

SEROPREVALENȚA ANTI-HVE LA ANGAJAȚII ÎNTRINDERILOR DE PROCESARE A CĂRNII

Iurie PÎNZARU

Centrul Național de Sănătate Publică

e-mail: pinzaruurie6@gmail.com; iurie.pinzaru@cnspl.md

tel. de serviciu 0 22 574 501, mobil 0 694 55 55 3

Rezumat.

Prezentul articol este dedicat estimării nivelului seroprevalenței anticorpilor anti-HVE la lucrătorii întreprinderilor de procesare a cărnii. În premieră pentru Republica Moldova a fost efectuată investigarea prin metoda imunoenzimatică a 270 seruri de la lucrătorii întreprinderilor de procesare a cărnii. Rezultatele obținute demonstrează o seroprevalență a markerului anti-HVE la acest contingent de 16,3%. Din 44 persoane pozitive de gen feminin au fost 56,8%, respectiv de gen masculin 43,2%. 6 seruri cu rezultat echivoc (2,2%) au fost prelucrate cu suspensie de Kaolin printr-o tehnologie originală prin care au fost eliminați inhibitorii nespecifici, cu testare ulterioară prin ELISA, rezultatul final fiind negativ. Rezultatele obținute demonstrează în Republica Moldova o situație similară cu cea din alte țări (Portugalia) și indică asupra necesității studierii și investigării în continuare la markerii hepatitei virale E a populației generale și grupurilor cu risc sporit de infectare cu scopul de a elabora măsuri eficiente de control și răspuns la această infecție.

Cuvinte-cheie: seroprevalența anti-HVE, întreprinderi de procesare a cărnii.

Summary. Anti-HVE seroprevalence at employees of meat processing companies.

This article is devoted to assessing the level of infection of anti-HVE IgG in meat processing enterprises. For the first time in the Republic of Moldova, an immunoenzymatic method was used to study 270 human sera from meat processing workers. The results demonstrate a seroprevalence of the anti-HVE IgG marker in this contingent in 16,3% of cases. Of the 44 positive persons, 56,8% of women and 43,2% of men were identified. 6 doubtful human sera (2,2%) were treated with a suspension of Kaolin by the original technology to remove non-specific inhibitors with repeated researching in the ELISA reaction, which subsequently gave negative results. The results obtained demonstrate the conformity of the situation in the Republic of Moldova with other countries (Portugal) and show the need for further research on the markers of viral hepatitis E among the population and in high-risk groups to develop effective measures to control and respond to this infection.

Key words: anti-HVE seroprevalence, meat processing enterprises.

Резюме. Анти-ХВЕ серопревалентность у сотрудников мясоперерабатывающих предприятий.

Данная статья посвящена оценке уровня инфицирования anti-HVE IgG у работников мясоперерабатывающих предприятий. Впервые в Республике Молдова было проведено исследование иммуноферментным методом 270 сывороток от работников мясоперерабатывающих предприятий. Полученные результаты свидетельствуют о серопревалентности маркера anti-HVE IgG у этого контингента в 16,3% случаев. Из 44 положительных лиц

vyявлено 56,8% женщин и 43,2% мужчин. 6 сомнительных сывороток (2,2%) были обработаны суспензией Каолина по оригинальной технологии для снятия неспецифических ингибиторов с повторным исследованием в реакции ELISA, которые в последующем дали отрицательный результат. Полученные результаты демонстрируют соответствие ситуации в Республике Молдова с другими странами (Португалия) и показывают необходимость дальнейшего исследования на маркёры вирусного гепатита E среди населения и в группах повышенного риска инфицирования с целью разработки эффективных мер по контролю и ответу за этой инфекцией.

Ключевые слова: анти-ХВЕ серопревалентность, мясоперерабатывающие предприятия.

