



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00761**

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

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30/06/2021** BOPI nr. **6/2021**

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

(73) Titular:

- **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, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, 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,**  
*BDUL.ION 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*

(56) Documente din stadiul tehnicii:

- **L. M. SCHOOLS, I. VAN DE POL, S. G. RIJPKEMA, C. S. SCHOT, "DETECTION AND IDENTIFICATION OF EHRlichia, BORRELIA BURGDORFERI SENSU LATO, AND BARTONELLA SPECIES IN DUTCH IXODES RICINUS TICKS", JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY,**  
*PP. 2215-2222, 1999; EP 2267161; EP 1895015*

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

Examinator: biochimist EREMIA LAURA



Orice persoană are dreptul să formuleze în scris și motivat, la OSIM, o cerere de revocare a brevetului de invenție, în termen de 6 luni de la publicarea mențiunii hotărârii de acordare a acesteia

# RO 133178 B1

1           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  
3 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  
5 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  
7 detecției și identificării rapide a prezenței celor mai importanți patogeni transmiși de căpușe,  
cunoscută fiind importanța bolilor transmise de vectori și necesitatea pregătirii răspunsului  
9 în fața amenințării ce o reprezintă aceste boli: boala Lyme, tularemia, encefalita de căpușe  
și febra hemoragică Crimeea-Congo.

11           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  
13 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  
15 emergența vectorilor, precum și emergența bolilor pe care aceștia pot să le transmită ca  
potențiale amenințări de bioterorism. Mai mult, schimbările climatice afectează profund  
17 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  
19 (inclusiv căpușele) se prelungeste, fapt ce potențează folosirea unor astfel de agenți într-un  
atac bioterorist. De asemenea, căpușele (ixodidele) sunt considerate deosebit de importante  
21 pentru medicina veterinară și pentru sănătatea umană fiind implicate în transmiterea unor  
boli emergente sau în transmiterea unor microorganisme și particule virale folosite drept  
23 arme biologice (CCHFv, *Francisella tularensis* și TBEv).

În funcție de rata de transmitere, doza infectantă, impactul economic cauzat și  
25 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-  
27 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  
29 categorii descriu agenți biologici de risc foarte mare pentru populația umană și care consti-  
tuie adevărate arme biologice, ce pot fi utilizate și într-un atac bioterorist. Vectorii (căpușele)  
31 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  
33 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  
35 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*  
37 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  
39 comando, condiții vitrege de supraviețuire etc) și/sau prin intermediul vectorilor (căpușelor)  
la atacul acestor agenți biologici.

41           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  
43 animale sau umane viremice. În Europa, CCHF este considerată o boală endemică în țări  
aproprite sau vecine cu România, precum: Bulgaria, Ucraina și regiunea Kosovo.

45           În România, geoclimatul și condițiile ecologice permit menținerea circulației TBEv în  
focare naturale, situație confirmată și de epidemia din 1999. Circulația arbovirusurilor în  
47 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 E.C. & Al.F. Vladimirescu. 2011; *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) - vectors for Lyme disease spirochetes in România. Experimental and Applied Acarology, Vol.54 (3): 293-300; Coipan E.C. & Al.F. Vladimirescu. 2010; First Report of Lyme disease Spirochetes in Ticks from România (Sibiu County). Experimental and Applied Acarology, Vol. 52(2): 193-197) 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/ințepătura 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 ADN 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 J, Pingoud A, Hahn M, 2003. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. Nucleic Acids Res Vol. 31: e56).

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 ADN-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 rezervor, 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 ADN-ului de *B. burgdorferi* în diferite probe include: PCR clasic, nested PCR, PCR competitiv și desigur, Real-Time PCR

1 (Wang J.,Li Y., Kinjo Y.,et al., 2010; Lipid binding orientation within CD1d affects  
2 recognition of *Borrelia burgdorferi* antigens by NKT cells; PNAS, Vol. 107, No.4: 1535-  
3 1540). Metoda Real-Time PCR a fost utilizată pentru detecția, cuantificarea și genotiparea  
4 tulpinilor de *B. burgdorferi* atât în căpușe, cât și la pacienți (Wang J., Li Y.,Kinjo Y., et al.,  
5 2010; Lipid binding orientation within CD1d affects recognition of *Borrelia burgdorferi*  
6 antigens by NKT cells; PNAS, Vol. 107, No. 4: 1535-1540).

7 Sensibilitatea izolării ADN din diferite surse a fost comparată atât în varianta  
8 manuală, cât și automată tot prin această tehnică. Cu toate acestea, s-au folosit un număr  
9 restrâns de gene țintă pentru amplificarea prin Real-Time PCR (exemplu: *ospA*, *rrs*, *hbb*,  
10 *recA*), iar mărimea produsului de amplificare (ampliconului) a fost de 100-200 pb, în compa-  
11 rație cu cele generate prin PCR-ul clasic. Sensibilitatea și specificitatea, precum și reproduc-  
12 tibilitatea metodelor Real-Time PCR, incluzând și Real-Time cantitativ (quantitative qPCR),  
13 pot fi afectate de o multitudine de factori, precum proprietățile primerilor și sondelor molecu-  
14 lare alese, calitatea ADN-ului extras, tipul de marcaj fluorescent folosit (agent de intercalare  
15 SYBR Green sau sonde de hibridizare), precum și de condițiile de amplificare (Wang J.,Li  
16 Y., Kinjo Y., et al., 2010; Lipid binding orientation within CD1d affects recognition of  
17 *Borrelia burgdorferi* antigens by NKT cells; PNAS, Vol. 107, No. 4: 1535-1540).

18 Până acum au fost realizate studii de identificare a genospeciilor de *B. burgdorferi*  
19 s.l. în căpușe provenite din diferite localități ale țării, prin metoda PCR-RLB (Coipan E.C. &  
20 A.I.F. Vladimirescu. 2011; *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) - vectors for Lyme  
21 disease spirochetes in România. *Experimental and Applied Acarology*, Vol.54 (3): 293-  
22 300; Coipan E.C. & A.I.F. Vladimirescu. 2010; First Report of Lyme disease Spirochetes  
23 in Ticks from România (Sibiu County). *Experimental and Applied Acarology*, Vol. 52(2):  
24 193-197). Rezultatele publicate au fost reconfirmate și prin Real-Time PCR pentru căpușele  
25 analizate provenite din Jud.Tulcea (Coipan E.C. & A.I.F. Vladimirescu. 2011; *Ixodes*  
26 *ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) - vectors for Lyme disease spirochetes in România.  
27 *Experimental and Applied Acarology*, Vol. 54 (3): 293-300).

28 Prezența unor simbiozi Francisella-like aflați în diferite specii de căpușe ce transmit  
29 tularemia, complică și mai mult intenția de identificare a *F. Tularensis* via PCR (Kugeler K.  
30 K. J., Gurfield N. Creek J. Et al., 2005; Discrimination between Francisella tularensis  
31 and Francisella-Like Endosymbionts when Screening Ticks by PCR; *Appl. Environ.*  
32 *Microbiol*, Nov., Vol. 71, No. 11:7594-7597).

33 Pentru cele mai numeroase bacterii, cea mai folosită genă pentru identificare și studii  
34 filogenetice este cea pentru 16S RNA (Scoles et al., 2004 citat de Kugeler et al., 2005).  
35 Având un grad foarte mare de similaritate, secvențele genelor pentru 16S RNA provenite de  
36 la câteva alte organisme decât *Francisella*, au fost clasificate ca aparținând familiei  
37 *Francisellaceae*, acestea incluzând și bacteriile intracelulare *Wolbachia persica* și alte  
38 bacterii *Francisella-like* care nu transmit boala. Astfel, a fost dezvoltată o strategie de utili-  
39 zare a unor gene specifice pentru *Francisella* și care prezintă un înalt grad de conservare.  
40 Un exemplu îl constituie secvențele genomice *ISFtu2*, *tul4* și *iglC19*, din care *ISFtu2* este o  
41 secvență de inserție (element genetic mobil), gena *tul4* codifică o proteină din membrană  
42 externă, iar *iglC19* este exprimată abundant în timpul infecției macrofagelor (Kugeler K. K.  
43 J., Gurfield N., Creek J. Et al, 2005; Discrimination between Francisella tularensis and  
44 Francisella-Like Endosymbionts when Screening Ticks by PCR; *Appl. Environ.*  
45 *Microbiol*, Nov., Voi. 71, No. 11 : 7594-7597). Pe baza acestor secvențe au fost concepute  
46 protocoale de detecție Real-Time PCR folosind sonde moleculare tip TaqMan® în sistem  
47 multiplex în așa fel încât, dacă se obțin semnale pozitive pentru toate cele 3 gene, atunci

# RO 133178 B1

este identificată *F. tularensis* în proba de analizat (**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**). 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 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**).

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 h) și includ două etape: una de sinteză a cADN, urmată de PCR clasic și electroforeză în gel de agaroză pentru vizualizarea produși lor 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 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**).

