



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56783 (13) U
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/531
A61K 39/295

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ІМУНОГЛОБУЛІНОВИХ ПРЕПАРАТІВ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСІВ ГРУПИ ЕСНО

1

(21) u201008699
(22) 12.07.2010
(24) 25.01.2011
(46) 25.01.2011, Бюл.№ 2, 2011 р.
(72) САВЧЕНКО БОРИС ІВАНОВИЧ
(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ПРОТИЧУМНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ І.І. МЕЧНИКОВА"
(57) Спосіб одержання імуноглобулінових препаратів для діагностики вірусів групи ЕСНО, що полягає в одержанні сироватки крові тварин після циклу імунізації комплексом сероварів моно- та

2

полівалентних вірусів ЕСНО та очистки від неспецифічних чинників, який **відрізняється** тим, що до одержаної імунної сироватки додають розчин 0,4 % риванолу як 1:3 і витримують суміш до осадження супутніх речовин-неспецифічних чинників, після чого надосадову рідину відділяють, додають хлористий натрій до кінцевої концентрації 0,85 %, розчин центрифугують, відокремлюють та видаляють осад, а розчин одержаного гаммаглобуліну з антигемоглобінуючими властивостями, за необхідності подальшого зберігання, ампулюють та ліофілізують.

Корисна модель належить до медичної вірусології та до виготовлення препаратів, що знайдуть використання в лабораторній діагностиці ентеровірусних захворювань.

Сімейство ентеровірусів це велика група вірусів, що зустрічається у кишечнику людини. В сімейство ентеровірусів входять віруси поліомієліту, віруси Коксаки А та Коксаки В, а також віруси ЕСНО (Enteric cytopathogenic human orphans- кишечні цитопатогенні віруси-сироти людини). Ентеровірусні захворювання мають широке розповсюдження у всіх країнах світу та є одною із найбільш актуальних проблем інфекційної патології. Ентеровіруси служать етіологічним чинником масштабних та локальних епідемічних спалахів, а також поодиноких гострих інфекційних захворювань.

Серед відомих в теперішній час 34 сероварів вірусів групи ЕСНО виявлено ряд штамів, що спричиняють гострі інфекційні захворювання людини. Із вірусів групи ЕСНО, етіологічна роль яких в патології людини була визначена, гемоглобінуючі штами спричиняють наступні клінічні захворювання: гострий серозний менінгіт (можливі енцефаліти, менінгоенцефаліти) - віруси ЕСНО 3, 6, 7, 11, 13, 19, 20, 21; захворювання схожі на поліомієліт; захворювання з лихоманкою та висипаннями - віруси ЕСНО 6, 13 [1]. Захворювання, що були спричинені ентеровірусами, частіше за все, мали у різних країнах характер епідемій [1-3]. Крім того, дослідники пов'язували спалахи гострих респіраторних захворювань, герпангін з вірусами групи

ЕСНО, у тому числі, з гемоглобінуючими штамми [4-5]. Таким чином, наведені літературні дані свідчать про значну роль гемоглобінуючих вірусів ЕСНО в етіології гострих інфекційних захворювань, що характеризуються різноманітною клінічною картиною та про значне розповсюдження цих штамів. Захворювання подібні за клінічною картиною можуть бути спричинені різними сероварами ентеровірусів, в той же час один і той серовар вірусу може спричиняти різноманітні за клінічним перебігом інфекції.

Вірусологічні дослідження, що пов'язані з ізоляцією ентеровірусів на культурах клітин, ідентифікацію виділених штамів з використанням, як правило, культури клітин, являються довготерміновими, що неприпустимо під час спалаху інфекцій з тяжкою клінічною картиною. Найкращу можливість у цьому відношенні може надати наявність ознак гемоглютинації у ентеровірусів, яка дозволяє всю велику групу вірусів ЕСНО (34 серовари) поділити на 2 підгрупи: гемоглютинуючих та негемоглютинуючих вірусів. Але ця ознака досі, більшою мірою, не була використана при ідентифікації. Серед запропонованих серологічних методів ідентифікації вірусів ЕСНО реакція затримки гемоглютинації (РЗГА) не отримала широкого розповсюдження. Одною із причин являється відсутність високоактивних антигемоглютинуючих препаратів, вільних від неспецифічних факторів- термостабільних інгібіторів та гемоглютининів [6]. Наразі, у якості діагностичних препаратів використовують

