



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00761

(22) Data de depozit: 28/09/2017

(41) Data publicării cererii:
29/03/2019 BOPI nr. 3/2019

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE
"CANTACUZINO",
SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR.103,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• CENTRUL DE CERCETARI ȘTIINȚIFICE
MEDICO-MILITARE,
STR. GRIGORE COBĂLCESCU, NR.24-28,
SECTOR1, BUCUREȘTI, RO;
• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE
AGRONOMICE ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ
DIN BUCUREȘTI, BD.MĂRĂȘTI NR.59,
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• NOVAINTERMED SRL,
STR. CEAIKOVSKI, NR.7, SC.2, ET.1,
AP.18, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• VLADIMIRESCU ALEXANDRU FILIP,
STR.GHEORGHE POP DE BĂSEȘTI,
NR. 42, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• NICOLESCU GABRIELA,
STR. BABA NOVAC, NR. 22, BL. 24C, SC.A,
ET.7, AP.29, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• PURCAREA - CIULACU VALERIA,
STR. RĂDIȚEI, NR. 20, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• NECȘULESCU MARIUS,
STR. DR. CAROL DAVILA, NR.44, AP.1,
SECT.5, BUCUREȘTI, B, RO;

• DUMITRESCU VICTORIA GABRIELA,
ALE. ZORELELOR, NR. 2A, BL.M14, SC.2,
ET.7, AP.113, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• POPESCU DIANA MIHAELA,
STR. CORMORANULUI, NR.23,
PANTELIMON, IF, RO;
• IONESCU LUCIA ELENA,
BDULION MIHALACHE, NR. 323, BL.20,
SC.A, ET.1, AP.7, SECT.1, BUCUREȘTI, B,
RO;
• BICHERU SIMONA NICOLETA,
ALE. APOSTOL MĂRGĂRIT NR.1, BL.106,
SC.1, ET.1, AP.20, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BĂRĂITĂREANU STELIAN,
DRM. VALEA DANULUI, NR 42, AP.10,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• DANEȘ DOINA, SPL.INDEPENDENȚEI,
NR.332, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• ISCULESCU EMILIA,
STR. EPISCOPUL ILARION, NR.4, AP.1,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• GEORGESCU ANA MARIA,
STR. VALEA CĂLUGĂREASCĂ, NR.8, BL.7,
SC. E, ET.3, AP.71, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• GAVRILA ALEXANDRA,
STR. AMURGULUI, NR.2 E, VILA C3,
POPEȘTI-LEORDENI, IF, RO

(74) Mandatar:
STRENC SOLUTIONS FOR INNOVATION
S.R.L., STR.LUJERULUI NR.6, BL.100,
SC.B, ET.3, AP.56, SECTOR 6, BUCUREȘTI

(54) **KIT DE REACTIVI PENTRU DETECȚIA MOLECULARĂ
DE AGENȚI VIRALI (VIRUSUL ENCEFALITEI DE CĂPUȘE
TBEV ȘI FEBRA HEMORAGICĂ CRIMEEA- CONGO-CCHFV)
ȘI BACTERIENI (FRANCISELLA TULARENSIS ȘI BORRELIA
BURGDORFERI SL.) TRANSMIȘI DE CĂPUȘE (IXODOIDEA)
LA OM ȘI ANIMALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un kit de reactivi pentru detecția moleculară de agenți virali și bacterieni transmiși de căpușe la om și animale. Kit-ul conform invenției detectează rapid, simultan, calitativ și cantitativ prezența genomurilor de *Borrelia burgdorferi s.l.*, *Francisella tularensis*, virusul encefalitei de căpușă TBEV și virusul febrei hemoragice Crimeea-Congo CCHFV din aceeași probă biologică, fiind constituit din 10 tuburi care conțin: un amestec gata de folosință, de primeri și sonde moleculare pentru detecția celor 4 patogeni, aflați într-o

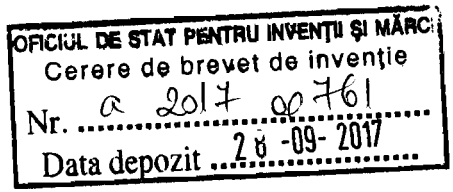
combinație optimă de reacție; un control intern de reacție, conținând primerii și sonda caracteristică; controale pozitive pentru toți patogenii țintă, exprimate în număr de echivalenți genomici/ml, inclusiv pentru controlul intern de reacție, kit-ul fiind utilizat pentru 13 platforme real-time PCR comerciale, în sistem singleplex sau multiplex.

Revendicări: 4
Figuri: 6

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



110



1

Kit de reactivi pentru detecția moleculară de agenți virali (Virusul Encefalitei de Căpușe-TBEV și Febra Hemoragică Crimeea-Congo- CCHFV) și bacterieni (*Francisella tularensis* și *Borrelia burgdorferi sl.*) transmiși de căpușe (Ixodoidea) la om și animale

Prezenta invenție are ca obiect realizarea și utilizarea pentru diagnosticul *in vitro* și respectiv în domeniul cercetării științifice, a unui kit de reactivi pentru detecția moleculară a patru agenți virali și bacterieni transmiși de căpușe la om și animale.

Un studiu inițiat de ECDC în 2008 arată importanța bolilor transmise de vectori și necesitatea pregătirii răspunsului în fața amenințării ce o reprezintă aceste boli: boala Lyme, tularemia, encefalita de căpușe și febra hemoragică Crimeea-Congo. Invenția este destinată detecției și identificării rapide a prezenței celor mai importanți patogeni transmiși de căpușe, cunoscută fiind importanța bolilor transmise de vectori și necesitatea pregătirii răspunsului în fața amenințării ce o reprezintă aceste boli: boala Lyme, tularemia, encefalita de căpușe și febra hemoragică Crimeea-Congo.

Soluția tehnică, ce constituie obiectul invenției, oferă o posibilitate unică de a ne pregăti în fața unui atac cu agenți biologici, dar se adresează, în același timp și organizațiilor și oamenilor de știință implicați în supravegherea operațională a vectorilor de importanță medicală. Acest lucru este posibil prin combinarea cunoștințelor de ultimă oră din domeniu și s-a concretizat în realizarea unui kit de detecție (a acizilor nucleici aparținând organismelor țintă) bazat pe o nouă concepție. Kit-ul – este menit să amplifice acizi nucleici *in vitro* prin PCR pentru detecția calitativă și cantitativă a prezenței genomurilor de *Borrelia burgdorferi s.l.*, *Francisella tularensis*, virusul encefalitei de căpușă (TBEv), și virusul febrei hemoragice Crimeea-Congo (CCHFv) în probe biologice diferite (căpușe-vector, sânge, lichid cefalo-rahidian, țesuturi animale-rezervor) prin tehnica Real-Time, folosind sonde moleculare de hibridizare marcate fluorescent.

Esența invenției din structura kit-ului este folosirea tehnicilor de biologie moleculară care au o gamă largă de utilizări în operațiunile de supraveghere țintită, controlul bolilor transmise de vectori și planurile naționale de securitate, management și planning. Acest kit stă la dispoziția cercetătorilor din diferite domenii și permite analiza probelor biologice de origine diferită într-o

STREANU ALEXANDRU

manieră convenabilă-unitară, crescând astfel eficiența studiilor de screening și supraveghere a bolilor transmise de căpușe.

În acest mod, kitul va contribui semnificativ la programele de securitate națională și menținerea stării de sănătate a populației țării noastre prin generarea unei unelte rapide de detecție a acestor patogeni deosebiți de periculoși.

Se cunoaște că una dintre cele mai ieftine și mai distructive arme disponibile teroriștilor de astăzi este utilizarea artropodelor ca vectori, deseori ignorate în controalele de rutină, pentru agenți patogeni extrem de periculoși. Războiul entomologic implică artropode-vectoare folosite direct în atacuri asupra oamenilor, acestea prin înțepături/mușcături transmițând agenții patogeni în populația umană (Sarkar, 2010).

Impactul devastator al bolilor transmise de vectori este bine documentat în literatura științifică. Artropodele reprezintă vectori periculoși și pot fi utilizați ca agenți de luptă ce pot fi ușor strecurați peste granițe, se pot autoreproduce rapid în cantități uriașe și pot răspândi boli în marșul lor neobosit. De aceea, programele de siguranță națională iau în considerație emergența vectorilor, precum și emergența bolilor pe care aceștia pot să le transmită ca potențiale amenințări de bioterorism. Mai mult, schimbările climatice afectează profund sănătatea umană și modifică distribuția cunoscută a vectorilor și a bolilor transmise de aceștia la om și animale. Astfel, se estimează că perioada de activitate a unor vectori (inclusiv căpușele) se prelungește, fapt ce potențează folosirea unor astfel de agenți într-un atac bioterorist. De asemenea, căpușele (ixodidele) sunt considerate deosebit de importante pentru medicina veterinară și pentru sănătatea umană fiind implicate în transmiterea unor boli emergente sau în transmiterea unor microorganisme și particule virale folosite drept arme biologice (*CCHFv*, *Francisella tularensis* și *TBEv*).

În funcție de rată de transmitere, doza infectantă, impactul economic cauzat și disponibilitatea vaccinurilor, encefalita de căpușe (*TBE*) și febra hemoragică Crimeea-Congo (*CCHFv*) au fost clasificate de către Centrul de Control al Bolilor Transmisibile (CDC-Atlanta-SUA) și de către NIAID (Național Institute of Allergy and Infectious Diseases) în categoria C, în timp ce *Francisella tularensis* a fost clasificată ca agent de biosecuritate tip A. Aceste categorii descriu agenți biologici de risc foarte mare pentru populația umană și care constituie adevărate arme biologice, ce pot fi utilizate și într-un atac bioterorist. Vectorii (căpușele) acestor patogeni se află în mod natural pe întreg teritoriul României (specia *Ixodes ricinus*) sau în partea de sud-est a țării (specia *Hyalomma marginatum*-vectorul principal pentru *CCHFv*). Dacă prezența patogenilor *B.*

burgdorferi s.l., TBEv și *F. tularensis* a fost confirmată în România, atât în probe biologice de la animale cât și de la oameni, prezența CCHFv a fost semnalată o singură dată (2009) la animale și numai prin tehnica ELISA.

Desfășurarea de trupe militare în zone unde CCHFv, TBEv, *B. burgdorferi* și *F. tularensis* sunt prezente, implică riscul ca soldații să fie direct expuși prin natura exercițiilor și a misiunilor efectuate (operațiuni la mare distanță de bazele de origine, acțiuni de comando, condiții vitrege de supraviețuire, etc) și/sau prin intermediul vectorilor (căpușelor) la atacul acestor agenți biologici.

Febra hemoragică Crimeea – Congo (CCHF) este o boală cu manifestare acută fiind o zoonoză virală care se transmite prin contact direct cu sângele și țesuturile gazdelor animale sau umane viremice. În Europa, CCHF este considerată o boală endemică în țări apropiate sau vecine cu România, precum: Bulgaria, Ucraina și regiunea Kosovo.

În România, geoclimatul și condițiile ecologice permit menținerea circulației TBEv în focare naturale, situație confirmată și de epidemia din 1999. Circulația arbovirusurilor în România este documentată încă din anii 50 prin analize serologice efectuate la oameni și animale. Boala Lyme sau borelioza produsă de bacteria *Borrelia burgdorferi* s.l. este considerată cea mai comună și importantă boală transmisă de căpușe la om din emisfera nordică și din Europa. În România, prevalența acestui patogen în vector (*Ixodes ricinus*) este de aprox 20%. (Coipan & Vladimirescu, 2010, 2011) Înainte de 2005, CDC-Atlanta SUA considera și *B. burgdorferi* agent biologic de amenințare.

Francisella tularensis reprezintă un agent patogen mai problematic, acesta având două subtipuri: A și B, care sunt implicate în producerea epidemiilor de tularemie la om și sunt asociate cu surse diverse: mâncare și apă contaminată, bacterii aerosolizate în timpul activităților agricole sau de zootehnie, manevrarea și jupuirea de lagomorfe, mușcătura/înțepătura de căpușe, dar și alte artropode, pescuitul și consumul racilor.

Sunt cunoscute în literatură lucrări științifice având teme apropiate de obiectul invenției, cele mai interesate fiind publicate în S.U.A. și Germania.

Analiza datelor obținute privind metodele moleculare folosite pentru cei 4 agenți patogeni a arătat clar că tendința este aproape echilibrată între folosirea Revers-Transcrierii PCR (33%) și a tehnicii Real-Time PCR (31%), restul metodelor având o semnificație mai redusă, excepție metodele bazate pe secvențiere.

Din analiza datelor obținute s-a concluzionat că cele mai folosite metode de detecție prin sonde moleculare prin Real-Time PCR a celor 4 agenți patogeni ce fac obiectul de studiu al kit-ului nostru, au fost cele bazate pe tehnologia TaqMan[®], restul de tehnici având o pondere foarte redusă. TaqMan[®] reprezintă sonde moleculare DNA hidrolizabile în prezența enzimei termostabile TaqPolimeraza (prin activitatea exonucleazică). Sondele de acest tip asigură o specificitate sporită pentru ca semnalul fluorescent este atribuit doar amplificării specifice a regiunii genomice țintă pentru care au fost destinate nu datorat unor amplificări nespecifice (Wilhelm et al., 2003).

Studiul bibliografic a relevat și faptul că în cazul tehnicilor Real-Time PCR utilizate pentru detecția celor 4 agenți patogeni vizați de kit-ul nostru, cele mai folosite marcaje pentru sondele moleculare au fost cu FAM[™] (6-Carboxi-fluoresceina) în 56% din cazuri, TAMRA[™] (Tetra-metil-rodamina) în 21% din cazuri și ROX[™] (Rodamina X sau R101) în 5% din situații.

În sistemul Real-Time PCR, produșii de amplificare/ampliconii sunt detectați direct (fără electroforeză), cu ajutorul sondelor moleculare marcate fluorescent ce se cuplează de țintă în timpul amplificării. Metoda Real-Time PCR permite monitorizarea creșterii intensității fluorescenței în timp real pentru amplificarea DNA-ului, în așa fel încât detecția și acumularea ampliconilor se face direct în tubul de reacție închis (diminuându-se astfel riscul de contaminare a operatorului și a mediului ambiant, dar și a mediului de reacție).

Identificarea rapidă și precisă a acestor agenți biologici de amenințare în mediul ambiant și în probe biologice este un element cheie a oricărei strategii de apărare. Până acum, detecția și identificarea bazată pe tehnica Real-Time PCR s-a dovedit extrem de eficientă în analiza agenților biologici de luptă, datorită rapidității, sensibilității, reproductibilității și a reducerii erorilor datorate operatorului uman. PCR reprezintă astăzi o metodă directă de detecție a infecțiilor cauzate de *B. burgdorferi* la animalele rezorvor, animalele infectate experimental, dar și în cazurile clinice-umane sau pentru a pune în evidență bacteria în vectori (căpușe). Metodele bazate pe PCR pentru detecția DNA-ului de *B. burgdorferi* în diferite probe include: PCR clasic, nested PCR, PCR competitiv și desigur, Real-Time PCR (Wang et al., 2010). Metoda Real-Time PCR a fost utilizată pentru detecția, cuantificarea și genotiparea tulpinilor de *B. burgdorferi* atât în căpușe, cât și la pacienți (Wang et al., 2010).

