

Invenția se referă la medicină, și anume la o metodă de identificare a markerului antiSARS-CoV-2 IgG în serul sanguin și poate fi folosită pentru diagnosticul infecției cu COVID-19.

Recent, la sfârșitul lunii decembrie 2019 a fost descoperit un nou coronavirus, genul Betacoronavirus, SARS-CoV-2 în Wuhan, China, care este foarte infecțios și este transmis cu ușurință de la om la om, provocând la moment o pandemie de semnificație globală. (Huang C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wahan, China. *Lancet*, no 395, 2020, p. 497-506; Xu X., Chen, P., Wang, J. et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. *Sci. China Life Sci.* No 63, 2020, p. 457-460. <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1637-5>). Coronavirusurile au o formă variabilă sferică sau ovoidă, pleomorfă, cu un diametru de 120...160 nm, având un înveliș extern pe care se află niște proeminențe glicoproteice, numite spicule, foarte lungi (24 nm) și pedunculatate, care-i dau un aspect de coroană (de unde și denumirea de coronavirus). Virionul are un înveliș extern de natură lipoproteică, care conține proteine virale: glicoproteina S, proteina E de înveliș, proteina de membrană (M) și hemaglutinin - esteraza (HE). Genomul constă dintr-o singură moleculă liniară de acid ribonucleic (ARN), monocatenară de sens pozitiv. ARN este infecțios, servește ca genom și ca ARNm viral. Transcrierea genomului este un proces complex și implică sinteza a opt catene de ARN de sens negativ subgenomic intermediar. Cele cinci proteine structurale sunt traduse de la ARN subgenomic.

Coronavirusurile sunt foarte răspândite în natură, producând la om și animale afecțiuni ale căilor respiratorii și ale tractului gastrointestinal, unele foarte grave, iar altele ușoare sau chiar neexprimate clinic. Coronavirusul SARS-CoV-2 se transmite direct pe cale respiratorie (picături), nu este exclusă calea fecal/orală. Actualmente nu există un tratament antiviral specific sau preventiv (vaccin) în infecțiile umane cu coronavirus, tratamentul fiind simptomatic (Zhu N. et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* vol. 328, no 3, 2020, p. 727-733). Infecția cu virusul SARS-CoV-2 poate fi ușoară, moderată sau severă; aceasta din urmă poate include: febră, cefalee, tuse, dificultăți de respirație, pneumonie bilaterală, diaree. Complicații: detresă respiratorie acută, insuficiență renală, viremie, insuficiență cardiacă, uneori cu sfârșit letal (Sangeeta D., Deepjyoti K. Wuhan Coronavirus: a fast-emerging global threat. *Int. J. Health. Res. Medico Leg. Prae.* 2020 January, vol. 6 (1), p. 79-82, DOI 10.31741/ijhrmlp.v6i1.2020.17; Li Q., Guan X., Wu P., Wang X., Zhou L., Tong Y., et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>).

Diagnosticul de laborator al infecției cu COVID-19 poate urma două căi:

- evidențierea virusului, detecția ARN viral SARS-CoV-2 prin metoda RT-PCR. Analiza PCR permite identificarea virusului SARS-CoV-2 atunci când el este prezent la persoana bolnavă prin identificarea materialului genetic (ARN) în probele obținute de la persoanele supuse investigației. Conform protocolului de diagnostic al infecției cu virusul SARS-CoV-2 proba se consideră pozitivă dacă se detectează două fragmente genetice specifice coronavirusurilor, dintre care unul specific SARS-CoV-2;
- detecția anticorpilor specifici IgM și IgG - care reprezintă răspunsul imun al organismului la virusul SARS-CoV-2. Identificarea anticorpilor prin analiza imunoenzimatică (AIE) în probele de ser ale pacienților poate avea următoarele semnificații: infecție precoce (IgM+; IgG-); persoană aflată în tranzit de infecție (IgM+; IgG+) și persoană aflată în faza de recuperare (IgM-; IgG+).

Interpretarea rezultatelor obținute în testul imunoenzimatic, în dependență de valoarea Cut-off presupune următoarele variante: rezultat negativ; rezultat echivoc și rezultat pozitiv.

Diagnosticul serologic al pacienților (inclusiv donatorii de sânge), realizat prin analiza imunofermenativă ELISA de generația a treia cu specificitatea >98% și sensibilitatea >98% pentru identificarea markerului antiSARS-CoV-2 IgG a inclus kiturile de reactive ai companiei DIA PRO (Italia). Complexul imun din conjugatul legat se formează la adăugarea substratului/cromogen, care dă un produs de culoare galbenă. Pentru stoparea reacției enzimatice se utilizează reagentul de stopare, și anume acidul sulfuric. Detecția se efectuează fotometric la lungimea de undă de 450 nm în dependență de filtrul utilizat.

