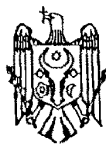




MD 1412 Y 2020.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1412** (13) **Y**
(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

| | |
|--|---|
| În termen de 6 luni de la data publicării mențiunii privind hotărârea de acordare a brevetului de invenție de scurtă durată, orice persoană poate face opoziție la acordarea brevetului | |
| (21) Nr. depozit: s 2019 0049 (22) Data depozit: 2019.04.24 | (45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.01.31, BOPI nr. 1/2020 |
| (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; PÎNZARU Iurie, MD; PLACINTĂ Gheorghe, MD; ROȘCA Angela, MD; DONOS Ala, MD; TOVBA Lidia, MD; SUVEICĂ Luminița, MD | |
| (73) Titular: AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ A MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE AL REPUBLICII MOLDOVA, MD | |

(54) Metodă de identificare a markerului AgHBs in serul sangvin uman

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină, în special la o metodă de identificare a markerului AgHBs in serul sangvin uman.

Esența invenției constă în aceea că probele de ser sangvin pentru examinare se prelucrează cu un amestec de suspensii de bentonit și caolin de 20%, luate în raport de 1:1, apoi serul sangvin se examinează în testul imunoenzimatic cu utilizarea microplăcii adsorbite cu AgHBs și se determină valorile densităților optice ale probelor prin metoda fotometrică la lungimea de undă de 450...620

2
nm, apoi se determină valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ după formula: media densităților optice ale probelor de control negativ + 0,050, 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 1412 Y 2020.01.31

(54) Method for identification of AgHBs marker in human serum**(57) Abstract:**

1

The invention relates to medicine, in particular to a method for identification of AgHBs marker in human serum.

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

2

620 nm, then is determined the average optical densities of the negative control samples according to the formula: average of the optical densities of the negative control samples + 0.050, then is determined the ratio of the average optical densities of the patient serum and the average optical densities 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 AgHBs в сыворотке крови человека**(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к медицине, в частности к методу идентификации маркера AgHBs в сыворотке крови человека.

Сущность изобретения состоит в том, что пробы сыворотки крови для исследования обрабатывают 20%-ой смесью суспензий бентонита и каолина, взятые при соотношении 1:1, затем сыворотку крови исследуют в иммуноферментном тесте с использованием микропланшета адсорбированным AgHBs и определяют значения оптических плотностей проб фотометрическим методом при длине волны 450...620 нм, затем

2

определяют среднее значение оптических плотностей проб отрицательного контроля по формуле: средняя оптических плотностей проб отрицательного контроля + 0,050, 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:

5 Invenția se referă la medicină, în special la o metodă de identificare a markerului AgHBs în serul sangvin uman.

Se cunoaște că hepatita virală B reprezintă una din cele mai răspândite maladii infecțioase de pe glob. Conform estimărilor Organizației Mondiale a Sănătății 2 miliarde din populația globului au contractat infecția cu virusul hepatitei virale B, dintre care 250 milioane de persoane sunt infectate cronic și prezintă o sursă potențială de infecție pentru restul populației.

10 Republica Moldova este situată în regiunea cu endemicitate medie (frecvența decelării AgHBs variază în jur de 2...7%, riscul de infectare pe parcursul vieții este de 20...60% pentru toate grupele de populație) (Constantin Spînu, Petru Iarovoi, Tiberiu Holban, Lilia Cojuhari. Hepatită virală B, Chișinău, 2008, p. 4, 32-36).

15 Pentru confirmarea diagnosticului în majoritatea cazurilor este necesar de efectuat 2 sau mai multe metode de diagnostic (A. Calancea, S. Caragia, R. Cojocaru, M.Isac et al. Diagnosticul de laborator al hepatitelor virale B, C și D. Instrucțiuni metodice, Chișinău 2008, pag. 80-85).

20 Pentru depistarea agenților cauzali ai hepatitei virale B se utilizează metode serologice, inclusiv reacția imunoenzimatică (ELISA). Principiul metodei ELISA este bazat pe reacția imunologică, cunoscută ca reacția “antigen-anticorp”; pe un suport, care se numește “faza solidă” este absorbit, un anticorp cunoscut (anti-HBs). Investigațiile la prezența AgHBs în serul (plasma) pacientului se efectuează prin metoda imunoenzimatică ELISA, care decurge în câteva etape conform instrucțiunilor metodice atașate truselor comerciale:

- 25
- formarea complexului imunochimic prin adăugarea markerului enzimatic;
 - spălarea fazei solide pentru îndepărtarea componentelor nespecifice;
 - adăugarea soluției cromogen/substrat și stoparea reacției;
 - citirea rezultatelor și interpretarea lor [1].