Sensibilitatea izolării DNA din diferite surse a fost comparată atât în varianta manuală, cât și automată tot prin această tehnică. Cu toate acestea, s-au folosit un număr restrâns de gene țintă

pentru amplificarea prin Real-Time PCR (ex: *ospA*, *rrs*, *hbb*, *recA*), iar mărimea produsului de amplificare (ampliconului) a fost de 100-200 pb, în comparație cu cele generate prin PCR-ul clasic. Sensibilitatea și specificitatea, precum și reproductibilitatea metodelor Real-Time PCR, incluzând și Real-Time cantitativ (quantitative qPCR), pot fi afectate de o multitudine de factori, precum proprietățile primerilor și sondelor moleculare alese, calitatea ADN-ului extras, tipul de marcaj fluorescent folosit (agent de intercalare SYBR Green sau sonde de hibridizare), precum și de condițiile de amplificare (Wang et al., 2010).

Până acum au fost realizate studii de identificare a genospeciilor de *B. burgdorferi s.l.* în căpușe provenite din diferite localități ale țării, prin metoda PCR-RLB (Coipan & Vladimirescu, 2010, 2011). Rezultatele publicate au fost reconfirmate și prin Real-Time PCR pentru căpușele analizate provenite din Jud.Tulcea (Vladimirescu et al., 2011).

Prezența unor simbioți *Francisella*-like aflați în diferite specii de căpușe ce transmit tularemia, complică și mai mult intenția de identificare a *F. tularensis* via PCR (Kugeler et al., 2005).

Pentru cele mai numeroase bacterii, cea mai folosită genă pentru identificare și studii filogenetice este cea pentru 16S RNA (Scoles et al., 2004 citat de Kugeler et al., 2005). Având un grad foarte mare de similaritate, secvențele genelor pentru 16S RNA provenite de la câteva alte organisme decât *Francisella*, au fost clasificate ca aparținând familiei *Francisellaceae*, acestea incluzând și bacteriile intracelulare *Wolbachia persica* și alte bacterii *Francisella*-like care nu transmit boala. Astfel, a fost dezvoltată o strategie de utilizare a unor gene specifice pentru *Francisella* și care prezintă un înalt grad de conservare. Un exemplu îl constituie secvențele genomice *ISFtu2*, *tul4* și *iglC19*, din care *ISFtu2* este o secvență de inserție (element genetic mobil), gena *tul4* codifică o proteină din membrană externă, iar *iglC19* este exprimată abundant în timpul infecției macrofagelor (Kugeler et al., 2005). Pe baza acestor secvențe au fost concepute protocoale de detecție Real-Time PCR folosind sonde moleculare tip TaqMan® în sistem multiplex în așa fel încât, dacă se obțin semnale pozitive pentru toate cele 3 gene, atunci este identificată *F. tularensis* în proba de analizat (Versage et al., 2003). Aceeași metodă poate fi utilizată și prin PCR clasic, urmat de detecția ampliconilor prin electroforeză în gel de agaroză, dar sensibilitatea și viteza de detecție sunt mult diminuate comparativ cu Real-Time PCR (Versage et al., 2003).

Până acum, cea mai rapidă și sensibilă metodă de detecție și identificare a *TBEv* este bazată pe revers-transcrierea urmată de PCR a unei regiuni genomice netranslate (3'UnTranslated Region sau UTR). Această metodă este des întâlnită în practica cercetării, dar și a supravegherii în

laborator și a fost descrisă de Schwaiger & Cassinotti (2003). Alte metode descrise în literatură se focusează pe gene pentru anvelopă (E) sau pentru proteine ne-structurale (NS) din structura genomică a acestor flavivirusuri.

Momentan, cea mai rapidă și sensibilă analiză pentru detecția *CCHFv* se bazează pe revers-transcriere urmată de PCR, chiar și în stadiile incipiente ale infecției cu acest virus.

Oricum, cele mai multe metode bazate pe revers-transcriere sunt consumatoare de timp (4-8 ore) și includ două etape: una de sinteză a cDNA, urmată de PCR clasic și electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produșilor de amplificare. Există și unele variante prin folosirea unui nested PCR sau analize suplimentare de hibridizare tip Southern-blotting. Toate aceste metode însă implică manipulări multiple ale probelor, crescând astfel riscul de contaminare și de afectare negativă a rezultatului final al analizei. Spre deosebire de acestea, metodele bazate exclusiv pe Real-Time PCR surmontează toate aceste neajunsuri și, în plus, permit lucrul cu un volum mare de probe, fapt ce le face foarte des utilizate în practica curentă de detecție și identificare a genelor (Yapar et al., 2005).

Cea mai folosită regiune genomică de la *CCHFv* este cea S (mică/small) ce codifică nucleoproteinele N și NS. Bazându-se pe secvența regiunii S, Wölfel et al. (2007) au descris o metodă Real-Time pentru detecția tuturor tulpinilor virulente de *CCHFv* circulante.

În prezent există mai multe abordări similare dar nu identice cu reactivii și metoda de lucru propusă de noi.

Astfel, Departamentul pentru Apărare al armatei SUA a realizat un dispozitiv portabil care permite detecția simultană a 3 agenți patogeni transmiși prin înțepătura/mușcătura de căpușă și anume: *TBEV*, *CCHFV* și *Rickettsia* considerate cele mai importante din punct de vedere militar de către armata americană. Metoda se bazează pe principiul detecției multiplex a majorității serotipurilor și tulpini aparținând celor 3 agenți patogeni, într-un timp scurt (<30 min) în unul sau doi pași folosind reactivi deosebit de stabili (stocare la 35°C pentru 2 ani). Metoda are o specificitate cel puțin de 80% comparativ cu metoda „golden standard” și anume Real-Time PCR sau ELISA și necesită numai volume de sub 100μl de probă. Deasemenea metoda are avantajul să fie ușor de operat de către soldați (soldier-friendly), ieftină, portabilă și stabilă la căldură. În comparație cu kit-ul invenției, soluția găsită de Departamentul de Apărare al SUA are doar 3 agenți din care de importanță pentru spațiul nostru se regăsesc doar *CCHFV* și *TBEV*, speciile de *Rickettsia* care produc boli grave la om precum tifosul cu transmitere inclusiv prin

păduchi sunt importante din punct de vedere epidemiologic, dar nu pot fi ușor transformate în arme biologice așa cum ar fi utilizarea *Francisellei tularensis*. În plus, kit-ul nostru permite și detecția *B.burgdorferi s.l.* care poate produce îmbolnăvire cu manifestare criptică ce generează disfuncționalități motrice și neurologice în timp.

Amplisens® CCHFV-FRT PCR Kit (Amplisens-Rusia) este un kit de detecție moleculară prin Real-Time-PCR dedicat identificării și cuantificării CCHFV, având o limită de detecție de 5×10^3 copii genomice/ml. Dezavantajul este că permite detecția unui singur agent din cei 4 pe care kit-ul prezentat aici îi identifică și poate fi utilizat numai pe 4 platforme real-time PCR comerciale comparativ cu 13 câte poate utiliza invenția de față.

RealStar CCHFV RT-PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics) este un kit de detecție moleculară prin Real-Time PCR - folosind canalul FAM™ ptr probe și JOE™ (este denumirea comercială a compusului chimic 6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluoresceina) pentru controlul pozitiv. Kit dedicat identificării și cuantificării CCHFV având o limită de detecție de 14,2 copii genomice/μl. Dezavantajul este că permite detecția unui singur agent din cei 4 pe care kit-ul prezentat aici îi identifică și poate fi utilizat numai pe 8 platforme real-time PCR comerciale comparativ cu 13 câte poate utiliza invenția de față.

FTD CCHFV (Fast-Track Diagnostics) este un kit de detecție moleculară prin Real-Time PCR folosind canalul verde (FAM) și oranj (JOE) pentru probe și controlul pozitiv. Acesta este un kit dedicat identificării și cuantificării CCHFV având o limită de detecție de 10^2 copii genomice/ml. Dezavantajul este că permite detecția unui singur agent din cei 4 pe care kit-ul prezentat îi identifică și poate fi utilizat numai pe 6 platforme real-time PCR comerciale comparativ cu 13 câte poate utiliza invenția de față.

TaqMan® Francisella tularensis Detection Kit (Applied Biosystems) este un kit de detectie moleculară prin Real-Time PCR dedicat identificării *F. tularensis* având detecția probelor pe canalul FAM și cea a controlului intern pe VIC® (este un fluorocrom dezvoltat și deținut sub aspectul drepturilor de proprietate intelectuală de către ABI/Lifetech având formula chimică protejată). Dezavantajul este că permite detecția unui singur agent din cei 4 pe care kit-ul prezentat îi identifică și poate fi utilizat numai pe 2 platforme real-time PCR comerciale comparativ cu 13 câte poate utiliza invenția de față.

ViPrimer PLUS Francisella tularensis qPCR Kit (Vivantis) este un kit de detecție moleculară bazat pe Real-Time PCR dedicat identificării și cuantificării *F. tularensis* având detecția probelor pe canalul FAM, iar cel pentru controlul pozitiv pe VIC/HEX având o limită de detecție de 10-100 copii genom/reacție. Dezavantajul este că acest kit permite detecția unui singur agent din cei 4 pe care kit-ul prezentat îi identifică. Dar are avantajul că poate fi utilizat pe majoritatea platforme real-time PCR comerciale comparativ cu 13 câte poate utiliza kit-ul inventat.

Tick Borne Encephalitis Virus (*TBEV*) Real Time RT-PCR Kit (Liferiver) este un kit de detecție real-time PCR dedicat pentru identificarea și cuantificarea *TBEV* unde probele sunt analizate pe canalul FAM, iar controalele pozitive pe canalele HEX, VIC și JOE. Limită de detectivitate este de 10^3 copii genomice/ml. Dezavantajul este că permite detecția unui singur agent din cei 4 pe care kit-ul conform invenției îi identifică. Dar are avantajul că poate fi utilizat 16 platforme real-time PCR comerciale comparativ cu 13 câte poate utiliza kit-ul inventat.

Sunt astfel cunoscute numeroase kit-uri comerciale pentru identificarea fiecărui patogen în parte, sau grupați câte 3 (ex.: AmpliSens® *TBEV*, *B. burgdorferi* și *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FRT PCR kit, de la InterLab Service) dar nu și pentru toți cei 4 agenți biologici ce fac obiectul acestui proiect. Sunt însă și kit-uri ce nu sunt comerciale pentru detecția simultană a 4 agenți biologici, dar nu cei din studiul propus de noi (ex. B-Tplex kit, pentru detecția *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis*, și *Variola major*, produs de Prodesse/Socochim). AmpliSens® *TBEV*, *B. burgdorferi* și *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FRT PCR kit (Amplisens-Rusia) este un kit de detecție real-time PCR în sistem multiplex ce asigură simultan detecția a 5 agenți patogeni folosind canalele pentru probe FAM, JOE/HEX și ROX având ca limită de detecție 5×10^3 echivalenți genomici/ml. Dezavantajul este că permite detecția a 2 agenți din cei 4 pe care kit-ul conform prezentei invenției îi identifică și poate fi utilizat numai pe 6 platforme real-time PCR comerciale comparativ cu 13 câte poate utiliza kit-ul de față.

Se cunoaște de asemenea brevetul CN105936945 (A) - Multiplex reverse transcription PCR kit for detecting four respiratory viruses, publicat la 14.09.2016, în care se solicită brevetarea unui kit care poate detecta în paralel infecția provocată de patru virusuri respiratorii la copii (RSV, INF, HMPV, ADV). Kitul se compune dintr-un co-extract acid nucleic, un lichid de reacție quadruplu RT-qPCR, control de calitate negativ, puternic pozitiv și respectiv slab pozitiv și cinci standarde cantitative pozitive de concentrații diferite. Deși realizează detecția concomitentă a

infecției provocată de patru virusuri, kitul respectiv prezintă dezavantajul că cele patru virusuri nu sunt transmise de căpușe și nu sunt suficiente date care să permită utilizarea lor într-un atac cu armă biologică.

În concluzie, kit-urile cunoscute pentru detecția de patogeni transmiși de căpușe se adresează la cel mult la 2 agenți patogeni dintre cei pe invenția de față îi poate detecta. Presupunând că investigatorul ar dori să urmărească în paralel prevalența celor 4 patogeni, acesta ar fi nevoit să folosească 4 kit-uri distincte. În plus, kit-ul pe care o să-l propunem conține toate componentele pentru amplificarea și detecția celor 4 patogeni prin Real-Time. Acest kit va fi astfel conceput încât să se poată utiliza și armoniza cu majoritatea kit-urilor comerciale destinate sintezei de cDNA (cu primeri random, hexamerici) și cu kit-urile de izolare de RNA/DNA total din diferite probe biologice de diferite origini.

Problema tehnică rezolvată de prezenta invenție constă în detecția simultană a patogenilor *Borrelia burgdorferi s.l.*, *Francisella tularensis*, TBEv și CCHFv folosind platforme obișnuite de Real-Time PCR, care să permită folosirea kit-ului de cât mai mulți utilizatori, crescând astfel nivelul de pregătire pentru securizarea operațiilor militare și sau în eventuala utilizare a acestor agenți (CCHFV, TBEV, *Francisella tularensis*) într-un atac bioterorist și în fața bolilor emergente transmise de căpușe.

Soluția tehnică ce constituie obiectul invenției urmărește dezvoltarea unor metode Real-Time PCR de detecție, ce vor fi grupate într-un singur kit, menit să detecteze 4 dintre cei mai importanți agenți patogeni transmiși de căpușe. Cei 4 patogeni vor fi detectați simultan (chiar dacă genomurile lor sunt heterogene, unii patogeni cu genom RNA, alții cu genom DNA) din aceeași probă biologică.

Invenția se bazează pe tehnologia Real-Time PCR (RT-PCR) care se realizează prin amplificarea unor segmente genice de RNA reverstranscris în cDNA și/sau DNA aflate în structura agenților virali și bacterieni antemenționați în prezența unor secvențe monocatenare de nucleotide (denumite primeri) și a unui mediu de reacție care să susțină polimerizarea *in vitro* a DNA-ului (soluție tampon, dNTP mix) în prezența unei DNA- polimeraze termostabile (ex. Taq polimeraza cu activitate exonucleazică). Producții de amplificare (ampliconii, cu dimensiuni cuprinse între 60-180pb) au fost evidențiați pe măsura ce se formau (în timp real) prin cuplajul pe bază de omologie cu sonde moleculare DNA hidrolizabile (tehnologie TaqMan[®]) marcate fluorescent, diferit, corespunzătoare unei game de canale de detecție cât mai largă din structura

termociclerelor aflate momentan în producția de serie, datele obținute fiind comparate cu rezultate generate prin folosirea unor controale pozitive, câte unul pentru fiecare agent detectat. Controalele pozitive constau din segmente de DNA, fragmente de gene amplificate prin PCR (ampliconi), care nu pun probleme legate de cuantificare, condiționare și manipulare. Față de alte sisteme similare dar nu identice, soluția tehnică ce constituie obiectul invenției folosește pentru prima dată asocierea celor 4 metode de detecție a celor 4 agenți biologici într-un singur kit.

Asocierea celor 4 agenți se poate face grupat câte doi în funcție de tipul de genom: agenți cu genom RNA (virusurile CCHF și TBE) și agenți cu genom DNA (bacteriile *F. tularensis* și *B. burgdorferi s.l.*).

Detecția prin real-time PCR a celor 4 agenți se realizează cu o combinație nouă de sonde moleculare marcate după cum urmează. Pentru bacterii, la capătul 5' al moleculei de DNA se află câte o moleculă de FAMTM/TETTM având drept moleculă quencer la capătul 3' MGB-NFQ (Minor Groove Binding- Non Fluorescent Quencer), iar pentru virusuri aceeași combinație, iar pentru controlul intern de reacție (CI) la capătul 5'-Cy5TM, iar la capătul 3'- BHQ[®] 2 (Black Hole Quencer).

