованными последовательностями.

Устройство в соответствии с изобретением обеспечивает возможность для анализа образцов, не требуя дополнительного продвинутого оборудования для медицинского анализа, что делает его весьма полезным в географических областях, в которых ограничен доступ к оборудованию для медицинского анализа. Устройство благодаря своему характерному дизайну позволяет получать подробный результат, который облегчает правильное и эффективное лекарственное лечение, позволяя избежать эмпирический подход. Таким образом, это весьма благоприятно для пациента, и помогает избежать ненужных побочных действий и уменьшает количество предписываемых лекарственных средств без вреда для пациента. Пластина для нанесения образца и участки для анализа, защищены корпусом и готовы для использования, не требуя каких-либо приготовлений.

В частности, устройство в соответствии с описанием настоящего изобретения обеспечивает путь для получения информации о, например, картине лекарственной чувствительности на ранних стадиях постановки диагноза, которая безусловно может помочь лечащим врачам начать подходящее лечение инфекционных заболеваний. Кроме того, устройство в соответствии с настоящим изобретением подходит для применения в периферийных лабораториях.

Кроме того, различные сегменты участков для анализа, содержащие поддерживающую пленку, по-

крытую прозрачным слоем, образуют весьма отчетливую трехмерную метку, появляющуюся в прозрачном слое индикаторного сегмента, который облегчает регистрацию результата и обеспечивает то, что результат регистрируется правильным образом.

Использованный здесь термин "инфекционные заболевания" относится к физиологическому заболеванию, вызванному микроорганизмами, такими как бактерии, вирусы, паразиты или грибы. Инфекционные заболевания могут распространяться непосредственно или опосредованно среди людей и животных.

Использованный здесь термин "нуклеиновые кислоты" относится к любой форме дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), которая состоит из оснований, таких как аденин, гуанин, цитозин и тимин, которые несут генетические коды и определяют биологическую роль любого живого организма. Похожее на ДНК, но более изменчивые рибонуклеиновые кислоты (РНК), которые образованы аденином, гуанином, цитозином и урацилом, переносят генетические коды и передают информацию. Таким образом, термин нуклеиновые кислоты относится к любой форме ДНК или РНК и ассоциирующихся с ними молекул. Не ограничивающие объем изобретения примеры таких ассоциатов включают кДНК, мРНК, тРНК, рРНК, мяРНК, миРНК, рiРНК, гнРНК, scaРНК, длинную нкРНК, внеклеточную ДНК и внеклеточную РНК.

Использованный здесь термин "периферические лабораторные условия" относится к любой клинической лаборатории, например медицинским центрам по обслуживанию сельского населения и медицинским госпиталям с весьма ограниченным медицинским оснащением, например не имеющим стандартного оборудования, перевязочных материалов и лекарственных средств, антибиотиков, а также имеющим ограниченный состав или даже не имеющим медицинский персонал, подготовленный для того, чтобы поставить диагноз и предложить лечение.

В одном из воплощений раскрытого здесь устройства первый и второй участок для анализа образца предназначены для анализа содержания варианта дикого типа гена или части гена в жидком образце или содержания мутантного варианта указанного гена или части гена в образце. Использованный здесь такой вариант дикого типа и соответствующий ему мутантный вариант названы как "пара дикий тип - мутантный вариант". Специалисту в данной области техники понятно, что мутантная последовательность гена или части гена отличается от последовательности дикого типа указанного гена или части гена по меньшей мере на одну нуклеотидную позицию.

Таким образом, в одном из воплощений предложено раскрытое здесь устройство, где участок для анализа первой полосы для анализа образца содержит по меньшей мере один сегмент, содержащий по меньшей мере частичную последовательность нуклеиновой кислоты гена дикого типа, а участок для анализа второй полосы для анализа образца содержит по меньшей мере один сегмент, содержащий соответствующую последовательность нуклеиновой кислоты мутанта указанного гена, где соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну мутацию. В одном из воплощений указанные последовательности нуклеиновых кислот имеют длину приблизительно 10-40 нуклеотидов, такую как 18-30 нуклеотидов. В еще одном воплощении указанные последовательности нуклеиновых кислот имеют длину приблизительно 60-130 нуклеотидов, такую как 70-120 нуклеотидов. В одном из воплощений указанная последовательность нуклеиновой кислоты биотинилирована и/или присоединена к белку или пептиду. В данном случае термин "соответствующий" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, которая содержит мутацию или множество мутаций, для которых обнаруживают присутствие или отсутствие. Например, последовательность нуклеиновой кислоты мутантного гена относительно соответствующего ему дикого гена содержит вариации одной и той же или комплементарных последовательностей нуклеиновых кислот по 5' и/или 3' относительно сайта мутации или мутаций.

Понятно, что указанная по меньшей мере частичная последовательность нуклеиновой кислоты в указанном по меньшей мере одном сегменте связана или конъюгирована, или гибридизована, или иммобилизована на участке для анализа, например, ковалентным образом или гидрофобным образом. Таким образом, в одном из воплощений раскрытого здесь устройства указанная по меньшей мере частичная последовательность нуклеиновой кислоты ковалентно связана с по меньшей мере одним сегментом участка для анализа. В еще одном воплощении раскрытого здесь устройства указанная по меньшей мере частичная последовательность нуклеиновой кислоты связана при помощи гидрофобных или ионных, или водородных связей с по меньшей мере одним сегментом участка для анализа.

Специалисту в данной области техники понятно, что указанная по меньшей мере частичная последовательность нуклеиновой кислоты в указанном по меньшей мере одном сегменте участка для анализа может быть присоединена путем неспецифической физической абсорбции одноцепочечной ДНК к нитроцеллюлозе, ковалентного присоединения путем диазосочетания, или путем фотохимических способов. Например, присоединяемая нуклеиновая кислота может быть денатурирована при помощи температуры и нанесена на мембрану в солевом буфере с иммобилизацией при помощи УФ излучения (в случае нейлоновой мембраны) или термообработки (в случае нитроцеллюлозной мембраны) или модифицирующих ионных взаимодействий. Специалист в данной области техники имеет представление о других подходящих способах связывания.

Использованный здесь термин "биосенсоры для латерального проточного анализа (LFNAB)" относится к сенсорам, используемым в иммунохроматографическом тесте. Общий принцип заключается в том, что тестируемые молекулы в реакционной смеси движутся за счет капиллярного движения, опосре-

дованного силой притяжения, и визуальные сигналы (изменение окрашивания) развиваются на мембране полос путем гибридизации субстратов, таких как, например стрептавидин, биотин, пероксидаза хрена, конъюгированные золотые наночастицы (AuNP) или флуорофоры. Специалисту в данной области техники понятно, что существует множество вариантов указанных тестов.

В одном из воплощений устройства указанные участки для анализа изготовлены из прозрачной целлюлозы или полимерного материала. Эти материалы являются благоприятными вследствие их прочности.

В одном из воплощений устройства поддерживающая пленка и трехмерная метка, появляющаяся на сегментах, имеют различные цвета для того, чтобы дополнительно улучшать точность во время регистрации обнаруживаемого результата и гарантии того, что информация с устройства регистрируется правильным образом.

В одном из воплощений описания настоящего изобретения предложено раскрытое здесь устройство, где участок для анализа или полоса содержит мембрану, выбранную из группы, состоящей из нейлоновой мембраны, мембраны PVDF (поливинилиденфторид), нитроцеллюлозной мембраны. В одном из конкретных воплощений указанная мембрана представляет собой нитроцеллюлозную мембрану. В одном из воплощений полоса для анализа и участок для анализа изготовлены из одного и того же материала.

Понятно, что различные пары вариантов мутант - дикий тип могут быть проанализированы одновременно на одном и том же первом и втором участках для образца для анализа. Например, по меньшей мере две отличающиеся пары мутант-дикий тип могут быть проанализированы одновременно на одном и том же первом и втором участке для образца для анализа, таком как по меньшей мере 4, по меньшей мере 6, по меньшей мере 8 или по меньшей мере 10. Последнее возможно потому, что каждый участок для анализа образца может содержать несколько сегментов, где каждый сегмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая соответствует мутантной последовательности или последовательности дикого типа.

В одном из воплощений описания настоящего изобретения пластина для нанесения образца и часть удлинённых полос для анализа образца, проходящих от пластины для нанесения образца к первому сегменту, выполнены из единого куска материала. Данное воплощение весьма благоприятно, поскольку образец будет обладать возможностью двигаться быстрее за счет содействия капиллярных сил от пластины для нанесения образца и вдоль пластин для анализа образца.

Таким образом, в одном из воплощений, предложено устройство, где каждый участок для анализа образца содержит по меньшей мере 2 сегмента, содержащие различные нуклеиновые кислоты, такие как по меньшей мере 4 сегмента, такие как по меньшей мере 6 сегментов и такие как по меньшей мере 10 сегментов.

Настоящее изобретение может быть использовано для обнаружения любых грамположительных или грамотрицательных бактерий и маркеров их устойчивости. Настоящее изобретение также может быть использовано для обнаружения, например патогенов, вызывающих заболевания, такие как актиномикоз, сибирская язва, бруцеллез, инфекции *Campylobacter*, холера, клостридиальные инфекции, дифтерия, диарея, энтерококковые инфекции, эризипелотрихоз, газовая гангрена, кишечные инфекции (вследствие *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Escheria coli*), легионеллез, лептоспироз, листериоз, болезнь Лайма, менингококковые инфекции, коклюш, чума, пневмония, псевдомонадные инфекции, сальмонеллез, брюшной тиф, менингококковые инфекции, стафилококковые инфекции и криптоспорициальные инфекции. Кроме того, могут быть обнаружены маркеры для вышеупомянутых заболеваний, такие как устойчивость к метициллину, устойчивость к широкому спектру бета-лактамаз, устойчивость к ванкомицину и металлорезистентность, но не ограничиваться ими.

Настоящее изобретение также может быть полезно для идентификации ДНК и РНК вирусов, вызывающих заболевания животных и растений, и маркеров устойчивости к ним, таких как вирусы, которые относятся к категории аденовирусов, вирусов Эпштейна-Бара, вирусов герпеса, вирусов гепатита, цитомегаловирусов, вирусов гриппа, HIV (вирус иммунодефицита человека)/AIDS (синдром приобретенного иммунодефицита), вируса папилломы, полиовирусов, вирусов бешенства, вирусов парагриппа, респираторно-синцитиальных вирусов, вирусов краснухи и ветряной оспы, но не ограничиваться ими.

Настоящее изобретение также может быть полезно для идентификации грибковых инфекций и их маркеров, таких как аспергиллез, бластомикоз, кандидоз, кокцидиоидомикоз (пустынная лихорадка), инфекция *C. neoformans*, *C. gattii*, глазные инфекции, включающие гистоплазмоз, мукоромикоз, пневмония, вызванная *Pneumocystis*, но не ограничиваться ими, инфекций, вызванных червями, таких как трихофития, вызванные круглыми червями, филяриоз, споротрихоз и вызванные аскаридами.

В соответствии с проиллюстрированным здесь устройство в соответствии с настоящим изобретением может быть использовано в генетическом тесте для обнаружения патогенных микробов и маркеров их устойчивости, включающих комплекс *Mycobacterium tuberculosis*. Комплекс *Mycobacterium tuberculosis* относится к генетически родственной группе видов *Mycobacterium*, которые могут вызывать туберкулез у людей, животных и других многоклеточных организмов. Не ограничивающие объем изобретения примеры видов *Mycobacterium* включают *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium canetti*, *Mycobacterium caprae*, *Mycobacterium pinnipedii*, *Mycobacterium suricattae*, *Mycobacterium mungi*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobac-*

terium paratuberculosis, и штаммы, не вызывающие туберкулез, включающие *Mycobacterium leprae* и *Mycobacterium lepromatosis*.

В разделе примеры настоящее изобретение описано в контексте генетического теста для обнаружения маркеров устойчивости к антибиотику в комплексе *Mycobacterium tuberculosis*. Специалисту в данной области техники понятно, что этот пример никоим образом не следует рассматривать как ограничивающий объем изобретения каким-либо образом. Устройство в соответствии с настоящим описанием в равной степени подходит в генетическом тесте для идентификации присутствия или отсутствия в образце какой-либо нуклеиновой кислоты, имеющей определенную последовательность.

Используемый здесь термин "устойчивость к антибиотику" относится к присутствию мутации или мутаций в генах или модификаций в белках или ферментах в любом живом организме, которые приводят к возникновению устойчивости в отношении антимикробных препаратов, включающих антибиотики. Такие устойчивые фенотипы/генотипы не реагируют на антибиотики.

Используемый здесь термин "маркер устойчивости к антибиотику" относится к мутантному варианту гена, который придает устойчивость к антимикробным препаратам, включающим антибиотики.

