

Invenția se referă la medicină, și anume la o metodă de identificare a markerului anti-AgHE IgG în serul sangvin și poate fi folosită pentru diagnosticul hepatitei virale E la persoanele cu risc sporit de infectare.

Hepatitele virale constituie una dintre problemele majore de sănătate publică din cauza răspândirii globale, endemicității, morbidității și mortalității crescute.

Hepatitele virale reprezintă o grupă de infecții cu răspândire largă și variații mari în diferite regiuni. Ele depind în mare măsură atât de factorii socio-economici și starea sistemului medico-sanitar, cât și de factorii mediului extern (apă, alimente- HVA, HVE) cu un impact socio-economic inestimabil.

Problema hepatitei virale E rămâne a fi prioritară la nivel mondial, precum și pentru majoritatea țărilor europene, inclusiv pentru Republica Moldova. Prezența markerului anti-HVE IgG în ser arată infecția hepatitei virale E suportată în trecut (Krawczynski K, Kamili S, Aggarwal R. Clinical spectrum and epidemiology of hepatitis E virus infection. Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease; 2000 April 9-13; Atlanta). În premieră în Republica Moldova au fost organizate și investigate la prezența anti-HVE IgG angajații întreprinderilor de procesare a cărnii(Technical Guide for ELISA. Where Better Science Begins, Joao R. Mesquita, Mette Myrnel, 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). Utilizarea pe larg a metodelor noi de diagnostic, suficient de diversificate și modernizate, a schimbat totalmente conceptul etiologic al multor maladii infecțioase. Mai mult decât atât, baza tehnologică curentă de diagnostic permite mediului contemporan de a efectua operativ modificările de reglare și de a elabora programe eficiente pe termen lung. Necesitatea elaborării, aplicării metodelor noi de diagnostic de laborator este dictată în contextul mai multor probleme întru stabilirea diagnosticului în baza rezultatelor investigațiilor de laborator.

Metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) este o tehnică imunoenzimatică, utilizată cel mai des în imunologie pentru detecția prezenței anticorpilor în proba testată. Tehnica ELISA este utilizată atât cu scop diagnostic în medicină, cât și în scop științific și industrial pentru detecția diverselor substanțe (Krawczynski K, Kamili S, Aggarwal R. Clinical spectrum and epidemiology of hepatitis E virus infection. Proceedings of the 10th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease; 2000 April 9-13; Atlanta, Diagnosticul de laborator al hepatitelor virale B, C și D. Instrucțiuni metodice, Chișinău 2008, p.79-94). Investigațiile la prezența anti-HVE IgG se efectuează tehnic, prin reacții ELISA metoda indirectă – cea mai răspândită pentru determinarea anticorpilor specifici. Faza solidă este imobilizată cu antigen, se adaugă proba testată, după spălare se adaugă în exces anticorpi marcați, specifici fața de anticorpii cercetați (așa - numiți anticorpi antispecie). Metoda ELISA este bazată pe reacția imunologică cunoscută ca reacție “antigen-anticorp”. Pe un suport, numit “faza solidă” (microplăci din polistiren) este absorbit un antigen cunoscut. În godeul microplăcii se adaugă serul cercetat. În perioada de incubare se formează complexe Ag-Ac. Ulterior se introduce conjugatul – un ligand marcat cu o enzimă (peroxidaza, fosfataza alcalină).

Complexul format este identificat prin adăugarea soluției cromogen (substrat cu producerea unei reacții colorimetrice). Pentru stoparea reacției enzimatice se utilizează “stop-reagentul” (acidul sulfuric). După fiecare etapă microplăcile sunt spălate cu o soluție tampon care conține detergent pentru a facilita îndepărtarea proteinelor sau anticorpilor nespecifici. Detecția se efectuează fotometric la lungimea de undă 405, 450 sau 490 nm [1].

Dezavantajele metodei cunoscute constau în sensibilitatea joasă în comparație cu reacțiile radioimunoenzimatice, de polimerizare în lanț, imunoblot, care sunt la un preț foarte scump, reacția ELISA este dependentă de mulți factori fizico-chimici, cum sunt temperatura, pH, calitatea apei, lumina.