Condițiile de incubare ale probei biologice în termociclerul real-time se face cu același program de amplificare (10 sec la 95 °C, 40 sec. la 60 °C; secvența repetată de 45 de ori) atât pentru amestecul de reacție viral cât și pentru cel bacterian. Astfel, din aceeași probă biologică se poate testa simultan (în același timp) pe aceeași platformă real time PCR în tuburi diferite toți cei 4 agenți + Controlul intern folosind aceleași coditii de termociclare.

Marcarea cu fluorocromii sus-amintiți permite folosirea kit-ului pe un număr mare de platforme real-time conform Tabel 1.

Dozajul, limitele de detecție, curbele de calibrare sunt proprii acestui kit.

| Model termocicler si Producatorul | Canal detectie 1 | Canal detectie 2 | Canal Detectie 3 | Canal Detectie 4 | Canal Detectie 5 | Canal Detectie 6 | Canal Detectie 7 |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Rotor-Gene Q 5plex | FAM | TET | - | Cy5 | - | - | - |

| | | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| (QIAGEN) | | | | | | | |
| Rotor –Gene Q 5plex HRM (QIAGEN) | FAM | TET | - | Cy5 | - | - | - |
| Rotor-Gene Q 6plex (QIAGEN) | - | FAM | TET | - | Cy5 | - | - |
| LC 480 (Roche Applied Science) | FAM | TET | - | - | - | Cy5 | - |
| MX3000P (Stratagene/ Agilent Technologies) | FAM | TET | - | - | - | - | Cy5 |
| MX3005P (Stratagene/ Agilent Technologies) | FAM | TET | - | - | - | - | Cy5 |
| MX4000 (Stratagene/ Agilent Technologies) | FAM | TET | - | - | - | - | Cy5 |
| SmartCycler (Cepheid) | FAM | TET | - | Cy5 | - | - | - |
| Chromo4 (Bio- Rad Laboratories) | FAM | TET | - | Cy5 | - | - | - |
| iCycleriQ (Bio-Rad Laboratories) | FAM | TET | - | Cy5 | - | - | - |
| ICycleriQ5 | FAM | TET | - | - | Cy5 | - | - |

| | | | | | | | |
|-------------------------------|-----|-----|---|-----|---|---|---|
| (Bio-Rad Laboratories) | | | | | | | |
| CFX96 (Bio-Rad Laboratories) | FAM | TET | - | Cy5 | - | - | - |
| CFX 384(Bio-Rad Laboratories) | FAM | TET | - | Cy5 | - | - | - |

Tabel 1. Termociclerele și canalele de detecție care permit utilizarea kit-ului nostru în sistem multiplex (2 agenți simultan + CI) sau singleplex (4 agenți simultan + CI).

În continuare, se dă un exemplu de realizare în legătură și cu figurile 1..5 care prezintă:

Fig.1 – Amplificare PCR pentru *Borrelia burgdorferi s.l.* (ampliconi 174 pb). Electroforeză în gel de agaroză LMP (low melting point) 2 %; Marker greutate moleculară 100pb; ampliconi în diferite concentrații

Fig.2- Amplificare PCR pentru *Francisella tularensis* – IS Ft2 (ampliconi 97 pb). Electroforeză în gel de agaroză LMP (low melting point) 2 %; Marker greutate moleculară 100pb;

Fig.3- Amplificare PCR pentru CCHFV S cDNA fragment (ampliconi 122 pb); Electroforeză în gel de agaroză LMP (low melting point) 2 %; Marker greutate moleculară 100pb; ampliconi în diferite concentrații

Fig. 4- Amplificare PCR pentru TBEV Hypr – 3'UTR (ampliconi 67 pb); Electroforeză în gel de agaroză LMP (low melting point) 2 %; Marker greutate moleculară 100pb; ampliconi în diferite concentrații

Fig.5 – Amplificare PCR pentru IC *Ixodes ricinus* 16S mtDNA – (ampliconi 67 pb); Electroforeză în gel de agaroză LMP (low melting point) 2 %

Fig. 6-Reprezentarea unor amplificări prin Real-Time PCR efectuate cu kit-ul prezentat pe probe pozitive la *B.burgdorferi s.l.* (roșu) și cu controlul pozitiv (verde) pe termociclerul Cepheix 96 (BioRad) în format clasic (A) și în format logaritmic (B).

Soluția tehnică pornește de la asigurarea unor reactivi cheie, specifici cu un dozaj propriu pentru detecția celor 4 agenți biologici transmiși de căpușe (respectiv urmărește amplificarea unor regiuni țintă din genomul acestora) precum și un control de reacție/extracție care permite

confirmarea funcționării componentelor reacției de PCR și/sau realizarea unei extracții reușite de acizi nucleici din căpușe. În continuare o să detaliem elementele constitutive ale soluției:

Secvențele de amorse/primeri utilizate în componența kit-ului sunt caracteristice fiecărui agent patogen în parte, fapt testat prin BLAST de noi și prin preluare din literatură de specialitate. BLAST reprezintă abrevierea de la Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1997) și anume o interfață informatică care permite compararea oricărei secvențe DNA/RNA sau de proteine cu secvențe similare din banca de gene (GenBank) și stabilește procentul de omologie cu acestea.

Regiunile țintă din genomul celor 4 agenți patogeni + CI Pozitiv ce sunt amplificate de kit-ul de față sunt după cum urmează.

Pentru *TBEV*: O metodă destul de răspândită atât pentru *TBEV* cât și pentru alte flavivirusuri o reprezintă amplificarea unei regiuni țintă din capătul 3'-OH al genomului așa numita zonă UTR (UnTranslated Region) destul de bine conservată la aceste virusuri (Thurner et al., 2004). Regiunea genomică înalt conservată care permite amplificarea unor fragmente de 100-200 nucleotide, specifice pentru *TBEV* este capătul terminal 3' UTR (UnTranslated Region). Lungimea acestei regiuni este variabilă, putând fi cuprinsă în intervalul 350 – 700 nucleotide. Această regiune terminală este implicată în o serie de etape esențiale replicării virale, precum formarea unei structuri stem-loop cu regiunea terminală *poly (A)* a RNA viral (Mohan și Padmanabhan, 1991). Regiunile 3'UTR și 5'UTR ale RNA conțin secvențe complementare care produc ciclizare, necesară pentru legarea la enzima NS5 RNA dependent RNA polimeraza și inițierea sintezei catenei RNA negative.

Regiunea 3'UTR este relativ mai lungă decât 5'UTR și prezintă heterogenitate semnificativă la nivelul secvenței nucleotidice. Regiunea 3'UTR conține structuri variabile și structuri conservate responsabile de menținerea viabilității virale (Mandl et al., 1998; Pletnev, 2001). Secvența nucleotidică a regiunii 3'UTR include un motiv pentanucleotidic (GAGAG) (Gritsun et al, 2001; Khromykh et al, 2003; Wengler & Castle, 1986), strict conservat printre toate flavivirusurile. Alte elemente importante sunt reprezentate de caseta homopurinică și homopirimidinică și de secvența responsabilă pentru circularizarea genomului (Khromykh et al, 2001; Kofler et al, 2006; Mandl, 2005; Mandl și colab, 1993; Thurner et al, 2004).

Studiile actuale au arătat că tulpinile *TBEV* pasate pe culturi celulare și/sau creier de șoarece suferă fenomene de deleție și elongație spontane la nivelul regiunii 3'UTR (Mandl et al, 1998;

Hoenninger, 2008) și posibil exacerbare a patogenității în corelație cu mutațiile de la acest nivel (Sakai et al., 2014). Noi am folosit ca țintă de detecție regiunea cuprinsă între 11054-11121nt din genomul *TBEV* (tulpina Neudorf U27495; după Schweiger & Cassinotti, 2003).

Pentru *CCHFV*: Segmentul S (small) are aproximativ 1,7kb și o singură regiune ORF (Open Reading Frame) care codifică proteina N nucleocapsidară (Chinikar et al., 2016) cu greutatea de aproximativ 53 kDa considerată antigen major care induce un răspuns imun puternic la animalele infectate (Garcia et al. 2006). Această proteină joacă un rol în încapsidarea RNA viral, formând complexe ribonucleoproteice. De asemenea, proteina N este implicată în o serie de interacțiuni cu alte molecule, precum RNA viral, polimeraza virală, alte proteine virale și ale celulei gazdă, precum și cu alte molecule de proteina N formând multimeri (Han și Rayner, 2011).

Segmentul S codifică proteina ce alcătuiește nucleocapsida și care este extrem de importantă pentru protecția virusului cât și pentru propagarea acestuia la noi celule. *CCHFv* se bucură de o mare răspândire geografică (în mai mult de 30 țări de pe diferite continente precum Africa, Asia și Europa) având o plasticitate și adaptabilitate genetică remarcabile. Reasortarea unor segmente genomice în timpul co-infecției căpușelor pe vertebrate poate fi o cauză importantă pentru generarea diversității genomice și modificarea potențialului patogen (Bente et al., 2013)

Existența unor așa numeroase tulpini virale inclusiv unele care nu au fost asociate cu o maladie umană, pune probleme serioase atunci când se dorește identificarea *CCHFv* prin metode moleculare în special Real-Time PCR (Yapar, et al.2005 Wolfel et al.; 2007; Atkinson et al.2012). Studiile de filogenie moleculară au arătat ca segmentul genomic S este destul de bine conservat la toate tulpiniile de *CCHFv* izolate și secvențiate. Noi am folosit ca țintă de detecție pentru kit-ul ce constituie obiectul invenției regiunea genomică cuprinsă între 1-122nt din structura regiunii S (Atkinson et al., 2012).

Pentru *Francisella tularensis*: *F.tularensis* coexistă la nivel celular și/sau tisular în organismele vectoare (căpușe) și cu alți endosibionți de origine bacteriană (Kugeler et al., 2005) așa cum este *Wolbachia persica*, acestea determinând ca atenția să fie îndreptată către găsirea de ținte genomice foarte specifice subspeciilor de *Francisella* patogene. Astfel, 3 secvențe genomice au fost investigate de majoritatea cercetătorilor (ISFtu2, tul4 și iglC precum și gena ribozomală 16S). Pentru că în cazul studiului nostru trebuia găsită o genă/regiune genomică țintă care să fie

cât mai specifică organismului patogen ce urmează să fie detectat, dar eventual să se afle și într-un număr mare de copii în genom atunci s-a recurs la secvența ISFtu2.

Secvența ISFtu2 reprezintă o secvență de inserție-like (IS) care se află în mai multe copii în genomul de *F.tularensis* (numărul de copii variind în funcție de tulpina și subtip/subspecie) (Tabel 2)

| Label | From | To | Strand |
|--------|---------|---------|----------|
| isftu2 | 103101 | 103844 | Positive |
| isftu2 | 218947 | 219690 | Negative |
| isftu2 | 323934 | 324677 | Negative |
| isftu2 | 352087 | 352548 | Negative |
| isftu2 | 381347 | 381820 | Positive |
| isftu2 | 383702 | 384445 | Positive |
| isftu2 | 582508 | 583251 | Negative |
| isftu2 | 606904 | 607647 | Negative |
| isftu2 | 753264 | 754007 | Positive |
| isftu2 | 876765 | 877508 | Positive |
| isftu2 | 1121516 | 1122259 | Positive |
| isftu2 | 1286406 | 1286891 | Positive |
| isftu2 | 1370445 | 1371188 | Negative |
| isftu2 | 1483215 | 1483958 | Positive |
| isftu2 | 1516518 | 1517261 | Negative |
| isftu2 | 1576231 | 1576974 | Negative |

Tabel 2 Localizarea celor 16 gene ISFtu2 (insertion sequence-like element) în cromozomul tulpinii *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4

(Secvența de referință a NCBI: AJ749949.2). Sursa: NCBI Web site:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/240248234?report=graph>

În tabelul 3, se face o comparație între tulpini de *F.tularensis* și variația elementelor ISFtu din genom (Larson et al.2015), în care pe linia a 2-a sunt indicate copiile ISFtu2.

| | Tulpini de <i>Francisella tularensis</i> cu genomul secvențiat în GenBank | | | |
|---------------------------|---|----------|-----------|------------|
| Elemente IS A.Ia A.IIa | SCHU S4 | NE061598 | WY96-3418 | WY-00W4114 |

| | | | | |
|----------------------------------|--------|--------|-----------|---------|
| ISFtu1 (IS630) | 47 (3) | 47 (3) | 48 (8) | 48 (8) |
| ISFtu2 (IS5) | 13 (3) | 13 (3) | 18b (18)) | 18b (18 |
| ISFtu3 (ISNCY, ISHpal-IS1016) | 2 (1) | 2 (1) | 1 (3) | 1 (3) |
| ISFtu4 (IS982) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ISFtu5 (IS4) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| ISFtu6 (IS1595) | 1 (1) | 1 (1) | 1 (1) | 1 (1) |
| ISSod13 (IS3) | 1 | 1 | 1 | 1 |
| TOTAL | 66 (8) | 66 (8) | 71(30) | 71 (30) |

Tabel 3 Familiile de secvențe IS prezente în genomurile a 4 tulpini de *F. tularensis* a căror genomuri se află secvențiate în totalitate în banca de gene

Alegerea elementului ISFtu2 (insertion sequence-like element) ca țintă a reacțiilor real-time PCR se datorează în mare măsură creșterii sensibilității acestei reacții ca urmare a prezenței lui în mai multe copii (Tabel 3) în genomul diferitelor specii și subspecii *Francisella* (Thomas et al., 2003):

- 12-17 copii în *F. tularensis* subsp. *tularensis*;
- 26-30 copii în *F. tularensis* subsp. *holarctica*;
- 6-18 copii în *F. tularensis* subsp. *novicida*;
- 1-2 copii în *F. philomiragia*.

Reacția Real-Time PCR ISFtu2 s-a dovedit mult mai sensibilă decât cele care au ținut genele 23 kDa, tul4 și fopA, cu o limită a detecției de un organism atât pentru *F. tularensis* subsp. *tularensis* cât și pentru *F. tularensis* subsp. *holarctica* (Versage et al., 2003). Acești autori au obținut următoarele rezultate:

- lipsa reacțiilor încrucișate cu alte bacterii decât cele incluse în genul *Francisella*;

- detectarea tuturor speciilor *Francisella* în diferite tipuri de probe biologice;
- identificarea de tulpini sălbatice și diferențierea speciilor genului *Francisella* (Versage et al., 2003).

ISFtu2 și gena *iglC* permit diferențierea *F. tularensis* de endosimbionții *Francisella*-like ai căpușelor gazdă, precum *Dermacentor variabilis* și *D. occidentalis* (Kugeler et al., 2005). Alegerea elementului ISFtu2 (insertion sequence-like element) ca țintă a reacțiilor real-time PCR se datorează în mare măsură creșterii sensibilității acestei reacții ca urmare a prezenței lui în mai multe copii în genomul diferitelor specii și subspecii *Francisella* (Thomas et al., 2003). Invenția a folosit ca țintă de detecție pentru kit regiunea genomică între 1853020-1853116 (97pb) de la *F.tularensis subsp. Holarctica* FTNF002-00; NC-009749 în acord cu studiul *in silico* de amplificare prin PCR și conform primerilor descriși de Versage et.al., 2003.

