



MD 319 Y 2011.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) 319⁽¹³⁾ Y

(51) Int. Cl.: A61B 5/00 (2006.01)
G01N 33/493 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
C12Q 1/48 (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 2010 0116 (22) Data depozit: 2010.06.30	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2011.01.31, BOPI nr. 1/2011
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventatori: TARAN Natalia, MD; DUMBRAVA Vlada-Tatiana, MD; LUPAȘCO Iulianna, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (74) Mandatar autorizat: VOZIANU Maria	

(54) Metodă de diagnosticare a hepatitei virale cronice D și hepatitei mixte B+C

(57) Rezumat:

Invenția se referă la medicină, în special la hepatologie și poate fi utilizată pentru diagnosticarea hepatitei virale cronice D și hepatitei mixte B+C.

Conform invenției, metoda constă în aceea că se determină conținutul de nitrați și nitriți în urină și conținutul de aspartataminotransferază în sânge, apoi se calculează mărimea raportului dintre suma de nitrați și nitriți față de conținutul de aspartatamino-

transferază și în cazul în care mărimea respectivă constituie 0,32...0,42, se diagnostichează hepatită virală cronică D, iar în cazul în care mărimea respectivă constituie 0,49...0,53, se diagnostichează hepatită virală cronică mixtă B+C.

Revendicări: 1

(54) Method for diagnosis of chronic viral hepatitis D and mixed hepatitis B+C

(57) Abstract:

MD 319 Y 2011.01.31

The invention relates to medicine, particularly hepatology and can be used for diagnosis of chronic viral hepatitis D and mixed hepatitis B+C.

According to the invention, the method consists in that it is determined the content of nitrates and nitrites in the urine and the content of aspartate aminotransferase in the blood, then it is calculated

5

the value of the ratio between the sum of nitrates and nitrites to the content of aspartate aminotransferase and if the corresponding value is 0.32...0.42 it is diagnosed the chronic viral hepatitis D and if the corresponding value is 0.49...0.53 it is diagnosed the chronic viral mixed hepatitis B+C.

Claims: 1

10

(54) Метод диагностики хронического вирусного гепатита D и смешанного гепатита B+C

15

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к медицине, в частности к гепатологии и может быть использовано для диагностики хронического вирусного гепатита D и смешанного гепатита B+C.

Согласно изобретению, метод состоит в том, что определяют содержание нитратов и нитритов в моче и содержание аспартатаминотрансферазы в крови, затем вычисляют величину соотношения суммы нитра-

5

10

2

тов и нитритов к содержанию аспартатамино-трансферазы и в случае если соответствующая величина составляет 0,32...0,42, диагностируют хронический вирусный гепатит D, а в случае если соответствующая величина составляет 0,49...0,53, диагностируют хронический вирусный смешанный гепатит B+C.

П. формулы: 1

15

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în special la hepatologie și poate fi utilizată pentru diagnosticarea hepatitei virale cronice D și hepatitei mixte B+C.

Este cunoscută metoda de diagnosticare a hepatitelor virale cronice, care constă în aceea că se utilizează sisteme de testare nanodiagnostice, care includ utilizarea unui biosenzor cu două canale de tipul „oglină - rezonanță”, dintr-o chiuvetă cu un biosenzor, la baza căreia este plasată o prismă, asociată cu un canal de unde constituit dintr-un strat cu indicele de refracție înalt și un strat de cuarț cu indicele de refracție mic, având grosimea de ordinul a câteva sute de nanometri în funcție de materialul stratului superficial sensibil, care reprezintă concomitent și fundul chiuvetei, apoi lichidul biologic, cu complexe specifice cu markerii macromoleculari hepatici, se fixează în stratul superficial al canalului de unde menționat prin interacțiunea anticorpilor (*anti-HBs*) și *HBsAg* (antigenul virusului hepatitei B) și/sau prin interacțiunea antigenului de suprafață a nucleocapsulei virusului hepatitei C cu anticorpii acestuia, și/sau prin hibridizarea oligonucleotidelor cu segmentele complementare ale ADN-ului virusului hepatitei B, și/sau prin hibridizarea oligonucleotidelor cu segmente complementare ale ARN-ului virusului hepatitei C, apoi se determină coeficientul de refracție a luminii al stratului superficial la hotarul canalului [1].

Dezavantajul metodei constă în aceea că necesită un echipament special sofisticat pentru determinarea și interpretarea rezultatelor.

