



MD 995 Y 2016.01.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **995** (13) **Y**
(51) Int.Cl: *A61K 38/21* (2015.01)
A61P 31/22 (2015.01)

(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 2015 0006 (22) Data depozit: 2015.01.27	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.01.31, BOPI nr. 1/2016
(71) Solicitant: CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA, MD (72) Inventatori: SPINU Constantin, MD; SPINU Igor, MD; GURIEV Vladimir, MD; BIRCA Ludmila, MD; SCOFERȚA Petru, MD; DONOS Ala, MD; UNCUȚA Diana, MD; POPOVICI Raisa, MD; BOLOGA Sergiu, MD; CORNILOV Stela, MD; UNCUȚA Andrei, MD (73) Titular: CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA, MD	

(54) Metodă de tratament al infecției cu virusul *Herpes simplex* de tip 1 și 2

(57) Rezumat:

Invenția se referă la medicină, în special la o metodă de tratament al infecției cu *Herpes simplex* de tip 1 și 2.

Conform invenției, metoda constă în efectuarea examenului clinic și paraclinic al pacientului și inițierea tratamentului etiotrop cu aciclovir, precum și a tratamentelor antiinflamator, sedativ, analgezic, topic, imunomodulator și vitaminoterapeutic, totodată în decurs de 12...24 ore de la

examenul clinic se efectuează testul de sensibilitate la aciclovir a tulpinilor de virus prelevate din veziculele herpetice și în cazul depistării tulpinilor rezistente la aciclovir, acesta se substituie din ziua a doua a tratamentului cu un preparat antiviral cu acțiune timidinkinaza-independentă pe bază de interferon uman recombinant α -2b.

Revendicări: 1

MD 995 Y 2016.01.31

(54) Method for treating *Herpes simplex* virus type 1 and 2-induced infection

(57) Abstract:

1

The invention relates to medicine, in particular to a method for treating *Herpes simplex* virus type 1 and 2-induced infection.

According to the invention, the method consists in carrying out the clinical and paraclinical examination of the patient and initiation of etiotropic therapy with acyclovir, and of anti-inflammatory, sedative, analgesic, local, immunomodulatory and vitamin-therapeutic treatment, at the same time within

2

12...24 hours after the clinical examination is carried out the acyclovir sensitivity testing of virus strains taken from herpetic vesicles, and in case of detection of acyclovir-resistant strains, it is replaced from the second day of treatment with an antiviral drug with thymidine kinase-independent action based on human recombinant interferon α -2b.

Claims: 1

(54) Метод лечения инфекции вызываемой вирусом *Herpes simplex* 1 и 2 типов

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к медицине, в частности к методу лечения инфекции вызванной вирусом *Herpes simplex* 1 и 2 типов.

Согласно изобретению, метод состоит в осуществлении клинического и параклинического обследования пациента и иницировании этиотропного лечения ацикловиром, а также противовоспалительного, седативного, анальгезирующего, местного, иммуномодуляторного и витаминотерапевтического лечения, при этом в течение 12...24 часов после

2

клинического обследования осуществляют тест на чувствительность к ацикловиру штаммов вируса, взятых из герпетических везикул, и в случае обнаружения резистентных штаммов к ацикловиру, его заменяют со второго дня лечения на противовирусный препарат с тимидинкиназа-независимым действием на основе интерферона человеческого рекомбинантного α -2b.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la medicină, în special la o metodă de tratament al infecției cu *Herpes simplex* de tip 1 și 2.

5 Tinta tratamentului în infecția herpetică include:

- reducerea severității bolii, scăderea contagiozității și a riscului de complicații prin inhibarea replicării virusurilor și stoparea răspândirii infecției;

- formarea unei apărări imune de o reală valoare prin asigurarea unui răspuns adecvat (Баринский И.Ф., Махмудов Ф.Р. Герпес. Баку, Victory, 2013, p. 10-123; Spanu C., Bîrca Ludmila, Rusu Galina. Infecția cu *Herpes simplex* – particularități clinico-epidemiologice, de evoluție, diagnostic, tratament, profilaxie (ghid practic). Chișinău, Tipografia centrală, 2006, p. 23-65).

10 Aceste obiective pot fi atinse prin: chimioterapie (tratament etiotrop antiherpetic), terapie imunomodulatoare (interferoni, inductori ai interferonogenezei, preparate cu anticorpi antiherpetic, vaccinoterapie), combinarea celor enumerate (chimioterapie+terapie imunomodulatoare) cu tratament antiinflamator, topic, analgezic. Specificul tratamentului etiotrop al infecției herpetice este demonstrat în mare măsură de interrelația dintre herpes-virusuri (HV) și organismul uman gazdă caracterizată prin persistența îndelungată a virusului în ganglionii nervoși senzitivi, activizarea lor în cazul diminuării imunității specifice și nespecifice, posibilitatea de reinfectare cu alte tulpini virale de herpes-virusuri.

20 Preparatele antiherpetice constituie 80% din toate preparatele antivirale existente, unele deja au fost abandonate din cauza toxicității severe sistemice importante (idoxuridina, vidarabina). Majoritatea substanțelor antivirale utilizate în terapia infecțiilor produse de herpes-virusuri acționează prin inhibarea sintezei ADN-ului viral și sunt din punct de vedere chimic analogi nucleozidici ai bazelor purinice sau pirimidinice. Cei mai utilizați compuși în terapia infecțiilor produse de herpes-virusuri sunt aciclovirul și analogii săi penciclovirul și ganciclovirul. Valaciclovirul, famciclovirul și valganciclovirul sunt pro-
25 medicamente cu același spectru de activitate ca al aciclovirului, dar cu biodisponibilitate orală superioară, ce permite administrarea lor pe cale orală. Se cunoaște că aciclovirul pentru a deveni activ trebuie supus trifosforilării: prima fosforilare se efectuează prin intermediul enzimei virale timidinkinaza, celelalte două fosforilări sunt realizate de enzimele celulei gazdă, unde ADN-polimeraza virusurilor herpetice include greșit aciclovirul trifosfat în lanțul ADN-ului viral în locul dezoxiguanizintrifosfatului natural, conducând la blocarea replicării virale. Activitatea aciclovirului este strict specifică,
30 deoarece timidinkinaza herpes-virusurilor de mii de ori mai rapid decât cea a celulelor se leagă cu aciclovirul, din care cauză aciclovirul se acumulează doar în celulele infectate cu virus.