Problema pe care o soluționează metoda revendicată constă în elaborarea unei metode de identificare a markerului anti-HVE IgG, care să prezinte sensibilitate și specificitate de 100% la probele neclare, la un preț accesibil în privința reagenților de laborator.

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 cu identificarea probelor de ser pozitive și negative la anti-AgHE IgG cu densitatea optică, respectiv mai mare de 1,000 și mai mică de 0,100, totodată în cazul probelor cu rezultate neclare serul se prelucrează la temperatura de 56°C, timp de 30 min, și se amestecă în volume egale cu o soluție de periodat de potasiu de 0,05 M, după 2 ore se adaugă la amestec soluție de 5% de glucoză în raport de 1:1, apoi se repetă testul imunoenzimatic pentru probele de ser prelucrat, diluat în raport de 1:4 cu utilizarea probei standardizate martor reagent cu ser anti-HVE IgG negativ cu densitatea optică mai mică de 0,100 și probei martor neutralizant cu ser anti-HVE IgG pozitiv cu densitatea optică mai mare de 1,000, se determină valorile densităților optice, care se calculează după formula: densitatea optică a probei martor reagent/densitatea optică a probei martor neutralizant, și în caz dacă raportul este mai mic de 2 proba la anti-HVE IgG se consideră negativă, iar dacă este mai mare de 2 - pozitivă.

Rezultatul invenției constă în identificarea rezultatelor neclare la anti-HVE IgG, care sunt de o sensibilitate înaltă, cu posibilitatea de a detecta concentrația substanței dorite, începând cu 0,05 ng/ml, utilizând o cantitate minimă de material pentru diagnostic cu vizualizarea rezultatului reacției fără a fi necesar instrumentar costisitor, și reagenții de diagnostic sunt la un preț accesibil.

Principiul metodei de identificare constă în neutralizarea anti-HVE IgG din proba testată în ser uman. Schema generală a reacției ELISA: testarea serului uman se face paralel în 2 godeuri. În primul godeu se adaugă serul anti-HVE IgG negativ - control reagent (CR), simultan cu serul pacientului, în al doilea - serul anti-HVE IgG pozitiv - neutralizant reagent (NR) simultan cu serul pacientului. După incubarea și detecția anti-HVE IgG se analizează rezultatele obținute.

Pe piața Republicii Moldova nu există un test comercial confirmator la anti-HVE IgG, care înlătură din ser inhibitorii nespecifici în cazul determinării anti-HVE IgG neclari sau pozitivi. De aceea există necesitatea elaborării unei metode de identificare a markerului anti-HVE IgG în ser la persoanele cu risc sporit de infectare.

Metoda de identificare a markerului hepatitei virale E constă în utilizarea a 2 stripuri cu godeuri. Conform instrucției indicațiilor de utilizare a trusei diagnostice "HVE IgG" producătorul DIA. PRO, Diagnostic Bioprobes SRL (Milano)-Italy se efectuează următoarele activități (HVE 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).

La I etapă - realizarea testului de confirmare la prezența markerului anti-HVE IgG în ser uman prin elaborarea în laborator a control reagentului (CR) și neutralizant reagentului (NR) și utilizarea lor în continuare în reacția ELISA (conform fig.) prin folosirea testului comercial "HVE IgG", Dia-Pro, Italy. Pentru aceasta au fost colectate probe de ser uman pentru control reagent (CR) cu densitatea optică mai mică de 0,100 anti-HVE IgG și pentru neutralizant control (NR) cu densitatea optică mai mare de 1,000 anti-HEV IgG, care au fost prelucrate în I etapă (calibrate și standardizate).

