



MD 1352 Z 2020.02.29

## REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat  
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1352** (13) **Z**  
(51) Int.Cl: *A61B 10/00* (2006.01)  
*G01N 33/50* (2006.01)  
*G01N 33/576* (2006.01)

### (12) BREVET DE INVENȚIE DE SCURTĂ DURATĂ

<p>(21) Nr. depozit: s 2018 0108 (22) Data depozit: 2018.11.14</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.07.31, BOPI nr. 7/2019</p>
<p>(71) Solicitant: AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ A MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE AL REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: SPINU Constantin, MD; ISAC Maria, MD; SAJIN Octavian, MD; SPINU Igor, MD; PLĂCINTĂ Gheorghe, MD; DONOS Ala, MD; PARASCHIV Angela, MD; MIRON Aliona, MD; GUȚU Veaceslav, MD (73) Titular: AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ A MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE AL REPUBLICII MOLDOVA, MD</p>	

#### (54) Metodă de identificare a markerului anti-HVC în serul sangvin uman

##### (57) Rezumat:

1

Invenția se referă la medicină, în special la o metodă de identificare a markerului anti-HVC în serul sangvin uman.

Esența invenției constă în aceea că probele de ser sangvin pentru examinare se prelucrează cu suspensie de bentonit de 20% în raport de 1:1, apoi serul sangvin se examinează în testul imunoenzimatic cu utilizarea microplăcii adsorbite cu AgHVC și se determină valorile densităților optice ale probelor prin metoda fotometrică la lungimea de undă de 450 nm, apoi se determină valoarea medie a densităților

2

optice ale probelor de control negativ după formula: media densităților optice ale probelor de control negativ + 0,350, apoi se determină raportul dintre valoarea medie a densităților optice ale serului pacientului și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ, și 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.

Revendicări: 1

MD 1352 Z 2020.02.29

**(54) Method for the identification of anti-HCV marker in human blood serum****(57) Abstract:**

1

The invention relates to medicine, in particular to a method for the identification of anti-HCV marker in human blood serum.

Summary of the invention consists in that the blood serum samples for examination are treated with a 20% suspension of bentonite in a ratio of 1:1, then the blood serum is examined in the immune-enzyme test using a microplate adsorbed with AgHCV and are determined the optical density values of the samples by the photometric method at a wavelength of 450

2

nm, then is determined the average optical density value of the negative control samples by the formula: average of the optical densities of the negative control samples + 0,350, then is determined the ratio of the average optical density value of the patient's serum and the average optical density value of the negative control samples, and if the ratio is up to 0.9 it is considered that the result is negative, and if greater than 1.1 the result is positive.

Claims: 1

**(54) Метод идентификации маркера анти-ВГС в сыворотке крови человека****(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к медицине, в частности к методу идентификации маркера анти-ВГС в сыворотке крови человека.

Сущность изобретения состоит в том, что пробы сыворотки крови для исследования обрабатывают 20%-ой суспензией бентонита при соотношении 1:1, затем сыворотку крови исследуют в иммуноферментном тесте с использованием микропланшета с адсорбированным антигеном ВГС и определяют значения оптических плотностей проб фотометрическим методом при длине

2

волны 450 нм, затем определяют среднее значение оптических плотностей проб отрицательного контроля по формуле: средняя оптических плотностей проб отрицательного контроля + 0,350, затем определяют соотношение среднего значения оптических плотностей сыворотки пациента и среднего значения оптических плотностей проб отрицательного контроля и в случае если соотношение составляет до 0,9, считается что результат отрицательный, а если больше 1,1 результат положительный.