În acest context o problemă extrem de majoră prezintă apariția rezistenței la aciclovir, în special la imunodeprimați, care poate varia de la 10 până la 40% cauzate de tulpinile de
40 virus *Herpes simplex* (tip ?) defecte în timidinkinaze (TK -). În prezent, tratamentul în infecția cu virusul *Herpes simplex* (HSV₂) implică (Каримова И. М. Герпесвирусная инфекция (диагностика, клиника, лечение). Медицинское информационное агентство. Москва, 2004, p. 117; Ciufecu Elvira Sînziana. Virusologie medicală, Familia Herpesviridae. București, Editura Medicală Națională, 2003, p. 280-334):

45 I. Stabilirea diagnosticului clinic, ținând cont de sediul anatomic al infecției și spectrul evolutiv condiționat de acest factor cu identificarea anamnesticalui maladii, examenul clinic obiectiv.

II. Anamneza epidemiologică.

50 III. Inițierea tratamentului etiotrop și simptomatic cu declanșarea investigațiilor de laborator intru confirmarea diagnosticului clinic.

III (a). Conform standardelor existente de tratament al infecției cu HSV? clinicianul nu trebuie să temporizeze tratamentul etiotrop specific (cu aciclovir) până la sosirea rezultatelor investigațiilor de laborator. Suspiciunea de tulpină virală rezistentă la aciclovir (TK-) apare pe parcursul tratamentului, adică în absența răspunsului clinico-virusologic
55 favorabil după 7...12 zile în primoinfecție herpetică și peste 1...3 luni în infecția herpetică cronică (persistentă). Așadar, instituirea „alternativei terapeutice” în prezent se face în baza răspunsului clinic la tratamentul antiviral, iar alegerea pe criterii de probabilitate statistică.

III (b). Este cunoscută metoda tradițională, complexă de tratament al infecției cu virusul *Herpes simplex* (HSV?), care include tratamentul etiotrop specific cu aciclovir (analogii săi), tratamentul local, terapia antiinflamatoare, imunomodulatoare și tratamentul simptomatic. Frecvent pentru tratamentul local se utilizează ung. Florenal 0,5%, Tebrofen 3,0%, Oxolin 1,0%, Ridoxol 0,5%. Terapia antiinflamatoare include remedii medicamentoase nesteroidice: acid acetilsalicilic, salicilamidă, fenilbutazon; imunomodulatoare – interferoni (viferon, gifaferon, leucinferon), inductori de interferon (amixin, poludan, ridostin, cicloferon). Se recomandă aplicarea curantilului în termene precoce pentru corecția microcirculației sangvine, a vitaminelor A, B, C și E pentru stimularea efectului trofic asupra tegumentelor și mucoaselor. Cuparea durerii herpetice, postherpetice și a pruritului se face cu sedative, somnifere și analgetice (analgin, sedalgin, baralgin, promedol etc.).

Durata tratamentului cu utilizarea aciclovirului este de la 7...12 zile pentru primoinfecție herpetică și până la 1...3 luni în dependență de forma clinică de manifestare: infecție cronică, latentă, persistentă. Acest tratament etiotrop cu aciclovir sau analogii săi de comun cu tratamentul topic și simptomatic permite vindecarea bolnavilor, cu excepția infecției herpetice cauzate de HSV? rezistent la aciclovir [1,2].

Dezavantajele metodei constau în absența efectului terapeutic în infecția herpetică primară și recidivantă cauzată de virusurile herpetice rezistente la aciclovir (TK-), dezvoltarea efectelor adverse pronunțate (greață, vomă, diaree, afectarea rinichilor, convulsii, halucinații etc.) pe parcursul administrării îndelungate a aciclovirului, cheltuieli financiare nejustificate.

IV. Diagnosticul de laborator.

Tehnicile de laborator utilizate pentru confirmarea diagnosticului clinic al infecției cu herpesvirusuri includ: 1) izolarea virusului HSV $\frac{1}{2}$ în cultură de celule HEP-2, Hela, Vero, BSC-21, C1-13, FEO în ou embrionat, prin inoculare animalelor de laborator și identificarea virusului izolat în reacția de neutralizare, hemaglutinare, fixare a complementului, 2) examenul prin tehnică imunofluorescentă (EIF) pentru identificarea antigenului virusurilor herpetice (HSV $\frac{1}{2}$) în baza anticorpilor monoclonali și policlonali, 3) utilizarea reacției de amplificare genică PCR și a tehnicilor de hibridizare pentru evidențierea și evaluarea ADN-lui virusului herpetic, 4) analiza imunoenzimatică, realizată prin echipament dotat cu anticorpi monoclonali pentru evidențierea anti-HSV IgM și anti-HSV IgG și evaluarea infecției herpetice primare, cronice, recidivante, 5) analiza imunoenzimatică (imunodot) cu utilizarea a două glicoproteine de suprafață a virusului HSV – 1 (gG1) și HSV – 2 (gG2) pentru identificarea formelor subclinice ale infecției herpetice și evaluarea seroconversiei în infecția herpetică recidivantă, 6) analiza prin Western blot (imunoblot) capabilă de a evidenția anticorpii din serul pacientului testat către 50 proteine individuale ale virusului herpetic (HSV $\frac{1}{2}$), 7) metoda citomorfologică – examenul microscopic al probelor recoltate din leziuni (cutanate, mucoase, biopsat etc.) care demonstrează celule gigante polinucleare și incluziuni intranucleare, cunoscute sub numele de celule Unna, dar nu permite diferențierea de alte virusuri. Suplimentar la cele menționate pot fi realizate examene complementare (puncția lombară cu cercetarea lichidului cefalorahidian, Rezonanța Magnetică Nucleară cerebrală, computer tomografia cerebrală, electroencefalografia, investigații ultrasonore) care sunt condiționate de forma clinică și sediul infecției. În formele recidivante și severe sunt necesare investigații suplimentare de apreciere a statutului imun, în special tisular (CD4 și CD8 – subpopulațiile T-limfocitelor), statutului interferonilor (cantitatea totală de interferon, capacitatea leucocitelor de a induce α și β -interferon, capacitatea T-limfocitelor de a induce γ -interferon), factorul de necroză tumorală.

