

Invenția se referă la medicină, în special la o metodă de identificare a markerului infecției hemotransmisibile, provocate cu citomegalovirus și poate fi utilizată pentru diagnosticul de laborator în scop științific sau practic.

Se cunoaște că infecțiile hemotransmisibile este o problemă majoră în cazul infectării persoanelor din populația generală, dar și a celor din grupurile țintă.

În studiile privind infecțiile virale s-a demonstrat că citomegalovirusul (CMV) a fost detectat la populație și grupele țintă în 80...100% de cazuri. Diferite studii au demonstrat că CMV provoacă hepatită și fibroză hepatică, și respectiv poate semnificativ agrava evoluția hepatitelor virale, cauzate de virusurile HVB și HVC (Bader el-Din N.G., Abd el-Meguid M., Tabll A.A., Anany M.A., Esmat G., Zayed N., Helmy A., el-Zayady A.R., Barakat A., el-Awady M.K. Human cytomegalovirus infection inhibits response of chronic hepatitis-C-virus-infected patients to interferon-based therapy. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2011, no 26(1), p.55-62).

Pentru depistarea agenților cauzali ai infecțiilor virale se utilizează diferite metode de diagnostic, inclusiv metode serologice, care contribuie la determinarea agentului cauzal prin reacția imunoenzimatică (ELISA), care include metoda indirectă - determină indirect prezența Ag în organismul uman cu folosirea anticorpilor CMV IgG, formați în procesul răspunsului imunologic al organismului uman la pătrunderea agentului infecțios. În multe cazuri este necesar de efectuat două sau mai multe metode de diagnostic, deseori se impune efectuarea repetată a investigațiilor de laborator (A. Calancea, S. Caragia, R. Cojocaru et al. Diagnosticul de laborator al hepatitelor virale B, C și D, Instrucțiuni Metodice. Chișinău, 2007).

Investigațiile la prezența anti-CMV IgG se efectuează prin metoda imunoenzimatică ELISA conform instrucțiunilor comerciale [1].

Metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) este o tehnică imunoenzimatică utilizată frecvent pentru detecția prezenței anticorpilor în proba testată. Metoda ELISA decurge în câteva etape:

- 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.

Dezavantajele metodei cunoscute constau în sensibilitatea și specificitatea mai joasă în comparație cu reacția de polimerizare în lant (PCR), analiza prin imunoblot, RIA. Confirmarea probelor inițial pozitive sau echivoce la prezența markerilor infecțiilor hemotransmisibile prin imunoblot sau PCR cere resurse financiare suplimentare. Dependența reacției enzimatică de factorii fizico-chimici (temperatură, umiditate, pH, calitatea apei, lumina și altele). Folosirea în componența kiturilor diagnostice a substanțelor cu efect cancerigen sau toxic.

Analiza și evaluarea revistei literaturii a demonstrat că pe piață nu sunt teste comerciale pentru confirmarea markerilor anti-CMV IgG, în legătură cu aceasta a fost necesar de a elabora un algoritm de confirmare a probelor de ser uman pozitive și echivoce la prezența markerului infecției hemotransmisibile prin reacția imunoenzimatică în scopul sporirii eficacității testului, prin înlăturarea (blocarea) inhibitorilor nespecifici.

Principiul metodei de confirmare propuse include inițial blocarea totală sau parțială a încărcăturii antigenice de pe pereții godeului de către anticorpii serului investigat (echivoc) cu adăugarea în continuare a serului standardizat pentru evidențierea antigenului de pe suprafața godeului neconjugat. Acest fenomen este evidențiat în continuare prin analiza imunoenzimatică. Schema generală a reacției ELISA: testarea serului uman se realizează în 2 godeuri. În primul godeu se adaugă serul negativ cu anticorpii markerilor infecțiilor - martor reagent (MR), simultan cu serul pacientului, iar în al doilea - serul pozitiv, martor neutralizant (MN) simultan cu serul pacientului. După incubarea și detectarea anticorpilor infecțiilor se analizează rezultatele obținute.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea metodei de confirmare a markerului infecției hemotransmisibile (anti-CMV IgG) prin reacția imunofermentativă în scopul sporirii eficacității testului prin înlăturarea inhibitorilor nespecifici în serul pacienților și excluderea transmiterii acestor infecții prin transfuzii de sânge de la donatori.