În calitate de cea mai apropiată soluție servește metoda de diagnosticare a hepatitelor virale cronice prin aprecierea cantității relative a următoarelor fracții: lizofosfatidilcolinei, sfingomielinei și fosfatidilcolinei, apoi se calculează coeficientul spectrului fosfolipidic sangvin prin formula $FC^2/SM \times LFC$, unde LFC este cantitatea relativă a lizofosfatidilcolinei, SM – cantitatea relativă a sfingomielinei, FC – cantitatea relativă a fosfatidilcolinei. În cazul în care se determină valori cuprinse între 2...35, se diagnostichează hepatită virală cronică B, în cazul în care se determină valori cuprinse între 36...45, se diagnostichează hepatită cronică, provocată de alcool, iar în cazul în care se determină valori cuprinse între 50...95 - se diagnostichează ciroză hepatică [2].

Dezavantajele acestei metode constau în perioada îndelungată de efectuare a analizelor și în aceea că este destul de costisitoare.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode mai puțin costisitoare, care ar permite detectarea cât mai rapidă a hepatitelor virale cronice mixte la investigația în masă a populației.

Conform invenției, metoda constă în aceea că se determină conținutul de nitrați și nitriți în urină și conținutul de aspartataminotransferază în sânge, apoi se calculează mărimea raportului dintre suma de nitrați și nitriți față de conținutul de aspartataminotransferază și în cazul în care mărimea respectivă constituie 0,32...0,42, se diagnostichează hepatită virală cronică D, iar în cazul în care mărimea respectivă constituie 0,49...0,53, se diagnostichează hepatită virală cronică mixtă B+C.

Rezultatul invenției constă în obținerea unei metode mai puțin costisitoare, care permite detectarea cât mai rapidă a hepatitelor virale cronice mixte la investigația în masă a populației.

Metoda revendicată permite investigarea în masă a persoanelor pentru diagnosticarea timpurie a pacienților cu hepatită virală cronică într-un interval de timp de 24 ore cu cheltuieli de 2...3 ori mai mici față de cea mai apropiată soluție.

Trebuie de menționat că nivelul de excreție urinară a nitraților și nitriților reflectă sinteza NO în organism, iar cantitatea de azot, identificat în urină (conform conținutului de NO₂ și NO₃), reflectă adecvat cantitatea de NO sintetizat de către organism. Cercetarea complexă a pacienților din loturile de studiu a relevat un conținut majorat de nitrați și de nitriți în urină față de valorile respective la persoanele sănătoase, ceea ce denotă o creștere sporită a nivelului de NO la pacienții cu proces inflamator cronic. Sursele din literatura de specialitate demonstrează că NO este considerat unul dintre mediatorii principali ai inflamației, fiind un criteriu de prognoză a evoluției patologiilor hepatice. Astfel, acest raport vizează cantitatea de NO față de cantitatea de ASAT.

Metoda dată a fost utilizată în secția de hepatologie a Spitalului Clinic Republican din mun. Chișinău, Republica Moldova. Lotul de studiu l-au constituit 179 de pacienți cu patologie hepatică cronică din diferite localități ale republicii: 50,84% (91) - femei și 49,16% (88) bărbați cu vârsta medie de 37,7±11,5 ani, dintre care până la 40 de ani 49,71% (89)

pacienți, iar 50,28% (90) pacienți peste 40 de ani. Lotul martor a fost alcătuit din 29 persoane practic sănătoase, din care 58,62% (17) femei și 41,38% (12) bărbați cu vârsta cuprinsă între 18 și 42 de ani, fără anamneză ereditară agravată, în absența patologiei hepatice și gastrointestinale. Repartizarea bolnavilor cu hepatită virală cronică s-a efectuat în funcție de etiologie, faza infecției virale, fiind estimat și gradul de activitate a procesului patologic hepatic. Caracteristica clinică a pacienților s-a efectuat în baza următoarelor sindroame clinice: asteno-vegetativ, dispeptic, algic și simptomelor: hepatomegalie, splenomegalie, indici de hipertensiune portală. Pentru evaluarea gradului de alterare hepatică s-a efectuat un complex de teste ce reflectă sindromul citolitic (ALAT, ASAT), colestatic (bilirubina totală și conjugată, fosfataza alcalină, colesterolul total, gamaglutamiltranspeptidaza), hepatopriv (proteina generală, albuminele, indicii protrombinici), sindromul imuno-inflamator (analiza generală a sângelui, nivelul de imunoglobulină IgA, IgM, IgG, CIC, limfocitele T_{tot} și subpopulațiile lor: $T_{act.}$, $T_{ifs.}$ și $T_{tft.}$ prin metoda randomizării cu teofilină). În scopul constatării etiologiei hepatitei virale cronice s-au determinat markerii hepatitelor virale B, C și D prin metoda imunoenzimatică. Examinarea stării ficatului s-a completat prin efectuarea ecografiei abdominale, gama-scintigrafiei hepatosplenice.