В контексте описания настоящего изобретения пара мутант-вариант дикого типа может содержать маркер устойчивости к антибиотику, который придает устойчивость к антибиотику путем мутации по любой нуклеотидной позиции в генах, таких как *rpoB*, *katG*, *inhA*, *gyrA*, *rrs*, *eis* или *emb*; и его последовательности дикого типа, которая не придает устойчивость к антибиотику. Не ограничивающие объем изобретения примеры маркеров устойчивости к антибиотику комплекса *Mycobacterium tuberculosis* включают *rpoB* 176 TGC, *rpoB* 432 GGC, *rpoB* 432 ACC, *rpoB* 432 AGC, *rpoB* 432 CAG, *rpoB* 432 CTG, *rpoB* 432 AGC, *rpoB* 432 CAG, *rpoB* 436 CTG, *rpoB* 437 AGC, *rpoB* 438 CAA, *rpoB* 438 TTC, *rpoB* 438 ATG, *rpoB* 441 GAC, *rpoB* 441 AAC, *rpoB* 441 CAG, *rpoB* 444 AAC, *rpoB* 444 CCG, *rpoB* 444 CTG, *rpoB* 447 TCG, *rpoB* 447 GGG, *rpoB* 447 TTG, *rpoB* 447 ACC, *rpoB* 451 CAC, *rpoB* 451 AAG, *rpoB* 451 CGC, *rpoB* 451 CGA, *rpoB* 451 CTG, *rpoB* 456 TCG, *rpoB* 456 GCG, *rpoB* 458 CTG, *rpoB* 486 CTG, *rpoB* 486 ATC, *rpoB* 496 CTG, *rpoB* 497 ATC, *rpoB* 513 CCA, *rpoB* 515 ATC, *rpoB* 516 TAC, *rpoB* 516 GTC, *rpoB* 522 TGG, *rpoB* 526 CGC, *rpoB* 526, *rpoB* 526 GAC, *rpoB* 526 CTC, *rpoB* 526 ACC, *rpoB* 531 TTG, *rpoB* 531 TGG, *rpoB* 533 CCG, *rpoB* 558 CGC, *rpoB* 598 GAG, *katG* 269 CGT, *katG* 463 CTG, *katG* 379 ACC, *katG* 98 TGC, *katG* 352 GAA, *katG* 463 CTG, *katG* 315 ACC, *katG* 202 GCA, *katG* 203 ACT, *katG* 518 вставки GGTC, *katG* 315 AAC, *katG* 127 CCG, *katG* 506 TAG, *katG* 315 ACA, *katG* 315 ACG, *katG* 315 ACT, *katG* 315 ATC, *katG* 315 AGA, *katG* 315 GGC, *katG* 315 CGC, *inhA* -15 T, *inhA* -8, *inhA* -17G, *inhA* -17T, *inhA* -34G, *inhA* -34T, мутации *inhA* -47 T, *ahpC* -*oxyR* мутации в кодонах -10, -6, -39, -48, -15, 12 и -9, *rrs* 483 T, *rrs* 485 G, *rrs* 496A, *rrs* 491T, *rrs* 512T, *rrs* 798T, *rrs* 877A, *rrs* 904G, *rrs* 906 C, *rrs* 904 T, *rrs* 1401G, *rpsL* 43 AGG, *rpsL* 88 CAG, *rpsL* 128 G, *rpsL* 263 G, *rpsL* 262 C, *gyrA* 94G, *gyrA* 90T, *gyrA* 90V, *gyrA* S91P, *gyrA* D94A, *gyrA* D94G, *gyrA* 94N, *gyrA* 94H, *emb* 306v ATG, *emb* 306i ATG, *eis* -10G/A, *eis* -12C/T, *eis* -15 C/G и *rrs* 1401 A/G. Не ограничивающие объем изобретения примеры соответствующих последовательностей дикого типа включают консервативные области генов *katG* wt, *rpoB* wt, *gyrA* wt, *rrs* wt, *eis* wt, *emb* wt, *ahpC* wt, *oxyR* wt и *rpsL* wt, например последовательности генов в кодонах *rpoB* 516 wt, *katG* 315 wt, *rpoB* 331 wt, *rpoB* 531 wt, *rpoB* 526 wt, *inhA* -15 wt, *rrs* 1401 wt, *gyrA* 94 wt, *gyrA* 90 wt, *rpoB* 533 wt, *emb* 306wt, *eis* -10wt, *eis* -12wt и *eis* -15 wt. В данном случае пример пары мутант-вариант дикого типа представляет собой *rpoB* 516 TAC и *rpoB* 516 wt.

В одном из воплощений предложено раскрытое здесь устройство, где указанный ген содержит маркер устойчивости к антибиотику, такой как маркер устойчивости к антибиотику комплекса *Mycobacterium tuberculosis*.

В одном из воплощений указанный маркер устойчивости к антибиотику выбран из группы, состоящей из *rpoB* 176 TGC, *rpoB* 432 GGC, *rpoB* 432 ACC, *rpoB* 432 AGC, *rpoB* 432 CAG, *rpoB* 432 CTG, *rpoB* 432 AGC, *rpoB* 432 CAG, *rpoB* 436 CTG, *rpoB* 437 AGC, *rpoB* 438 CAA, *rpoB* 438 TTC, *rpoB* 438 ATG, *rpoB* 441 GAC, *rpoB* 441 AAC, *rpoB* 441 CAG, *rpoB* 444 AAC, *rpoB* 444 CCG, *rpoB* 444 CTG, *rpoB* 447 TCG, *rpoB* 447 GGG, *rpoB* 447 TTG, *rpoB* 447 ACC, *rpoB* 451 CAC, *rpoB* 451 AAG, *rpoB* 451 CGC, *rpoB* 451 CGA, *rpoB* 451 CTG, *rpoB* 456 TCG, *rpoB* 456 GCG, *rpoB* 458 CTG, *rpoB* 486 CTG, *rpoB* 486 ATC, *rpoB* 496 CTG, *rpoB* 497 ATC, *rpoB* 513 CCA, *rpoB* 515 ATC, *rpoB* 516 TAC, *rpoB* 516 GTC, *rpoB* 522 TGG, *rpoB* 526 CGC, *rpoB* 526, *rpoB* 526 GAC, *rpoB* 526 CTC, *rpoB* 526 ACC, *rpoB* 531 TTG, *rpoB* 531 TGG, *rpoB* 533 CCG, *rpoB* 558 CGC, *rpoB* 598 GAG, *katG* 269 CGT, *katG* 463 CTG, *katG* 379 ACC, *katG* 98 TGC, *katG* 352 GAA, *katG* 463 CTG, *katG* 315 ACC, *katG* 202 GCA, *katG* 203 ACT, *katG* 518 вставки GGTC, *katG* 315 AAC, *katG* 127 CCG, *katG* 506 TAG, *katG* 315 ACA, *katG* 315 ACG, *katG* 315 ACT, *katG* 315 ATC, *katG* 315 AGA, *katG* 315 GGC, *katG* 315 CGC, *inhA* -15 T, *inhA* -8, *inhA* -17G, *inhA* -17T, *inhA* -34G, *inhA* -34T, мутации *inhA* -47 T, *ahpC* -*oxyR* мутации в кодонах -10, -6, -39, -48, -15, 12 и -9, *rrs* 483 T, *rrs* 485 G, *rrs* 496A, *rrs* 491T, *rrs* 512T, *rrs* 798T, *rrs* 877A, *rrs* 904G, *rrs* 906 C, *rrs* 904 T, *rrs* 1401G, *rpsL* 43 AGG, *rpsL* 88 CAG, *rpsL* 128 G, *rpsL* 263 G, *rpsL* 262 C, *rrs* 1401G, *gyrA* 94G, *gyrA* 90T, *gyrA* 90V, *gyrA* S91P, *gyrA* D94A, *gyrA* D94G, *gyrA* 94N, *gyrA* 94H, *emb* 306v ATG, *emb* 306i ATG, *eis* -10G/A, *eis* -12C/T, *eis* -15 C/G и *rrs* 1401 A/G. В одном из воплощений указанный маркер устойчивости к антибиотику выбран из группы, состоящей из *rpoB* 176 TGC, *rpoB* 432 GGC, *rpoB* 432 ACC, *rpoB* 432 AGC, *rpoB* 432 CAG, *rpoB* 432 CTG, *rpoB* 432 AGC, *rpoB* 432 CAG, *rpoB* 436 CTG, *rpoB* 437 AGC, *rpoB* 438 CAA, *rpoB*

438 TTC, рpoB 438 ATG, рpoB 441 GAC, рpoB 441 AAC, рpoB 441 CAG, рpoB 444 AAC, рpoB 444 CCG, рpoB 444 CTG, рpoB 447 TCG, рpoB 447 GGG, рpoB 447 TTG, рpoB 447 ACC, рpoB 451 CAC, рpoB 451 AAG, рpoB 451 CGC, рpoB 451 CGA, рpoB 451 CTG, рpoB 456 TCG, рpoB 456 GCG, рpoB 458 CTG, рpoB 486 CTG, рpoB 486 ATC, рpoB 496 CTG, рpoB 497 ATC, рpoB 513 CCA, рpoB 515 ATC, рpoB 516 TAC, рpoB 516 GTC, рpoB 522 TGG, рpoB 526 CGC, рpoB 526, рpoB 526 GAC, рpoB 526 CTC, рpoB 526 ACC, рpoB 531 TTG, рpoB 531 TGG, рpoB 533 CCG, рpoB 558 CGC и рpoB 598 GAG В одном из воплощений указанный маркер устойчивости к антибиотику выбран из группы, состоящей из katG 269 CGT, katG 463 CTG, katG 379 ACC, katG 98 TGC, katG 352 GAA, katG 463 CTG, katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT, katG 518 вставки GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G, inhA -17T, inhA -34G, inhA -34T, мутации inhA -47 T. В одном из воплощений указанный маркер устойчивости к антибиотику выбран из группы, состоящей из gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H. В одном из воплощений указанный маркер устойчивости к антибиотику выбран из группы, состоящей из ahpC -oxyR мутации в кодонах -10, -6, -39, -48, -15, 12 и -9, rrs 483 T, rrs 485 G, rrs 496A, rrs 491T, rrs 512T, rrs 798T, rrs 877A, rrs 904G, rrs 906 C, rrs 904 T, rrs 1401G, rpsL 43 AGG, rpsL 88 CAG, rpsL 128 G, rpsL 263 G, rpsL 262 C, rrs 1401G, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G и rrs 1401 A/G.

В одном из воплощений раскрытого здесь устройства указанный по меньшей мере один сегмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты маркера устойчивости к антибиотику, выбранного из группы, состоящей из рpoB 176 TGC, рpoB 432 GGC, рpoB 432 ACC, рpoB 432 AGC, рpoB 432 CAG, рpoB 432 CTG, рpoB 432 AGC, рpoB 432 CAG, рpoB 436 CTG, рpoB 437 AGC, рpoB 438 CAA, рpoB 438 TTC, рpoB 438 ATG, рpoB 441 GAC, рpoB 441 AAC, рpoB 441 CAG, рpoB 444 AAC, рpoB 444 CCG, рpoB 444 CTG, рpoB 447 TCG, рpoB 447 GGG, рpoB 447 TTG, рpoB 447 ACC, рpoB 451 CAC, рpoB 451 AAG, рpoB 451 CGC, рpoB 451 CGA, рpoB 451 CTG, рpoB 456 TCG, рpoB 456 GCG, рpoB 458 CTG, рpoB 486 CTG, рpoB 486 ATC, рpoB 496 CTG, рpoB 497 ATC, рpoB 513 CCA, рpoB 515 ATC, рpoB 516 TAC, рpoB 516 GTC, рpoB 522 TGG, рpoB 526 CGC, рpoB 526, рpoB 526 GAC, рpoB 526 CTC, рpoB 526 ACC, рpoB 531 TTG, рpoB 531 TGG, рpoB 533 CCG, рpoB 558 CGC, рpoB 598 GAG, katG 269 CGT, katG 463 CTG, katG 379 ACC, katG 98 TGC, katG 352 GAA, katG 463 CTG, katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT, katG 518 вставки GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G, inhA -17T, inhA -34G, inhA -34T, мутации inhA -47 T, ahpC -oxyR мутации в кодонах -10, -6, -39, -48, -15, 12 и -9, rrs 483 T, rrs 485 G, rrs 496A, rrs 491T, rrs 512T, rrs 798T, rrs 877A, rrs 904G, rrs 906 C, rrs 904 T, rrs 1401G, rpsL 43 AGG, rpsL 88 CAG, rpsL 128 G, rpsL 263 G, rpsL 262 C, rrs 1401G, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G и rrs 1401 A/G. В одном из воплощений указанный по меньшей мере один сегмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты маркера устойчивости к антибиотику, выбранного из группы, состоящей из рpoB 176 TGC, рpoB 432 GGC, рpoB 432 ACC, рpoB 432 AGC, рpoB 432 CAG, рpoB 432 CTG, рpoB 432 AGC, рpoB 432 CAG, рpoB 436 CTG, рpoB 437 AGC, рpoB 438 CAA, рpoB 438 TTC, рpoB 438 ATG, рpoB 441 GAC, рpoB 441 AAC, рpoB 441 CAG, рpoB 444 AAC, рpoB 444 CCG, рpoB 444 CTG, рpoB 447 TCG, рpoB 447 GGG, рpoB 447 TTG, рpoB 447 ACC, рpoB 451 CAC, рpoB 451 AAG, рpoB 451 CGC, рpoB 451 CGA, рpoB 451 CTG, рpoB 456 TCG, рpoB 456 GCG, рpoB 458 CTG, рpoB 486 CTG, рpoB 486 ATC, рpoB 496 CTG, рpoB 497 ATC, рpoB 513 CCA, рpoB 515 ATC, рpoB 516 TAC, рpoB 516 GTC, рpoB 522 TGG, рpoB 526 CGC, рpoB 526, рpoB 526 GAC, рpoB 526 CTC, рpoB 526 ACC, рpoB 531 TTG, рpoB 531 TGG, рpoB 533 CCG, рpoB 558 CGC и рpoB 598 GAG. В одном из воплощений, указанный по меньшей мере один сегмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты маркера устойчивости к антибиотику, выбранного из группы, состоящей из katG 269 CGT, katG 463 CTG, katG 379 ACC, katG 98 TGC, katG 352 GAA, katG 463 CTG, katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT, katG 518 вставка GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G, inhA -17T, inhA -34G, inhA -34T, мутации inhA -47 T. В одном из воплощений указанный по меньшей мере один сегмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты маркера устойчивости к антибиотику, выбранного из группы, состоящей из ahpC-oxyR мутации в кодонах -10, -6, -39, -48, -15, 12 и -9, rrs 1401G, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G и rrs 1401 A/G.