Introducere. Hepatita virală Este o maladie infecțioasă acută și cronică, antroponoză și zooantroponoză cu mecanism de transmitere digestiv, care se transmite de la om la om și de la animale la om, cu evoluție autolimitată, manifestându-se clinic asemănător hepatitei virale A. Este considerată o infecție recurentă în țările în curs de dezvoltare [1,4]. În cazuri mai puțin frecvente, izolate, aceasta a fost raportată și în țările dezvoltate. Identificată în 1990, Hepatita virală E (HVE) este etiologic cauzată de un virus cu ARN monocatenar neînvelit, unde infecția poate duce la o boală hepatică acută (sau subclinică), cum ar fi cea asociată infecției cu hepatită A. Rata mortalității este, în general, scăzută - o medie de 0,5-3% pentru majoritatea pacienților, în timp ce femeile însărcinate dețin o medie ridicată de aproximativ 15-25%. În 1995, a fost înaintată o teorie conform căreia HVE se transmite oamenilor de la animale (zoonoză). Nu după mult timp, în 1997 și 2001, respectiv, HVE a fost identificată ca transmisă de la porcine și de la păsări. După această perioadă, transmiterea infecției cu HVE a fost asociată cu mai multe animale, de exemplu, bovine, caprine, rozătoare, câini, cerbi și găini. Infecții cu virusul hepatitei virale E au fost identificate atât în țările în curs de dezvoltare, cât și în cele dezvoltate (inclusiv anti-HVE) [1]. Virusul hepatitei virale E a fost identificat electromicroscopic în 1983, iar în 1990 a fost clonat genotipul viral [2,5], ceea ce a permis încadrarea VHE în familia *Calciviridae*, fiind mult asemănător todavirusurilor. Virusul hepatic E, identificat în 1997 la porcine, este în relație antigenică cu VHE uman [5].

A fost raportată, de asemenea, o legătură directă cu hepatita virală E acută la oameni prin consumul de carne de cerb. De asemenea, secvențele genomului HVE au fost identificate în ficat de porc comercializat în supermarketurile din Japonia [1].

Nu este excepție nici Republica Moldova, unde până în prezent nu au fost efectuate studii de performanță privind incidența hepatitei virale E, inclusiv în grupurile cu risc sporit de infectare printre care se atestă și angajații întreprinderilor de procesare a cărnii. Având ca temei această paradigmă în premieră în Republica Moldova în anul 2017 au fost organizate cercetări de laborator screening la anticorpii anti-HVE IgG la angajații a trei întreprinderi de procesare

a cărnii în scopul determinării posibilului risc de infectare prin intermediul cărnii preponderent de porc supuse procesării.

Evidențierea markerului anti-HVE IgG în ser demonstrează o infectare (un contact) cu virusul HVE suportată în trecut. Medicina clinică modernă devine vădită prin utilizarea extensivă a tehnologiilor diagnosticului de laborator de înaltă performanță, care sunt vertiginos implementate în practica medicală [2,3,4,5].

Material și metode. De la 270 angajați ai întreprinderilor de procesare a cărnii au fost recoltate câte 4 ml de sânge în temeiul acordului informat a fiecărei persoane, aprobat de Comitetul de Etică a Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” nr. 86 din 21.06.2017 și investigat prin testele ELISA (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay), cele mai frecvent folosite teste întru evidențierea marcherilor virusului HVE. Pentru investigații au fost utilizate kituri de generația a III-ea pentru determinarea calitativă a anticorpilor IgG către virusul hepatitei virale E în ser uman pentru diagnostic *in vitro*. Prezumtiv serurile au fost separate de celulele sanguine pentru a evita hemoliză.

