



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 57446

(13) A

(51) 7 A61B10/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДВидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ РІВНЯ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ІМУНІТЕТУ ДО ГРИПУ

1

2

(21) 2002108182

(22) 15 10 2002

(24) 16 06 2003

(46) 16 06 2003, Бюл. № 6, 2003 р.

(72) Деміховська Олена Володимирівна, Спиридонова Тетяна Борисівна, Бадюгин Сергій Георгійович, Коробка Ніна Яківна, Юрченко Олександр Григорович

(73) ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ МЕДИЧНИЙ  
ІНСТИТУТ НАРОДНОЇ МЕДИЦИНИ

(57) Спосіб визначення рівня поствакцинального імунітету до грипу, що включає аналіз сироваткових антитіл в реакції гальмування гемаглютинації з вірусним діагностиком, який відрізняється тим, що як вірусний діагностик застосовують інактивовану вакцину з актуальними сезонними грипозними антигенами

Винахід відноситься до медицини, а саме, до досліджень або аналізу матеріалів особливими способами, переважно біологічних, здебільшого периферійної крові, та може бути використаним в епідеміологічних дослідженнях для визначення рівня поствакцинального імунітету або імуногенності вакцин.

Відомий спосіб визначення імунологічної ефективності вакцинації, у відповідності з яким кожну з парних сироваток, взятих до і після вакцинації, досліджують з декількома грипозними діагностиком, що містять цілі віруси з особливим антигенним складом [1,2]. Висновок про якість вакцинації, зокрема про імуногенні властивості вакцини, здійснюють на підставі оцінки відеотеку сероконверсії (підвищення титру антитіл до вірусу грипу в реакції гальмування гемаглютинації у дуплі з парних сироваток не менш ніж у 4 рази) та кратності підвищення середньогеометричного титру антитіл у популяції вакцинованих. Як свідчать результати цих досліджень кількість сероконверсій до трьох антигенів вірусів грипу серед вакцинованих трьохкомпонентною вакциною є практично однаковою [3].

До причини, що стримує досягнення очікуваного технічного результату, належить те, що виконання відомого способу не економічно, а інтерпретація його результатів є складною і замало ефективною для оцінки епідемічної ситуації. Це зумовлене тим, що відомий спосіб рішення задачі доцільно використовувати перш за все для серологічної діагностики грипу, коли треба визначити, який саме серотип вірусу грипу спричинив хворобу, але не для оцінки популяційного імунітету.

Рівень техніки, що досліджений заявником, інформує про відсутність у джерелах патентної та науково-технічної інформації відомостей про використання інших «об'єктів того ж призначення», що дозволяє вважати відоме рішення найбільш близьким.

В основу винаходу поставлена задача розробити такий спосіб визначення рівня поствакцинального імунітету до грипу, який шляхом оптимізації вибору вірусного діагностика для реакції гальмування гемаглютинації, підвищує ефективність і економічність виконання та спрощує інтерпретацію результатів при використанні.

Означений вище технічний результат досягається тим, що в способі визначення рівня поствакцинального імунітету до грипу, що містить аналіз сироваткових антитіл в реакції гальмування гемаглютинації, згідно з винаходом, як вірусний діагностик застосовують інактивовану грипозну вакцину з актуальними сезонними грипозними антигенами.

Використання інактивованої вакцини з актуальними сезонними грипозними антигенами є найбільш оптимальним у вирішенні задачі, бо значущим показником виступає титр антитіл до вакцини, як єдиного діагностика, для оцінки популяційного імунітету до грипу напередодні холодного сезону року, або у парних сироватках (до вакцинації та через 21-28 днів після неї) для визначення імунологічної ефективності вакцинації.

Причинно-слідчий зв'язок сукупності істотних відмінних ознак, що заявляються, з вищезгаданим технічним результатом полягає в наступному.

