



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41118 (13) U
(51) МПК (2009)
C12N 7/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ШТАМ ВІРУСУ КЛІЩОВОГО ЕНЦЕФАЛІТУ FLAVIVIRUS ENCEPHALITIDEM IXODICUM № 2809 ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ СПЕЦИФІЧНИХ ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ

1

(21) u200812570

(22) 27.10.2008

(24) 12.05.2009

(46) 12.05.2009, Бюл.№ 9, 2009 р.

(72) ЛОЗИНСЬКИЙ ІГОР МИКОЛАЙОВИЧ, UA,
КОЗЛОВСЬКИЙ МИХАЙЛО МИХАЙЛОВИЧ, UA,
БІЛЕЦЬКА ГАЛИНА ВАЦЛАВІВНА, UA, ФЕДУР
ВОЛОДИМИР ІЛЛІЧ, UA, ДРУЛЬ ОКСАНА СТЕ-
ФАНІВНА, UA, РОГОЧИЙ ЄВГЕН ГЕОРГІЙОВИЧ,
UA

2

(73) ЛЬВІВСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИ-
ТУТ ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ГІГІЄНИ МОЗ УКРАЇНИ,
UA

(57) Штам кліщового енцефаліту №2809, ізольова-
ний від кліщів Ixodes ricinus, зібраних в активному
природному вогнищі цього вірусу в селі Мирча
Велико-Березнівського району Закарпатської об-
ласті в 1979 році, депонований в Колекції штамів
арбовірусів Львівського НДІ епідеміології та гігієни
МОЗ України за №67.

Корисна модель відноситься до медичної віру-
сології, а саме до лабораторної діагностики і про-
філактики захворювань, що викликаються вірусом
кліщового енцефаліту.

На сьогодні відомі кілька штамів вірусу кліщово-
го енцефаліту, які використовуються для виго-
товлення діагностичних та лікувально-
профілактичних препаратів, серед яких найбільш
широко вживаними для цих цілей в країнах колиш-
нього Радянського Союзу є штами "Соф'їн", "Аб-
сеттаров", "Пан" та інші [1].

В Україні в природних вогнищах кліщового ен-
цефаліту циркулюють відмінні від вищезгаданих
штамів збудники цієї інфекції, що спричиняють
спорадичні та масові спалахи захворювання серед
населення, серед яких відомим є штам №2288 [2,
3, 4]. Однак, промислове виготовлення специфіч-
них імунобіологічних препаратів із місцевих штамів
до цього часу не налагоджено. Недоліком згада-
них "сибірських" штамів арбовірусів є нижча їх аві-
дність та специфічність у порівнянні із місцевими
штамами, що негативно відображується на анти-
генній активності та профілактичній ефективності
виготовлених із них препаратів при застосуванні їх
в Україні.

Завданням винаходу є новий оригінальний
штам вірусу кліщового енцефаліту, що є етіологіч-
ним чинником захворювань людей в Україні і поте-
нційним кандидатом для виготовлення імунобіоло-
гічних препаратів для діагностики, лікування та
профілактики даної інфекції.

Вирішити це завдання можливо шляхом вико-
ристання штаму №2809 вірусу кліщового енцефа-
літу, ізольованого у Львівському НДІ епідеміології
та гігієни від кліщів Ixodes ricinus, зібраних в актив-
ному природному вогнищі цього вірусу в селі Мир-
ча Велико-Березнівського району Закарпатської
області в 1979 році [2]. Даний штам депонований
за №67 в Колекції штамів арбовірусів Львівського
НДІ епідеміології та гігієни МОЗ України (лабора-
торія трансмісивних вірусних інфекцій), яка згідно
Постанови Кабінету Міністрів України №1709 від
19.12.2001р. віднесена до наукових об'єктів, що
становлять національне надбання держави.