30 Dezavantajele metodei constau în sensibilitatea și specificitatea joasă în comparație cu reacția de polimerizare în lanț (PCR), imunoblot, RIA, care cer resurse financiare suplimentare, urmarea apariției rezultatelor neclare, dependența reacției enzimatice de factorii fizico-chimici (temperatura, umiditatea, pH, calitatea apei, lumina ș. a.).

35 În scopul sporirii eficacității testului se propune o metodă de realizare a testului prin prelucrarea suplimentară primară a probelor destinate testării cu un amestec de suspensii de bentonit și caolin de 20%, luate în raport de 1:1, pentru înlăturarea inhibitorilor nespecifici din serul investigat al pacienților.

40 Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode de investigare a probelor de ser (plasmă) a pacienților la prezența markerului AgHBs prin prelucrarea primară a mostrelor cu un amestec de suspensii de bentonit și caolin de 20% pentru înlăturarea inhibitorilor nespecifici (cauza apariției rezultatelor neclare) din serul cercetat cu realizarea în continuare a investigațiilor prin analiza imunoenzimatică.

45 Esența invenției constă în aceea că probele de ser sangvin pentru examinare se prelucrează cu un amestec de suspensii de bentonit și caolin de 20%, luate în raport de 1:1, apoi serul sangvin se examinează în testul imunoenzimatic cu utilizarea microplăcii adsorbite cu AgHBs și se determină valorile densităților optice ale probelor prin metoda fotometrică la lungimea de undă de 450...620 nm, apoi se determină valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ după formula: media densităților optice ale probelor de control negativ + 0,050, 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.

55 Rezultatul obținut constă în identificarea și confirmarea simultană a markerului AgHBs prin prelucrarea primară a probelor de ser (plasmă) recoltate de la pacienți cu un amestec de suspensii de bentonit și caolin, care face posibil realizarea investigațiilor prin metoda imunoenzimatică cu obținerea rezultatelor finale în timp de 3,5 ore de la montarea testului, cu excluderea rezultatelor neclare.

Avantajele metodei constau în aceea că tehnologia propusă de identificare și confirmare a markerului (AgHBs) virusului hepatitei virale B conduce la reducerea esențială a timpului de investigare de la circa 7 ore la 3,5 ore, urmare a decăderii necesității de aplicare a testului pentru confirmare, în special dictat de rezultatele neclare. Concomitent suplimentarea tehnologiei de identificare a markerului AgHBs cu etapa de prelucrare a serurilor cu amestecul de suspensii de bentonit și caolin duce la sporirea eficacității testului: specificității și sensibilității metodei propuse comparativ cu metoda cunoscută. Absența necesității în investigarea probelor neclare în testul de confirmare cu consumabilele respective indică prezența aspectului economic al metodei propuse. Este necesar de menționat că valorificarea metodei propuse practic la toate nivelele de asistență medicală nu cere echipament suplimentar (sofisticat), care este un factor important pentru implementare în laboratoarele instituțiilor medicale, ceea ce demonstrează accesibilitatea extinsă pentru instituțiile medicale a metodei revendicate.

Exemplu de realizare a invenției: inițial toate serurile pacienților se prelucrează cu amestecul de suspensii de bentonit și caolin de 20%, luate în raport de 1:1. Absorbția inhibitorilor nespecifici din serul uman se realizează prin utilizarea amestecului de minerale caolin, care conține lut alb, oxid de siliciu, aluminiu și apă ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) și bentonit ($\text{Al}_2[\text{Si}_4\text{O}_{10}](\text{OH})_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$). La amestecul compus din 5,0 mg caolin + 5,0 mg bentonit în eprubeta se adaugă 19,0 ml de soluție fiziologică (1:20), apoi timp de 10 min la temperatura +18...+24°C suspensia se amestecă la aparatul centrifuga-vortex, apoi urmează centrifugarea la 5000 rot/min, timp 15 min. În continuare la 100 μl ser cercetat se adaugă 400 μl de soluție fiziologică. Apoi în eprubete se adaugă câte 500 μl de amestec de suspensii de bentonit și caolin și 500 μl de ser cercetat diluat. Urmează centrifugarea amestecului la 5 000 rot/min, timp 15 min. Supernatantul obținut se folosește pentru investigarea în reacția imunoenzimatică cu utilizarea test-sistemului comerciale a companiei Dia. Pro, Milano-Italy (96 investigații).

