



REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1258** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/576 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ

<p>(21) Nr. depozit: s 2017 0125 (22) Data depozit: 2017.12.05</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2018.06.30, BOPI nr. 6/2018</p>
<p>(71) Solicitant: CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE AL REPUBLICII MOLDOVA, MD</p> <p>(72) Inventatori: PINZARU Iurie, MD; SPINU Constantin, MD; ISAC Maria, MD; SAJIN Octavian, MD; HALACU Ala, MD</p> <p>(73) Titular: CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE AL REPUBLICII MOLDOVA, MD</p>	

(54) Metodă de identificare a markerului anti-HVE IgG in serul sangvin

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină, și anume la o metodă de identificare a markerului anti-HVE IgG în serul sangvin și poate fi folosită pentru diagnosticul hepatitei virale E la persoanele din industria alimentară.

Esența invenției constă în examinarea serului sangvin în testul imunoenzimatic cu utilizarea microplăcii adsorbite cu AgHVE și determinarea valorilor densității optice a probelor la lungimea de undă 450...620 nm, apoi se determină valoarea medie a densităților optice a probelor de control negativ după formula: media densităților optice ale probelor de control negativ + 0,350, apoi se determină raportul dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului și

2
valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ și în cazul în care raportul este de până la 0,9, se consideră că rezultatul este negativ, dacă este mai mare de 1,1 este pozitiv, iar probele cu rezultatul de 0,9...1,1 se prelucrează cu suspensie de caolin de 20% cu formula $Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$, apoi se repetă testul imunoenzimatic menționat cu determinarea ulterioară a raportului dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice de control negativ + 0,350, în cazul în care raportul este de până la 0,9, se consideră că rezultatul este negativ, iar dacă este mai mare de 1,1 rezultatul este pozitiv.

Revendicări: 1

(54) Method for identifying the anti-HVE IgG marker in the blood serum

(57) Abstract:

1
The invention relates to medicine, namely to a method for identifying the anti-HVE IgG marker in the blood serum and can be used for the diagnosis of viral hepatitis E in persons in the food industry.

Summary of the invention consists in examining the blood serum in the enzyme immunoassay using a microplate with adsorbed AgHVE and determining the optical density values of the samples by a photometric method at a wavelength of 450...620 nm, then determining the average optical density value of the samples with negative control according to the formula: average of the optical densities of the samples with negative control + 0.350, then determining the ratio of the average optical density value of the patient's serum and

2
the average optical density value of the samples with negative control and if the ratio is up to 0.9, it is considered that the result is negative, if more than 1.1 it is positive, and samples with a result of 0.9...1.1 are treated with a 20% slurry of kaolin of the formula $Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$, then the said enzyme immunoassay is repeated, followed by the determination of the ratio of the average optical density value of the patient's serum and the average optical densities value with negative control + 0.350, if the ratio is up to 0.9, it is considered that the result is negative, and if more than 1.1 the result is positive.

Claims: 1

(54) Метод идентификации маркера анти-HVE IgG в сыворотке крови

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к медицине, а именно к методу идентификации маркера анти-HVE IgG в сыворотке крови и может быть использовано для диагностики вирусного гепатита E у лиц из пищевой промышленности.

Сущность изобретения состоит в исследовании сыворотки крови в иммуноферментном тесте с использованием микропланшета с адсорбированным AgHVE и определением значения оптической плотности фотометрическим методом при длине волны 450...620 нм, затем определяют среднее значение оптической плотности проб с отрицательным контролем по формуле: среднее оптических плотностей проб с отрицательного контроля + 0,350, затем определяют соотношение средней величины оптической плотности

2
сыворотки пациента и средней величины оптической плотности проб с отрицательным контролем и в случае если соотношение составляет до 0,9, считается что результат отрицательный, если больше 1,1 положительный, а пробы с результатом 0,9...1,1 обрабатывают 20%-ой суспензией каолина формулы $Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$, затем повторяют упомянутый иммуноферментный тест с последующим определением соотношения средней величины оптической плотности сыворотки пациента и средней величины оптических плотностей отрицательного контроля + 0,350, если соотношение составляет до 0,9, считается что результат отрицательный, а если больше 1,1 результат положительный.

