



MD 1420 Y 2020.02.29

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1420** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/569 (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 0085 (22) Data depozit: 2019.07.31	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.02.29, BOPI nr. 2/2020
(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; MIRON Aliona, MD; SPÎNU Igor, MD; PLĂCINTĂ Gheorghe, MD; DONOS Ala, MD (73) Titular: AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ A MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE AL REPUBLICII MOLDOVA, MD	

MD 1420 Y 2020.02.29

(54) Metodă de identificare a markerului anti-CMV IgG în serul sangvin uman**(57) Rezumat:**

1
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.

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

2
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 citrat fosfat, peroxid de hidrogen și câte 50 μl 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 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.

Revendicări: 1

(54) Method for identifying anti-CMV IgG marker in the human blood serum

(57) Abstract:

1

The invention relates to medicine, in particular to a method for identifying a marker of hemotransmissible infection caused by cytomegalovirus and can be used for laboratory diagnosis for scientific or practical purposes.

Summary of the invention consists in carrying out the immunoenzyme test with identification of anti-CMV IgG marker, and for doubtful results, a test is carried out, including the development of a control reagent, containing negative anti-CMV IgG serum and a neutralizing control, containing positive anti-CMV IgG serum, then is used a plate with wells for anti-CMV IgG, into which reagents are added: 100 μl of control reagent is added into well A1, 100 μl of neutralizing control is added into well B1, 50 μl of diluted test serum (100 μl of sample diluent containing tris buffer, 0.1% Procline 300 and 5 μl of test serum) and 50 μl of control reagent is added into wells C1, E1 and G1, and 50 μl of test serum diluted in a ratio of 1:20 and 50 μl of neutralizing control is added into wells D1, F1

2

and H, then the samples are incubated at 37°C, for 30 min, after which all wells are washed 5 times with buffer solution, containing Tris-HCl buffer, 0.5% Tween 20 and 0.1% Procline 300 and diluted with distilled water in a ratio of 1:25, then into all wells, except A1, is added 100 μl of conjugated enzyme, containing anti-human immunoglobulin IgG and peroxidase, thereafter are incubated at 37°C, for 30 min, then all wells are re-washed 5 times with buffer solution and is added 50 μl of chromogen, containing citrate phosphate buffer solution, hydrogen peroxide and 50 μl of substrate, containing tetramethylbenzidine buffer solution and are incubated at 37°C, for 10 min, after which the reaction is stopped by adding 100 μl of 0.5 M sulfuric acid, then are determined the optical density values at a wavelength of 450/620 nm and is calculated by the formula: control reagent/neutralizing control for anti-CMV IgG, if the ratio is less than 2.0 is determined a negative result, and if greater than 2.0 - a positive result.

Claims: 1

(54) Метод идентификации маркера анти-CMV IgG в сыворотке крови человека

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к медицине, в частности к способу идентификации маркера гемотрансмиссивной инфекции, вызванной цитомегаловирусом и может быть использовано для лабораторной диагностики в научных или практических целях.

Сущность изобретения состоит в проведении иммуноферментного теста с идентификацией маркера анти-CMV IgG, а для сомнительных результатов проводят тест, который включает разработку контрольного реагента, который содержит отрицательную сыворотку анти-CMV IgG и нейтрализующего контроля, который содержит положительную сыворотку анти-CMV IgG, затем используют планшет с лунками для анти-CMV IgG, в которую добавляют реагенты: в лунку А1 добавляют 100 мкл контрольного реагента, в лунку В1 добавляют 100 мкл нейтрализующего контроля, в лунках С1, Е1 и G1 добавляют по 50 мкл разведенной исследуемой сыворотки (100 мкл пробный разбавитель, содержащего трис-буфер, 0,1% Проклин 300 и 5 мкл исследуемой сыворотки) и по 50 мкл контрольного реагента, а в лунках D1, F1 и H1 добавляют по 50 мкл разведенной исследуемой сыворотки при соотношении 1:20 и по 50 мкл нейтрализующего контроля, затем пробы

2

инкубируют при температуре 37°C, в течение 30 мин, после чего все лунки промывают 5 раз с буферным раствором, содержащий трис-HCl-буфер, 0,5% Tween 20 и 0,1% Проклин 300 и разбавленный дистиллированной водой при соотношении 1:25, затем во все лунки, кроме А1, добавляют по 100 мкл конъюгированного фермента, содержащий анти-человеческий иммуноглобулин IgG и пероксидазу, после чего инкубируют при температуре 37°C, в течение 30 мин, затем все лунки повторно промывают 5 раз буферным раствором и добавляют по 50 мкл хромогена, содержащий цитрат фосфатный буферный раствор, перекись водорода и по 50 мкл субстрата, содержащий тетраметилбензидиновый буферный раствор и инкубируют при температуре 37°C, в течение 10 мин, после чего реакцию останавливают добавлением по 100 мкл 0,5 М серной кислоты, затем определяют значения оптической плотности при длине волны 450/620 нм и рассчитывают по формуле: контрольный реагент/нейтрализующий контроль для анти-CMV IgG, в случае если соотношение меньше 2,0 определяют отрицательный результат, а если больше 2,0 - положительный результат.

П. формулы: 1

Descriere:

5 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.

10 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).

20 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].

30 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;
- 35 - 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. 40 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 45 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 50 încărcăturii antigenice de pe pereții godeului de către anticorpul serului investigat (echivoc) cu adăugarea în continuare a serului standardizat pentru evidențierea antigenului de pe suprafața godeului neconjunct. 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 anticorpul markerilor infecțiilor - martor reagent (MR), simultan cu serul pacientului, iar în al doilea - serul pozitiv, martor 55 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.

5 Esența invenției constă în efectuarea testului imunoenzimatic cu identificarea markerului anti-CMV IgG, iar pentru rezultatele echivoce se efectuează testul, care include
 10 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
 15 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 citrat fosfat, peroxid de hidrogen și câte 50 μl de substrat, care conține soluție tampon de tetrametilbenzidină și se
 20 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.

25 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 imunofermențativă clasică, utilizată în calitate de soluția cea mai apropiată, tehnologie de
 30 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
 35 echivoce) identificate în reacția ELISA se aplică metoda de investigare propusă.

Metoda de confirmare a markerului anti-CMV IgG constă în elaborarea martorului reagent (MR), care conține ser negativ la anti-CMV IgG și martor neutralizant (MN), care conține ser pozitiv la anti-CMV IgG.

Tabelul 1

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

40

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 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

5 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

10 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 citrat fosfat, peroxid de hidrogen și câte 50 µl 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 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

15 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.

20 Analiza și evaluarea ulterioară a rezultatelor investigațiilor de laborator la prezența markerului anti-CMV IgG prin metoda cunoscută demonstrează prezența acestora în 12,2±1,3% de cazuri, probele echivoce au fost depistate în 1,9±0,5%, iar cele negative - 85,9±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±1,3%.

25 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

30 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.

35 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±m	Total	M±m	Total	M±m	Total	M±m	Total	M±m	Total	M±m
632	632	77	12,2±1,3	12	1,9±0,5	543	85,9±1,4	77	12,2±1,3	0	0	555	87,8±1,3

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Biovision Cytomegalovirus (CMV) IgG ELISA Kit155 S. Milpitas Blvd., Milpitas, CA 95035 USA, 2018

(57) Revendicări:

Metodă de identificare a markerului anti-CMV IgG în serul sangvin uman, care 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 citrat fosfat, peroxid de hidrogen și câte 50 μl 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 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.