Algoritmul analizei imunofermenative ELISA pentru identificarea markerului antiSARS-CoV-2 IgG include următoarele etape:

1. Formarea complexului imunologic, urmare a reacției imunologice cu reagenți, unde unul conține markerul enzimatic.
2. Stoparea fazei solide pentru îndepărtarea componentelor nespecifice cu adăugarea conjugatului.
3. Adăugarea soluției cromogen/substrat și stoparea reacției cu reagentul de stopare.
4. Evaluarea și interpretarea rezultatelor reacției ELISA.
5. După 1...2 săptămâni investigarea probelor de sânge cu rezultatul echivoc de la pacienții examinați, inclusiv donatorii primari de sânge în ELISA se repetă [1].

Dezavantajele metodei menționate constau în aceea că unele probe de sânge (ser), recoltate de la pacienți, inclusiv donatori primari de sânge cu diagnosticul clinic de infecție COVID-19 și examinate prin ELISA demonstrează prezența unor rezultate echivoce, urmare aflării diferitor factori inhibitori nespecifici în ser, care influențează rezultatele finale ale reacției de identificare a markerului antiSARS-CoV-2 IgG în ELISA. În cazul obținerii rezultatelor echivoce proba de ser trebuie să fie testată repetat în ELISA, peste 1...2 săptămâni. Această situație face dificil interpretarea rezultatelor finale în timp scurt.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode de testare a probelor de sânge (ser) uman la prezența markerului antiSARS-CoV-2 IgG prin ELISA, pentru excluderea rezultatelor echivoce (nedeterminate).

Soluția propusă înlătură prezența inhibitorilor nespecifici în ser după prelucrarea cu suspensie de caolină cu examinarea ulterioară în testul ELISA, astfel modificând eficacitatea testului, care este manifestată prin sporirea specificității și sensibilității.

Esența invenției constă în examinarea serului sangvin în testul imunoenzimatic (ELISA) cu utilizarea microplăcii adsorbite cu antigen specific de SARS-CoV-2 și determinarea valorilor densităților optice ale probelor prin metoda fotometrică la lungimea de undă 450 nm, apoi se determină valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ după formula: valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ + 0,250, apoi se determină raportul dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ + 0,250, 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 ale probelor de control negativ + 0,250, 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.

Cercetările serurilor prin reacția imunoenzimatică ELISA pentru identificarea markerului anti SARS-CoV-2 IgG s-a realizat cu produsul companiei Dia Pro, Milano-Italy (96 determinations Enzyme Immunoassay for the determination of IgG antibodies to COVID-19 in human serum and plasma).

Metoda propusă include următoarele etape:

1. Efectuarea investigațiilor prin reacția imunoenzimatică ELISA la prezența markerului anti SARS-CoV-2, unde au fost identificate probele de ser cu rezultat echivoc (raportului dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ + 0,250 - 0,9...1,1), care apoi au fost prelucrate cu suspensie de caolin de 20%, pregătită extempore, utilizând echipamentul „Vortex-1 plus”.
2. Investigarea probelor de ser după prelucrarea cu suspensie de caolin prin reacția imunoenzimatică ELISA pentru evidențierea markerului antiSARS-CoV-2 IgG.
3. Interpretarea rezultatelor.

Rezultatul invenției constă în excluderea rezultatelor echivoce, care cer investigarea repetată a serului pacienților după un interval de 2 săptămâni cu cheltuieli suplimentare: recoltare, transportare, investigare, timp suplimentar pentru investigarea repetată a pacientului etc.

Metoda propusă de identificare a markerului anti-SARS-CoV-2 IgG în sângele uman include 3 etape, care contribuie la obținerea rezultatului scontat.

I etapă: Efectuarea investigațiilor prin reacția imunoenzimatică ELISA la prezența markerului antiSARS-CoV-2, unde sunt identificate probele de ser cu rezultat echivoc, prelucrarea primară a probelor de ser echivoce (raportului dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ + 0,250 - 0,9...1,1) cu suspensie de caolin de 20% cu formula  $Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$ .

Conform algoritmului propus metoda include următoarele proceduri tehnologice.

