

Invenția se referă la medicină, și anume la o metodă de diagnostic al hepatitei virale B cu determinarea AgHBs și confirmarea lui ulterioară la persoanele cu expunere accidentală, cum sunt personalul medical, utilizatorii de droguri, pacienții aflați în tratament de hemodializă etc.

Hepatita virală B rămâne a fi o problemă prioritară la nivel mondial, precum și în majoritatea țărilor europene, inclusiv în Republica Moldova. Conform estimărilor Organizației Mondiale a Sănătății (OMS) 2 miliarde de persoane din populația globului au contractat infecția cu virusul hepatitei B, dintre care 350...400 milioane de persoane sunt infectate cronic și prezintă o sursă potențială de infecție pentru populație și risc sporit în situații de expuneri accidentale (World Health Organization. Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection, march, 2015; World Health Assembly (WHA) resolution 60.26 Worker's health global plan of action. Geneva, World Health Organization, 2007). Prevalența infecției cu virusul hepatitei B la populația generală a Republicii Moldova cu endemicitate medie variază în dependență de regiuni (frecvența decelării AgHBs constituie 2...7%; riscul de infectare pe parcursul vieții este de 20...60% pentru toate grupele de populație, iar rata de cronicizare a infecției virale hepatice cu virusul B 15...20% (Constantin Spînu, Petru Iarovoi, Tiberiu Holban, Lilia Cojuhari. Monografie Hepatita virală B (etiologie, epidemiologie, diagnostic, tratament și profilaxie), Chișinău, 2008, 200 p.; C. Spînu, T. Holban, V. Gurev, Ig. Spînu. Monografie Hepatite virale și HIV (aspecte etiologice, epidemiologice, clinice, diagnostic de laborator, tratament și profilaxie), Chișinău, 2013, 296 p.).

Prevenirea expunerii rămâne principala strategie în reducerea infecțiilor ocupaționale cu hemotransmitere, ceea ce demonstrează necesitatea elaborării unor noi procedee rapide de identificare a markerilor virusurilor hepatitelor virale B, C și D, în special pentru persoanele cu expunere accidentală (Bloodborne pathogens for occupational exposure. Lexington, Kentucky, University of Kentucky Occupational Health and Safety, 2008; Siguranța injecțiilor, Ghid practic, Chișinău, 2015, p. 26-32).

Etapele de management al expunerii accidentale la sânge cu risc de contractare a infecției cu virusul hepatitei virale B includ:

1. Raportarea evenimentului;
2. Evaluarea gravității situației și îngrijirile primare acordate de personalul medical expus accidentului;
3. Evaluarea clinică și testarea serologică la markerii hepatitei virale B;
4. Supravegherea serologică și profilaxia hepatitei virale B;
5. Evaluarea persoanei care a constituit sursa posibilă de infecție (pacientul).

Medicina clinică contemporană devine vădită prin utilizarea extensivă a tehnologiilor diagnosticului de laborator de înaltă performanță, care sunt vertiginos implementate în practica medicală.

Investigațiile la prezența markerilor virusului hepatitei virale B AgHBs și AgHBs confirmator se efectuează tehnic prin reacții imunoenzimice (ELISA), utilizate cel mai des în diagnosticul de laborator pentru detecția prezenței antigenului AgHBs în ser/plasmă în special la persoanele cu expunere accidentală.

Metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) este bazată pe reacția imunologică cunoscută ca reacție „antigen-anticorp” pe un suport, care se numește “faza solidă” (de obicei microplăci din polisterol, pe suprafața cărora sunt fixați) anticorpi monoclonali cunoscuți. În godeul microplăcii, sensibilizat cu anticorpii cunoscuți, se adaugă proba biologică cercetată, de regulă ser sau plasmă umană. În perioada de incubație se formează complexe Ac-Ag 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 peroxidază, fosfatază alcalină). Complexul format este identificat în reacția enzimatică prin adăugarea soluției cromogen/substrat cu producerea unei reacții colorimetrice (vizibile). Virajul 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 405, 450 sau 490 nm.