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, (**Wolfel 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.**) au descris o metodă Real-Time pentru detecția tuturor tulpinilor virulente de CCHFV circulante.

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 100 μl de probă. De asemenea 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

# RO 133178 B1

1 om precum tifosul cu transmitere inclusiv prin păduchi sunt importante din punct de vedere  
epidemiologie, dar nu pot fi ușor transformate în arme biologice așa cum ar fi utilizarea  
3 *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  
5 neurologice în timp.

Amplisens®CCHFV-FRT PCR Kit (Amplisens-Rusia) este un kit de detecție  
7 moleculară prin Real-Time-PCR dedicat identificării și cuantificării CCHFV, având o limită de  
detecție de  $5 \times 10^3$  copii genomice/ml. Dezavantajul este că permite detecția unui singur  
9 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.

11 RealStar CCHFV RT-PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics) este un kit de detecție mole-  
culară prin Real-Time PCR - folosind canalul FAM™ ptr probe și JOE™ (este denumirea  
13 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  
15 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  
17 comerciale comparativ cu 13 câte poate utiliza invenția de față.

FTD CCHFV (Fast-Track Diagnostics) este un kit de detecție moleculară prin Real-  
19 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  $10^2$   
21 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  
23 comparativ cu 13 câte poate utiliza invenția de față.

TaqMan® *Francisella tularensis* Detection Kit (Applied Biosystems) este un kit de  
25 detectiv 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  
27 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  
29 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.

31 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  
33 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  
35 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  
37 kit-ul inventat.

Tick Borne *Encephalitis Virus (TBEV)* Real Time RT-PCR Kit (Liferiver) este un kit  
39 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. Limita  
41 de detecție este de 10 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 utili-  
43 zat 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  
45 patogen în parte, sau grupați câte 3 (exemple: AmpliSens® TBEV, *B. burgdorferi* și, *A.*  
*phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris* - FRT PCR kit, de la InterLab Service) dar nu și

# RO 133178 B1

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 (exemple: kit B-Tplex, pentru detecția *B. anthracis*, *F. tularensis*, *Y. pestis*, și *Variola major*, produs de Prodesse/Socochim). 1 3

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  $5 \times 10^3$  echivalenți genomici/ml. Dezavantajul este că permite detecția a 2 agenți din cei 4 pe care kit-ul conform prezentei invenții îi identifică și poate fi utilizat numai pe 6 platforme real-time PCR comerciale comparativ cu 13 câte poate utiliza kit-ul de față. 5 7 9 11

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. 13 15 17 19

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 cADN (cu primeri random, hexamerici) și cu kit-urile de izolare de ARN/ADN total din diferite probe biologice de diferite origini. 21 23 25 27

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 prin folosirea unui kit de reactivi pentru detecția moleculară a agenților virali. 29 31

Kitul de reactivi pentru detecția moleculară a agenților virali TBEV și CCHFV și bacterieni, *Francisella tularensis* și *Borrelia burgdorferi s.l.* transmiși de căpușele Ixodoidea la om și animale, conform invenției, înlătură dezavantajele de mai sus prin aceea că aceasta conține: 33 35

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, cum ar fi a fluorocromilor, de la capătul 5' al sondei moleculare ADN de tip TaqMan®, care 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 altă parte se realizează modificarea moleculei de stingere a fluorescenței, denumiți quencer, de la capătul 3' al sondei moleculare tip TaqMan®, care reduce fundalul de fluorescență generată de utilizarea altor molecule de stingere, fluorescente și crește sensibilitatea de circa 10 ori prin folosirea quencerilor nonfluorescenți de tip MGB-NFQ: Minor Groove Binding - Non Fluorescence Quencer; 37 39 41 43 45

# RO 133178 B1

1 b. un control intern de reacție ce conține primeni și sonda caracteristică pentru  
Ixodide;

3 b1. CI *Ixodes ricinus* DNAMt 16S - secvența obținută prin amplificarea prin PCR a  
ADN-ului genomic total în laboratoarele proprii, ADN provenit deja un pool de 5 căpușe,  
5 femele de *Ixodes ricinus* recoltate din vegetație, questing ticks, amplificat prin PCR clasic,  
conform protocolului descris;

7 c. controale pozitive pentru toți patogenii țintă, după cum urmează:

9 c1. *Borrelia burgdorferi s.l.* - secvența sens, obținută prin amplificarea prin PCR clasic  
a genomului ADN din *Borrelia burgdorferi* tulpina 1RS, conform protocolului PCR descris;

11 c2. *Francisella tularensis s* - secvența sens obținută prin amplificarea prin PCR clasic  
a genomului ADN din *Francisella tularensis* tulpina LVS, Amplirun® *Francisella tularensis*  
ADN control MB110; produs de Vircell-Microbiologists, conform protocolului PCR descris;

13 c3. CCHFV - secvența de sinteză obținută prin amplificarea prin PCR clasic a matriței  
de ADN sintetic monocatenară, produsă la comandă de către GeneArt™Strings™DNA  
15 Fragments, conform protocolului PCR descris;

17 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.

19 Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

21 -folosirea kit-ului de cât mai mulți utilizatori, crescând astfel nivelul de pregătire pentru  
securizarea operațiilor militare în eventuala utilizare a acestor agenți (CCHFV, TBEV,  
*Francisella tularensis*) într-un atac bioterorist și în fața bolilor emergente transmise de  
23 căpușe.

25 -detectarea simultană a 4 dintre cei mai importanți agenți patogeni transmiși de  
căpușe.

27 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  
29 simultan (chiar dacă genomurile lor sunt heterogene, unii patogeni cu genom ARN, alții cu  
genom ADN) din aceeași probă biologică.

31 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  
33 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  
35 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  
37 pentru detecția calitativă și cantitativă a prezenței genomurilor de *Borrelia burgdorferi s.l.*,  
*Francisella tularensis*, virusul encefalitei de căpușă (TBEv) și virusul febrei hemoragice  
39 Crimeea-Congo (CCHFv) în probe biologice diferite (căpușe-vector, sânge, lichid cefalo-  
rahidian, țesuturi animale-rezervor) prin tehnica Real-Time, folosind sonde moleculare de  
41 hibridizare marcate fluorescent.

43 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  
45 stă la dispoziția cercetătorilor din diferite domenii și permite analiza probelor biologice de  
origine diferită într-o manieră convenabilă-unitară, crescând astfel eficiența studiilor de  
47 screening și supraveghere a bolilor transmise de căpușe.



# RO 133178 B1

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/muşcăături transmițând agenții patogeni în populația umană (**Sakar  
M, Bio-terrorism On Six Legs: Insect Vectors Are The Major Threat To Global Health  
Security. Webmed Central Public Health 1(12): WMC001282).**

Invenția se bazează pe tehnologia Real-Time PCR (RT-PCR) care se realizează prin  
amplificarea unor segmente genice de ARN reverstranscris în cADN și/sau ADN aflate în  
structura agenților virali și bacterieni antemenționați în prezența unor secvențe monoca-  
tenare de nucleotide (denumite primeri) și a unui mediu de reacție care să susțină poli-  
merizarea *in vitro* a ADN-ului (soluție tampon, dNTP mix) în prezența unei ADN-polimeraze  
termostabile (exemplu: Taq polimeraza cu activitate exonucleazică). Producții de amplificare  
(ampliconii, cu dimensiuni cuprinse între 60-180 pb) au fost evidențiați pe măsura ce se  
formau (în timp real) prin cuplajul pe bază de omologie cu sonde moleculare ADN hidrolizabile  
(tehnologie TaqMan<sup>®</sup>) 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 ADN, 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 obiec-  
tul 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 ARN (virusurile CCHF și TBE) și agenți cu genom ADN (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  
ADN se află câte o moleculă de FAM<sup>™</sup>/TET<sup>™</sup> 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'-Cy5<sup>™</sup>, iar la capătul  
3'-BHQ<sup>®</sup> 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 condiții de termociclar.

Marcarea cu fluorocromii sus-amintiți permite folosirea kit-ului pe un număr mare de  
platforme real-time conform tabelului 1. Dozajul, limitele de detecție, curbele de calibrare sunt  
proprii acestui kit.

# RO 133178 B1

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

Tabelul 1

Model termocicler și Producătorul	Canal detecție 1	Canal detecție 2	Canal detecție 3	Canal detecție 4	Canal detecție 5	Canal detecție 6	Canal detecție 7
Rotor-Gene Q 5plex (QIAGEN)	FAM	TET	-	Cy5	-	-	-
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
Smart Cycler (Cepheid)	FAM	TET	-	Cy5	-	-	-
Chromo 4 (Bio-Rad Laboratories)	FAM	TET	-	Cy5	-	-	-
iCyclerIQ (Bio-Rad Laboratories)	FAM	TET	-	Cy5	-	-	-
iCyclerIQ5 (Bio-Rad Laboratories)	FAM	TET	-	-	Cy5	-	-
CFX96 (Bio-Rad Laboratories)	FAM	TET	-	Cy5	-	-	-
CFX 384 (Bio-Rad Laboratories)	FAM	TET	-	Cy5	-	-	-

În continuare, se dă un exemplu de realizare în legătură și cu figurile 1 până la 6 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 100 pb; 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 100 pb;

- fig. 3, amplificare PCR pentru CCHFV S cADN fragment (ampliconi 122 pb). Electroforeză în gel de agaroză LMP (low melting point) 2%; Marker greutate moleculară 100 pb; 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 100 pb; 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 Cepheid 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.

