Invenţia se referă la medicină, în special la o metodă de identificare a markerului infecţiei hemotransmisibile, provocate de HTLV-1/2 şi poate fi utilizată pentru diagnosticul de laborator în sângele donatorilor de sânge, transplant, contingentului medical, populaţiei generale si în special la persoanele cu risc sporit de infectare (utilizatori de droguri intravenoase, persoanele aflate la tratament de hemodializă, medicii antrenaţi în manopere invazive etc.) pentru reducerea riscului de transmitere ale acestor infecţii.

Datele statistice arată că cel puţin de la cinci până la zece milioane de persoane din întreaga lume sunt infectate cu HTLV-1 şi între trei şi cinci milioane de oameni din intreaga lume sunt infectaţi cu HTLV-2. Ratele de seroprevalenţă ale HTLV diferă în funcţie de aria geografică, compoziţia sociodemografică şi riscuri individuale de comportament. La nivel mondial, ratele de seroprevalenţă HTLV-1 tind să crească odată cu vârsta şi sunt mai mari la femei decât la bărbaţi, deoarece transmiterea sexuală are loc mai des de la bărbaţi la femei decât la bărbaţi de la femei. În Europa, unde infecţia cu HTLV-2 se întâlneşte aproape exclusiv în randul utilizatorilor de droguri intravenoase, se estimează aproximativ de la 20000 până la 40000 de persoane infectate (Gessain A., Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. Front Microbiol. No 3, 2012, p. 388; doi : 10.3389/fmicb.2012.00388. [PubMed: 23162541]).

În Brazilia, statisticile arată că 2,5 milioane de persoane sunt infectate cu HTLV-1, reprezentând numărul cel mai mare de indivizi din lume infectaţi cu acest virus (Kozlowski A.G., Matos M.A., Carneiro M.A., Lopes C.L., Teles S.A., Vicente C.P., Martins R.M. Seroprevalence of HTLV in a population of HIV1-infected patients in midwestern Brazil).

Pentru depistarea agenţilor cauzali ai infecţiilor virale se utilizează diferite metode de diagnostic, inclusiv metode serologice, care contribuie la determinarea agentului cauzal prin reacţia imunoenzimatică (ELISA), care include metoda indirectă - determină indirect prezenţa Ag în organismul uman cu folosirea anticorpilor HTLV-1/2, formaţi în procesul răspunsului imunologic al organismului uman la pătrunderea agentului infecţios. În multe cazuri este necesar de efectuat 2 sau mai multe metode de diagnostic, deseori se impune efectuarea repetată a investigaţiilor de laborator (A. Calancea, S. Carajia, R. Cojocaru et al. Diagnosticul de laborator al hepatitelor virale B, C si D, instructiuni metodice, Chisinau, 2008). Investigaţiile la prezenţa anti-HTLV-1/2 se efectuează prin metoda imunoenzimatică ELISA conform instrucţiunilor comerciale.

Metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) este o tehnică imunoenzimatică utilizată frecvent pentru identificarea prezenţei anticorpilor în proba testată. Metoda ELISA decurge în câteva etape:

- formarea complexului imunochimic prin adăugarea markerului enzimatic;
- spălarea fazei solide pentru indepărtarea componentelor nespecifice;
- adăugarea soluţiei cromogen/substrat şi stoparea reacţiei;
- citirea rezultatelor şi interpretarea lor.

Principiul metodei de identificare cunoscute include iniţial blocarea totală sau parţială a încărcăturii antigenice de pe pereţii godeurilor stripului de către anticorpii serului investigat cu adăugarea în continuare a serului standardizat pentru evidenţierea antigenului de pe suprafaţa godeului neconjugat. Acest fenomen este evidenţiat în continuare prin analiza imunoenzimatică. Schema generală a reacţiei ELISA: testarea serului uman se realizează în 2 godeuri. În primul godeu se adaugă serul negativ cu anticorpii markerilor infecţiilor - martor reagent (MR), simultan cu serul pacientului, în al doilea - serul pozitiv, martor neutralizant (MN), simultan cu serul pacientului. După incubarea şi detectarea anticorpilor infecţiilor se analizează rezultatele obţinute [1].

Dezavantajele metodei cunoscute sunt: sensibilitatea şi specificitatea joasă în comparaţie cu reacţia de polimerizare în lanţ (PCR), analiza prin imunoblot, RIA. Confirmarea probelor iniţial pozitive sau incerte la prezenţa markerilor infecţiilor hemotransmisibile prin imunoblot sau PCR cere resurse financiare suplimentare. Dependenţa reacţiei enzimatice de factorii fizico-chimici (temperatură, umiditatea, pH, calitatea apei, lumina şi al.). Folosirea în componenţa kiturilor diagnostice ale substanţelor cu efect cancerigen sau toxic. Analiza şi evaluarea revistei literaturii a demonstrat că pe piaţă nu se regăsesc teste comerciale pentru identificarea markerului anti-HTLV-1/2. În legatură cu absenţa testului comercial imunologic pentru identificarea markerului virusului limfotropic uman tip 1/2 (HTLV-1/2) a fost necesar de a elabora o metodă de identificare a probelor de ser uman pozitive şi incerte la prezenţa markerilor infecţiilor hemotransmisibile şi, totodată pentru sporirea eficacităţii testului.

