ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS OBJAVU K DIPLOMU

35

Prihlásené: 30 09 81 /PO 71-81/
Právo prednosti od 30 09 81
Zverejnené: Acta virol. 24, 72-75 /1980/
24, 455-458 /1980/

Udelené: 20 02 86
Vydané: 15 06 86

MDT 576.858

Autorky objavu: GREŠÍKOVÁ MILOTA MUDr. DrSc., členka korešpondentka ČSAV a SAV,
SEKEYOVÁ MAGDALÉNA PhMr., BIELIKOVÁ VALÉRIA, BRATISLAVA

Názov objavu: **Kmeň vírusu kliešťovej encefalitídy Skalica**

Predmet objavu:

1. Jav spočívajúci v existencii nového prírodného kmeňa vírusu kliešťovej encefalitídy, nazvaného autorkami Skalica.

2. Vlastnosť nového prírodného kmeňa uvedeného v bode 1 spočívajúca v schopnosti tvoriť malé plaky a v neschopnosti vyvolávať cytopatický efekt na línii prasačích obličkových buniek (skratka PS), v termolabilite, v nízkej patogenite po subkutánnej inokulácii bielym dospelým myšiam a v nízkej virémii u hostiteľov, t. j. kmeň Skalica má vlastnosti podobné oslabeným kmeňom arbovírusov.

Objav sa týka nového prírodného kmeňa vírusu kliešťovej encefalitídy, ktorý sy vyznačuje vlastnosťami zhodnými s atenuovanými kmeňmi arbovírusov.

Izolácia vírusu: Od r. 1974 sa skúmali vlastnosti novoizolovaných kmeňov vírusu kliešťovej encefalitídy.

V marci 1974 se odchytalo na Západnom Slovensku /okres Skalica/ 190 drobných hlodavcov. Pokusy o izoláciu vírusu sa robili z orgánov drobných hlodavcov /krv, slezina, pečeň a mozog/. Zo sleziny, pečene a mozgu drobných hlodavcov /Clethrionomys glareolus, Apodemus flavicollis, Apodemus sylvaticus, Pitymys subterraneus, Microtus arvalis a Sorex araneus/ sa pripravovali 10 %-né suspenzie v Earlovom roztoku s prímesou laktalbumínhydrolyzátu, antibiotík a 10 % inaktivovaného séra. Suspenzie sa centrifugovali počas 20 minút pri 2 000 otáčkach za minútu. Tekutina nad úsadkom sa stiahla a inokulovala intracerebrálne (ic) po 0,01 ml na 2- až 3-dňové biele cicajúce myši. Krv odobratá od drobných hlodavcov zo sinus orbitalis sa ihneď zmrazila a pred pokusom sa riedila 1:5 v Earlovom roztoku a inokulovala intracerebrálne po 0,01 ml na 2- až 3-dňové biele cicajúce myši.

Z orgánov Clethrionomys glareolus /hrdziak horny/ sa zachytili 4 kmene vírusu: Jeden kmeň vírusu /č. 53, ktorý je uložený v zbierke Virologického ústavu SAV v Bratislave/ sa izoloval z krvi Cl. glareolus v prvej myšej pasáži; Inkubačná doba v 1. pasáži bola 9 dní a v ďalších pasážach sa skrátila na 5 až 6 dní. Vírusový hemaglutinín sa získal v 4. myšej pasáži a mal titer 1 280 pri pH 6,4.

Ďalší kmeň vírusu /č. 14, ktorý je uložený v zbierke Virologického ústavu SAV v Bratislave/ sa izoloval z mozgu Cl. glareolus v prvej myšej pasáži: inkubačná doba bola 8 dní; v ďalších pasážach sa skrátila na 5 dní. Vírusový hemaglutinín sa získal v 4. myšej pasáži a mal titer 1 280 pri pH 6,4.