Esența invenției constă în efectuarea testului imunoenzimatic cu identificarea markerului anti-CMV IgG, iar pentru rezultatele echivoce se efectuează testul, care include elaborarea unui martor reagent, care conține ser negativ anti-CMV IgG și unui martor neutralizant, care conține ser pozitiv anti-CMV IgG, apoi se utilizează un strip cu godeuri pentru anti-CMV IgG, în care se adaugă reagenții: în godeul A1 se adaugă 100 μl de martor reagent, în godeul B1 se adaugă 100 μl de martor neutralizant, în godeurile C1, E1 și G1 se adaugă câte 50 μl de ser cercetat diluat (100 μl de diluant de probă, care conține tris bufer, 0,1% Proclin 300 și 5 μl ser cercetat) și câte 50 μl de martor reagent, iar în godeurile D1, F1 și H1 se adaugă câte 50 μl de ser cercetat diluat în raport de 1:20 și câte 50 μl de martor neutralizant, apoi probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min, după care toate godeurile se spală de 5 ori cu soluție tampon, care conține tris HCl bufer, 0,5% Tween 20 și 0,1% Proclin 300 și diluat cu apă distilată în raport de 1:25, apoi în toate godeurile, cu excepția A1, se adaugă câte 100 μl de enzimă conjugată, care conține imunoglobulină anti-umană IgG și peroxidază, după care se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min, apoi toate godeurile repetat se spală de 5 ori cu soluție tampon și se adaugă câte 50 μl de cromogen, care conține soluție tampon de tetrametilbenzidină și se incubează la temperatura de 37°C, timp de 10 min, după care reacția se stopează prin adăugarea a câte 100 μl de acid sulfuric de 0,5 M, apoi se determină valorile densității optice la lungimea de undă de 450/620 nm și se calculează după formula: martor reagent/martor neutralizant pentru anti-CMV IgG, în cazul în care raportul este mai mic de 2,0 se determină un rezultat negativ, iar dacă este mai mare de 2,0 - un rezultat pozitiv.

Rezultatul invenției constă în eficientizarea metodei de identificare, reducerea timpului cu 3 ore și economisirea surselor financiare.

Avantajele: sensibilitatea și specificitatea înaltă în comparație cu metoda imunofermentativă clasică, utilizată în calitate de soluția cea mai apropiată, tehnologie de utilizare accesibilă pentru toate laboratoarele unităților sanitaro-medicale de diferite nivele de asistență medicală, prețul reagenților utilizați este accesibil.

Exemplu de realizare a invenției.

Inițial serul pacientului se testează prin metoda screeningului la prezența markerului anti-CMV IgG, apoi probele echivoce se testează suplimentar la markerul infecției hemotransmisibile anti-CMV IgG. Pentru înlăturarea inhibitorilor nespecifici (rezultatele echivoce) identificate în reacția ELISA se aplică metoda de investigare propusă. Metoda de confirmare a markerului anti-CMV IgG constă în elaborarea matorului reagent (MR), care conține ser negativ la anti-CMV IgG și mator neutralizant (MN), care conține ser pozitiv la anti-CMV IgG.

Tabelul 1

	I strip - la anti-CMV IgG
A1	100 μ l mator reagent
B1	100 μ l mator neutralizant
C1	50 μ l ser 1 diluat + 50 μ l mator reagent
D1	50 μ l ser 1 diluat + 50 μ l mator neutralizant
E1	50 μ l ser 2 diluat + 50 μ l mator reagent
F1	50 μ l ser 2 diluat + 50 μ l mator neutralizant
G1	50 μ l ser 3 diluat + 50 μ l mator reagent
H1	50 μ l ser 3 diluat + 50 μ l mator neutralizant

Schema investigațiilor la prezența markerului infecției hemotransmisibile este prezentată în tabelul 1.