П. формулы: 1

**Descriere:****(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

- 5 Invenția se referă la medicină, în special la o metodă de identificare a markerului anti-HVC în serul sangvin uman.
- Hepatita virală cu virusul C constituie o problemă majoră de sănătate publică cu impact social și economic. În întreaga lume, circa 200 milioane de persoane, aproximativ 3% din populația mondială sunt infectate cu virusul hepatic C (HVC), iar 10 3...4 milioane reprezintă cazuri noi înregistrate anual în lume. Incidența infecției simptomatice noi cu virusul hepatic C a fost estimată la 1...3 cazuri la 100.000 persoane anual. Evident, incidența reală a infecției cu HVC este mult mai mare urmare a ponderii înalte de cazuri asimptomatice. S-a constatat că la 80% din cei care au contact HVC, maladia evaluează în formă asimptomatică, amănifestă. Practic din 100 de persoane, 15 care au contractat virusul HVC, forma acută se manifestă numai în 20% din cazuri. Progresele înregistrate în studierea hepatitei virale C au fost axate atât pe studierea particularităților clinice, de tratament, în special a formelor cronice, cât și pe perfectarea diagnosticului paraclinic (de laborator), luând în considerație faptul că actualul nu dispunem de vaccin contra hepatitei virale C. Totuși tratamentul de ultima generație în 20 93...95% conduce la eliberarea bolnavilor de virusul HVC (World Health Organization. Guidelines for the screening, care and treatment of persons with hepatitis C infection, April 2014, 122 p). Dar necăutând la acele progrese obținute în combaterea hepatitelor virale, inclusiv și a hepatitei cu HVC, Republica Moldova ca țara cu endemicitate medie se confruntă cu probleme privind realizarea măsurilor de control și răspuns la HVC, 25 inclusiv a diagnosticului de laborator (C. Spinu, T. Holban, V. Guriev, Ig. Spinu. Hepatitele virale și HIV (aspectele etiologice, epidemiologice, clinice, diagnostic de laborator, tratament și profilaxie), Chișinău, 2013, Tipografia ASM, 296 p.; V. Pântea, C. Spînu, L. Cojuhari, V. Cebotărescu Hepatita C acută. Particularitățile clinice, epidemiologice, imunologice și de tratament la persoanele de vârstă tânără și medie, Chișinău, 2009, Tipografia Sirius, 108 p.).
- 30 Diagnosticul serologic utilizat în serviciul de transfuzii de sange (donori) în calitate de screening sau pentru confirmarea diagnosticului clinic presupune utilizarea testelor de analiză imunoenzimatică (AIE) de generația a treia, care pot identifica mai mult de 95% din infecțiile cronice și 50...70% din infecțiile acute cu HVC. Investigațiile 35 privind identificarea markerului anti-HVC (una din componentele de bază a diagnosticului clinic în probele de sange, recoltate de la bolnavi cu diagnosticul clinic prezumptiv de hepatita virală C) se realizează prin AIE pe suport solid, utilizând kiturile de reactivi ai companiei DIA.PRO (Italia). Complexul imun format din conjugatul legat se vizualizează la adăugarea substratului/cromogen (tetrametilbenzidină) care dă un produs de culoare galbenă. Intensitatea produsului obținut este proporțională cu 40 cantitatea de anticorpi specifici anti-HVC în proba de sânge examinată. Pentru stoparea reacției enzimatică se utilizează stop-reagentul (mai frecvent acidul sulfuric). Detecția se efectuează fotometric la lungimea de undă 450...620 nm în dependență de filtru utilizat.
- 45 Algoritmul analizei imunoenzimatică existent (prototip) exprimat prin identificarea markerului anti-VHC include următoarele etape:
1. Formarea complexului imunologic, urmare a reacției imunologice prin suplimentarea cu reagenți, unde unul conține markerul enzimatic
  2. Stoparea fazei solide pentru îndepărtarea componentelor nespecifice
  - 50 3. Suplimentarea reacției enzimatică prin adăugarea soluției cromogen/substrat și stoparea reacției cu stop-reagent
  4. Analiza rezultatelor
  5. Evaluarea cu interpretarea rezultatelor obținute
  6. Examinarea repetată în AIE a probelor de sânge care au demonstrat rezultate 55 echivoce de la bolnavi peste 1...2 săptămâni [1].
- Dezavantajele procedurii existente: unele probe de sânge (ser) recoltate de pacienții cu diagnosticul clinic prezumptiv de hepatită virală și examinate prin analiza AIE demonstrează rezultate echivoce (invalide) urmare a prezenței în seruri a diferitor factori inhibitori nespecifici care influențează rezultatele finale ale reacției de

identificare a markerului anti-HVC in speciemenle investigate. Urmare acestui fenomen pacienții care au demonstrat rezultate echivoce cer a fi investigați repetat in AIE peste 1...2 săptămâni. Aceste circumstanțe fac dificil interpretarea rezultatelor finale, influențază negativ asupra specificității și sensibilității testului, concomitent cauzând  
5 incomodități pentru pacienți pe parcursul realizării managementului diagnosticului de laborator.