# RO 133178 B1

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 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**) și anume o interfață informatică care permite  
compararea oricărei secvențe ADN/ARN 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 C., Witwer C., Hofacker I.L., Stadler P.F., 2004; Conserved RNA secondary  
structures in Flaviviridae genomes; J. Gen. Virol. Vol. 84: 1113-1124**). 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 ARN viral (**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.**). Regiunile 3'UTR și 5'UTR ale ARN  
conțin secvențe complementare care produc ciclizare, necesară pentru legarea la enzima  
NS5 ARN dependent de ARN polimeraza și inițierea sintezei catenei ARN 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 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; 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**). Secvența  
nucleotidică a regiunii 3'UTR include un motiv pentanucleotidic (GAGAG) (**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; 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; 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**), strict conservat  
printre toate flavivirusurile. Alte elemente importante sunt reprezentate de caseta  
homopurinică și homopirimidinică și de secvența responsabilă pentru circularizarea  
genomului (**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: 6719-728;**

# RO 133178 B1

1 Kofler R. M, Hoenninger V. M., Thurner C. & Mandl C.W., 2006; Funcțional analysis of  
the tick-borne encephalitis virus cyclization elements indicates major differences  
3 between mosquito-borne and tick-borne flaviviruses; *J. Virol.* Vol. 80: 4099-4113;  
Mandl C. W. 2005; Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that  
5 affect neuropathogenesis; *Virus Res.* Vol. 111: 161-174; Mandl C. W., Holzmann H.,  
Kunz C. & Heinz F. X., 1993; Complete genomic sequence of Powasan virus: evaluation  
7 of genetic elements in tick-borne versus mosquito-borne flaviviruses; *Virology* Vol.  
194: 173-184; Thurner C., Witwer C., Hofacker I. L., Stadler P. F., 2004; Conserved RNA  
9 secondary structures in Flaviviridae genomes; *J. Gen. Virol.* Vol. 84:1113-1124.).

11 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  
13 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:  
15 construction of highly attenuated mutants of a flavivirus; *J. Virol.*, Vol. 72:2132-2140;  
Hoenninger V. M., Rouha H., Orlinger K.K. et al., 2008; Analysis of the effects of  
17 alterations in the tick-borne encephalitis virus 3'-noncoding region on translation and  
RNA replication using reporter replicons; *Virology* Vol. 377: 419-430) și posibil  
19 exacerbare a patogenității în corelație cu mutațiile de la acest nivel (Sakai M, Yoshii K,  
Sunden Y, Yokozavva K, Hirano M, Kariwa H., 2014; Variable region of the 3' UTR is a  
21 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.*  
23 *Epub 2014 Jan 6*). Noi am folosit ca țintă de detecție regiunea cuprinsă între 11054-11121  
nt din genomul TMF (tulpina Neudorf U27495; după Schweiger M., Peter O., Cassinotti P.,  
25 2001; Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (sensu lato) infections using a  
real-time PCR assay; *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 7(9): 461-469).

27 Pentru *CCHFV*: Segmentul S (small) are aproximativ 1,7 kb și o singură regiune ORF  
(Open Reading Frame) care codifică proteina N nucleocapsidară (Chinikar S, Shah-  
29 Hosseini N., Bouzari S., et al., 2016; Assessment of Recombination in the S-segment  
Genome of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Iran; *Arthropod-Borne Dis*,  
31 Vol. 10(1): 12-23) cu greutatea de aproximativ 53 kDa considerată antigen major care induce  
un răspuns imun puternic la animalele infectate (Garcia S, Chinikar S, Coudrier D,  
33 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  
35 antibody detection in human and animal sera collected in Iran; *J. Clin. Virol.*, Vol. 35:  
154-159). Această proteină joacă un rol în încapsidarea ARN viral, formând complexe  
37 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,  
39 precum și cu alte molecule de proteina N formând multimeri (Han N. & Rayner S., 2011;  
*Epidemiology and mutational analysis of global strains of Crimeean-Congo  
haemorrhagic fever virus; Virologica Sinica*, Vol. 26: 229-244).

41 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*  
43 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.  
45 Reasortarea unor segmente genomice în timpul co-infecției căpușelor pe vertebrate poate  
fi o cauză importantă pentru generarea diversității genomice și modificarea potențialului

# RO 133178 B1

patogen (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).

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 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, Wolfel 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; 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). 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 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).

Pentru *Francisella tularensis*: *F. tularensis* coexistă la nivel celular și/sau tisular în organismele vectoare (căpușe) și cu alți endosibionți de origine bacteriană (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) 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 igIC 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) (Tabelul 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/nucore/240248234?report=graph>

Tabelul 2

Label	From	To	Strand
istftu2	103101	103844	Positive
istftu2	218947	219690	Negative
istftu2	323934	324677	Negative
istftu2	352087	352548	Negative

# RO 133178 B1

Tabelul 2 (continuare)

Label	From	To	Strand
istftu2	381347	381820	Positive
istftu2	383702	384445	Posirive
istftu2	582508	583251	Negative
istftu2	606904	607647	Negative
istftu2	753264	754007	Positive
istftu2	876765	877508	Positive
istftu2	1121516	1122259	Positive
istftu2	1296406	1286891	Positive
istftu2	1370445	1371188	Negative
istftu2	1483215	1483958	Positive
istftu2	1516518	1517261	Negative
istftu2	1576231	1576974	Negative

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

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

Tabelul 3

Elemente IS A.IaA.IIa	Tulpini de <i>Francisella tularensis</i> cu genomul secvențiat în GenBank			
	SCHU S4	NE061598	WY96-3418	WY-00W4114
ISFtul (IS630)	47 (3)	47 (3)	48 (8)	48 (8)
ISFtu2 (IS5)	13 (3)	13 (3)	18b (18)	18b (18)
ISFtu3 (ISNCY, ISHpa-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)
ISSod 13(IS3)	1	1	1	1
TOTAL	66 (8)	66 (8)	71 (30)	71 (30)

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 (Tabelul 3) în genomul diferitelor specii și subspecii *Francisella* (Thomas R. A., Johansson B., Neeson D. et al., 2003; Discrimination of

# RO 133178 B1

human pathogenic subspecies of <i>Francisella tularensis</i> by using restriction fragment length polymorphism; <b>J. Clin. Microbiol. Vol. 41: 50-57</b> ):	1
- 12-17 copii în <i>F. tularensis subsp. tularensis</i> ;	3
- 26-30 copii în <i>F. tularensis subsp. holarctica</i> ;	
- 6-18 copii în <i>F. tularensis subsp. novicida</i> ;	5
- 1-2 copii în <i>F. philomiragia</i> .	
Reacția Real-Time PCR ISFtu2 s-a dovedit mult mai sensibilă decât cele care au țintit genele 23 kDa, tul4 și fopA, cu o limită a detecției de un organism atât pentru <i>F. tularensis subsp. tularensis</i> cât și pentru <i>F. tularensis subsp. holarctica</i> ( <b>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</b> ).	7
Acești autori au obținut următoarele rezultate:	9
- lipsa reacțiilor încrucișate cu alte bacterii decât cele incluse în genul <i>Francisella</i> ;	11
- detectarea tuturor speciilor <i>Francisella</i> în diferite tipuri de probe biologice;	13
- identificarea de tulpini sălbatice și diferențierea speciilor genului <i>Francisella</i> ( <b>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</b> ).	15
<i>ISFtu2</i> și gena <i>igIC</i> permit diferențierea <i>F. tularensis</i> de endosimbionții <i>Francisella</i> - <i>Wke</i> ai căpușelor gazdă, precum <i>Dermacentor variabilis</i> și <i>D. occidentalis</i> (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 <i>Francisella</i> ( <b>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</b> ). Invenția a folosit ca țintă de detecție pentru kit regiunea genomică între 1853020-1853116 (97pb) de la <i>F. tularensis subsp. Holarctica</i> FTNF002-00; NC-009749 în acord cu studiul <i>in silico</i> de amplificare prin PCR și conform primerilor descriși în <b>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</b> .	17
Pentru <i>Borrelia burgdorferi s.l.</i> : studiile efectuate de <b>Yang J., Liu Z., Guan G., et al., 2012; Evaluation of molecular methods for detection of Borrelia burgdorferi sensu lato in ticks; Diagnostic Microbiol. &amp; Infectious Diseases, Vol. 73 (I): 80-83.</b> , au demonstrat că metoda nested-PCR care țintește gena cromozomală <i>fla</i> ( <b>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(II): 4856-4866</b> ) este mult mai sensibilă decât variantele nested PCR pentru alte genele cromozomiale, respectiv <i>rrs</i> ( <b>Wodecka B., Leonska 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</b> <b>Wodecka et al., 2010</b> ) și <i>p66</i> (Roșca și Schwan, 1989). În lumina acestor date, se pare că genele cromozomiale demonstrate a fi înalt conservate (exempli: <i>fla</i> , <i>rrs</i> , <i>p66</i> ), pot fi extrem	19

# RO 133178 B1

de utile la detectarea tuturor izolatelor de *B. burgdorferi s.l.* (Yang J., Liu Z., Guan G., et al., 2012; Evaluation of molecular methods for detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in ticks; Diagnostic Microbiol. & Infectious Diseases, Vol. 73 (I): 80-83).