În continuare se utilizează un strip cu godeuri pentru anti-CMV IgG, în care se adaugă reagenții: în godeul A1 se adaugă 100 μ l de mator reagent, în godeul B1 se adaugă 100 μ l de mator neutralizant, în godeurile C1, E1 și G1 se adaugă câte 50 μ l de ser cercetat diluat (100 μ l de diluant de probă, care conține tris bufer, 0,1% Proclin 300 și 5 μ l ser cercetat) și câte 50 μ l de mator reagent, iar în godeurile D1, F1 și H1 se adaugă câte 50 μ l de ser cercetat diluat în raport de 1:20 și câte 50 μ l de mator neutralizant, apoi probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min, după care toate godeurile se spală de 5 ori cu soluție tampon, care conține tris HCl bufer, 0,5% Tween 20 și 0,1% Proclin 300 și diluat cu apă distilată în raport de 1:25, apoi în toate godeurile, cu excepția A1, se adaugă câte 100 μ l de enzimă conjugată, care conține imunoglobulină anti-umană IgG și peroxidază, după care se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min, apoi toate godeurile repetat se spală de 5 ori cu soluție tampon și se adaugă câte 50 μ l de cromogen, care conține soluție tampon citrat fosfat, peroxid de hidrogen și câte 50 μ l de substrat, care conține soluție tampon de tetrametilbenzidină și se incubează la temperatura de 37°C, timp de 10 min, după care reacția se stopează prin adăugarea a câte 100 μ l de acid sulfuric de 0,5 M, apoi se determină valorile densității optice la lungimea de undă de 450/620 nm și se calculează după formula: mator reagent/mator neutralizant pentru anti-CMV IgG, în cazul în care raportul este mai mic de 2,0 se determină un rezultat negativ, iar dacă este mai mare de 2,0 - un rezultat pozitiv.

Rezultatele investigațiilor de laborator la prezența infecției hemotransmisibile sunt prezentate în tabelul 2.

Analiza și evaluarea ulterioară a rezultatelor investigațiilor de laborator la prezența markerului anti-CMV IgG prin metoda cunoscută demonstrează prezența acestora în 12,2 \pm 1,3% de cazuri, probele echivoce au fost depistate în 1,9 \pm 0,5%, iar cele negative - 85,9 \pm 1,4% cazuri. Rezultatele investigațiilor de laborator la prezența markerului anti-CMV IgG prin metoda propusă demonstrează prezența markerului anti-CMV IgG în 12,2 \pm 1,3%. Ulterior prin metoda de confirmare propusă cele 12 probe echivoce s-au dovedit a fi negative. Asadar, metoda propusă de identificare a markerului CMV IgG demonstrează o sporire semnificativă (până la 100%) a sensibilității și specificității metodei de identificare a markerului anti-CMV IgG, în special pentru serurile echivoce la prezența markerului nominalizat. Metoda propusă privind investigarea persoanelor, inclusiv cu risc sporit de infectare (donatorii de sânge, pacienții hemodializati, lucrătorii medicali, utilizatorii de droguri intravenoase etc.) la markerul anti-CMV IgG urmare a valorificării în practica medicală va contribui la reducerea semnificativă a riscului de infectare cu infecția hemotransmisibilă CMV, în special în sistemele de transfuzie a sângelui, transplant, proceduri de hemodializă etc.

Rezultatele identificării markerului anti-CMV IgG la persoanele cu risc sporit de infectare

Tabelul 2

Persoane cu risc sporit de infectare	Total investigați	Rezultatele investigațiilor la prezența markerilor infecțiilor hemotransmisibile											
		Metoda cunoscută						Metoda propusă					
		pozitiv		echivoc		negativ		pozitiv		echivoc		negativ	
		Total	M \pm m	Total	M \pm m	Total	M \pm m	Total	M \pm m	Total	M \pm m	Total	M \pm m
632	632	77	12,2 \pm 1,3	12	1,9 \pm 0,5	543	85,9 \pm 1,4	77	12,2 \pm 1,3	0	0	555	87,8 \pm 1,3