(13) U
(11) 56783
(19) UA

імунні моновалентні та полівалентні сироватки для ідентифікації ентеровірусів виробництва ЗПП Інституту поліомієліту та вірусних енцефалітів ім. М. П. Чумакова РАМН. До складу набору сироваток включені також імунні сироватки, призначені для ідентифікації вірусів ЕCHO в реакції нейтралізації у культурі тканини [7]. Одним з таких препаратів є "Сыворотки диагностические энтеровирусные, сухие моно- и поливалентные для реакции нейтрализации". До складу діагностичного набору сироваток входять сироватки до 31-го серотипу вірусів ЕCHO (1-9; 11-27; 29-33), а також полівалентні сироватки одержані до цих сероварів вірусів. Серологічна ідентифікація вірусів виконується реакцією нейтралізації у первиннотрипсинізованій культурі тканини нирок зелених мавп (для ідентифікації вірусів ЕCHO 1-9; 11-15; 17-20; 22-27; 29-32 сероварів, а також на перещеплюваних лініях клітин RD для вірусів ЕCHO 16, 21, 23. Але даний метод не є найбільш специфічним для цієї групи вірусів. До того ж, для виготовлення сироваток використовуються дорогі культури тканин, та тварини (кролі і барани), утримання яких також дуже затратне.

Дане технічне рішення прийнято за прототип корисної моделі, як таке що призначене для одержання діагностичного препарату вірусів ЕCHO.

Зважаючи на недостатню специфічність діагностичних сироваток прототипу для ідентифікації гемаглютинуючих вірусів ЕCHO була поставлена задача підвищення специфічності одержання діагностичних препаратів шляхом поліпшення очистки сироватки від неспецифічних компонентів.

Задача вирішується тим, що спосіб одержання імуноглобулінових препаратів для діагностики вірусів групи ЕCHO полягає в одержанні сироватки крові тварин після циклу імунізації комплексом сероварів вірусів ЕCHO та очистки від неспецифічних чинників додаванням до одержаної імуної сироватки розчину 0,4 % ріванолу у пропорції 1:3 та витримують суміш до осадження супутніх речовин-неспецифічних чинників, після чого надосадкову рідину відділяють, додають хлористий натрій до кінцевої концентрації 0,85 %, розчин центрифують,

відокремлюють та видаляють осад, а розчин одержаного гемаглобуліну з антигемаглютинуючими властивостями, за необхідності подальшого зберігання, ампулюють та ліофілізують.

Спосіб реалізують наступним чином. Імунізацію білих щурів та сірих кролів проводили антигенами 12-ма гемаглютинуючими сероварами вірусів ЕCHO та полівалентними антигенами 3 типів. В основу організації полівалентних антигенів була покладена особливість різних штамів вірусів ЕCHO проявляти гемаглютинуючу активність залежно від температури проведення реакції аглютинації (РГА при +4°, +18°, +37 °C). Полівалентні антигени 3-х типів були утворені об'єднанням рівних об'ємів гемаглютинуючих вірусів ЕCHO (по 1,0 мл).

Моно- та полівалентні сироватки одержували імунізацією лабораторних тварин (білих щурів та сірих кролів) гемаглютинуючими штамми вірусів ЕCHO. Полівалентні антигени містили від 4 до 6 моновалентних антигенів.

Одержання моновалентних щурячих антигемаглютинуючих сироваток до вірусів ЕCHO.

В якості антигенів використовували гемаглютинуючі віруси ЕCHO 3, 11, 6, 7, 11, 12, 13, 19, 20, 21, 24, 29, 30 сероварів, вирощених на первиннотрипсинізованих клітинах нирках ембріонів людини (ПЭЧ), фібробластах ембріонів людини ФЕЧ. Накопичення антигенів також можливе на перещеплюваних культурах фібробластів щура (ФК). В моновалентних антигенах визначали аглютинуючі та інфекційні титри в реакціях аглютинації та в реакції нейтралізації в культурі тканини. Для імунізації використовували білих щурів та сірих кролів. На кожний моновалентний та полівалентний антигени брали по 5 білих щурів та по 3 кроля. Схема імунізації. Білих щурів імунізували внутрішньочеревним введенням наростаючих доз моновалентних антигенів 1, 2, 3, 5 мл з інтервалом 7 діб. В одержаних від кожного щура моновалентних сироватках визначали рівень специфічних антитіл в РЗГА та неспецифічних гемаглютининів до еритроцитів людини в реакції аглютинації РА (Табл. 1).