П. формулы: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

- 5 Invenția se referă la medicină, și anume la o metodă de identificare a markerului anti-HVE IgG în serul sangvin și poate fi folosită pentru diagnosticul hepatitei virale E la persoanele din industria alimentară.
- 10 Problema hepatitei virale E rămâne a fi prioritară la nivel mondial, precum și pentru majoritatea țărilor europene, inclusiv Republica Moldova, unde până recent nu au fost efectuate studii de performanță privind incidența hepatitei virale E, inclusiv în grupurile cu risc sporit de infectare. Ținând cont de aceasta în premieră în Republica Moldova au fost organizate investigații de laborator la anticorpii anti-HVE IgG la angajații întreprinderilor de procesare a cărnii.
- 15 Evidențierea markerului anti-HVE IgG în ser demonstrează o infecție cu virusul HVE suportată în trecut. Medicina clinică contemporană devine vădită prin utilizarea extensivă a tehnologiilor diagnosticului de laborator de înaltă performanță, care sunt vertiginos implementate în practica medicală (I. Joao R. Mesquita, Mette Myrmel, Kathrine Stene-Johansen, Joakim Verbo and Maria S. J. Nascimento. A Public Health initiative on hepatitis E virus epidemiology, safety and control in Portugal - study protocol, BMC infectious Diseases (2016) 16:17, 5 p.;
- 20 Pântea Victor, Monografie Hepatitele virale acute și cronice (actualități), Tipografia Sirius, Chișinău, 2009, 224 p.).
- 25 Investigațiile la prezența markerilor virusului hepatitei virale E se efectuează tehnic, prin reacții imunoenzimice (ELISA), utilizate cel mai frecvent în diagnosticul de laborator pentru detecția prezenței anticorpilor HVE clasa IgM/IgG în ser la persoane, în special din grupele cu risc sporit de infectare.
- 30 Principiul metodei ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) este bazat pe reacția imunologică cunoscută ca reacție „antigen-anticorp” pe un suport, numit “faza solidă” [1]. În godeul micropăcii, sensibilizat cu antigeni cunoscuți, se adaugă proba biologică cercetată, de regulă ser sau plasmă umană. În perioada de incubare se formează complexe Ag-Ac prin intermediul segmentului activ, liber- Fab al anticorpilor monoclonali. Ulterior la complexe imune formate se introduce conjugatul – un ligand marcat cu o enzimă (cel mai frecvent peroxidaza, fosfataza alcalină). Complexul format este identificat în reacția enzimatică prin adăugarea
- 35 soluției cromogen/substrat cu producerea unei reacții colorimetrice (vizibile). Schimbarea colorației depinde de cantitatea antigenului/anticorpului în proba testată. Pentru stoparea reacției enzimice se utilizează “stop-reagentul” (cel mai des – acidul sulfuric). Detecția se efectuează fotometric la lungimea de undă de 450 sau 620 nm [2].
- 40 Metoda imunoenzimatică include următoarele etape:
1. Reacția imunologică – formarea complexului imunologic prin adăugarea reagenților, dintre care unul conține markerul enzimatic.
 2. Stoparea fazei solide pentru îndepărtarea componentelor nespecifice.
 3. Reacția enzimatică prin adăugarea soluției cromogen/substrat și stoparea
- 45 reacției cu “stop-reagent”.
4. Citirea rezultatelor.
 5. Interpretarea rezultatelor.
- 50 Dezavantajul metodei cunoscute constă în aceea că unele probe de ser examinate la prezența markerilor HVE în testul imunoenzimatic (ELISA) demonstrează rezultate incerte din cauza prezenței în seruri a factorilor (inhibitori) nespecifici, care influențează rezultatele reacției prin reducerea specificității și a sensibilității metodei.
- 55 Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode de investigare a serurilor la markerii hepatitei virale E, care include o etapă suplimentară: serurile care în testul imunoenzimatic (ELISA) demonstrează rezultate incerte (nedeterminate), se prelucrează suplimentar cu suspensie de kaolin ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) pentru înlăturarea inhibitorilor nespecifici, apoi repetat sunt examinate în ELISA.

Esența invenției constă în examinarea serului sangvin în testul imunoenzimatic cu utilizarea microplăcii adsorbite cu AgHVE și determinarea valorilor densității optice a probelor la lungimea de undă 450...620 nm, apoi se determină valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ după formula: media densităților optice a probelor de control negativ + 0,350, apoi se determină raportul dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ și în cazul în care raportul este de până la 0,9, se consideră că rezultatul este negativ, dacă este mai mare de 1,1 - pozitiv, iar probele cu rezultatul de 0,9...1,1 se prelucrează cu suspensie de caolin de 20% cu formula $Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$, apoi se repetă testul imunoenzimatic menționat cu determinarea ulterioară a raportului dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice de control negativ + 0,350, în cazul în care raportul este de până la 0,9, se consideră că rezultatul este negativ, iar dacă este mai mare de 1,1 - pozitiv.

15 Rezultatul invenției constă în obținerea rezultatelor finale cu excluderea rezultatelor incerte datorită prelucrării cu suspensie de kaolin ($Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$) pentru înlăturarea inhibitorilor nespecfici.