Procedura de prelucrare a serurilor echivoce include următoarele: suspensia de caolin (lut alb) în concentrație de 20% se diluează cu soluție fiziologică (1:3). Presumptiv suspensia de caolin se pregătește extempore prin amestecare ușoară a particulelor de mineral resuspendate cu ajutorul instrumentului „Vortex-1 plus”: consecutiv de 3 ori, timp de 5 min, cu interval de 3...4 min, în regim de 1000 rot./min, la temperatura de 18...24°C. În continuare se pregătește în altă eprubetă 100 μl de ser echivoc, la care se adaugă 400 μl de soluție fiziologică (1:4) fiind amestecate periodic. Ulterior, volumele identice (1:1) de suspensie de caolin și ser diluat se toarnă în eprubetă. Apoi conținutul acestei eprubete se prelucrează în „Vortex-1 plus” timp de 5 min și se incubează la temperatura de 18...25°C timp de 30 min, pentru absorbție și înlăturarea inhibitorilor nespecifici. Urmează centrifugarea (5 min la 10000 rot./min), după care, serul se aspiră și se investighează prin reacția ELISA.

II etapă: testarea probelor de ser de la donatorii primari de sânge prezumptiv prelucrate cu suspensie de caolin prin reacția ELISA pentru depistarea markerului antiSARS-CoV-2 IgG cu utilizarea reactivelor trusei de diagnostic de laborator pentru infecția COVID-19, DiaPro, Diagnostic Bioprobes SRL 20099, Milano-Italy, „COVID-19 IgG” „Enzyme Immunoassay for the determination of the IgG antibodies to COVID-19 in human serum and plasma”.

Inițial se montează numărul necesar de stripuri cu godeuri, care sunt absorbite cu antigen specific COVID-19, conform instrucțiunii trusei menționate. Apoi în godeurile stripurilor montate se picură reagenți și probele investigate prelucrate cu suspensie de caolin, cu excepția godeului A1, în altele 3 godeuri B1,C1,D1 se picură 200 μl de control negativ, care conține ser uman negativ >0150 DO 450 nm, în godeul E1 se picură 200 μl de control pozitiv - >0,500 DO 450 nm, iar în godeurile F1, G1, H1 - se adaugă câte 200 μl de diluant (DILSPE), care conține 1% proteină serică, 10 mM de soluție citrat de Na tampon cu pH 6,0±0,1, 0,5% Tween 20, 0,09% azid de sodiu și 0,045% ProClin 300. Apoi în godeurile F1, G1, H1 se picură câte 10 μl de ser cercetat. În continuare, în toate godeurile, cu excepția A1, se adaugă câte 50 μl DILAS, care conține 10 mM de soluție tampon tris cu pH 8,0±10,1 și 0,045% ProClin 300.

Stripurile pregătite se sigilează cu peliculă de polietilenă și se incubează timp de 45 min, la temperatura de +37°C, apoi se spală în regim automat de 5 ori programat pentru 5 cicluri cu 20 sec repaos prin livrarea de 350 μl per godeu a soluției WASHBUF, care conține 10 mM de soluție tampon fosfat cu pH 7,0±0,2, 0,05% Tween 20 și 0,045% ProClin 300 diluată și pregătită anterior (1:20). După această procedură se adaugă câte 100 μl de enzimă conjugat, cu excepția godeului A1 (blank), care conține peroxidază, conjugat cu anticorpi IgG policlonali, 5% BSA, 10mM de

soluție tampon tris cu pH 6,8±0,1, 0,045% ProClin 300 și 0,02% de soluție de gentamicină sulfat. Stripurile pregătite și sigilate cu peliculă de polietilenă se incubează timp de 45 min la temperatura de +37°C, apoi se spală în regim automat de 5 ori cu intervalul de 20 sec prin livrare și aspirare a câte 350 μl *per* godeu cu soluție de 10 mM tampon fosfat cu pH 7,0±0,2%, 0,05%, Tween 2,0 și 0,04% ProClin 300, pregătită anterior (1:20).

În continuare se adaugă câte 100 μl soluție tampon fosfat cu pH 3,5-3,8, 4% dimetilsulfoxid, 0,03% tetra-metilbenzidină și 0,02% peroxid de hidrogen în fiecare godeu cu incubarea ulterioară la temperatura camerei de 18...24°C, timp de 15 min. Reacția se stopează prin adăugarea a câte 100 μl de acid sulfuric (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,3M), apoi după 3...5 min se determină valorile densității optice (DO) a probelor de ser prin metoda fotometrică la lungimea de undă de 450 nm. Urmează determinarea valorii medii a densităților optice ale probelor de control negativ după formula: valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ + 0,250, apoi se determină raportul dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului (S) și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ + 0,250 (CO).

III etapă: interpretarea rezultatelor conform tab. 1.