Principiul metodei (Metoda ELISA indirectă: placă acoperită cu antigen):

Kitul de reactivi folosește metoda imunoenzimatică (ELISA) de generația a treia pentru detectarea calitativă a anticorpilor de clasă IgG către virusul hepatitei E (anti-HVE) în ser sau plasmă umană. Plăcile de microtitrare din polistiren sunt pre-acoperite cu antigeni recombinanți, imunoreactivi, care codifică determinanții conservativi și imunodominanți ai tuturor celor patru subtipurii ale HVE, în procedura de incubare în două etape. Pe parcursul primei etape de incubare, anticorpii anti-HVE specifici, dacă sunt prezenți vor fi legați de antigene HVE pre-acoperite cu fază solidă. Godeurile sunt spălate pentru a elimina componentele nespecifice ale serului. În timpul celei de-a doua etape de incubare, anticorpi legați de orice complex de antigen-anticorp (IgG) format anterior vor fi detectați prin adăugarea anticorpilor policlonal specifici anti hlgH conjugați cu peroxidază de hrean (HRP-conjugat), iar conjugatul HRP nelegat este apoi îndepărtat prin spălare. Enzima captată pe faza solidă, care acționează asupra amestecului substrat/ crom-

gen, generează un semnal optic care este proporțional cu cantitatea de IgG anti-HVE prezentă în eșantion. O valoare limită permite ca densitatea optică să fie interpretată în rezultatele negative și pozitive anti-HVE IgG și validată în conformitate cu cerințele instrucțiunii la Kitul HVE IgG "Third generation Enzyme Immunoassay for the determination of IgG antibodies to Hepatitis E Virus in human serum and plasma", for "in vitro" diagnostic use only (DIA.PRO, Diagnostic Bioprobes SRL, Italia).

Materialele expuse în prezentul articol au fost consultate cu dr. hab. în medicină, profesorul universitar Constantin Spînu, specialist în virusologia medicală.

Rezultatele obținute. Probele de ser nedeterminate (echivoce) întru evitarea influenței inhibitorilor nespecifici, au fost prelucrate cu suspensie de Kaolină după o tehnologie originală, ulterior supuse investigațiilor repetate în reacția ELISA. *Principiul metodei* propuse constă în absorbția inhibitorilor nespecifici prin utilizarea soluției de Kaolină ($Al_2O_3 \cdot 2SiO_2 \cdot 2H_2O$), care conține lut alb, oxid de siliciu, aluminiu și apă. În procesul de prelucrare a serurilor se folosește soluția de Kaolină de 25% (0,25 gr Kaolină+1000 μ l soluție fiziologică (1:5). Concomitent, se dizolvă 100 μ l ser cercetat în 400 μ l soluție fiziologică (1:5). ulterior în suspensia de Kaolină se adaugă serul diluat (1:10) și se menține timp de o oră la temperatura +18+25° C, periodic agitându-se, după care se centrifughează la 1000 rpm, timp de 10 minute.

După centrifugare se colectează serul în eprubete și se păstrează la temperatura + 4°C. În continuare, serul obținut se testează la prezența anti-HVE IgG prin metoda ELISA.

Pentru argumentarea celor expuse prezentăm datele obținute (tabelul 1) privind investigarea a 270 seruri sanguine, recoltate de la angajații ÎPC prin metoda prototip (ELISA) și cea propusă întru identificarea markerului anti-HEV IgG.

Rezultatele obținute demonstrează, că investigarea serurilor în ELISA prin metoda-prototip a evidențiat 44 persoane cu markerul anti-HVE IgG, la 6 persoane rezultatele au fost nedeterminate/neconcludente (posibil din cauza inhibitorilor nespecifici

prezenți în ser), iar pentru 220 persoane rezultatele au fost negative. Investigarea repetată a celor 6 seruri prezumtiv tratate ca indeterminate după metoda propusă în ELISA, care a inclus prelucrarea prezumptivă a lor cu suspensie de Kaolină a demonstrat foarte clar apartenența lor la "rezultatele negative". În ansamblu prin metoda propusă au fost identificate 44 (16,3%) persoane cu markerul anti-HVE IgG și 226 (83,7%) negative la prezența markerului nominalizat.

Rezultate suspecte nu au fost identificate. Concomitent, metoda prototip a demonstrat că, 44 (16,3%) persoane pozitive la markerul anti-HVE IgG, 6 (2,2%) cu rezultate suspecte (echivoce) și 220 (81,5%) cu rezultate negative (tabelul 1). Așadar, metoda propusă demonstrează o eficacitate sporită de identificare și evaluare a anticorpilor anti-HVE IgG în serul pacienților investigați prin ELISA cu absența rezultatelor suspecte (echivoce) și creșterea specificității [depozit AGEPI nr. s 2017 0125].