20 Metoda include examinarea serului sangvin în testul imunoenzimatic cu utilizarea microplăcii adsorbite cu AgHVE și determinarea valorilor densității optice a probelor la lungimea de undă 450...620 nm, apoi se determină valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ după formula: media densităților optice a probelor de control negativ + 0,350, apoi se determină raportul dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ și în cazul în care raportul este de până la 0,9 se consideră că rezultatul este negativ, dacă este mai mare de 1,1 - pozitiv, iar probele cu rezultatul de 0,9...1,1 se prelucrează cu suspensie de caolin de 20% cu formula $Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$, apoi se repetă testul imunoenzimatic menționat cu determinarea ulterioară a raportului dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice de control negativ + 0,350, în cazul în care raportul este de până la 0,9, se consideră că rezultatul este negativ, iar dacă este mai mare de 1,1 - pozitiv.

Etapele metodei revendicate sunt următoarele.

I ETAPĂ

35 1. Inițial se introduce numărul necesar de godeuri în microplacă. Primul godeu gol este rezervat pentru BLC (A1).

40 2. Cantiatarea de 200 μ l de control negativ, care nu conține anti-HVE IgG în ser uman, se diluează în 3 godeuri (B1,C1,D1), apoi 200 μ l de calibrator, care conține ser uman slab pozitiv la anti-HVE IgG, se introduce în 2 godeuri (E1,F1), iar 200 μ l de control pozitiv, care conține ser uman cu anti-HVE IgG pozitiv cu un titru mai mare de 100 UI/ml, în godeul (G1) se picură 200 μ l diluant + 10 μ l de ser de la persoana investigată. Controalele și calibratorul sunt prediluate, gata de utilizare.

45 3. Urmează adăugarea a 200 μ l diluant de probă (DILSPE) în toate godeurile (A2-H2). Apoi se distribuie în mod corespunzător câte 10 ml de probă în godeuri. Pentru a se dispersa pe deplin proba diluată se amestecă ușor, evitând debordarea și contaminarea godeurilor adiacente. În continuare se verifică dacă culoarea diluantului, după adăugarea de probe, se modifică de la verde deschis la verde-albastru închis, aceasta demonstrând că probele au fost adăugate.

50 4. Cantitatea de 50 μ l diluant (DILAS) se dispersează în toate controalele/calibratoarele și godeurile cu probe, cu excepția A1. Se verifică dacă culoarea a devenit albastru închis.

5. Microplaca pregătită se incubează timp de 45 min la temperatura de + 37°C și se sigilează cu peliculă, numai atunci când testul este efectuat manual. Nu se acoperă microplaca atunci când se utilizează echipament automat ELISA.

55 6. Microplaca se spală de 5 ori în mașina de spălat automată cu livrarea și aspirarea a 300 μ l per godeu cu soluție diluată pregătită anterior (1:20).

7. Urmează pipetarea a 100 μ l de enzime conjugate, care conțin globulina antispecie de iepure sau șoarece și peroxidază din hrean, în fiecare godeu, cu excepția A1- BLC, și se acoperă cu capac; se verifică dacă această componentă de culoare roșie a fost distribuită în toate godeurile, cu excepția A1.

8. Microplaca se spală de 5 ori în mașina de spălat automată cu livrarea și aspirarea a 300 μl per godeu cu soluție diluată pregătită anterior (1:20).

9. Apoi se adaugă câte 100 μl de cromogen substrat, care conține 0,02% de peroxid de hidrogen, sol. de 4% de dimetilsulfoxid și sol. de 0,03% de tetrametilbenzidină, în fiecare godeu și se incubează la temperatura de 18...24°C timp de 15 min.

10. Reacția se stopează prin adăugarea a câte 100 μl de acid sulfuric, 0,3 M, după care se determină valorile densității optice la lungimea de undă 450...620 nm.

10 Rezultatele testelor se calculează cu ajutorul unei valori limită, determinată după formulă:

Media densității optice (DO) control negativ + 0,350.

15 Rezultatele negative ale serului pacientului sunt atunci când densitatea optică a serului/densitatea optică medie a controalelor negative +0,350 este < 0,9, în cazul cand DO a serului/DO medie a controalelor negative +0,350 este 0,9...1,1 – rezultat echivoc, în cazul cand DO a serului/DO medie a controalelor negative +0,350 este >1,1 – rezultat pozitiv.

ETAPA II

20 După investigarea serurilor pacienților în testul ELISA, selectăm probele de ser suspecte (Ser/media DO control negativ + 0,350 = 0,9...1,1) pentru a evita influența inhibitorilor nespecifici prin utilizarea preparatului „Kaolin”.