Ďalšie dva kmene vírusu /č. 21 a č. 36, ktoré sú uložené v zbierke Virologického ústavu SAV v Bratislave/ sa izolovali z mozgov Clethrionomys glareolus v druhej myšej pasáži; inkubačná doba bola 5 až 6 dní. Vírusový hemaglulitín u oboch kmeňov mal titer 2 560 pri pH 6,4.

Izolované kmene sa identifikovali pomocou referenčných imúnnych sér k vírusu kliešťovej encefalitídy a k vírusu West Nile. Antigény, pripravené z izolátov č. 53, 14, 21 a 36 /ktoré sú uložené v zbierke Virologického ústavu SAV v Bratislave/ reagovali s antisérom ku kliešťovej encefalitíde v titroch 320 až 640, pričom prototypový kmeň reagoval v titre 1 280.

Ďalšia identifikácia vírusu sa robila pomocou komplement-fixačného testu. Ani v komplement-fixačnej reakcii sa nezistili podstatné rozdiely medzi kmeňmi č. 53, 21, 14, 36 navzájom a prototypovým kmeňom (Grešíková, M., Mrciak, M., Brtek, V. and Sekeyová, M.: Isolation and identification of tick-borne encephalitis virus from a bank vole /Clethrionomys glareolus/ trapped in the vicinity of Radimovsky forest /Western Slovakia/ pp. 105 až 110. Internat Arbeitskolloquium über Naturherde von Infectionskrankheiten in Zentraleuropa. Graz 25. 2. až 28. 2. 1976).

Preto sa v ďalších pokusoch používal len kmeň č. 53, ktorý bol izolovaný v krvi Clethrionomys glareolus. Kmeň bol označený podľa okresu, kde sa izoloval, Skalica.

Ďalšia selekcia kmeňa bola robená metódou 3 konečných riedení na bielych cicajúcich myšiach.

Vlastnosti kmeňa: Izolovaný kmeň vírusu kliešťovej encefalitídy Skalica sa odlišoval v niektorých biologických vlastnostiach ako od prototypového, tak aj od novoizolovaných kmeňov vírusu kliešťovej encefalitídy. Kmeň Skalica vytvára malé plaky pod agarom, je termosenzitívny a nepatogénny po subkutánnej /ďalej sc/ inokulácii dospelým bielym myšiam, na rozdiel od prototypového a novoizolovaných kmeňov vírusu kliešťovej encefalitídy, ktoré vytvárajú veľké plaky, sú termorezistentné a patogénne po sc inokulácii dospelým bielym myšiam (Grešíková, M., Sekeyová, M., 1980: Characteristic of some tick-borne encephalitis virus strains isolated in Slovakia. Acta virol. 24, 72 až 75). Na základe týchto vlastností možno kmeň Skalica považovať za prirodzený variant vírusu kliešťovej encefalitídy so zníženou virulenciou ako vidno z tabuľky 1.

Rozlíšenie kmeňov kliešťovej encefalitídy /Skalica a prototypový kmeň Hypr/ pomocou niektorých biologických vlastností.

Marker	Kmeň Skalica	Kmeň Hypr
Veľkosť plakov	0,75 mm p^-	1,5 mm p^+
Cytopatický účinok na PS bunkách	nevyvoláva CPE CPE^-	vyvoláva CPE CPE^+
Termostabilita	termolabilný t^-	termostabilný t^+
Virulencia pre dospelé biele myši po sc inokulácii	nepatogénny sc^-	patogénny sc^+
Virémia u dospelých hostiteľov	krátkotrvajúca stopová v^-	dlhotrvajúca intenzívna v^+

V porovnávacích štúdiách vlastností vírusu Skalica sa použil novoizolovaný kmeň vírusu kliešťovej encefalitídy označený protokolovým číslom 204, ktorý sa izoloval v roku 1975 na Devínskej ceste (okres Bratislava), z kliešťov Ixodes ricinus. Uvedený kmeň je virulentný po sc inokulácii bielym dospelým myšiam a je uložený v zbierke kmeňov Virologického ústavu SAV pod číslom 204.