Штам №2809 відноситься до родини
Flaviviridae, роду Flavivirus, західного підтипу ком-
плексу кліщового енцефаліту і характеризується
наступними ознаками. Він високопатогенний для
лінійних і безпородних дорослих та новонародже-
них білих мишей, проявляючи 100% сприйнятли-
вість для організму цих тварин. При зараженні їх
викликає типову картину експериментального ен-
цефаліту з інкубаційним періодом при внутріш-
ньомозковому шляху зараження 3-5 днів (макси-
мальний титр 12,0 lg LD₅₀/0,02мл), при підшкірному
шляху зараження - 4-7 днів, (максимальний титр
8,0 lg LD₅₀/0,05мл). Індекс інвазивності - 1,0-3,4.

Порівнюючи ці дані із аналогічними показни-
ками штамів Соф'їн, Пан та №2288, наведеними в
таблиці 1, можна зробити висновок, що штам
№2809 відноситься до високовірулентних штамів
даної групи вірусів, володіючи певними відміннос-
тями щодо патогенності для лабораторних мишей.

UA (19) 41118 (11) 41118 (13) U

Таблиця 1

Характеристика штамів вірусу кліщового енцефаліту за ступенем вірулентності для білих безпородних мишей

Штами	Нейровірулентність у Іg LD ₅₀ /0,02мл						
	сисунки	3-тижневі			дорослі		
	в/м	в/м	п/ш	І.і.	в/м	п/ш	І.і.
2809	12,0	9,0	8,0	1,0	7,7	4,3	3,4
Соф'їн	13,3	-	-	-	8,5	7,5	1,0
Пан	11,2	-	-	-	8,0	7,1	0,9
2288	10,2	9,5	8,7	0,8	7,7	5,5	2,2

Примітки:

1. в/м - внутрішньомозкове інфікування.
2. п/ш - підшкірне інфікування.
3. І.і. - індекс інвазивності

Штам №2809 добре розмножується в перещеплюваній культурі клітин СНЕВ, викликаючи чітку деструкцію клітин на 3-4 добу. Пік накопичення інфекційної і гемаглютинуючої активності спостерігається на 4 добу. Титр по тканинній цитопатогенній дозі (ТЦД) корелює із показником інтрацеребральної активності і становить максимально 10,25 Іg ТЦД₅₀ в 0,1мл, що є вищою репродуктивною активністю в перещеплюваних клітинах лінії СНЕВ порівняно з аналогічним штамом №2288, для якого цей показник становив 9,2 Іg LD₅₀/0,1мл.

Гемаглютинуюча активність пропонованого штаму при репродукції в мозку мишей становить 1:320-1:1280 в зонах рН 6,3-6,7.

В реакції біологічної нейтралізації штам №2809 нейтралізується гомологічною сироваткою і сироватками до інших штамів вірусу кліщового енцефаліту. Індекс нейтралізації із гомологічною сироваткою - 4,0 Іg. Із сироваткою до штаму Соф'їн він складає 2,2 Іg, до штамів Абсеттаров, Пан, - 2,5-2,8 Іg, до штаму №2288 - 3,3 Іg.

Антигенні властивості штаму №2809 вивчені і в реакціях зв'язування комплекменту (РЗК), гальмування гемаглютинації (РГГА) та непрямой імунофлюоресценції (РНІФ). Встановлено, що штам № 2809 володіє значно вищою антигенною активністю порівняно із штамми Соф'їн та Абсеттаров і щонайменше в 2 рази перевищує за титрами комерційний антиген кліщового енцефаліту вироб-

ництва Томського НПО "Віріон" (С. 81, К. 1751). Так, в перехресній РЗК при дослідженні гіперімунних сироваток та імунних асцитичних рідин безпородних білих мишей до вказаних серотипів вірусу кліщового енцефаліту з'ясовано, що антиген штаму №2809 дає титри антитіл з гомологічною імунною сироваткою 1:640, з імунними сироватками еталонних штамів Абсеттаров і Пан, відповідно, - 1:80 і 1:40, місцевого штаму №2288 - 1:160. Ці результати свідчать про високу антигенну активність та чітку відмінність антигенної структури штаму №2809 вірусу кліщового енцефаліту від "східного" і "західного" його різновидностей, та в деякій мірі і від його згаданого прототипу, циркулюючого в Україні.