Studiul respectiv vizează determinarea nivelului de nitrați și de nitriți în urină, aprecierea enzimei ASAT în sânge. Nivelul de nitrați și de nitriți în urină, de ASAT în sânge s-a studiat în funcție de sex, vârstă, durata bolii, gradul de activitate a procesului inflamator hepatic și al infecției virale, utilizându-se aceleași criterii de divizare.

Prin urmare, în baza datelor de investigații efectuate s-a constatat că identificarea acestui raport (nivelul de nitrați și de nitriți în urină către nivelul de aspartataminotransferază în sânge) permite diagnosticarea hepatitelor virale cronice D și mixte B+C. Calcularea rapoartelor menționate s-a efectuat în cifre absolute, iar unitățile de măsură s-au calculat în conformitate cu Sistemul Internațional (SI). Această metodă este neinvazivă și permite de a primi în termen scurt o informație exactă despre prezența hepatitei virale cronice la persoana investigată.

În metoda revendicată s-au utilizat următoarele metode de diagnosticare.

Pentru aprecierea nivelului de nitrați și nitriți în urină la pacienții cercetați s-a utilizat metoda Griess, care constă în măsurarea intensității culorii ($\lambda_{max}=520$ nm) a compusului diazolic format în urma reacției de diazotare dintre acidul sulfanilic și ionii nitriți și cuplarea ulterioară cu α -naftilamină. Proba analizată (2 mL) se amestecă cu același volum (2 mL) de reactiv Griess (amestec de volume egale de soluții ale α -naftilaminei și acidului sulfanilic), se agită și se lasă timp de 20...30 min la întuneric, după aceea se măsoară extincția la lungimea de undă 520 nm față de soluția de comparare, reactivul Griess și apa distilată se iau în raport de 1:1.

Concomitent s-au apreciat indicatorii sindromului citolitic – ALAT (alaninaminotransferaza, norma 7...40 U/L) și ASAT (aspartataminotransferaza, norma (7...40 U/L)). ALAT catalizează transferul grupului aminic de la alanină la alfa-cetoglutarat. ALAT se depistează în mușchii scheletului, ficat, cord. Cele mai mari concentrații de ALAT sunt în ficat. ASAT catalizează transferul grupului aminic de pe asparaginat pe alfa-cetoglutarat. Concentrația acestor enzime a fost determinată prin metoda cinetică cu ajutorul seturilor de reagenți ale firmei ELITEH (Franța), conform instrucțiunilor anexate la test.

Indicii obținuți au fost studiați în funcție de etiologia hepatitelor virale cronice mixte comparativ cu lotul martor, de asemenea s-a comparat raportul nivelului de nitrați și de nitriți în urină față de nivelul de ASAT între loturile de pacienți cu hepatite virale cronice (tabel).

Tabel

Raportul nitraților și nitriților în urină către ASAT

Index	Lotul martor (n=29)	Hepatite virale cronice D (n=37)	Hepatite virale cronice mixte B+C (n=37)
Nitrați și nitriți în urină/ASAT	0,19±0,02	0,37±0,05	0,51±0,02

50

Metoda dată a fost utilizată în secția de hepatologie a Spitalului Clinic Republican. În studiul respectiv, în baza unui material clinic (179 pacienți), s-au demonstrat particularitățile clinice, sindroamele patologice de bază (citolic, colestatic, hepatopriv, imuno-inflamator) în

funcție de nivelul de nitrați și nitriți în urină. În urma acestor cercetări a fost confirmat și demonstrat rolul esențial al nitraților și nitriților în mecanismul patogenetic al activității procesului patologic hepatic și al infecției virale. În evoluția hepatitelor virale cronice s-au apreciat modificări ale sintezei NO după conținutul produșilor finali ai metabolismului lui