В одном из воплощений указанный по меньшей мере один сегмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты маркера устойчивости к антибиотику выбранного из группы, состоящей из рpoB 513 CCA, рpoB 515 ATC, рpoB 516 TAC, рpoB 516 GTC, рpoB 522 TGG, рpoB 526 CGC, рpoB 526, рpoB 526 GAC, рpoB 526 CTC, рpoB 526 ACC, рpoB 531 TTG, рpoB 531 TGG и рpoB 533 CCG. Для ясности эта группа названа ниже как маркер устойчивости к антибиотику группы X. В одном из воплощений указанный по меньшей мере один сегмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты маркера устойчивости к антибиотику, выбранного из группы, состоящей из katG 315 ACC, katG 202 GCA, katG 203 ACT,

katG 518 вставки GGTC, katG 315 AAC, katG127 CCG, katG 506 TAG, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC, katG 315 CGC, inhA -15 T, inhA -8, inhA -17G и inhA -17T. Для ясности эта группа названа ниже как маркер устойчивости к антибиотику группы Y. В одном из воплощений указанный по меньшей мере один сегмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты маркера устойчивости к антибиотику, выбранного из группы, состоящей из groB 516 TAC, groB 516 GTC, groB 526 CGC, groB 526, groB 526 GAC, groB 526 CTC, groB 526 ACC, groB 531 TTG, groB 531 TGG, groB 533 CCG, inhA-15 T, inhA-8, inhA-17G, inhA-17T, katG315 ACC, katG 315 AAC, katG 315 ACA, katG 315 ACG, katG 315 ACT, katG 315 ATC, katG 315 AGA, katG 315 GGC и katG 315 CGC. Для ясности эта группа названа ниже как маркер устойчивости к антибиотику группы Z. В одном из воплощений указанный по меньшей мере один сегмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты маркера устойчивости к антибиотику, выбранного из группы, состоящей из ahpC-oxuR мутации в кодонах -10, -6, -39, -48, -15, 12 и -9, rrs 1401G, gyrA 94G, gyrA 90T, gyrA 90V, gyrA S91P, gyrA D94A, gyrA D94G, gyrA 94N, gyrA 94H, emb 306v ATG, emb306i ATG, eis -10G/A, eis -12C/T, eis -15 C/G и rrs 1401 A/G. Для ясности эта группа названа ниже как маркер устойчивости к антибиотику группы P.

В одном из воплощений указанный по меньшей мере один сегмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты маркера устойчивости к антибиотику, выбранного из группы, состоящей из groB 531 TTG и katG 315 ACC. В одном из конкретных воплощений указанный по меньшей мере один сегмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4.

Специалисту в данной области техники понятно, что раскрытый здесь участок для анализа может содержать несколько сегментов, где каждый сегмент содержит последовательность нуклеиновой кислоты маркера устойчивости к антибиотику, которая отличается от последовательности нуклеиновой кислоты в других сегментах. Таким образом, участок для анализа может содержать сегменты, каждый из которых содержит последовательность нуклеиновой кислоты отличающегося маркера устойчивости к антибиотику. Специалисту в данной области техники понятно, что перечисленные выше маркеры могут быть свободно скомбинированы в одном или более чем одном участке для анализа. Например, любой участок для анализа может содержать сегмент, содержащий любой из перечисленных маркеров устойчивости к антибиотику в вышеописанной группе X, и сегмент, содержащий любой из перечисленных маркеров устойчивости к антибиотику в группе Y выше. Участок для анализа может содержать сегмент, содержащий маркер из группы X, сегмент, содержащий маркер из группы Y, сегмент, содержащий маркер из группы Z, и сегмент, содержащий маркер из группы P. Также возможно, что участок для анализа может содержать сегмент, содержащий один или более чем один маркер из одной группы, и один или более чем один сегмент, содержащий различные маркеры из одной и той же группы. Специалисту в данной области техники понятно, что перечисленные здесь комбинации не ограничивают объем изобретения.

Таким образом, в одном из воплощений указанный раскрытый здесь участок для анализ содержит по меньшей мере два сегмента, такие как по меньшей мере три сегмента, такие как по меньшей мере шесть сегментов, такие как по меньшей мере девять сегментов, такие как по меньшей мере двенадцать сегментов, такие как по меньшей мере четырнадцать сегментов, которые содержат последовательности нуклеиновых кислот отличающихся маркеров устойчивости к антибиотикам, таких как отличающиеся маркеры устойчивости к антибиотикам, выбранные из различных или одних и тех же групп, перечисленных выше.

Например участок для анализа может содержать сегменты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты маркеров устойчивости к антибиотику groB 176 TGC, groB 432 GGC, groB 438 CAA, groB 447 ACC, groB 516 TAC, groB 526 CGC, groB 531 TTG, katG 315 ACA, inhA-15T, rrs 1401 G, gyrA 94G, emb 306v ATG и ies -10G/A или их разновидностей. Например участок для анализа может содержать сегменты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты маркеров устойчивости к антибиотику groB 432 ACC, groB 438 ATG, groB 447 GGG, groB 516 GTC, groB526 GAC, groB 531 TGG, katG 315 ACT, inhA -8, gyrA 90T, emb 306i ATG и ies -12C/T или их разновидностей. Например участок для анализа может содержать сегменты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты маркеров устойчивости к антибиотику groB 432 CAG, groB 438 TTC, groB 447 TCG, groB 526 CTC, katG 315 GGC, inhA -17G и ies-15 C/G или их разновидностей. Например участок для анализа может содержать сегменты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты антибиотических маркеров rrs 483 T, rrs 485 G, rrs 496A, rrs 491T, rrs 512T, rrs 798T, rrs 877A, rrs 904G, rrs 906 C, rrs 904 T, rrs 1401G, rpsL 43 AGG, rpsL 88 CAG, rpsL 128 G, rpsL 263 G и rpsL 262 C или их разновидностей. Например участок для анализа может содержать сегменты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты маркеров устойчивости к антибиотику groB 432 CTG, groB 447 TTG, groB 526 ACC и katG 315 CGC или их разновидностей.

В одном из воплощений раскрытого здесь устройства указанный по меньшей мере один сегмент, содержащий по меньшей мере частичную последовательность нуклеиновой кислоты гена дикого типа содержит последовательность, выбранную из katG, groB, gyrA, rrs, eis, emb, ahpC, oxuR, в кодонах groB 516 wt, katG 315 wt, groB 331 wt, groB 531 wt, groB 526 wt, inhA - 15 wt, rrs 1401 wt, gyrA 94 wt, gyrA 90 wt, groB 533 wt, emb 306wt, eis -10wt, eis -12wt и eis -15 wt, но не ограничивающуюся ими. В данном случае пример пары мутант-вариант дикого типа представляет собой groB 516 TAC и groB 516 wt. В одном из воплощений указанный по меньшей мере один сегмент, содержащий по меньшей мере частичную по-

следовательность нуклеиновой кислоты гена дикого типа, содержит последовательность, выбранную из rpoB 531 wt и katG 315 wt. В одном из конкретных воплощений указанный по меньшей мере один сегмент содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3.

Понятно, что раскрытое здесь устройство обеспечивает возможность для анализа присутствия или отсутствия соответствующих последовательностей дикого типа в образце. Для краткости, все такие комбинации соответствующих последовательностей дикого типа не перечислены здесь. В одном из воплощений все соответствующие последовательности дикого типа анализируют на одном участке для анализа содержащем несколько сегментов, где каждый сегмент содержит отличающуюся последовательность дикого типа нуклеиновой кислоты. Таким образом, в одном из воплощений, участок для анализа может содержать сегменты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты rpoB 176 wt, rpoB 432 wt, rpoB 438 wt, rpoB 447 wt, rpoB 516 wt, rpoB 526 wt, rpoB 531 wt, katG 315 wt, inhA -8, inhA -15, inhA -17 wt, 16s rRNA wt, gyrA 90, gyrA 91, gyrA 92, gyrA 93, gyrA 94, wt, emb 306 wt и ies -10, ies -12, eis -15 wt. rrs 483 wt, rrs 485 wt, rrs 496A wt, rrs 491 wt, rrs 512 wt, rrs 798 wt, rrs 877 wt, rrs 904 wt, rrs 906 wt, rrs 904 wt, rrs 1401 wt, rpsL 43 wt, rpsL 88 wt, rpsL 128 wt, rpsL 263 wt и rpsL 262 wt и ies -10, ies -12, eis -15 wt; В одном из воплощений участок для анализа может содержать сегменты, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты rpoB 432 wt, rpoB 438 wt, rpoB 447 wt, rpoB 516 wt, rpoB 526 wt, rpoB 531 wt, katG 315 wt, inhA -8, inhA -15, inhA -17 wt, gyrA 90, gyrA 91T, gyrA 92T, gyrA 93G, gyrA 94, wt, emb 306 wt и ies -10, ies -12, eis -15 wt; или rpoB 432 wt, rpoB 438 wt, rpoB 447 wt, rpoB 526 wt, katG 315 wt, inhA -8wt, inhA -15wt, inhA -17 wt, rrs 483 wt, rrs 485 wt, rrs 496A wt, rrs 491 wt, rrs 512 wt, rrs 798 wt, rrs 877 wt, rrs 904 wt, rrs 906 wt, rrs 904 wt, rrs 1401 wt, rpsL 43 wt, rpsL 88 wt, rpsL 128 wt, rpsL 263 wt и rpsL 262 wt и ies -10, ies -12, eis -15 wt; или rpoB 432 wt, rpoB 447 wt, rpoB 526 wt и katG 315 wt.

Также предполагается, что участок для анализа может содержать сегменты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты маркеров устойчивости к антибиотику и соответствующую последовательность нуклеиновой кислоты гена дикого типа. Например участок для анализа может содержать сегменты, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты rpoB 176 wt и rpoB 176 TGC; rpoB 432 wt, rpoB 432 GGC, rpoB 432 ACC, rpoB 432 CAG и rpoB 432 CTG; rpoB 438 wt, rpoB 438 CAA, rpoB 438 ATG и rpoB 438 TTC; rpoB 447 wt, rpoB 447 ACC, rpoB 447 GGG, rpoB 447 TCG и rpoB 447 TTG; rpoB 516 wt, rpoB 516 TAC и rpoB 516 GTC; rpoB 526 wt, rpoB 526 CGC, rpoB 526 GAC, rpoB 526 CTC и rpoB 526 ACC; rpoB 531 wt, rpoB 531 TTG и rpoB 531 TGG; katG 315 wt, katG 315 ACA, katG 315 ACT, katG 315 GGC и katG 315 CGC; inhA -8wt, inhA -15wt, inhA -17 wt, inhA-15T, inhA -8 и inhA -17G; 16s rRNAwt и rrs 1401 G; gyrA 90-94 wt gyrA 94G и gyrA 90T; emb 306 wt, emb 306v ATG, emb 306i ATG; или ies -8 wt, ies-12 wt, ies -15 wt, ies -10G/A, ies -12C/T и ies-15 C/G.

Таблица 1

WT для участка (1) для анализа	Набор маркеров для участка (2) для анализа	Набор маркеров для участка (3) для анализа	Набор маркеров для участка (4) для анализа	Набор маркеров для участка (5) для анализа
rpoB 176	rpoB 176 TGC			
rpoB 432	rpoB 432 GGC	rpoB 432 ACC	rpoB 432 CAG	rpoB 432 CTG

rpoB 438	rpoB 438 CAA	rpoB 438 ATG	rpoB 438 TTC	
rpoB 447	rpoB 447 ACC	rpoB 447 GGG	rpoB 447 TCG	rpoB 447 TTG
rpoB 516	rpoB 516 TAC	rpoB 516 GTC		
rpoB 526	rpoB 526 CGC	rpoB526 GAC	rpoB 526 CTC	rpoB 526 ACC
rpoB 531	rpoB 531 TTG	rpoB 531 TGG		
katG 315	katG 315 ACA	katG 315 ACT	katG 315 GGC	katG 315 CGC
inhA -8, inh -15, inhA - 17	inha-15T	inhA -8	inhA -17G	
16s rRNA	rrs 1401 G			
gyrA 90, gyrA 91, gyrA 92, gyrA 93, gyrA 94	gyrA 94G	gyrA 90T	gyrA 91T	gyrA93G
emb 306	emb 306v ATG	emb 306i ATG		
Ies -10, ies - 12, ies -15	ies -10G/A	ies -12C/T	ies-15 C/G	

Понятно, что в воплощениях устройства по настоящему изобретению, где присутствуют больше чем две полосы для анализа, указанные маркеры могут быть разделены между указанными больше чем двумя полосами.

В качестве примера предполагается, что раскрытое здесь устройство содержит участок для анализа дикого типа, продемонстрированного в столбце 1 табл. 1 и по меньшей мере один участок для анализа, выбранный из участков, продемонстрированных в столбцах 2-5 в табл. 1, таких как столбец 1 и 2, столбец 1 и 3, столбец 1 и 4 и столбец 1 и 5. Также рассматриваются комбинации участка для анализа в соответствии со столбцом 1 со столбцами 2 и 3; 2 и 4; 2 и 5, 3 и 4; 3 и 5; 4 и 5; 2, 3 и 4; 3, 4 и 5; 2, 4 и 5; 2, 3 и 5; или 2, 3, 4 и 5.

Дополнительно предполагается, что участок для анализа может содержать по меньшей мере сегмент, который обеспечивает возможность для обнаружения видов бактерий, таких как один из видов, включенных в комплекс *Mycobacterium tuberculosis*.

Кроме того, специалисту в данной области техники понятно, что каждый участок для анализа образца может содержать сегмент, который выступает в качестве контрольного для любого из дикого типа и его мутации, вызывающей устойчивость у видов *Mycobacterium*. В одном из конкретных воплощений предложено устройство, которое содержит участок для анализа образца, содержащий контрольный сегмент. В одном из воплощений указанный контрольный сегмент содержит по меньшей мере частичную последовательность гена домашнего хозяйства бактериальных видов, такого как ген домашнего хозяйства видов *Mycobacterium tuberculosis*, и маркеры их устойчивости. В одном из конкретных воплощений указанная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 5.

В одном из воплощений устройства пластина для нанесения образца и удлиненные полосы для анализа образца выполнены из абсорбирующего волокнистого материала, через который образец способен двигаться за счет силы тяжести или капиллярного движения. Другие альтернативы материалов представляют собой прозрачные целлюлозные материалы или полимерные материалы.

Устройство предназначено для размещения, например, на столе или рабочем столе таким образом, что пластина для нанесения образца и удлиненных полос для анализа образца располагается по существу горизонтально для того, чтобы облегчить прохождение образца в удлиненных полосах для анализа образца. Кроме того, абсорбирующий материал, используемый в пластине для образца и полосах для анализа, обеспечивает то, что образец поступает в участок для анализа образца.