Pentru *Borrelia burgdorferi* s.l.: studiile efectuate de Yang et al. (2012) au demonstrat că metoda nested-PCR care ținea gena cromozomală *fla* (Wallich et al., 1992) este mult mai sensibilă decât variantele nested PCR pentru alte genele cromozomiale, respectiv *rrs* (Wodecka et al., 2010) și *p66* (Rosa și Schwan, 1989). În lumina acestor date, se pare că genele cromozomiale demonstrate a fi înalt conservate (ex. *fla*, *rrs*, *p66*), pot fi extrem de utile la detectarea tuturor izolatelor de *B. burgdorferi* s. l. (Yang et al., 2012).

S-a folosit drept țintă de detecție pentru kit-ul ce constituie obiectul invenției, regiunea genomică cuprinsă între 792-946 pb din genomul de *Borellia burgdorferi* s.l. (după primerii descriși de Schweiger & Cassinotti, 2001).

Componentele kit-ului sunt după cum urmează.

Kit-ul conține 10 tuburi ce conțin toți reactivii specifici pentru detecția și cuantificarea celor 4 agenți + Controlul Intern sub forma de soluții concentrate gata de utilizare (ready for use).

Kit-ul conține în mod obligatoriu următoarele componente:

- (i) un amestec gata de folosință de primeri și sonde moleculare pentru detecția celor 4 patogeni, aflați într-o combinație optimă de reacție,
- (ii) un control intern de reacție ce va conține primerii și sonda caracteristică,
- (iii) controale pozitive pentru toți patogenii țintă (exprimate în număr de echivalenți genomici/ml) inclusiv pentru controlul intern de reacție,

Celelalte elemente esențiale în reacția PCR precum: amestec Real-Time PCR (polimerază termostabilă + tampon + amestec echilibrat de dNTP-uri) și apă extrapură, nu vor face parte din componența kit-ului.

Secvențele primerilor (amorșelor) și a sondelor moleculare precum și caracteristicile lor fizico-chimice calculate *in silico* sunt redată în Tabelul 4.

| DENUMIRE SECVENTA | secventa genica dupa: | Lungime nt. | Tm °C | GC% | Stabilitate la capatul 3' | Cautare in banca de secvente prin BLAST | Sonda molecular a are atasat la capatul 5' | Sonda moleculara are atasat la capatul 3' |
|---|---------------------------------------|----------------|-----------|------|---------------------------------|--|--|---|
| P1 Forward CCHFV S segment | Atkinson et al.2012 | 19 | 57,4 | 47,4 | 9,4 ΔG | 38,2 / 100% omologie cu gena tinta | x | x |
| P2 Reverse CCHFV S segment | Atkinson et al.2012 | 21 | 55,7 | 38,1 | 8,2 ΔG | 42,1/1005 omologie cu gena tinta | x | x |
| S CCHFV S segment | Atkinson et al.2012 | 26 | 70,7 * | 51,9 | ND | 49,3/100% omologie cu gena tinta | FAM/FA M | BHQ/ MGB-NFQ |
| P1 Forward TBEV 3'UTR | Schweige r & Cassinotti 2003 | 18 | 60,6 | 61,1 | 7,9 | 36,2/ 100% omologie cu gena tinta | x | x |
| P2 Reverse TBEV 3'UTR | Schweige r & Cassinotti 2003 | 23 | 60,1 | 47,8 | 6,1 | 46,1/100% omologie cu gena tinta | x | x |
| S TBEV 3'UTR | Schweige r & Cassinotti 2003 | 23 | 70,4 | 56,5 | 6,4 | 46,1/ 100% omologie cu gena tinta cu mentiunea ca are omologie 100% si cu Lupig III Virus secventa KF 05633.1 | FAM/ TET | TAMRA/MGB- NFQ |
| P1 Forward Francisella tularensis ISFtu2 | Versage et al.,2003 | 25 | 62,4 | 44 | 5,6 | 50,1/100% omologie cu gena tinta | x | x |
| P2 Reverse Francisella tularensis ISFtu2 | Versage et al.,2003 | 29 | 61,2 | 31 | 6,9 | 50,1/100% omologie cu gena tinta | x | x |
| S Francisella tularensis ISFtu2 | Versage et al.,2003 | 36 | 71,3 | 36,1 | 8,1 | 50,1/ 100% omologie cu gena tinta | FAM/FA M | BHQI/MGBNFQ |

| | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|----|------|----------------|-----|--|-------------|------------------|
| P1 Forward Borrelia burgdorferi sl FlaB | Schweiger et al., 2001 | 22 | 60,1 | 36,4 | 8,5 | 44,1/ 100% omologie cu gena tinta | X | X |
| P2 Reverse Borrelia burgdorferi sl. FlaB | Schweiger et al., 2001 | 20 | 63,1 | 45,0 | 8,2 | 40,1/100% omologie cu gena tinta | X | X |
| S Borrelia burgdorferi sl. Fla B | Schweiger et al., 2001 | 33 | 69,8 | 36,1/36,3 6 | 6,2 | 66,2/ 100% omologie cu gena tinta | FAM/TE T | TAMRA/MGBNF Q |
| P1 IC Ixodes ricinus 16S mt gene | Schweiger & Cassinotti 2003 | 29 | 61,1 | 31,0 | 7,7 | 58,0/ 100% omologie cu gena tinta ptr Ixodes scapularis, Ixodes ricinus, Amblyomma inoratum, Dermacentor nutalli, Haemaphysalis sp, Argas persicus | X | X |
| P2 IC Ixodes ricinus 16S mt gene | Schweiger & Cassinotti 2003 | 25 | 61,2 | 32,0 | 7,0 | 50,1/100% omologie cu gena tinta Ixodes scapularis, Hyalomma aegyptium, Ix. Loricatus, Ix. Ricinus | X | X |
| S IC Ixodes ricinus 16S mt gene | Schweiger & Cassinotti 2003 | 36 | 65,0 | 27,8 | 9,6 | 75,0/100% omologie cu Ix. scapularis, Ix. ricinus, Ix. inopinatus, Caris os puertoriensis Orithodoros capensis | VIC/CY5 | TAMRA/ BHQ 2 |

Tabelul 4 Primeri și sonde utilizate în compunerea kit-ului

Prin marcaj cu BOLD se subliniază modificările aduse moleculelor față de literatura de specialitate și care se regăsesc în compoziția kit-ului.

În cadrul invenției se realizează modificarea moleculelor fluorescente (fluorocromilor) de la capătul 5' al sondei moleculare DNA de tip TaqMan, ceea ce permite utilizarea unei game largi de termociclere (Tabel 1) și permite analiza simultană a 2 agenși patogeni în sistem multiplex sau 4 agenși simultan în sistem singleplex.

Soluția găsită privind modificarea moleculei de stingere a fluorescenței (quencer) de la capatul 3' al sondei moleculare TaqMan reduce fundalul (background) de fluorescență generată de utilizarea TAMRA și crește sensibilitatea de cca. 10 ori prin folosirea quencerilor nonfluorescenți de tip MGB (TaqMan Gene Expression Assay Solution 2012). Quencer-ul MGB (Minor Groove Binding) asigură o creștere a T_m (temperatura de topire) a sondei DNA, fapt ce

conduce la stabilizarea hibrizilor moleculari ce se stabilesc în cadrul PCR între sonda moleculară și genomul țintă. Utilizarea NFQ (Non Fluorescent Quencer) asigură absorbția fluorescenței (stingerea) datorate fluorocromilor în așa fel încât în final rezultă un fundal mai redus de fluorescență reziduală fapt ce crește claritatea semnalului de detecție a regiunii genomice țintă. Secvențele și proprietățile fizico-chimice ale controalelor pozitive sunt cele listate în continuare.

- *Borrelia burgdorferi* sl. Secvența de mărime: 174 bp.

5'-

GCAATCATTGCCATTGCAGATTGTGTCAAATACTATTAGTTGTAGATGCTACAACC
TCATCTGTCATTG

TAGCATCTTTTATTTGAGCATAAGATGCTTTTAGGTTTCAATAGCATACTCAGTACT
ATCCTTTATAGA

CTCAAGTCTATTTTGGAAAGCACCTAAATTTGCT-3'

Secvența sens obținută prin amplificarea prin PCR clasic a genomului DNA din *Borrelia burgdorferi* tulpina IRS (Amplirun® B.burgdorferi DNA control MBC076; 15750 copii genomice/μl; produs de Vircell-Microbiologists) conform protocolului:

Volum final de reacție = 50μl

Într-un tub tip PCR de 200μl (DNA/RNA free) se amestecă componentele indicate în tabelul 5:

| Ingredientul/ Concentrația | Volumul (μl) /reacție |
|--|-----------------------|
| P1 Forward <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. FlaB 18μM | 1,5 |
| P2 Reverse <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. FlaB 18μM | 1,5 |
| Taq Polimeraza cu înaltă fidelitate la copierea DNA GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher) 5U/μl | 1 |
| dNTP în amestec echimolar (10mM fiecare) | 8 |
| Tampon 10x GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher) | 5 |
| Apă extrapură 18MΩ | 30 |

15

| | |
|--|---|
| B.burgdorferi DNA control MBCO (15750 copii genomice/ μ l) diluție 1/10 în apă extrapură | 3 |
|--|---|

Tabel 5 Componente producere control pozitiv *B. burgdorferi* prin PCR

Tubul se supune reacției de amplificare într-un termocicler după programul termic indicat în tabelul 6

| Temperatura în tubul de reacție ($^{\circ}$ C) | Timpul de reacție (sec) | Numarul de cicluri/ repetari a secvenței termice |
|---|-------------------------|--|
| 94 | 120 | 1 |
| 95 | 10 | 45 |
| 60 | 40 | |
| 72 | 420 | 1 |

Tabel 6 Programul termic al reacției de amplificare pentru controlul pozitiv obținut prin PCR de *B. burgdorferi*

După amplificare produsul de amplificare obținut (ampliconul în volum de 5-10 μ l/godeu în prezența de tampon de încărcare /gel loading buffer pe baza de albastru de brom fenol) este verificat prin electroforeză orizontală în gel de agaroză (2-3%) în prezența de tampon TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM Acid Acetic și 1mM EDTA; pH=8.3) la 70Vcc timp de 30-60 min, după marcarea cu Bromura de Etidiu (aflată în gel 0,2-0,5 μ g/ml), gelul este examinat & fotografiat. Se considera reușită producerea de control pozitiv prin PCR atunci când banda corespunzătoare ampliconului se află între benzile de 100 și 200 pb ale Markerului de greutate moleculară (100bp Ladder Thermo Fisher Scientific) conform Fig.1

Ulterior, după purificarea ampliconului prin trecerea lui pe coloane (PureLink™Quick PCR Purification Kit / Invitrogen prin Thermo Fisher Scientific) este măsurat/cuantificat spectrofluorimetric la nanodrop. Concentrația este ajustată cu apa extrapură până la o concentrație stoc de 2,5-0,6 ng/ μ l.

Ampliconul este caracterizat prin analiza *in silico* folosind software OligoEvaluator™ de la PREMIER Biosoft a secvenței de parametrii indicați în tabelul 7.

| Masa moleculara | Coeficientul de extincție | μg/OD la 260 nm | Lungime (bp) | Tm (°C) | GC% | Structura Secundara |
|--------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------|------------|------|------------------------|
| 53490.2 | 1672.2 | 32.0 | 174 | 88.5 | 34.5 | Puternica |

Tabel 7 Parametrii caracteristici ai ampliconului *B.burgdorferi*

- *Francisella tularensis* Secvența de mărime: 97pb.

5'-

TGAGTTTTACCTTCTGACAACAATATTTCTATTGGATTACCTAAAGCATCAGTCATAG
CATGGATTTTAG

TGGTTATCCCACCAACTGATCTACCAA-3'

Secvența sens obținută prin amplificarea PCR classic a genomului DNA din *Francisella tularensis* tulpina LVS (Amplirun® *Francisella tularensis* DNA control MB110; 14000 copii genomice/μl ; produs de Vircell-Microbiologists) conform protocolului:

Volum final de reacție = 50μl

Într-un tub tip PCR de 200μl (DNA/RNA free) se amestecă componentele date în tabelul 8.

| Ingredientul/ Concentrația | Volumul (μl) /reacție |
|---|-----------------------|
| P1 Forward <i>Francisella tularensis</i> ISFtu2 18μM | 1,5 |
| P2 Reverse <i>Francisella tularensis</i> ISFtu2 18μM | 1,5 |
| Taq Polimeraza cu înaltă fidelitate la copierea DNA GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher) 5U/μl | 1 |
| dNTP în amestec echimolar (10mM fiecare) | 8 |
| Tampon 10x GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher) | 5 |

| | |
|--|----|
| Apă extrapură 18MΩ | 30 |
| Amplirun® Francisella tularensis DNA control MB110 (14000 copii genomice/μl) diluție 1/10 în apă extrapură | 3 |

Tabel 8 Componentele tubului pentru producerea prin PCR a controlului pozitiv de *F.tularensis*

Tubul se supune reacției de amplificare într-un termocicler după programul termic indicat în tabelul 9.

| Temperatura în tubul de reacție (°C) | Timpul de reacție (sec) | Numarul de cicluri/ repetări a secvenței termice |
|--------------------------------------|-------------------------|--|
| 94 | 120 | 1 |
| 95 | 10 | 45 |
| 60 | 40 | |
| 72 | 420 | 1 |

Tabel 9 Programul termic al reacției de amplificare pentru producerea controlului pozitiv de *F.tularensis*

După amplificare produsul de amplificare obținut (ampliconul în volum de 5-10 ul/godeu în prezența de tampon de încărcare /gel loading buffer pe bază de albastru de brom fenol) este verificat prin electroforeză orizontală în gel de agaroză (2-3%) în prezența de tampon TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM Acid Acetic și 1mM EDTA; pH=8.3) la 70Vcc timp de 30-60 min, după marcarea cu Bromura de Etidiu (aflată în gel 0,2-0,5μg/ml), gelul este examinat & fotografiat. Se consideră reușită producerea de control pozitiv prin PCR atunci când banda corespunzătoare ampliconului se află între benzile de 100 și 200 pb ale Markerului de greutate moleculară (100bp Ladder Thermo Fisher Scientific) conform Fig. 2. Ulterior, după purificarea ampliconului prin trecerea lui pe coloane (PureLink™ Quick PCR Purification Kit / Invitrogen prin Thermo Fisher Scientific) este măsurat/cuantificat spectro-fluorimetric la nanodrop. Concentrația este ajustată cu apă extrapură până la o concentrație stoc de 3,9-0,2 ng/μl.

Ampliconul este caracterizat prin analiza *in silico* (folosind software OligoEvaluator™ de la PREMIER Biosoft) a secvenței de mai sus, parametrii dați în tabelul 10.

| Masa moleculară | Coefficientul de extincție | μg/OD la 260 nm | Lungime (bp) | Tm (°C) | GC% | Structura Secundară |
|-----------------|----------------------------|-----------------|--------------|---------|------|---------------------|
| 29741.6 | 938.8 | 31.7 | 97 | 86.1 | 36.1 | Puternica |

Tabel 10 Parametrii caracteristici ai ampliconului de *F.tularensis*

-**CCHFV** Secvența de mărime: 122 pb.

