



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **71014** (13) **U**  
(51) МПК (2012.01)  
**A61B 10/00**  
**G01N 33/50** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2012 01011</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Волянський Андрій Юрійович (UA),</b> <b>Романова Олена Анатоліївна (UA),</b> <b>Попов Микола Миколайович (UA),</b> <b>Кучма Ірина Юріївна (UA),</b> <b>Крестецька Світлана Леонідівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>31.01.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.06.2012</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.06.2012, Бюл.№ 12</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ</b> <b>МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І.</b> <b>МЕЧНИКОВА АМН УКРАЇНИ",</b> вул. Пушкінська, 14, м. Харків, 61057 (UA)

**(54) СПОСІБ ЕКСПРЕСНОЇ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ЩЕПЛЕННЯ**

**(57) Реферат:**

Спосіб експресної оцінки ефективності щеплення передбачає дослідження стану імунореактивності в індуктивній фазі імуногенезу після вакцинації імуофлуоресцентним методом.

**UA 71014 U**



Корисна модель належить до імунології та вакцинології, зокрема є способом оцінки ефективності щеплення.

Стандартним методом оцінки ефективності щеплення є визначення рівня сироваткових антитіл, специфічних по відношенню до вакцинного антигену. Достовірне зростання цього рівня, в більшості випадків, спостерігається через місяць після вакцинації; тривалість та напруженість імунітету можна оцінити через 6-12 місяців. Відповідно, факт недостатньої ефективності вакцинації, що засвідчується при відсутності захисного титру антитіл, встановлюється в досить віддалені терміни.

Найближчим аналогом є спосіб експресної оцінки ефективності імунізації [1], в якому за рахунок використання методів лінійного регресійного аналізу динаміки імуногормональних взаємодій, забезпечується можливість розрахунку очікуваного рівня антитілогенезу за результатами дослідження сироваткових рівнів гормональних показників в індуктивній та/або на початку продуктивної фази імуногенезу. До суттєвих ознак цього способу, що збігаються з ознаками корисної моделі, яка заявляється, належать терміни проведення дослідження (індуктивна фаза імуногенезу), а також використання показників, що відображають певні тенденції в процесі формування специфічної імунної відповіді та, відповідно, мають певний рівень прогностичного значення.

До причин, що заважають отриманню бажаного технічного результату, при використанні найближчого аналога належить низький рівень придатності цього способу в клінічних умовах (досліджуваний масив даних, на основі якого розроблено алгоритм розрахунку очікуваного рівня антитілогенезу, отримано на лабораторних тваринах та потребує певної адаптації). Крім того застосування способу передбачає визначення різних сироваткових показників в різні терміни і при цьому дозволяє отримати лише короткочасний прогноз (на 7-14 добу після проведення дослідження).

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб оцінки ефективності щеплення, в якому за рахунок використання ранніх прогностично значущих маркерів імуногенності забезпечується отримання інформації стосовно очікуваної тривалості та напруженості поствакцинального імунітету.

Для вирішення поставленої задачі проведено комплексне імунологічне обстеження кількох груп пацієнтів, імунізованих різними вакцинними препаратами: "Інфлувак", стафілококова вакцина, АДП та корова вакцина. За характером індивідуальної реакції на щеплення, пацієнти кожної групи розподілено на 3 категорії: I - пацієнти, у яких вакцинація не була ефективною (титри антитіл через 6 місяців після імунізації були нижче захисних ( $<2,0$  МО/мл). Серед пацієнтів, у яких вакцинація була ефективною, окремо виділено категорію щеплених (III), в якій титри специфічних по відношенню до вакцинного антигену антитіл більш ніж в п'ять разів перевищували мінімальний захисний рівень.

В прикладі 1 наведено дані щодо розподілу індивідуальної реактивності в групі 20-22 річних молодих людей після імунізації стафілоковою вакциною.