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 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). 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 primeri 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 (amorserilor) și a sondelor moleculare precum și caracteristicile lor fizico-chimice calculate *in silico* sunt redată în 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*

Tabelul 4

Denumire secvență	Secvența genică după:	Lungime nt.	Tm °C	GC%	Stabilitate la capătul 3'	Căutare în banca de secvențe prin BLAST	Sonda moleculară are atașat la capătul 5'	Sonda moleculară are atașat la capătul 3'
P1 Forward CCHFV S segment	Atkinson et al.2012	19	57,4	47,4	9,4 AG	38,2/100% omologie cu gena țintă	x	x
P2 Reverse CCHFV S segment	Atkinson et al.2012	21	55,7	38,1	8,2 AG	42,1/100% omologie cu gena țintă	x	x
S CCHFV S segment	Atkinson et al.2012	26	70,7*	51,9	ND	49,3/100% omologie cu gena țintă	FAM/FAM	BHQ/MGB-NFQ



# RO 133178 B1

Tabelul 4 (continuare)

Denumire secvență	Secvența genică după:	Lungime nt.	Tm °C	GC%	Stabilitate la capătul 3'	Căutare în banca de secvențe prin BLAST	Sonda moleculară are atașat la capătul 5'	Sonda moleculară are atașat la capătul 3'
P1 Forward TBEV 3'UTR	Schweiger & Cassinotti 2003	18	60,6	61,1	7,9	36,2/100% omologie cu gena țintă	x	x
P2 Reverse TBEV 3'UTR	Schweiger & Cassinotti 2003	23	60,1	47,8	6,1	46,1/100% omologie cu gena țintă	x	x
S TBEV 3'UTR	Schweiger & Cassinotti 2003	23	70,4	56,5	6,4	46,1/100% omologie cu gena țintă cu mențiunea că are omologie 100% și cu Lupig 111 Virus secvența KF 05633.1	FAM/ TET	TAMRA /MGB-NFQ
P1 Forward <i>Francisella tularensis</i> ISFtu2	Versage et al.,2003	25	62,4	44	5,6	50,1/100% omologie cu gena țintă	x	x
P2 Reverse <i>Francisella tularensis</i> ISFtu2	Versage et al, 2003	29	61,2	31	6,9	50,1/100% omologie cu gena ținta	x	x
S <i>Francisella tularensis</i> ISFtu2	Versage et al.,2003	36	71,3	36,1	8,1	50,1/100% omologie cu gena țintă	FAM/FA M	BHQ1/ MGB-NFQ
P1 Korward <i>Borrelia burgdorferi</i> și FlaB	Schweiger et al., 2001	22	60,1	36,4	8,5	44,1/100% omologie cu gena ținta	x	x

# RO 133178 B1

Tabelul 4 (continuare)

Denumire secvență	Secvența genică după:	Lungime nt.	Tm °C	GC%	Stabilitate la capătul 3'	Căutare în banca de secvențe prin BLAST	Sonda moleculară are atașat la capătul 5'	Sonda moleculară are atașat la capătul 3'
P2 Reverse <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. FlaB	Schweiger et al., 2001	20	63,1	45,0	8,2	40,1/100% omologie cu gena țintă	x	x
<i>S Borrelia burgdorferi</i> s.l. FlaB	Schweiger et al., 2001	33	69,8	36,1/36,36	6,2	66,2/100% omologie cu gena țintă	FAM/TET	TAMRA /MCBN F Q
P1 IC <i>Ixodes ricinus</i> 16S mt gene	Schweiger & Cassinotti 2003	29	61,1	31,0	7,7	58,0/100% omologie cu gena țintă ptr <i>Ixodes scapularis</i> , <i>Ixodcs ricinus</i> , <i>Amblyomma inoratum</i> , <i>Dermacentor nutalii</i> , <i>Haemaphysalis sp</i> , <i>Argas persicus</i>	x	x
P2 IC <i>Ixodes ricinus</i> 16S mt gene	Schweiger & Cassinotti 2003	25	61,2	32,0	7,0	50,1/100% omologie cu gena țintă <i>Ixodes scapularis</i> , <i>Hyaloma aegyptium</i> , <i>Ix. Loricatus</i> , <i>Ix. Ricinus</i>	x	x
S IC <i>Ixodes ricinus</i> 16S mt gene	Schweiger & Cassinotti 2003	36	65,0	27,8	9,6	75,0/100% omologie cu <i>Ix. scapularis</i> , <i>Ix. ricinus</i> , <i>Ix. inopinatus</i> , <i>Carios puertoriensis</i> <i>Orithodoros capensis</i>	VIC/CY5	TAMRA / BMQ 2

# RO 133178 B1

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

Soluția găsită privind modificarea moleculei de stingere a fluorescenței (quencer) de la capătul 3' al sondei moleculare TaqMan reduce fundalul (background) de fluorescență generată de utilizarea TAMRA și crește sensibilitatea de circa 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<sub>m</sub> (temperatura de topire) a sondei ADN, fapt ce conduce la stabilizarea hibridilor 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 fluorescența 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* s.l. Secvența de mărime: 174 bp. 5'

GCAATCATTGCCATTGCAGATTGTGTCAAATACTATTAGTTGTAGATGCTACAACC  
TCATCTGTCATTG  
TAGCATCTTTTATTTGAGCATAAGATGCTTTTAGGTTTTCAATAGCATACTCAGTACT  
ATCCTTTATAGA  
CTCAAGTCTATTTTGGAAAGCACCTAAATTTGCT-3'

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

Volum final de reacție = 50 μl

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

## Componente producere control pozitiv *B.burgdorferi* prin PCR

Tabelul 5

Ingredientul/Concentrația	Volumul (μl)/reacție
P1 Forward <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. FlaB 18 μM	1,5
P2 Reverse <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l. FlaB 18 μM	1,5
Taq Polimeraza cu înaltă fidelitate la copierea ADN GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher) 5U/μl	1
dNTP în amestec echimolar (10 mM fiecare)	8
Tampon 10 x GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher)	5
Apă extrapură 18 MΩ	30
<i>B. burgdorferi</i> ADN control MBCO (15750 copii genomice/μl) diluție 1/10 în apă extrapură	3

# RO 133178 B1

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

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

Tabelul 6

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

13 După amplificare produsul de amplificare obținut (ampliconul în volum de  
15 5-10  $\mu$ l/godeu în prezența de tampon de încărcare/gel loading buffer pe baza de albastru de  
17 brom fenol) este verificat prin electroforeză orizontală în gel de agaroză (2-3%) în prezența  
19 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 0,2-0,5  $\mu$ g/ml), gelul este  
21 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 (100 bp Ladder Thermo Fisher Scientific) conform fig. 1.

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

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

29 *Parametrii caracteristici ai ampliconului B. burgdorferi*

Tabelul 7

Masa moleculară	Coeficientul de extincție	$\mu$ g/OD la 260 nm	Lungime (bp)	Tm (°C)	GC%	Structura Secundară
53490,2	1672,2	32,0	174	88,5	34,5	Puternică

35 *Francisella tularensis* Secvența de mărime: 97pb. 5'  
TGAGTTTTACCTTCTGACAACAATATTTCTATTGGATTACCTAAAGCATCAGTCATAG  
37 CATGGATTTTAG  
TGGTTATCCC ACCA ACTGATCTACCAA-3'

39 Secvența sens obținută prin amplificarea PCR classic a genomului ADN din  
*Francisella tularensis* tulpina LVS (Amplirun® *Francisella tularensis* ADN control MBIIO;  
41 14000 copii genomice/ $\mu$ l ; produs de Vircell-Microbiologists) conform protocolului:

Volum final de reacție = 50  $\mu$ l

43 Într-un tub tip PCR de 200  $\mu$ l (DNA/RNA free) se amestecă componentele date în  
tabelul 8.