Tabel 1

S/CO	Interpretarea
<0,9	Negativ
0,9-1,1	Zona gri
>1,1	Pozitiv

În cazul, în care raportul este de până la 0,9 se consideră ca rezultatul este negativ, iar dacă este mai mare de 1,1 rezultatul este pozitiv (tab. 1).

Remarcă: metoda propusă exclude apariția rezultatelor echivoce (0,9...1,1), care cer investigarea repetată a pacienților sau donatorilor după 1...2 săptămâni.

Exemplu de identificare a antiSARS-CoV-2 IgG în serul pacienților, care s-au vindecat după infecția COVID-19.

În Centrul Național de Transfuzie a Sângelui au fost examinați 119 donatori (la markerul antiSARS-CoV-2, clasa IgG) din rândul pacienților: persoane de sex masculin, cu vârsta de 18...60 ani, cu istoric de boală COVID-19, caz confirmat, vindecați (rezolvarea completă a simptomelor) și rezultat negativ pentru COVID-19 prin efectuarea repetată a testului PCR. După forma de manifestare clinică a patologiei COVID-19; 73 (61,3%) donatori au demonstrat patologii cu formă ușoară (infecții respiratorii virale acute), 36 (30,3%) donatori au demonstrat patologii cu formă medie (laringotraheită acută, bronșită acută, rinofaringită acută), iar 10 (8,4%) donatori au demonstrat patologii cu formă gravă (pneumonie bilaterală, formă gravă). Plasma (serul) a fost colectată la cel puțin 14 zile de la recuperarea clinică. Din 119 donatori de plasmă proaspătă congelată convalescentă, 104 donatori sau 87,4±3,0% au prezentat indici peste valoarea de referință (>1,1 - pozitiv), ce indică prezența anticorpilor antiSARS-CoV-2, clasa IgG. 13 donatori sau 10,9±2,9% au prezentat indici sub valoarea de referință (<0,9 - negativ), ce indică absența anticorpilor, iar 2 donatori sau 1,7±1,2% au prezentat indici cu valoare echivocă, S/CO= 0,9...1,1 (tabelul 2). Posibil apariția rezultatelor echivoce (indeterminate) a fost cauzată de prezența factorilor nespecifici în probele de ser examinate, care esențial pot modifica specificitatea și sensibilitatea testului. Aceste două persoane cu rezultat echivoc au servit temei pentru investigarea repetată la prezența anticorpilor nominalizați după o tehnologie originală, descrisă în metoda revendicată, care permite eliminarea factorilor nespecifici din serurile examinate, astfel înlăturând noțiunea de rezultat echivoc la etapa de interpretare finală a rezultatelor obținute. Tehnologia identificării antiSARS-CoV-2 în serul pacienților conform metodei revendicate include următoarele etape, inclusiv:

- efectuarea investigațiilor prin reacția imunoenzimatică ELISA la prezența markerului antiSARS-CoV-2, unde au fost identificate probele de ser cu rezultat echivoc, prelucrarea primară a probelor de ser echivoce (raportului dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ + 0,250 - 0,9...1,1) cu suspensie de caolin de 20% cu formula Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·2SiO<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O;
- testarea probelor de ser de la donatorii primari de sânge după prelucrarea cu suspensie de caolin prin reacția imunoenzimatică ELISA;
- interpretarea rezultatelor obținute.

Investigarea probelor de ser de la donatorii primari de sânge prin metoda revendicată a demonstrat ca nivelul ser prevalenței pozitive a constituit 87,4±30%, iar celor negative - 12,6±3,0% (tabelul 2).

Metoda propusă sporește eficacitatea testului, manifestată printr-o creștere semnificativă a specificității și sensibilității testului. Concomitent, metoda revendicată de identificare a markerului antiSARS-CoV-2 IgG exclude examinarea repetată a serului pacientului în ELISA după 1...2 săptămâni cu economie de timp, reactive de laborator, consumabile și reprezintă beneficiu pentru pacient.

Rezultatele investigațiilor și evaluării prezentei markerului antiSARS-CoV-2 IgG în serurile sangvine, colectate de la donatorii primari de sânge în Centrul Național de Transfuzie a Sângelui.

Tabel 2

Nr. d/o	Contingentul investigat	Total	Identificarea anti-COVID-19 IgG										
			Metodă cunoscută						Metodă propusă				
			pozitiv		echivoc		negativ		pozitiv		echivoc	negativ	
			abs	P±ES	abs	P±ES	abs	P±ES	abs	P±ES		abs	P±ES
	Donatori	119	104	87,4±3,0	2	1,7±1,2	13	10,9±2,9	104	87,4±3,0	0	15	12,6±3,0