Exemplul 1

Pacientul R., 28 ani, inclus în lotul martor. Anamneza ereditară neagravată, maladii cronice absente. Datele obiective din partea sistemului respirator, cardiac, digestiv și urinar fără particularități. Datele biochimice reflectă starea funcțională a ficatului fără abateri de la normele fiziologice. Analiza generală a sângelui: Hb - 140 g/L, er. - $4,2 \cdot 10^{12}$, leuc. - $4,2 \cdot 10^9$, limf. - 26 %, VSH 5,0 mm/oră. Analiza generală a urinei fără patologie. ALAT - 20,04 U/L, ASAT - 18,21 U/L, bilirubina totală 18,4 μ mol/L, bilirubina conjugată 3,6 μ mol/L, indicele protrombinic 97%, ureea serică 4,9 μ mol/L. Studiarea imunității umorale s-a soldat cu următoarele date: Ig A - 2,10 g/L, Ig M - 1,05 g/L, Ig G - 11,63 g/L. Cercetarea imunității celulare s-a stabilit în limitele: limfocite T_{tot} - 57%, limfocite T_{act} - 27,6%, T_{tfs} - 16,6%, T_{tfr} - 44,7%, B_{limf} - 22,988%, CIC - 35 UDO. Markerii virali: AgHBs - negativ, anti-HVD - negativ, anti-HBC - negativ, anti-HVC - negativ. Cercetarea parametrilor studiați a constatat următoarele date: nivelul de nitrați și nitriți în urină - 3,75 g/L, ASAT - 18,21 U/L. Calcularea raportului sumei nitraților și nitriților în urină față de aspartataminotransferază este de 0,20 mm/L.

Deoarece rezultatele obținute atât clinice, cât și biochimice nu au depășit limitele valorilor stabilite, indicii obținuți au fost apreciați în calitate de normă fiziologică pentru persoanele sănătoase.

Exemplul 2

Pacientul U., 34 ani. S-a internat cu acuze la astenie, oboseală rapidă, dureri surde și greutate în hipocondrul drept. Datele paraclinice ale sistemului respirator, cardiac și urinar fără patologii. La examinarea tractului digestiv se atestă hepatomegalie, ficatul proeminând de sub rebord costal cu 4...5 cm, consistența elastică, marginea semirotundă. Investigații biochimice efectuate: analiza generală a sângelui Hb - 121 g/L, er. - $5,0 \cdot 10^{12}$, L - $4,9 \cdot 10^9$, tr. - $179 \cdot 10^9$, limf. - 29%, VSH - 2,0 mm/oră. Analiza generală a urinei - patologie nu s-a depistat. ALAT - 98,81 U/L, ASAT - 52,54 U/L, bilirubina totală - 16,10 μ mol/L, bilirubina conjugată - 2,3 μ mol/L, indicele protrombinic - 90%, ureea serică - 4,9 μ mol/L. Studiarea imunității umorale s-a soldat cu următoarele date: Ig A - 3,47 g/L, Ig M - 3,0 g/L, Ig G - 38,35 g/L. Cercetarea imunității celulare s-a stabilit în limitele: limfocite T_{tot} - 44,9%, limfocite T_{act} - 21,5%, T_{tfs} - 26,2%, T_{tfr} - 15,9%, B_{limf} - 15%, CIC - 1145 UDO. Markerii virali: AgHBs - pozitiv, Anti-HVD - pozitiv. Nivelul de nitrați și de nitriți în urină - 19,20 g/L, ASAT - 52,54 U/L. Calcularea raportului sumei de nitrați și de nitriți în urină față de aspartataminotransferază este de 0,37 μ mol/L, ce se încadrează în limitele stabilite pentru hepatita virală cronică D (v. tab.) - respectiv se diagnostichează hepatita virală cronică D, activitate moderată.