Algoritmul prezentat nu include identificarea și evaluarea tulpinilor de virus herpetic (HSV?) rezistente și sensibile (TK+) la aciclovir.

Dezavantajele metodei cunoscute de tratament al infecției herpetice etiologic cauzate de HSV? țin de:

- absența testului de identificare a tulpinilor de virus *Herpes simplex* (tip ?) rezistente la aciclovir defecte în (TK-) în primele (12...24 ore) de inițiere a tratamentului antiviral etiotrop specific,

- eșecul tratamentului antiviral cu aciclovir la 40% pacienți, în special la cei imunodeprimați cu infecție herpetică acută, cronică (recidivantă),

- necesitatea modificării spectrului de antivirale etiotropspecifice pentru infecția herpetică, inclusiv doza de aplicare pe parcursul tratamentului,

- utilizarea neadecvată a aciclovirului în tratamentul infecției cu virusul *Herpes simplex* duce la sporirea procentuală considerabilă a tulpinilor de virus herpetic rezistente la aciclovir,

- sporirea semnificativă a incidenței reacțiilor adverse; afectarea tranzitorie a funcției renale prin cristalizarea aciclovirului în tubii renali, reducerea funcției hepatoprotectoare a ficatului, apariția semnelor de neurotoxicitate, greață, vomă, diaree, febră, iritație, confuzie, vertij, delir etc.,

- pierderi materiale (financiare) neargumentate suportate de Compania Națională de Asigurări în Medicină și pacienți pe parcursul tratamentului, ce țin de procurarea medicamentului nominalizat – aciclovir, sau analogilor lui,

- reducerea semnificativă a posibilității de izolare și identificare a sensibilității virusului *Herpes simplex* (HSV?) la aciclovir în stadiile tardive de evoluție a infecției herpetice.

Problema pe care o rezolvă invenția este sporirea semnificativă a eficacității tratamentului specific etiotrop în infecția cu virusul *Herpes simplex* HSV $\frac{1}{2}$ manifestată prin revenirea la normă în termeni reduși a parametrilor clinici și paraclinici, reducerea semnificativă a duratei de spitalizare și a efectelor adverse cauzate de administrarea nejustificată a aciclovirului, diminuarea riscului de dezvoltare a complicațiilor severe postherpetice ca urmare a tratamentului neadecvat și evitarea cheltuielilor materiale neargumentate.

Esența invenției constă în efectuarea examenului clinic și paraclinic al pacientului și inițierea tratamentului etiotrop cu aciclovir, precum și a tratamentelor antiinflamator, sedativ, analgezic, topic, imunomodulator și vitaminoterapeutic, totodată în decurs de 12...24 ore de la examenul clinic se efectuează testul de sensibilitate la aciclovir a tulpinilor de virus prelevate din veziculele herpetice și în cazul depistării tulpinilor rezistente la aciclovir, acesta se substituie din ziua a doua a tratamentului cu un preparat antiviral cu acțiune timidinkinaza-independentă pe bază de interferon uman recombinant α -2b.

Invenția se referă la o nouă abordare a metodelor de tratament al infecției herpetice în baza diagnosticului prezumtiv precoce (realizat în 12...24 ore) care permite diferențierea tulpinilor de virus herpetic în (TK+) și (TK-).

Rezultatul invenției constă în obținerea unei eficacități sporite în tratamentul etiotrop specific al infecției herpetice, demonstrată prin revenirea la parametrii normali într-un interval de timp redus (comparativ cu metoda prototip) a indicilor clinici și paraclinici, excluderea utilizării nejustificate a aciclovirului (derivaților săi), care poate dezvolta efecte adverse extrem de nedorite (greață, vomă, diaree, convulsii, cristalizarea aciclovirului în tubii renali, halucinații etc.), reducerea riscului de avansare a infecției herpetice în forme severe (encefalite), urmare a absenței răspunsului virusologic scontat la tratamentul cu aciclovir, diminuarea semnificativă a duratei de spitalizare a pacienților, inclusiv a suportului material.

Soluționarea acestei probleme, privind sporirea eficacității tratamentului în infecția cu virusul *Herpes simplex*, se datorează includerii acestui modul original de diferențiere a virusurilor herpetice în HSV $\frac{1}{2}$ (TK+) și HSV (TK-) în primele 12...24 ore de la inițierea investigării clinice a pacientului, care face posibilă modificarea în timp real a tratamentului antiviral cu dezvoltarea unui răspuns clinico-virusologic de tratament al infecției herpetice cu HSV? (TK+); HSV? (TK -) susținut.

Toate aceste argumente ne permit să afirmăm că prin aplicarea metodei propuse se soluționează o importantă problemă clinico-virusologică, obținând rezultate terapeutice și epidemiologice benefice, însoțite de ameliorarea indicilor clinici și paraclinici cu un impact pozitiv asupra diminuării morbidității prin infecțiile herpetice.

În continuare prezentăm metodologia propusă pentru diferențierea tulpinilor de virus *Herpes simplex* în HSV $\frac{1}{2}$, aciclovir sensibile (TK+) și HSV $\frac{1}{2}$ aciclovir rezistente (TK-), unde procesul tehnologic include mai multe etape.