Інактивована грипозна вакцина обов'язково має у складі всі протективні (поверхневі) антигени

(13) A

(11) 57446

(19) UA

актуальних штамів вірусу грипу, в тому числі гемаглютиніни. Наприклад, одна доза спліт-вакцини "Флюарікс" (0,5мл) містить по 15мг кожного з 3-х основних штамів А(Н1N1), А(Н3N2) і В. Одним з найважливіших критеріїв імунологічної ефективності вакцини є показник сероконверсії, тобто питомі ваги вакцинованих осіб, у яких відбулося зростання титру антитіл не менш, ніж у 4 рази [4]. Введення одночасно трьох антигенів з однаковою кількістю кожного з компонентів призводить до синхронного зростання титру антитіл до кожного з антигенів. Згідно з проведеними нами паралельними дослідженнями, титр антитіл до вакцини у 77,3% з 207 сироваток дорослих осіб, майже співпадає з середньо геометричним титром (СГТ) антитіл до трьох діагностиків, що містять окремі штами грипу А(Н1N1), А(Н3N2) і В. У 21,5% сироваток титр антитіл до вакцини суттєво (в 4 рази) перевищує (СГТ) до окремих штамів і у 1,2% сироваток - навпаки, титр антитіл до вакцини суттєво нижчий, ніж СГТ до окремих штамів.

Отже, сукупність відокремлюючих ознак винаходу, що заявляється, є істотною, бо має причинно-наслідковий зв'язок з очікуваним технічним результатом, а саме, підвищення економічності реакції та спрощення інтерпретації результату імунологічного дослідження з метою оцінки рівня поствакцинального колективного імунітету.

Відомості, що підтверджують можливість здійснення способу визначення рівня поставакцинального імунітету до грипу, що заявляється, полягають у наступному.

Для здійснення способу залучають полістиролові планшети з лунками для реакції гемаглютинації мікро- або макрометодом, багатоканальні автоматичні піпетки, свіжі курячі еритроцити.

Виконують забір крові у хворих (до 3-4мл) в суху пробірку. Після згортання крові відсепаровують сироватку. Перед дослідження сироватка має зберігатися у замороженому вигляді. Для використання її розводять у співвідношенні 1:10 ізотонічним розчином і прогрівають 30хв на водяній бані при 56-58°C. Виконання реакції гальмування гемаглютинації починають з виготовлення стандартної

робочої дози грипозного антигена, в даному випадку, грипозної вакцини. Для цього проводять реакцію гемаглютинації, визначають титр гемаглютиніну вакцини, який становить 1 АО (аглютинуюча одиниця). В реакції гальмування гемаглютинації використовують (за стандартною методикою) 4 АО в 0,1мл. В експериментальних дослідженнях титр вакцини сягав 1:2560, тобто для виготовлення робочої дози антигена вакцину потрібно було розвести до 1:640. Для порівняння титри стандартних грипозних діагностиків становили від 1:128 до 1:160, відповідно робочі дози - від 1:32 до 1:40. Для постановки основного дослідження готувлять серії послідовних двукратних розведень сироваток (з 1:10 до 1:1280) на ізотонічному розчині натрія хлориду в обсязі 0,1мл. До кожного розведення додають 0,1мл робочої дози антигена (4 АО). Після контакту протягом 1 години додають по 0,2мл 1% суспензії еритроцитів. Облік реакції виконують візуально через 40-45хв після осідання еритроцитів у контролі.

Доступність та мінімальний обсяг використаного антигенного матеріалу (вакцина), мінімальний обсяг вивчаемого матеріалу, відсутність додаткової апаратури та обладнання підвищували оперативність, спрощували здійснення способу та підвищували його економічність при використанні для епідеміологічного нагляду за грипозною інфекцією.

Приклад 1. Перед проведенням чергової щорічної вакцинації проти грипу на підприємстві, співробітники якого були прищеплені по 2-3 рази у минулі роки, було вирішено визначити рівень сироваткових антитіл до актуальних грипозних штамів з метою визначення тактики подальшої імунопрофілактики на підприємстві. У серпні-місяці, через 10 місяців після попередньої вакцинації, у 207 осіб була взята кров для визначення рівня антитіл за допомогою РГГА в паралельному дослідженні з інактивованою спліт-вакциною "Флюарікс" і трьома стандартними грипозними діагностикумами А(Н1N1) штам - Ленінград/325/88, А(Н3N2) штам Сидней 05/97, В (Ленінград/90/86М). Результати визначення титру антитіл у  $\log_2$  та зворотніх СГТ - в таблиці 1.