5'-

TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCACAGTGTTCTCTTGAGTGTTAGCAAAC
GTAACAGATGAAAGAGCAAGCTACTAAAGATGAGATGAACAAGTGGTTTGAAGAGT
TCAAAAAGG-3'

Secvența de sinteză obținută prin amplificarea prin PCR clasic a matriței DNA sintetic (de 322 nt) monocatenară, produsă la comandă de către GeneArt™Strings™DNA Fragments (produs de către Invitrogen, ThermoFischer Scientific) concentrația inițială fiind de 20 ng/μL. Protocolul de obținere prin PCR fiind:

Volum final de reacție = 50μl

Într-un tub tip PCR de 200μl (DNA/RNA free) se amestecă componentele indicate în tabelul 11.

| Ingredientul/ Concentrația | Volumul (μl) /reacție |
|--|-----------------------|
| P1 Forward CCHFV S segment 18μM | 1,5 |
| P2 Reverse CCHFV S segment 18μM | 1,5 |
| Taq Polimeraza cu înaltă fidelitate la copierea DNA GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher) 5U/μl | 1 |
| dNTP în amestec echimolar (10mM fiecare) | 8 |
| Tampon 10x GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher) | 5 |
| Apa extrapură 18MΩ | 30 |

| | |
|--|---|
| GeneArt™Strings™DNA Fragment de 322nt; diluție 1/10 în apă extrapură (2ng/μl) | 3 |
|--|---|

Tabel 11 Componentele tubului pentru producerea prin PCR a controlului pozitiv de *CCHFV*

Tubul se supune reacției de amplificare într-un termocicler după programul termic dat în tabelul 12.

| Temperatura în tubul de reacție (°C) | Timpul de reacție (sec) | Numărul de cicluri/ repetări a secvenței termice |
|--------------------------------------|-------------------------|--|
| 94 | 120 | 1 |
| 95 | 10 | 45 |
| 60 | 40 | |
| 72 | 420 | 1 |

Tabel 12 Programul termic al reacției de amplificare pentru obținerea controlului pozitiv de *CCHFV*

După amplificare, produsul de amplificare obținut (ampliconul în volum de 5-10 μl/godeu în prezență de tampon de încărcare (gel loading buffer pe bază de albastru de brom fenol) este verificat prin electroforeză orizontală în gel de agaroză (2-3%) în prezența de tampon TAE IX (40 mM Tris, 20 mM Acid Acetic și 1mM EDTA; pH=8.3) la 70Vcc timp de 30-60 min, după marcarea cu Bromura de Etidiu (aflată în gel 0,2-0,5μg/ml), gelul este examinat & fotografiat. Se consideră reușită producerea de control pozitiv prin PCR atunci când banda corespunzătoare ampliconului se afla între benzile de 100 și 200 pb ale Markerului de greutate moleculară (100bp Ladder Thermo Fisher Scientific) conform Fig.3.

Ulterior, după purificarea ampliconului prin trecerea lui pe coloane (PureLink™Quick PCR Purification Kit / Invitrogen prin Thermo Fisher Scientific) este măsurat/cuantificat spectrofluorimetric la nanodrop. Concentrația este ajustată cu apă extrapură până la o concentrație stoc de 49,1-1,8 ng/μl.

Ampliconul este caracterizat (prin analiza *in silico* folosind software OligoEvaluator™ de la PREMIER Biosoft) a secvenței de mai sus, parametrii indicați în tabelul 13.



| Masa moleculară | Coefficientul de extincție | μg/OD la 260 nm | Lungime (bp) | Tm (°C) | GC% | Structura Secundara |
|-----------------|----------------------------|-----------------|--------------|---------|------|---------------------|
| 37850.9 | 1231.1 | 30.7 | 122 | 91.8 | 41.8 | Puternica |

Tabel 13 Parametrii ampliconului control pozitiv de *CCHFV*

-TBEV Secvența de mărime: 68 pb.

5'-

GGGCGGTTCTTGTTCTCCCTGAGCCACCATCACCCAGACACAGGTAGTCTGACAAGG
AGGTGATGTGT-3'

Secvența obținută prin amplificarea prin Revers-Transcriere PCR a genomului RNA din TBEV tulpina Hypr aflată în laboratoarele proprii, conform protocolului:

Volum final de reacție = 50μl;

Într-un tub tip PCR de 200μl (DNA/RNA free) se amestecă componentele date în tabelul 14 folosind componentele din kit-ul: SuperScript III™ One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher).

| Ingredientul/ Concentrația | Volumul (μl) /reacție |
|--|-----------------------|
| P1 Forward TBEV 3'UTR 18μM | 1,5 |
| P2 Reverse TBEV 3'UTR 18μM | 1,5 |
| 2X Reaction Mix (buffer 2x+0.4mM din fiecare dNTP + 6mM MgSO ₄) | 25 |
| SuperScript III RT Platinum™Taq Mix | 1 |
| Apa extrapura 18MΩ tratata cu DEPC | 18 |
| Total RNA* izolat din creier de șoarece inoculat cu TBEV Hypr (1100 ng/μl) în dilutie de 1/10 în apă extrapură | 3 |

Tabel 14 Componentele tubului pentru obtinerea prin PCR a controlului pozitiv de *TBEV*

*Metoda de izolare a RNA total din creier de șoarece nou născut inoculat cu TBEV a folosit kit-ul: RNAeasy[®] (Qiagen) și s-a urmat protocolul descris pentru acesta.

Tubul se supune reacției de amplificare într-un termocicler după programul termic dat în tabelul 15.

| Temperatura în tubul de reacție (°C) | Timpul de reacție (sec) | Numărul de cicluri/ repetări a secvenței termice |
|--------------------------------------|-------------------------|--|
| 50 | 900 | 1 |
| 95 | 120 | 1 |
| 95 | 15 | 45 |
| 60 | 40 | |

Tabel 15 Programul termic a reacției de amplificare pentru controlul pozitiv *TBEV*

După amplificare, produsul de amplificare obținut (ampliconul în volum de 5-10μl/godeu în prezență de tampon de încărcare /gel loading buffer pe bază de albastru de brom fenol) este verificat prin electroforeză orizontală în gel de agaroză (2-3%) în prezență de tampon TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM Acid Acetic și 1mM EDTA; pH=8.3) la 70Vcc timp de 30-60 min, după marcarea cu Bromura de Etidiu (aflată în gel 0.2-0.5μg/ml), gelul este examinat & fotografiat. Se consideră reușită producerea de control pozitiv prin PCR atunci când banda corespunzătoare ampliconului se afla între benzile de 100 și 200 pb ale Markerului de greutate moleculară (100bp Ladder Thermo Fisher Scientific) conform Fig.4.

Ulterior, după purificarea ampliconului prin trecerea lui pe coloane (PureLink™ Quick PCR Purification Kit / Invitrogen prin Thermo Fisher Scientific) este măsurat/cuantificat spectrofluorimetric la nanodrop. Concentrația este ajustată cu apă extrapură până la o concentrație stoc de 800-0,5ng/μl.

Ampliconul este caracterizat prin analiza *in silico* (folosind software OligoEvaluator™ de la PREMIER Biosoft) a secvenței de mai sus; parametrii fiind dați în tabelul 16.

| Masa moleculara | Coeficientul de extincție | μg/OD la 260 nm | Lungime (bp) | Tm (°C) | GC% | Structura Secundara |
|-----------------|---------------------------|-----------------|--------------|---------|------|---------------------|
| 20979.8 | 645.6 | 32.5 | 68 | 93.5 | 55.9 | Puternică |

Tabel 16 Parametrii ampliconului *TBEV* ce constituie controlul pozitiv din kit**IC *Ixodes ricinus* 16S mtDNA** Secvența de mărime: 98pb.

3'

AAAAAATACTCTAGGGATAACAGCGTAATAATTTTGGATAGTTCATATAGATAAA
ATAGTTTGCACCTCGATGTTGGATTAGGATTCTTTTTTGGT-5'

Secvența obținută prin amplificarea prin PCR a DNA genomic total în laboratoarele noastre, DNA provenit de la un pool de 5 căpușe (femele) de *Ixodes ricinus* recoltate din vegetație (questing ticks), nehrănite din localitatea Brateiu, Jud. Sibiu în Mai 2009.

Amplificarea s-a realizat conform protocolului:

Volum final de reacție = 50μl

Într-un tub tip PCR de 200μl (DNA/RNA free) se amestecă componentele date în tabelul 17.

| Ingredientul/ Concentratia | Volumul (μl) /reacție |
|--|-----------------------|
| P1 IC <i>Ixodes ricinus</i> 16S mt gene 18μM | 1,5 |
| P2 IC <i>Ixodes ricinus</i> 16S mt gene 18μM | 1,5 |
| Taq Polimeraza cu inalta fidelitate la copierea DNA GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher) 5U/μl | 1 |
| dNTP in amestec echimolar (10mM fiecare) | 8 |
| Tampon 10x GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher) | 5 |
| Apa extrapura 18MΩ | 30 |
| DNA total izolat din <i>Ix.ricinus</i> ** (14-30ng/μl) | 3 |

**Metoda de izolare a DNA total din *Ix.ricinus* (pool de 5 căpușe, female) a folosit kit-ul: TRIzol® (Thermo Fisher) și s-a urmat protocolul descris pentru acesta.

Tabel 17 Componentele tubului pentru obtinerea CI de Ixodes prin PCR

Căpușele au fost împărțite în *pool*-uri de 5-10 exemplare în funcție de mărime și locul recoltării, spălate în apă distilată, pentru îndepărtarea *RNA lather*TM (reactiv apos, non toxic, de stocare a țesuturilor, care stabilizează și protejează RNA celular în timpul recoltării, transportului și păstrării probelor până la prelucrare) și cântărite. Am adăugat un volum corespunzător de Trizol la 50-100 mg țesut (căpușe), conform recomandărilor producătorului (*volumul probei nu trebuie să depășească 10% din volumul de TRIzol[®] adăugat*) și s-a omogenizat proba pentru distrugerea celulelor și dizolvarea componentelor celulare. În timpul acestei etape se menține integritatea acizilor nucleici.

Izolarea DNA are loc după incubarea omogenatului la temperatura camerei pentru a permite disocierea complexelor nucleoproteice, tratarea ulterioară cu cloroform și separarea fazelor prin centrifugare. DNA-ul va rămâne cantonat în faza organică și interfază.

Precipitarea DNA se realizează după îndepărtarea fazei apoasă reziduale, prin tratarea inițială cu etanol 100%, vortexare, incubare la temperatura camerei și centrifugare la 4°C, care permite DNA-ului să formeze un depozit pe peretele lateral și partea de jos a tubului.

Spalarea DNA-ului se realizează prin tratări repetate ale peletului cu soluție de citrat de sodiu - etanol (citrat de sodiu 0,1 M în 10% etanol, pH 8,5) și incubări repetate a câte 30 minute la temperatura camerei, urmate de centrifugări la 4°C.

După tratarea finală cu etanol 75%, incubare timp de 10-20 minute la temperatura camerei și centrifugare 5 minute la 2000 x g și 4°C, depozitul DNA se usucă și se resuspendă în NaOH 8 mM, la o concentrație de 0,2-0,3 μg / μl., și s-a urmat protocolul descris pentru acesta.

Tubul se supune reacției de amplificare într-un termocicler după programul termic indicat în tabelul 18.

| Temperatura în tubul de reacție (°C) | Timpul de reacție (sec) | Numărul de cicluri/ repetări a secvenței termice |
|--------------------------------------|-------------------------|--|
| 94 | 120 | 1 |
| 95 | 10 | 45 |
| 60 | 40 | |
| 72 | 420 | 1 |

Tabel 18 Programul termic al reacției de amplificare pentru obținerea CI de Ixodes

După amplificare, produsul de amplificare obținut (ampliconul în volum de 5-10 μ l/godeu în prezență de tampon de încărcare /gel loading buffer pe bază de albastru de brom fenol) este verificat prin electroforeză orizontală în gel de agaroză (2-3%) în prezență de tampon TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM Acid Acetic și 1mM EDTA; pH=8.3) la 70Vcc timp de 30-60 min, după marcarea cu Bromura de Etidiu (aflata în gel 0.2-0.5 μ g/ml), gelul este examinat & fotografiat. Se consideră reușită producerea de control pozitiv prin PCR atunci când banda corespunzătoare ampliconului se află între benzile de 100 și 200 pb ale Markerului de greutate moleculară (100bp Ladder Thermo Fisher Scientific) conform Fig. 5.

Ulterior, după purificarea ampliconului prin trecerea lui pe coloane (PureLink™ Quick PCR Purification Kit / Invitrogen prin Thermo Fisher Scientific) este măsurat/cuantificat spectrofluorimetric la nanodrop. Concentrația este ajustată cu apă extrapură până la o concentrație stoc de 100-10ng/ μ l.

Ampliconul este caracterizat prin analiza *in silico* (folosind software OligoEvaluator™ de la PREMIER Biosoft) a secvenței de mai sus; având următorii parametri: Tabel 20.

| Masa moleculara | Coeficientul de extincție | μ g/OD la 260 nm | Lungime (bp) | Tm (°C) | GC% | Structura Secundara |
|-----------------|---------------------------|----------------------|--------------|---------|------|---------------------|
| 30397.0 | 988.8 | 30.7 | 98 | 82.8 | 30.6 | Slaba și multipla |

Dozajele elementelor constitutive sunt date în tabelul 20

| DENUMIRE Constituent | Se regăsește în compunerea tubului nr. Din kit | Dozaj concentrație | Verificat prin | Limite de valori pentru Ct | Ecivalent în copii genomice |
|----------------------------|--|--------------------|----------------------------------|--|-----------------------------|
| PI Forward CCHFV S segment | Tub 1 Solutie de lucru CCHFV | 18 μ M | Citire concentrație la Nanodrop* | Pentru utilizarea în sistem singleplex în prezenta controlului | ND |

| | | | | | |
|----------------------------|---------------------------------|------------|----------------------------------|--|----|
| | | | | pozitiv din kit se vor obtine valori ale Ct cuprinse intre: 13-32 | |
| P2 Reverse CCHFV S segment | Tub 1 Solutie de lucru CCHFV | 18 μ M | Citire concentratie la Nanodrop* | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obtine valori ale Ct cuprinse intre:13-32 | ND |
| S CCHFV S segment | Tub 1 Solutie de lucru CCHFV | 25 μ M | Citire concentratie la Nanodrop* | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obtine valori ale Ct cuprinse intre:13-32 | ND |
| P1 Forward TBEV 3'UTR | Tub 2 Solutie de lucru TBEV | 18 μ M | Citire concentratie la Nanodrop* | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din | ND |

| | | | | | |
|--|------------------------------------|------------|----------------------------------|---|----|
| | | | | kit se vor obtine valori ale Ct cuprinse intre:13-32 | |
| P2 Reverse TBEV 3'UTR | Tub 2 Solutie de lucru TBEV | 18 μ M | Citire concentratie la Nanodrop* | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obtine valori ale Ct cuprinse intre:13-32 | ND |
| S TBEV 3'UTR | Tub 2 Solutie de lucru TBEV | 25 μ M | Citire concentratie la Nanodrop* | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obtine valori ale Ct cuprinse intre: 13-32 | ND |
| P1 Forward Francisella tularensis ISFtu2 | Tub 3 Solutie lucru Francisella | 18 μ M | Citire concentratie la Nanodrop* | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor | ND |

| | | | | | |
|--|------------------------------------|------|----------------------------------|--|----|
| | | | | obține valori ale Ct cuprinse între: 13-32 | |
| P2 Reverse Francisella tularensis ISFtu2 | Tub 3 Soluție lucru Francisella | 18μM | Citire concentrație la Nanodrop* | Pentru utilizarea în sistem singleplex în prezența controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse între: 13-32 | ND |
| S Francisella tularensis ISFtu2 | Tub 3 Soluție lucru Francisella | 25μM | Citire concentrație la Nanodrop* | Pentru utilizarea în sistem singleplex în prezența controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse între: 13-32 | ND |
| P1 Forward Borrelia burgdorferi sI FlaB | Tub 4 Soluție de lucru Borrelia | 18μM | Citire concentrație la Nanodrop* | Pentru utilizarea în sistem singleplex în prezența controlului pozitiv din kit se vor obține | ND |