Etapa 1. Concomitent cu examenul clinic primar al pacientului cu diagnosticul prezumtiv „infecție herpetică”, conținutul veziculelor indiferent de localizare (herpes labial, genital, ocular etc.) în volum de 0,1 ml se inoculează în culturi celulare Vero, HEp-2 cu monostrat format, cultivate special pe lamele de sticlă (destinate pentru tehnicile de imunofluorescență), unde mediul de cultură Eagle + ser bovin (10%) a fost suplimentat cu

aciclovir în concentrație inhibitoare, cand IC-50=2,0-5,0, µg/ml. După 12...24 ore lamelele cu substrat celular deja fixat se prelucrează cu anticorpi monoclonali anti-HSV? marcați cu fluoresceină (BIO-RAD, Pathfinder, SUA) pentru evidențierea markerilor antigenici ai virusurilor herpetice HSV $\frac{1}{2}$ la microscopul de ultimă generație în regim automatizat Leica 2500 DM, Germania.

5 Etapa 2. Aceeași procedură realizată prin infectarea culturilor celulare Vero, HEp-2 cu conținut vezicular de la pacienții nominalizați și prelucrarea ulterioară prin tehnici de imunofluorescență pentru evidențierea markerilor antigenici ai virusului herpetic HSV? în absența soluției de aciclovir în concentrație IC>2,0 µg/ml.

10 Etapa 3. Procedură similară primului test, deosebindu-se prin inocularea concomitentă a conținutului veziculelor recoltate de la pacienții cu infecție herpetică în volum de 0,1 ml și a serurilor de neutralizare a activității infecțioase a virusului herpetic HSV? de asemenea în volum de 0,1 ml (obținute la Institutul de virusologie „D.I. Ivanovski”), Moscova, Federația Rusă, în culturi celulare.

15 Etapa 4. Ultimul test-martor, similar primului, a inclus toate elementele enumerate de identificare a virusului herpetic HSV $\frac{1}{2}$ și de evidențiere a posibilelor tulpini aciclovir-rezistente în culturile celulare nominalizate, dar inoculate cu placebo (0,1 ml ser fiziologic).

Tabelul 1

20 Interpretarea rezultatelor obținute prin tehnici de imunofluorescență privind diferențierea tulpinilor de HSV? în TK+ și TK-, după metodologia propusă de autori în timp de 12...24 ore

Testele utilizate	Infecție herpetică (IH) cu virusurile HSV ?		
	*IH cu virusul HSV, TK-	** IH cu virusul HSV,TK+	*** Absența IH cu HSV
Test -1	(+)	(-)	(-)
Test -2	(+)	(+)	(-)
Test -3	(-)	(-)	(-)
Test -4	(-)	(-)	(-)

Remarcă: * pacient cu infecție herpetică (IH), etiologic cauzată de virusul HSV $\frac{1}{2}$, rezistent la tratamentul cu aciclovir; ** pacient cu IH determinată de HSV $\frac{1}{2}$ sensibil la tratamentul cu aciclovir, *** absența infecției herpetice la pacienții investigați.

25 Pentru aprobarea metodei propuse de tratament al infecției cu virusul *Herpes simplex* s-au efectuat investigații clinice și paraclinice pentru aprecierea eficacității metodei originale de tratament în clinicile de boli infecțioase la copii și adulți „Spitalul clinic municipal de boli contagioase la copii”, Spitalul clinic de boli infecțioase „T. Ciorbă”, Chișinău. Pe parcursul perioadei de studiu au fost examinați 85 bolnavi în vârstă de la 2 până la 18 ani cu diagnosticul clinic prezumtiv – infecție herpetică labială.

30 Diagnosticul clinic prezumtiv de infecție herpetică labială a fost confirmat prin investigații paraclinice: evidențierea markerilor Ag HSV $\frac{1}{2}$ și Ag HSV $\frac{1}{2}$ în elementele de structură ale sângelui (limfocite, leucocite și eritrocite) la bolnavii din ambele loturi prin tehnici de imunofluorescență cu anticorpi monoclonali, marcați cu fluoresceină. Pondere bolnavilor cu infecție herpetică, etiologic cauzată de HSV " confirmată prin tehnicile nominalizate a constituit 85,9%. Ulterior bolnavii au fost repartizați în două loturi martor și experimental, fiind completate succesiv, odată cu internarea lor în staționar, care au inclus 43 și, respectiv, 42 pacienți. Loturile au fost formate după metoda selecției aleatorii, iar studiul a fost realizat prin metoda dublu-orb. În lotul martor tratamentul inițiat după examenul primar clinic a inclus aciclovir 15 mg/kg *per os*, de 5 ori/zi, timp de 7...12 zile suplimentat cu ung. Florenal 0,5%, Tebrofen 3,0% și Oxolin 1,0% local și cu administrare de vitamine din grupa B, acid ascorbic, în unele cazuri după necesitate au fost aplicate sedative și analgetice. Supravegherea clinică și investigațiile paraclinice efectuate la sfârșitul curei de tratament demonstrează că la o pondere considerabilă de bolnavi 85,7% din lotul martor s-au redus semnificativ termenele de apariție a noi erupții veziculoase, însoțite de simptome de arsură și prurit, constituind în medie 3,7± 0,2 zile față de 10,7±0,5 zile identificate la 6 (14,3%) pacienți din același lot, ulterior identificați ca rezistenți la tratamentul cu aciclovir (TK-). Acest grup de pacienți, în număr de 6, de asemenea a punctat un număr semnificativ de recidive 5 (cazuri) cu termene prelungite de disconfort

general (dureri, mialgii, nevralgii etc.) până la 12, inclusiv absența procesului de epitelizare (tab. 2).