# RO 133178 B1

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

Tabelul 8

Ingredientul/Concentrația	Volumul (μl)/reacție
P1 Forward Francisella tularensis ISFtu2 18 μM	1,5
P2 Reverse Francisella tularensis ISFtu2 18 μM	1,5
Taq Polimeraza cu înaltă fidelitate la copierea ADN GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher) 5U/μl	1
dNTP în amestec echimolar (10 mM fiecare)	8
Tampon 10 x GeneAmp High Fidelity (produs ABf/ThermoFisher)	5
Apă extrapură 18 MΩ	30
Amplirun® <i>Francisella tularensis</i> ADN control MB110 (14000 copii genomice/μl) diluție 1/10 în apă extrapură	3

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

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

Tabelul 9

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

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 prezență de tampon TAE IX (40 mM Tris, 20 mM Acid Acetic și 1mM EDTA; pH = 8,3) la 70 Vcc timp de 30-60 min, după marcarea cu Bromura de Etidiu (aflată în gel 0,2-0,5 μg/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 (100 bp 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 spectrofluorimetric 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.

# RO 133178 B1

## Parametrii caracteristici ai ampliconului de *F. tularensis*

Tabelul 10

Masa moleculară	Coeficientul de extincție	μg/OD la 260 nm	Lungime (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	GC%	Structura Secundară
29741,6	938,8	31,7	97	86,1	36,1	Puternică

- CCHFV Secvența de mărime: 122 pb. 5'-

TCTCAAAGAAACACGTGCCGCTTACGCCACAGTGTTCTCTTGAGTGTTAGCAAAC  
GTAACAGATGAAAGAGCAAGCTACTAAAGATGAGATGAACAAGTGTTTGAAGAGT  
TCAAAAAGG-3'

Secvența de sinteză obținută prin amplificarea prin PCR clasic a matriței ADN 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 = 50 μl.

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

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

Tabelul 11

Ingredientul/Concentrația	Volumul (μl)/reacție
P1 Forward CCHFV S segment 18 μM	1,5
P2 Reverse CCHFV S segment 18 μM	1,5
Taq Polimeraza cu înaltă fidelitate la copierea ADN GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher) 5 U/μl	1
dNTP în amestec echimolar (10 mM fiecare)	8
Tampon 10 x GeneAmp High Fidelity (produs ABI/ThermoFisher)	5
Apa extrapură 18 MΩ	30
GeneArt™Strings™DNA Fragment de 322 nt; diluție 1/10 în apă extrapură (2 ng/μl)	3

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

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

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

# RO 133178 B1

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 1X (40 mM Tris, 20 mM Acid Acetic și 1mM EDTA; pH = 8,3) la 70 Vcc timp de 30-60 min, după marcarea cu Bromura de Etidiu (aflată în gel 0,2-0,5 μg/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 (100 bp 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 spectro-fluorimetric 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.

## Parametrii ampliconului control pozitiv de CCHFV

Tabelul 13

Masa moleculară	Coeficientul de extincție	μg/OD la 260 nm	Lungime (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	GC%	Structura Secundară
37850,9	1231,1	30,7	122	91,8	41,8	Puternică

- TBEV Secvența de mărime: 68 pb. 5'-  
GGGCGGTTCTTGTCTCCCTGAGCCACCATCACCCAGACACAGGTAGTCTGACAAGG  
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 = 50 μl;

Într-un tub tip PCR de 200 μl (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 ADN Polymerase (Thermo Fisher).

## Componentele tubului pentru obținerea prin PCR a controlului pozitiv de TBEV

Tabelul 14

Ingredientul/Concentrația	Volumul (μl)/reacție
P1 Forward TBEV 3'UTR 18 μM	1,5
P2 Reverse TBEV 3'UTR 18 μM	1,5
2X Reaction Mix (buffer 2x + 0,4 mM din fiecare dNTP + 6 mM MgSO <sub>4</sub> )	25
SuperScript III RT Platinum™ Taq	1
Apa extrapură 18 MΩ tratată cu DEPC	18
Total RNA* izolat din creier de șoarece inoculat cu TBEV Hypr (1100 ng/μl) în diluție de 1/10 în apă extrapură	3

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

# RO 133178 B1

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

## 3 Programul termic a reacției de amplificare 5 pentru controlul pozitiv TBEV

Tabelul 15

7 Temperatura în tubul de reacție (°C)	8 Timpul de reacție (sec)	9 Numărul de cicluri/repetări a secvenței termice
10 50	11 900	12 1
13 95	14 120	15 1
16 95	17 15	18 45
19 60	20 40	

21 După amplificare, produsul de amplificare obținut (ampliconul în volum de  
22 5-10  $\mu$ l/godeu în prezență de tampon de încărcare/gel loading buffer pe bază de albastru de  
23 brom fenol) este verificat prin electroforeză orizontală în gel de agaroză (2-3%) în prezență  
24 de tampon TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM Acid Acetic și 1 mM EDTA; pH = 8,3) la 70 Vcc timp  
25 de 30-60 min, după marcarea cu Bromura de Etidiu (aflată în gel 0,2-0,5  $\mu$ g/ml), gelul este  
26 examinat & fotografiat. Se consideră reușită producerea de control pozitiv prin PCR atunci  
27 când banda corespunzătoare ampliconului se află între benzile de 100 și 200 pb ale  
28 Markerului de greutate moleculară (100 bp Ladder Thermo Fisher Scientific) conform fig. 4.

29 Ulterior, după purificarea ampliconului prin trecerea lui pe coloane  
30 (PureLink™ Quick PCR Purification Kit/Invitrogen prin Thermo Fisher Scientific) este  
31 măsurat/cuantificat spectro-fluorimetric la nanodrop. Concentrația este ajustată cu apă  
32 extrapură până la o concentrație stoc de 800-0,5 ng/ $\mu$ l.

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

## 35 Parametrii ampliconului TBEV ce constituie controlul pozitiv din kit

Tabelul 16

36 Masa moleculară	37 Coeficientul de extincție	38 $\mu$ g/OD la 260 nm	39 Lungime (bp)	40 Tm (°C)	41 GC %	42 Structura Secundară
43 20979,8	44 645,6	45 32,5	46 68	47 93,5	48 55,9	49 Puternică și multiplă

50 IC Ixodes ricinus 16S mtADN Secvența de mărime: 98 pb. 3'  
51 AAAAAAATACTCTAGGGATAACAGCGTAATAATTTTGGATAGTTCATATAGATAAA  
52 ATAGTTTGGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATTCTTTTTTGGT-5'

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

56 Amplificarea s-a realizat conform protocolului:

57 Volum final de reacție = 50  $\mu$ l.

58 Într-un tub tip PCR de 200  $\mu$ l (ADN/ARN free) se amestecă componentele date în  
59 tabelul 17.



# RO 133178 B1

Componentele tubului pentru obținerea CI de Ixodes prin PCR

Tabelul 17

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

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

Căpușele au fost împărțite în pool-uri de 5-10 exemplare în funcție de mărime și locul recoltării, spălate în apă distilată, pentru îndepărtarea ARN latter™ (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 ADN are loc după incubarea omogenatului la temperatura camerei pentru a permite disocierea complexelor nucleoproteice, tratarea ulterioară cu cloroform și separarea fazelor prin centrifugare. ADN-ul va rămâne cantonat în faza organică și interfază.

Precipitarea ADN 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 ADN-ului să formeze un depozit pe peretele lateral și partea de jos a tubului. Spălarea ADN-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 min la temperatura camerei, urmate de centrifugări la 4°C.

După tratarea finală cu etanol 75%, incubare timp de 10-20 min la temperatura camerei și centrifugare 5 min la 2000 x g și 4°C, depozitul ADN 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.

# RO 133178 B1

## Programul termic al reacției de amplificare pentru obținerea Cl de Ixodes

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

După amplificare, produsul de amplificare obținut (ampliconul în volum de 5-10  $\mu$ 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 IX (40 mM Tris, 20 mM Acid Acetic și 1 mM EDTA; pH = 8,3) la 70 Vcc timp de 30-60 min, după marcarea cu Bromura de Etidiu (aflată în gel 0,2-0,5  $\mu$ 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 (100 bp 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 spectro-fluorimetric la nanodrop. Concentrația este ajustată cu apă extrapură până la o concentrație stoc de 100-10 ng/ $\mu$ l.

Ampliconul este caracterizat prin analiza *in silico* (folosind software OligoEvaluator™ de la Premier Biosoft) a secvenței de mai sus; având următorii parametri: tabelul 19.