Одно из предпочтительных воплощений устройства включает поддерживающую пленку, изготовленную из пластика или инертного, или непрозрачного вещества, расположенного напротив входного канала и отверстий в корпусе. Поддерживающая пленка предотвращает вытекание жидкого образца из материала пластины для нанесения образца или полосы для анализа образца до достижения образцом участка для анализа, таким образом улучшая точность результата анализа.

В одном из воплощений устройства удлиненные полосы для анализа образца сначала проходят по существу в радиальном направлении от центра пластины для нанесения образца до того, как они образуют угол, таким образом, что участки для анализа расположены по существу параллельно друг другу, и

результат обнаруживают по комбинации сегментов, расположенных в поперечном направлении относительно удлинённых полос для анализа образца. Данное воплощение является благоприятным, поскольку образец может легко двигаться от пластины для нанесения образца к удлинённым полосам для образца, что обеспечивает то, что достаточное количество образца переносится в каждую из удлинённых полос для анализа образца.

В одном из воплощений устройства, соответствующие сегменты первого и второго участков для анализа расположены в поперечном направлении относительно участков для анализа. Данное воплощение устройства способствует регистрации правильного результата анализа легким и надежным образом, например генотипов дикого типа и мутантных генотипов. В одном из конкретных воплощений устройства детектирующий агент представлен на участках для анализа образца. В одном из воплощений детектирующий агент представлен исключительно в сегментах участков для анализа.

Одно из воплощений устройства содержит третью удлинённую полосу для анализа образца, предназначенную для анализа различных аспектов образца нуклеиновой кислоты, где участок для анализа, указанной третьей полосы для образца предназначен для анализа присутствия или отсутствия нуклеиновых кислот с различными заранее определенными последовательностями и имеет по существу одинаковую длину, и расположен между указанными первой и второй удлинёнными полосами для анализа образца, таким образом, что результат анализа обнаруживают по комбинации соответствующих сегментов трех полос для анализа. Третья удлинённая полоса для анализа образца дополнительно увеличивает диагностическую точность анализа, поскольку могут быть обнаружены дополнительные фенотипические изменения.

В одном из воплощений устройства угол α в диапазоне 40-80° образован первой и второй удлинёнными полосами для образца, и выемка, проходящая от периферии к центру пластины для нанесения образца, выполнена в пластине для нанесения образца между первой и второй удлинёнными полосами для образца, таким образом, что образец направляется к первой и второй удлинённым полосам для образца. Этот дизайн устройства обеспечивает то, что образец легко движется в удлинённых полосах для анализа образца.

В одном из воплощений устройства третья удлинённая полоса для образца движется по существу в радиальном направлении от пластины для нанесения образца от конца выемки.

Одно из воплощений устройства включает четвертую и пятую удлинённые полосы для анализа образца, предназначенные для анализа различных аспектов образца нуклеиновой кислоты, где участки для анализа указанных четвертой и пятой полос для образца предназначены для анализа присутствия или отсутствия нуклеиновых кислот с различными определенными последовательностями, и имеют по существу одинаковую длину и расположены на противоположных сторонах относительно первой и второй удлинённых полос для анализа образца, таким образом, что результат анализа обнаруживают по комбинации соответствующих сегментов всех четырех или пяти полос для анализа. Четвертая и пятая удлинённые полосы для анализа образца дополнительно увеличивают точность и позволяют получать более подробную информацию о результатах анализа, поскольку могут обнаруживаться параметры, такие как род, виды, гены домашнего хозяйства, дикий тип и маркеры гена устойчивости.

В одном из воплощений устройства четвертая и пятая удлинённые полосы для образца проходят по существу в радиальном направлении от центра пластины для нанесения образца до того, как они образуют угол, таким образом, что участки для анализа расположены параллельно друг другу, а также относительно первого и второго участков для анализа, и расположены в одну линию с участками для анализа первой и второй удлинённых полос для образца.

Одно из воплощений устройства включает опорную структуру, выполненную внутри корпуса для поддержания пластины для нанесения образца и удлинённых полос для образца в правильном положении внутри корпуса, что очень важно для того, чтобы обеспечивать отображение результата анализа правильным образом.

В еще одном аспекте описания настоящего изобретения предложен диагностический способ для определения присутствия или отсутствия в образце субъекта нуклеиновой кислоты-мишени с заранее определенной последовательностью, где способ включает стадии:

- а) обеспечение биологического образца, который ранее был получен у субъекта не инвазивным методом,
- б) подвергание указанного образца селективной амплификации с по меньшей мере одной нуклеиновой кислотой-мишенью с заранее определенной последовательностью с получением амплифицированной нуклеиновой кислоты-мишени,
- в) нанесение амплифицированной нуклеиновой кислоты-мишени на пластину для нанесения образца описанного здесь устройства (10; 30; 50),
- г) инкубирование указанного устройства в течение периода времени, достаточного для обнаружения указанной нуклеиновой кислоты-мишени при помощи детектирующего агента, и
- д) обнаружение присутствия или отсутствия по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты-мишени с заранее определенной последовательностью.

В одном из воплощений раскрытого здесь способа указанная амплифицированная нуклеиновая ки-

слота-мишень, полученная на стадии б), непосредственно или опосредованно связана с детектирующим агентом перед нанесением амплифицированной нуклеиновой кислоты-мишень на пластину для нанесения образца устройства.

В еще одном воплощении амплифицированная нуклеиновая кислота-мишень, полученная на стадии б), и детектирующий агент, по отдельности добавляют на пластину для нанесения образца устройства, таким образом, что непосредственное или опосредованное связывание осуществляется *in situ*. В одном из воплощений указанную амплифицированную нуклеиновую кислоту-мишень добавляют перед добавлением детектирующего агента. В еще одном воплощении указанный детектирующий агент добавляют перед добавлением амплифицированной нуклеиновой кислоты-мишени.

В еще одном воплощении детектирующий агент представлен в пластине для образца и/или участках для анализа. В одном из воплощений указанный детектирующий агент представлен исключительно в сегментах участков для анализа. Следовательно в данном воплощении амплифицированная нуклеиновая кислота-мишень, полученная на стадии б), не связана с детектирующим агентом до ее добавления на пластину для нанесения образца раскрытого здесь устройства.

В одном из воплощений указанный биологический образец получают у указанного субъекта не инвазивным образом, таким как не хирургический путь, что не несет какой-либо риск для указанного пациента и не требует осуществления медицинским работником. В одном из воплощений раскрытого здесь способа биологический образец представляет собой первичную бактериальную культуру указанного субъекта.

В одном из воплощений указанный образец представляет собой образец, выбранный из биологических жидкостей, таких как моча, кровь, мокрота, и тканей, таких как моча, кровь и мокрота, таких как моча и мокрота.

В одном из воплощений раскрытого здесь способа инкубирование на стадии д) осуществляют в течение периода, достаточного для обнаружения, где этот период составляет меньше чем 180 мин, меньше чем 120 мин, такой как меньше чем 90 мин, такой как меньше чем 80 мин. Понятно, что быстрое получение результатов анализа является благоприятным.

В одном из воплощений раскрытого способа стадию в) осуществляют одновременно со стадией б). В еще одном воплощении стадию в) осуществляют после стадии б).

В одном из воплощений этого способа селективная амплификация на стадии б) представляет собой мультиплексную селективную амплификацию. Мультиплексная селективная амплификация относится к одновременной селективной амплификации множества различных определенных последовательностей нуклеиновых кислот в одной реакционной пробирке. Как правило, молекулы-мишени могут быть амплифицированы при помощи способа амплификации нуклеиновой кислоты, такого как изотермическая амплификация, тем не менее, сохраняется проблема с правильной идентификацией точечных мутаций в ДНК мишени, например в случае бактериальных инфекций, устойчивых к лекарственным средствам. Таким образом, представление способа, который обеспечивает возможность для надежной и специфической, и селективной амплификации ДНК мишени, является особенно важным, причем этот способ обеспечивал бы точное обнаружение вариантов однонуклеотидных замен.

Таким образом, в одном из воплощений второго аспекта описания настоящего изобретения предложен способ, где селективная амплификация на стадии б) выбрана из группы, состоящей из полимеразной цепной реакции (ПЦР), ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), тестов ДНК с использованием разветвленных зондов (квантиплексная рДНК), лигазной цепной реакции, транскрипционно-опосредованной амплификации (ТМА), амплификации, основанной на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA), амплификации по типу катящегося кольца (RCA) в комбинации с распознаванием мишеней с использованием замыкающих кольцо зондов (PLP).

В качестве примера PLP представляют собой линейные олигонуклеотидные зонды, которые содержат область обнаружения, рестрикции, специфическую концевую последовательность и линкерные последовательности, где 5' и 3' плечи (концы) предназначены для гибридизации с последовательностью-мишенью. Поскольку концы зонда гибридизуются по соседству от сайта, специфического в отношении мишени, для лигирования требуется превосходное соответствие по 3' концу, что позволяет эффективно различать точечные мутации. Линкерный сегмент в середине содержит последовательности, обладающие функциями для амплификации, идентификации и обнаружения, даже при высокой степени мультиплексности. Над опосредованным лигированием замыкающим кольцо зондом можно осуществить RCA с получением одноцепочечного конкатемера, содержащего множество комплементарных повторов последовательности PLP. Для улучшения чувствительности этот конкатемер может быть расщеплен рестриктазами, повторно лигирован в новые кольца и подвергнут дополнительному процессу RCA, известному как последовательная амплификация по типу катящегося кольца (C2CA). Расщепленные рестриктазами ампликоны (мономеры) гибридизуются по типу сэндвича с общими для них олигонуклеотидными метками AuNP и с соответствующими олигонуклеотидными метками дикого типа и мутантными олигонуклеотидными метками, иммобилизованными на полосках для латерального проточного анализа для получения визуальных сигналов. Таким образом, в одном из воплощений указанного способа селективная амплификация на стадии б) представляет собой амплификацию по типу катящегося кольца в комбинации с

распознаванием мишени с использованием замыкающих кольцо зондов, возможно включая стадию последовательной амплификации по типу катящегося кольца.

В одном из воплощений, указанные замыкающие кольцо зонды имеют длину 70-120 нуклеотидов, например длину от 70 до 100 нуклеотидов.

В одном из воплощений способа в соответствии с настоящим изобретением на стадии нанесения используют по меньшей мере один замыкающий кольцо зонд, который специфичен для маркера устойчивости к антибиотику выбранного из группы, состоящей из *groB* 176 TGC, *groB* 432 GGC, *groB* 432 ACC, *groB* 432 AGC, *groB* 432 CAG, *groB* 432 CTG, *groB* 432 AGC, *groB* 432 CAG, *groB* 436 CTG, *groB* 437 AGC, *groB* 438 CAA, *groB* 438 TTC, *groB* 438 ATG, *groB* 441 GAC, *groB* 441 AAC, *groB* 441 CAG, *groB* 444 AAC, *groB* 444 CCG, *groB* 444 CTG, *groB* 447 TCG, *groB* 447 GGG, *groB* 447 TTG, *groB* 447 ACC, *groB* 451 CAC, *groB* 451 AAG, *groB* 451 CGC, *groB* 451 CGA, *groB* 451 CTG, *groB* 456 TCG, *groB* 456 GCG, *groB* 458 CTG, *groB* 486 CTG, *groB* 486 ATC, *groB* 496 CTG, *groB* 497 ATC, *groB* 513 CCA, *groB* 515 ATC, *groB* 516 TAC, *groB* 516 GTC, *groB* 522 TGG, *groB* 526 CGC, *groB* 526, *groB* 526 GAC, *groB* 526 CTC, *groB* 526 ACC, *groB* 531 TTG, *groB* 531 TGG, *groB* 533 CCG, *groB* 558 CGC, *groB* 598 GAG, *katG* 269 CGT, *katG* 463 CTG, *katG* 379 ACC, *katG* 98 TGC, *katG* 352 GAA, *katG* 463 CTG, *katG* 315 ACC, *katG* 202 GCA, *katG* 203 ACT, *katG* 518 вставка GGTC, *katG* 315 AAC, *katG* 127 CCG, *katG* 506 TAG, *katG* 315 ACA, *katG* 315 ACG, *katG* 315 ACT, *katG* 315 ATC, *katG* 315 AGA, *katG* 315 GGC, *katG* 315 CGC, *inhA* -15 T, *inhA* -8, *inhA* -17G, *inhA* -17T, *inhA* -34G, *inhA* -34T, мутации *inhA* -47 T, *ahpC* -oxyR мутации в кодонах -10, -6, -39, -48, -15, 12 и -9, *rrs* 483 T, *rrs* 485 G, *rrs* 496A, *rrs* 491T, *rrs* 512T, *rrs* 798T, *rrs* 877A, *rrs* 904G, *rrs* 906 C, *rrs* 904 T, *rrs* 1401G, *rpsL* 43 AGG, *rpsL* 88 CAG, *rpsL* 128 G, *rpsL* 263 G и *rpsL* 262 C, *rrs* 1401G, *gyrA* 94G, *gyrA* 90T, *gyrA* 90V, *gyrA* S91P, *gyrA* D94A, *gyrA* D94G, *gyrA* 94N, *gyrA* 94H, *emb* 306v ATG, *emb* 306i ATG, *eis* -10G/A, *eis* -12C/T, *eis* -15 C/G и *rrs* 1401 A/G. И по меньшей мере один замыкающий кольцо зонд представляет собой замыкающий кольцо зонд, который специфичен для соответствующей последовательности дикого типа.

Не ограничивающие объем изобретения примеры соответствующих последовательностей дикого типа включают *katG*, *groB*, *gyrA*, *rrs*, *eis*, *emb*, *ahpC*, *oxyR*, в кодонах *groB* 516 wt, *katG* 315 wt, *groB* 331 wt, *groB* 531 wt, *groB* 526 wt, *inhA* - 15 wt, *rrs* 1401 wt, *gyrA* 94 wt, *gyrA* 90 wt, *groB* 533 wt, *emb* 306wt, *eis* -8 wt, *eis* -10wt, *eis* -12wt, *eis* -15 wt, *rrs* 483 wt, *rrs* 485 wt, *rrs* 496A wt, *rrs* 491 wt, *rrs* 512 wt, *rrs* 798 wt, *rrs* 877 wt, *rrs* 904 wt, *rrs* 906 wt, *rrs* 904 wt, *rrs* 1401 wt, *rpsL* 43 wt, *rpsL* 88 wt, *rpsL* 128 wt, *rpsL* 263 wt и *rpsL* 262 wt. В данном случае пример пары мутант-вариант дикого типа представляет собой *groB* 516 TAC и *groB* 516 wt.

