

## АНАЛІЗ МЕТОДІВ АНТИРАБІЧНОГО СЕРОЛОГІЧНОГО МОНІТОРИНГУ

**Дрожже Ж.М.**, завідувач вірусологічним відділом ДНДІЛДВСЕ

**Нікітова А.П.**, аспірант

**Недосєков В.В.**, д.вет.н., професор

**Мартинюк О.Г.**, к.вет.н., асистент

НУБіП України, м. Київ

**Полупан І.М.**, к.вет.н., ст.н.співр.

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

*В статті розглянуто важливість застосування серологічних досліджень у тварин та проведено порівняльний аналіз існуючих методів визначення ВНА до вірусу сказу. Розроблено систему оцінки імунного статусу тварин, вакцинованих проти сказу, здійснено контроль ефективності антирабічних вакцин. Розроблено оптимальний метод для визначення ВНА, а також наведено результати випробування модифікованого RFFIT у культурі клітин нирки сайги (НС) та встановлено його простоту у виконанні, безпечність, високу чутливість та економічність.*

***Ключові слова:** антирабічна вакцина, антирабічні антитіла, культура клітин, ступінь кореляції.*

**Постановка проблеми.** В умовах погіршення поточної ситуації щодо сказу, основним ефективним методом його контролю є специфічна профілактика. З цією метою використовують високоімуногенні інактивовані вакцини, які складають основу профілактики захворювання.

Нині біологічною промисловістю виробляють ряд таких інактивованих антирабічних моновакцин, як: «Рабізин» (Новогалещенська біофабрика), вакцини зі штаму «Щолково-51» (Сумська державна біофабрика), вакцину зі штаму «Щолково-51 К» (Херсонська державна біофабрика), «Рабістар» (ТОВ «Укрветпромстач»). Разом з тим в Україні застосовують вакцини закордонних виробників: «Nobivac Rabies» (Нідерланди), «Дефензор-3» (США) та «Біокан Р» (Чеська республіка) [4].

Не дивлячись на такий широкий арсенал біопрепаратів, аналіз епізоотичної ситуації засвідчує, що застосування лише високоактивних вакцин та ефективних схем імунізації недостатньо, що пов'язано з гетерогенністю популяційного та індивідуального захисту тварин не зважаючи на однаковий ступінь проведеної імунізації [3].

Крім того, не менш важливим питанням залишається достовірність оцінки антирабічного імунітету (метод тестування, спосіб оцінки результатів).

**Аналіз останніх досліджень.** Аналіз літературних джерел дозволив встановити, що імунітет визначається шляхом оцінки клітинного та гуморального факторів, так перший полягає у визначенні вмісту лімфоцитів та їх субпопуляцій – за розеткоутворенням з еритроцитами барана, співвідношення яких має важливу роль для оцінки стану цієї ланки імунітету. Також проводять визначення функціональної активності фагоцитуючих клітин крові, а функціональну активність Т- і В-лімфоцитів досліджують в реакції бластної трансформації (РБТЛ) [5].

Гуморальними факторами антирабічного імунітету є інтерферони, С-реактивний білок крові, білки системи комплементу, лізоцим, трансферін, білки, що виділяються клітинами імунної системи за специфічної її активації (інтерлейкіни, специфічні антитіла різних класів, тощо).

Однак, найважливіша захисна роль при сказі належить віруснейтралізуючим антитілам, визначення рівнів яких дозволяє встановити ефективність антирабічної вакцинації тварин для прогнозування епізоотичної ситуації щодо сказу.

Крім того, серологічні дослідження рандомізованої популяції собак, які ми проводили в Москві, Смоленську та Києві, дозволили встановити, що від 46 до 77 % тварин не мають протективного рівня віруснейтралізуючих антитіл, що становить серйозну загрозу життю людини і підтверджує необхідність проведення серологічного моніторингу [2].