Cele 6 persoane cu rezultate neconcludente au fost înregistrate la 4 femei ori 66,7% și 2 cazuri (33.3%) s-au înregistrat în rândurile angajaților de gen masculin.

Din numărul total de 44 persoane cu rezultate pozitive 25 ori 56,8% s-au înregistrat la angajatele de sex feminin și 19 ori 43,2% la bărbați.

Repartiția pe grupurile de vârstă demonstrează, că cele mai multe cazuri s-au înregistrat în grupa 30-39 ani cu 9 cazuri (36,0 %) la femei și 8 (42,1%) la bărbați, urmată de angajații din grupa 40-49 ani cu 6 cazuri printre bărbați ori 31,5% și 9 (36,0%) în rândul angajatelor de gen feminin.

Cele mai multe cazuri de persoane cu anti-IgG HVE s-au înregistrat la ÎPC nr. 2, unde a fost identificat markerul nominalizat la 21 angajați inclusiv 11 femei și 10 bărbați, la ÎPC nr. 1 – la 14 persoane dintre care 11 femei și 3 bărbați. La ÎPC nr. 3 – 9 angajați inclusiv 3 femei și 6 bărbați la care s-a identificat markerul anti-HVE IgG.

Ancheta epidemiologică și chestionarea celor 44 angajați în contextul contactului la serviciu și la domiciliu cu animalele domestice (porcine, bovine, păsări etc.) ori materie primă de origine animalieră de la întreprindere a stabilit, că doar 5 persoane (2 angajați

Tabelul 1.

Rezultatele identificării și evaluării prin ELISA a markerului anti-HVE IgG în serul sanguin a angajaților de la întreprindere de procesare a cărnii prin metoda-prototip și cea propusă

Contingentul examinat cu risc sporit de infectare	Nr. de probe investigate	Identificarea markerului anti-HEV IgG											
		Metoda ELISA						Metoda propusă					
		Pozitive		Suspect (echivoc)		Negative		Pozitive		Suspect (echivoc)		Negative	
		Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%	Abs	%
Lucrătorii ÎPC	270	44	16,3±2,2	6	2,2±0,9	220	81,5±2,4	44	16,3±2,2	0	0	226	83,7±2,3

Tabelul 2.

Repartiția angajaților cu rezultat pozitiv la anti-IgG HVE de la ÎPC evaluate după sex și grupurile de vârstă

ÎPC	După sex				Grupa de vârstă (ani)											
	B		F		< 20		20-29		30-39		40-49		50-59		> 60	
	abs	%	abs	%	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F
Nr.1	3	15,7	11/1	44,0	-	-	-	2	1	5	2	3/1	-	-	-	1
Nr.2	10/2	5,2	11/2	44,0	-	-	1	-	6/2	4	2	5/1	-	2	1	-/1
Nr.3	6	3,1	3/1	12,0	-	-	1	-	1	-	2	1/1	-	1	2	1
Total	19/2	-	25/4	-	-	-	2	2	8/2	9	6	9/3	-	3	3	2/1

Remarcă: Numărătorul indică la rezultatele negative, iar numitorul la cele pozitive.

de gen masculi și 1 de sex feminin de la ÎPC nr.3 și respectiv 2 bărbați de la ÎPC nr.2) din cele 44 persoane au neglijat contactul direct la serviciu cu materia primă ori produsele finite pe motiv că prestează servicii de deservire a echipamentului, utilajului frigorific și tehnologic, conducător auto și dericitoare în secția de producere. Totodată, cele 5 persoane au confirmat în cadrul anchetei epidemiologice că peste 10-13 ani la domiciliu se ocupă de creșterea și îngrijirea porcinelor, bovinelor, caprinelor și găinilor.