Problema pe care o rezolvă invenţia constă în elaborarea metodei de identificare a markerului infecţiei hemotransmisibile (anti-HTLV-1/2) prin reacţia imunoenzimatică în scopul sporirii eficacităţii testului prin înlăturarea inhibitorilor nespecifici în serul pacienţilor şi excluderea transmiterii acestor infecţii prin transfuzii de sânge de la donatori.

Esenţa invenţiei constă în efectuarea testului imunoenzimatic, care include elaborarea unui martor reagent, care conţine ser negativ anti-HTLV-1/2 şi unui martor neutralizant, care conţine ser pozitiv anti-HTLV-1/2, apoi se utilizează un strip cu godeuri pentru anti-HTLV-1/2, în care se adaugă reagenţii: în godeul A1 se adaugă 100 µl de martor reagent, în godeul B1 se adaugă 100 µl de martor neutralizant, în godeurile C1, E1 şi G1 se adaugă câte 40 µl de diluant pentru probă, care conţine soluţie tampon fosfat de 10%, 0,14 de ser bovin, albumină şi 10 µl de ser cercetat, şi câte 50 µl de martor reagent, iar în godeurile D1, F1 şi H1 se adaugă câte 40 µl de diluant pentru probă, care conţine soluţie tampon fosfat de 10%, 0,14 de ser bovin, albumină şi 10 µl de ser cercetat, şi câte 50 µl de martor neutralizant, apoi probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min, după care toate godeurile se spală de 5 ori cu soluţie tampon, care conţine tris HCl tampon, 0,5% Tween 20 şi 0,1% Proclin mM 300 şi diluat cu apă distilată în raport de 1:25, apoi în toate godeurile, cu excepţia A1, se adaugă câte 100 µl de enzimă conjugată, care conţine imunoglobulină anti-umană IgG şi peroxidază, după care se incubează la temperatura de 37°C, timp de

60 min, apoi toate godeurile repetat se spală de 5 ori cu soluţie tampon şi se adaugă câte 50 µl de cromogen, care conţine soluţie tampon citrat fosfat, peroxid de hidrogen şi câte 50 µl de substrat, care conţine soluţie tampon de tetrametilbenzidină şi se incubează la temperatura de 18...24°C, timp de 30 min, după care reacţia se stopează prin adăugarea a câte 100 µl de acid sulfuric de 0,5 M, apoi se determină valorile densităţii optice la lungimea de undă de 450/620 nm şi se calculează după formula: martor reagent/martor neutralizant pentru anti-HTLV-1/2, în cazul în care raportul este mai mic de 2,0 se determină un rezultat negativ, iar dacă este mai mare de 2,0 - un rezultat pozitiv.
Rezultatul obţinut: metoda propusă pentru identificarea markerului anti-HTLV-1/2 a infecţiilor hemotransmisibile face posibil realizarea investigării cu aceleaşi seruri prin folosirea ambelor tehnologii concomitent cu obţinerea rezultatelor scontate în timp de 3 ore cu economisirea surselor financiare.
Avantajele: sensibilitatea şi specificitatea înaltă în comparaţie cu metoda imunoenzimatică clasică, utilizată în calitate de cea mai apropiată soluţie, tehnologie de utilizare accesibilă pentru toate laboratoarele unităţilor sanitaro-medicale de diferite nivele de asistenţă medicală, preţul reagenţilor utilizaţi accesibil.
Exemplu de realizare a invenţiei.
Serurile pacienţilor cu rezultatele incerte se testează la markerul infecţiei hemotransmisibile anti-HTLV-1/2. Pentru înlăturarea inhibitorilor nespecifici (rezultatele incerte) identificate în ELISA se aplică metoda de investigare propusă.
Metoda de confirmare a markerului anti-HTLV-1/2 constă în elaborarea martorului reagent (MR), care conţine ser negativ la anti-HTLV-1/2 şi martor neutralizant (MN), care conţine ser pozitiv la anti-HTLV-1/2.
Tabelul 1

	I strip - anti-HTLV-1/2
Al	100 µl martor reagent
B1	100 µl martor neutralizant
C1	40 µl diluant pentru probă+ 10 µl ser 1+ 50 µl martor reagent
Dl	40 µl diluant pentru probă+ 10 µl ser 1+ 50 µl martor neutralizant
E1	40 µl diluant pentru probă+ 10 µl ser 2+ 50 µl martor reagent
F1	40 µl diluant pentru probă+ 10 µl ser 2+ 50 µl martor neutralizant
G1	40 µl diluant pentru probă+ 10 µl ser 3+ 50 µl martor reagent
H1	40 µl diluant pentru probă+ 10 µl ser 3+ 50 µl martor neutralizant