Problema pe care o rezolvă invenția: elaborarea unei metode de investigare a probelor de sânge (ser) uman la prezența markerului hepatitei virale C, anti-HVC evidențiat prin analiza imunoenzimatică (AIE). Soluția propusă se reduce la  
10 următoarele: inițial toate speciemenle recoltate de la pacienți cu diagnosticul clinic prezumptiv de hepatită virală inițial se prelucrează cu suspensie de bentonit pentru înlăturarea inhibitorilor nespecifici cu examinarea ulterioară în testul AIE.

Esența invenției constă în aceea că probele de ser sangvin pentru examinare se prelucrează cu suspensie de bentonit de 20% în raport de 1:1, apoi serul sangvin se  
15 examinează în testul imunoenzimatic cu utilizarea microplăcii adsorbite cu AgHVC și se determină valorile densității optice a probelor prin metoda fotometrică la lungimea de undă de 450 nm, apoi se determină valoarea medie a densităților optice a probelor de control negativ după formula: media densităților optice ale probelor de control negativ + 0,350, apoi se determină raportul dintre valoarea medie a densității optice a serului  
20 pacientului și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ și, 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.

Inregistrarea serurilor prin AIE intru identificarea markerului anti-HVC s-a realizat cu produsul companiei DIA.PRO, Milano-Italy (96 determinations).

25 Metoda propusă include următoarele etape:

1. Prelucrarea primară a tuturor probelor de ser colectate de la pacienți predestinate pentru testare prin AIE intru identificarea markerului anti-VHC cu suspensie de bentonit în concentrație de 20%.

2. Investigarea probelor de ser după prelucrare cu suspensie de bentonit in AIE  
30 pentru evidențierea markerului anti-HVC

3. Interpretarea rezultatelor

Rezultatul invenției constă în excluderea rezultatelor echivoce, care cer investigarea repetată a pacienților după 1...2 săptămâni cu cheltuieli suplimentare și durata îndelungată pentru stabilirea diagnosticului pozitiv.

35 Metodă de identificare a markerului virusului hepatitei virale C în sângele uman include 3 etape care va contribui la rezultatul obținut.

I etapă: Prelucrarea primară a tuturor probelor de ser colectate de la pacienți predestinate pentru testare prin AIE pentru identificarea markerului anti-VHC cu suspensie de bentonit în concentrație de 20% .

40 Conform algoritmului propus include următoarele proceduri tehnologice:

Prelucrarea serurilor umane colectate de la pacienți predestinați testării prin AIE pentru evidențierea markerului anti-HVC se realizează cu suspensie de bentonit în concentrație de 20,0% pentru absorbție și înlăturarea inhibitorilor nespecifici. Procedura de prelucrare include următoarele: produsul bentonit în concentrația nominalizată se  
45 diluează cu soluție fiziologică (1:3), după cum urmează, 100 μl ser se suplimentează cu 400 μl soluție fiziologică. Ulterior volume identice (1:1) de suspensie de bentonit și ser diluat se introduc intr-o eprubetă, care se incubează la temperatura de 18...25°C, timp de 30 min, fiind amestecate periodic. Urmează centrifugarea (20 min, 3000,0 rot./min) după care serul se aspiră și se păstrează la temperatura de +4°C.

50 II etapă: Investigarea probelor de ser după prelucrare cu suspensie de bentonit în AIE intru evidențierea markerului anti-HVC. După prelucrarea probelor de ser cu suspensie de bentonit intru evitarea influenței inhibitorilor nespecifici și excluderii apariției rezultatelor indeterminate (echivoce), speciemenle se testează prin AIE cu produsele trusei de diagnostic de laborator pentru hepatita virală C; DIA.PRO, Diagnostic Bioprobes, 20128 Milano-Italy, HCV Ab Third generation Enzyme  
55 immunoassay for the determination of Hepatitis C Virus antibody in human serum and plasma.