La a II etapă - absorbția inhibitorilor nespecifici în ser uman prin utilizarea preparatului periodat de potasiu cu formula KIO_4 . Se efectuează tratarea serului cu periodat de potasiu. În apă distilată se prepară o soluție de periodat de potasiu 0,05 M. În acest scop, în 1,1 ml de apă distilată se dizolvă 1,15 g de periodat de potasiu prin încălzire timp de 2...5 min într-o baie de apă la $t = 70...80^\circ C$. Soluția de periodat de potasiu rămâne activă timp de 6 luni la $t = 4^\circ C$. Înainte de utilizare periodatul trebuie să fie încălzit din nou într-o baie de apă pentru dizolvarea sedimentului format în acesta în timpul aflării la frig. Înainte de tratare, serurile nediluate sunt încălzite la $t=56^\circ C$ timp de 30 min și amestecate în volume egale cu o soluție de periodat. După 2 ore de contact pentru a neutraliza activitatea periodatului de potasiu la amestec la temperatura camerei se adaugă 5% soluție de glucoză în raport de 1:1. După tratament, diluția serică constituie 1:4.

Schema generală a reacției ELISA pentru confirmarea anti-HVE IgG

Tabelul 1

	1	2
A	BLC	200 μ l diluant+10 μ l ser2 + 40 μ l MR+50 μ l DILAS
B	Martor negativ (MN) 200 μ l+50 μ l DILAS	200 μ l diluant+10 μ l ser2 + 40 μ l MN+50 μ l DILAS
C	Martor negativ (MN) 200 μ l+50 μ l DILAS	200 μ l diluant+10 μ l ser3 + 40 μ l MR+50 μ l DILAS
D	Martor negativ (CN) 200 μ l + 50 μ l DILAS	200 μ l diluant+10 μ l ser3 + 40 μ l MN+50 μ l DILAS
E	Martor reagent (MR) 200 μ l + 50 μ l DILAS	200 μ l diluant+10 μ l ser4 + 40 μ l MR+50 μ l DILAS
F	Martor neutralizant (MN) 200 μ l + 50 mcl DILAS	200 μ l diluant+10 μ l ser4 + 40 μ l MN+50 μ l DILAS
G	200 μ l diluant+10 mcl ser1 + 40 μ l MR + 50 mcl DILAS	200 μ l diluant+10 μ l ser5 + 40 μ l MR+50 μ l DILAS
H	200 μ l diluant+10 μ + 40 μ l MN + 50 μ l DILAS	200 μ l diluant+10 mcl ser5 + 40 μ l MN+50 μ l DILAS

Metoda de identificare a markerului hepatitei virale E la persoane cu risc sporit de infectare a fost elaborată în laboratorul Agenției Naționale pentru Sănătate Publică și 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 cu identificarea probelor de ser pozitive și negative la anti-AgHE IgG, a probei martor reagent (MR, serul negativ cu densitatea optică mai mică de 0,100) și martor neutralizant (MN cu densitatea optică mai mare de 1,000), sunt calibrate și standardizate în laborator, apoi la probele neclare se prelucrează serul uman cu periodat de potasiu. În două stripuri cu godeuri se picură reagenții, și anume primul strip primul godeu (A1) rămâne fără reagent și este utilizat în calitate de probă blanc, în alte trei godeuri (B1,C1,D1) se picură câte 200 μ l de ser uman ce nu conține anti-HVE IgG, care sunt în calitate de probă de control negativ, în godeul (E1) se picură câte 200 μ l de martor reagent, în F1 se picură 200 μ l de martor neutralizant, în godeul șapte (G1) se picură 200 μ l de DILSPE, care conține 10 mM Na-citrat tampon pH 6,0 +/-0,1; 0,5% Tween 20, 0,09% Na-azidă și 0,1% Kathon GC, apoi 10 μ l de ser și 40 μ l de martor reagent, în godeul opt (H1) se picură 10 μ l de ser de la persoana investigată și 200 μ l de diluant DILSPE, care conține 10 mM Na-citrat tampon pH 6,0 +/-0,1; 0,5% Tween 20, 0,09% Na-azidă și 0,1% Kathon GC și 40 μ l de martor neutralizant, apoi în toate godeurile, cu excepția probei blanc, se pipetează câte 50 μ l de diluant DILAS, care conține 10 mM soluție tris tampon pH 8,0 +/-0,1, care conține 0,1% Kathon GC, concomitent se pregătește al doilea strip unde se picură în toate godeurile câte 10 μ l de ser de la persoana investigată și câte 200 μ l de diluant DILSPE, care conține 10 mM Na-citrat tampon pH 6,0 +/-0,1; 0,5% Tween 20, 0,09% Na-azidă și 0,1% Kathon GC, în godeul A2, C2, E2 și G2 se adaugă 40 μ l de martor reagent și în B2, D2, F2 și H2 se adaugă 40 μ l de neutralizant reagent, apoi ambele stripuri se incubează la temperatura + 37°C, timp de 45 min, după care toate godeurile se spală de 5 ori cu soluție tampon de spălare, care conține 10 mM fosfat tampon pH 7,0+/-0,2; 0,05% Tween 20 și 0,1% Kathon GC diluată cu 1:20 cu apă distilată (tab. 1), apoi în toate godeurile, cu excepția godeului A din primul strip, se pipetează câte 100 μ l de enzimă conjugată, care conține globulina antispecie de iepure sau șoarece și peroxidază din hrean și se incubează repetat la temperatura + 37°C, timp de 45 min. Repetat toate godeurile se spală de 5 ori cu soluție tampon de spălare, care conține 10 mM fosfat tampon pH 7,0+/-0,2; 0,05% Tween 20 și 0,1% Kathon GC. Se picură în toate godeurile cromogen, care conține