Слід відмітити, що з 1 жовтня 2004 р. заборонено ввіз тварин на територію країн ЄС без сертифіката, що засвідчує наявність проективного рівня антирабічних антитіл у сироватках крові досліджених тварин.

Таким чином, оцінка рівня антирабічних антитіл є не лише необхідним заходом при визначенні ефективності антирабічної вакцинації та безсумнівним фактором при оцінці індивідуального імунітету.

**Мета досліджень:** проаналізувати існуючі методи визначення титру антирабічних антитіл та розробити оптимальний метод для тестування сироваток крові тварин, вакцинованих проти сказу.

**Матеріали і методи.** Для серологічного моніторингу було досліджено 472 проби сироватки крові від м'ясоїдних тварин (268 проб від собак, 98 проб від котів та 106 проб від лисиць). В експериментах використовували тест-систему Platelia Rabies Kit II виробництва Bio-Rad та обладнання для проведення імуноферментного аналізу. Для постановки FAVN використовували перещеплювальну культуру клітин нирки сирійського хом'яка – ВНК 21/13, тест-штам CVS вірусу сказу, позитивну та негативну референтну сироватку МЕБ до вірусу сказу, FITC-кон'югат (антирабічний моноклональний глобулін) виробництва FDI Diagnostics, інвертований люмінесцентний мікроскоп.

FAVN проводили як описано в Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines [11], ІФА згідно з листівкою-вкладкою до тест-системи.

Діагностичну чутливість та специфічність визначали за формулами:

$$\text{Діагностична чутливість} = \frac{ПП}{ПП + ХН} \cdot 100 \% \quad (7)$$

$$\text{Діагностична специфічність} = \frac{IH}{IH + ХП} \cdot 100 \% \quad (8), \text{ де}$$

ІІ – істинно позитивні результати;

ІН – істинно негативні результати;

ХН – хибно негативні результати;

ХП – хибно позитивні результати [11].

Модифікацію RFFIT розроблювали у культурі клітин нирки сайги (НС) з використанням вакцинного штаму ТС-80 вірусу сказу. Методика постановки тесту передбачала два варіанти: суміш «вірус - сироватка» вносили до моношарової культури клітин або безпосередньо до суспензії клітин при їх посіві. Репродукцію вірусу сказу визначали з використанням методу флуоресцентних антитіл.

Кореляцію значень титрів антирабічних антитіл визначали комп'ютерною програмою Excel.

**Результати дослідження.** У світовій практиці існує понад 15 методів визначення рівня антирабічних антитіл і тому регіональним лабораторіям досить важко віддати перевагу тому чи іншому тесту [1, 3].

Першим методом визначення антитіл до вірусу сказу є реакція нейтралізації (РН) *in vivo* (на мишах), розроблена L.T. Webster та J.R. Dawson. Цей метод використовується більш як 60 років та є референс-тестом, який володіє високою чутливістю і точністю визначення віруснейтралізуючих антирабічних антитіл.

Незважаючи на доведені часом та практикою переваги даного тесту, він має деякі недоліки: використання вірулентного вірусу, штам CVS, тривалий період аналізу (15-21 діб), відносно висока вартість тварин, тощо.

На основі цього комітет експертів ВООЗ із сказу з 1973 р. у своїх доповідях підкреслює важливість розробки методів титрування антирабічних антитіл *in vitro*.

Тому постійно розробляються та використовуються різні методи: реакція зв'язування комплекменту (РЗК), реакція дифузної преципітації (РДП), реакція непрямой гемаглютинації (РНГА), твердофазний імуоферментний аналіз (ТФ ІФА), тест швидкої інгібіції фокусів флуоресценції (RFFIT) і ряд інших. Однак усі ці методи мають різний ступінь використання в практичних умовах. Так, найменш чутливими тестами виявлення антирабічних антитіл є РЗК та РДП, що практично не знайшли свого застосування. Широко використовувалась реакція непрямой гемаглютинації (РНГА), відмінною рисою якої була технічна простота, експресність та загальнодоступність. Проте з часом методи на основі гемаглютинації були замінені на ТФ ІФА (ELISA), котрий став широко застосовуватися для відносної оцінки рівня вірусспецифічних антитіл у сироватках крові тварин [1]. Перевагою ELISA є його стандартність, швидкість та легкість у проведенні, а також відсутність необхідності використання живого вірусу сказу та культури клітин. Він також менш залежний від якості сироваток та проблем, пов'язаних із їх гемолізом, цитотоксичністю та бактерійною забрудненістю [11].