Kmeň Skalica vyvoláva u dospelých jedincov Clethrionomys glareolus, Apodemus sylvaticus, A. flavicollis, Microtus arvalis a Pitymys subterraneus len stopovú virémiu. nedostetočnú k infekcii vektorov, zatiaľ čo novoizolovaný kmeň vírusu kliešťovej encefalitídy (204) vyvoláva intenzívnu virémiu postačujúcu k infekcii vektorov, ako ukazuje tabuľka 2.

(Kožuch, O., Čunichin, S. P., Grešíková, M., Nosek, J., Kurenkov, V. B., Lysý, J., 1981: Experimental charakteristics of viraemia caused by two strains of tick-borne encephalitis virus in small rodents. Acta virol. 25, 219 až 224).

Tabulka 2

Virémia u Clethrionomys glareolus a Apodemus flavicollis, infikovaných kmeňmi vírusu kliešťovej

Experimentálny hostiteľ	Kmeň Skalica Titer vírusu v krvi /log LD_{50}/ na 0,01 ml/ v dňoch po infekcii				Experimentálny hosti
	1	2	3	4	
A. flavicollis 2	1	1	0	0	A. flavicollis 6
A. flavicollis 3	1	0	0	0	A. flavicollis 7
A. flavicollis 4	0	1	1	0	A. flavicollis 8
A. flavicollis 5	1	1	0	0	A. flavicollis 9
Cl. glareolus 1	1	0	0	0	A. flavicollis 10
Cl. glareolus 2	0	0	0	0	Cl. glareolus 6
Cl. glareolus 3	0	0	0	0	Cl. glareolus 7
Cl. glareolus 4	0	0	0	0	Cl. glareolus 8
Cl. glareolus 5	0	0	0	0	Cl. glareolus 9

Pri porovnávaní antigénnych vlastností vírusu Skalica sa použil novoizolovaný kmeň vírusu kliešťovej encefalitídy, izolovaný z kliešťov Ixodes ricinus na lokalite Nemečky (okres Topoľčany), ktorý je uložený v zbierke kmeňov Virologického ústavu SAV pod prototypovým číslom Ir 13.

Na základe štúdií antigénnych vlastností kmeňa vírusu Skalica sa zistilo, že tento kmeň možno odlíšiť pomocou kinetiky hemaglutinačno-inhibičného (tabuľka 3) a komplement-fixačného testu (tabuľka 4) od prototypového kmeňa vírusu kliešťovej encefalitídy /Hypr/, od novoizolovaného kmeňa tohto vírusu Ixodes ricinus 13 (ďalej Ir 13) (Grešíková, M., Sekeyová, M., 1979: Some aspects on biological and natigenic properties of freshly isolated tick-borne encephalitis virus strains. International symposium on tick-borne encephalitis. Baden near Vienna, October, 19 až 20).

Ďalšie porovnania antigénnych vlastností vírusov komplexu kliešťovej encefalitídy sa robili pomocou hemaglutinačne-inhibičného testu za použitia monoklonálnych protilátok pripravených ku kmeňu Skalica; ukázala sa antigénna odlišnosť vírusov z komplexu kliešťovej encefalitídy izolovaných v Eurázii od vírusu Powassan, izolovanom na Americkom kontinente (Grešíková, M., Sekeyová, M., 1984: Antigenic relationships among viruses of the tick-borne encephalitis complex as studied by monoclonal antibodies. Acta virol. 28, 64 až 68).

Kmeň Skalica nezmenil svoje vlastnosti ani po pasáži v kliešťoch Ixodes ricinus [Grešíková, M., Nosek, J., 1983: Marker stability of the Skalica strain (from the tick-borne encephalitis complex) propagated in Ixodes ricinus ticks. Acta virol. 27, 180 až 182]

T a b u ľ k a 3

Rozlíšenie kmeňa Skalica od prototypového kmeňa Hypr a novoizolovaného kmeňa kliešťovej encefalitídy Ir 13 pomocou kinetiky hemaglutinačno-inhibičného testu