Таблиця 1

Результати імунологічного дослідження моновалентних сироваток

№ № п. п	Серовари вірусів	Інфекційні титри вірусів культура ПЭЧ (в Log) в РН	Титри Аглютининів вірусів в Культ. ПЭЧ	Титри неспецифічних аглютининів в сироватках	Титри специфічних аглютининів в сироватках
1	ЕCHO-3	5,75	1:1024	1:512	1:512
2	ЕCHO-6	6,0	-	1:128	1:128
3	ЕCHO-7	6,75	1:1024	1:512	1:512
4	ЕCHO-11	6,65	1:128	1:64	1:64
5	ЕCHO-12	5,8	1:128	1:128	1:128
6	ЕCHO-13	6,35	1:16	1:32	1:32
7	ЕCHO-19	5,0	1:1024	1:512	1:1024
8	ЕCHO-20	6,5	-	1:256	1:256
9	ЕCHO-21	5,0	-	1:256	1:256
10	ЕCHO-24	3,5	-	1:512	1:512
11	ЕCHO-29	6,25	-	1:512	1:512
12	Е-30	6,25	1:64	1:128	1:128

Результати, що наведені в таблиці 2 свідчать про те, що імунізація проводилася антигенами з високим рівнем інфекційних та аглютинуючих титрів. Поряд з утворенням специфічних антигемаглютинуючих антитіл в імунних сироватках відбувається накопичення у високих титрах неспецифічних геаглютининів, котрі унеможливають визначення специфічних антигемаглютинуючих антитіл. Для видалення неспецифічних факторів із імунних сироваток використали 0,4 % розчин ріванолу який має властивість видаляти із сироваток альбумінову, α , β -глобулінові фракції сироваток, з котрими пов'язують неспецифічні фактори в імунних сироватках. До одного об'єму сироватки прибавляли 3 об'єми 0,4 % розчину ріванолу з рН 5,8. Альбумінова, α , β -глобулінові фракції сироваток після витримки 30 хв. при +4 °С випадали в щільний осад, що їх разом з ріванолом видалляли висолюванням хлористим натрієм (0,85 % насичення). Наступним центрифугуванням при 2000 об./хв. впродовж 15 хв. відділяли гамаглобулін. Одержані в процесі обробки гамаглобулінові фракції сироваток розводили фізіологічним розчином 1:10, ампулювали та ліофілізували. В ампулах отримували аморфний препарат білого кольору, що легко розчинявся дистильованою водою, зберігалися антигемаглютинуючі антитіла. Препарати були вільними від неспецифічних факторів, що давало можливість використовувати імунні гамаглобулінові препарати без допоміжної обробки для встановлення сероварів ізолюваних вірусів групи ЕСНО.

Одержання полівалентних гамаглобулінових препаратів. До полівалентного антигену №1 входили віруси ЕСНО 3, 11, 13, 19 серотипів; до полівалентного антигену №2 входили віруси ЕСНО 7, 12, 20, 21 сероварів; до антигену №3

входили віруси 6, 24, 29, 30 сероварів. Полівалентні антигени складали в залежності від прояву геаглютинуючої активності вірусів при різних температурах +4°; +18° ; +37 °С. Полівалентні антигени білим щурам вводили від 4,0 до 6,0 мл в залежності від кількості взятих в антиген вірусів, триразово з тижневим інтервалом. Такими ж дозами імунізували кролів також триразово з тижневим інтервалом. Тотальне кровопускання білих щурів та кролів проводили через 10 діб після останнього введення антигенів. Щурів та кролів попередньо заморювали ефіром (етером). В сироватках, отриманих від кожного щура та кроля паралельно визначали рівень антигемаглютинуючих та титри віруснейтралізуючих антитіл до кожного серовару вірусу, включеному в полівалентний антиген (табл. 2). Результати наведені в таблиці свідчать про можливість використовувати полівалентні антигени для одержання полівалентних сироваток з високими титрами антитіл до кожного антигену, що був взятий в полівалентний антиген, специфічність одержаних гамаглобулінових полівалентних препаратів та про можливість їх використання для ідентифікації вірусів групи ЕСНО в РЗГА. Використання полівалентних гамаглобулінових препаратів дозволяє проводити попереднє типування вірусів на 3 групи, що сприяє прискоренню ідентифікації геаглютинуючих штамів групи ЕСНО з подальшою ідентифікацією моновалентними препаратами.