Metoda imunoenzimatică include următoarele etape:

1. Reacția imunologică – formarea complexului imunologic prin adăugarea reagenților, din care unul conține markerul enzimatic;
2. Stoparea fazei solide pentru îndepărtarea componentelor nespecifice;
3. Reacția enzimatică prin adăugarea soluției cromogen/substrat și stoparea reacției cu “stop-reagent”;
4. Citirea rezultatelor;
5. Interpretarea rezultatelor.

Conform algoritmului existent, recomandat de OMS, CDC, ECDC, testarea întru evidențierea și confirmarea markerului AgHBs virusului hepatitei B, în special în cazuri de expuneri accidentale, include două etape.

Prima etapă, utilizarea unei truse speciale (comerciale) pentru evidențierea markerului AgHBs hepatitei virale B. Realizarea acestei etape conform tehnologiei existente necesită estimativ 3 ore [1].

A doua etapă, utilizarea unei truse speciale (test confirmator) pentru confirmarea sau infirmarea rezultatului (pozitiv sau negativ) obținut în urma realizării primei etape. Pentru realizarea testului de confirmare sunt necesare 3,5 ore [2].

Dezavantajele procedurii existente: așadar, examinarea serului/plasmei obținute de la persoană, în special cu expunere accidentală, realizată în două etape conform algoritmului existent, necesită 6,5 ore, care nu de fiecare dată se încadrează în timpul zilei de lucru, în special în condiții când proba ajunge la laborator în a doua jumătate sau la finele zilei de lucru.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă este reducerea maximă a riscului de transmitere a hepatitei virale B prin reducerea timpului de 2 ori (de la 6,5 ore la 3,5 ore) la efectuarea reacției imunofermentative la prezența markerilor AgHBs și AgHBs confirmator, în special în situații de expunere accidentală, întru elaborarea măsurilor de urgență pentru a reduce riscul de infectare a persoanelor implicate.

Esența invenției constă în aceea că în două stripuri cu godeuri se utilizează ser uman ce nu conține AgHBs, ser uman negativ la anticorpii AgHBs, ser cu anticorpi la AgHBs cu un titru mai mare de 100 UI/ml și ser de la persoana investigată în primul strip, iar în al doilea strip se utilizează ser uman ce nu conține AgHBs, ser fetal de bovine pentru calibrare, ser uman inactivat, care conține AgHBs calibrați și ser de la persoana investigată. După incubare la temperatura de 18...24°C, timp de 30 min, în toate probele se adaugă conjugat diluat 1:20 de globulină antispecie de iepure sau șoarece și peroxidază din hrean, apoi probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 120 min. Ulterior se adaugă soluție cromogenă ce include soluție de 0,02% de peroxid de hidrogen, soluție de 4% de dimetilsulfoxid și soluție de 0,03% de tetrametilbenzidină, se incubează la temperatura de 18...24°C, timp de 30 min, după care se determină valorile densității optice prin metoda fotometrică la lungimea de undă de 450...620 nm. Rezultatul obținut constă în elaborarea unui algoritm nou de testare la markerii AgHBs și AgHBs confirmator la persoanele cu expunere accidentală.

Conform algoritmului existent de identificare a markerului AgHBs virusului hepatitei virale B (CDC, USA), în coloana de testare este precizată necesitatea investigării persoanelor la prezența markerilor AgHBs cu confirmarea ulterioară a rezultatelor prin determinarea AgHBs confirmator, optimizând excluderea apariției fals-rezultatelor.

În corespundere cu instrucțiunea de testare la markerul AgHBs pentru determinarea markerului AgHBs în ser ori plasmă investigațiile se efectuează pe stripuri cu godeuri cu ajutorul setului de reagenți inclus în trusă [1].

