

Invenția se referă la medicină, și anume la o metodă de identificare a markerului anti-Toxocara IgG în serul sanguin și poate fi folosită pentru diagnosticul toxocarozei umane.

Toxocaroză umană constituie o problemă medico-socială de importanță majoră cu răspândire globală, dar totodată rămâne a fi una dintre cele mai neînțeleasă invazie parazitara la om cu complexe și diferite probleme ce țin de diagnostic, tratament și profilaxie. Este o infecție produsă de un parazit din genul *Toxocara*, familia *Ascarididae*, contactată prin ingestia de sol contaminat cu ouă embrionate, provenite din fecalele animalului gazdă. Contaminarea mediului ambiant cu ouă de toxocara și igiena defectuoasă a alimentației asigură răspândirea infecției. În cazul copiilor, o sursă importantă de infecție o reprezintă locurile de joacă în care au acces animalele. În ultima perioadă de timp se constată o extindere continuă a infecției, inclusiv în țările în curs de dezvoltare economică, astfel constituind o problemă prioritară și pentru Republica Moldova (Plăcintă Gheorghe. Monografie: Toxocaroză – problemă actuală a serviciului medical și sanitar public, Chișinău, 2017, 240 p.)

Tratamentul toxocarozei umane rămâne o chestiune controversă și nu este în general un consens cu privire la tratamentul specific, în această ordine de idei, actualmente nu există o metodă definitivă de diagnostic a infecției parazitara cu toxocaroză. Criteriile de vindecare cer a fi stabilite în forme clare clinice, indicatori de imagistică și de laborator. Strategia optimă de management necesită elaborarea algoritmului de diagnostic, tratament al toxocarozei aplicat în funcție de activitatea procesului pato-invaziv (Van Den Broucke S., Kanobana K., Polman K., et al. Toxocariasis diagnosed in international travelers at the Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium, from 2000 to 2013, in: PLoS Negl. Trop. Dis., 2015; nr. 9).

Medicina clinică contemporană devine vădită prin utilizarea extensivă a tehnologiilor diagnosticului de laborator de înaltă performanță, care sunt vertiginos implementate în practica medicală (Roldan W.H., Elefant G.R., Ferreira A.W. Deglycosylation of *Toxocara* excretory-secretory antigens improves the specificity of the serodiagnosis for human toxocariasis. The Journal Parasite Immunology, November 2015, vol. 37, Issue 11, p. 557-567).

Investigațiile privind nivelul de anticorpi anti-Toxocara IgG una din componentele de bază ale diagnosticului clinic și realizarea prin metoda de analiză imunoenzimatică pe suport solid, utilizând kiturile de reactivi ai companiei NovaTec (Germania). Complexul imun format din conjugatul legat se vizualizează la adăugarea de tetrametilbenzidină (TMB), substrat care dă un produs de reacție albastru. Intensitatea produsului obținut este proporțională cu cantitatea de anticorpi specifici anti-Toxocara canis IgG în specimen. Pentru stoparea reacției enzimatică se utilizează stop-reagentul (mai frecvent acidul sulfuric). Detecția se efectuează fotometric la lungimea de undă 450 sau 620 nm.

Tehnologia testului imunoenzimatic exprimată prin identificarea markerului anti-Toxocara IgG 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.
3. Suplimentarea reacției enzimatică prin adăugarea soluției cromogen/substrat și stoparea reacției cu stop-reagent.
4. Analiza rezultatelor.
5. Evaluarea cu interpretarea rezultatelor obținute [1].

Dezavantajele soluției cunoscute constau în aceea, că actualmente nu există o metodă definitivă de diagnostic a infecțiilor cu toxocara, iar sensibilitatea și specificitatea reală a testelor serologice nu poate fi determinată cu acuratețe. Diagnosticul de laborator este și mai mult complicat de variabilitatea răspunsului imunologic umoral, care depinde de încărcătură și localizarea infecției. Numeroase studii au demonstrat că testele imunoenzimatică care folosesc un antigen excretor, purificat din stratul larval au o sensibilitate și specificitate sporită comparativ cu alte teste care utilizează antigenul brut. În contextul celor expuse, totuși unele probe de ser examinate la prezența markerului anti-Toxocara IgG în testul imunoenzimatic (ELISA) demonstrează rezultate echivoce (invalide), urmare a prezenței în seruri a diferitor factori inhibitori nespecifici care influențează rezultatele finale ale reacției, manifestată prin reducerea specificității metodei.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei noi metode de investigare a serurilor umane la prezența markerului anti-Toxocara IgG, pentru sporirea specificității și sensibilității testului imunoenzimatic, se efectuează în timp redus de 3,5 ore și reduce maximal riscul de infectare cu toxocaroză. Așadar, serurile umane recoltate de la pacienți cu diagnosticul clinic prezumptiv de toxocaroză, care în testul ELISA au demonstrat rezultate incerte (invalide) se prelucrează cu suspensie de caolin de 25%, pentru înlăturarea inhibitorilor nespecifici, apoi repetat sunt examinate în ELISA.