В одном из воплощений способа в соответствии с настоящим изобретением на стадии нанесения используют по меньшей мере замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении маркеров устойчивости к антибиотику *groB* 513 CCA, *groB* 515 ATC, *groB* 516 TAC, *groB* 516 GTC, *groB* 522 TGG, *groB* 526 CGC, *groB* 526, *groB* 526 GAC, *groB* 526 CTC, *groB* 526 ACC, *groB* 531 TTG, *groB* 531 TGG и *groB* 533 CCG, и замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении соответствующей последовательности дикого типа. В одном из воплощений способа в соответствии с настоящим изобретением на стадии нанесения используют по меньшей мере замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении маркеров устойчивости к антибиотику *katG* 315 ACC, *katG* 202 GCA, *katG* 203 ACT, *katG* 518 вставка GGTC, *katG* 315 AAC, *katG* 127 CCG, *katG* 506 TAG, *katG* 315 ACA, *katG* 315 ACG, *katG* 315 ACT, *katG* 315 ATC, *katG* 315 AGA, *katG* 315 GGC, *katG* 315 CGC, *inhA* -15 T, *inhA* -8, *inhA* -17G и *inhA* -17T, и замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении соответствующей последовательности дикого типа. В одном из воплощений способа в соответствии с настоящим изобретением на стадии нанесения используют по меньшей мере замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении маркеров устойчивости к антибиотику *groB* 516 TAC, *groB* 516 GTC, *groB* 526 CGC, *groB* 526, *groB* 526 GAC, *groB* 526 CTC, *groB* 526 ACC, *groB* 531 TTG, *groB* 531 TGG, *groB* 533 CCG, *inhA* -15 T, *inhA* -8, *inhA* -17G, *inhA* -17T, *katG* 315 ACC, *katG* 315 AAC, *katG* 315 ACA, *katG* 315 ACG, *katG* 315 ACT, *katG* 315 ATC, *katG* 315 AGA, *katG* 315 GGC и *katG* 315 CGC, и замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении соответствующей последовательности дикого типа.

В одном из воплощений способа в соответствии с настоящим изобретением на стадии нанесения используют по меньшей мере замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении маркеров устойчивости к антибиотику *ahpC* -oxyR мутации в кодонах -10, -6, -39, -48, -15, 12 и -9, *rrs* 1401G, *gyrA* 94G, *gyrA* 90T, *gyrA* 90V, *gyrA* S91P, *gyrA* D94A, *gyrA* D94G, *gyrA* 94N, *gyrA* 94H, *emb* 306v ATG, *emb* 306i ATG, *eis* -10G/A, *eis* 12C/T, *eis* -15 C/G и *rrs* 1401 A/G, и замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении соответствующей последовательности дикого типа. В одном из воплощений способа в соответствии с настоящим изобретением на стадии нанесения используют по меньшей мере замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении маркеров устойчивости к

антибиотику *groB* 432 ACC, *groB* 438 ATG, *groB* 447 GGG, *groB* 516 GTC, *groB*526 GAC, *groB* 531 TGG, *katG* 315 ACT, *inhA* -8, *gyrA* 90T, *emb* 306i ATG и *ies* -12C/T, и замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении соответствующей последовательности дикого типа. В еще одном воплощении способа в соответствии с настоящим изобретением на стадии нанесения используют по меньшей мере замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении маркеров устойчивости к антибиотику *groB* 432 CAG, *groB* 438 TTC, *groB* 447 TCG, *groB* 526 CTC, *katG* 315 GGC, *inhA* -17G и *ies*-15 C/G, и замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении соответствующей последовательности дикого типа. В еще одном воплощении способа в соответствии с настоящим изобретением на стадии нанесения используют по меньшей мере замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении маркеров устойчивости к антибиотику *groB* 432 CTG, *groB* 447 TTG, *groB* 526 ACC и *katG* 315 CGC, и замыкающие кольцо зонды, которые специфичны в отношении соответствующей последовательности дикого типа. В еще одном воплощении способа в соответствии с настоящим изобретением используют маркеры устойчивости *rrs* 483 wt, *rrs* 485 wt, *rrs* 496A wt, *rrs* 491 wt, *rrs* 512 wt, *rrs* 798 wt, *rrs* 877 wt, *rrs* 904 wt, *rrs* 906 wt, *rrs* 904 wt, *rrs* 1401 wt, *rpsL* 43 wt, *rpsL* 88 wt, *rpsL* 128 wt, *rpsL* 263 wt и *rpsL* 262 wt и *ies* -10, *ies* -12, *eis* -15 wt и мутантные кодоны.

Специалисту в данной области техники понятно, что комбинация используемых замыкающих кольцо зондов зависит от идентичности маркеров устойчивости к антибиотику, для которых обнаруживают отсутствие или присутствие, и что любая комбинация маркеров, перечисленных в отношении первого аспекта настоящего изобретения в равной степени подходит для этого второго аспекта. Для краткости, перечни здесь не повторяются.

В одном из примеров замыкающие кольцо зонды, используемые в селективной амплификации на стадии б), могут быть специфичны соответственно в отношении маркеров устойчивости к антибиотику *groB* 516 TAC, *groB* 516 GTC и в отношении соответствующей последовательности дикого типа *groB* 516 wt. В еще одном примере замыкающие кольцо зонды, используемые в селективной амплификации на стадии б), могут быть специфичны соответственно в отношении маркеров устойчивости к антибиотику *groB* 531 TGG и *groB* 531 wt. В одном из воплощений указанные замыкающие кольцо зонды содержат соответственно последовательности SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 9. В еще одном примере замыкающие кольцо зонды, используемые в селективной амплификации на стадии б), могут быть специфичны соответственно в отношении маркеров устойчивости к антибиотику *katG* 315 ACC и *katG*315 wt. В одном из воплощений указанные замыкающие кольцо зонды содержат соответственно последовательности SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 7. Специалисту в данной области техники понятно, что несколько отличающихся замыкающих кольцо зондов могут быть комбинированы в одной селективной амплификации, например одна реакция селективной амплификации может быть осуществлена с использованием нескольких замыкающих кольцо зондов, каждый из которых специфичен в отношении одного из *groB* 531 TGG, *groB* 531 wt, *katG* 315 ACC и *katG*315 wt. В конкретном воплощении раскрытого здесь способа замыкающие кольцо зонды представляют собой по меньшей мере один из SEQ ID NO: 7-10, такие как по меньшей мере два из SEQ ID NO: 7-10, такие как по меньшей мере три из SEQ ID NO: 7-10, такие как все четыре из SEQ ID NO: 7-10. В одном из воплощений указанные замыкающие кольцо зонды представляют собой SEQ ID NO: 7 и 8. В еще одном воплощении указанные замыкающие кольцо зонды представляют собой SEQ ID NO: 9 и 10.

Требование новейших приборов, таких как флуориметры, флуоресцентные микроскопы, сканеры с матрицей с зарядовой связью для регистрации сигналов RCA или C2CA, затрудняет использование RCA в лабораториях с ограниченными ресурсами, такими как периферийные лаборатории, и приводит к необходимости альтернативных способов. Специалисту в данной области техники понятно, что устройство в соответствии с настоящим изобретением может быть использовано в качестве способа, для которого не требуется продвинутое и дорогостоящее оборудование для анализа и следовательно подходит для периферийных лабораторий.

В воплощениях способа по настоящему изобретению амплифицированная молекула нуклеиновой кислоты-мишени связана с детектирующим агентом. Такое связывание может представлять собой непосредственное или опосредованное связывание, например посредством дополнительной молекулы нуклеиновой кислоты. Способы связывания детектирующей молекулы с молекулой нуклеиновой кислоты хорошо известны в области техники, и специалисту в данной области техники известны подходящие способы, включающие электрические или механические, или ионные или химические, или эти способы в комбинации. Не ограничивающие объем изобретения примеры органических и не органических детектирующих нуклеиновые кислоты агентов и их комбинация включают радионуклиды, наночастицы золота, флуорофоры или любые окрашенные вещества, аптамеры или линкеры, стрептавидин-ассоциированные агенты, биотин, пероксидаза хрена или конъюгированные наночастицы золота (AuNP). В одном из воплощений указанный детектирующий агент представляет собой наночастицы золота, такие как наночастицы золота, конъюгированные с молекулой нуклеиновой кислоты. В некоторых воплощениях указанный детектирующий агент обнаруживается визуально. В некоторых воплощениях указанный детектирующий агент обеспечивает цветовой сигнал.

В связанном аспекте предложен набор, включающий описанное здесь устройство и по меньшей мере

ре один зонд, специфичный в отношении маркера множественной устойчивости, по меньшей мере один зонд, специфичный в отношении соответствующей последовательности дикого типа, и раскрытый здесь детектирующий агент. Например, могут быть использованы описанные комбинации замыкающих кольцо зондов. Специалисту в данной области техники понятно, что описание маркеров резистентности и замыкающих кольцо зондов в отношении первого и второго аспектов описания настоящего изобретения в равной степени подходят для этого третьего аспекта.

Таким образом, как представлено в примере описания настоящего изобретения, амплификация нуклеиновой кислоты может включать комбинированное использование и интеграцию замыкающих кольцо зондов, амплификацию по типу катящегося кольца, регистрирующее устройство для латерального проточного анализа и наночастицы золота для обеспечения видимых сигналов для упрощенной оценки результата теста, как подробно обсуждается ниже. Например, тестирующая полоса для латерального проточного анализа может иметь олигонуклеотиды нуклеиновой кислоты, конъюгированные с наночастицами золота или без них в качестве составляющей части, и способ для приготовления указанной тестирующей полосы для обнаружения и/или определения нуклеиновой кислоты.

Конъюгированные с нуклеиновыми кислотами наночастицы золота стабилизированы в сухой форме и сохраняют все их свойства после регидратации (форма, текстура, подвижность, гибридизационная емкость и коллоидное состояние). Присутствие нуклеиновой кислоты-мишени в образце обнаруживается по появлению двух красных полос на тестирующей и контрольной зонах.

Хотя изобретение описано со ссылкой на различные аспекты примеров и воплощений, специалисты в данной области техники понимают, что могут быть произведены различные изменения, и эквиваленты могут быть заменены на их элементы в пределах объема изобретения. Дополнительно, может быть произведено множество модификаций для адаптации конкретной ситуации или молекулы к идеям изобретения в пределах основного объема изобретения. Таким образом, предполагается, что изобретение не ограничено каким-либо конкретным рассматриваемым воплощением, а что изобретение включает все воплощения, попадающие в объем формулы изобретения.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 демонстрирует изображения, полученные при помощи проходящей электронной микроскопии (ТЕМ) с увеличением 50000х и 300000х (А и В), демонстрирующие то, что наночастицы золота имеют средний диаметр $15 \pm 0,5$ нм. Сдвиг спектров светопоглощения (С) с 520 нм к 528 нм демонстрирует то, что приготовленные частицы золота конъюгированы с олигонуклеотидами. Единичный сглаженный спектр измерений DLS (динамическое светорассеяние) (D) подтверждает конъюгацию и монодисперсию конъюгатов AuNP-олигонуклеотид.

Фиг. 2 демонстрирует результаты исследований предела обнаружения способа PLP-LF путем тестирования 10-кратных разбавлений геномной ДНК МТВ (А). Денситограммы в В, построенные путем вычисления локальных интенсивностей цвета, представляют полуколичественные изменения в контрольных и тестирующих столбцах.

Фиг. 3 демонстрирует результаты тестирования, характеризующего образцы геномной ДНК (300 нг), выделенной из клинических МТВ, содержащих дикий тип или мутантные кодоны groB 531 и katG 315. Денситограммы количественно демонстрируют присутствие и/или отсутствие генотипов дикого типа и/или мутантных генотипов клинических изолятов.

Фиг. 4 представляет собой перечень последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в примере, с SEQ ID NO: 1-18.

Фиг. 5а, 6а и 7а иллюстрируют перспективное изображение различных воплощений устройства (10; 30; 50) в соответствии с изобретением. Устройства (10; 30; 50) предполагаются для анализа жидких образцов, содержащих амплифицированные нуклеиновые кислоты.

Устройство (10), проиллюстрированное на фиг. 6а, включает прямоугольный защитный корпус (11), имеющий лицевую сторону (12), заднюю сторону (13) и четыре боковых поверхности (14). Устройство (10) во время использования предназначено для по существу горизонтального расположения при том, что лицевая сторона (12) направлена вверх.

На лицевой стороне (12) корпуса (11) выполнен по существу круглый канал (15) для введения образца таким образом, что анализируемый образец может поступать к пластине (16) для нанесения образца снаружи от корпуса (11). Кроме того, два отверстия (17), через которые может быть увиден результат анализа, выполнены на лицевой стороне корпуса. Отверстия (17) могут быть покрыты прозрачным слоем для защиты внутреннего содержимого корпуса. Размер и форма канала (15) для введения образца и отверстия (17) могут быть модифицированы несколькими путями в пределах объема изобретения. Например, два отверстия могут быть заменены одним большим отверстием.

Например, корпус изготовлен из пластического материала, который обеспечивает поддержку для различных компонентов устройства и обеспечивает требуемую защиту устройству.

Корпус вмещает пластину (16) для нанесения образца и первая (18) и вторая (19) удлиненные полосы для анализа образца, схематически проиллюстрированные на фиг. 6b.

Пластина (16) для нанесения образца, представленная в проиллюстрированных воплощениях, является по существу круглой и изготовлена из абсорбирующего волокнистого материала, например, изго-

товлена из стекла, синтетических волокон или целлюлозного материала. Жидкий образец наносится на пластину (16) для нанесения образца и проходит через пластину для нанесения образца за счет капиллярной подвижности к первой (18) и второй (19) удлиненным полосам для анализа образца. Это воплощение проиллюстрировано на фиг. 5b и фиг. 8.

