



УКРАЇНА

(19) UA (11) 47938 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 39/205МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ МОЗКОВОЇ СУСПЕНЗІЇ ВІРУСУ СКАЗУ

1

(21) u200910290

(22) 09.10.2009

(24) 25.02.2010

(46) 25.02.2010, Бюл.№ 4, 2010 р.

(72) НЕДОСЄКОВ ВІТАЛІЙ ВОЛОДИМИРОВИЧ,
ГРИШОК ЛЮДМИЛА ПАВЛІВНА, ПОЛУПАН ІВАН
МИКОЛАЙОВИЧ, ІВАНОВ МИКОЛА ЮРІЙОВИЧ,
ЩЕРБАНЬ ЮРІЙ ПЕТРОВИЧ(73) ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
УКРАЇНСЬКОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК(57) Спосіб отримання мозкової суспензії вірусу
сказу, що включає приготування вірусомісної су-

2

спензії головного мозку та видалення тканинного детриту, який **відрізняється** тим, що, з метою створення безпечних умов роботи, отримання мозкової суспензії з високим інфекційним титром та запобігання контамінації, отримання вірусомісної суспензії здійснюється шляхом триразового заморожування-відтаювання мозкової тканини із суспензійним середовищем у стерильному поліпропіленовому флаконі із енергійним струшуванням при відтаюванні до утворення гомогенної суспензії та видаленням тканинного детриту центрифугуванням.

Корисна модель відноситься до галузі ветеринарної вірусології, епізоотології та біотехнології, зокрема до способу отримання мозкової суспензії вірусу сказу і може бути використана в роботі діагностичних, науково-дослідних, науково-виробничих лабораторій ветеринарної медицини та біологічної промисловості.

Мозкову суспензію вірусу сказу широко застосовують в лабораторіях ветеринарної медицини для виділення вірусу на білих мишах при постановці діагнозу на сказ, в реакції нейтралізації при визначенні титру антирабійних антитіл в сироватках крові тощо. Крім того, мозковий тест-штам CVS вірусу сказу використовується при дослідженні імуногенної активності інактивованих антирабійних вакцин методом NIH.

Відомі способи отримання мозкової суспензії вірусу сказу, які передбачають для подрібнення шматочків мозку використовувати фарфорову ступку і пестик, за допомогою яких з додаванням стерильного річного піску проводять розтирання тканин до утворення гомогенної маси [1-2]. Крім того пропонується використовувати електричні подрібнювачі або гомогенізатори, а найновішим методом отримання суспензії мозку є використання ультразвукового дезінтегратора [3].

Недоліком цих способів є:

1. При використанні пестика і ступки - довготривалий контакт мозку з навколишнім середовищем, що створює можливість контамінації вірусомісного середовища сторонньою мікрофлорою.

2. Небезпека забруднення вірусом сказу боксового приміщення чи настільного боксу, що створює загрозу життю працівників лабораторії.

3. При використанні гомогенізатора чи іншого подрібнюючого обладнання викликають складнощі при їх стерилізації.

4. Використання ультразвукового дезінтегратора вимагає наявності даного приладу в лабораторії.

Метою даної корисної моделі є забезпечення безпечності роботи і отримання вільної від сторонньої мікрофлори мозкової суспензії вірусу сказу з високим інфекційним титром.

Мета досягається тим, що суспензію готують у стерильному герметично закритому поліпропіленовому флаконі шляхом триразового заморожування-відтаювання шматочків мозку з енергійним струшуванням при кожному відтаюванні та видаленням тканинного детриту центрифугуванням.

Приклад 1

Визначення титру інфекційної активності вірусу сказу у відділах мозку тварин

З метою встановлення рівня репродукції вірусу в мозку тварин використовували кролів, овець, лисиць і тхорзофреток, яких інфікували інтрацеребрально в дозі $3,0 \pm 0,3$ Іг МЛД₅₀/см³ фіксованим вірусом сказу (штами CVS, РБ-71). Після повного розвитку клінічних ознак сказу (в стадії агонії) тварин забивали, відбирали мозок і визначали титр інфекційної активності вірусу сказу в різних відділах головного мозку шляхом титрування на безпородних білих мишах. Результати дослідження представлені в табл. 1.

