



MD 1433 F1 2000.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1433** (13) **F1**
(51) Int.Cl: *A61K 51/10* (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată în termen de 6 luni de la data publicării	
(21) Nr. depozit: 99-0120 (22) Data depozit: 1999.04.01	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2000.03.31, BOPI nr. 3/2000
(71) Solicitant: CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventatori: SPÂNU Constantin, MD; BÎRCĂ Liudmila, MD; STOVBUȘ Sergiu, MD; SCOFERȚA Petru, MD; VUTCARIOV Vasile, MD (73) Titular: CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ AL MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	

(54) Metodă de evaluare a anticorpilor antirotavirali

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la virusologia medicală și
veterinară, în special la depistarea și evaluarea anti-
corpilor antirotavirali.

Metoda propusă constă în determinarea anticor-
pilor antirotavirali cu ajutorul unui antigen-test
prin reacția de inhibare a aglutinării și aprecierea

2
titrului anticorpilor, utilizând un antigen-test
stafilococic, ce conține proteina A, sensibilizat cu
imunoglobuline specifice.

5
Rezultatul invenției constă în creșterea
sensibilității și specificității metodei.

Revendicări: 1

MD 1433 F1 2000.03.31

3

Descriere:

Invenția se referă la virusologia medicală și veterinară, în special la depistarea și evaluarea anticorpilor antirotavirali.

În literatură sunt descrise diverse metode serologice pentru diagnosticul de laborator al infecțiilor virale. Aplicarea pe larg a acestora este limitată din motivul necesității unor antigen-teste speciale costisitoare, inaccesibile rețelei practice de asistență medicală. Mai mult decât atât, prepararea lor implică o gamă extinsă de etape tehnologice, care necesită mult timp.

Este cunoscută metoda de depistare și evaluare a anticorpilor antirotavirali, care constă în determinarea anticorpilor antirotavirali prin reacția indirectă de inhibare a hemaglutinării (RIIHA) și aprecierea titrului anticorpilor cu ajutorul unui antigen-test eritrocitar comercial. Reacția se realizează în godeurile plăcilor de polisterol timp de 3-4 ore [1].

Dezavantajul metodei constă în sensibilitatea, specificitatea și precizia redusă la depistarea anticorpilor în RIIHA.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție este sporirea eficacității (sensibilitatea și specificitatea) și preciziei metodei în depistarea și evaluarea anticorpilor antirotavirali.

Metoda, conform invenției, înlătură dezavantajele sus-menționate prin aceea că constă în determinarea anticorpilor antirotavirali cu ajutorul unui antigen-test prin reacția de inhibare a aglutinării și aprecierea titrului anticorpilor, utilizând un antigen-test stafilococic, ce conține proteina A, sensibilizat cu imunoglobuline specifice.

Esența invenției constă în evaluarea anticorpilor anti-Rota în reacția de inhibare a coaglutinării (RICOA) cu ajutorul antigen-testului stafilococic, ce conține proteina A, sensibilizat cu imunoglobuline specifice. Sporirea eficacității metodei se datorează utilizării acestui antigen-test original, construit în baza sensibilizării multiple a stafilococilor, ce conțin proteina A, cu imunoglobuline specifice. Procedul de preparare a acestui antigen-test (numit "Rotatest") este descris în brevetul MD 752 B1. Metoda propusă permite de a spori semnificativ sensibilitatea și specificitatea depistării anticorpilor antirotavirali, fapt care sporește semnificativ precizia diagnosticului.

Avantajele metodei sunt prezentate în tabelele 1 și 2, care demonstrează datele obținute la depistarea și evaluarea anticorpilor antirotavirali prin RICOA, RIIHA și prin analiza imunoenzimatică (AIE), folosind testul imunoenzimatic produs de firma "Acva-Past" (Sankt-Petersburg).

În tabelul 1 sunt prezentate rezultatele testării serurilor pereche recoltate de la copii cu infecție rotavirală prin AIE, RICOA și RIIHA, care demonstrează că testul elaborat (RICOA) posedă o sensibilitate și specificitate sporită semnificativ ($P=0,001$) față de RIIHA și nu cu mult diferă de testul AIE. Eficacitatea sporită a testului RICOA de asemenea este argumentată prin valoarea titrului geometric al nivelului de anticorpi anti-Rota în serurile pereche examinate.

Rezultatele expuse în tabelul 2 demonstrează că indicele sensibilității metodei propuse față de AIE a alcătuit $91,8 \pm 1,7\%$, iar al celui RIIHA - $72,7 \pm 2,8\%$ ($P=0,001$). Indicele specificității metodei propuse este vădit superior celui RIIHA ($72,8 \pm 2,8\%$) și alcătuiește $84,7 \pm 2,3\%$ ($P=0,001$). Este necesar de menționat că rezultatele testării prin metoda propusă coincid cu cele obținute prin AIE în $87,4 \pm 2,2\%$ cazuri, pe când cu rezultatele obținute prin RIIHA - $72,8 \pm 2,8\%$ cazuri ($P=0,001$).