Tabelul 19

Masa moleculară	Coeficientul de extincție	$\mu$ g/OD la 260 nm	Lungime (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	GC%	Structura Secundară
30397,0	988,8	30,7	98	82,8	30,6	Slabă și multiplă

Dozajele elementelor constitutive sunt date în tabelul 20

*Dozajele elementelor constitutive; ND parametru ce nu se determină*

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
P1 Forwar CCHFV S segment	Tub 1 Soluție de lucru CCHFV	18 $\mu$ M	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

# RO 133178 B1

Tabelul 20 (continuare)

Denumire Constituent	Se regăsește în compunerea tubului nr. din kit	Dozaj concentrație	Verificat prin	Limite de valori pentru Ct	Ecivalent în copii genomice	
P2 Reverse CCHFV S segment	Tub 1 Soluție de lucru CCHFV	18 μM	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	1 3 5 7 9 11
S CCHFV S segment	Tub 1 Soluție de lucru CCHFV	25 μM	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	13 15 17 19 21
P1 Forward TBEV 3'UTR	Tub 2 Soluție de lucru TBEV	18 μM	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	23 25 27 29
P2 Reverse TBEV 3'UTR	Tub 2 Soluție de lucru TBEV	18 μM	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	31 33 35 37 39
STBEV 3'UTR	Tub 2 Soluție de lucru TBEV	25 μM	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	41 43 45 47

# RO 133178 B1

Tabelul 20 (continuare)

Denumire Constituent	Se regăsește în compunerea tubului nr. din kit	Dozaj concentrație	Verificat prin	Limite de valori pentru Ct	Ecivalent în copii genomice
P1 Forward <i>Francisella tularensis</i> ISFtu2	Tub 3 Soluție lucru <i>Francisella</i>	18 μM	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
P2 Reverse <i>Francisella tularensis</i> ISFtu2	Tub 3 Soluție lucru <i>Francisella</i>	18 μM	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 <i>Francisella tularensis</i> ISFtu2	Tub 3 Soluție lucru <i>Francisella</i>	25 μM	Citire concentrație la Nanodrop*	Pentru tilizarea în sistem singleplex în prezența controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse între: 13-32	ND
PI Forward <i>Borrelia burgdorferi</i> și FlaB	Tub 4 Soluție de lucru <i>Borrelia</i>	18 μM	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
P2 Reverse <i>Borrelia burgdorferi</i> si. FlaB	Tub 4 Soluție de lucru <i>Borrelia</i>	18 μM	Citire concentrație la Nanodrop*	Pentru tilizarea în sistem singleplex în prezența controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse între: 13-32	ND

# RO 133178 B1

Tabelul 20 (continuare)

Denumire Constituent	Se regăsește în compunerea tubului nr. din kit	Dozaj concentrație	Verificat prin	Limite de valori pentru Ct	Ecivalent în copii genomice
<i>S Borrelia burgdorferi</i> și Fla B	Tub 4 Soluție de lucru <i>Borrelia</i>	25 μM	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 IC <i>Ixodes ricinus</i> 16S mt gene	Tub 5 Soluție de lucru Control Intern	18 μM	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
P2 IC <i>Ixodes ricinus</i> 16S mt gene	Tub 5 Soluție de lucru Control Intern	18 μM	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 IC <i>Ixodes ricinus</i> 16S mt gene	Tub 5 Soluție de lucru Control Intern	25 μM	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
Positive Control CCHFV	Tub 6 Concentrație standard de amplicon CCHFV	400-1,8 ng/μl	Citire concentrație la Nanodrop* & Electroforeză a** în gel de agaroză 2-3% (conform fig. 7)	Pentru utilizarea în sistem singleplex în prezența controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse între: 12-32	7000000-7000

# RO 133178 B1

Tabelul 20 (continuare)

Denumire Constituent	Se regăsește în compunerea tubului nr. din kit	Dozaj concentrație	Verificat prin	Limite de valori pentru Ct	Ecivalent în copii genomice
Positive Control TBEV	Tub 7 Concentrație standard de amplicon TBEV	800-0,5 ng/μl	Citire concentrație la Nanodrop* & Electroforez a** în gel de agaroză 2-3% (conform Fig. 8)	Pentru utilizarea în sistem singleplex în prezența controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse între: 12-32	5000000-500
Positive Control <i>Francisella</i>	Tub 8 Concentrație standard de amplicon <i>Francisella</i>	3,9-0,2 ng/μl	Citire concentrație la Nanodrop* & Electroforez a** în gel de agaroză 2-3% (conform fig. 6)	Pentru utilizarea în sistem singleplex în prezența controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse între: 12-35	14000-140
Positive Control <i>Borrelia</i>	Tub 8 Concentrație standard de amplicon <i>Francisella</i>	2,5-0,1 ng/μl	Citire concentrație la Nanodrop* & Electroforez a** în gel de agaroză 2-3% (Conform fig. 5)	Pentru utilizarea în sistem singleplex în prezența controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse între: 25-35	16000-160
Positive Internal Control Ixodes	Tub 8 Concentrație standard de amplicon <i>Francisella</i>	100-10 ng/μl μM	Citire concentrație la Nanodrop* & Electroforez a** în gel de agaroză 2-3% (conform fig. 9)	Pentru utilizarea în sistem singleplex în prezența controlului pozitiv din kit se vor obține valori ale Ct cuprinse între: 12-32	3400000-340000

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

# RO 133178 B1

Pentru rezultate optime, înainte de realizarea măsurătorilor, cele 2 zone ale spectrofotometrului prin care se realizează citirea, se vor curăța cu șervețel curat de laborator. Se pipetează 1 μl soluție blank (apă 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 posibilitățile contaminanți prezenți în probă (fenol, proteine) și gradul de puritate al acesteia.

## Limite detecție NanoDrop One\* Thermo Scientific

Tabelul 21

Tip probă	Limită minimă detecție	Limită maximă detecție	Reproductibilitate
ADN dublu catenar	2,0 ng/μl	27500 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	13 ng/μl	18150 ng/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	22000 ng/μl	± 1,6 pentru concentrații cuprinse între 3,2 și 80 ng/μl; ± 2% pentru probe > 80 ng/μl

\*\* Electroforeză 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 min, după terminarea timpului de migrare și întreruperea alimentării curentului electric. Gelul se spală timp de 30 min 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 ADN în roz-violet. După terminarea procesului de migrare, vizualizarea moleculelor ADN se realizează prin așezarea gelului pe un transiluminator și efectuarea unei poze cu sisteme fotografice dedicate.

Prepararea gelului de agaroză se realizează prin topirea agarozii în cuptorul cu microunde, în tampon de electroforeză TAE IX (40 mM Tris, 20 mM Acid Acetic și 1 mM 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.

# RO 133178 B1

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

3            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.

7            Se prezintă în continuare alți parametri ce definesc elementele invenției.

9            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 2 x și înregistrarea valorilor CT (valoarea CT 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.

15           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.

## Deviația standard și coeficientul de variație

Tabelul 22

Diluții GE/reacție	Nr. de determinări	Valoarea (%) a CV ptr IAP și în paranteză 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)	CCHFv
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)	<i>Francisella tularensis</i>
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)	<i>Borrelia burgdorferi</i> sl.
1/100	2	0,98 (0,79)	
1/1000	2	2,43 (2,62)	
1/10000	2	3,69 (3,56)	



# RO 133178 B1

Kit-ul pornește de la procesarea probelor biologice în vederea izolării concomitente sau separat a acizilor nucleici (ADN total și ARN 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.

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

*Tabelul 23*

Tipul de acid nucleic extras	Denumirea comerciala a leiturului si producătorul	Cu respectarea protocolului aferent
ADN	AccuPrep® Genomic ADN Extraction Kit (Bionner)	DA
	QIAamp® genomic Mini kit (Qiagen)	
ARN	QuickGene® ARN tissue kit Sil & dispozitivul aferent QuickGene-Mini 80	DA
	RNeasy® Mini kit Qiagen	
ADN și ARN	TRIzol®	DA

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 maximum 7 indivizi. Mărunțirea căpușelor se poate face fie după imersarea acestora în azot lichid, fie prin utilizarea unor omogenizatoare/mori cu bile comerciale (exemplu: 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 (tabelul 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 ARN) se realizează transformarea ARN în cDNA prin reacția de reverstranscriere ce se realizează fie într-o singură etapă, fie în două (obținere de cADN cu ajutorul amorsoarelor hexamere 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 ADN Polymerase.