Riedenia séra	Čas expozície	HI titre so sérom pacienta			HI titre s referenčným sérom ku kliešťovej encefalitíde		
		Antigén			Antigén		
		Hypr	Ir 13	Skalica	Hypr	Ir 13	Skalica
40		32	16	4	16	16	4
80		4	4	0	4	4	0
	30 minút						
160		0	0	0	0	0	0
320		0	0	0	0	0	0
40		32	32	4	16	32	4
80		8	16	0	8	8	0
	2 hodiny						
160		0	4	0	0	4	0
320		0	0	0	0	0	0
40		32	32	4	32	32	4
80		16	16	0	8	16	0
	4 hodiny						
160		4	4	0	4	4	0
320		0	0	0	0	0	0
640		0	0	0	0	0	0

Pokračovánie tabuľky 3

Riedenie séra	Čas expozície	HI titre so sérom pacienta			HI titre s referenčným sérom ku kliešťovej encefalitíde		
		Antigén			Antigén		
		Hypr	Ir 13	Skalica	Hypr	Ir 13	Skalica
40		32	32	8	32	32	4
80		32	32	4	16	16	4
160		16	16	0	8	8	0
	24 hodín						
320		8	8	0	4	4	0
640		0	4	0	0	0	0
1 280		0	0	0	0	0	0

T a b u ľ k a 4

Rozlíšenie kmeňa Skalica od prototypového kmeňa Hypr a od novoizolovaného kmeňa vírusu kliešťovej encefalitídy Ir 13 pomocou kinetiky komplement-fixačného testu.

Čas expozície v hodinách	Komplement-fixačný titer s antisérom		
	Prototypový Antigén Hypr	IR 13 Antigén	Skalica Antigén
1	0	8/8+	0
2	0	16/16	0
4	8/4	16/16	0
18	16/16	64/32	8/4

+Titer séra/titer antigénu

Ir 13 = Kmeň vírusu kliešťovej encefalitídy izolovaný z kliešťov Ixodes ricinus na lokalite Nemečky

V praxi sa doteraz používali plne virulentné kmene vírusu kliešťovej encefalitídy, alebo kmeň Langat, ktorý bol izolovaný v Malajsku.

Kmeň Skalica, ktorý je predmetom objavu, odstraňuje nevýhody doteraz používaných kmeňov vírusu kliešťovej encefalitídy: má znížený virulenciu a bol izolovaný na Slovensku.

Hlavnou výhodou nového kmeňa vírusu kliešťovej encefalitídy z hľadiska bezpečnosti pri práci je možnosť jeho použitia vo virologických laboratóriach na prípravu zásobných suspenzií, antigénov i pre prípravu vakcíny proti kliešťovej encefalitíde.

Klasifikácia: Kmeň vírusu kliešťovej encefalitídy Skalica patrí do čeľade Togaviridae, rod Flavivirus; podľa antigénnych vlastností je zaradený do skupiny B arbovírusov. V hemaglutinačno-inhibičnom teste reaguje skrížene s arbovírusmi B skupiny.

Vírus obsahuje jednovláknitú ribonukleovú kyselinu o relatívnej molekulovej hmotnosti $3 . 10^6$.

Morfológia: Vírusový obal obsahuje lipidy; vírus je citlivý na pôsobenie éteru, chloroformu, ako i sodnej soli kyseliny deoxycholátovej. Optimálne pH vírusu je 7,6 až 8,2.

Po purifikácii vírusu sú viditeľné partikule 60 až 70 nm s výbežkami.

Vírus sa inaktivuje vo fyziologickom roztoku pri teplote 55 °C: pri kultivácii kmeňa Skalica na kuracích embrynálnych bunkách pri teplote 40 až 43 °C dochádza k nízkej produkcii vírusu na rozdiel od prototypového kmeňa vírusu kliešťovej encefalitídy a novoizolovaného kmeňa /Ixodes ricinus 13/ (Grešíková, M., Sekeyová, M.: 1980: Characteristic of some tick-borne encephalitis virus strain isolated in Slovakia, Acta virol. 24, 72 až 75).