Prima etapă a celei mai apropiate soluții se începe cu spălarea o singură dată a stripurilor cu sorbent anti-HBsAg cu diluant washer (500 μl), în conformitate cu instrucțiunea setului "HBsAg one Version ULTRA" (DIA.PRO) - utilizat în calitate de exemplu.

#### A1-BLC

B1 Negativ Control -150 μl+100 μl conjugat

C1 Negativ Control -150 μl+100 μl conjugat

D1 Negativ Control -150 μl+100 μl conjugat

E1 Calibrator -150 μl+100 μl conjugat

F1 Calibrator -150 μl+100 μl conjugat

G1 Control Pozitiv -150 μl+100 μl conjugat

H1 Ser -150 μl+100 μl conjugat.

Godeul A1 rămâne gol ca BLC (blanc), ceea ce permite verificarea calității acestui test-sistem. Controlul negativ prezintă ser uman ce nu conține markerul studiat (B1, C1, D1), iar calibratorul în stare liofilizată conține ser fetal de bovine, HBs Ag neinfecat recombinant în 0,5 IU/ml. Înainte de utilizare calibratorul se dizolvă în apă distilată (E1, F1). Control pozitiv prezintă ser uman inactivat care conține antigenul respectiv calibrat și standardizat (G1). Conjugatul dizolvat 1:20 conține globulină antispecie (iepure, șoarece), conjugată cu peroxidază din hrean sau altă enzimă.

După această procedură se efectuează incubarea microplăcii la temperatura de 37°C, timp de 120 min, apoi se spală de 5 ori a câte 40 s, se adaugă 200 μl de cromogen/substrat, care conține soluție de peroxid de hidrogen și soluție de tetrametilbenzidină și iarăși se incubează pe o durată de 30 min la temperatura de 18...24°C. Citirea rezultatelor se face la lungimea de undă de 450...620 nm cu interpretarea lor după formula de calcul - cut-off=medie B1+C1+D1+0,050.

Interpretarea rezultatelor:

Ser cu densitatea optică / Cut-off cu densitatea optică <0,9-negativ

Ser cu densitatea optică / Cut-off cu densitatea optică 0,9-1,1- fals

Ser cu densitatea optică / Cut-off cu densitatea optică >1,1- pozitiv

Odată cu obținerea rezultatelor suspecte (pozitive) este necesar de a efectua etapa II-a, care confirmă AgHBs.

Etapa a II-a de confirmare a prezenței sau absenței markerului AgHBs a virusului hepatitei virale B în biosubstratul (plasmă/ser) persoanei examinate se efectuează conform instrucțiunii setului "HBsAg Confirmation" (DIA.PRO) – utilizate de noi în calitate de exemplu cu realizarea următorilor pași de picurare în godeuri cu sorbent anti-HBs Ag (anticorpi monoclonali):

#### A1-BLC

B1 Negativ Control-150 μl+100 μl conjugat

C1 Negativ Control -150 μl+100 μl conjugat

D1 Negativ Control -150 μl+100 μl conjugat

E1 Control Reagent C -150 μl+100 μl conjugat

F1 Neutralizant Reagent -150 μl+100 μl conjugat

G1 Ser 1-150 μl+50 μl Control Reagent C+100 μl conjugat

H1 Ser 1-150 μl+50 μl Neutralizant Reagent+100 μl conjugat

Control Reagent conține ser uman negativ la anticorpii AgHBs. Neutralizant Reagent conține un titru semnificativ >100 UI/ml de anticorpii la AgHBs. Conjugatul dizolvat 1:20 conține globulină antispecie (iepure, șoarece), conjugată cu peroxidază din hrean sau altă enzimă.

