

УДК 636.09:578.824:57.083:311.42

Ж. М. ДРОЖЖЕ

Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ

ПОРІВНЯННЯ МЕТОДІВ ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУСНЕЙТРАЛІЗУЮЧИХ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ СКАЗУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТВАРИН

У статті подано результати досліджень сироваток крові м'ясоїдних тварин для визначення титру поствакцинальних антитіл до вірусу сказу методом ELISA в порівнянні з результатами, отриманими в реакції нейтралізації в культурі клітин

Ключові слова: сказ, віруснейтралізуючі антитіла, FAVN, ELISA

Антирабічна вакцинація залишається єдиним ефективним заходом боротьби та методом профілактики сказу у світі. Цей захід є важким економічним тягарем серед програм забезпечення епізоотичного благополуччя будь-якої країни.

Виявлення та визначення титру антирабічних антитіл є одним із головних елементів оцінки ефективності проведення кампаній пероральної імунізації диких м'ясоїдних та антирабічних щеплень домашніх м'ясоїдних [1–4].

Країни Євросоюзу, Великобританія, Скандинавські країни та Японія запровадили систему вимог до тварин, що перетинають їхні кордони, в основі якої – щеплення собак, котів, тхорів з подальшим визначенням титру віруснейтралізуючих антитіл до вірусу сказу перед ввезенням на територію країни. Згідно міжнародних вимог методом для виявлення антитіл є модифікована реакція нейтралізації в культурі клітин – FAVN (fluorescent antibody virus neutralisation), а мінімальний рівень віруснейтралізуючих антитіл має бути не нижчим ніж $0,5 \text{ MO/cm}^3$ [5–7].

Методи дослідження антитіл до вірусу сказу значно удосконалились з моменту введення у вірусологічну практику реакції нейтралізації на білих мишах, яка була розроблена Webster і Dawson ще в 1935 році [8, 9]. На заміну реакції нейтралізації на білих мишах для рутинної практики були запропоновані більш швидкі та дешеві варіанти реакції нейтралізації в культурі клітин – RFFIT (rapid fluorescent focus inhibition test), описаний Smith з колективом авторів в 1973 році та FAVN, описаний Cliquet з колективом авторів в 1998 році. Ці методи залишаються референтними згідно вимог ВООЗ та МЕБ [8, 10].

З початку 80-х років минулого століття знаходить поширення метод ELISA для визначення рівня антирабічних антитіл, який відрізняється високою швидкістю одержання результатів. Описано декілька імуноферментних тест-систем для визначення титру антитіл до вірусу сказу у сироватці крові людей, домашніх та диких м'ясоїдних [8, 9].

Порівняльна характеристика основних параметрів вищезгаданих методів наведена в таблиці 1.

Таблиця 1

Основні характеристики методів дослідження антирабічних віруснейтралізуючих антитіл

№ п/п	Показник	Метод		
		РН на білих мишах	РН в культурі клітин	ELISA
1	Час проведення, діб	14	3	0,2
2	Потреба у живому вірусі сказу	Так	Так	Ні
3	Потреба у спеціальному обладнанні	Ні	Так	Так
4	Вид тварин	Всі	Всі	Переважно м'ясоїдні
5	Вплив якості сироватки	Так	Так	Ні

Мета дослідження: порівняння результатів дослідження сироваток крові м'ясоїдних тварин двома методами (ELISA та FAVN) для визначення віруснейтралізуючих антитіл до вірусу сказу та встановлення кореляції одержаних результатів.

Матеріали та методи: 522 сироватки крові м'ясоїдних тварин, надісланих в ДНДІЛДВСЕ для визначення рівня антирабічних антитіл: 291 проб від собак, 106 проб від котів та 125 проб від лисиць.

Тест-система Platelia Rabies Kit II виробництва Bio-Rad, обладнання для проведення імуноферментного аналізу. Перещеплювана культура клітин нирки сирійського хом'яка – ВНК 21/13, тест-штам CVS вірусу сказу, позитивна та негативна референтна сироватка МЕБ до вірусу сказу, FITC-кон'югат (антирабічний моноклональний флуоресціюючий глобулін) виробництва FDI Diagnostics, Inc., інвертований люмінесцентний мікроскоп.

FAVN проводили, відповідно до Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines [8], ІФА – згідно з рекомендаціями виробника тест-системи.