- 5 La 5 din cei 6 pacienți, de asemenea au fost atestate suprainfecții bacteriene, ceea ce a dus la o creștere a duratei de manifestare a erupțiilor, durata medie a spitalizării constituind 16...19 zile.

Tabelul 2

Indicii clinici de bază evidențiați la pacienții cu infecție herpetică labială după aplicarea tratamentului existent nemodificat

Nr.	Indici	Lotul martor – 43 bolnavi				P
		IH cu HSV? TK+		IH cu HSV? TK -		
		37(86,1%)		6(13,9%)		
		Abs	M±m	Abs	M±m	
1	Durata spitalizării	9...10	8,5±0,3	18...21	20,5±0,3	<0,05
2	Termenele de apariție a erupțiilor noi (zile)	3...4	3,7±0,2	9...12	10,7±0,5	
3	Numărul recidivelor (cazuri)	2		5		
4	Termenele dispariției disconfortului general (dureri, nevralgii, mialgii etc.) (zile)	6...7	6,4±0,3	14...16	13,4±0,7	
5	Suprainfecții bacteriene (cazuri)	1		6		
6	Termenele de epitelizare (zile)	15...17	16±1,0	25...30	27,3±1,0	

- 10 *Remarcă:* Monitorizarea clinică și a unor indici paraclinici a fost efectuată în termen de până la 3...6 luni.

- 15 Durata spitalizării pentru bolnavii cu infecție herpetică, rezistenți la tratamentul cu aciclovir (TK-) a constituit de la 18 până la 21 zile, comparativ cu 9...10 zile, interval caracteristic pentru bolnavii care au răspuns la tratamentul cu aciclovir. În paralel cu monitorizarea clinico-virusologică s-a efectuat testarea unor indici ai imunității celulare la finele curei de tratament cu aciclovir, prin utilizarea analizei imunoenzimatică Capcellia (BIORAD) SUA cu aprecierea numărului total de limfocite și a subclaselor T-helper și T-supresor. Rezultatele examinării paraclinice a bolnavilor din lotul martor sunt expuse în tab. 3.

Tabelul 3

- 20 Indicii paraclinici de bază la bolnavii cu infecție herpetică labială examinați în lotul martor după tratamentul existent, nemodificat

Nr.	Indicii imunității celulare	Lotul martor – 43 bolnavi				P
		IH cu HSV? TK+		IH cu HSV? TK -		
		37 (86,1%)		6 (13,9%)		
		Abs	M±m	Abs	M±m	
1	T-limfocite total	37	1,1±0,1	6	1,2±0,1	<0,05
2	T-limfocite (helperi)		0,81±0,07		0,65±0,06	
3	T-limfocite (supresori)		0,29±0,02		0,50±0,04	
4	Indicele T-helperi/T-supresori		2,79±0,03		1,3±0,2	

Remarcă: Valorile indicilor paraclinici sunt exprimate astfel, spre exemplu T-limfocite (helper) = 0,81±0,07x10⁹/L.

- 25 Evaluarea rezultatelor obținute demonstrează că la bolnavii cu infecție herpetică labială, care au răspuns la tratamentul cu aciclovir (TK+) după 7...12 zile s-a înregistrat o sporire a numărului de T-limfocite helper și o reducere a T-limfocitelor supresoare, comparativ cu indicii analogi la bolnavii care au fost identificați ca rezistenți la aciclovir (TK-). Indicatorul T-helper / T-supresor de asemenea reflectă această tendință, pentru bolnavii care au răspuns la tratamentul cu aciclovir.

- 30 Identificarea markerului Ag HSV? prin tehnici de imunofluorescență în elementele de structură ale sângelui (leucocite, limfocite, eritrocite) la bolnavii din lotul martor, care au răspuns la tratamentul cu aciclovir după 12 zile a demonstrat o reducere semnificativă a incidenței de la 85,9% (37) până la 39,5% (17). P<0,05.

La cei 6 bolnavi rezistenți la tratamentul cu aciclovir, markerii Ag HSV? au fost identificați până și după tratament.

- Investigarea clinică și paraclinică a pacienților din lotul experimental cu infecție herpetică labială, în număr de 42 bolnavi, a inclus aceiași parametri, cu excepția că la inițierea examenului clinic și a diagnosticului de laborator pentru confirmarea infecției cu HSV $\frac{1}{2}$ a fost inclusă metodologia de diferențiere a tulpinilor de virus *Herpes simplex* în TK+ și TK- (tab. 1). Includerea testului de apreciere a sensibilității la aciclovir a tulpinilor de virus HSV? concomitent cu inițierea examenului clinic ne-a permis să identificăm din start timp de 12...24 ore 5 pacienți cu infecție herpetică, rezistenți la tratamentul cu aciclovir (TK-). Astfel a devenit real, începând cu ziua a doua de tratament, de a substitui produsul antiviral aciclovir cu viferon – 500.000 pentru bolnavii cu infecție herpetică labială, cauzată de HSV $\frac{1}{2}$ (TK-), nemodificând tratamentul simptomatic. Viferonul este un produs antiviral, care include interferon IFN – a 2 uman recombinat și vitaminele E și C pe ulei de cacao.
- Așadar, începând cu ziua a doua de tratament, la cei 5 bolnavi cu infecție herpetică HSV? (TR -) din lotul experimental, produsul antiviral aciclovir a fost substituit cu viferon – 500.000, suplimentat cu ung. Florenal, Tebrofen, Oxolin local și cu administrarea de vitamine (grupa B), acid ascorbic și aplicarea după caz a unor sedative și analgetice pe parcursul a 7...12 zile. Rezultatul eficacității metodei de tratament modificate a bolnavilor cu infecție herpetică labială cu o durată de până la 12 zile sunt expuse în tab. 4.