În continuare urmează utilizarea a unui strip cu godeuri în care se picură reagenți – în godeul A1 se picură 150 μl control negativ, care conține ser negativ (absența markerului AgHBs), iar în godeul B1 se adaugă 150 μl control pozitiv, care conține ser pozitiv (prezența markerului AgHBs), apoi în godeurile C1,D1,E1,F1,G1,H1 se pipetează serurile prelucrate cu amestec de suspensii de bentonit și caolin de 20%, luate în raport de 1:1. În continuare în toate godeurile se pipetează 100 μl conjugat diluat (1:20), care conține reagent concentrat, peroxidază din hrean și conjugat diluat, care conține 10 nM Tris bufer, pH 6,8±0,1, după care se sigilează cu peliculă de polistiren și se incubează la temperatura +37°C, timp de 120 min; ulterior toate godeurile se prelucrează de 5 ori cu soluție tampon de spălare, care conține 10 nM fosfat bufer pH 7,0±10,2 Tvin 20 diluat cu apa distilată (1:20). Apoi în toate godeurile se pipetează câte 200 μl cromogen/substrat, care conține 50 nM citrat fosfat bufer pH 3,5±3,8, dimetil sulfoxid de 4%, tetra-metil-benzidină de 0,03% (TMB) și peroxid de hidrogen de 0,02% (H_2O_2) și se incubează la temperatura +18...+24°C, timp de 30 min, după care reacția se stopează prin adăugarea a câte 100 μl de acid sulfuric de 0,3M. Apoi se determină valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ după formula: media densităților optice ale probelor de control negativ + 0,050, 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.

Pentru argumentarea celor expuse prezentăm datele obținute (tabel) privind investigarea a 885 seruri sanguine colectate de la pacienții din grupele de populație cu risc sporit de infectare cu virusul hepatitei virale B la markerul AgHBs în baza acordului informat a contingentelor de vârstă de la 18 până la 70 ani din diferite teritorii administrative (Chișinău, Bălți, Comrat, Vulcănești) prin metoda cunoscută și cea revendicată.

Rezultatele investigațiilor la prezența markerului AgHBs prin metoda imunoenzimatică ELISA demonstrează că prin metoda cunoscută markerul nominalizat a fost identificat în 41 de cazuri (4,6±0,7%), iar numărul probelor negative a constituit 823 (93,0±0,9%). Rezultatele neclare au fost identificate în 21 de cazuri (2,4±0,5%). Un procent (8,9±3,2%) semnificativ la prezența markerului AgHBs a fost identificat în rândul utilizatorilor de

MD 1412 Y 2020.01.31

5

5 droguri intravenoase, care prezintă un contingent cu risc sporit de infectare cu virusul hepatitei virale B. De asemenea, acest indicator privind prevalența infectării cu markerul AgHBs a fost mai sporit la lucrătorii medicali ($6,0 \pm 1,5\%$) comparativ cu populația generală ($2,5 \pm 1,2\%$). La lucrătorii medicali incidența probelor neclare a constituit 3,2 \pm 1,1%, pacienții hemodializați - 3,9 \pm 1,8%, donatorii primari de sange – 1,0 \pm 0,6%, iar la persoane din populația generală – 1,9 \pm 1,1%. Prevalența probelor negative la contingentele examinate, inclusiv la utilizatorii de droguri intravenoase, au constituit 90,8 \pm 1,8%, 90,4 \pm 3,0%, 86,1 \pm 3,9%, 95,7 \pm 1,6% respectiv. Rezultatele obținute, inițial apreciate ca neclare au fost investigate suplimentar prin testul de confirmare, unde ulterior au fost apreciate ca negative (*HBsAg Confirimator One Ultra Dia.Pro* Diagnostic Bioprobes S.R.L. VIA GIOSUE' CARDUCCI 27 20099 SESTO SAN GIOVANNI (MI) Italy, Lot C4T4/8).