Esența invenției constă în examinarea serului sanguin în testul imunoenzimatic cu utilizarea microplăcii adsorbite cu Ag *toxocara canis* și determinarea valorilor densității optice a probelor prin metoda fotometrică la lungimea de undă 450 nm, apoi se determină raportul dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului x 10 și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ, și dacă raportul este de până la 9 NTU, se consideră că rezultatul este negativ, dacă este mai mare de 11 NTU, rezultatul este pozitiv, iar probele cu rezultatul de 9...11 NTU se prelucrează cu suspensie de caolin de 25%, apoi se repetă testul imunoenzimatic cu determinarea ulterioară a raportului menționat pentru determinarea rezultatului negativ în cazul când raportul este de până la 9 NTU și pozitiv dacă este mai mare de 11 NTU.

Rezultatul invenției constă în sporirea specificității și sensibilității testării imunoenzimatică, se efectuează în timp redus de 3,5 ore și reducerea maximală a riscului de infectare cu toxocaroză.

Metoda propusă include 3 (trei) etape:

1. Investigarea primară a serurilor sanguine umane întru identificarea markerului anti-Toxocara IgG prin testul imunoenzimatic ELISA.
2. Identificarea probelor de ser sanguin care au demonstrat rezultatele incerte cu prelucrarea lor cu soluție de caolin de 25%
3. Investigarea repetată a probelor de ser prelucrate cu soluție de caolin de 25% în testul ELISA cu evaluarea și interpretarea finală a rezultatelor obținute. În continuare detaliat se prezintă tehnologiile de realizare, caracteristice pentru fiecare etapă.

I etapă

Procedeu manual.

Inițial se montează numărul necesar de stripuri cu godeuri care sunt absorbite cu Ag *toxocara canis* în microplaca din trusa destinată pentru realizarea ELISA conform instrucțiunii anexate NovaTec, Immundiagnostica GmbH, NovaLisa Toxocara canis IgG, Product Number TOCG0450 (96 Determinations). Ulterior în godeurile stripurilor montate se picură reagenții și probele investigate cu excepția blancului (A1), în alte 3 godeuri (B1) se picură 100 μl ser uman (control negativ) care nu conține anti-Toxocara IgG; C1- 100 μl, ser uman slab pozitiv la anti-Toxocara (cut-off); D1 – 100 μl care conține ser uman cu anti-Toxocara IgG cu titru mai mare de 1000,0 UI/mL (control pozitiv). Proba investigată în volum de 10 μl se diluează în 1000 μl diluant de probă, care conține fosfat bufer 10 mM, pH 7,2±0,2. Apoi probele diluate în volum de 100 μl se repartizează în stripuri începând cu E1. Stripurile pregătite se sigilează cu peliculă și se incubează timp de o oră la temperatura de +37°C, apoi se spală în regim automat de 5 ori cu livrarea și aspirarea a 300 μl per godeu cu soluție diluată de fosfat, pregătită anterior (1:20), urmează pipetarea a 100 μl de enzimă conjugată, care conține globulina conjugată cu peroxidază proteina A în fiecare godeu cu excepția A1, apoi se incubează timp de 30 min la temperatura de 20...25°C. Ulterior urmează spălarea stripurilor în regim automat de 5 ori cu livrarea și aspirarea a 300 μl per godeu cu soluție diluată de fosfat, pregătită anterior (1:20). În continuare se adaugă câte 100 μl Cromogen substrat, care conține 3,3',5,5'- tetrametilbenzidin TMB în fiecare godeu și se incubează 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 la lungimea de undă 450 nm, apoi se determină raportul dintre valoarea medie a densității optice a serului pacientului x 10 și valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ și, în cazul, în care raportul este de până la 9 NTU, se consideră că rezultatul este negativ, dacă este mai mare de 11 NTU rezultatul este pozitiv, iar probele cu rezultatul de 9...11 NTU sunt cu rezultat incert.

Etapa II

Include următoarele proceduri tehnologice.