Tabelul 4

Indicii clinici de bază evidențiați la pacienții din lotul experimental cu infecție herpetică labială după aplicarea tratamentului etiotrop modificat

Nr.	Indici	Lotul experimental – 42 bolnavi				P
		IH cu HSV? TK+		IH cu HSV? TK -		
		37 (88,1%)		5 (11,9)		
		Abs	M±m	Abs	M±m	
1	Durata spitalizării	9...11	8,8±0,3	8...9	7,2±0,3	<0,05
2	Termenele de apariție a erupțiilor noi (zile)	2...3	3,0±0,2	2...3	3,0±0,2	
3	Numărul recidivelor (cazuri)	3				
4	Termenele dispariției disconfortului general (dureri, nevralgii, mialgii etc.) zile	5...7	6,1±0,3	4...6	5,7±0,3	
5	Suprainfecții bacteriene (cazuri)	1				
6	Termenele de epitelizare (zile)	14...16	15,7±1,0	13...15	14,5±1,0	

- Remarcă: Monitorizarea clinică și a unor indici paraclinici a fost efectuată în termen de până la 3...6 luni.

- Rezultatele obținute, expuse în tabelul 5, demonstrează că practic nu este o diferență semnificativă între valoarea indicilor clinici evidențiați la bolnavii cu infecție herpetică labială HSV $\frac{1}{2}$ (TK+) și la pacienții cu HSV? (TK -), ultimii evidențiați ca aciclovir rezistenți la tratamentul din start cu aciclovir. Contrar lotului martor, indicii din lotul experimental, în special pentru cei 5 bolnavi (TK-), cărora din start li s-a modificat schema de tratament, demonstrează o tendință de ameliorare mai rapidă a valorilor indicilor nominalizați. Indicii paraclinici evidențiați pentru bolnavii cu infecție herpetică labială din lotul experimental de asemenea confirmă eficacitatea sporită a metodei de tratament propuse comparativ cu metoda din cadrul celei mai apropiate soluții. Rezultatele investigațiilor de laborator ce țin de statutul imun tisular sunt expuse în tab. 5.

Tabelul 5

Indicii paraclinici de bază la pacienții cu infecție herpetică labială examinați în lotul experimental de tratament în varianta propusă

Nr.	Indicii imunității celulare	Lotul experimental - 42 bolnavi				P
		IH cu HSV? TK+		IH cu HSV? TK -		
		37 (88,1%)		5 (11,9%)		
		Abs	M±m	Abs	M±m	
1	T-limfocite total	37	1,2±0,1	5	1,2±0,1	<0,05
2	T-limfocite (helperi)		0,79±0,65		0,81±0,07	
3	T-limfocite (supresori)		0,27 ±0,02		0,28±0,02	
4	Indicele T-helperi / T-supresori		2,92±0,31		2,89 ±0,30	

Remarcă: Valorile indicilor paraclinici sunt exprimate astfel, spre exemplu T-limfocite total=1,2±0,1x10⁹/L.

Astfel, la finele tratamentului (după 7...12 zile) cu aciclovir pentru pacienții cu infecție herpetică (TK+) și cu viferon – 500.000 pentru pacienții cu virus *Herpes simplex* HSV? (TK-) nu a fost evidențiată o diferență statistic semnificativă între indicii caracteristici pentru statutul imun tisular. În ambele cazuri indicii au revenit în limitele normei în termene similare.

Identificarea markerului Ag HSV? prin tehnici de imunofluorescență cu anticorpi monoclonali anti HSV? marca ți cu fluoresceină la finele tratamentului (după 7...12 zile) a demonstrat o reducere semnificativă a prezenței markerului nominalizat în elementele de structură ale sângelui bolnavilor cu infecție herpetică de la 85,9% (36) până 38% (17) P=0,05. Markerul Ag HSV^{1/2} a fost identificat după tratamentul etiotrop cu viferon - 500.000 inițiat practic după examenul clinic la 2 bolnavi din 5 testați prezumtiv și apreciați ca aciclovir rezistenți (TK-).

Algoritmul tratamentului etiotrop existent al infecției cu virusul *Herpes simplex*, tip ? este următorul:

I. Examenul clinic al pacientului cu infecție herpetică (prima zi);
II. Inițierea tratamentului cu aciclovir (începând cu prima zi). Diagnosticul de laborator (12...48 ore);

III. Evaluarea tratamentului etiotrop (simptomatic după 7...12 zile);

IV. Modificarea tratamentului în urma eșecului cauzat de virusul herpetic aciclovir rezistent. Inițierea unui nou tratament cu un alt antiviral, inclusiv viferon, timidinkinază - independent (după 7...12 zile);

V. Evaluarea tratamentului etiotrop antiherpes (simptomatic) după 14...24 zile inițiat cu alt produs antiviral – foscarnet.

Algoritmul tratamentului etiotrop propus al infecției cu virusul *Herpes simplex*, tip ? este următorul:

I. Examenul clinic al pacientului cu infecție herpetică (prima zi);

II. Inițierea tratamentului cu aciclovir (începând cu prima zi). Diagnosticul de laborator (12...48 ore). Diferențierea tulpinilor de virus herpetic în aciclovir sensibile (TK+) și rezistente (TK-) după metoda propusă în 12...24 ore;

III. Modificarea tratamentului inițiat cu aciclovir după 24 ore urmare a identificării tulpinilor de virus herpetic aciclovir rezistente (TK-). Substituirea aciclovirului cu un alt produs antiviral etiotrop, inclusiv viferon, timidinkinază - independent;

IV. Evaluarea tratamentului etiotrop (simptomatic) după 7...12 zile.

Modificarea schemei de tratament al infecției herpetice cu HSV? în baza includerii unui element nou propus în diagnosticul de laborator, care ne permite în timp de 12...24 ore diferențierea tulpinilor de virus *Herpes simplex* HSV^{1/2} în TK+ și TK-, oferă posibilitatea de a iniția tratamentul etiotrop practic peste 12...24 ore după realizarea examenului clinic, contrar 7...12 zile, urmare a algoritmului existent de tratament.