10 Identificarea markerului AgHBs in probele de sange recoltate de la persoanele din grupele de risc de infectare, unde inițial toate probele de ser destinate investigării la prezența markerului nominalizat a fost prelucrate cu amestecul de suspensii de caolin și bentonit au demonstrat absența rezultatelor neclare. Rezultatele investigațiilor a 21 probe neclare au demonstrat că toate (0,9 \pm 1,1%) au fost negative. După modificarea rezultatelor finale privind prevalența markerului AgHBs prin metoda propusă s-a demonstrat că prevalența probelor pozitive a constituit 41 (4,6 \pm 0,7%), iar probele negative 844 (95,4 \pm 0,7%).

15 In ansamblu, datele obținute demonstrează că metoda revendicată elimină posibilitatea apariției rezultatelor neclare. Astfel metoda revendicată sporește eficacitatea testului, manifestată prin creștere semnificativă a specificității și sensibilității testului până la 100%. Concomitent, menționăm că metoda propusă de identificare a markerului AgHBs exclude utilizarea testului de confirmare pentru probele neclare și investigarea repetată a pacienților după 1...2 săptămâni cu toate consecințele: economie de timp, consumabile și beneficii pentru pacient.

20
25
30

MD 1412 Y 2020.01.31

6

Rezultatele identificării și evaluării markerului AgHBs în serurile sangvine ale persoanelor cu risc sporit de identificare și din populația generală

Tabel

| Nr d/o | Contingentul investigat | Total | Identificarea markerului AgHBs | | | | | | | | | | |
|-----------|---|-------|--------------------------------|---------|--------|---------|---------|----------|----------------|---------|--------|---------|----------|
| | | | Metoda cunoscută | | | | | | Metoda propusă | | | | |
| | | | pozitiv | | neclar | | negativ | | pozitiv | | neclar | negativ | |
| | | | abs | M±m(%) | abs | M±m(%) | abs | M±m(%) | abs | M±m(%) | abs | abs | M±m(%) |
| 1 | Pacienții hemodializați | 94 | 6 | 6,4±2,5 | 3 | 3,2±1,8 | 85 | 90,4±3,0 | 6 | 6,4±1,5 | 0 | 88 | 93,6±2,5 |
| 2 | Lucrătorii medicali | 250 | 15 | 6,0±1,5 | 8 | 3,2±1,1 | 227 | 90,8±1,8 | 15 | 6,0±1,5 | 0 | 235 | 94,0±1,5 |
| 3 | Donatorii primari de sange | 301 | 7 | 2,3±0,9 | 3 | 1,0±0,6 | 291 | 96,7±1,0 | 7 | 2,3±0,9 | 0 | 294 | 97,7±0,9 |
| 4 | Utilizatorii de droguri intravenoase | 79 | 7 | 8,9±3,2 | 4 | 5,1±2,5 | 68 | 86,1±3,9 | 7 | 8,9±3,2 | 0 | 72 | 91,1±3,2 |
| 5 | Persoane din populația generală | 161 | 4 | 2,5±1,2 | 3 | 1,9±1,1 | 154 | 95,7±1,6 | 4 | 2,4±1,2 | 0 | 157 | 97,5±1,2 |
| | Total | 885 | 41 | 4,6±0,7 | 21 | 2,4±0,5 | 823 | 93,0±0,9 | 41 | 4,6±0,7 | 0 | 844 | 95,4±0,7 |

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. HBsAg One Ultra, Dia. Pro, Dia.Pro Diagnostic Bioprobes S.R.L. VIA GIOSUE' CARDUCCI 27 20099 SESTO SAN GIOVANNI (MI) Italy, Lot C4T4/8, 2014

(57) Revendicări:

Metodă de identificare a markerului AgHBs în serul sangvin uman, care constă în aceea că probele de ser sangvin pentru examinare se prelucrează cu un amestec de suspensii de bentonit și caolin de 20%, luate în raport de 1:1, apoi serul sangvin se examinează în testul imunoenzimatic cu utilizarea microplăcii adsorbite cu AgHBs și se determină valorile densităților optice ale probelor prin metoda fotometrică la lungimea de undă de 450...620 nm, apoi se determină valoarea medie a densităților optice ale probelor de control negativ după formula: media densităților optice ale probelor de control negativ + 0,050, 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.