Urmează incubarea la temperatura de 18...24°C, timp de 30 min, apoi se pipetează cu 100 µl de conjugat diluant (conține globulină antispecie 1:20 (iepure, șoarece), conjugată cu peroxidază din hrean sau altă enzimă) și iarăși se incubează pe o durată de 120 min la temperatura de 37°C. După spălarea godeurilor (cu soluție de spălare, dizolvată 1:20) de 5 ori a câte 40 s se efectuează pipetarea cu 200 µl de cromogen/substrat, care conține soluție de peroxid de hidrogen și soluție de tetrametilbenzidină și se incubează 30 min la temperatura de 18...24°C. Apoi se evaluează rezultatele în conformitate cu analiza fotocolorimetrică pe lungimea de undă de 450...620 nm. Cut-off=E1/F1<2. Timpul efectuării testului de confirmare (infirmare) a markerului AgHBs virusului hepatitei virale B în biosubstratul persoanei examinate constituie 3,5 ore. Rezultatele pozitive se consideră când valoarea cut-off la proba examinată este > 2, iar negative <2.

În ansamblu, timpul necesar pentru realizarea testului de identificare a markerului AgHBs (I etapă) și de confirmare (II etapă) a AgHBs virusului hepatitei virale B în biosubstratele persoanei examinate expus în metoda-prototip constituie 6,5 ore.

Tabel-model de realizare a algoritmului propus privind procedura de testare la markerii hepatitei virale B la persoanele cu expunere accidentală

Tabelul 1

Godeuri	AgHBs confirmator	AgHBs
A1	BLC	BLC
B1	Control Negativ(CN)	Control Negativ(CN)
C1	Control Negativ(CN)	Control Negativ(CN)
D1	Control Negativ(CN)	Control Negativ(CN)
E1	Control Reagent(CR)	Calibrator
F1	Neutralizant Reagent (NR)	Calibrator
G1	Ser/Control Reagent (CR)	Control Pozitiv
H1	Ser/Neutralizat Reagent (NR)	Ser

Metoda propusă pentru identificarea și confirmarea markerului AgHBs a virusului hepatitei virale B face posibilă realizarea acestor proceduri (tehnologii) în cadrul unei singure etape cu obținerea rezultatelor scontate în timp de 3,5 ore. Esența invenției constă în efectuarea testării simultane la markerii Ag HBs și AgHBs confirmator realizate pe microplacă sensibilizată cu anticorpi monoclonali anti-AgHBs cu consumabile fabricate de același producător. Spre exemplu, întru confirmarea realizării algoritmului propus s-au folosit consumabile și reagenți ale companiei Dia Pro, Diagnostic Bioprobes SRL, Italy cu termen de valabilitate 09.2017, Ag HBs One Ultra, lot C3T3/3 termen de valabilitate 09.2017 și Ag HBs confirmator, lot N3/1.