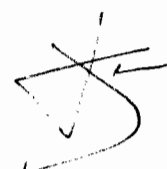
| | | | | | |
|--|---------------------------------------|------------|----------------------------------|---|----|
| | | | | valori ale Ct cuprinse intre: 13-32 | |
| P2 Reverse Borrelia burgdorferi sl. FlaB | Tub 4 Solutie de lucru Borrelia | 18 μ M | Citire concentratie la Nanodrop* | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obtine valori ale Ct cuprinse intre: 13-32 | ND |
| S Borrelia burgdorferi sl. Fla B | Tub 4 Solutie de lucru Borrelia | 25 μ M | Citire concentratie la Nanodrop* | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obtine valori ale Ct cuprinse intre:13-32 | ND |
| P1 IC Ixodes ricinus 16S mt gene | Tub 5 Solutie de lucru Control Intern | 18 μ M | Citire concentratie la Nanodrop* | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obtine valori ale | ND |

| | | | | | |
|--|---|------------------------|--|---|------------------|
| | | | | Ct cuprinse intre:13- 32 | |
| P2 IC Ixodes ricinus 16S mt gene | Tub 5 Solutie de lucru Control Intern | 18 μ M | Citire concentratie la Nanodrop* | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse intre:13- 32 | ND |
| S IC Ixodes ricinus 16S mt gene | Tub 5 Solutie de lucru Control Intern | 25 μ M | Citire concentratie la Nanodrop* | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse intre:13- 32 | ND |
| Positive Control CCHFV | Tub 6 Concentratie standard de amplicon CCHFV | 400-1,8 ng/ μ l | Citire concentratie la Nanodrop * & Electroforeza** in gel de agaroza 2-3% (conform Fig.7) | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct | 7000000- 7000 |





| | | | | | |
|------------------------------------|---|------------------------|---|--|-----------------|
| | | | | cuprinse intre: 12- 32 | |
| Positive Control TBEV | Tub 7 Concentratie standard de amplicon TBEV | 800-0,5 ng/ μ l | Citire concentratie la Nanodrop* & Electroforeza** in gel de agaroza 2-3% (conform Fig.8) | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse intre: 12- 32 | 5000000- 500 |
| Positive Control Francisella | Tub 8 Concentratie standard de amplicon Francisella | 3,9-0,2 ng/ μ l | Citire concentratie la Nanodrop* & Electroforeza** in gel de agaroza 2-3% (conform Fig.6) | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse intre: 12- 35 | 14000- 140 |
| Positive Control Borrelia | Tub 8 Concentratie standard de amplicon Francisella | 2,5-0,1 ng/ μ l | Citire concentratie la Nanodrop * & Electroforeza** in gel de agaroza 2-3% (Conform Fig.5) | Pentru tilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse | 16000- 160 |



| | | | | | |
|----------------------------------|--|--------------------|---|---|----------------|
| | | | | între:25-35 | |
| Positive Internal Control Ixodes | Tub 8 Concentratie standard de amplicon Francisella | 100-10 ng/ul µM | Citire concentratie la Nanodrop* & Electroforeza** in gel de agaroză 2-3% (conform Fig.9) | Pentru utilizarea in sistem singleplex in prezenta controlului pozitiv din kit se vor obtine valori ale Ct cuprinse între:12-32 | 3400000-340000 |

Tabel 20 Dozajele elementelor constitutive; ND parametru ce nu se determina

*Citirea la Nanodrop: Utilizarea aplicațiilor predefinite ale Spectrofotometrului NanoDrop™ One (tabel 21), permite cuantificarea probelor purificate de DNA dublu catenar, DNA monocatenar și RNA și furnizează informații legate de concentrația probei și valorile absorbantei pentru A260/280 și A260/230.

Pentru rezultate optime, înainte de realizarea măsurătorilor, cele 2 zone ale spectrofotometrului prin care se realizează citirea, se vor curăța cu servetele curate de laborator. Se pipetează 1 µl soluție blank (apa extrapură sau tampon Tris EDTA, pH=8.0), în funcție de soluția în care s-a realizat eluția materialului genetic analizat, pentru realizarea calibrării aparatului. Pentru măsurarea probelor se urmează aceeași procedură. Rezultatele măsurătorilor cu datele spectrale complete sunt afișate pe display în câteva secunde. Acest lucru permite să se decidă dacă proba analizată poate fi utilizată în aplicațiile ulterioare, deoarece *soft*-ul spectrofotometrului furnizează informații despre posibila contaminanți prezenți în probă (fenol, proteine) și gradul de puritate al acesteia.

| Tip probă | Limită minimă detecție | Limită maximă detecție | Reproductibilitate |
|-------------------|------------------------|------------------------|--|
| ADN dublu catenar | 2.0 ng/µl | 27.500 ng/µl | ± 2.0 ng/µl pentru concentrații cuprinse între 2.0 și 100 ng/µl probă; ± 2% pentru probe >100 ng/µl |

| | | | |
|-----------------|-----------|--------------|--|
| ADN monocatenar | 1.3 ng/μl | 18.150ng/μl | ± 1.3 ng/μl pentru concentrații cuprinse între 2.6 și 66 ng/μl; ± 2% pentru probe >66 ng/μl |
| ARN | 1.6 ng/μl | 22.000 ng/μl | ± 1.6 pentru concentrații cuprinse între 3.2 și 80 ng/μl; ± 2% pentru probe >80 ng/μl |

Tabel 21 Limite detecție NanoDrop One® Thermo Scientific

**Electroforeza în gel de agaroză constituie o metodă standard pentru separarea, purificarea și identificarea moleculelor de DNA, inclusiv din amestecuri ce nu pot fi separate adecvat prin alte tehnici. Agaroză cu o rezoluție standard este de obicei suficientă pentru vizualizarea produsilor de amplificare rezultați în urma unei reacții PCR, dar se poate folosi și un gel de agaroză cu rezoluție înaltă, de obicei pentru vizualizarea ampliconilor mici. În gel se încarcă alături de probe și un marker de greutate moleculară, precum și martorul negativ al reacției. Markerul de greutate permite aprecierea corectitudinii rezultatelor obținute.

Principiul reacției: la pH alcalin sau neutru acizii nucleici au sarcină electrică globală negativă. Ca urmare, dacă sunt plasați într-un câmp electric vor migra la anod.

Există două variante de colorare a gelului de agaroză:

1. Colorarea gelului cu bromură de etidiu (BrEt) 0,5-1 mg / ml, timp de 20 de minute, după terminarea timpului de migrare și întreruperea alimentării curentului electric. Gelul se spală timp de 30 de minute în apă distilată într-un cristalizor.

2. Introducerea colorantului direct în tamponul de reacție înainte de turnarea acestuia în tancul de electroforeză, colorarea realizându-se astfel simultan cu migrarea acizilor nucleici sau mai nou și mult mai simplu, *direct în gelul de încărcare a probelor.*

Bromura de etidiu este un agent intercalant tip fluorocrom care este excitat de lumina ultravioletă și emite în vizibil, determinând colorarea moleculelor DNA în roz-violet. După terminarea procesului de migrare, vizualizarea moleculelor DNA se realizează prin așezarea gelului pe un transiluminator și efectuarea unei poze cu sisteme fotografice dedicate.

Prepararea gelului de agaroză se realizează prin topirea agarozei în cuptorul cu microunde, în tampon de electroforeză TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM Acid Acetic și 1mM EDTA; pH=8.3) până la obținerea unei soluții clare, transparente care se toarnă în tăvița de electroforeză în care a fost fixat pieptănul pentru formarea godeurilor. După răcirea și întărirea gelului, pieptănul se

scoate, iar gelul se așează în cuva / tancul de electroforeză orizontală, prin imersare în tamponul de electroforeză.

Produșii de amplificare migrează în câmp electric între cei doi electrozi, particulele încărcate electric deplasându-se spre electrodul de sarcină opusă.

Pregătirea produșilor de amplificare în vederea migrării în gel de agaroză. Produsul de amplificare, se încarcă în godeurile gelului ulterior adăugării de *Loading dye*, alături de un marker de greutate moleculară standard. Migrarea are loc în câmp electric la o tensiune și intensitate a curentului constante pe întreaga durată a procesului.

Se prezintă în continuare alți parametri ce definesc elementele invenției.

Pentru măsurarea reproductibilității reacțiilor analitice a Real-Time PCR) s-a procedat prin repetarea fiecărei reacții (în sistem Singleplex) pentru fiecare patogen în parte de câte 2x și înregistrarea valorilor C_T (valoarea C_T reprezintă locul unde curba de amplificare intersectează linia de trashhold și reprezintă ciclul la care s-a detectat amplificarea prin PCR) la următoarele diluții ale Echivalenților Genomici (GE- Genomic Equivalents) -1/10; 1/100; 1/1000; 1/10000.

Analizele s-au efectuat în cadrul aceluiași run (pentru măsurarea Intra Assay Precision; IAP) în variante duplicate dar și în cadrul unor run-uri diferite (zile diferite, operatori PCR diferiți pentru măsurarea Interassay precision; InRAP) tot în duplicat. Pentru fiecare set de valori s-a calculat Deviația Standard (SD) și Coeficientul de Variație (CV) și s-a exprimat procentual, rezultatele fiind cele din tabelul 22.

| Dilutii GE/reactie | Nr de determinari | Valoarea (%) a CV ptr IAP si in paranteza ptr InRAP | Agentul Patogen Detectat |
|--------------------|-------------------|---|-------------------------------|
| 1/10 | 2 | 1.15 (2.70) | TBEv |
| 1/100 | 2 | 0.82 (1.68) | |
| 1/1000 | 2 | 2.40(2.90) | |
| 1/10000 | 2 | 3.09 (3.85) | |
| 1/10 | 2 | 1.0 (2.35) | |
| 1/100 | 2 | 0.54 (1.02) | |
| 1/1000 | 2 | 0.25 (2.47) | |
| 1/10000 | 2 | 3.21 (3.89) | |
| 1/10 | 2 | 1.23 (2.87) | Francisella tularensis |
| 1/100 | 2 | 0,45 (1.64) | |
| 1/1000 | 2 | 2.15 (2.78) | |
| 1/10000 | 2 | 3.23(4,16) | |

| | | | |
|---------|---|-------------|---------------------------------|
| 1/10 | 2 | 1.67 (1.26) | Borrelia burgdorferi sl. |
| 1/100 | 2 | 0.98 (0.79) | |
| 1/1000 | 2 | 2,43 (2.62) | |
| 1/10000 | 2 | 3.69 (3.56) | |

Tabel 22 Deviația standard și coeficientul de variație

Kit-ul pornește de la procesarea probelor biologice în vederea izolării concomitente sau separat a acizilor nucleici (DNA total și RNA total). Testările efectuate în laborator au arătat că pot fi utilizate cu succes kit-urile și/sau soluțiile de extracție acizi nucleici comerciale date în tabelul 23.

| Tipul de acid nucleic extras | Denumirea comerciala a kit-ului si producatorul | Cu respectarea protocolului aferent |
|------------------------------|--|-------------------------------------|
| DNA | AccuPrep [®] Genomic DNA Extraction Kit (<i>Bionner</i>) | DA |
| | QIAamp [®] genomic Mini kit (<i>Qiagen</i>). | |
| RNA | QuickGene [®] RNA tissue kit SII & dispozitivul aferent QuickGene-Mini 80 | DA |
| | RNeasy [®] Mini kit Qiagen | |
| DNA si RNA | TRIZol [®] | DA |

Tabel 23 Utilizarea kit-urilor de extracție acizi nucleici ce pot fi folosite pentru funcționarea invenției noastre

Probele biologice reprezentate de căpușe se vor procesa după cum urmează.

Căpușele, în funcție de dimensiune pot fi grupate în pool-uri de câte 20 (în special larvele și nimfele), iar adulții care sunt hrăniți câte unul sau în pool-uri de max 7 indivizi. Mărunțirea căpușelor se poate face fie după imersarea acestora în azot lichid, fie prin utilizarea unor omogenizatoare/mori cu bile comerciale (ex. Mixer Mill MM 200/400 de la Retsch[®]). Omogenizarea căpușelor se realizează similar cu omogenizarea țesuturilor animale în prezența soluției de extracție ce este prevăzută în componența kit-urilor de mai sus (Tabel.23).

Sângele și LCR-ul se procesează după indicațiile din kit-urile de extracție.

În vederea detecției și cuantificării virusurilor *CCHFV* și *TBEV* (cu genom RNA) se realizează transformarea RNA în cDNA prin reacția de reverstranscriere ce se realizează fie într-o singură

etapa, fie în două (obținere de cDNA cu ajutorul amorselor hexamerice cu secvențe random și ulterior amplificarea secvenței țintă prin PCR). În vederea revers-transcrierii recomandăm utilizarea kit-ului: SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with platinum Taq DNA Polymerase.

Utilizarea Kit-ului in sistem singleplex.

Marcajul fluorescent diferit al sondelor moleculare incluse în kit precum și faptul că acestea sunt livrate în tuburi diferite permite ca folosind aceleași condiții de ciclare să realizăm detecția și cuantificarea simultană în tuburi diferite a tuturor celor 4 agenți + CI urmând protocolul de mai jos:

Se distribuie cu ajutorul unor micropipete în hota cu flux laminar PCR, următoarele volume de reactivi pentru 25μl amestec final de reacție:

| Pentru detecția CCHFV | C+ | Proba | C- |
|-----------------------|--|--|---|
| | -2,5 mix reacție CCHFV -Tampon PCR 2X 12,5μl -Enzima TaqPolimeraza 1μl -dNTP mix 10mM fiecare 4μl -Template/Matrita: 3μl Positive Control CCHFV -Apa extrapura: 3 μl | -2,5μl mix reacție CCHFV -Tampon PCR 2X 12,5μl -Enzima TaqPolimeraza 1μl -dNTP mix 10mM fiecare 4μl -Template/Matrita: 3μl cDNA(obținut din proba cu hexameri) -Apa extrapura:3μl. | -2,5μl mix reacție CCHFV -Tampon PCR 2X 12,5μl -Enzima TaqPolimeraza 1μl -dNTP mix 10mM fiecare 4μl -Template/Matrita: 3μl Apa -Apa extrapura:3μl |
| Pentru TBEV | -2,5 μl mix reacție TBEV -Tampon PCR 2X 12,5μl -Enzima TaqPolimeraza 1μl -dNTP mix 10mM fiecare 4μl -Template/Matrita: 3μl Positive Control TBEV -Apa extrapura: 3μl | -2,5 μl mix reacție TBEV -Tampon PCR 2X 12,5μl -Enzima TaqPolimeraza 1μl -dNTP mix 10mM fiecare 4μl -Template/Matrita: 3μl cDNA(obținut din proba cu hexameri) -Apa extrapura: 3μl | -2,5 μl mix reacție TBEV -Tampon PCR 2X 12,5μl -Enzima TaqPolimeraza 1μl -dNTP mix 10mM fiecare 4μl -Template/Matrita: 3μl Apa -Apa extrapura:3μl |
| Pentru Francisella | -2,5 μl mix reacție | -2,5 mix reacție | -2,5μl mix reacție |

| | | | |
|------------------------|---|--|---|
| | Francisella -Tampon PCR 2X 12,5µl -Enzima TaqPolimeraza 1µl -dNTP mix 10mM fiecare 4µl -Template/Matrita: 3µl Positive Control Francisella -Apa extrapura: 3µl | Francisella -Tampon PCR 2X 12,5µl -Enzima TaqPolimeraza 1µl -dNTP mix 10mM fiecare 4µl -Template/Matrita: 3µl DNA(obtinut din proba) -Apa extrapura:3µl | Francisella -Tampon PCR 2X 12,5µl -Enzima TaqPolimeraza 1µl -dNTP mix 10mM fiecare 4µl -Template/Matrita: 3µl Apa -Apa extrapura:3µl |
| Pentru Borrelia | -2,5 mix reactie Borrelia -Tampon PCR 2X 12,5µl -Enzima TaqPolimeraza 1µl -dNTP mix 10mM fiecare 4µl -Template/Matrita: 3µl Positive Control Borrelia -Apa extrapura:3µl | -2,5µl mix reactie Borrelia -Tampon PCR 2X 12,5µl -Enzima TaqPolimeraza 1µl -dNTP mix 10mM fiecare 4µl -Template/Matrita: 3µl DNA(obtinut din proba) -Apa extrapura:3µl | -2,5 µl mix reactie Borrelia -Tampon PCR 2X 12,5µl -Enzima TaqPolimeraza 1µl -dNTP mix 10mM fiecare 4µl -Template/Matrita: 3µl Apa -Apa extrapura:3µl |
| Pentru CI | -2,5µl mix reactie CI -Tampon PCR 2X 12,5µl -Enzima TaqPolimeraza 1µl -dNTP mix 10mM fiecare 4µl -Template/Matrita: 3µl Positive Control CI sau DNA genomic extras din capuse daca si probele au provenit din capuse. Apa extrapura:3µl. | Nu se aplica | -2,5 µl mix reactie CI -Tampon PCR 2X 12,5µl -Enzima TaqPolimeraza 1µl -dNTP mix 10mM fiecare 4µl -Template/Matrita: 3µl Apa -Apa extrapura:3µl |