Metoda prezintă și alte avantaje: este simplă în utilizare, nu necesită utilaj special, permite de a obține rezultatul în ziua montării (timp de 2 ore) și poate fi aplicată în orice laborator virusologic sau bacteriologic din țară.

Astfel, rezultatul invenției constă în creșterea sensibilității și specificității metodei.

Metoda se realizează în modul următor. Montarea reacției de inhibare a coaglutinării (RICOA) necesită următoarele componente:

1. Antigen rotaviral SA-11.
2. Ser sanguin sau produs ascitic imun antirotaviral.
3. Mediu 199 sau soluție-tampon de NaCl (pH 7,2-7,4).
4. Ser sanguin uman care nu conține anticorpi anti-Rota.
5. Ser sanguin de la bolnav.
6. Antigenul-test "Rotatest".

Montarea RICOA se efectuează în trei etape.

Etapa 1. Titrarea antigenului rotaviral SA-11 și determinarea dozei de lucru.

În godeurile plășetei de polisterol se efectuează diluția antigenului rotaviral SA-11 în volumul de 0,1 ml, începând cu 1:2 până la 1:256. Diluțiile se efectuează în mediul 199 sau în soluție-tampon de NaCl (pH 7,2-7,4). În 8 godeuri se aplică câte 0,1 ml de mediu sau soluție-tampon de NaCl, apoi în primul godeu se adaugă câte 0,1 ml de antigen. Amestecul se agită (se pipetează), apoi în volum de 0,1 ml se transferă în al doilea godeu. După agitare din al doilea godeu se transferă 0,1 ml de amestec în al treilea și așa mai departe. Din al 8-lea godeu 0,1 ml de amestec se aruncă. De fiecare dată se utilizează pipete noi. Pe lame de sticlă degresate se aplică câte 20 μ l de fiecare diluție a antigenului, adăugând la fiecare câte 20 μ l de "Rotatest". În calitate de martori la extremitățile lamei se aplică

MD 1433 F1 2000.03.31

4

câte 20 μ l de mediu 199 sau soluție-tampon de NaCl (pH 7,2-7,4). La soluția situată la una din extremitățile lamei se adaugă 20 μ l de antigen rotaviral în diluția de 1:2 (martor 1), iar la cea de-a doua extremitate a lamei - 20 μ l de "Rotatest" (martor 2).

Componentele se amestecă ușor, apoi se expun pentru 10-15 min la temperatura de 22-25°C, periodic clătind lamele. Aprecierea rezultatelor reacțiilor se efectuează după scara de patru plusuri (+):

(++++) - coaglutinare totală, reacție pozitivă marcantă;

(+++-) - coaglutinare pronunțată, reacție pozitivă;

(++--) - coaglutinare parțială, reacție slab pozitivă;

(+---) - coaglutinare slab vizibilă, reacție slab pozitivă;

(----) - coaglutinare absentă, reacție negativă.

În probele martor 1 și 2 se apreciază absența coaglutinării. Cea mai mare diluție a antigenului în care are loc coaglutinarea de 2+ se apreciază ca fiind titrul antigenului. În RICOA se utilizează patru unități de aglutinare (UA). De ex.: dacă titrul antigenului este de 1:28 (1 UA) în lucru se va folosi diluția 1:32 (4 UA).

Etapa 2. Se efectuează diluarea serului sanguin de la bolnav. În 9 godeuri se aplică câte 0,1 ml soluție-tampon de NaCl (pH 7,2-7,4) sau mediu 199. În primul godeu se adaugă 0,1 ml de ser de la bolnav, se pipetează de 2-3 ori, apoi 0,1 ml amestec se transferă în al doilea godeu și așa mai departe. Din al 9-lea godeu 0,1 ml de amestec se aruncă. La fiecare diluție a serului în volum de 0,1 ml se adaugă câte 0,1 ml antigen în doza de lucru (4 UA). Martori: într-un godeu (martor 1) se aplică 0,1 de ml soluție-tampon de NaCl sau mediu 199, în al doilea godeu (martor 2) - 0,1 ml de ser sanguin sau produs ascitic imun antirotaviral în diluție de 1:8 și în al treilea godeu (martor 3) se aplică câte 0,1 ml ser sanguin uman normal în diluție de 1:2. În toate trei godeuri se adaugă câte 0,1 ml de antigen rotaviral în doza de lucru de 4 UA. Amestecurile se agită ușor și se expun pentru 10-15 min la temperatura de 22-25°C.