Найбільше поширення отримав непрямий варіант ТФ ІФА, який володіє універсальністю міченого реагенту, що дозволяє виявити антитіла до різних антигенів. При дослідженні сироваток крові людей у РН на мишах та непрямим варіантом ТФ ІФА було отримано високий рівень збігу результатів дослідження сироваток (93,3%).

При вивченні результативності традиційної РН, тесту інгібіції фокусів флуоресценції й непрямого варіанта ТФ ІФА при дослідженні 270 сироваток крові людини отримано наступні дані: РН - 78,5%, RFFIT - 78,9%, ТФ ІФА - 76,7% [11].

У наших дослідженнях 472 проб сироваток крові м'ясоїдних тварин, надісланих в ДНДЛДВСЕ, було виявлено, що діагностична чутливість і специфічність при дослідженні сироваток крові методом ELISA з використанням тест-системи Platelia Rabies Kit II у порівнянні з референтним методом FAVN становить для собак 98 і 90 %, котів 96 і 93 %, лисиць 91 і 93 %. Кореляція між значеннями титрів віруснейтралізуючих антитіл в сироватках крові м'ясоїдних, досліджених методами FAVN та ELISA становить 0,97.

Таким чином, за чутливістю ТФ ІФА не поступається традиційним тестам, технічно більш простий і дає змогу досліджувати більшу кількість проб за короткий термін (декілька годин).

Однак вищезазначені методи виявляють антитіла до всіх протеїнів вірусу сказу та спричинюють помилкові визначення ступеня захисту. Внаслідок цього необхідно використовувати метод на основі імуноглобулінів, специфічних протективним епітопам глікопротеїну вірусу сказу.

З цієї точки зору ідеальним інструментом є конкурентний варіант ТФ ІФА з використанням моноклональних антитіл, специфічних до протективних антигенних детермінант, які дозволяють визначати в сироватках, що тестуються, тільки віруснейтралізуючі антитіла. Порівняльні дослідження результатів цього тесту та РН показали високий ступінь кореляції ( $n=88$ ,  $r=0,90$ ). З використанням даного методу в Японії були проведені дослідження 1019 сироваток крові собак і в 84,8% випадків виявлено антирабічні антитіла з рівнем, вищим від протективного порога (0,5 МО). Проте даний тест не дозволяє домогтися максимального ступеня кореляції з РН та не обліковує всіх умов при постановці референс-тесту РН, у той час як згідно з рекомендаціями Комітету експертів ВООЗ із сказу тільки віруснейтралізуючі антитіла (ВНА) у сироватці являють собою важливий фактор захисту проти рабічної інфекції та необхідний індикатор імуногенної ефективності вакцинації.

Більше того, встановлено залежність ступеня захисту від рівня ВНА і показано можливість оцінки імуногенності вакцин за результатами визначення антитіл у вакцинованих тварин [9].

У зв'язку з вищезазначеним протягом тривалого часу для визначення ВНА розробляються та використовуються різні варіанти тесту нейтралізації *in vitro* [3].

З урахуванням цього нами було розроблено модифікацію RFFIT у культурі клітин нирки сайги (НС) з використанням вакцинного штаму ТС-80 вірусу сказу, яка характеризується простотою, експресністю, безпечністю, високою чутливістю, продуктивністю та економічністю.