Аналіз кореляції між рівнем ефективності вакцинації та показниками імунного статусу в індуктивній фазі імуногенезу дозволив виявити інформативні критерії з достатньо високим рівнем прогностичної цінності, до яких, зокрема, належать рівень експресії та щільність TLR2 на субпопуляції моноцитів периферичної крові (МПК) з фенотипом  $CD14^{+}CD16^{+}$ .

TLRs (toll-like receptors(s)) - група мембранних рецепторів, що експресуються багатьма типами клітин імунної системи (зокрема всіма відомими типами антигенпрезентуючих клітин, а також окремими типами В лімфоцитів) та відіграють важливу роль в процесі індукції антигенспецифічної адаптивної імунної відповіді. TLR2 здатні розпізнавати найширший спектр PAMPs (консервативних патогенасоційованих молекулярних патернів) як самостійно, так і в складі гетеродимерних комплексів з іншими TLRs.

CD 16, що є IgG Fcγ рецептором типу IIIA (FcγRIIIA), належить до індукцйбельних поверхневих молекул, які експресуються клітинами моноцитарно-макрофагального ряду на певній стадії диференціації та відіграють суттєву роль в процесі індукції імунної відповіді [2].  $CD16^{+}CD14^{+}$  моноцити вважаються проміжною стадією між  $CD14^{++}CD16^{-}$  моноцитами та  $CD14^{low}CD16^{-}$  макрофагами, експресують більшу кількість HLA-DR та мають вищий рівень антигенпрезентуючої активності у порівнянні з більш чисельною популяцією  $CD14^{++}CD16^{+}$  [3]. Відомо, що  $CD14^{dim}CD16^{+}$  моноцити експресують більш високі рівні TLR2 [4], що дозволяє припустити наявність певного зв'язку між рівнем експресії TLR2, функціональним станом індуктивних механізмів імуногенезу та, відповідно, очікуваною ефективністю антигенспецифічної імунної відповіді.

Проведене дослідження експресії TLR2 CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клітинами протягом першого місяця після вакцинації показало наявність достовірних відмінностей у різних за характером індивідуальної реакції на щеплення категоріях пацієнтів (табл. 1).

5 Як видно з наведених даних, щільність експресії TLR2 мала тенденцію до зниження протягом другого та третього тижня спостереження, більш виражену у пацієнтів I категорії у відповідь на Інфлувак та антистафілококову вакцину.

Таблиця 1

Рівень експресії TLR2 клітинами  
моноцитарно-макрофагального ряду протягом першого місяця після вакцинації

Вакцина	Категорії	TLR2			
		7	14	21	30
1	2	3	4	5	6
Інфлувак	I	** $20,7 \pm 2,4$	** $28,1 \pm 3,4$	* $26,3 \pm 3,1$	* $16,5 \pm 2,8$
	II	*** $38,5 \pm 4,6$	** $52,5 \pm 5,1$	* $49,9 \pm 5,3$	* $36,5 \pm 3,6$
	III	*** $40,7 \pm 4,1$	*** $61,2 \pm 7,3$	** $53,5 \pm 4,0$	* $42,5 \pm 3,1$
Антистафілококова вакцина	I	** $29,8 \pm 3,2$	** $34,7 \pm 4,1$	* $31,1 \pm 5,2$	* $23,8 \pm 3,3$
	II	*** $41,3 \pm 4,5$	*** $56,8 \pm 6,3$	** $53,1 \pm 5,6$	* $43,2 \pm 4,9$
	III	*** $43,2 \pm 4,8$	*** $64,3 \pm 2,8$	*** $50,1 \pm 2,6$	** $39,2 \pm 4,1$
АДП	I	*** $38,1 \pm 2,1$	** $45,1 \pm 2,1$	* $42,5 \pm 3,1$	* $39,2 \pm 3,7$
	II	*** $41,1 \pm 5,3$	*** $59,8 \pm 7,2$	*** $53,4 \pm 5,1$	** $39,6 \pm 3,8$
	III	*** $50,1 \pm 6,6$	*** $67,7 \pm 7,8$	*** $59,3 \pm 5,6$	** $41,3 \pm 4,1$
Протикорова вакцина	I	** $29,9 \pm 3,2$	** $36,7 \pm 4,1$	* $31,3 \pm 3,2$	* $23,8 \pm 3,3$
	II	*** $42,3 \pm 4,2$	*** $56,8 \pm 6,3$	*** $53,1 \pm 5,6$	** $37,2 \pm 3,6$
	III	*** $51,3 \pm 4,2$	*** $60,3 \pm 3,2$	*** $56,5 \pm 2,8$	** $41,3 \pm 4,4$
Контроль		* $10,4 \pm 1,1$	* $12,1 \pm 1,3$	* $9,3 \pm 1,4$	* $8,5 \pm 1,8$