Etapa 3. Pe lame degresate se aplică câte 20 μ l de amestec, ce conține serul bolnavului în diluție și antigenul rotaviral SA-11 în doza de lucru de 4 UA, și câte 20 μ l de martori 1, 2 și 3, la care se adaugă câte 20 μ l de "Rotatest". Componentele se amestecă ușor și se expun 10-15 min la temperatura de 22-25°C, periodic clătind lamele. Aprecierea rezultatelor reacției se efectuează după scara de patru + descrisă mai sus.

În martorii 1 și 3 va avea loc o coaglutinare de 3-4 + (reacție pozitivă), pe când în martorul 2 coaglutinarea va lipsi (reacție negativă). Diluția maximă a serului bolnavului în care coaglutinarea este absentă (2+), se apreciază ca fiind valoarea titrului serului. De ex.: dacă în serul diluat până la 1:64 nu se observă o coaglutinare de 2+, atunci în probă (serul examinat) se conțin anticorpi față de rotavirusuri în titrul de 1:64.

Tabelul 1

Studiul comparativ al evaluării anticorpilor antirotavirali la copiii cu diaree acută de etiologie rotavirală prin metodele AIE, RICOA și RIIHA

Metoda utilizată	Seruri pereche	Numărul serurilor pereche testate	Inclusiv în diluții									Titru geo-metric exprimat în log	Titru geo-metric mediu
			1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512		
AIE	I	64	0	5	13	14	11	18	1	1	1	4,6	1:24,2
	II		0	1	2	1	1	4	9	8	38	8,0	1:256
RICOA	I	56	0	3	12	14	8	16	2	1	0	4,6	1:24,2
	II		0	0	1	1	2	3	12	16	21	7,8	1:223
RIIHA	I	32	0	1	8	7	6	9	1	0	0	4,5	1:22,6
	II		0	0	1	1	2	9	8	8	3	6,8	1:112

Tabelul 2

Eficacitatea metodei elaborate pentru depistarea și evaluarea anticorpilor anti-Rota la bolnavii cu diaree acută, etiologie cauzată de rotavirusuri

Metoda aplicată	Rezultatul investigațiilor	Analiza imunoenzimatică (AIE) "Acva-Past"		Sensibilitatea, %	Specificitatea, %	Coincidența, %
		Pozitiv	Negativ			
Reacția de inhibare a coaglutinării (RICOA), realizată după metoda propusă	Pozitiv	56	29	91,8 $\pm$ 1,7	84,7 $\pm$ 2,3	87,4 $\pm$ 2,2
	Negativ	5	160			
Reacția indirectă de inhibare a hemaglutinării (RIIHA)	Pozitiv	32	56	72,7 $\pm$ 2,8	72,8 $\pm$ 2,8	72,8 $\pm$ 2,8
	Negativ	12	150			

MD 1433 F1 2000.03.31

5

Remarcă: Sensibilitatea = (RICOA și AIE pozitiv/AIE pozitiv) x 100%;
 Specificitatea = (RICOA și AIE negativ/AIE negativ) x 100%;
 Coincidența = (RICOA și AIE pozitiv) + (RICOA și AIE negativ)/(AIE pozitiv + AIE negativ) x 100%.

5

Exemplul 1. Titrarea antigenului rotaviral SA-11

Tabelul 3

Diluțiile antigenului	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
Antigen rotaviral SA-11	0,1 ml							
Etapa 1 Soluție-tampon de NaCl	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Rezultatele RICOA*	4+	4+	4+	4+	4+	4+	2+	-

Remarcă: *gradul de coaglutinare după scara de 4+

- absența coaglutinării.

10

Etapa 1. În 8 godeuri se aplică câte 0,1 ml de soluție fiziologică. În primul godeu se adaugă câte 0,1 ml antigen rotaviral SA-11. Amestecul se pipetează de 2-3 ori și câte 0,1 ml se transferă în al doilea godeu. Din al doilea după pipetare (2-3) câte 0,1 ml se transferă în al treilea și așa mai departe. Din al 8-lea godeu după pipetare 0,1 ml de amestec se aruncă.

15

Etapa 2. Pe lame degresate se aplică câte 20 μ l de fiecare diluție a antigenului rotaviral SA-11, la care se adaugă 20 μ l de "Rotatest".

Martorii: pe lamă se aplică 20 μ l de antigen în diluție 1:2, la care se adaugă 20 μ l de soluție fiziologică (martor 1); pe altă lamă se aplică 20 μ l de "Rotatest", la care se adaugă 20 μ l de soluție-tampon de NaCl (pH 7,2-7,4) (martor 2).

20

Componentele se amestecă ușor, apoi se expun pentru 10-15 min la temperatura de 22-25°C, periodic clătind lamele. În probele martor se determină absența coaglutinării.