Для об'єктивної оцінки та визначення практичної придатності розробленого методу провели порівняльне тестування антирабічних сироваток крові великої рогатої худоби, коней, собак і лисиць, вакцинованих культуральними інактивованими антирабічними вакцинами, виробленими із штамів ТС-80, Щелково-51, за допомогою традиційної РН на мишах та модифікованого RFFIT у культурі клітин НС.

Результати дослідження сироваток крові реакцією нейтралізації на мишах і пропонованим методом у культурі клітин НС були практично ідентичні. При цьому встановлено, що коефіцієнт кореляції результатів, отриманих РН на мишах та пропонованим варіантом RFFIT, становить 0,94.

Враховуючи, що рівень ВНА в крові тварин є одним із основних критеріїв протективної активності антирабічних вакцин [9], з використанням розробленого методу було проведено моніторинг сироваток крові великої рогатої худоби, коней та собак, щеплених вакцинами із штаму ТС-80.

Так, через 1 міс. після парентеральної імунізації інактивованою вакциною титр ВНА становив у великої рогатої худоби 4-8 МО, у коней 5-8 МО, а у перорально щеплених м'ясоїдних - 0,5-2,0 МО.

Для визначення залежності частоти імунізації, провели оцінку антирабічної інактивованої сорбованої вакцини зі штаму ТС-80 при одно - й двократній імунізації великої рогатої худоби. Для цього тварин вакцинували та через 1, 6 і 12 міс. після цього проби сироваток крові досліджували в РН.

Встановлено, що середній титр ВНА після однократної вакцинації становив: через 1 міс. - 6 МО, через 6 - 4 МО, через 12 - 1 - 2 МО, а після двократної імунізації - 10,7 і 3 МО відповідно (до вакцинації специфічних антитіл у сироватці крові не було у 100% досліджених тварин).

Таким чином, за допомогою розробленого тесту встановлено, що після однократної імунізації сільськогосподарських тварин живою та інактивованою антирабічними вакцинами, виробленими із штаму ТС-80, формується напружений імунітет через один місяць після вакцинації й зберігається протягом тривалого часу.

Через значне поширення вірусу сказу серед тварин, де найбільшу небезпеку являють домашні м'ясоїдні тварини, важливе значення в програмі щодо контролю за сказом належить оцінці рівня імунітету в собак із групи ризику. Для цього провели серологічний моніторинг шляхом визначення рівня ВНА у сироватках крові собак з приватного сектора. Було виявлено протективний рівень ВНА у 95 % тварин.

Отже, розроблено систему оцінки імунного статусу тварин, вакцинованих проти сказу, здійснено контроль ефективності антирабічних вакцин. Крім того, проведено модифікацію системи обліку реакції нейтралізації: облік виконували по 97 % інгібіції репродуктивного вірусу; за

принципом «все або нічого», тобто одна виявлена позитивна клітина - позитивний результат у даній лунці.

Протестовано сироватки крові 98 собак та встановлено, що за оцінки по 97% інгібіції репродукованого вірусу мінімальний захисний титр (0,5 МО) спостерігався у 46 (47%) собак, у той час як облік по повній інгібіції дозволив визначити протективний титр антитіл тільки у 36 (36%) собак. Отриманий результат свідчить, що даний тест дозволяє більш точно підходити до оцінки віруснейтралізуючої активності сироваток крові тварин.

**Висновки.** Критичний аналіз методів тестування дозволив теоретично обґрунтувати необхідність використання для серологічного моніторингу сказу реакції віруснейтралізації в культурі клітин (RFFIT).

1. Даний метод характеризується простотою виконання, експресністю, безпечністю, високою чутливістю, продуктивністю й економічністю.

2. Розроблений нами метод дозволяє рекомендувати його для оцінки віруснейтралізуючих антитіл у сироватках крові вакцинованих тварин та достовірного визначення рівня захисту тварин.