Exemplul 3

Pacientul L., 39 ani. S-a internat cu acuze la astenie, oboseală rapidă, dureri surde și greutate în hipocondrul drept, periodic amărăciune în gură. Datele paraclinice, respectiv sistemul respirator, cardiac și urinar fără particularități patologice. La examinarea tractului digestiv se atestă hepatomegalie, ficatul proeminând de sub rebordul costal cu 4 cm, consistența elastică, marginea semirotundă. Analiza generală a sângelui: Hb - 140 g/L, er. - $4,4 \cdot 10^{12}$, L - $4,9 \cdot 10^9$, tr. - $324 \cdot 10^9$, limf. - 22%, VSH - 7 mm/oră. Analiza generală a urinei fără patologie. ALAT - 60,75 U/L, ASAT - 38,88 U/L, bilirubina totală - 23,04 μ mol/L, bilirubina conjugată - 1,3 μ mol/L, indicele protrombinic - 95%, ureea în ser 7,3 μ mol/L. Studiarea imunității umorale s-a soldat cu următoarele date: Ig A - 3,38 g/L, Ig M - 2,90 g/L, Ig G - 20,33 g/L. Cercetarea imunității celulare s-a stabilit în limitele: limfocite T_{tot} - 44,0%, limfocite T_{act} - 24%, T_{tfs} - 9%, T_{tfr} - 35%, B_{limf} - 35%. Markerii virali: AgHBs - pozitiv, Anti-HBC - pozitiv, Anti-HVC - pozitiv, Anti-HVC IgM - pozitiv. Nivelul de nitrați și de nitriți în urină - 20,85 g/L, ASAT - 38,88 U/L. Calcularea raportului sumei de nitrați și de

MD 319 Y 2011.01.31

6

nitriți în urină față de aspartataminotransferază este de 0,53, ce se încadrează în limitele stabilite pentru hepatita virală cronică mixtă (B+C) (v. tab.) - respectiv se diagnostichează hepatită virală cronică mixtă. Diagnosticul: Hepatită cronică etiologie virală mixtă (HVB, HVC), activitate minimală, faza de reactivare a virusului C.

5

10

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. RU 2004134192 A 2006.05.10
2. RU 2167424 C1 2001.05.20

(57) Revendicări:

Metodă de diagnosticare a hepatitei virale cronice D și hepatitei mixte B+C, care constă în aceea că se determină conținutul de nitrați și nitriți în urină și conținutul de aspartataminotransferază în sânge, apoi se calculează mărimea raportului dintre suma de nitrați și nitriți față de conținutul de aspartataminotransferază și în cazul în care mărimea respectivă constituie 0,32...0,42, se diagnostichează hepatită virală cronică D, iar în cazul în care mărimea respectivă constituie 0,49...0,53, se diagnostichează hepatită virală cronică mixtă B+C.

Șef Secție:

GROSU Petru

Examinator:

IUSTIN Viorel

Redactor:

CANȚER Svetlana

AGENTIA DE STAT PENTRU PROPRIETATEA INTELECTUALA A REPUBLICII MOLDOVA

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii	
(21) Nr. depozit: s 2010 0116	(32) Data de prioritate recunoscută:
(22) Data depozit: 2010.06.30	Raport de documentare internațională: ☐ da
(54) Titlul: Metodă de diagnosticare a hepatitei virale cronice D și mixte B și C	
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(51) (Int.Cl): Int. Cl.: A61B 5/00 (2006.01) G01N 33/493 (2006.01) G01N 33/49 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01) C12Q 1/00 (2006.01) C12Q 1/48 (2006.01)	
II. Condiții de unitate a invenției: ☒ satisface ☐ nu satisface Note:	
III.Revendicări: claritatea, susținerea de descriere Note: ☒ satisface ☐ nu satisface	
IV. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare)	
MD (Documentare Invenții (inclusiv cereri nepublicate)) – diagnostic, hepatită virală B, C, aspartataminotransferază	
EA, CIS (Eapatis) – Диагноз, вирусный гепатит В, С, аспаргатаминотрансфераза	
SU (nonpublic) – Диагноз, вирусный гепатит В, С, аспаргатаминотрансфераза	
V. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate	

VI. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	1. MD 34 Z 2009.06.30	1
A	2. MD 1656 G2 2001.11.30	1
A	3. MD2848 G2 2006.06.30	1
A	4. MD 2149 G2 2003.11.30	1
A	5. MD 3300 G2 2007.12.30	1
A	6. RU 2071350 C1 1997.01.10	1
A	7. Иммунохроматографический диагностикум для определения антител к вирусу гепатита В, С < URL http://www.adventus.info/medicine/childe/2/20.php_gasit 2010.03.02	1
D, A	8. RU 2004134192 A 2006.05.10	
D, C, A	9. RU 2167424 C1 2001.05.20	1
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general		T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur		E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie		D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare		C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
		& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate		L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării		2010-11-08
Examinator		IUSTIN Viorel