Одержані полівалентні та моновалентні сироватки були перевірені в РЗГА з використанням в якості антигенів свіжоізолюваних нами вірусів ЕСНО. Штами були розподілені на три групи відповідно до груп полівалентних сироваток.

Таблиця 2

Рівень антигемаглютинуючих та вірус нейтралізуючих антитіл в полівалентних сироватках до музейних штамів вірусів ЕСНО

Віруси	Середньоегеометричні титри РЗГА	Середньо геометричні титри антитіл РН
Полівалентна сироватка 1		
ЕСНО 3	1:316	1:316
ЕСНО 11	1:8913	1:1259
ЕСНО 13	1:1738	1:316
ЕСНО 19	1:240	1:368
Полівалентна сироватка 2		
ЕСНО 7	1:275	1:2512
ЕСНО 12	1:174	1:1259
ЕСНО 20	-	1:2512
ЕСНО 21	-	1:1585
Полівалентна сироватка 3		
ЕСНО 6	-	1:263
ЕСНО 24	-	1:891
ЕСНО 29	1:158	1:724
ЕСНО 30	-	1:550

Примітки: - титри антитіл в РЗГА до вірусів ЕСНО 6, 24, 20, 21, 30 не визначали тому, що прототипними штамми геаглютинуюча активність втрачена; РЗГА- реакція затримки геаглютинації; РН- реакція нейтралі-

зації.

В групі гемаглютинуючі віруси були ідентифіковані моновалентними сироватками в РЗГА та

результати підтверджені в реакції нейтралізації (РН). Результати наведені в Табл. 3.

Таблиця 3

Ідентифікація свіжоізолюваних вірусів ЕCHO полі- та моновалентними гаммаглобуліновими препаратами в РЗГА та в РН (кількість штамів)

Віруси	Полівалентні γ -глобуліни, РЗГА			Моновалентні γ -глобуліни, РЗГА	Підтверджено ідентифікацією в РН
	№ 1	№ 2	№ 3		
ЕCHO-3	7	-	-	7	7
ЕCHO-6	-	-	10	10	10
ЕCHO-7	-	1	-	1	1
ЕCHO-11	9	-	-	9	9
ЕCHO-12	-	1	-	1	1
ЕCHO-13	-	-	-	-	-
ЕCHO-19	1	-	-	1	1
ЕCHO-20	-	6	-	6	6
ЕCHO-21	-	-	-	-	-
ЕCHO-24	-	-	-	-	-
ЕCHO-29	-	-	-	-	-
ЕCHO-30	-	-	-	-	-
Всього	17	8	10	35	35

Наведені в таблиці результати свідчать про високу специфічність одержаних гаммаглобулінових полівалентних та моновалентних препаратів та про можливість їх використання для ідентифікації вірусів групи ЕCHO в РЗГА. Використання полівалентних гаммаглобулінових препаратів дозволяє проводити попереднє типування вірусів на 3 групи, що сприяє прискоренню ідентифікації гемаглютинуючих штамів групи ЕCHO.

Джерела інформації:

1. Ворошилова М. К., Жевандрова В. И., Балаян М. С. Методы лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций. «Медицина» Москва - 1964. С. 151.
2. Ворошилова М. К. Изучение кишечных вирусов в СССР. В кн Материалы к изучению энтеровирусных заболеваний и их последствий. Рига, 1962, С. 3-18.
3. Бароян О. В., Гайлонская И. Н., Григорьян И. К. Кишечные вирусы и их роль в кишечной патологии человека. Асептический серозный менингит. Советская медицина, 1961, №1., С. 53-64.

4. Todorov J. Заболевания гриппоподобного характера с респираторными проявлениями, связанные с энтеровирусной инфекцией. Труды НИИ эпидемиологии и микробиологии. Болгария. 1963, XI, 155-161.

5. Kouth V., et all. Die "Herpangina", Ehidemie 1967-1968 ECHO 3, 6, 30. Dtsch.vtd. Wschr. 1969, 94, 39, 1959-1965.

6. Инструкция по применению сывороток диагностических энтеровирусных, сухих моно- и поливалентных", утвержденной 16.10.1998 г. Управления лекарственных средств и медтехники.

7. Подоплекин В. Д., Подоплекина Л. Е. Опыт практического применения РЗГА для идентификации вирусов ЕCHO и определение уровня антител к ним в крови людей. В кн. Приготовление и применение вирусных препаратов. Материалы XX научной конференции, посвященные 60-летию Томского НИИВС, Томск, 1966, С. 16.