Inițial se montează numărul necesar de stripuri cu godeuri care sunt absorbite cu antigenul virusului VHC derivat din proteine „core” și „ns” ale virusului nominalizat în

microplaca din trusa destinată pentru realizarea AIE conform instrucției trusei menționate. Ulterior în godeurile stripurilor montate se picură reagenții și probele investigate, cu excepția godeului alb (A1), în altele 3 godeuri (B1, C1, D1) se picură 200 μl control negativ care conține ser uman negativ >0,050 DO 450 nm, godeurile (E1, F1) se completează cu 200 μl calibrator care conține ser bovin și ser uman pozitiv >1,000 DO 450 nm. Ulterior în godeul G1 se picură 200 μl control pozitiv <1,000 DO 450 nm, iar în godeurile H1, A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2 se adaugă 200 μl sample diluent (DILSPE), care conține 1% proteină serică, 10 nM Na-citrat bufer pH 6,0±0,1, 0,5% Tvin 20, 0,09% Na-azidă și 0,1 Katon GC. Apoi în aceste godeuri (H1, A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2) se picură 10 μl de ser uman predestinat investigației la care se adaugă 50 mcl DILAS, cu excepția godeului A1, unde se conține 10 nM de soluție Tris bufer cu pH 8,0±0,1, 0,1 Katon GC.

Stripurile pregătite se sigilează cu pelicula de polietilenă și se incubează timp de 45 min, la temperatura de +37°C, apoi se spală în regim automat de 5 ori prin livrarea și aspirarea a 300 μl per godeu cu soluție de 10 nM fosfat bufer pH 7,0±0,2, 0,05% Tvin și 0,05% Katon GC diluată și pregătită anterior (1:20).

După această procedură se adaugă 100 μl enzimă conjugată, cu excepția godeului A1 (blanc), care conține peroxidaza, 5% BSA, 10 nM Tris bufer pH 6,8±0,1, 0,1% Katon și 0,02% sulfat de gentamicină. Stripurile pregătite și sigilate cu pelicula de polietilenă se incubează timp de 45 min, la temperatura de +37°C, apoi se spală în regim automat de 5 ori prin livrare și aspirare a 300 μl per godeu cu soluție de 10 nM fosfat bufer pH 7,0±0,2, 0,05% Tvin și 0,05% Katon GC diluată, pregătită anterior (1:20).

În continuare se adaugă câte 100 μl Cromogen/substrat, care conține 50 mM bufer citrat fosfat cu pH 3,5±3,8; 4% dimetilsulfoxid; 0,03% tetra-metil-benzidin ori TMB și 0,02% peroxid de hidrogen în fiecare godeu cu incubarea în continuare la temperatura de 20...25°C, timp de 15 min.

Reacția se stopează prin adăugarea a câte 100 μl de acid sulfuric 0,2 mol/l, apoi se determină valorile densității optice a probelor prin metoda fotometrică la lungimea de undă de 450 nm, apoi se determină valoarea medie a densităților optice a probelor de control negativ după formula: media densităților optice ale probelor de control negativ + 0,350, 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 (Co).

III etapă: Evaluarea rezultatelor

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 (Tab.1).

Tabelul 1

S/Co	Interpretare
0,9	Negativ
1,1	Pozitiv

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

Pentru argumentarea celor expuse prezentăm datele obținute (Tab. 2) privind investigarea a 859 seruri sanguine, recoltate de la pacienții din grupele cu risc sporit de infectare cu virusul hepatitei C de la 16 până la 80 ani, din diferite teritorii administrative (Chișinău, Bălți, Comrat) ale Republicii Moldova, inclusiv cu diagnosticul clinic prezumptiv de hepatita virală C în baza acordului informat prin metoda-prototip și cea propusă întru identificarea markerului anti-HVC.