Таблиця 1

Рівень антигемаглютинінових антитіл до окремих антигенів грипу та до вакцини в сироватках щеплених та нещеплених осіб

		А(Н1N1)	А(Н3N2)	В	Вакцина
Прищеплені n=207	$\log_2$	7Д	7,06	7,08	7,9
	СГТ	137,2	133,4	135,3	238,9
Не прищеплені n=89	$\log_2$	4,32	5,08	4,71	5,28
	СГТ	18,63	25,81	22,16	37,8

Як видно з табл. 1 зворотній середньгеометричний титр (СГТ) антитіл до вакцини приблизно на 0,8  $\log_2$  або у 1,75 рази більше, ніж до окремих антигенів, як у щеплених при високих титрах, так і у нещеплених при низьких титрах антитіл. Проте ця різниця не є достовірною, тому що в РГГА достовірною вважається різниця у 2  $\log_2$ , тобто в 4 рази стосовно СГТ. Кількість осіб, у яких титр антитіл до вакцини вищий за титр антитіл до окремих антигенів, складає від 18% у нещеплених до

21,5% у щеплених. На аналіз майже 300 сироваток була використана всього 1 доза (0,5мл) вакцини. Обсяг роботи лаборантів зменшився утричі. В результаті були визначено колективний імунітет серед прищеплених в порівнянні з нещепленими.

Приклад 2. Для визначення імунологічної ефективності вакцини було визначено показник сероконверсії - питомі ваги вакцинованих осіб, у яких після вакцинації рівень антитіл збільшився не менш ніж у 4 рази, або на 2  $\log_2$ . Окрім цього показ-

ника, який для якісної вакцини згідно з критеріями Європейського Союзу, має складати не менш 40%, визначали ступінь сероконверсії - кратність збільшення СГТ антитіл після щеплення. Кров у 89 ра-

ніше не вакцинованих осіб забирали 2 рази до вакцинації та через 14-21 день після неї РТГА ставили в усіх парних сироватках одночасно. Результати в таблиці 2

Таблиця 2

## Показники імунологічної ефективності вакцинації

ПОКАЗНИКИ	Частота сероконверсії (%)	Ступінь сероконверсії
Критерії ЄС	більше 40%	2,5
Вакцина (ІІ <sup>89</sup> )	59,5%	5,4

Як свідчать дані таблиці 2, імунологічна ефективність застосованої вакцини суттєво перевищує критерії ЄС до якісної вакцини.

Таким чином, після проведення лабораторного випробування запропонованого способу визначення рівня поставакцинального імунітету до грипу, заявником встановлено, що заявлений спосіб може бути широко використаний в лабораторній практиці санітарно-епідеміологічної служби, для заявляемого об'єкту у тому вигляді, як він схарактеризований у незапеченому пункті формули, підтверджена можливість його здійснення за допомогою вказаних у заявці або відомих до дати пріоритету діагностичних приладів, спосіб, що втілює заявляемий винахід при здійсненні, забезпечує досягнення позитивного результату, а саме підвищення економічності та спрощення інтерпретації результату імунологічного дослідження по відношенню до прототипу з можливістю його використання для епідеміологічного нагляду за грипоною інфекцією та ефективністю вакцинації.

Отже, розроблений винахід відповідає умовам

«промислової придатності», «новизна», «винахідницький рівень» і може бути кваліфікований винаходом України.

## Джерела інформації

1. Методические рекомендации по изучению коллективного иммунитета в

рамках эпидемиологического надзора за этой инфекцией в стране - Л Д984 -12е

2. Наказ №30 МОЗ України від 09.02.1998 "Про заходи щодо профілактики та боротьби з грипом та гострими респіраторними захворюваннями в Україні"

3. Влияние кратности иммунизации детей инактивированной гриппозной вакциной на иммунный ответ и эффективность защиты // А.В. Слободнюк, В.В. Романенко, О.С. Утницкая, Т.М. Мотус, А.В. Переверзев // Журн. микробная - 2002 - №4 - С.36-39

4. Commission of European Communities Harmonization of requirements for influenza vaccines// EEC document 111/3188/91-EN