Виражені відмінності штаму №2809 від штаму Соф'їн та №2288 виявлені і при вивченні їх фізико-хімічних властивостей. Як видно із даних таблиці 2 індекси інактивації (різниця між контрольним титром і титром після обробки) пропонованого штаму ефіром (4,8), дезоксихолатом натрію (ДХ-На) (3,7), ацетоном (4,10), підвищеною до +50°C температурою (3,6) виразно відрізнялися від аналогічних показників прототипних штамів і вказують при цьому на більшу чутливість першого варіанту до дії фізико-хімічних факторів, що є позитивним моментом для виготовлення на його основі імунобіологічних препаратів.

Таблиця 2

Результати вивчення фізико-хімічних властивостей штамів вірусів кліщового енцефаліту в культурі клітин СНЕВ

Штами	Контрольний титр*	Після обробки ефіром**	Після обробки ДХ-На**	Після обробки ацетоном**	Після термоінактивації**
2809	10,2	5,4/4,8	6,5/3,7	6,1/4,1	6,6/3,6
Соф'їн	8,7	5,2/3,5	5,2/3,5	5,0/3,7	6,1/2,6
2288	9,2	6,4/2,8	7,2/2,0	6,2/3,0	7,4/1,8

Примітки:

1. * - в Іg ТЦД₅₀ в 0,1мл.
2. ** - в чисельнику титр після обробки, в знаменнику індекс інактивації.

Порівняльне вивчення імунобіологічних властивостей штамів вірусу кліщового енцефаліту проводили шляхом визначення здатності їх стимулювати у мишей утворення ендogenous інтерферону (ІФН) та антитіл (АТ) до Т-залежного антигену еритроцитів барана. Встановлено (таблиця 3), що штам №2809 володіє високою інтерфероніндукуючою активністю, хоча і дещо нижчою порівняно із штамом №2288. Динаміка інтерфероноутворення, індукованого запропонованим штамом характеризується трьома вираженими піками накопичення

ІФН в крові: 320-640, 160-320 та 160 од/мл відповідно через 24, 72-120 годин і 10-12 днів після зараження дозою 10 ЛД₅₀/0,2мл.

Інфікування тварин нижчою у 50 разів дозою штаму №2809 (0,2 ЛД₅₀/0,2мл) викликає у перші дні інтерферогенезу адекватно і невисокі концентрації сироваткового ІФН (40-80 од/мл), проте в подальшому на 2-му піку його активності вони досягають високих величин (160 од/мл), рівнозначних, як і при введенні високої дози (10 ЛД₅₀/0,2мл).

Таблиця 3

Інтерфероніндукуюча активність штамів №2809 та 2288 вірусу кліщового енцефаліту

Штами	Доза в ЛД ₅₀	Титри ІФН (в од/мл) в крові мишей через:				
		5 год.	24 год.	48 год.	72 год.	120 год.
№2809	10	20	320-640	10	160-320	160
	0,2	<10	20-40	40-80	10-20	40-80
№2288	10	10-20	1280	160	80	40-80
	0,2	<10	320-640	160	80-160	80
Штами	Доза в ЛД ₅₀	Титри ІФН (в од/мл) в крові мишей через:				
		7 днів	10 днів	12 днів	15 днів	20 днів
№2809	10	10	80-160	160	<10	н.д.
	0,2	40	160	160	<10	<10
№2288	10	40	320*	н.д.	10-20	<10
	0,2	40	320-640*	н.д.	<10	<10

Примітка: * - титри інтерферону визначали на 11 день після інфікування

На відміну від штаму №2809 накопичення ІФН у відповідь на введення прототипного штаму №2288 відбувається у 2 етапи з піками на 24-72 години та 11 днів з відповідними рівнями ІФН 1280 і 320 од/мл, причому інфікування мишей у 50 разів меншою дозою не призводить до значного послаблення індукції ІФН.