Rezultatele investigațiilor la prezența markerului anti-HVC prin tehnica (AIE) demonstrează că prin metoda prototip markerul nominalizat a fost identificat în 40 (4,7%) cazuri, iar numărul probelor negative a constituit 790 (92,0%). Rezultatele indeterminate (echivoce) au fost identificate în 29 (3,4%) cazuri. Un procent semnificativ (20,9%) de probe pozitive la prezența markerului anti-HVC a fost identificat în rândul persoanelor utilizatoare de droguri intravenoase care prezintă un contingent cu risc sporit de infectare cu virusul hepatitei virale C. De asemenea acest indicator, privind incidența infectării cu HVC este mai sporit (4,2%) la lucrătorii medicali comparativ cu populația generală (1,5%). Probele echivoce pentru lucrătorii medicali, utilizatorii de droguri intravenoase și populația generală au constituit respectiv

1,9%, 16,4% și 2,9%. Incidența probelor negative pentru grupele nominalizate au constituit respectiv 93,8%, 62,7% și 95,6%.

5 Identificarea markerului anti-HVC în probele de sânge recoltate de la lucrătorii medicali, utilizatorii de droguri intravenoase și populația generală prin metoda propusă, unde inițial toate probele de ser destinate investigării la prezența markerului nominalizat au fost prelucrate cu suspensie de bentonit au demonstrat absența rezultatelor echivoce (indeterminate). Concomitent s-au modificat rezultatele finale privind incidența absenței markerului anti-HVC în probele de sânge colectate de la lucrătorii medicali, utilizatorii  
10 de droguri intravenoase și populația generală. Pentru aceste contingente absența markerului HVC a constituit respectiv 95,8%, 79,1% și 98,5%. La general investigarea probelor de sânge prin metoda propusă a demonstrat că incidența probelor pozitive a constituit 40 (4,7%), iar a celor negative de 819 (95,3%).

15 În ansamblu datele obținute demonstrează că metoda propusă din start elimină posibilitatea apariției rezultatelor indeterminate (echivoce), sporind astfel eficacitatea testului, manifestată printr-o creștere semnificativă a specificității și sensibilității testului. Concomitent menționăm că procedura propusă de identificare a markerului anti-HVC exclude investigarea repetată a pacienților în AIE după 1...2 săptămâni cu  
20 toate consecințele: economie de timp, consumabile și beneficiu pentru pacient.

Rezultatele identificării și evaluării markerului anti-HVC în serurile sanguine ale persoanelor cu risc sporit de infectare și din populația generală, inclusiv cu diagnostic clinic prezumptiv de hepatită virală C, obținute prin metoda cunoscută și cea revendicată

Tabelul 2

Nr d/o	Contingentul investigat	Total	Identificarea markerului anti-HVC											
			Metoda cunoscută						Metoda propusă					
			pozitiv		echivoc		negativ		pozitiv		echivoc		negativ	
Abs.	M±m(%)	Abs.	M±m(%)	Abs.	M±m(%)	Abs.	M±m(%)	Abs.	M±m(%)	Abs.	M±m(%)			
1	Lucrători medicali	520	22	4,2±0,9	10	1,9±0,6	488	93,8±1,0	22	4,2±0,9	0	0	498	95,8±0,9
2	Utilizatorii de droguri i/v	67	14	20,9±5,0	11	16,4±4,5	42	62,7±5,9	14	20,9±5,0	0	0	53	79,1±5,0
3	Populația generală	272	4	1,5±0,7	8	2,9±1,0	260	95,6±1,2	4	1,5±0,7	0	0	268	98,5±0,7
	Total	859	40	4,7±0,7	29	3,4±0,6	790	92,0±0,9	40	4,7±0,7	0	0	819	95,3±0,7

**(56) Referințe bibliografice citate în descriere:**

1. HCV Ab Third generation Enzyme immunoassay for the determination of anti Hepatitis C virus antibody in human serum and plasma. 2007, DIA. PRO Diagnostic Bioprobes Srl Via Columella n. 31 20128 Milano- Italy.

**(57) Revendicări:**

Metodă de identificare a markerului anti-HVC în serul sangvin uman, care constă în aceea că probele de ser sangvin pentru examinare se prelucrează cu suspensie de bentonit de 20% în raport de 1:1, apoi serul sangvin se examinează în testul imunoenzimatic cu utilizarea microplăcii adsorbite cu AgHVC și se determină valorile densităților optice ale probelor prin metoda fotometrică la lungimea de undă de 450 nm, apoi se determină valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ după formula: media densităților optice ale probelor de control negativ + 0,350, apoi se determină raportul dintre valoarea medie a densităților optice ale serului pacientului și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ, și 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.