Для облегчения потока образца в пластине для образца между первой и второй удлиненными полосами для анализа расположена выемка (23), проходящая от периферии пластины для нанесения образца в направлении ее центра. Проиллюстрированная пластина для нанесения образца является по существу круглой, но форма может быть модифицирована несколькими путями для облегчения потока образца к удлиненным полосам для анализа образца. Альтернативная форма может представлять собой каплю, узкий край которой направлен к удлиненным полосам для анализа образца.

Первая часть полос для анализа образца, соединенная с пластиной (16) для нанесения образца, предпочтительно изготовлена из того же самого материала, что и пластина (16) для нанесения образца для продвижения образца к соответствующему участку (20) для анализа образца. Для дополнительного улучшения продвижения образца от пластины для нанесения образца к полосам для анализа образца пластина для нанесения образца и часть удлиненных полос для анализа образца, проходящая от пластины для нанесения образца к участку для анализа образца, выполнена из единого куска материала.

Участки (20) для анализа первой и второй удлиненных полос для образца имеют одинаковую длину и расположены параллельно, так что результат регистрируют на лицевой стороне корпуса путем комбинирования результатов с двух участков (20) для анализа образца каждой полосы.

Каждый участок для анализа содержит одинаковое количество сегментов (22). Эти сегменты (22) в каждом из участков для анализа образца расположены параллельно для того, чтобы обеспечить желаемый контакт между соседними сегментами и обеспечить возможность для прохождения образца через участок для анализа образца. Участок анализа образца, т.е. различные сегменты, расположенные параллельно, изготовлены из прозрачного материала, расположенного над поддерживающей пленкой (31). Прозрачный материал имеет толщину по меньшей мере 0,1 мм, и после того, как один из сегментов регистрирует определенный ген или вещество в образце, трехмерная метка появляется в прозрачном слое сегмента. Прозрачный слой в комбинации с поддерживающей пленкой обеспечивает очень четкую метку, которая легко регистрируется пользователем. Различные сегменты не видны на полосах для анализа, но после нанесения образца в сегменте появляется метка, соответствующая результату для анализируемого образца. Результат обнаруживается по комбинации двух соответствующих поперечных сегментов первой и второй полосы для анализа образца.

Угол α в диапазоне 40-80° выполнен между первой и второй удлиненными полосами для образца для обеспечения легкого прохождения образца в удлиненные полосы для анализа образца.

На фиг. 6a и 6b схематически проиллюстрировано альтернативное воплощение устройства. Корпус имеет по существу тот же самый дизайн, как в предыдущем воплощении, но устройство содержит дополнительную третью удлиненную полосу для анализа образца, расположенную между первой и второй удлиненными полосами для анализа образца. Третья удлиненная полоса для анализа образца по существу идентична первой и второй удлиненным полосам для анализа образца и обеспечивает возможность для анализа дополнительных характеристик в том же самом устройстве. Третья удлиненная полоса для образца тянется по существу в радиальном направлении от центра пластины для нанесения образца от конца выемки между первой и второй удлиненными полосами для анализа образца.

На фиг. 7a и 7b схематически проиллюстрировано еще одно альтернативное воплощение (50) устройства (30). Корпус имеет по существу тот же самый дизайн, как в предыдущем воплощении, но устройство содержит четвертую (25) и пятую (26) удлиненные полосы для анализа образца, расположенные снаружи от первой и второй удлиненных полос для анализа образца, т.е. на противоположных сторонах относительно первой и второй удлиненных полос для анализа образца. Четвертая и пятая удлиненные полосы для анализа образца по существу идентичны первой и второй удлиненным полосам для анализа образца, и обеспечивает возможность для анализа дополнительных характеристик в том же самом устройстве. Четвертая и пятая удлиненные полосы для образца сначала проходят по существу в радиальном направлении от центра пластины для нанесения образца до того, как они образуют угол, таким образом, что участки для анализа расположены параллельно друг другу и участкам для образца первого и второго удлиненных участков для анализа образца.

Угол β в диапазоне 60-100° выполнен между четвертой и пятой удлиненными полосами для образца для обеспечения того, что образец легко проходит во все удлиненные полосы для анализа образца.

На фиг. 7b участок для образца проиллюстрирован в перспективе. Пластина (16) для нанесения образца и удлиненные полосы (18, 19, 24, 25, 26) для анализа образца предпочтительно содержат пластиковую поддерживающую пленку (31), расположенную напротив входного канала (15) и отверстий (17) в корпусе для обеспечения того, чтобы жидкий образец не вытекал из пластины для нанесения образца и удлиненных полос для анализа образца. Каждая из первой, второй, третьей, четвертой и пятой удлиненных полос для анализа образца включает участок (20) для анализа, содержащий множество сегментов, изготовленных таким образом, чтобы на них проявлялась метка, если определенные последовательности

нуклеиновых кислот обнаруживаются в жидком образце, проникающем через участок (20) для образца. Каждая из первой, второй, третьей, четвертой и пятой удлиненных полос для анализа образца дополнительно содержит абсорбирующую пластину (28), расположенную в конце полосы для образца. Абсорбирующая пластина облегчает ток образца через участок (20) для анализа.

Различные сегменты (22) участков (20) для образца не видны до того, как наносится образец, и результат отображается на участке для анализа образца, в виде линии или символа, который появляется на полосе для анализа образца в том случае, если в образце обнаруживается конкретная бактерия или нуклеиновая кислота, которая запускает появление метки на этом сегменте.

Количество сегментов в участке для образца 20 может быть адаптировано для специфического анализа, для которого адаптировано это устройство, но в основном содержит по меньшей мере 5 сегментов. Результат анализа регистрируется по комбинации результатов, представленных на соответствующих участках для образца для анализа расположенных параллельно, т.е. два, три или пять сегментов, расположенных в поперечном направлении относительно участков (20) для образца.

Пример

Краткое описание

В следующем примере раскрыт экспериментальный вариант приготовления и анализа образцов комплекса *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), лежащих в основе настоящего изобретения.

Материалы и способы

Химические вещества и олигонуклеотиды

Стрептавидин из *Streptomyces avidinii*, тригидрат хлорида золота (III) (HAuCl_4), сахароза, дитиотреитол (DTT), тритон X-100, тринатрий цитрат, гидрохлорид трис (гидрокси-метил)аминометана (Трис-HCl), твин 20, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA) и бычий сывороточный альбумин (BSA, для конъюгатов олигонуклеотид-AuNP), буфер хлорид натрия-цитрат натрия (SSC) (pH 7,0), физиологический раствор, забуференный фосфатом (PBS, pH 7,4, 0,01 M) и хлорид натрия (NaCl, 5M, pH 7,0), ATP (аденозинтрифосфат), dNTP (дезоксирибонуклеозидтрифосфат), олигонуклеотиды (приобретенные в Integrated DNA Technologies и Sigma-Aldrich). Для анализа LF не содержащие связывающее вещество пластины из боросиликатного стекловолокна (качество A/C), абсорбирующие пластины из целлюлозного волокна (качество 113) и нитроцеллюлозную мембрану прикрепляли к ламинированным картам/полосам (шириной 0,4 и 0,5 см).

Бактериальные штаммы и экстракция ДНК

Референтный штамм MTB H37Rv (ATCC 25618) и десять клинических изолятов MTB (табл. 2) выращивали на среде Левенштейна-Йенсена с и без 40 мг/л RIF, соответственно. ДНК экстрагировали и 10 мкг геномной ДНК ферментативно фрагментировали с использованием 10 Е каждого из NaeI и HpyCH4V, и 1х буфер CutSmart (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) при 37°C в течение 90 мин, а затем подвергали инактивации ферментов при 65°C в течение 20 мин. Концентрацию ДНК измеряли при помощи анализов дцДНК HS (высокочувствительный) и BR (широкий спектр) с использованием флуориметра Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Таблица 2

Информация о генотипах штаммов		
Идентификатор штамма	генотип <i>groB</i>	генотип <i>katG</i>
2	S531L (TCG/TTG)	S315T (AGC/ACC)
4	S531L (TCG/TTG)	S315T (AGC/ACC)
8	S531L (TCG/TTG)	S315T (AGC/ACC)
9	S531L (TCG/TTG)	S315T (AGC/ACC)
12	S531L (TCG/TTG)	S315T (AGC/ACC)
13	S531L (TCG/TTG)	WT
17	S531L (TCG/TTG)	S315T (AGC/ACC)
19	WT	WT
20	WT	WT
21	WT	WT

Замыкающие кольцо зонды и амплификация по типу катящегося кольца

Последовательности олигонуклеотидов, использованные в этом исследовании, приведены на фиг. 4. Четыре PLP сконструировали для нацеливания на два кодона в генах *katG* и *groB* и соответствующие им последовательности дикого типа (*katG* 315 ACC (MUT), *katG* 315 AGC (WT), *groB* 531 TTG (MUT) и *groB* 531 TCG (WT)). После подтверждения вторичных структур с использованием Mfold Web Server PLP фосфорилировали по 5' концу путем инкубирования реакционной смеси, состоящей из 1 мкМ олигонук-

леотида, 1x PNK буфера A, 1 mM ATP) и 1 Е/мкл Т4 полинуклеотидкиназы (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) при 37°C в течение 30 мин с последующей инактивацией фермента 65°C в течение 20 мин. Подтверждение эффективности PLP осуществляли путем осуществления C2CA [Dahl et al. Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101, 4548-4553] с модификациями. Чувствительность анализа оценивали при помощи полос LF с ампликонами, полученными из 300 пг, 3 нг, 30 нг и 300 нг геномной ДНК.

Приготовление и характеристики конъюгированных с олигонуклеотидами наночастиц золота

Наночастицы золота готовили при помощи стандартного способа восстановления цитрата [Frens G. Nature Phys Sci. 1973, 241, 20-22] с модификациями. В сухие круглодонные колбы из боросиликатного стекла объемом 500 мл, очищенные в aquaregia (азотная кислота и соляная кислота в отношении 3:1), 100 мл 0,01% HAuCl₄ в воде MilliQ кипятили при интенсивном встряхивании. Добавляли четыре миллилитра 1% раствора тринатрий цитрата и после вращения винно-красный краситель. Пятьдесят микромолей тиолированного олигонуклеотида, предназначенного для гибридизации с последовательностью, представленной во всех мономерах C2CA, восстанавливали при помощи 500 mM DTT в буфере SSC в течение 30 мин. Колонку NAPTM-5 (GE Healthcare Biosciences, Little Chalfont, UK) использовали для очистки олигонуклеотидов и элюировали непосредственно в 1 мл AuNP. После инкубирования элюата в течение 2 ч при 37°C постепенно добавляли 1M NaCl и оставляли 'окисляться' при 4°C. Раствор центрифугировали при 13000 g в течение 25 мин, супернатант удаляли, и конъюгаты AuNP-олигонуклеотид повторно диспергировали в 1 мл 5% BSA, 0,25% твин 20 и 20 mM трис-HCl (pH 8,0).

Обычные полученные при помощи просвечивающего электронного микроскопа (ТЕМ) изображения приготовленных AuNP получали при 100 кВ для проверки качества приготовленных частиц. Конъюгаты AuNP-олигонуклеотид охарактеризовывали путем измерения их светопоглощения при 520 нм в мультимодальном микропланшетном ридере (SpectraMaxR M5, Molecular Devices), и их поверхностный заряд (ζ -потенциал) измеряли путем динамического светорассеяния (DLS) с использованием Zetasizer Nano ZS90 (Malvern, UK), оборудованного лазером HeNe мощностью 4,0 мВт и лавинным фотодиодным детектором.

Дизайн, конструкция и приготовление полос для латерального проточного анализа

100×5 мм LF полоса состоит из пластины для нанесения образца, нитроцеллюлозной мембраны и абсорбирующей пластины, которые закреплены на тонкой пластиковой подложке. Сухую пластину для нанесения образца (25×5 мм) после насыщения 1% BSA, 1% Triton X-100, 20 mM трис-HCl, 100 mM NaCl; pH 8,0 фиксировали на одном конце нитроцеллюлозной мембраны (45×5 мм) с перекрытием на 2-3 мм, и абсорбирующую пластину (30×5 мм) фиксировали на другом конце нитроцеллюлозной мембраны.

Биотинилированные олигонуклеотиды с полос (фиг. 3) иммобилизовали в зоне тестирования и контрольной зоне на нитроцеллюлозной мембране. Контрольная зона содержала одну полосу иммобилизованных олигонуклеотидов, комплементарных конъюгатам AuNP-олигонуклеотид. Зона тестирования содержала 4 полосы, разделенные 3 мм, где каждая полоса состояла из индивидуальных олигонуклеотидов с полос для обнаружения путем гибридизации мономеров C2CA, соответствующих их специфическим генотипам katG 315 WT, katG 315 MUT (AGC/ACC), groB 531 WT и groB 531 MUT (TCG/TTG). Пятьдесят микромолей олигонуклеотида с полосы смешивали с равным объемом 1x PBS, содержащего 15 мкМ стрептавидина. После инкубирования при 37°C в течение 2 ч конъюгированный со стрептавидином олигонуклеотид иммобилизовали на нитроцеллюлозной мембране с использованием наноплоттера (Nano-Plotter NP2.0, GeSiM, Grosserkmannsdorf, Germany).

Визуализация ампликонов C2CA на полосах для латерального проточного анализа

Пятьдесят пять микролитров мономеров C2CA (амплифицированные фрагменты нуклеиновых кислот) гибридизировали с 13 мкл конъюгатов AuNP-олигонуклеотид и наносили на пластину для нанесения образца полос LF капля за каплей. Образец оставляли течь в течение 5-7 мин и промывали 4x буфером SSC для визуализации красных полос. Развитие окрашивания в контрольной полосе указывало на положительный контроль в анализе, тогда как сигналы с каждой тестируемой полосы специфически относились к присутствию WT и/или генотипов MUT katG 315 и groB 531. Диаграммы интенсивности строили для полос, и интенсивности в пикселях измеряли для количественной оценки результатов на денситограммах с использованием инструмента с открытым исходным кодом ImageJ (Version 1.49q) [Schneider et al. Nat. Meth. 2012,9, 671-675].