Примітка: під ризикою - відсоток клітин, які експресують TLR2;

над ризикою - щільність експресії TLR2 на клітині,

\*\*\* - висока (у >50 % клітин інтенсивність флюоресценції 0,41-0,60 в.о),

\*\* - середня (у >50 % клітин інтенсивність флюоресценції 0,21-0,40 в.о),

\* - низька (у >50 % клітин інтенсивність флюоресценції 0,05-0,20 в.о).

Контроль: група (n=40) здорових невакцинованих осіб 25-43 років.

10 На 21 добу після вакцинації у пацієнтів цієї категорії у всіх дослідних групах інтенсивність флюоресценції >50 % клітин знаходилась у межах 0,05-0,20 в.о., в той час як у пацієнтів II категорії аналогічний рівень цього показника спостерігався лише в групі, що отримувала Інфлувак.

15 За відсотком клітин, що експресують TLR2 у всіх групах та категоріях пацієнтів відзначено зростання на 14-21 добу спостереження, однак в I категорії це зростання не перевищувало 50 %, в той час як в межах II категорії показник, нижчий за 50 % ( $49,9 \pm 5,3$ ) спостерігався тільки

на 21 добу в групі, що отримувала Інфлувак. Таким чином, максимальну прогностичну цінність має показник рівня експресії TLR2 на 14 добу після вакцинації.

Показник інтенсивності флуоресценції в цей термін може бути використаний як додатковий критерій з певними обмеженнями - при оцінці ефективності вакцинації інфлуваком, та, імовірно, іншими протигрипозними вакцинами, його застосування недоцільно.

Таким чином, до суттєвих ознак корисної моделі, що заявляють, належить проведення дослідження рівня експресії TLR2 популяцією моноцитів периферійної крові з фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> на 14 добу після вакцинації; застосування як дискримінативного критерію 50 % рівня TLR2 позитивних клітин; застосування в окремих варіантах здійснення корисної моделі показника, що відображає щільність експресії.

Крім того, масив даних, за результатами аналізу яких встановлено граничні значення, використані при розробці способу, що заявляється, отримано з використанням імунофлуоресцентного методу. У зв'язку з цим, незважаючи на можливість визначення ступеня експресії досліджуваних поверхневих структур і іншими способами, застосування імунофлуоресцентного аналізу слід вважати суттєвою ознакою, необхідною при всіх варіантах здійснення корисної моделі.

Спосіб здійснюється наступним чином:

На 14 добу після вакцинації проводиться дослідження експресії TLR2 популяцією моноцитів периферійної крові з фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> методом проточної цитофлуориметрії з використанням мічених флуоресцентними барвниками моноклональних антитіл до досліджуваних поверхневих структур (стисло методик викладено в прикладі 2).

За умови, якщо серед CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитів відсоток TLR2-позитивних клітин не перевищує 50, робиться висновок про високу імовірність недостатньої ефективності вакцинації. як додатковий критерій можливо використання показника інтенсивності флуоресценції: низька ефективність вакцинації прогнозується у випадку, коли у >50 % TLR2 позитивних CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клітин інтенсивність флуоресценції не перевищує 0,40 в.о.

