



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA

(11) 97645

(13) U

(51) МПК

G01N 33/53 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 11119**
(22) Дата подання заявки: **13.10.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.03.2015**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.03.2015, Бюл.№ 6**

(72) Винахідник(и):
**Козловський Михайло Михайлович (UA),
Лозинський Ігор Миколайович (UA),
Білецька Галина Вацлавівна (UA),
Рогочий Євген Георгійович (UA),
Друль Оксана Стефанівна (UA),
Федорук Володимир Ілліч (UA),
Бень Ірина Ігорівна (UA),
Шоломей Михайло Володимирович (UA)**

(73) Власник(и):
**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ЛЬВІВСЬКИЙ
НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ
ЕПІДЕМІОЛОГІЇ ТА ГІГІЄНИ
МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
УКРАЇНИ",
вул. Зелена, 12, м. Львів, 79005 (UA)**

(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ КІЩОВОГО ВІРУСНОГО ЕНЦЕФАЛІТУ МЕТОДОМ ІМУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ

(57) Реферат:

Спосіб приготування тест-систем для діагностики кліщового вірусного енцефаліту методом імунофлюоресценції включає репродукування штамів вірусу в перещеплюваній культурі клітин лінії СНЕВ, збір вірусовмісних клітин та нанесення їх на предметні скельця, фіксацію клітин ацетоном і обробку їх ультрафіолетовим опроміненням. При цьому як діагностиком використовують антигени, приготовані із перещеплюваних клітин лінії СНЕВ, інфікованих циркулюючими в Україні штамми вірусу кліщового енцефаліту.

UA 97645 U

Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до створення діагностичних препаратів, і призначена для проведення специфічної лабораторної діагностики кліщового вірусного енцефаліту (КВЕ).

Лабораторна діагностика кліщового вірусного енцефаліту проводиться із застосуванням певних імуно-серологічних реакцій, в тому числі, з використанням методу імунофлюоресценції. Даний метод ґрунтується на специфічній імунохімічній взаємодії антигену вірусу кліщового енцефаліту (КВЕ) з відповідним антитілом до нього. Візуалізація цих антиарбовірусних антитіл, зв'язаних з антигеном, здійснюється з допомогою антивидових антитіл, мічених флуоресціюючими барвниками, серед яких найчастіше використовують флуоресцеїнізотіоціанат (ФІТЦ), що зумовлює світіння зеленого кольору в ультрафіолетовому спектрі люмінесцентного мікроскопу [1-2].

На основі вказаного методу для виявлення антитіл до вірусу кліщового енцефаліту широко застосовують реакцію непрямой імунофлюоресценції (РНІФ), що характеризується високою специфічністю та чутливістю [1-2]. Постановка даної реакції передбачає використання відповідних тест-систем, які, головним чином, зводяться до застосування специфічного вірусного антигену (діагностикуму), приготовленого на основі збудників, що викликають дане захворювання.

Задачею корисної моделі є розробка способу приготування тест-систем для діагностики кліщового вірусного енцефаліту в реакції непрямой імунофлюоресценції із використанням штаму збудника, ізолюваного в Україні, що за своєю специфічністю та чутливістю переважали б результативність аналогічних методів із застосуванням препаратів, виготовлених із еталонних "сибірських" та "західноєвропейських" штамів.

Поставлену задачу вирішують шляхом здійснення певної технології, у якій як діагностикум використовують антигени, приготовані із перещеплюваних клітин лінії СНЕВ, інфікованих штамми вірусу кліщового енцефаліту.

Пропонований спосіб передбачає репродукування штамів вірусу в перещеплюваній культурі клітин лінії СНЕВ, збір вірусомісних клітин та нанесення їх на предметні скельця, фіксацію клітин ацетоном і обробку їх ультрафіолетовим опроміненням.

Користуючись камерою Горяєва визначають густину клітин і доводять її до концентрації 750000 кл/мл. Інфіковані штамми КВЕ клітини змішують у тому ж об'ємі і концентрації з нормальними, контрольними клітинами, проводячи безперервне помішування. Отримана суміш клітин являє собою маточний матеріал для приготування діагностикумів.

На чисто вимиті, знежирені у суміші Нікіфорова і висушені предметні скельця мікропіпеткою наносять по 6 краплин у 2 ряди маточного матеріалу. Предметним скельцям із маточним матеріалом ("слайдам") дають підсохнути при кімнатній температурі під витяжною шафою впродовж 3 годин.

