



УКРАЇНА

(19) UA (11) 15568 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/53МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ГАРЯЧКИ ЗАХІДНОГО НІЛУ

1

2

(21) u200511873

(22) 12.12.2005

(24) 17.07.2006

(46) 17.07.2006, Бюл. № 7, 2006 р.

(72) Лозинський Ігор Миколайович, Білецька Галина Вацлавівна, Козловський Михайло Михайлович, Семонишин Оксана Богданівна, Друль Оксана Стефанівна, Федорук Володимир Ілліч, Шоломей Михайло Володимирович

(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИ-

ТУТ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ГІГІЄНИ МОЗ УКРАЇНИ,
Лозинський Ігор Миколайович(57) Спосіб діагностики гарячки Західного Нілу, що включає виявлення антитіл в реакції зв'язування комплекменту, який **відрізняється** тим, що як діагностиком використовують антиген, виготовлений методом сахарозо-ацетонової екстракції із вірусу Західного Нілу штаму № 4270, отриманого у вигляді мозкової суспензії лабораторних мишей.

Корисна модель відноситься до галузі медицини і призначений для проведення лабораторної діагностики гарячки Західного Нілу.

На сьогодні відомі кілька штамів вірусу Західного Нілу, які використовуються для виготовлення діагностичних та лікувально-профілактичних препаратів, серед яких найбільш широко вживаним для цих цілей в Україні є еталонний штам Eg-101, ізолюваний в Єгипті [1].

Виявлено ряд штамів вірусу Західного Нілу, які циркулюють в Україні і періодично спричиняють спорадичні захворювання серед населення [1, 2]. Вагому роль в етіології цієї інфекції відіграє штам №4270, ізолюваний з мозку і внутрішніх органів чибіса, відловленого у Черкаській області в 1985 році [2]. Даний штам депонований за №70 від 01.01.2002 року в колекції арбовірусів Львівського НДІ епідеміології та гігієни, яка згідно Постанови Кабінету Міністрів України №1709 від 19.12.2001 р, віднесена до наукових об'єктів, що становлять національне надбання України [3].

Сьогодні для лабораторної діагностики гарячки Західного Нілу використовують діагностичні препарати, виготовлені із еталонного штаму Eg-101. Однак цей штам, володіючи певною антигенною та біологічною активністю, необхідною для штаму-продуцента діагностичних препаратів, проявляє значну відмінність за фізико-хімічними та біологічними властивостями від циркулюючих в Україні збудників гарячки Західного Нілу [4]. Недоліком штаму Eg-101 є його нижча авідність та специфічність у порівнянні із місцевими штамми, що

негативно відображається на антигенній активності та результативності серологічних реакцій, які застосовуються у лабораторній діагностиці даної інфекції. Промислове виготовлення специфічних вітчизняних діагностиків із місцевих штамів до цього часу не налагоджено.

Метою корисної моделі є розробка способу діагностики гарячки Західного Нілу із використанням діагностиком, приготованого із місцевого штаму збудника, що за своєю специфічністю та чутливістю переважав би результативність аналогічних методів із застосуванням препаратів, виготовлених із штаму Eg-101.

Вирішення цього завдання досягається шляхом виявлення антитіл в реакції зв'язування комплекменту (РЗК), у якій в якості діагностиком використовується антиген, приготований методом сахарозо-ацетонової екстракції із вірусу Західного Нілу штаму № 4270, отриманого у вигляді мозкової суспензії лабораторних мишей.

Пропонований спосіб діагностики передбачає пасажування вірусу, приготування антигену та постановку реакції зв'язування комплекменту, що здійснюються наступним чином.

Приклад пасажування штаму. Безпородних білих мишей вагою 6-8 грамів заражають у мозок по 0,03мл вірусною суспензією штаму N4270. При появі виражених паралічів на 4-5 добу мишей забивають за правилами евтаназії, добувають асептично мозок і готують 10% зависину мозкової тканини шляхом розтирання мозку у фарфоровій ступці із додаванням фізіологічного розчину.