Utilizarea Kit-ului în 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 25ui amestec final de reacție:

# RO 133178 B1

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

Tabelul 24

Pentru detecția CCHFV	C+	Proba	C-
	- 2,5 mix reacție CCHFV - Tampon PCR 2X12,5 μl - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță: 3 μl Positive Control CCHFV - Apă extrapură: 3 μl	12,5 μl - Tampon PCR 2X12,5 μl - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță: 3 μl cDNA (obținut din proba cu hexameri) - Apă extrapură: 3 μl	- 2,5 μl mix reacție CCHFV - Tampon PCR 2X12,5 μl - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță: 3 μl Apă - Apă extrapură: 3 μl
Pentru TBEV	- 2,5 μl mix reacție TBEV - Tampon PCR 2X 12,5 μl - Enzima TaqPolimeraza lui - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță: 3 μl Positive Control TBEV - Apă extrapură: 3 μl	- 2,5 μl mix reacție TBEV - Tampon PCR 2X 12,5 μl - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță: 3 μl cDNA(obtinut din proba cu hexameri) - Apă extrapură: 3 μl	- 2,5 μl mix reacție TBEV - Tampon PCR 2X 12,5 μl - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță: 3 μl Apă - Apă extrapură: 3 μl
Pentru <i>Francisella</i>	- 2,5 μl mix reacție <i>Francisella</i> - Tampon PCR 2X 12,5 μl - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță:3 μl Positive Control <i>Francisella</i> - Apă extrapură: 3 μl	- 2,5 μl mix reacție <i>Francisella</i> - Tampon PCR 2X 12,5ul - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță:3 μl DNA(obtinut din proba) - Apă extrapură: 3 μl	- 2,5 μl mix reacție <i>Francisella</i> - Tampon PCR 2X 12,5ul - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță: 3 μl Apă - Apă extrapură: 3 μl
Pentru <i>Borrelia</i>	- 2,5 mix reacție <i>Borrelia</i> - Tampon PCR 2X 12,5 μl - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță:3 μl Positive Control <i>Borrelia</i> - Apă extrapură: 3 μl	- 2,5 mix reacție <i>Borrelia</i> - Tampon PCR 2X 12,5 μl - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță:3 μl ADN (obținut din proba) - Apă extrapură: 3 μl	- 2,5 mix reacție <i>Borrelia</i> - Tampon PCR 2X 12,5 μl - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță:3 μl Apă - Apă extrapură: 3 μl

# RO 133178 B1

Tabelul 24 (continuare)

Pentru detecția CCHFV	C+	Proba	C-
Pentru CI	- 2,5 mix reacție CI - Tampon PCR 2X 12,5 μl - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță: 3 μl Positive Control CI sau ADN genomic extras din capuse dacă și probele au provenit din capuse. Apa extrapură: 3 μl.	Nu se aplică	- 2,5 mix reacție CI - Tampon PCR 2X 12,5 μl - Enzima TaqPolimeraza 1 μl - dNTP mix 10 mM fiecare 4 μl - Template/Matriță: 3 μl Apă - Apă extrapură: 3 μl

Tuburile, după ce au fost vortexate și centrifugate scurt, sunt introduse în termociclerul real-time unde sunt supuse la 45 de cicluri termice după programul dat în tabelul 6 (fără incubarea la 70 C/420 sec/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.

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

Tabelul 25

Agentul/Tubul	C+	Proba	C-
CCHFV	TET	TET	TET
TBEV	FAM	FAM	FAM
<i>Francisella</i>	FAM	FAM	FAM
<i>Borrelia</i>	TET	TET	TET
CI	Cy5	Cy5	Cy5

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.

*Interpretare date de amplificare exprimate în valori Ct (valoarea Ct 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*

Tabelul 26

Agentul/Tubul	C+	Proba	C-
CCHFV	C <sub>T</sub> 12-32 pe TET	C <sub>T</sub> 12-35 pe TET	C <sub>T</sub> 0 pe TET
TBEV	C <sub>T</sub> 12-32 pe FAM	C <sub>T</sub> 12-35 pe FAM	C <sub>T</sub> 0 pe FAM
Francisella	C <sub>T</sub> 12-32 pe FAM	C <sub>T</sub> 12-35 pe FAM	C <sub>T</sub> 0 pe FAM
Borrelia	C <sub>T</sub> 12-32 pe TET	C <sub>T</sub> 12-35 pe TET	C <sub>T</sub> 0 pe TET
CI	C <sub>T</sub> 12-32 pe Cy5	Nu se determină	C <sub>T</sub> 0 pe Cy5

# RO 133178 B1

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

5 Utilizarea Kit-ului în sistem Multiplex.

6 Marcajul fluorescent diferit al sondelor moleculare incluse în kit precum și faptul că  
 7 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  
 9 sau bacterii) + CI urmând protocolul de mai jos:

10 Se distribuie cu ajutorul unor micropipete în hota cu flux laminar PCR, volumele de  
 11 reactivi pentru 25  $\mu$ l amestec final de reacție, date în tabelul 27.

## 13 Volume de reactivi pentru utilizarea kit-ului în regim multiplex

Tabelul 27

15 Pentru detecția CCHFV + 17 TBEV (Virusuri) + CI	C+	Proba	C-
19	2,5 $\mu$ l mix reacție 21 CCHFV - 2,5 $\mu$ l mix reacție 23 TBEV - 2,5 $\mu$ l mix reacție CI - 25 Tampon PCR 2X conținând și dNTP-uri și enzima Taq polimeraza 27 (TaqMan® Multiplex Master mix) 12,5 $\mu$ l - 29 Template/Matrița: 1 $\mu$ l Positive Control 31 CCHFV, 1 $\mu$ l Positive control TBEV, 1 $\mu$ l 33 Positive control CI - Apă extrapură: 2 $\mu$ l	- 2,5 $\mu$ l mix reacție CCHFV - 2,5 $\mu$ l mix reacție TBEV - 2,5 $\mu$ l mix reacție CI - Tampon PCR 2X conținând și dNTP-uri și enzima Taq polimeraza (TaqMan® Multiplex Master mix) 12,5 $\mu$ l - Template/Matrița: 3 $\mu$ l cDNA (obținut din proba cu hexameri) - Apă extrapură: 2 $\mu$ l	- 2,5 $\mu$ l mix reacție CCHFV - 2,5 $\mu$ l mix reacție TBEV - 2,5 $\mu$ l mix reacție CI - Tampon PCR 2X conținând și dNTP-uri și enzima Taq polimeraza (TaqMan® Multiplex Master mix) 12,5 $\mu$ l - Template/Matrița: 3 $\mu$ l Apă - Apă extrapură: 2 $\mu$ l
35 Pentru <i>Francisella</i> și 37 <i>Borrelia</i> + CI (Bacterii)	- 2,5 $\mu$ l mix reacție <i>Francisella</i> - 2,5 $\mu$ l mix reacție <i>Borrelia</i> - 2,5 $\mu$ l mix reacție CI - 39 Tampon PCR 2X conținând și dNTP-uri și enzima Taq polimeraza 41 (TaqMan® Multiplex Master mix) 12,5 $\mu$ l - Template/Matrița: 1 $\mu$ l Positive Control 43 <i>Francisella</i> , 1 $\mu$ l Positive control <i>Borrelia</i> 1 $\mu$ l Positive control CI - Apă 45 extrapură: 2 $\mu$ l	- 2,5 $\mu$ l mix reacție <i>Francisella</i> - 2,5 $\mu$ l mix reacție - 2,5 $\mu$ l mix reacție CI - Tampon PCR 2X conținând și 47 dNTP-uri și enzima Taq polimeraza (TaqMan® Multiplex Mașter mix) 12,5 $\mu$ l - Template/Matrița: 3 $\mu$ l - 1 $\mu$ l CI (dacă este ADN extras din capușe atunci este 0) - Apă extrapură: 1 sau 49 2 $\mu$ l	- 2,5 $\mu$ l mix reacție <i>Francisella</i> - 2,5 $\mu$ l mix reacție <i>Borrelia</i> - 2,5 $\mu$ l mix reacție CI - Tampon PCR 2X conținând și dNTP-uri și enzima Taq polimeraza (TaqMan® Multiplex Master mix) 12,5 $\mu$ l - Template/Matrița: 3 $\mu$ l - Apă extrapură: 2 $\mu$ l

# RO 133178 B1

Tuburile, după ce au fost vortexate și centrifugate scurt, sunt introduse în termociclerul real-time unde sunt supuse la 45 de cicluri termice după programul dat în tabelul 6 (fără incubarea la 70°C/420 sec/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.

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

Tabelul 28

Agentul/Tubul	C+	Proba	C-
CCHFV + TBEV + CI	TET/FAM/Cy5	TET/FAM/Cy5	TET/FAM/Cy5
Francisella + <i>Borrelia</i> + CI	FAM/TET/Cy5	FAM/TET/Cy5	FAM/TET/Cy5

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.

*Interpretare date de amplificare exprimate în valori CT (valoarea CT 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*

Tabelul 29

Agentul/Tubul	C+	Proba	C-
CCHFV+ TBEV+CI	C <sub>T</sub> 12-32 pe TET C <sub>T</sub> 12-32 pe FAM C <sub>T</sub> 12-32 pe Cy5	C <sub>T</sub> 12-35 pe TET C <sub>T</sub> 12-35 pe FAM C <sub>T</sub> 12-32 pe Cy5	C <sub>T</sub> 0 pe TET C <sub>T</sub> 0 pe FAM C <sub>T</sub> 0 pe Cy5
Francisella+ <i>Borrelia</i> +CI	C <sub>T</sub> 12-32 pe FAM C <sub>T</sub> 12-32 pe TET C <sub>T</sub> 12-32 pe Cy5	C <sub>T</sub> 12-35 pe FAM C <sub>T</sub> 12-35 pe TET C <sub>T</sub> 12-32 pe Cy5	C <sub>T</sub> 0 pe FAM C <sub>T</sub> 0 pe TET C <sub>T</sub> 0 pe Cy5

Dacă în cazul probelor, valoarea C<sub>T</sub> este „0”, atunci probele se consideră negative; dacă însă valoarea C<sub>T</sub> 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<sub>T</sub> 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 detecție unei reacții tip Real-Time PCR este influențată de mulți factori care pot fi grupați în două categorii:

- Condițiile de reacție
- Omologia și specificitatea primerilor și sondelor față de regiunea genomică țintă.