Metoda include determinarea și confirmarea markerului AgHBs și constă în utilizarea a două stripuri cu godeuri, care inițial se spală cu un sorbent anti-HBsAg, după care se picură reagenții, și anume în primul strip primul godeu (A) rămâne fără reagent și este utilizat în calitate de probă blanc, în alte trei godeuri (B,C,D) se picură câte 150 µl de ser uman ce nu conține AgHBs, care servesc în calitate de probă de control negativ, în godeul cinci (E) se picură 150 µl de ser uman negativ la anticorpii AgHBs, care servește în calitate de probă de control reagent, în godeul șase (F) se picură 150 µl de ser uman cu anticorpi la AgHBs cu un titru mai mare de 100 UI/ml, care servește în calitate de probă de reagent neutralizant, în godeul șapte (G) se picură 150 µl de ser de la persoana investigată și 50 µl de ser uman negativ la anticorpii AgHBs și în godeul opt (H) se picură 150 µl de ser de la persoana investigată și 50 µl de ser cu anticorpi la AgHBs cu un titru mai mare de 100 UI/ml, după care probele se incubează la temperatura de 18...24°C, timp de 30 min, apoi se pregătește al doilea strip în care se exclude proba blanc (A), în următoarele trei godeuri (B,C,D) se picură câte 150 µl de ser uman ce nu conține AgHBs, care servesc în calitate de probă de control negativ, în godeurile cinci și șase (E,F) se picură 150 µl de ser fetal de bovine, AgHBs neinfecțios recombinant de 0,5 UI/ml și diluat cu apă distilată, care servesc în calitate de probă de calibrare, în godeul șapte (G) se picură 150 µl de ser uman inactivat, care conține AgHBs calibrat, care servește în calitate de probă de control pozitiv și în godeul opt (H) se picură 150 µl de ser de la persoana investigată, după care probele se incubează la temperatura de 18...24°C, timp de 30 min, apoi în toate godeurile din ambele stripuri se picură câte 100 µl de conjugat diluat 1:20 de globulină antispecie de iepure sau șoarece și peroxidază din hrean, după care probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 120 min, după incubare stripurile se spală de 5 ori a câte 40 s și se pipetează soluție cromogenă ce include soluție de 0,02% de peroxid de hidrogen, soluție de 4% de dimetilsulfoxid și soluție de 0,03% de tetrametilbenzidină în toate godeurile ambelor stripuri, apoi se incubează la temperatura de 18...24°C, timp de 30 min, după care se determină valorile densității optice prin metoda fotometrică la lungimea de undă de 450...620 nm, apoi se determină raportul valorilor obținute ale compușilor din godeurile șapte și opt (G/H) în primul strip, iar în al doilea strip se determină valoarea medie a densităților optice ale compușilor cu probe de control negativ (B,C,D) conform formulei:

media densităților optice ale probelor de control negativ + 0,050;

apoi se determină raportul dintre valoarea densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice ale compușilor cu probe de control negativ (B,C,D), în cazul în care raportul valorilor obținute ale compușilor din godeurile șapte și opt (G/H) din primul strip este mai mare de 2, iar raportul dintre valoarea densității optice a serului pacientului și valoarea medie a densităților optice ale compușilor cu probe de control negativ este mai mare de 1,1 se determină prezența AgHBs în serul sangvin.

În total au fost examinate prin metoda prototip și cea expusă de noi 92 seruri colectate de la diferite contingente cu risc sporit de expunere. Rezultatele investigațiilor sunt expuse în tabelul 2.

Rezultatele identificării și confirmării markerului Ag HBs virusului hepatitei virale B la persoanele cu risc sporit de expunere prin metoda prototip și cea propusă

Tabelul 2

Contingentul examinat cu risc sporit de expunere	Numărul de probe investigate	Identificarea și confirmarea markerului AgHBs						Incidența (%)	Coincidența (%)
		Metoda prototip			Metoda propusă				
		Pozitiv	Negativ	Timp* (ore)	Pozitiv	Negativ	Timp* (ore)		
Utilizatorii de droguri	24	6	18	6,5	6	18	3,5	25,0	100,0
Personalul medical	36	5	31	6,5	5	31	3,5	13,9	100,0
Pacienții aflați în tratamentul de dializă	32	8	24	6,5	8	24	3,5	25,0	100,0

Timpul\* - intervalul de timp în care au fost realizate testele.

Așadar, metoda propusă privind procedura de testare la markerii hepatitei virale B la persoanele cu expunere accidentală demonstrează o coincidență de 100% a rezultatelor obținute în comparație cu metoda prototip, o reducere a timpului de la 6,5 ore la 3,5 ore, inclusiv a volumului de lucru și a consumabilelor. Procedura de testare propusă de noi, care include realizarea simultană a tehnologiilor de identificare și confirmare a markerului AgHBs are o importanță semnificativă pentru medicină (sănătatea publică), deoarece face posibil ca măsurile de profilaxie (nespecifice și specifice) realizate imediat după expunere să reducă la minimum riscul de contractare, inclusiv accidentală, a infecției cu virusul hepatitei virale B.