Tabel 24 Volume de reactivi pentru detecție agenți patogeni inclusiv controale pozitive, controale negative și CI

Tuburile, după ce au fost vortexate și centrifugate scurt, sunt introduse în termocicler-ul real-time unde sunt supuse la 45 de cicluri termice după programul dat în tabelul 6 (fără incubarea la 70°C/420sec/1ciclu), cu mențiunea că achiziția de semnale fluorescente se face la sfârșitul etapei de termostatare la 60°C, iar detecția semnalelor fluorescente se va face astfel pentru fiecare agent/tub cu reacțanți.

| Agentul/Tubul | C+ | Proba | C- |
|--------------------|-----|-------|-----|
| CCHFV | TET | TET | TET |
| TBEV | FAM | FAM | FAM |
| Francisella | FAM | FAM | FAM |
| Borrelia | TET | TET | TET |
| CI | Cy5 | Cy5 | Cy5 |

Tabel 25 Canalele de achiziție a datelor de fluorescență pentru patogeni, CI, controale pozitive, probe și controale negative

Rezultatele vor fi afișate de soft-ul fiecărui termocicler sub forma unor grafice unități arbitrare de fluorescență VS număr de cicluri sau în format logaritmic (conform Fig..6.)

Interpretarea datelor se va face conform tabel 26.

| Agentul/Tubul | C+ | Proba | C- |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| CCHFV | C _T 12-32 pe TET | C _T 12-35 pe TET | C _T 0 pe TET |
| TBEV | C _T 12-32 pe FAM | C _T 12-35 pe FAM | C _T 0 pe FAM |
| Francisella | C _T 12-32 pe FAM | C _T 12-35 pe FAM | C _T 0 pe FAM |
| Borrelia | C _T 12-32 pe TET | C _T 12-35 pe TET | C _T 0 pe TET |
| CI | C _T 12-32 pe Cy5 | Nu se determina | C _T 0 pe Cy5 |

Tabel 26 Interpretare date de amplificare exprimate în valori C_T (valoarea C_T reprezintă locul unde curba de amplificare intersectează linia de trashhold și reprezintă ciclul la care s-a detectat amplificarea prin PCR) pentru patogeni, CI, controale pozitive, probe și controale negative

Dacă în cazul probelor, valoarea C_T este 0 atunci probele se consideră negative, dacă însă valoarea C_T depășește 35, atunci pentru proba respectivă se repeta analiza și eventual se crește volumul de template/matriță din reacția PCR în dauna volumului de apă din reacție.

Utilizarea Kit-ului în sistem Multiplex.

Marcajul fluorescent diferit al sondelor moleculare incluse în kit precum și faptul că acestea sunt livrate în tuburi diferite, permite ca folosind aceleași condiții de ciclare, să realizăm detecția și

cuantificarea simultană în același tub a câte 2 agenți deodată (virusuri sau bacterii) + CI urmând protocolul de mai jos:

Se distribuie cu ajutorul unor micropipete în hota cu flux laminar PCR, volumele de reactivi pentru 25ul amestec final de reacție, date în tabelul 27.

| Pentru detecția CCHFV +TBEV (Virusuri)+ CI | C+ | Proba | C- |
|--|---|---|--|
| | -2,5μl mix reacție CCHFV -2,5μl mix reacție TBEV -2,5μl mix reacție CI -Tampon PCR 2X continand si dNTP-uri si enzima Taq polimeraza (TaqMan® Multiplex Master mix) 12,5μl -Template/Matrita: 1μl Positive Control CCHFV, 1μl Positive control TBEV, 1μl Positive control CI -Apa extrapura: 2μl | -2,5μl mix reacție CCHFV -2,5μl mix reacție TBEV -2,5μl mix reacție CI -Tampon PCR 2X continand si dNTP-uri si enzima Taq polimeraza (TaqMan® Multiplex Master mix) 12,5μl -Template/Matrita: 3 μl cDNA(obtinut din proba cu hexameri) -Apa extrapura: 2μl | -2,5μl mix reacție CCHFV -2,5μl mix reacție TBEV -2,5μl mix reacție CI -Tampon PCR 2X continand si dNTP-uri si enzima Taq polimeraza (TaqMan® Multiplex Master mix) 12,5μl -Template/Matrita: 3μl Apa -Apa extrapura: 2μl |
| Pentru Francisella si Borrelia +CI (Bacterii) | -2,5μl mix reacție Francisella -2,5μl mix reacție Borrelia -2,5μl mix reacție CI -Tampon PCR 2X continand si dNTP-uri si enzima Taq polimeraza (TaqMan® Multiplex Master mix) 12,5μl -Template/Matrita: 1μl Positive Control Francisella, 1μl | -2,5μl mix reacție Francisella -2,5μl mix reacție Borrelia -2,5μl mix reacție CI -Tampon PCR 2X continand si dNTP-uri si enzima Taq polimeraza (TaqMan® Multiplex Master mix) 12,5μl -Template/Matrita: 3μl -1μl Positive control CI(daca este DNA | -2,5μl mix reacție Francisella -2,5μl mix reacție Borrelia -2,5μl mix reacție CI -Tampon PCR 2X continand si dNTP-uri si enzima Taq polimeraza (TaqMan® Multiplex Master mix) 12,5μl -Template/Matrita: 3μl -Apa extrapura: 2μl |

| | | | |
|--|---|--|--|
| | Positive control Borrelia, 1µl Positive control CI -Apa extrapura: 2µl | extras din capuse atunci este 0) -Apa extrapura: 1sau 2µl | |
|--|---|--|--|

Tabel 27 Volume de reactivi pentru utilizarea kit-ului în regim multiplex

Tuburile, după ce au fost vortexate și centrifugate scurt, sunt introduse în termocicler-ul real-time unde sunt supuse la 45 de cicluri termice după programul dat în tabelul 6 (fara incubarea la 70°C/420sec/1 ciclu), cu mențiunea că achiziția de semnale fluorescente se face la sfârșitul etapei de termostatare la 60°C, iar detecția semnalelor fluorescente se va face astfel pentru fiecare agent/tub cu reactanți.

| Agentul / Tubul | C+ | Proba | C- |
|-----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| CCHFV +TBEV+CI | TET/FAM/Cy5 | TET/FAM/Cy5 | TET/FAM/Cy5 |
| Francisella + Borrelia + CI | FAM/TET/Cy5 | FAM/TET/C5y | FAM/TET/Cy5 |

Tabel 28 Canalele de achiziție a datelor de fluorescență pentru patogeni grupați câte doi, CI, controale pozitive, probe și controale negative

Rezultatele vor fi afișate de soft-ul fiecărui termocicler sub forma unor grafice unități arbitrare de fluorescență VS număr de cicluri sau în format logaritmic (asemănător Fig. 6)

Interpretarea datelor se va face pe baza tabelului 29.

| Agentul/Tubul | C+ | Proba | C- |
|-------------------------------------|---|---|---|
| CCHFV+ TBEV+CI | C _T 12-32 pe TET C _T 12-32 pe FAM C _T 12-32 pe Cy5 | C _T 12-35 pe TET C _T 12-35 pe FAM C _T 12-32 pe Cy5 | C _T 0 pe TET C _T 0 pe FAM C _T 0 pe Cy5 |
| Francisella+ Borrelia+CI | C _T 12-32 pe FAM C _T 12-32 pe TET C _T 12-32 pe Cy5 | C _T 12-35 pe FAM C _T 12-35 pe TET C _T 12-32 pe Cy5 | C _T 0 pe FAM C _T 0 pe TET C _T 0 pe Cy5 |

Tabel 29 Interpretare date de amplificare exprimate în valori C_T (valoarea C_T reprezintă locul unde curba de amplificare intersectează linia de trashhold și reprezintă ciclul la care s-a detectat amplificarea prin PCR) pentru patogeni, CI, controale pozitive, probe și controale negative

Dacă în cazul probelor, valoarea C_T este „0”, atunci probele se consideră negative; dacă însp valoarea C_T depășește 35, atunci pentru proba respectivă se repetă analiza și eventual se crește volumul de template/matriță din reacția PCR în dauna volumului de apă din reacție. Dacă valoarea C_T corespunzătoare CI este „0” în cazul probelor și/sau controlului pozitiv (C+), atunci reactivii implicați în reacția PCR sunt degradați și se vor înlocui.

Limita de detectie unei reactii tip Real-Time PCR este influentata de multi factori care pot fi grupati in doua categorii:

a) Condițiile de reactie

b) Omologia si specificitatea primerilor si sondelor fata de regiunea genomica tinta.

Daca in cazul kit-ului prezentat aici conditiile de reactie variaza destul de mult (se folosesc numeroase formulari comerciale de tamponi si polimeraze) conditiile de omologie sunt indeplinite si in acord cu literatura de specialitate (citata in tabel 4), cu studiul *in silico* si cautarea BLAST. Astfel consideram urmatoarele valori pentru limita de detectie (Tabel 30)

| Agentul patogen detectat | Limita de detectie singleplex |
|-------------------------------|--|
| <i>CCHFV</i> | 5 copii de echivalent genomic/reactie |
| <i>TBEV</i> | 50 copii de echivalent genomic/reactie |
| <i>JIC</i> | 50 copii de echivalent genomic/reactie |
| <i>Francisella tularensis</i> | <1 copii de echivalent genomic/reactie |
| <i>Borrelia burgdorferi</i> | 10 copii de echivalent genomic/reactie |

Tabel 30 Limita de detectie pentru fiecare patogen detectat de kit.

BIBLIOGRAFIE

În ordinea apariției în text:

1. Sakar M., Bio-terrorism On Six Legs: Insect Vectors Are The Major Threat To Global Health Security. WebmedCentral Public Health 1(12):WMC001282
2. Ceianu C., Panculescu-Gatej R.I., Coudrier D., Bouloy M., 2012; First serologic evidence for the circulation of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Romania; Vector Borne Zoonotic Diseases, Vol.Sep., 12(9):718-721.
3. Coipan E.C. & Al.F. Vladimirescu. 2011; *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) - vectors for Lyme disease spirochetes in Romania. Experimental and Applied Acarology, Vol.54 (3): 293-300.
4. Coipan E.C. & Al.F. Vladimirescu. 2010; First Report of Lyme disease Spirochetes in Ticks from Romania (Sibiu County). Experimental and Applied Acarology, Vol.52 (2): 193-197.
5. Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M, 2003. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. Nucleic Acids Res Vol.31: e56.
6. Wang J., Li Y., Kinjo Y., et al., 2010; Lipid binding orientation within CD1d affects recognition of *Borrelia burgdorferi* antigens by NKT cells; PNAS, Vol. 107, No.4: 1535-1540.

7. Vladimirescu A.F., Coipan E.C., Magureanu C. ,2011; RT-PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction) method for detection of *Borrelia burgdorferi s.l.* in ixodid vectors (*Ixodes ricinus*); Poster Sesiunea Stiintifica Anuala a USAMV.
8. Kugeler K. K. J., Gurfield N., Creek J. Et al, ,2005; Discrimination between *Francisella tularensis* and Francisella-Like Endosymbionts when Screening Ticks by PCR; Appl. Environ. Microbiol, Nov., Vol. 71, No. 11 : 7594–7597.
9. Versage L.J.,Severin D.D.M.,Chu M.C.,Petersen J.M. ,2003; Development of a Multitarget Real-Time TaqMan PCR Assay for Enhanced Detection of *Francisella tularensis* in Complex Specimens; Journal of Clinical Microbiology,Vol.41, No.12: 5492-5499.
10. Schweiger M. & Cassinotti P. 2003 Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (*TBEV*) RNA; Journal of Clinical Virology , Vol.27;136-145.
11. Yapar M.,Aydogan H.,Pahsa A,Besirbellioglu B.A.,Bodur H et al,2005; Rapid and quantitative detection of Crimeean-Congo hemorrhagic fever virus by one-step real-time reversetranscriptase-PCR; Japan J.Infect Dis ,Vol.58:358-362.
12. Wölfel R.,Paweska J.T.,Petersen N.et al.,2007;Virus detection and monitoring of viral load in Crimeean –Congo hemorrhagic fever virus patients; Emerg. Infect.Dis., Vol.13:1097-1100.
13. Altschul S.F.Madden T.L.,Schäffer A.A.,Zhang J.,Zhang Z.,Miller W.,Lipman D.J.;1997.; Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs; Nucleic Acids Research, Vol.25, No.17,3389-3402.
14. Thurner C.,Witwer C.,Hofacker I.L.,Stadler P.F. , 2004; Conserved RNA secondary structures in Flaviviridae genomes; J. Gen. Virol. Vol.84: 1113-1124.
15. Mohan, P. M. & Padmanabhan, R. ;1991; Detection of stable secondary structure at the 3' terminus of dengue virus type 2 RNA. Gene, Vol. 108: 185–191.
16. Mandl C.W.,Holzman H.,Meixner T.,Rauscher S, Stadler P.F. et al.,1998; Spontaneous and engineered deletions in the 3' noncoding region of tick-borne encephalitis virus: construction of highly attenuated mutants of a flavivirus; J. Virol., Vol.72: 2132-2140.
17. Pletnev A.G., Michael B., Kathyrin A.H. et al ,2001; Tick-borne Langat/mosquito-borne dengue flavivirus chimera, a candidate live attenuated vaccine for protection against disease caused by members of the tick-borne encephalitis virus complex: evaluation in Rhesus monkeys and in mosquitoes ; J.Virol. Vol.75(17): 8259-8267.
18. Gritsun T.S.,Desai A. & al.,2001; The degree of attenuation of tick borne encephalitis virus depends on the cumulative effects of point mutations; J.Gen.Virol.Vol. 82: 1667-1675.
19. Khromykh A. A. Kondratieva N., Sgro J.Y., Palemberg A. & Westaway E.G.,2003; Significance in replication of the terminal nucleotides of the flavivirus genome; J.Virol. Vol.77: 10623-10629.
20. Wengler G., Castle E.,1986;Analysis of structural properties which possibly are characteristic for the 3'-terminal sequence of the genome RNA of flaviviruses; J Gen.Virol ,Vol.67(Pt 6): 1183-1188.