25 Absorbția inhibitorilor nespecifici din serul uman se realizează prin utilizarea preparatului “Kaolin”, care conține lut alb, oxid de siliciu, aluminiu și apă ($Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$). Prelucrarea serurilor se efectuează prin următoarea procedură: produsul “Kaolin” 20% se diluează cu soluție fiziologică (1:5); ulterior 100 μl de ser se prelucrează cu 400 μl de soluție fiziologică (1:5), apoi se adaugă suspensia de „Kaolin” și serul diluat într-o eprubetă, astfel se obține diluția serului în concentrație de 1:10, care se depune la temperatura de 18...25°C, timp de 25 min, fiind amestecat periodic. Urmează centrifugarea (25 min, 2000 rot./min), după care serul se aspiră și se păstrează la temperatura de 4°C.

30 ETAPA III

După prelucrarea cu suspensie de „Kaolin” 20% a probelor de ser nedeterminate (echivoce) pentru evitarea influenței inhibitorilor nespecifici, probele prelucrate se investighează repetat în reacția ELISA cu produsele trusei diagnostice „HVE IgG” DIA. PRO, Diagnostic Bioprobes SRL (Milano) - Italy. Pentru argumentarea celor expuse prezentăm datele obținute (tab.) privind investigarea a 270 seruri sanguine, recoltate de la angajații întreprinderilor de procesare a cărnii din raionul Anenii-Noi și Soroca în baza acordului informat prin metoda prototip și ceea propusă pentru identificarea markerului (anticorpilor) anti-HVE IgG. Rezultatele obținute demonstrează că investigarea serurilor în ELISA prin metoda-prototip a evidențiat 40 44 persoane cu markerul anti-HVE IgG, la 6 persoane rezultatele au fost nedeterminate (posibil din cauza inhibitorilor nespecifici prezenți în ser), iar pentru 220 persoane rezultatele au fost negative. Investigarea celor 6 seruri după metoda propusă în ELISA, care a inclus prelucrarea prezumtivă a lor cu suspensie de Kaolin 20%, a demonstrat foarte clar apartenența lor la “rezultatele negative”. În ansamblu 45 prin metoda propusă au fost identificate 44 (16,3%) persoane cu markerul anti-HVE IgG și 226 (83,7%) negative la prezența markerului nominalizat; rezultate echivoce nu au fost identificate. Pe când metoda prototip a demonstrat următoarele: 44 (16,3%) persoane pozitive la markerul anti-HVE IgG, 6 (2,2%) cu rezultate echivoce și 220 (81,5%) cu rezultate negative. Așadar, metoda propusă demonstrează o 50 eficacitate sporită de identificare și evaluare a anticorpilor anti-HVE IgG în serul pacienților investigați prin ELISA cu absența rezultatelor echivoce și creșterea specificității.

55 Rezultatele identificării și evaluării prin ELISA a markerului anti-HVE IgG în serul sangvin a lucrătorilor de la întreprinderile de procesare a cărnii din r-nele Anenii-Noi și Soroca prin metoda cunoscută și cea propusă

Tabel

Contingentul examinat cu risc sporit de infectare	Nr. de probe investigate	Identificarea markerului anti-HEV IgG											
		Metoda prototip						Metoda propusă					
		Pozitiv		Echivoc		Negativ		Pozitiv		Echivoc		Negativ	
		Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%
Lucrătorii combinatului de carne "Salamer", s. Mereni, "Aviselect", s. Bulboaca, r-ul Anenii-Noi și DebutSor, r-ul Soroca	270	44	16,3±2,2	6	2,2±0,9	220	81,5±2,4	44	16,3±2,2	0	0	226	83,7±2,3

5

(56) Referințe bibliografice citate in descriere:

1. HEV IgG Third generation Enzyme immunoassay for the determination of IgG antibodies to hepatitis E virus in human serum and plasma. DIA.PRO Bioprobes SRL Via G. Carduci n° 27,20099 Sesto San Giovanni (Milano)-Italy.
2. Spînu C., Holban T., Guriev V., Spînu Ig. Hepatitele virale și HIV. Tipografia AȘM, Chișinău, 2013, 296 p.

(57) Revendicări:

Metodă de identificare a markerului anti-HVE IgG in serul sangvin, care include examinarea serului sangvin în testul imunoenzimatic cu utilizarea microplăcii adsorbite cu AgHVE și determinarea valorilor densității optice a probelor la lungimea de undă 450...620 nm, apoi se determină valoarea medie a densităților optice a probelor de control negativ după formula: media densităților optice ale probelor de control negativ + 0,350, apoi se determină raportul dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ și în cazul în care raportul este de până la 0,9 se consideră că rezultatul este negativ, dacă este mai mare de 1,1 este pozitiv, iar probele cu rezultatul de 0,9...1,1 se prelucrează cu suspensie de caolin de 20% cu formula $Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$, apoi se repetă testul imunoenzimatic menționat cu determinarea ulterioară a raportului dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice de control negativ + 0,350, în cazul în care raportul este de până la 0,9, se consideră că rezultatul este negativ, iar dacă este mai mare de 1,1 rezultatul este pozitiv.