#### **Список використаних джерел:**

1. Ботвинкин А.Д. Обнаружение антител к вирусу бешенства с помощью ELISA в пробах крови, собранных на бумажные диски / А.Д. Ботвинкин, О.Ц. Наволокин // Лабораторное дело. – 1988. – №3. – С. 73 – 74.

2. Опыт серологического мониторинга городских популяций собак при бешенстве / Макаров В.В., Недосеков В.В., Серета А.Д. [и др.] // Ветеринарная патология. – 2002. – №1. – С. 140 – 143.

3. Методические указания по определению иммунитета и эффективности вакцинации животных против бешенства / Недосеков В.В., Куриннов В.В., Груздев К.Н. [и др.]. – Покров, 2002. – 12 с.

4. Антирабійні вакцини в ветеринарній медицині / Недосеков В.В., Полупан І.М., Гришок Л.П., Иванов М.Ю. // Ветеринарна біотехнологія. Бюлетень. – 2007. – №11. – С. 141 – 150.

5. Столюк В.В. Отримання трансфер-фактору антирабійного та його імунобіологічні властивості: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня к.вет.н.: спец. 16.00.03. «Ветеринарна мікробіологія та вірусологія» // В.В. Столюк – Київ, 2003. – 21 с.

6. Kennedy J. Quarantine and Rabies: A Reappraisal. Report by the advisory group on Quarantine to the right hon nick brown MP, Minister of agriculture, fisheries and food / Kennedy J. / MAFF publication. – London, 1998. – 313 p.

7. Klingeborn B. Vaccination and antibody testing replacing quarantine as rabies safety measure for transfer of dogs and cats into Sweden and Norway from EU/EFTA-countries / B. Klingeborn, J. Krogsrud // Rabies Bull. Eur. – 1993. – Vol. 17 (4). –13 p.

8. Laboratory Techniques in Rabies/ WHO, Fourth Edition. – 1996.

9. Potency testing of inactivated rabies vaccines in mice, dogs and cats / Lazarowicz M., Kihm U., Bommeli W. [et al.] // *Comp. immunol., microbiol. infect. diseases.* – 1982. – Vol. 5. – №1-3. – P. 233 – 235.

10. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines / Office International epizootic (OIE) – 2004.

11. Sureau P. Correlations entre l'epreuve immunoenzymatique, la seroneutralisation et la reduction de foyers fluorescents pour le titrage des anticorps rabiques / Sureau P., Rollin P., Zeller H. // *Comp. immunol., microbiol. infect. diseases.* – 1982. – Vol. 5. – №1-3. – P. 143 – 150.

**Дрожже Ж.Н., Никитова А.П., Недосеков В.В., Мартинюк А.Г., Полупан И.Н. Анализ методов антирабического серологического мониторинга**

В статье рассмотрены важность применения серологических исследований у животных и проведен сравнительный анализ существующих методов определения ВНА к вирусу бешенства. Разработана система оценки иммунного статуса животных, вакцинированных против бешенства, осуществлен контроль эффективности антирабических вакцин. Разработан оптимальный метод для определения ВНА, а также приведены результаты испытания модифицированного RFFIT в культуре клеток почки сайги (ПС) и установлено его простоту в исполнении, безопасность, высокую чувствительность и экономичность.

**Ключевые слова:** антирабическая вакцина, антирабические антитела, культура клеток, степень корреляции.

**Drozhzhe Zh.N., Nikitova A.P., Nedosekov V.V., Martunyk O.G., Polupan I.N. The analysis of antirabies serological monitoring methods**

The article deals with the importance of serological studies in animals and a comparative analysis of existing methods of virus neutralizing antibodies to rabies virus. The system of evaluation of immune status of animals vaccinated against rabies by monitoring the effectiveness of rabies vaccines. The optimum method for determination of virus neutralizing antibodies, as well as the results of testing the modified RFFIT in kidney cell culture and set its ease of performance, safety, high sensitivity and efficiency.

**Keywords:** rabies vaccine, rabies antibody, cell culture, correlation degree.