

Descriere:

Invenția se referă la domeniul medicinei și medicinei veterinare, în special, la procedeele de identificare a antigenului rotavirusurilor.

Este cunoscut procedeul de preparare a diagnosticumului pentru identificarea antigenului rotaviral în reacția de coaglutinare în picătură pe lama de sticlă, prelucrând o singură dată reagentul stafilococic, ce conține proteina A, cu imunoglobuline specifice timp de 20 min [1].

Este cunoscut de asemenea procedeul de preparare a diagnosticumului pentru depistarea antigenului rotaviral în reacția de coaglutinare în fază solidă, prelucrând o singură dată reagentul stafilococic, ce conține proteina A, cu imunoglobuline specifice, contactul fiind de 15-30 min [2].

Este cunoscut procedeul frecvent folosit la prepararea diagnosticumului pentru depistarea antigenilor bacterieni și virali (inclusiv rotavirali) în reacția de coaglutinare prin picătură pe lamă de sticlă, prelucrând o singură dată reagentul comercial stafilococic, ce conține proteina A, cu imunoglobuline specifice timp de 45-75 min [3].

Dezavantajele procedeelelor descrise mai sus sunt sensibilitatea și specificitatea reduse la depistarea antigenilor rotavirali în reacția de coaglutinare, făcând-o mai puțin eficientă față de metoda de referință (analiza imunoenzimatică).

Problema pe care o rezolvă invenția dată este sporirea specificității și sensibilității procedeelelor la depistarea antigenului rotaviral.

Procedeul propus înlătură dezavantajele descrise mai sus prin aceea că pentru sensibilizarea reagentului stafilococic se folosește sensibilizarea multiplă: divizibilitatea contactului cu imunoglobulinele specifice se mărește de cinci ori, iar timpul unui contact se mărește până la 5-6 ore, ceea ce face posibilă conjugarea pe suprafața reagentului stafilococic a unei cantități mai mari de imunoglobuline specifice.

Procedeul propus de preparare a diagnosticumului pentru depistarea antigenului rotaviral permite de a spori sensibilitatea și specificitatea la detecția antigenilor rotavirali în reacția de coaglutinare în comparație cu cel mai apropiat analog.

Realizarea procedeelelor

Reagentul comercial stafilococic (tulpina Cowan-I) ce conține proteina A (producție a concernului "Imunoghen" NPO"Biomed") este trecut în suspensie în 2,0 ml de apă distilată și menținut la temperatura camerei (16-24°C) timp de 2,0±0,5 ore pentru a se umfla. Ulterior suspensia se centrifughează, supernatantul se înlătură, iar la precipitat se adaugă 2,0 ml de imunoglobuline specifice. După a doua trecere în suspensie amestecul reagentului cu imunoglobuline pentru conjugare se lasă timp de 5-6 ore la temperatura de 16-24°C, permanent agitându-l cu aparatul șutel. Amestecul se centrifughează, supernatantul se înlătură, iar la precipitat se adaugă din nou 2,0 ml de imunoglobuline specifice. Procedura indicată mai sus se repetă de 5 ori pentru saturarea maximă a reagentului cu anticorpi specifici. Ulterior suspensia se spală de trei ori cu soluție fiziologică și se aduce la volumul inițial (2,0 ml) cu soluție fiziologică. Reagentul coaglutinant obținut pentru detecția antigenului rotaviral se folosește în reacția de coaglutinare pe lama de sticlă.

Efectuarea reacției

Pe lama de sticlă, așezată pe o foaie de hârtie neagră, se aplică separat cu ajutorul micropipetei (dozator) o picătură de material supus investigației și câte o picătură de control pozitiv (antigen rotaviral) și negativ (soluție fiziologică) în volum de 20,0 ml. La picăturile aplicate se adaugă câte o picătură (20,0 ml) de diagnosticum, se amestecă lent cu ansa bacteriologică timp de 0,5-1,0 min. Citirea rezultatelor se efectuează pe parcursul a 0,5-2,0 min numai după apariția coaglutinării totale sau pronunțate în proba-control (+) și lipsa acestui fenomen în proba-control (-). Aprecierea reacției se efectuează după scara de 4+:

(+ + + +) - coaglutinare totală, reacție pozitivă marcantă;

(+ + + -) - coaglutinare pronunțată, reacție pozitivă;

(+ + - -) - coaglutinare parțială, reacție slab pozitivă;

(+ - - -) - coaglutinare slab vizibilă, reacție slab pozitivă;

(- - - -) - absența coaglutinării, reacție negativă.