Kmeň Skalica obsahuje hemaglutinín. Hemaglutinačná aktivita je optimálna pri pH 6,4 až 6,6.

Vírus sa syntetizuje v cytoplazme vnímavých buniek; pre kultiváciu vírusu sa použili kuracie embryonálne bunky. Vírus vyvoláva melé plaky na kuracích embryonálnych bunkách (Chunikin, S. D., Grešíková, M., Dzivanyan, T., Nosek. J., Sekeyová, M., Kužuch, O., Kurenkov, V., and Lashkevich, V.: Attempts to determine geographic distribution of tick-borne encephalitis virus strains by use of two biological markers. Proceedings International Symposium: "New aspects in ecology of arboviruses" Inst. Virol. SAV, Bratislava 1980, 153 až 159).

Cicajúce biele myši sú najvnímavejšie experimentálne zvieratá pre kmeň Skalica vírusu kliešťovej encefalitídy Rajčáni, J., Grešíková, M., 1982: Pathogenicity of the Skalica strain [(from the tick-borne encephalitis complex) for white mice. Acta virol. 26: 264 až 269].

Vírus sa množí aj na orgánových kultúrach kuracích embryí, kde na 3. deň po inokulácii titer vírusu dosahuje hodnôt 8,5 intracerebrálnych (ic) myších LD_{50}/0,01 ml. Vírus sa rozmnožuje in vitro aj v orgánových kultúrach bielych cicajúcich myší (Grešíková, M., Sekeyová, M., 1980: In vitro cultivation studies on the Skalica strain of tick-borne encephalitis virus. Acta virol, 24: 455 až 458).

Príklad kultivácie:

Kmeň sa udržuje intracerebrálnym pasážovaním na cicajúcich bielych myšiach. Pripravuje sa 10 %-ná suspenzia z mozgov cicajúcich bielych myší v bazálnom Eaglovom médiu, s prímesou 10 % fetálneho telacieho séra a antibiotík. Suspenzia sa centrifuguje pri 10 000 otáčkach za minútu a supernatant sa lyofilizuje. Ako inoklum sa používa lyofilizovaná suspenzia v riedení 10^{-2}; objem inokula je 0,01 ml. Myšky sa pitvú na 3 až 4 deň po inokulácii, po objavení sa príznakov encefalitídy.

Ďalšia možnosť kultivácie je na vyrastených 1- až 2-dňových tkanivových kultúrach z kuracích embryonálnych buniek; inokulum obsahuje 0,1 ml vírusovej suspenzie (1 ml, riedenej 10^{-2}. Kultivácia prebieha 2 až 3 dni pri teplote 37 °C. Potom sa médium stiahne, scentrifuguje počas 20 min pri 2 000 otáčkach za minútu, skoncentruje a vyčistí diferenciálnou centrifugáciou (sedimentácia pri 25 000 otáčkach za minútu počas 2 h, vyčírenie pri 2 000 otáčkach za minútu, 20 minút, opätovná sedimentácia pri 25 000 otáčkach za minútu, koncentrácia do sto krát menšieho objemu a vyčírenie pri 2 000 otáčkach za minútu 20 min). Skoncentrovaný vírus sa zlyofilizuje.

Kmeň vírusu kliešťovej encefalitídy označený Skalica je uložený do zbierky kmeňov Virologického ústavu SAV, oddelenia ekológie vírusov pod číslom 53.

Kmeň tohto vírusu sa dá využiť v zdravotníctve na prípravu vakcíny proti kliešťovej encefalitíde. Ďalšia možnosť použitia je pri príprave diagnostických preparátov ku kliešťovej encefalitíde s kmeňom Skalica, t.j. antigénov a imúnnych sér ku všetkým kmeňom vírusu kliešťovej encefalitídy.

Poznatky objavu tvoria podstatu vynálezov, ktorým boli udelené čs. autorské osvedčenia: AO 222 011, AO 230 070, AO 230 288, AO 230 296, AO 233 279.

Severografia, n. p., MOST

Cena 2,40 Kčs