Schema investigaţiilor la prezenţa markerului infecţiei hemotransmisibile anti-HTLV-1/2 este prezentat în tabelul 1.
Metoda de identificare a markerului anti-HTLV-1/2 în serul sangvin uman constă în efectuarea testului imunoenzimatic, care include elaborarea unui martor reagent, care conţine ser negativ anti-HTLV-1/2 şi unui martor neutralizant, care conţine ser pozitiv anti-HTLV-1/2, apoi se utilizează un strip cu godeuri pentru anti-HTLV-1/2, în care se adaugă reagenţii: în godeul A1 se adaugă 100 µl de martor reagent, în godeul B1 se adaugă 100 µl de martor neutralizant, în godeurile C1, E1 şi G1 se adaugă câte 40 µl de diluant pentru probă, care conţine soluţie tampon fosfat de 10%, 0,14 de ser bovin, albumină şi 10 µl de ser cercetat, şi câte 50 µl de martor reagent, iar în godeurile D1, F1 şi H1 se adaugă câte 40 µl de diluant pentru probă, care conţine soluţie tampon fosfat de 10%, 0,14 de ser bovin, albumină şi 10 µl de ser cercetat, şi câte 50 µl de martor neutralizant, apoi probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min, după care toate godeurile se spală de 5 ori cu soluţie tampon, care conţine tris HCl tampon, 0,5% Tween 20 şi 0,1% Proclin mM 300 şi diluat cu apă distilată în raport de 1:25, apoi în toate godeurile, cu excepţia A1, se adaugă câte 100 µl de enzimă conjugată, care conţine imunoglobulină anti-umană IgG şi peroxidază, după care se incubează la temperatura de 37°C, timp de 60 min, apoi toate godeurile repetat se spală de 5 ori cu soluţie tampon şi se adaugă câte 50 µl de cromogen, care conţine soluţie tampon citrat fosfat, peroxid de hidrogen şi câte 50 µl de substrat, care conţine soluţie tampon de tetrametilbenzidină şi se incubează la temperatura de 18...24°C, timp de 30 min, după care reacţia se stopează prin adăugarea a câte 100 µl de acid sulfuric de 0,5 M, apoi se determină valorile densităţii optice la lungimea de undă de 450/620 nm şi se calculează după formula: martor reagent/martor neutralizant pentru anti-HTLV-1/2, în cazul în care raportul este mai mic de 2,0 se determină un rezultat negativ, iar dacă este mai mare de 2,0 - un rezultat pozitiv.
Rezultatele investigaţiilor de laborator la prezenţa infecţiei hemotransmisibile de HTLV-1/2 sunt prezentate în tabelul 2.
Analiza şi evaluarea ulterioară a rezultatelor investigaţiilor de laborator la prezenţa markerului anti-HTLV-1/2 prin metoda cunoscută demonstrează prezenţa acestora în 10,1±3,4% de cazuri, probele incerte au fost depistate în 3,8±2,2%, iar cele negative – 86,1±3,9% de cazuri. Rezultatele investigaţiilor de laborator la prezenţa markerului anti-HTLV-1/2 prin metoda revendicată demonstrează prezenţa markerului anti-HTLV-1/2 în 10,1±3,4%. Ulterior prin metoda de confirmare propusă cele 3 probe incerte s-au dovedit a fi negative. Aşadar, metoda propusă de identificare a markerului anti-HTLV1/2 demonstrează o sporire semnificativă (până la 100%) a sensibilităţii şi

specificităţii metodei de identificare a markerului anti-HTLV-1/2, în special pentru serurile incerte la prezenţa markerului nominalizat. Metoda propusă privind investigarea persoanelor, inclusiv cu risc sporit de infectare (donatorii de sânge, pacienţii hemodializaţi, lucrătorii medicali, utilizatorii de droguri intravenoase etc.) la markerul anti-HTLV-1/2 urmare a valorificării în practica medicală va contribui la reducerea semnificativă a riscului de infectare cu infecţia hemotransmisibilă HTLV-1/2, în special în sistemele de transfuzie a sângelui, transplant, proceduri de hemodializă etc.

Rezultatele identificării markerilor anti- HTLV-1/2 la utilizatorii de droguri intravenoase
Tabelul 2

Utilizatori de droguri intravenoase	Nr.de probe investigate	Rezultatele investigaţiilor la prezenţa markerilor infecţiilor hemotransmisibile										
		Metoda cunoscută						Metoda revendicată				
		Pozitiv		Incert		Negativ		Pozitiv		Incert	Negativ	
		Total	M+m	Total	M+m	Total	M+m	Total	M+m	Total	Total	M+m
79	79	8	10,1 ± 3,4	3	3,8 ±2,2	68	86,1± 3,9	8	10,1± 3,4	0	71	89,9± 3,4