Absorbția inhibitorilor nespecifici din probele umane incerte și anume cu rezultatul de 9...11 NTU, se prelucrează cu suspensie de caolin de 25%. Prelucrarea include următoarea procedură: soluția de caolin în concentrație de 25,0% se diluează cu soluție fiziologică (1:5), apoi urmează prelucrarea a 100 μl ser cu 400 μl de soluție fiziologică. Ulterior volume identice (1:1) de suspensie de caolin și ser diluat se toarnă într-o eprubetă, care se incubează la temperatura de 18...25°C, timp de 30 min, fiind amestecate periodic. Urmează centrifugarea (20 min, 2500 rot/min), după care serul se aspiră și se păstrează la temperatura de 4 °C.

Etapa III

După inactivare și prelucrare cu suspensie de caolin de 25% a probelor de ser incerte (echivoce) pentru evitarea influenței inhibitorilor nespecifici, probele procesate se analizează repetat în testul ELISA cu produsele trusei de diagnostic de laborator pentru infecții parazitare cu toxocara a companiei NovaTec, Immunodiagnostica GmbH, NovaLisa, Toxocara canis IgG, Product Number : TOCG0450 (96 Determination).

Pentru argumentarea celor expuse prezentăm datele obținute (Tabel) privind investigarea a 955 seruri sanguine, recoltate de la pacienții în vârstă de la 2 până la 75 ani din diferite teritorii administrative ale Republicii Moldova cu diagnosticul clinic prezumptiv de toxocaroză, în baza acordului informat, prin metoda cunoscută și metoda revendicată pentru identificarea markerului anti-Toxocara IgG. Rezultatele obținute demonstrează că prin metoda cunoscută markerul anti-Toxocara IgG, utilizând testului ELISA, a fost identificat în 469 (49,1%) de probe recoltate de la pacienții investigați. Pentru bărbați acest indicator a constituit 208 (48,6%), iar pentru femei 261 (49,5%). Rezultatele negative au demonstrat absența markerului anti-Toxocara IgG în 439 (42,4%) din 955 probe investigate, pentru bărbați acest indicator a constituit 197 (46,0%), iar pentru femei 242 (45,9%). Este important de menționat, că din totalul de probe de 955 examinate cu testul ELISA au fost identificate 47 (4,9%) rezultate incerte: 23 (5,4%) cazuri pentru bărbați și 24 (4,6%) la femei. Evaluarea comparativă a rezultatelor obținute, demonstrează că nu există o diferență semnificativă în indicatorii de incidență a markerului anti-Toxocara IgG la bărbați și femei, urmare a realizării metodei cunoscute ($p < 0,05$).

Utilizarea metodei revendicate pentru probele incerte esențial modifică rezultatele finale privind identificarea repetată a markerului anti-Toxocara IgG prin testul imunoenzimatic. Urmare a utilizării metodei propuse, ponderea probelor pozitive a rămas nemodificată, rezultatele incerte au dispărut, iar incidența probelor negative

pentru bărbați și femei a constituit respectiv 51,4% și 50,5%. Este important de menționat existența unei diferențe semnificative privind incidența probelor negative la markerul anti-Toxocara IgG investigate prin metoda cunoscută - 42,4 % și cea revendicată – 50,9% ($p < 0,01$) (Tabel). În ansamblu datele obținute demonstrează că metoda revendicată elimină rezultatele incerte, astfel semnificativ sporind specificitatea și sensibilitatea testului.

Tabel

Pacienții în dependență de sex	Nr. de probe investigate (pacienți)	Identificarea markerului anti-Toxocara IgG										
		Metoda cunoscută						Metoda revendicată				
		Pozitiv		Incert		Negativ		Pozitiv		Incert	Negativ	
		abs	%	abs	%	abs	%	abs	%	abs	abs	%
Bărbați	428	208	48,6 ± 2,4	23	5,4 ± 1,1	197	46,0 ± 2,4	208	48,6 ± 2,4	0	220	51,4 ± 2,4
Femei	527	261	49,5 ± 2,2	24	4,6 ± 0,9	242	45,9 ± 2,2	261	49,5 ± 2,2	0	266	50,5 ± 2,2
Total	955	469	49,1 ± 1,6	47	4,9 ± 0,6	439	42,4 ± 1,5	469	49,1 ± 1,6	0	486	50,9 ± 1,6

Rezultatele identificării și evaluării prin ELISA a markerului anti-Toxocara IgG în serurile sanguine ale pacienților cu diagnosticul clinic prezumptiv de toxocaroză, obținute prin metoda cunoscută și cea revendicată

Remarcă: Pacienții examinați din toate teritoriile administrative ale Republicii Moldova au cuprins diapazonul de vârstă de la 2 până la 75 ani.