Фіксують "слайди" в охолодженому при температурі -20 °С хімічно чистому ацетоні 20 хв. і знову висушують під витяжною шафою на фільтрувальному папері до повного висихання. В результаті цієї фіксації відбувається ще й інактивація вірусу. Для повного знезараження "слайди" додатково обробляють ультрафіолетовим опроміненням впродовж 3 годин. Приготовані діагностикуми контролюють на специфічність та активність, після чого вони готові для використання. Для тривалого використання "слайди" обгортають алюмінієвою фольгою і в картонній коробці зберігають при температурі -80 °С не більше 2-х років.

Отримані описаним способом тест-системи з антигенами до штамів КВЕ, ізолюваних в Україні (N1, N2) та еталонних штамів (N3, N4) використовували в РНІФ для порівняльного титрування сироваток крові 87 гарячкових хворих з підозрою на кліщовий вірусний енцефаліт. Результати проведених досліджень зведено у таблицю 1.

Таблиця 1

Результати титрування сироваток крові гарячкових хворих з підозрою на кліщовий вірусний енцефаліт в РНІФ з використанням тест-систем до різних штамів вірусу кліщового енцефаліту

Сироватки крові	Число серопозитивних проб і титри антитіл до антигенів вірусу кліщового енцефаліту:							
Хворих з підозрою на кліщовий вірусний енцефаліт (87 проб)	N1		N2		N3		N4	
	Абс	Х	Абс	Х	Абс	Х	Абс	Х
	%	M±m	%	M±m	%	M±m	%	M±m
	13	36,9±2,7	15	40,2±2,8	7	22,3±2,4	8	25,8±2,5
	14,9		17,2		8,0		9,2	

Примітка:

N 1, N 2 - штамми ВКЕ, ізолювані в Україні;

N 3, N 4 - еталонні штамми ВКЕ;

Х - середньгеометрична величина обернених значень титрів антитіл.

Із даних таблиці 1 видно, що при проведенні лабораторної діагностики КВЕ у вищезгаданих гарячкових хворих тест-системи приготувані із штамів ВКЕ, ізолюваних в Україні, виявилися значно чутливішими і специфічнішими, ніж аналогічні діагностичні препарати, отримані на основі еталонних штамів. Це виявляється у вищому на 5,7-9,2 відсотку кількості серопозитивних осіб до антигенів вірусу кліщового енцефаліту (14,9-17,2 % проти 8,0-9,2 %) і у вищих показниках титрів специфічних антитіл (1:36,9-1:40,2 проти 1:22,3-1:25,8).

Таким чином, запропонований спосіб приготування тест-систем для лабораторної діагностики кліщового вірусного енцефаліту методом імунофлюоресценції з використанням штамів ВКЕ, циркулюючих в Україні, дає можливість отримати діагностичні препарати з вищим на 5,7-9,2 % діагностичним ефектом порівняно з аналогічними діагностикумами, приготовленими з прототипних (еталонних) штамів ВКЕ, що не циркулюють в Україні. Впровадження даних тест-систем у вітчизняне виробництво і використання їх в лікувально-профілактичних та діагностичних закладах системи охорони здоров'я значно підвищить достовірність діагностики захворювань кліщовим вірусним енцефалітом в Україні, а отже, і ефективність лікування таких хворих.

Джерела інформації:

1. Арбовирусы (методы лабораторных и полевых исследований). Под ред. С.Я. Гайдамович. - М.: Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР, - 1986. - С. 113-119.

2. Посібник з медичної вірусології / В.М. Гирін, В.Г. Порохницький, С.Г. Вороненко [та ін.]. - К.: Здоров'я. - 1995. - 368 с.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб приготування тест-систем для лабораторної діагностики кліщового вірусного енцефаліту методом імунофлюоресценції, що включає репродукування штамів вірусу в перещеплюваній культурі клітин лінії СНЕВ, збір вірусомісних клітин та нанесення їх на предметні скельця, фіксацію клітин ацетоном і обробку їх ультрафіолетовим опроміненням, який **відрізняється** тим, що як діагностикум використовують антигени, приготувані із перещеплюваних клітин лінії СНЕВ, інфікованих циркулюючими в Україні штамми вірусу кліщового енцефаліту, завдяки чому мають більшу чутливість, специфічність та достовірність результатів порівняно з аналогічними тест-системами, в яких застосовуються діагностикуми, приготувані на основі інших (еталонних) штамів даного вірусу.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601