Результаты

В соответствии с представленным здесь в примере по настоящему изобретению представлен экспериментальный анализ, который способен обеспечивать быстрые визуальные сигналы для дифференцирования дикого типа и мутаций в генах katG и groB, вызывающих MDR-TB, т.е. устойчивость к INH и RIF. Этот способ может обеспечивать визуальные сигналы в течение приблизительно 75 мин, и эти результаты могут направить клинического врача для принятия информированных решений в отношении регулирующих мероприятий в системе здравоохранения, а также корректирования эффективной схемы терапии антибиотиками. Этот анализ позволяет получать предварительную альтернативную информацию относительно времязатратных обычных DST и обеспечивает совместимое решение для клинических лабораторий с ограниченными ресурсами. Таким образом, авторы настоящего изобретения разработали про-

стой, специфический и экономически эффективный диагностический тест, ускоряющий идентификацию устойчивости к лекарственному средству и/или устойчивости к антибиотику. Основанный на ДНК тест подходит для применения в клинических лабораториях с ограниченными ресурсами и позволяет получать информацию о картине устойчивости к лекарственному средству и/или устойчивости к антибиотику бактерий, инфицирующих пациента, которая является ценной для клинических врачей для того, чтобы предпринять подходящие действия для лечения и контроля инфекции.

Оценка конъюгатов AuNP-олигонуклеотид

Изображения ТЕМ AuNP (фиг. 1А и В) подтверждают, что размер сферических частиц составляет $\pm 3,5$ нм. Кривая распределения размеров, основанная на светопоглощении AuNP демонстрировала λ -макс при 520 нм до конъюгирования олигонуклеотидов, и пик сдвигался к 527 нм после конъюгирования (фиг. 1С). Измерения путем DLS (фиг. 1D) выявили средний диаметр 90 ± 4 нм с единичным пиком, указывающим на монодисперсный раствор без агрегации частиц. Измерения ζ -потенциала соответственно -37,4 мВ и -34,5 мВ для AuNP и их конъюгатов с олигонуклеотидами демонстрировали, что препараты стабильны.

Предел обнаружения теста замыкающего кольцо зонда для латерального проточного анализа

Предел обнаружения (LOD) этого анализа PLP-LF определяли в трех параллелях путем тестирования различных разведений геномной ДНК из референтного штамма MTB H37Rv. Поскольку оба сигнала ясно обнаруживали с 300 нг ДНК (фиг. 2А), в этом экспериментальном исследовании осуществляли дополнительные эксперименты с ДНК из клинических образцов (табл. 2) с использованием этого количества. Денситограммы (фиг. 2В), основанные на локальной плотности пикселей красного окрашивания, развешивающегося на полосах для латерального проточного анализа, коррелировали с визуальным наблюдением. Интенсивность сигнала groB 531 WT была ниже по сравнению с katG 315 WT, что может быть следствием высокого содержания GC в целевой области гена groB, возможно приводящего в результате к меньшему выходу мономеров C2CA. Минорные вариации обнаружены среди денситограмм контрольных полос, даже хотя использовали полосы для латерального проточного анализа с того же самого раунда печати. Улучшения для достижения более высокой чувствительности могут обеспечить непосредственное тестирование образцов мокроты.

Визуальное обнаружение теста замыкающего кольцо зонда для латерального проточного анализа на клинических изолятах MTB

Набор из 10 клинических изолятов MTB (табл. 2), которые были устойчивы и/или чувствительны к INH и RIF, тестировали при помощи способа PLP-LF. Как видно на фиг. 3, шесть штаммов (идентификационные номера: 2, 4, 8, 9 и 12) содержали мутантные кодоны katG и groB; три штамма (19, 20 и 21) несли исключительно кодоны дикого типа, и один штамм (13) демонстрировал присутствие кодона дикого типа katG, но не мутантный кодон groB. Все визуальные сигналы анализа PLP-LF тестируемых штаммов полностью согласовывались с генотипической характеристикой штаммов путем пиросеквенирования, и соответствующие денситограммы под каждой полосой LF соответствовали их визуальным сигналам. Этот способ может быть расширен путем включения множества других мутаций, вызывающих MDR-TB, и чувствительность может быть улучшена для применения непосредственно в отношении образцов мокроты пациентов, страдающих от TB.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устройство (10; 30; 50) для анализа жидких образцов, содержащих амплифицированные нуклеиновые кислоты, в латеральном проточном анализе, где указанное устройство содержит

пластину (16) для нанесения образца;

первую (18) и вторую (19) полосы для латерального проточного анализа образца, предназначенные для анализа различных аспектов образца нуклеиновой кислоты, где первая и вторая полосы являются удлиненными и проходят от пластины для нанесения образца, и каждая из указанных первой и второй полос содержит по существу прямой участок для анализа (20) биосенсора нуклеиновых кислот для латерального проточного анализа, разделенный на множество сегментов (22), каждый из которых выполнен таким образом, чтобы указывать на присутствие или отсутствие в указанном образце нуклеиновой кислоты-мишени с заранее определенной последовательностью, где нуклеиновая кислота-мишень с заранее определенной последовательностью непосредственно или опосредованно связана с детектирующей молекулой для обнаружения присутствия указанной нуклеиновой кислоты-мишени, и

где участки для анализа указанных первой и второй полос для анализа образца содержат поддерживающую пленку, покрытую прозрачным слоем толщиной по меньшей мере 0,1 мм, где указанные участки для анализа выполнены для анализа присутствия или отсутствия нуклеиновых кислот с различными заранее определенными последовательностями, где указанные участки для анализа первой и второй полос для анализа образца имеют по существу одинаковую длину и расположены параллельно, так что результат анализа обнаруживают по комбинации трехмерных меток, появляющихся в прозрачном слое расположенных в линию сегментов указанных первой и второй полос для анализа,

где указанные сегменты содержат последовательности нуклеиновых кислот, которые комплементарны заранее определенным последовательностям нуклеиновых кислот-мишеней, присутствие или отсутствие которых анализируют; и

корпус (11), в котором расположены указанная пластина для нанесения образца и по меньшей мере две удлиненные полосы для анализа образца, где указанный корпус имеет лицевую сторону (12), в которой выполнен канал (15) для введения образца, обеспечивающий возможность доступа к пластине для нанесения образца снаружи корпуса, и по меньшей мере одно отверстие (17), обеспечивающее возможность обнаружения результата анализа снаружи корпуса,

где пластина для нанесения образца и удлиненные полосы для анализа образца выполнены из единого куска материала, где указанный материал содержит поддерживающую пленку, покрытую прозрачным слоем толщиной по меньшей мере 0,1 мм.

2. Устройство для анализа жидких образцов, содержащих амплифицированные нуклеиновые кислоты, по п.1, где участок для анализа первой полосы для анализа образца содержит по меньшей мере один сегмент, содержащий по меньшей мере частичную последовательность нуклеиновой кислоты гена дикого типа, и участок для анализа второй полосы для анализа образца содержит по меньшей мере один сегмент, содержащий соответствующую последовательность нуклеиновой кислоты мутанта указанного гена, где соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты содержит по меньшей мере одну мутацию.

3. Устройство для анализа жидких образцов, содержащих амплифицированные нуклеиновые кислоты, по п.2, где указанный ген содержит по меньшей мере один маркер устойчивости к антибиотику, такой как маркер устойчивости к антибиотику *Mycobacterium tuberculosis*, такой как по меньшей мере один маркер устойчивости к антибиотику, выбранный из группы, состоящей из *groB* 516 TAC, *groB* 516 GTC, *katG* 315 ACC, *groB* 531 TTG, *groB* 531 TGG, *groB* 526 TAC, *groB* 526 GAC, *groB* 526 CTC, *groB* 526 ACC, *inhA*-15 T, *rrs* 1401 G, *gyrA* 94 GGC, *gyrA* 90 GTG и *groB* 533 CCG.

4. Устройство для анализа жидких образцов, содержащих амплифицированные нуклеиновые кислоты, по любому из пп.1-3, где указанные участки для анализа выполнены из прозрачной целлюлозы или полимерного материала.

5. Устройство по любому из пп.1-4, где поддерживающая пленка (31) и трехмерная метка, появляющаяся на сегментах, имеют отличающиеся цвета.

6. Устройство по любому из пп.1-5, где первая и вторая удлиненные полосы для образца сначала проходят по существу в радиальном направлении от центра пластины для нанесения образца до того, как они образуют угол, таким образом, что участки для анализа первой и второй удлиненных полос для анализа образца расположены по существу параллельно друг другу, и результат обнаруживают по комбинации сегментов, расположенных в поперечном направлении относительно удлиненных полос для анализа образца.

7. Устройство по любому из пп.1-6, содержащее третью удлиненную полосу (24) для анализа образца, предназначенную для анализа различных аспектов образца нуклеиновой кислоты, где участок для анализа указанной третьей полосы для образца выполнен для анализа присутствия или отсутствия нуклеиновых кислот с различными заранее определенными последовательностями, имеет по существу одинаковую длину и расположен между указанными первой и второй удлиненными полосами для анализа образца, таким образом, что результат анализа обнаруживают по комбинации соответствующих сегментов трех полос для анализа, предпочтительно где третья удлиненная полоса для образца проходит по существу в радиальном направлении от пластины для нанесения образца от конца выемки (23).

8. Устройство по п.6, где угол α в диапазоне 40-80° образован первой и второй удлиненными полосами для образца, и выемка (23), проходящая от периферии к центру пластины для нанесения образца, выполнена в пластине для нанесения образца между первой и второй удлиненными полосами для образца таким образом, что образец направляется к первой и второй удлиненным полосам для образца.

9. Устройство по любому из пп.1-8, содержащее четвертую (25) и пятую (26) удлиненные полосы для анализа образца, предназначенные для анализа различных аспектов образца нуклеиновой кислоты, где участки для анализа указанных четвертой и пятой полос для образца предназначены для анализа присутствия или отсутствия нуклеиновых кислот с различными заранее определенными последовательностями, имеют по существу одинаковую длину и расположены на противоположных сторонах относительно первой и второй удлиненных полос для анализа образца таким образом, что результат анализа обнаруживают по комбинации соответствующих сегментов всех четырех или пяти полос для анализа, предпочтительно где четвертая и пятая удлиненные полосы для образца проходят по существу в радиальном направлении от центра пластины для нанесения образца до того, как они образуют угол, таким образом, что участки для анализа расположены параллельно друг другу, а также относительно первого и второго участков для анализа, и расположены в одну линию с участками для анализа первой и второй удлиненных полос для образца.

10. Устройство по любому из пп.1-9, где опорная структура выполнена внутри корпуса для поддержания пластины для нанесения образца и удлиненных полос для образца в правильном положении внутри корпуса.

11. Способ определения присутствия или отсутствия нуклеиновой кислоты-мишени с заранее опре-

деленной последовательностью в образце субъекта, включающий стадии:

а) обеспечение биологического образца, который ранее был получен у субъекта неинвазивным методом,

б) подвергание указанного образца селективной амплификации по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты-мишени с заранее определенной последовательностью с получением амплифицированной нуклеиновой кислоты-мишени,

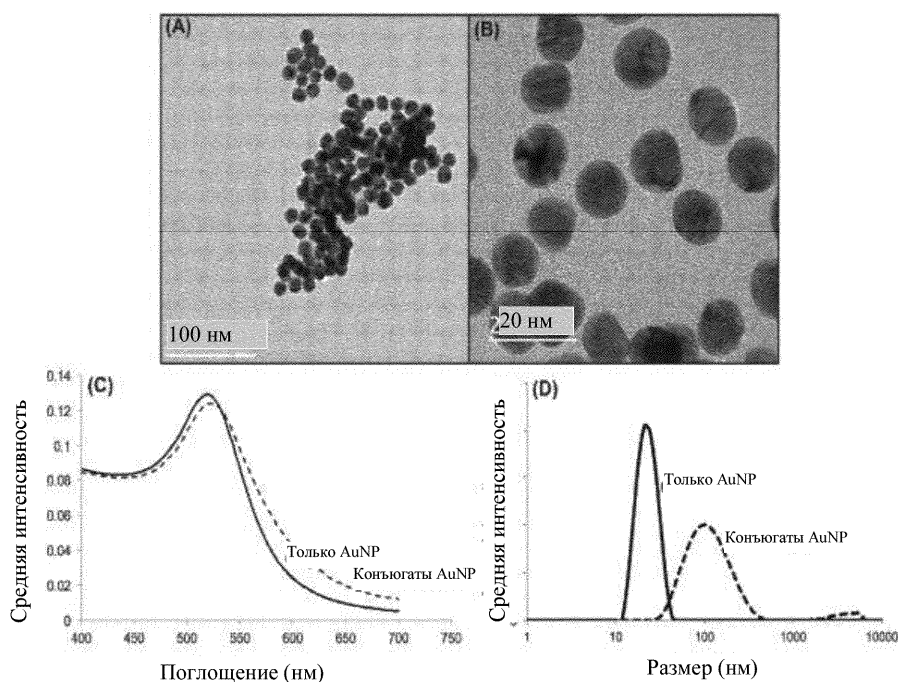
в) нанесение амплифицированной нуклеиновой кислоты-мишени на пластину для нанесения образца устройства (10; 30; 50) по любому из пп.1-10,

г) инкубирование указанного устройства в течение периода времени, достаточного для обнаружения указанной нуклеиновой кислоты-мишени при помощи детектирующего агента для обнаружения присутствия указанной нуклеиновой кислоты-мишени, и

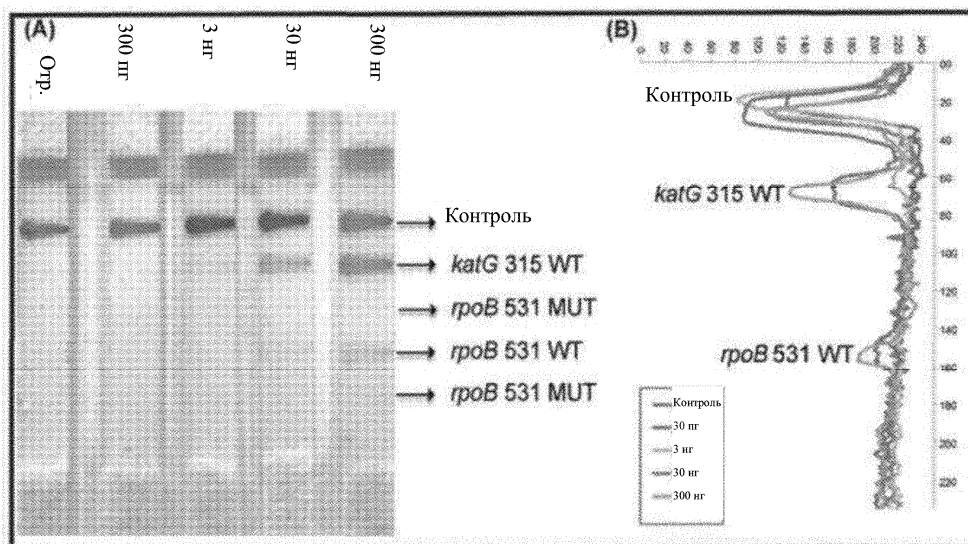
д) обнаружение присутствия или отсутствия по меньшей мере одной нуклеиновой кислоты-мишени с заранее определенной последовательностью.