(13) U

(11) 47938

(19) UA

Таблиця 1

Рівень репродукції вірусу сказу в головному мозку тварин після інтрацеребрального зараження

n=3

Вид тварин	Відділи головного мозку	Титр вірусу сказу (lg МЛД ₅₀ /см ³)	
		РБ-71	CVS
Кролі	Кора головних півкуль	6,5±0,2	5,6±0,1
	Амонов ріг	6,7±0,2	5,5±0,3
	Мозочок	6,3±0,1	5,2±0,2
	Довгастий мозок	5,3±0,3	4,2±0,1
Вівці	Кора головних півкуль	6,8±0,2	5,3±0,2
	Амонов ріг	6,4±0,3	5,2±0,3
	Мозочок	5,8±0,2	5,0±0,3
	Довгастий мозок	5,1±0,1	3,9±0,2
Лисиці	Кора головних півкуль	4,8±0,3	4,5±0,2
	Амонов ріг	4,6±0,2	4,5±0,3
	Мозочок	4,1±0,1	3,7±0,2
	Довгастий мозок	3,8±0,3	3,4±0,2
Тхорзофретки	Кора головних півкуль	5,3±0,2	5,2±0,3
	Амонов ріг	5,2±0,1	4,8±0,2
	Мозочок	4,6±0,2	4,2±0,3
	Довгастий мозок	4,3±0,1	3,7±0,2

Дані, представлені в табл.1, показують, що загальною властивістю штамів вірусу сказу є їх максимальна репродукція в амоновому розі і корі великих півкуль головного мозку, менше - в мозочку і мінімальне - в довгастому мозку експериментально інфікованих тварин.

Таким чином, максимальний рівень накопичення вірусу сказу встановлено в корі великих півкуль і амоновому розі після інтрацеребрального зараження тварин вірусом сказу.

На основі отриманих результатів для отримання мозкової суспензії вірусу сказу, в якості вірусомісного субстрату, використовували вищевказані відділи головного мозку овець, інфікованих вірусом сказу.

Приклад 2

Визначення оптимального методу отримання вірусомісної суспензії

При розробці методу отримання препаратів мозкового вірусу сказу для отримання 20% суспензії мозку був визначений ряд таких параметрів

як час експозиції на ультразвуковому дезінтеграторі (від 10 секунд до 5 хвилин).

Окрім цього, власні дослідження та аналіз літературних даних показав, що вірус сказу є стійким до багаторазового заморожування-відтаювання і не знижує своєї інфекційної активності. Крім цього, при відтаюванні проходить руйнування клітин мозку кристалами води, що забезпечує максимальний вихід внутрішньоклітинного вірусу в суспензію. Усе це було використано при отриманні 20% мозкової суспензії.

Заключним етапом отримання мозкової суспензії вірусу сказу є його очистка від тканинного детриту. З цією метою використовували низькошвидкісне центрифугування при 2000об/хв протягом 15 хвилин, при 4°C.

В результаті проведених експериментів були визначені оптимальні умови отримання мозкового вірусу сказу. Результати дослідження представлені в табл.2.

Таблиця 2

Порівняльне визначення інфекційної активності 20% суспензії штаму вірусу сказу РБ-71, отриманої різними способами

n=3

№ п/п	Метод	Об'єм, см ³	Інфекційна активність 20% суспензії, lg МЛД ₅₀ /см ³	Інфекційна активність вірусу після видалення тканинного детриту, lg МЛД ₅₀ /см ³
1	2	3	4	5
1	Екстрагування ультразвуком (трикратна експозиція на ультразвуковому дезінтеграторі протягом 40 с при 23кГц)	500	6,5±0,2	6,6±0,1

Продовження таблиці 2

1	2	3	4	5
2	Екстрагування ультразвуком (двократна експозиція на ультразвуковому дезінтеграторі протягом 2 хвилин при 23кГц)	500	6,7±0,1	6,7±0,2
3	Трикратне заморожування-відтаювання	50	6,9±0,3	7,0±0,2
4	Трикратне заморожування-відтаювання	60	6,8±0,2	6,9±0,3
5	Трикратне заморожування-відтаювання	200	7,1±0,3	7,1±0,1
6	Трикратне заморожування-відтаювання	300	7,0±0,2	7,1±0,3

Представлені в табл.2 дані свідчать про те, що при використанні трикратного заморожування-відтаювання титр інфекційної активності вірусомісної суспензії був на 0,1-0,6 lg МЛД₅₀/см³ вище ніж при використанні з даною метою ультразвукового дезінтегратора.

Отже, використання розробленої схеми дає можливість отримати мозкову суспензію вірусу сказу з максимально високим титром інфекційної активності при усуненні забруднення лабораторного обладнання і інструментів, що мінімізує загрозу життю працівників.

Література:

1. Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики бешенства: ГОСТ 26075-84. - [Чинний від 09.01.1984]. - М.: Издательство стандартов. - 1984. - 10с.
2. Ветеринарна медицина. Методи діагностики сказу: ДСТУ 7053:2009. - [Чинний від 01.01.2010]. - 2009. - 13с.
3. Koprowski H. The mouse inoculation test. In: Meslin F., Kaplan M., Koprowski H. // WHO Laboratory Techniques in Rabies 4th ed. - Geneva. - 1996. - P.80-87.