Aprecieria rezultatelor reacției se efectuează după scara de patru + descrisă mai sus. Diluția maximă a antigenului în care are loc coaglutinarea de 2+ se apreciază ca fiind valoarea titrului antigenului.

25

Exemplul descris demonstrează că coaglutinarea la scara de 2+ a avut loc la diluția de 1:128, considerată ca titrul antigenului; în RICOA sunt utilizate 4 UA; astfel, valoarea titrului antigenului 1:128 se împarte la 4, deci în RICOA se va utiliza antigenul rotaviral în diluția de 1:32 (4 UA).

Exemplul 2. Determinarea și evaluarea titrului de anticorpi anti-Rota în reacția de inhibare a coaglutinării (RICOA)

30

Tabelul 4

Diluțiile antigenului	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
Serul bolnavului	0,1 ml								
Soluție-tampon de NaCl (pH 7,2-7,4)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Antigenul rotaviral în doza de lucru (4 UA)	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Rezultatul RICOA	-	-	-	-	-	-	-	3+	4+

Ca martori se folosesc:

Martor 1: 0,1 ml de soluție fiziologică și 0,1 ml de antigen rotaviral în doza de lucru de 4 UA.

35

Martor 2: 0,1 ml de ser sau produs ascitic imun antirotaviral SA-11 în diluție 1:8 și antigen rotaviral în doza de lucru de 4 UA.

Martor 3: 0,1 ml de ser uman normal în diluție de 1:2 și antigen rotaviral în doza de lucru de 4 UA.

Amestecurile se agită și se expun pentru 10-15 min la temperatura de 22-25°C. Peste 10-15 min pe lame degresate se aplică câte 20 μ l de amestec, ce conține ser diluat și antigen rotaviral în doza de lucru, și martorii 1, 2 și 3 în volum de 20 μ l. Ulterior la fiecare din amestecurile nominalizate se adaugă câte 20 μ l de "Rotatest". Componentele se amestecă ușor, apoi se expun pentru 5-10 min la temperatura de 22-25°C, periodic clătind lamele. Aprecieria rezultatelor reacției se efectuează după scara de 4+ descrisă mai sus. Reacția este supusă scontării numai în cazul în care martorii 1 și 3 sunt pozitivi (are loc coaglutinarea la scara de 3-4+), iar martorul 2 este negativ (absența coaglutinării). Diluția maximă a serului de la bolnav în care coaglutinarea este absentă se apreciază ca fiind valoarea titrului serului. În exemplul prezentat absența coaglutinării în diluția de 1:128 denotă că în probă (serul examinat) se conțin anticorpi antirotaviral în titrul de 1:128.

45

MD 1433 F1 2000.03.31

6

Astfel, rezultatele menționate mai sus demonstrează că metoda propusă sporește semnificativ sensibilitatea și specificitatea evaluării anticorpilor antirotavirali în serurile bolnavilor.

5

(57) Revendicare:

Metodă de evaluare a anticorpilor antirotavirali, ce include determinarea anticorpilor cu ajutorul unui antigen-test prin reacția de inhibare a aglutinării și aprecierea titrului anticorpilor, **caracterizată prin aceea că** se utilizează un antigen-test stafilococic, ce conține proteina A, sensibilizat cu imunoglobuline specifice.

10

(56) Referințe bibliografice:

1. Spănu C., Grușco T., Scoferța P. et al. Infecția rotavirică - etiologia, epidemiologia, clinica și diagnosticul de laborator. Instrucții metodice. Chișinău, 1992, p. 20

**Șef Direcție
Invenții:**

JOVMIR Tudor

Examinator:

CEBAN Aurelia

Redactor:

ANDRIUȚĂ Victoria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 99-0120	(85) Data fazei naționale PCT:
(22) Data depozit: 01.04.1999	(86) Cerere internațională PCT:
(30) Priorități recunoscute :	
(31) nr.: 32) data : 33) țara: :	
(54) Titlul : Metodă de evaluare a anticorpilor antirotavirali	
Termeni caracteristici în limba română: diagnostic, virusologie, Rota-virus, anticorpi, reacția de coaglutinare	
II. D O C U M E N T A R E ÎN LITERATURA DE BREVETE DE INVENȚII	
Indicii clasificărilor de brevete :	
(51) Int. Cl. : A 61 K 51/10	
MD Perioada 1994-1998	Brevete: MD 752 C2 Cereri publicate: nu au fost selectate Cereri nepublicate: nu au fost selectate Certificate MU:
BEA Perioada: 1996-1998	Brevete: nu au fost selectate Cereri: nu au fost selectate Rapoarte de documentare
Data 15.12.1999	Examinator , Ciobanu Aurelia