12. Способ по п.11, где указанная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК или РНК, такую как бактериальная ДНК, такую как ДНК из комплекса *Mycobacterium tuberculosis*.

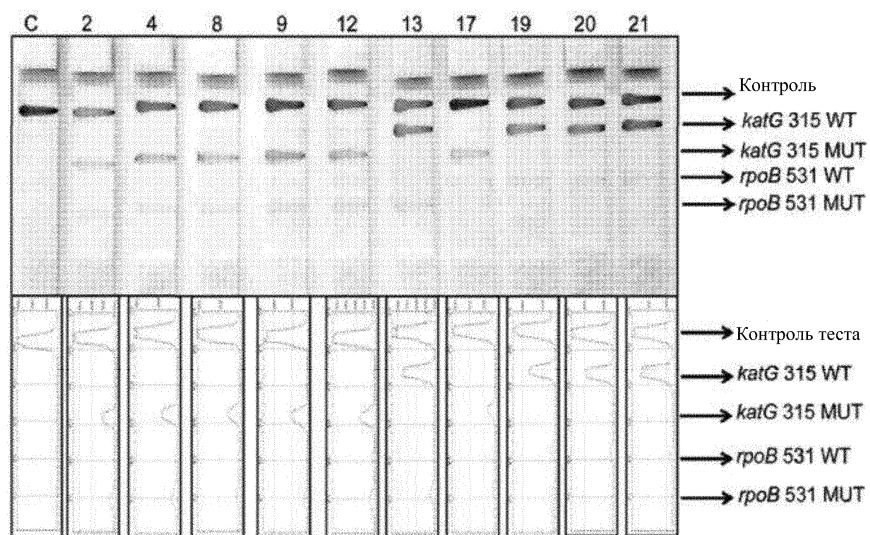
13. Набор для анализа жидких образцов на присутствие маркеров множественной устойчивости к антибиотикам, включающий устройство по любому из пп.1-10 и по меньшей мере один зонд, специфичный в отношении последовательности маркера множественной устойчивости, по меньшей мере один зонд, специфичный в отношении соответствующей последовательности дикого типа, и детектирующий агент для обнаружения присутствия указанной нуклеиновой кислоты-мишени.



Фиг. 1



Фиг. 2



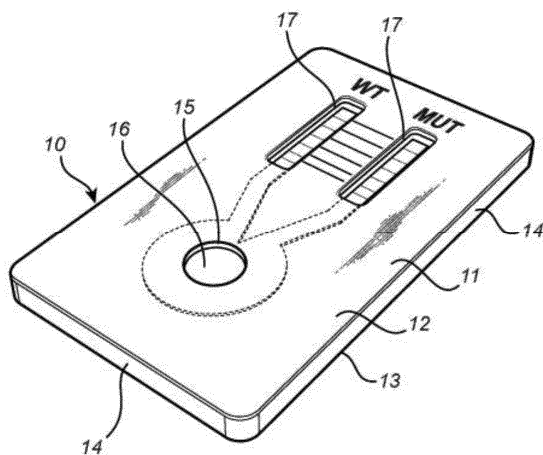
Фиг. 3

SEQ. ID NO	Oligo ID	Название	Последовательность (5' → 3')	Описание	5' модификация	3' модификация
1	S01233	<i>rpoB</i> 531 wt Atag-	AAAAAAAAAAAAAAAAAGATCACACTTACGGGAACAGC	Олигонуклеотид на полосе	Биотин	
2	S01234	<i>rpoB</i> 531 TTG Atag-	AAAAAAAAAAAAAAAAAGATCTAACGCACGGGAATCTC	Олигонуклеотид на полосе	Биотин	
3	S01237	<i>katG</i> 315 wt Atag-	AAAAAAAAAAAAAAAAACTGAGAGTTCGATGACCTGT	Олигонуклеотид на полосе	Биотин	
4	S01239	<i>katG</i> 315 ACC Atag-	AAAAAAAAAAAAAAAAAATGCTCGGGAAGGCTACTC	Олигонуклеотид на полосе	Биотин	
5	S01235	TB-control oligo_v1	ATAGTGCTTACTTAAAAAAAAA	Олигонуклеотид на полосе		Биотин
6	S01236	TB-Gold Oligo_v1	GTAAGACACTATTACTGAGGAGAAAAAAAAA	Конъюгат AuNP-олигонуклеотид		Тиол
7	S00448	<i>katG</i> 315 wt	TGGTGATCGCGTCTTACCACAGGTCATCGAACTCTCAGGTGTATGCAGCTCCTCAGTAATAGTGTCTTACATACGACCTCGATGCCGC	Замыкающий кольцо зонд		
8	S00565	<i>katG</i> 315 ACC	TGGTGATCGCGTCTTACCAGTAGCCTTCCCGAGCATGTGTATGCAGCTCCTCAGTAATAGTGTCTTACATACGACCTCGATGCCGC	Замыкающий кольцо зонд		
9	S00592	<i>rpoB</i> 531 wt RS Popeye2	GGCGCTGGGGTTGCTGTTCCGTAAGTGTGATCGTGTATGCAGCTCCTCAGTAATAGTGTCTTACTGGTTGACCCACAAGTTTTCCGACTGTC	Замыкающий кольцо зонд		
10	S00228	<i>rpoB</i> 531 TTG RS v1	GGCGCTGGGGAGTTCCCGTGCCTTAGATCGTGTATGCAGCTCCTCAGTAATAGTGTCTTACGCGCCGACTGT	Замыкающий кольцо зонд		
11	L11783	TB <i>rpoB</i> CO RS	CTCTCTCTCTCTCTCTCTCTGTCGCGACGTGCACCCGTCGCACTACGGCCGAGTGTC	Иммобилизованный олигонуклеотид	Биотин	
12	L11860	<i>katG</i> CO	CTCTCTCTCTCTCTCTCTTTCCAGCCCAAGCCCATCTGCTCCAGCGGAGCAGCCTCGGGTTC	Иммобилизованный олигонуклеотид	Биотин	

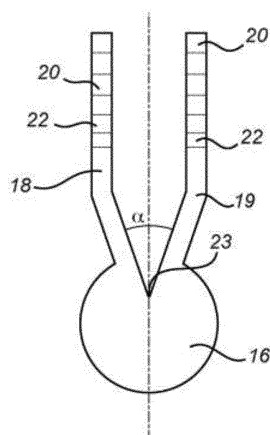
Фиг. 4а

SEQ. ID NO	Oligo ID	Название	Последовательность (5' → 3')	Описание	5' модификация	3' модификация
13	S00244	BNL_RO_AluI	GTGTATGCAGCTCCTCAGTA	Олигонуклеотид для рестрикции		
14	S00166	AluI RO	TACTGAGGAGCTGCATACAC	Олигонуклеотид для рестрикции		
15	L12879	TB <i>rpoB</i> SW RS wt v2	GGCACATCCGGCCGTAGTGCAGCGGGTGCACGTGCGGGACCTCACGTGACAGACCGCCGGGCCCCAGCGCCGACAGTCGGCGCTTGTGGGTCAACCCGACAGCGG	Синтетическая мишень		
16	L11801	TB <i>rpoB</i> SW RS mut	GGCACATCCGGCCGTAGTGCAGCGGGTGCACGTGCGGGACCTCCAGCCCGGCACGCTCACGTGACAGACCGCCGGGCCCCAGCGCCAACAGTCGGCGCTTGTGGGTCAACCCGACAGCGGGTGT	Синтетическая мишень		
17	L12721	<i>katG</i> SW wt v2	GAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGCGCTGGAAGAGCTCGTATGGTAAGGACGCGATCACAGCGGCATCGAGGTCGTATG	Синтетическая мишень		
18	L12560	<i>katG</i> 315 ACC target	GAACCCGAGGCTGCTCCGCTGGAGCAGATGGGCTTGCGCTGGAAGAGCTCGTATGGCACCGGAACGGTAAAGACCGCATCACACCGCATCGAGGTCGTATGGAC	Синтетическая мишень		

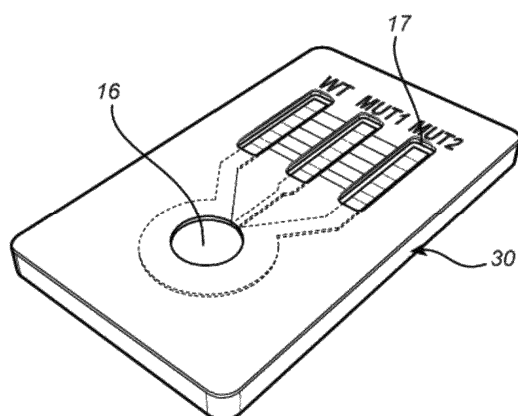
Фиг. 4b



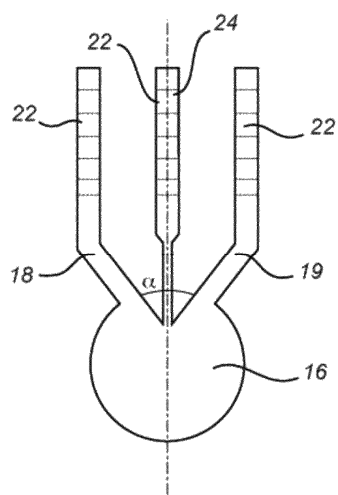
Фиг. 5а



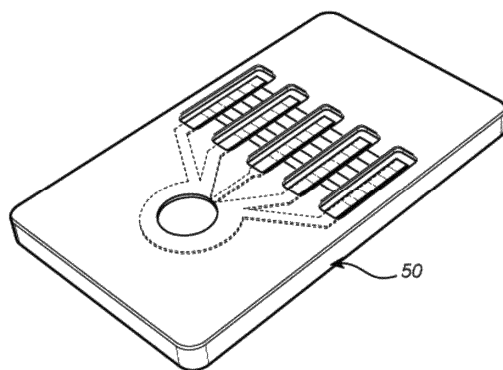
Фиг. 5b



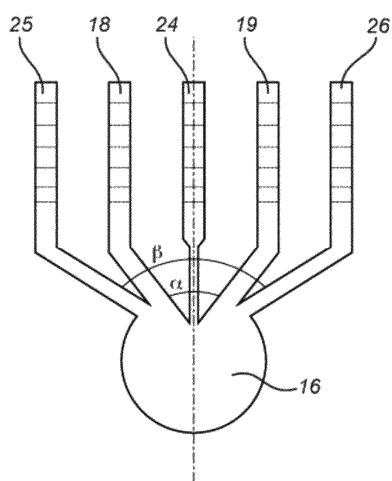
Фиг. 6a



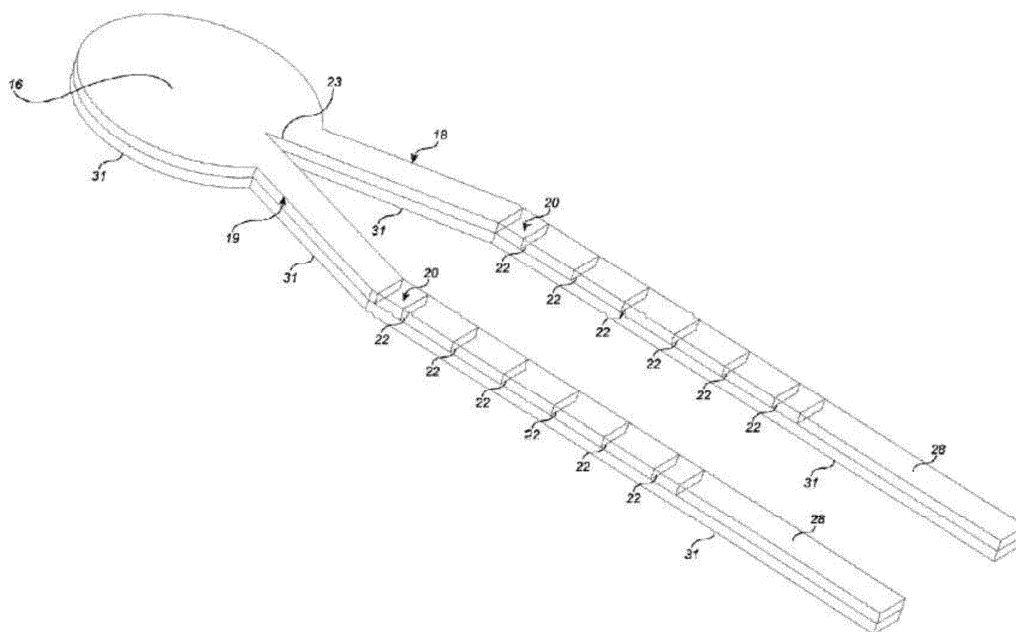
Фиг. 6b



Фиг. 7a



Фиг. 7b



Фиг. 8



Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2