Ceilalți 39 angajați în virtutea atribuțiilor de serviciu au contact direct cu materia primă de origine animalieră în secțiile de tranșare, deflaxare, dezosare, semifabricate, ori după cum s-a stabilit la ÎPC nr. 2, că un angajat, poate fi implicat în mai multe operațiuni tehnologice concomitente cum ar fi: formatarea mezelurilor, umplerea membranelor cu carne tocată și revenirea la procedura de tranșare a cărnii de porcină/vită, de flaxare etc.

Rezultate similare au fost obținute și de alți savanți inclusiv din Portugalia, Suedia etc. expuse în publicațiile menționate [2,6,7,8].

Concluzii

1. În premieră în Republica Moldova a fost identificată seroprevalența markerului anti-HVE IgG în serul angajaților de la întreprinderile de procesare a cărnii, ceea ce demonstrează existența unui risc sporit de infectare cu virusul hepatitei virale E în rândul acestui grup de populație.

2. De menționat, că în acest studiu de comun cu metoda-prototip a fost utilizată o metodă originală de identificare a markerilor HVE în serul sangvin, fapt ce va conduce la sporirea sensibilității și specificității și în continuare a eficacității testului [depozit AGEPI nr. s 2017 0125].

3. Aceste circumstanțe demonstrează necesitatea continuării studiului cu identificarea și evaluarea prevalenței markerilor serologici ai hepatitei virale E în populația generală și în grupele cu risc sporit de infectare printre care și angajații întreprinderilor de

procesare a cărnii întru identificarea factorilor determinanți și perfectarea măsurilor de control și răspuns.

4. În contextul publicațiilor de ultima oră [5,6,7,8] privind identificarea markerilor virusului hepatitei E la donatorii de sânge un deosebit interes ar prezenta evaluarea riscului asociat transmiterii prin transfuzii de sânge și a produselor obținute a acestei infecții.

5. Soluționarea acestor probleme ar fortifica în viitor unele poziții din Programul Național privind securitatea transfuzională și autoasigurarea țării cu produse sangvine, 2017-2021 întru reducerea în continuare a morbidității prin hepatite virale.

Bibliografie

1. <http://www.rapidtest.com/index.php?i=HEV-IgG-ELISA-kit&id=156&cat=16>
2. Joao R. Mesquita, Mette Myrmel, Kathrine Steen-Johansen, Joakim Verbo and Maria S. J. Nascimento. *A Public Health initiative on hepatitis E virus epidemiology, safety and control in Portugal – study protocol*. BMC Infectious Diseases, 2016, 6, 17, 5 p.
3. HEV IgG Third generation Enzyme immunoassay for the determination of IgG antibodies to hepatitis E virus in human serum and plasma (DIA.PRO Bioprobes SRL Via G. Carduci n° 27,20099 Sesto San Giovanni (Milano)-Italy.
4. Pânteu V. *Hepatitele virale acute și cronice (actualități)*. Tipografia Sirius, Chișinău, 2009, 224 p.
5. Pânteu V. *Hepatitele virale acute și cronice (etiologie, epidemiologie, patogenie, tabloul clinic, tratament și profilaxie)*. Tipografia "Sirius", Chișinău, 2014, 260 p.
6. Baylis S.A., Gartner T., Nick S., Ovemyr I., Blümel I. *Occurrence of hepatitis E virus RNA in plasma donations from Sweden, Germany and the United States*. Vox Sang, 2012, 103, pp. 89-90.
7. Hewitt P.E., Ijaz S., Brailsford S.R., Brett R., Dicks S., Haywood B. et al. *Hepatitis E virus in blood components: a prevalence and transmission study in Southeast England*. Lancet, 2014, 384, pp. 1766-73.
8. Breda F., Cochicho I., Mesquita I.R., Bento A., Oliveira R.P., Louro E. et al. *First report of chronic hepatitis E in renal transplant recipients in Portugal*. I. Inject Dev Ctries., 2014, 8, pp. 1639-42.