Rezultatele obținute demonstrează că modificarea metodei cunoscute (prototip) de tratament cu aciclovir al infecției cu HSV?, prin includerea la etapa inițială de examinare clinică a unui modul nou de diagnostic pentru diferențierea virusurilor herpetice HSV? în sensibile (TK+) și rezistente (TK-) a dus la sporirea semnificativă a eficacității tratamentului comparativ cu metoda cunoscută. Acest efect benefic include: revenirea la

parametrii normali într-un interval de timp cu mult mai redus a indicilor clinici și paraclinici, excluderea utilizării nejustificate a produsului antiviral etiotrop – aciclovir, care poate dezvolta efecte adverse nedorite (cristalizarea aciclovirului în tubii renali, vomă, greață, diaree, somnolență, halucinații, convulsii, amețeli etc.), reducerea riscului de avansare a infecției cu herpes în forme severe (encefalite), cronice, latente urmare a absenței răspunsului virusologic scontat la tratamentul cu aciclovir, diminuarea semnificativă a duratei de spitalizare a pacienților, inclusiv a costului tratamentului.

Pentru ilustrarea eficacității tratamentului infecției herpetice labiale, etiologic cauzate de virusul *Herpes simplex* prezentăm următoarele cazuri clinice.

Exemplul 1. Bolnavul B., 2 ani 7 luni, a fost internat pe data de 18.10.2014 cu acuze la senzație de arsuri, dureri, usturime la față în regiunea buzelor, disconfort, slăbiciune generală, febră 38,1°C. În regiunea labială (subnazală) au fost identificate multiple vezicule cu lichid transparent, care au apărut pe parcursul ultimelor 12...24 ore. Ganglionii limfatici periferici erau măriți în volum. În anamneză s-a stabilit apariția în premieră a acestei patologii. Investigațiile de laborator realizate în primele 24...48 ore au identificat prezența markerului Ag HSV-1 în elementele de structură ale sângelui și în lichidul vezicular, markerul anti-HSV-1 IgM a fost negativ, iar anti-HSV-1 IgG pozitiv. Concomitent prin testul propus s-a demonstrat că tulpina virusului herpetic HSV-1 este sensibilă la aciclovir (TK+). În urma investigațiilor efectuate s-a stabilit diagnosticul clinic de infecție herpetică primară, etiologic cauzată de HSV-1 (TK+). În continuare pacientul a fost testat la markerii paraclinici: hemoleucograma (18.10.2014) Hb-106 g/L, Er-3,5x10¹²/L, leuc-6,0x10⁹/L, nes-2%, segm-60%, eoz-1%, limf-28%, mon-9%, VSH-12 mm/oră și repetat (22.10.2014) Hb-128 g/L, Er-4,5x10¹²/L, leuc-5,1x10⁹/L, nes-0%, segm-35%, eoz-2%, limf-55%, mon-8%, VSH-10 mm/oră; urograma și coprograma fiind în limitele normei.

Testarea indicilor imunității celulare prin analiza imunoenzimatică (Capcella-BIORAD) a evidențiat următoarele: T-limfocite(total)-0,6x10⁹; T-limfocite (helperi)-0,31x10⁹; T-limfocite (supresori)-0,29x10⁹, T-helperi /T-supresori-1,06. S-a instituit tratamentul cu ung. Florenal 0,5%, ung. Herpevir 2,5%, aplicații topice și aciclovir, 15 mg/kg, *per os*, de 5 ori/zi, timp de 7 zile. Ca rezultat al tratamentului apariția de noi vezicule herpetice s-a stopat peste 48 ore, iar erupțiile au dispărut peste 5...6 zile, concomitent dispărând și acuzele locale. Identificarea markerului Ag HSV-1 în elementele structurale ale sângelui după finalizarea tratamentului a demonstrat absența acestuia. Markerii anti-HSV^{1/2} IgM și anti-HSV^{1/2} IgG în serul bolnavului au rămas nemodificați. Indicii imunității celulare au demonstrat următoarele: T-limfocite (total)-1,2x10⁹/L, T-limfocite (helperi)-0,80x10⁹/L, T-supresor-0,29x10⁹/L; T-helperi/T-supresori-2,75. Supravegherea clinică pe parcursul perioadei de până la 3 luni a pacientului nu a evidențiat apariția de recidive.

Exemplul 2. Bolnavul G., 2 ani 3 luni, a fost internat pe data 15.10.2014 cu acuze severe de dureri, prurit, senzație de usturime, febră 37,6 °C, disconfort, slăbiciune generală însoțite de multiple vezicule cu lichid transparent localizate în regiunea perinazală a feței, apărute recent în ultimele 12...24 ore. În anamneză a acuzat prezumtiv suportarea unei infecții respiratorii acute însoțite de febră, dureri de cap și în gât, nas înfundat, ochi înroșiți (hiperemizați), disconfort general. Ganglionii limfatici periferici erau măriți în volum. Maladia a evoluat cu recidive și remisii, acum recidivând a 4-a oară. Din anamneză s-a constatat că acutizarea posibil este legată de statutul imun compromis. Prezumtiv a fost stabilit diagnosticul „infecție herpetică nazo-labială”. Investigațiile de laborator efectuate în primele 12...24 ore au identificat prezența markerului Ag HSV-1 în elementele de structură ale sângelui și în lichidul veziculelor, markerul anti-HSV 1 IgM a fost negativ, iar anti-HSV 1 IgG pozitiv. Concomitent prin testul propus la etapa primară, în primele 12...24 ore de examinare clinică a bolnavului prin teste paraclinice s-a demonstrat că tulpina virusului herpetic HSV-1 este rezistentă la aciclovir (TK-). Astfel diagnosticul clinic a fost formulat în următoarea redacție: „infecție herpetică nazo-labială recidivantă, etiologic cauzată de HSV-1, rezistent la aciclovir (TK-)”. În continuare pacientul a fost examinat la următorii markeri paraclinici: hemoleucograma (16.10.2014) Hb-137 g/L, Er-4,5x10¹²/L, Leuc-6,3x10⁹/L, neseg-2%, segm-50%, eoz-4%, limf-38%, mon-6%, VSH-12 mm/oră; examenul biochimic al sângelui ureea-5,29 mmol/L, creatinina-68,4 mmol/L, ALT-13,4U/L, AST-66,2U/L, bilirubina generală-6,1 μmol/L, amilaza-56,0U/L; urograma și coprograma (în normă). Indicii imunității celulare: T-limfocite(total)-0,80x10⁹; T-limfocite (helperi)-0,48x10⁹; T-limfocite (supresori)- 0,35x10⁹; T- helperi /T-supresori -1,37. Luând în considerație rezistența tulpinii de HSV-1 la aciclovir evidențiată în primele 12...24 ore de