Приклад 1. Розподіл індивідуальної реактивності в групі 20-22 річних молодих людей після імунізації стафілококовою вакциною

Таблиця 2

Титри антистафілококових АТ (МО/мл) протягом року після вакцинації

Щеплені (групи)	N=50	До імунізації	Терміни після імунізації		
			1 міс.	6 міс.	12 міс.
1	6 чоловік	0,57±0,06	2,3±0,3	1,9±0,2	0,70±0,08
2	40 чоловік	0,75±0,08	7,4±0,8	5,1±0,6	1,2±0,1
3	4 людини	0,83±0,08	13,1±1,4	10,6±1,1	1,6±0,2

Приклад 2.

Експресію TLR2 на популяції CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитів периферійної крові визначали методом проточної цитофлуориметрії з використанням FITC-кон'югованих анти-CD14, Alexa Fluor 647-мічені анти-CD16 антитіла (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) та PE-мічені анти-TLR2 антитіла (e-Biosciences, San Diego, CA, USA).

До 100 мл цільної крові додавали по 10 мл анти-CD14, анти-CD16 та анти-TLR2 або ізотоп-контрольні антитіла, інкубували 15 хвилин при кімнатній температурі в темряві, додавали 2 мл FACS лізуючого розчину (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) для лізису еритроцитів, витримували 15 хвилин, відмивали двічі у фосфатно-сольовому буфері, після чого клітини ресуспендували в 0,5 мл 1 % параформальдегіду та аналізували на проточному цитофлуориметрі FACSCalibur. Визначали відсоток TLR2-позитивних CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитів та середню інтенсивність флуоресценції.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Патент: 39026 (UA) МПК: А61В 10/00 (2006.01), G01N 33/50 (2006.01) Спосіб експресної оцінки ефективності імунізації/ Волянський Андрій Юрійович; Симиренко Людмила Львівна; Кучма Ірина Юріївна; Цейтлін Натан Абрамович; Крестецька Світлана Леонідівна; власник ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА АМН УКРАЇНИ" (UA).-3. № U200809004; дата подання 09.07.2008, опубліковано 26.01.2009, бюл. № 2/2009

2. Ravetch J.V. IGG FC receptors/ Jeffrey V. Ravetch, Silvia Bolland// Annual Review of Immunology. - Vol. 19. - P. 275-290. - DOI: 10.1146/annurev. immunol. 19.1.275

3. Ziegler-Heitbrock L. The CD 14+CD 16+blood monocytes: their role in infection and inflammation. / L. Ziegler-Heitbrock // Leukoc Biol.-2007. - V 81. - N 3. - P. 584-592. - doi: 10.1189/jlb.0806510

5 4. Iwahashi M. Expression of Toll-like receptor 2 on CD 16+blood monocytes and synovial tissue macrophages in rheumatoid arthritis./ M. Iwahashi, M. Yamamura, T. Aita, A. Okamoto, A. Ueno, N. Ogawa, S. Akashi, K. Miyake, P.J. Godowski, H.Makino //Arthritis Rheum.-2004. - V 50. - N 5. - P. 1457-1467.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

10

1. Спосіб експресної оцінки ефективності щеплення, що передбачає дослідження стану імунореактивності в індуктивній фазі імуногенезу, який **відрізняється** тим, що на 14 добу після вакцинації імуофлуоресцентним методом визначають показники експресії TLR2 популяцією моноцитів периферичної крові з фенотипом CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> і, якщо відсоток TLR2-позитивних клітин не перевищує 50, робиться висновок про високу імовірність недостатньої ефективності вакцинації.

15

2. Спосіб за п. 1, в якому додатково використовують показник інтенсивності флюоресценції: низька ефективність вакцинації прогнозується у випадку, коли у >50 % TLR2 позитивних CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клітин інтенсивність флюоресценції не перевищує 0,40 в.о.

20

---

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

---

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