Певна відмінність між цими штамми спостерігається і щодо їх впливу на Т-залежну імунну відповідь. Так, згідно даних таблиці 4, штам №2809 при використаних схемах введення дози 2 ЛД₅₀/0,2мл в незначній мірі (в 2 рази) стимулює ранню стадію антитілогенезу (7 доба спостереження), тоді як на пізній її стадії (14 доба спостереження) реєструється виразне послаблення (в 3-6 разів) даного процесу. В аналогічних умовах досліджу штаму №2288 суттєво не впливав на Т-залежний гуморальний імунітет у мишей: максимальне відхилення титрів АТ від контрольних показників не перевищувало 2 разів.

Накопичення біомаси штаму №2809 вірусу кліщового енцефаліту здійснюється класичним способом шляхом пасажування вірусмісного матеріалу в живих чутливих системах, в тому числі в організмі лабораторних мишей, що можна проілюструвати наступним прикладом.

Безпородних білих мишей вагою 6-8 грамів заражають у мозок по 0,03мл вірусною суспензією

штаму №2809. 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. Отриману зависину мозкової тканини центрифугують при 1000-1500 об/хв протягом 10хв. Рідину, що утворилась над осадом, використовують для зараження наступної партії мишей, інфікований мозок котрих використовується для приготування діагностичного, вакцини чи інших цілей.

Таким чином, штам №2809 вірусу кліщового енцефаліту, спричиняючи захворювання людей в Україні, проявляючи суттєві відмінності по ряду антигенних, фізико-хімічних та імунобіологічних показників від існуючих "промислово-комерційних" прототипів та інших циркулюючих в Україні його різновидностей, володіючи при цьому високою специфічністю, антигенною, імуногенною та репродуктивною активністю, відповідає регламентованим параметрам відбору штамів-кандидатів для виробництва імунобіологічних препаратів.

Використання цього штаму для виготовлення специфічного діагностичного, імуноглобуліну та культуральної вакцини дозволить суттєво підвищити відповідно достовірність діагностики та ефективність лікування і профілактики захворювань кліщовим енцефалітом в Україні.

Таблица 4

Вплив штамів вірусу КЕ №2809 і 2288 на продукцію сироваткових АТ до еритроцитів барана у мишей лінії СВА

Штами	Час введення ЕБ по відношенню до інфікування *	Титри АТ в обернених величинах після імунізації ЕБ			
		на 7 добу		на 14 добу	
		Вірус + ЕБ	ЕБ	Вірус + ЕБ	ЕБ
2809	- 48	80-160	160	640-1280	1280
	+ 2	320 +	160	640-1280 --	2560
	+ 48	160-320	160-320	320-640 ---	2560
	+ 120	320-640 +	160-320	1280	1280
2288	- 24	320	320	320-640 -	640-1280
	+ 2	160-320	320	640 -	1280
	+ 48	640 +	320	320-640 -	640-1280
	+ 120	640	640	640	1280

Примітка:

* - час введення ЕБ до (-) і після (+) інфікування поданий в годинах;

+ - збільшення титрів АТ у співвідношенні до контролю (ЕБ) на 1 порядок розведення (у 2 рази);

-- зменшення титрів АТ у співвідношенні до контролю (ЕБ) на 1 порядок розведення (у 2 рази);

--- зменшення титрів АТ у співвідношенні до контролю (ЕБ) на 2-4 порядки розведення (у 3 рази);

---- зменшення титрів АТ у співвідношенні до контролю (ЕБ) на 4-8 порядків розведення (у 6 разів).

Джерела інформації:

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

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

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

4. Пат. 63096 А України, МПК С 12 N 7/00. Штам вірусу кліщового енцефаліту Flavivirus encerphalitidem ixodicum № 2288 для виготовлення специфічних імунобіологічних препаратів / І.М. Лозинський, Г.В. Білецька, М.М. Козловський, Є.Г. Рогочий // - Оpub. 15.01.2004. Бюл. №1.