0,02% de peroxid de hidrogen, sol. de 4% de dimetilsulfoxid și sol. de 0,03% de tetrametilbenzidină, se incubează la temperatura 18...24°C, timp de 15 min, după care reacția se stopează prin adăugarea a câte 100 μl de acid sulfuric de 0,3M, ulterior se determină valorile densității optice la lungimea de undă 450...620 nm, apoi se determină valoarea după formula: martor reagent/martor neutralizant, în cazul în care raportul este mai mic de 2 se consideră că rezultatul este negativ, iar dacă este mai mare de 2 – pozitiv.

Conform screeningului la prezența anti-HVE IgG în 200 seruri sanguine, care au fost recoltate de la angajații întreprinderilor de procesare a cărnii din raioanele Anenii Noi și Soroca, în baza acordului informat, prin cea mai apropiată soluție au fost identificate probe pozitive la anti-HVE IgG la 35 persoane (17,5± 2,7%), la 5 persoane (2,5±1,1%) rezultatele au fost nedeterminate (caz suspect), iar la 160 persoane (80,0±2,8%) rezultatele au fost negative conform tab. 2.

Investigarea celor 5 seruri după metoda propusă (confirmare) prin ELISA, care au fost prelucrate cu periodat de potasiu cu formula KIO₄, a demonstrat rezultate negative. Așadar rezultate pozitive la anti-HVE IgG sunt în 17,5±2,7% (35 probe), rezultate negative la anti-HVE IgG sunt în 88,5±2,7% (165 probe).

Rezultatele identificării markerului anti-HVE IgG în serul sangvin a angajaților de la interprimdere de procesare a cărnii din r-nul Anenii Noi și r-nul Soroca

Tabelul 2

Contingentul examinat cu risc sporit de infectare	Nr de probe investigate	Identificarea markerului anti-HVE IgG											
		Metoda cunoscută						Metoda propusă					
		Poz.		Neclar		Neg.		Poz.		Neclar		Neg.	
		Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%
Angajații întreprinderii de procesare a cărnii r-nul Anenii Noi, r-nul Soroca	200	35	17,5±2,7	5	2,5±1,1	160	80,0±2,8	35	117,5±2,7	0	0	165	82,5±2,7

Așadar, metoda propusă demonstrează o eficacitate sporită de identificare a anti-HVE IgG în serul persoanelor investigate prin ELISA cu utilizarea reagenților elaborați în laborator (martor reagent și neutralizant reagent).

Metoda propusă contribuie la ameliorarea tehnologiilor de identificare a markerului anti-HVE IgG și are o importanță semnificativă pentru medicină (sănătate publică), deoarece face posibilă realizarea unor măsuri nespecifice de profilaxie, pentru a reduce la minim riscul de contractare a virusului hepatitei E, fiind posibil de utilizat în știință și practică.