Proba este calificată pozitivă fiind prezent antigenul rotaviral numai în cazul aprecierii coaglutinării la scara (+ + + +) sau (+ + + -) în prezența controlului.

Procedeul este ilustrat de următorul exemplu.

Oportunitatea prelucrării de 5 ori în dinamică a reagentului stafilococic cu imunoglobuline specifice antivirale se bazează pe datele (tab.1), ce demonstrează că fiecare prelucrare consecutivă sporește considerabil cantitatea de imunoglobuline specifice conjugate cu reagentul stafilococic.

Tabelul 1

Etapale conjugării reagentului stafilococic	Concentrația anticorpilor antivirali (mg/ml)	
	Fixați (M±m)	Nefixați (M±m)
1	0,272 ± 0,07	1,728 ± 0,07
2	0,794 ± 0,10	1,206 ± 0,10
3	0,943 ± 0,09	1,057 ± 0,09
4	1,254 ± 0,16	0,746 ± 0,16
5	1,567 ± 0,12	0,433 ± 0,12
6	1,622 ± 0,09	0,378 ± 0,09

Tabelul 2

Metoda aplicată	Rezultatul investigațiilor	Reacția imunoenzimatică (RIE) "Acvapast"		Sensibilitatea (%)	Specificitatea (%)	Coincidența (%)
		pozitiv	negativ			
Reacția de coaglutinare (RCOA) cu diagnosticumul propus	Pozitiv	50	39	80,6±2,3	82,2±2,3	81,9±2,3
	Negativ	12	180			
P				<0,05	<0,05	<0,05
Reacția de coaglutinare (RCOA) - analogul cel mai apropiat	Pozitiv	16	82	72,7±2,4	74,7±2,3	74,6±2,3
	Negativ	6	243			

Remarcă: Sensibilitatea = (RCOA și RIE pozitiv/RIE pozitiv) x 100%

Specificitatea = (RCOA și RIE negativ/RIE negativ) x 100%

Coincidența = (RCOA și RIE pozitiv) + (RCOA și RIE negativ)/(RIE pozitiv + RIE negativ) x 100%

Avantajul procedurii propus față de cel mai apropiat analog este confirmat de datele obținute la detecția agenților rotavirali în reacția de coaglutinare efectuată paralel cu diagnosticumul celui mai apropiat analog. În calitate de metodă de referință s-a folosit testul imunoenzimatic (RIE) produs de firma "Acvapast", or. Sankt-Petersburg (tab. 2). Rezultatele expuse demonstrează că indicele sensibilității procedurii propus față de metoda de referință RIE a alcătuit 80,6±4,8%, iar al celui mai apropiat analog - 72,7±4,8%, adică nivelul probabilității de încredere - P este mai mic de 0,05. Indicele specificității procedurii propus este vădit superior celui mai apropiat analog (74,7±4,6%) și alcătuiește 82,2±4,6% (P<0,05). De asemenea e necesar de menționat că rezultatele procedurii propus coincid cu cele ale metodei de referință (RIE) în 81,9±4,6% cazuri, iar cu ale celui mai apropiat analog în 74,6±4,6% (P < 0,05).

Tabelul 3

Procedeu-analogul cel mai apropiat (Инструкция по применению стафилококкового реагента, содержащего белок А, сухого, МЗ СССР, 02.04.1990 г.)	Prepararea diagnosticumului pentru identificarea antigenului rotaviral după un procedeu original
1. Rehidratarea	
2,0 ml de apă distilată; 2,0±0,5 h la t°=16-24°C	Analogic
2. Sensibilizarea	
Imunoglobulinele specifice + reagentul stafilococic, expoziția 45-75 min la t°=16-24°C cu agitare permanentă Procedura se efectuează o singură dată	Imunoglobulinele specifice + reagentul stafilococic, expoziția 5-6 h la t°=16-24°C cu agitare permanentă Procedura se repetă de 5 ori.
3. Modul de realizare	
Reacția de coaglutinare pe lamă de sticlă	Analogic
4. Eficacitatea	
Specificitatea în raport cu metoda de referință (RIE)	
74,7±4,6% (P < 0,05)	82,2 ±4,6%
Sensibilitatea în raport cu metoda de referință (RIE)	
72,7±4,8% (P < 0,05)	80,6 ±4,8%
Concordanța în raport cu metoda de referință	
74,6±4,6% (P < 0,05)	81,9 ±4,6%

Astfel, conform tab. 3, procedeuul propus în comparație cu metoda celui mai apropiat analog sporește semnificativ specificitatea și sensibilitatea diagnosticumului odată cu majorarea divizibilității și duratei de sensibilizare a reagentului stafilococic cu imunoglobulinele specifice.