- la examinarea clinică s-a instituit tratamentul cu aplicarea ung. Florenal 0,5%, Tebrofen, Oxolin și etiopatogenic cu viferon-500.000 UA/1supp., *per rectum*, de 2 ori /zi, timp de 10 zile, cura repetată. Acuzele la dureri, prurit, disconfort au dispărut peste 3...4 zile, erupțiile peste 5...6 zile. Investigațiile de laborator după finalizarea tratamentului au demonstrat următoarele: absența markerului Ag HSV-1 în elementele de structură ale sângelui, anti-HSV? IgM pozitiv și anti HSV ? IgG -pozitiv. Indicii imunității celulare au prezentat următoarele valori: T-limfocite (total)- $1,2 \times 10^9$; limfocite (helperi)- $0,84 \times 10^9$; limfocite (supresori)- $0,33 \times 10^9$; T-helperi/T-supresori-2,55. Supravegherea clinică pe parcursul perioadei de până la 3 luni a pacientului nu a evidențiat apariția de noi recidive.
- 5 Astfel, includerea modului de diferențiere a tulpinilor de virus herpetic HSV? in (TK+) și (TK-) la etapa de examinare primară a bolnavului (în primele 12...24 ore) din start face posibilă modificarea algoritmului tratamentului, favorizând în continuare o evoluție favorabilă a procesului patologic, o recuperare mai rapidă a bolnavilor cu o reducere semnificativă a duratei de manifestare a principalelor semne clinice și paraclinice în lotul experimental comparativ cu lotul martor.
- 10
- 15

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Герпесвирусная инфекция. Под редакцией В.П. Малого. Москва, Медицинская практика, 2009, p. 36-57
2. Исаков В.А., Архипова Е.И., Исаков Д.В. Герпесвирусные инфекции человека (руководство для врачей). Санкт-Петербург, 2006, p. 276-282

(57) Revendicări:

Metodă de tratament al infecției cu *Herpes simplex* de tip 1 și 2, care constă în efectuarea examenului clinic și paraclinic al pacientului și inițierea tratamentului etiotrop cu aciclovir, precum și a tratamentelor antiinflamator, sedativ, analgezic, topic, imunomodulator și vitaminoterapeutic, **caracterizat prin aceea că** în decurs de 12...24 ore de la examenul clinic se efectuează testul de sensibilitate la aciclovir a tulpinilor de virus prelevate din veziculele herpetice și în cazul depistării tulpinilor rezistente la aciclovir, acesta se substituie din ziua a doua a tratamentului cu un preparat antiviral cu acțiune timidinkinaza-independentă pe bază de interferon uman recombinant α -2b.

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

LUPAȘCU Lucian

Redactor:

LOZOVANU Maria

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2015 0006

(22) Data depozit: 2015.01.27

(71) Solicitant: **CENTRUL NAȚIONAL DE SĂNĂTATE PUBLICĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA, MD**

(54) **Titlul: Metodă de tratament a infecției cu virusul herpes simplex (HSV de tip 1 și 2)**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl: A61K 31/522 (2015.01)**

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): “herpes”, “herpes tratament”, “herpes aciclovir”

Int.Cl: A61K 31/522 (2015.01)

EA, CIS (Eapatis): “герпес”, “герпес лечение”, “герпес ацикловир”

Int.Cl: A61K 31/522 (2015.01)

SU (nonpublic): “герпес”, “герпес лечение”, “герпес ацикловир”

Int.Cl: A61K 31/522 (2015.01)

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

<http://www.sanoteca.md/aciclovir-comprimate>

<http://farmaciadeacasa.md/index.php/fenistilr-pencivir-crema-1-2g-n1.html>

http://old.ms.md/_files/6573-

[protocol%2520ultima%2520varINFECTIA%2520HERPES%2520simplex%2520pentru%2520ordin.pdf](http://old.ms.md/_files/6573-protocol%2520ultima%2520varINFECTIA%2520HERPES%2520simplex%2520pentru%2520ordin.pdf)

<http://www.asm.md/administrator/fisiere/editii/f13.pdf>

<http://www.romedic.ro/infectiile-herpetice-virusul-herpes-simplex>

http://www.medtorrents.com/blog/herpes_simplex/2014-01-29-63

<http://www.terapiamedicala.ro/virusul-herpes-simplex>

<http://sanatate.flu.ro/boli-si-afectiuni/medicamente-antivirale-acyclovir-si-valacyclovir/>

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 1051 C2 1999.05.31	1
A	MD 1473 □ G2 2000.05. □ 1	□
A	RU 2492861 C1 2013.09.20	1
A	SU 1530189 A1 1988.04.15	1
A	SU 1246005 A1 1986.07.23	1

A	SU 1720649 A1 1981.08.06	1
A, D	Герпесвирусная инфекция под редакцией В.П. Малого, Москва □ Медицинская практика, 2009, 304 p.	1
A, D, C	Исаков В.А., Архи □ ова Е.И., Исаков Д.В. Герпесв □ русные инфекции человека (руководство для врачей), Санкт-Петербург, 2006, 302 p.	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		
Examinator		LUPAȘCU Lucian