(19) UA (11) 15568 (13) U

Отриману завісину мозкової тканини центрифугують при 1000-1500об/хв протягом 10хв. Рідину, що утворилась над осадом, використовують для зараження наступної партії мишей, інфікований мозок котрих використовується для приготування антигену.

Приклад приготування антигену методом сахарозо-ацетонової екстракції. Із отриманої інфікованої тканини мозку мишей на 8,5% охолоджену розчині сахарози готують 20% завісину, додаючи на 1 мозок 0,4мл 5% розчину сахарози. Тричі завісину обробляють охолодженням до -15°C хімічно чистим ацетоном: двічі із розрахунку 1 об'єм завісини на 20 об'ємів ацетону, а третій раз невелику, довільну кількість. Обробку ацетоном проводять шляхом додавання по краплях підготовленої мозкової суспензії в центрифужні стакани з охолодженим ацетоном при безперервному помішуванні скляною паличкою. Кожного разу після обробки ацетоном суміш центрифугують на холоді 10хв. при 1800об/хв і надосадкову рідину видаляють. Антиген міститься в осаді, котрий висушують під вакуумом до перетворення його в сухий порошок.

Утворений осад розчиняють боратним буферним розчином рН 9,0 до об'єму вихідної завісини мозку, ретельно розмішують скляною паличкою, залишають на 18-20 год. при +4°C для повної гідратації, після чого центрифугують на холоді (-4°C) 1 год. при 10000 об/хв. Антигеном є рідина, що утворилась над осадом. Для інактивації антиген обробляють бетапропіолактоном 1:1000 протягом 30хв при кімнатній температурі, перемішуючи завісину через 5-10хв. Дію бетапропіолактону нейтралізують 14% розчином гіпосульфиту натрію (на 10мл антигену додають 1,2мл 14% розчину гіпосульфиту) [5].

Отримані цим методом антигени штамів N4270 і Eg-101, після контролю на залишкову інфекційність і нешкідливість для білих безпородних мишей, використовували в РЗК для порівняльного титрування сироваток гарячкових хворих і рекон-

валесцентів. Постановку РЗК здійснювали загально прийнятим методом.

Як видно із даних титрування, при виявленні сероконверсій у хворих і перехворілих на гарячку Західного Нілу, сахарозо-ацетоновий антиген, приготований із штаму № 4270, виявився чутливішим і більш специфічним ніж антиген штаму Eg-101. Він виявляє у вищому відсотку число серопозитивних до вірусу гарячки Західного Нілу осіб (81,2% проти 69,2-72,8%) і у вищих титрах (1:56,7 проти 1:34,4 - 1:35,1) комплементзв'язуючі антитіла.

Таким чином, штам №4270 вірусу Західного Нілу, відповідаючи регламентованим параметрам відбору штамів-кандидатів для виробництва імунобіологічних препаратів, забезпечує вищий діагностичний ефект порівняно з аналогічним ефектом прототипного штаму.

Використання цього штаму для приготування сахарозо-ацетонового діагностикуму дозволяє підвищити антигенну і біологічну активність діагностикуму та підвищити достовірність діагностики захворювань гарячкою Західного Нілу в Україні.

Джерела інформації:

1. Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я. // Арбовирусы и арбовирусные инфекции. - М.: Медицина, - 1989. - 335 с.

2. Виноград И.А. Арбовирусы в Украинской ССР и их медико-биологическое значение: Дис. ... д-ра мед. наук. - Львов, 1983. - 505 с.

3. Пат. 7905 України, МПК C12N 7/00. Штам вірусу Західного Нілу (Virus Nili Occidentalis) №4270 для виготовлення специфічних імунобіологічних препаратів. / І.М. Лозинський, Г.В. Білецька, М.М. Козловський та ін. // Заявка №20041210204 від 13.12.2004. – Опуб. 15.07.2005. Бюл. №7.

4. Лозинський І.М., Виноград І.А. Арбовіруси та арбовірусні інфекції у лісостеповій зоні України // Мікробіол.журнал. - 1998. - т. 60, № 2. - С.49-60.

5. Арбовирусы. Сборник научных трудов. - Москва, 1986. - 180с.