21. Khromykh A. A., Meka H., Guyatt K.J. & Westway E.G. ,2001; Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication; J.Virol.Vol.75: 6719-6728.
22. Kofler R. M., Hoenninger V.M., Thurner C. & Mandl C.W., 2006; Functional analysis of the tick-borne encephalitis virus cyclization elements indicates major differences between mosquito-borne and tick-borne flaviviruses; J.Virol. Vol.80: 4099-4113.
23. Mandl C.W. 2005; Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis; Virus Res. Vol.111: 161-174.
24. Mandl C. W., Holzmann H., Kunz C. & Heinz F. X.,1993;Complete genomic sequence of Powasan virus:evaluation of genetic elements in tick-borne versus mosquito-borne flaviviruses; Virology Vol. 194:173-184.
25. Hoenninger V. M., Rouha H., Orlinger K.K. et al., 2008; Analysis of the effects of alterations in the tick-borne encephalitis virus 3'-noncoding region on translation and RNA replication using reporter replicons;Virology Vol.377: 419-430.
26. Sakai M, Yoshii K, Sunden Y, Yokozawa K, Hirano M, Kariwa H.,2014; Variable region of the 3' UTR is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model. J.Gen.Virol. Apr; Vol.95(Pt 4):823-35. doi: 10.1099/vir.0.060046-0. Epub 2014 Jan 6.
27. Chinikar S, Shah-Hosseini N., Bouzari S.2, et al.,2016; Assessment of Recombination in the S-segment Genome of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Iran;Arthropod-Borne Dis, Vol.10(1): 12–23.
28. Garcia S, Chinikar S, Coudrier D, Billecocq A, et al.,2006; Evaluation of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus recombinant antigen expressed by Semliki Forest suicide virus for IgM and IgG antibody detection in human and animal sera collected in Iran; J.Clin. Virol., Vol. 35: 154–159.
29. Han N. & Rayner S., 2011; Epidemiology and mutational analysis of global strains of Crimeean-Congo haemorrhagic fever virus; Virologica Sinica, Vol.26:229-244.
30. Bente, D. A., Forrester, N. L., Watts, D. M.,et al., 2013; Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity; Antiviral. Res. Vol.100: 159–189.
31. Atkinson B.,Chamberlain J.,Logue Ch. H.,Cook N.,Bruce Ch.,Dowall S.D.,Hewson R. ,2012: Development of a Real-Time RT-PCR Assay for the Detection of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus; Vector-Borne and Zoonotic Diseases, Vol.12, No.9, 786-792.
32. Larson M.A.,Nalbantoglu U.,Sayood K.,Zentz E.B.,Bartling A.M.,Francesconi S.C. et al.,2015: *Francisella tularensis* Subtype A II Genomic Plasticity in Comparison with Subtype A I; PloS ONE 10(4):e0124906.
33. Thomas R. A., Johansson B.,Neeson D. et al.,2003; Discrimination of human pathogenic subspecies of *Francisella tularensis* by using restriction fragment length polymorphism; J.Clin.Microbiol. Vol.41: 50-57.
34. Yang J.,Liu Z.,Guan G.,et al., 2012; Evaluation of molecular methods for detection of *Borrelia burgdorferi* senso lato in ticks; Diagnostic Microbiol. & Infectious Diseases, Vol.73 (1):80-83.

35. Wallich R., Helmes C., Schaible U.E., et al., 1992; Evaluation of Genetic Divergence among *Borrelia burgdorferi* Isolates by Use of OspA, fla, HSP60, and HSP70 Gene Probes; *Infection and Immunity*, Vol.60(11): 4856-4866.
36. Wodecka B., Leońska A., Skotarczak B. ; 2010; A comparative analysis of molecular markers for the detection and identification of *Borrelia spirochaetes* in *Ixodes ricinus*. *J.Med.Microbiol.* Vol.59 (Pt 3): 309-314.
37. Rosa P.A. & Schwan T.G., 1989; A specific and sensitive assay for the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction; *J.Infect.Dis.* Vol.160 (6) : 1018-29.
38. Schweiger M. , Péter O., Cassinotti P., 2001; Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a real-time PCR assay; *Clinical Microbiology and Infection*, Vol.7(.9): 461- 469.
39. TaqMan Gene Expression Assay Solution 2012, Life Technologies Corporation, pag.8.



REVENDICĂRI

1. Kit de reactivi pentru detecția moleculară de agenți virali *TBEV* și *CCHFV* și bacterieni, *Francisella tularensis* și *Borrelia burgdorferi s.l.* transmiși de căpușe (Ixodoidea) la om și animale, caracterizat prin aceea că acesta conține:

a) - un amestec gata de folosință de primeri și sonde moleculare pentru detecția celor 4 patogeni, aflați într-o combinație optimă de reacție, în care se realizează pe de-o parte, modificarea moleculelor fluorescente (fluorocromilor) de la capatul 5' al sondei moleculare DNA de tip TaqMan[®] (ceea ce permite utilizarea unei game largi de termociclere și analiza simultană a 2 agenți patogeni în sistem multiplex sau 4 agenți simultan în sistem singleplex), iar pe de alta parte se realizează modificarea moleculei de stingere a fluorescenței (quencer) de la capatul 3' al sondei moleculare tip TaqMan[®] (ceea ce reduce fundalul de fluorescență generată de utilizarea altor molecule de stingere, fluorescente și crește sensibilitatea de cca. 10 ori prin folosirea quencerilor nonfluorescenți de tip MGB-NFQ: Minor Groove Binding- Non Fluorescence Quencer).

b) -un control intern de reacție ce contine primerii și sonda caracteristică pentru Ixodide;

b1)- CI Ixodes ricinus DNAm t 16S -Secvența obținută prin amplificarea prin PCR a DNA genomic total în laboratoarele proprii, DNA provenit de la un pool de 5 căpușe (femele) de *Ixodes ricinus* recoltate din vegetație (questing ticks), nehrănite din localitatea Brateiu, Jud. Sibiu în Mai 2009 amplificat prin PCR clasic, conform protocolului descris.

c)-controale pozitive pentru toți patogenii țintă, după cum urmează:

c1) - *Borrelia burgdorferi s.l.*- Secvența sens, obținută prin amplificarea prin PCR clasic a genomului DNA din *Borrelia burgdorferi* tulpina IRS, conform protocolului PCR descris

c2) - *Francisella tularensis s-* Secvența sens obținută prin amplificarea prin PCR clasic a genomului DNA din *Francisella tularensis* tulpina LVS (Amplirun[®] *Francisella tularensis* DNA control MB110; produs de Vircell-Microbiologists) conform protocolului PCR descries.

c3) - CCHFV Secvența de sinteză obținută prin amplificarea prin PCR clasic a matriței DNA sintetic monocatenară, produsă la comandă de către GeneArt[™]Strings[™]DNA Fragments, conform protocolului PCR descris.

c4) - TBEV- Secvența obținută prin amplificarea prin Revers-Transcriere PCR a genomului RNA din TBEV tulpina Hypr aflată în laboratoarele proprii, conform protocolului PCR descris.

2. Kit de reactivi pentru detecția moleculară de agenți virali TBEV și CCHFV și bacterieni, *Francisella tularensis* și *Borrelia burgdorferi s.l.*, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că în scopul utilizării kit-ului atât în regim sigleplex cât și în regim multiplex, condițiile de incubare ale probei biologice în termociclerul real-time se face atât pentru amestecul de reacție viral, cât și cel bacterian cu același program de amplificare care presupune menținerea timp de 10 sec la o temperatura de 95 °C și apoi timp de 40 sec. la 60 °C într-o secvență care se repetă de 45 de ori, achiziția de semnale fluorescente făcându-se la trecerea de la 95 la 60 °C, iar detecția semnalelor fluorescente se face în mod specific pentru fiecare agent/tub cu reactanți, astfel că din aceeași proba biologică se poate testa simultan pe aceeași platformă real time PCR în tuburi diferite toți cei 4 agenți și controlul intern, folosind aceleași condiții de termociclare.

3. Kit de reactivi pentru detecția moleculară de agenți virali TBEV și CCHFV și bacterieni, *Francisella tularensis* și *Borrelia burgdorferi s.l.* transmiși de căpușe (Ixodoidea) la om și animale, conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că pentru utilizarea sa în sistem singleplex se aplică un protocol specific care implică:

- distribuirea cu ajutorul unor micropipete în hota cu flux laminar PCR, de volume bine specificate și descrise de reactivi pentru 25μl amestec final de reacție:

-după ce tuburile au fost vortexate și centrifugate scurt sunt introduse în termociclerul real-time unde sunt supuse la 45 de cicluri termice după programul din revendicarea 2;

-se afișează rezultatele de către de soft-ul fiecărui termocicler sub forma unor grafice unități arbitrare de fluorescență VS număr de cicluri sau în format logaritmic;

-interpretarea datelor pe baza valorilor C_T conform tabelului specificat.

4 Kit de reactivi pentru detecția moleculară de agenți virali TBEV și CCHFV și bacterieni, *Francisella tularensis* și *Borrelia burgdorferi s.l.* transmiși de căpușe (Ixodoidea) la om și animale, conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că pentru utilizarea sa în sistem multileplex se aplică un protocol specific care implică:

-distribuirea cu ajutorul unor micropipete în hota cu flux laminar PCR, de volume de reactivi pentru 25μl amestec final de reacție, bine specificate și descrise;

- după ce tuburile au fost vortexate și centrifugate scurt sunt introduse în termocicler-ul real-time unde sunt supuse la 45 de cicluri termice după programul conform revendicării 2;
- afișarea rezultatelor de către soft-ul fiecărui termocicler sub forma unor grafice unități arbitrare de fluorescență VS număr de cicluri sau în format logaritmic;
- interpretarea datelor pe baza valorilor C_T , pe grupe de agenți patogeni, conform tabelului specificat.

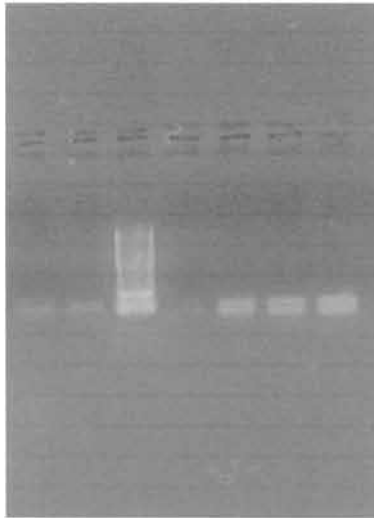


Fig. 1

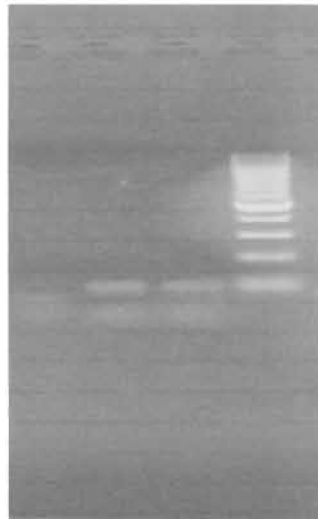


Fig. 2



Fig. 3

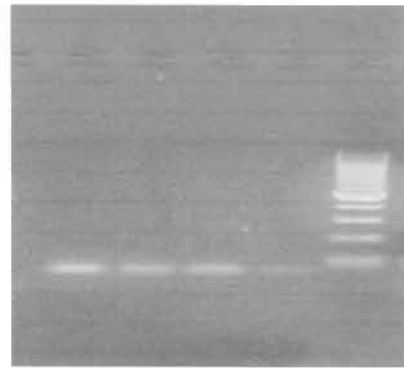


Fig. 4

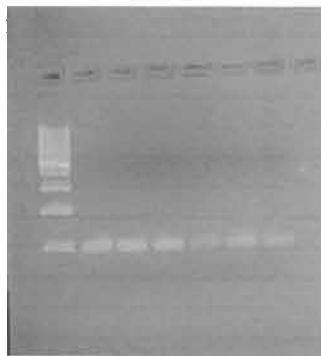


Fig. 5

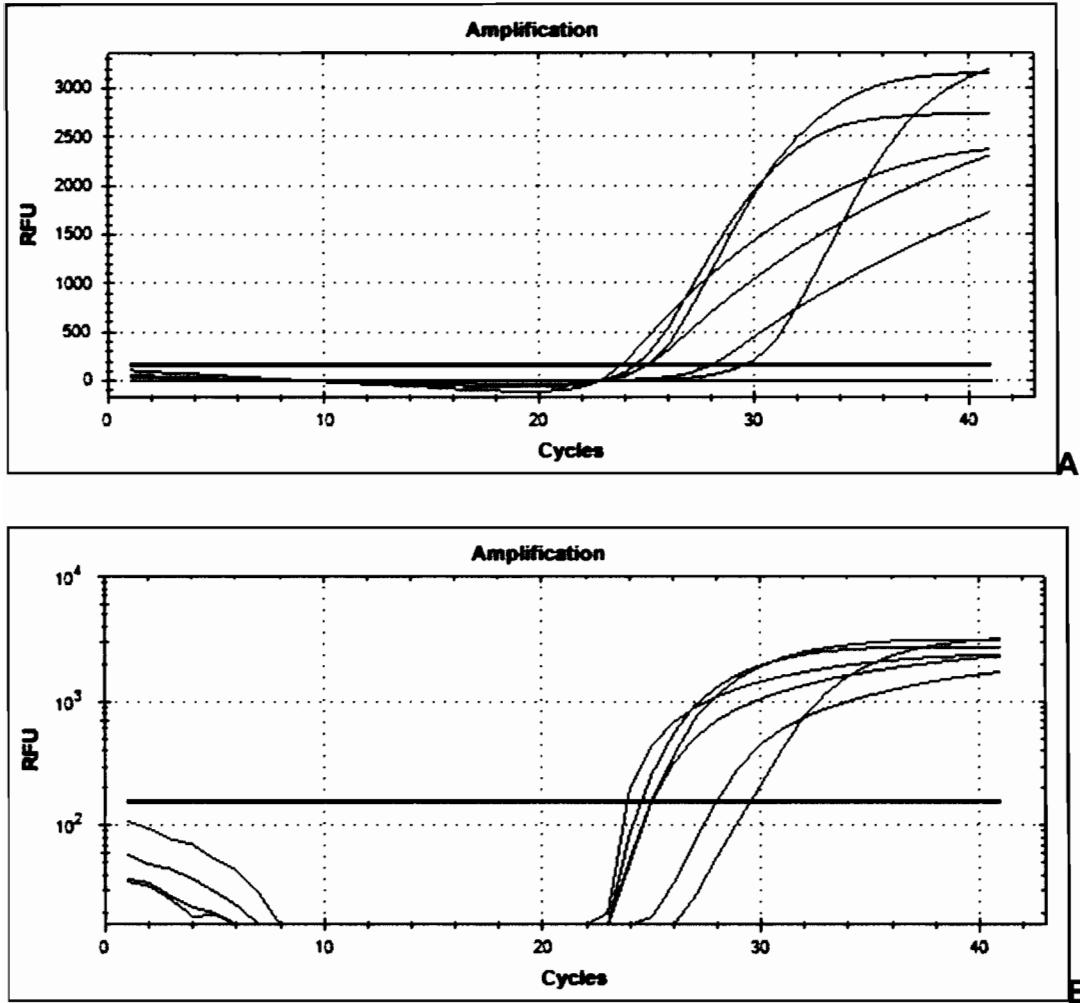


Fig. 6