Dacă în cazul kit-ului prezentat aici condițiile de reacție variază destul de mult (se folosesc numeroase formulări comerciale de tampoane și polimeraze) condițiile de omologie sunt indeplinite și în acord cu literatura de specialitate (citată în tabel 4), cu studiul *in silico* și căutarea BLAST. Astfel considerăm următoarele valori pentru limita de detecție (tabelul 30).

# RO 133178 B1

1 *Limita de detecție pentru fiecare patogen detectat de kit*

*Tabelul 30*

3	Agentul patogen detectat	Limita de detecție singleplex
	CCHFV	5 copii de echivalent genomic/reacție
5	TBEV	50 copii de echivalent genomic/reacție
	,]IC	50 copii de echivalent genomic/reacție
7	<i>Francisella tularensis</i>	< 1 copii de echivalent genomic/reacție
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	10 copii de echivalent genomic/reacție

# RO 133178 B1

## Revendicări

1. Kit de reactivi pentru detecția moleculară de agenți virali TBEV și CCHFV și bacterieni, *Francisella tularensis* și *Borrelia burgdorferi* sl. transmiși de căpușele *Ixodoidea* la om și animale, **caracterizat prin aceea că**, acesta conține: 3
- 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, cum ar fi a fluorocromilor, de la capătul 5' al sondei moleculare ADN de tip TaqMan<sup>®</sup>, care 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 altă parte se realizează modificarea moleculei de stingere a fluorescenței, denumiți quencer, de la capătul 3' al sondei moleculare tip TaqMan<sup>®</sup>, care reduce fundalul de fluorescență generată de utilizarea altor molecule de stingere, fluorescente și crește sensibilitatea de circa 10 ori prin folosirea quencerilor nonfluorescenți de tip MGB-NFQ: Minor Groove Binding - Non Fluorescence Quencer; 5
- b. un control intern de reacție ce conține primeri și sonda caracteristică pentru Ixodide; 7
- b1. Cl *Ixodes ricinus* DNAmT 16S - secvența obținută prin amplificarea prin PCR a ADN-ului genomic total în laboratoarele proprii, ADN provenit deja un pool de 5 căpușe, femele de *Ixodes ricinus* recoltate din vegetație, questing ticks, amplificat prin PCR clasic, conform protocolului descris; 9
- c. controale pozitive pentru toți patogenii țintă, după cum urmează: 11
- c1. *Borrelia burgdorferi* s.l. - secvența sens, obținută prin amplificarea prin PCR clasic a genomului ADN din *Borrelia burgdorferi* tulpina 1RS, conform protocolului PCR descris; 13
- c2. *Francisella tularensis* s - secvența sens obținută prin amplificarea prin PCR clasic a genomului ADN din *Francisella tularensis* tulpina LVS, Amplirun<sup>®</sup> *Francisella tularensis* ADN control MB110; produs de Vircell-Microbiologists, conform protocolului PCR descris; 15
- c3. CCHFV - secvența de sinteză obținută prin amplificarea prin PCR clasic a matriței de ADN sintetic monocatenară, produsă la comandă de către GeneArt<sup>™</sup> Strings<sup>™</sup> DNA Fragments, conform protocolului PCR descris; 17
- 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. 19
2. Kit de reactivi pentru detecția moleculară de agenți virali TBEV și CCHFV și bacterieni, *Francisella tularensis* și *Borrelia burgdorferi* sl., 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 probă 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. 21
3. Kit de reactivi pentru detecția moleculară de agenți virali TBEV și CCHFV și bacterieni, *Francisella tularensis* și *Borrelia burgdorferi* sl. transmiși căpușele *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: 23
- distribuirea cu ajutorul unor micropipete în hota cu flux laminar PCR, de volume bine specificate și descrise de reactivi pentru 25 μl amestec final de reacție: 25

# RO 133178 B1

- 1 - 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 din revendicarea 2;
- 3 - 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;
- 5 - interpretarea datelor pe baza valorilor CT conform tabelului specificat.
- 7 4. Kit de reactivi pentru detecția moleculară de agenți virali TBEV și CCHFV și  
bacterieni, *Francisella tularensis* și *Borrelia burgdorferi s.l.* transmiși de căpușele *Ixodoidea*  
la om și animale, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că**, pentru utilizarea sa în  
9 sistem multileplex se aplică un protocol specific care implică:
- 11 - distribuirea cu ajutorul unor micropipete în hota cu flux laminar PCR, de volume de  
reactivi pentru 25 μl amestec final de reacție, bine specificate și descrise;
- 13 - 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;
- 15 - afișarea rezultatelor de către soft-ul fiecărui termocicler sub forma unor grafice  
unități arbitrare de fluorescență VS număr de cicluri sau în format logaritmic;
- 17 - interpretarea datelor pe baza valorilor CT pe grupe de agenți patogeni, conform  
tabelului specificat.



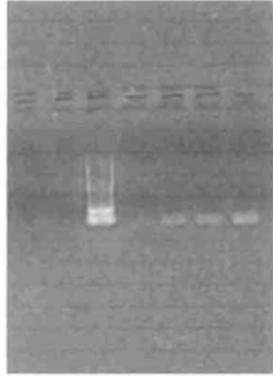


Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

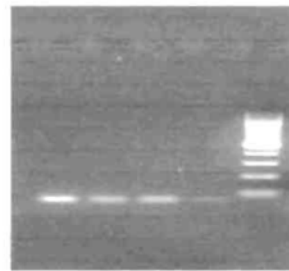


Fig. 4



Fig. 5

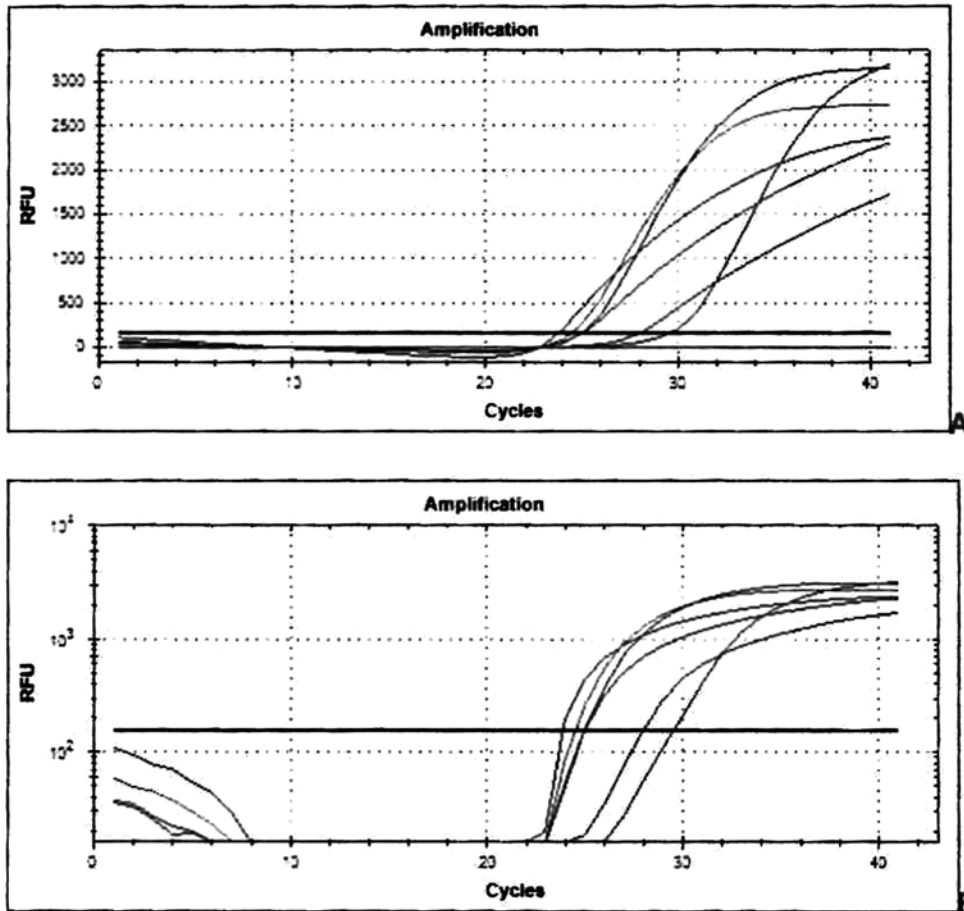


Fig. 6



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 275/2021