Діагностичну чутливість та специфічність визначали за формулами:

$$\text{Діагностична чутливість} = \frac{II}{II + XH} \cdot 100\% \quad (1)$$

$$\text{Діагностична специфічність} = \frac{IH}{IH + XH} \cdot 100\% \quad (2), \text{ де}$$

II – істинно позитивні результати;

IH – істинно негативні результати;

XH – хибно негативні результати;

XI – хибно позитивні результати

Кореляцію значень титрів антирабічних антитіл визначали за допомогою комп'ютерної програми MS Excel. Мінімальний титр антитіл, який здатна виявити тест-система, визначали шляхом дослідження граничних розведень.

Результати досліджень. Сироватки крові тварин попередньо протестовані в FAVN були поділені на 2 групи: 1 – негативні і з титром антитіл нижче 0,5

МО/см³, 2 – з титром вище 0,5 МО/см³ та дослідженні в ELISA. Результати дослідження наведено в таблиці 2.

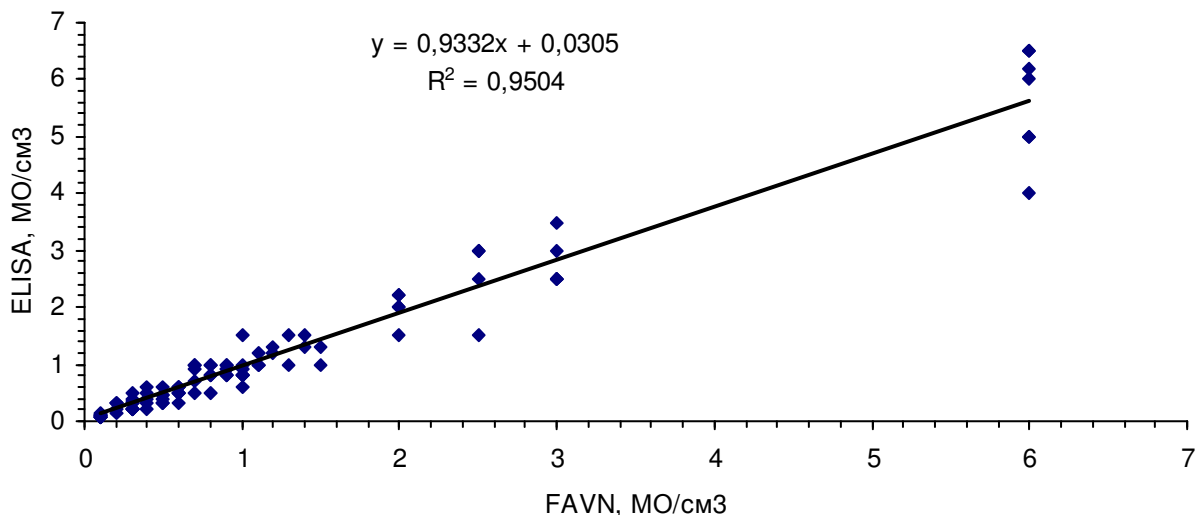
Таблиця 2

**Результати дослідження сироваток крові тварин методами
FAVN та ELISA**

		FAVN (референтний метод)		
		≥ 0,5 МО/см ³	< 0,5 МО/см ³	
ELISA	Собаки			
	≥ 0,5 МО/см ³	185	8	
	< 0,5 МО/см ³	10	88	
	Коти			
	≥ 0,5 МО/см ³	74	4	
	< 0,5 МО/см ³	3	25	
	Лисиці			
	≥ 0,5 МО/см ³	43	3	
	< 0,5 МО/см ³	5	74	

Діагностична чутливість та специфічність ELISA у порівнянні з референтним методом FAVN для собак становила 96 і 90%, котів – 95 і 89% та лисиць – 93 і 94% відповідно.

Встановлення кореляційної залежності між результатами титрів антирабічних віруснейтралізуючих антитіл визначеними методами FAVN та ELISA показано на рисунку 1.



Рис

1. Кореляція між титрами антирабічних віруснейтралізуючих антитіл визначеними методами FAVN та ELISA (n=92)

Дані зображені на рисунку 1 свідчать про те, що кореляція між результатами, отриманими при дослідженні сироваток крові собак, котів та лисиць методами FAVN та ELISA, становить 0,95.

При дослідженні методами граничних розведень встановлено, що мінімальний титр віруснейтралізуючих антитіл, що можна виявити методом FAVN, становить $0,024 \text{ МО/см}^3$, проти – $0,12 \text{ МО/см}^3$ для методу ELISA.

При виконанні досліджень методом FAVN в культурі клітин отриманні сумнівні результати при дослідженні 45 проб сироваток крові, що складає 8,6% від загальної кількості досліджених проб, через незадовільну якість сироваток – гемоліз, цитотоксичність та значну бактеріальну забрудненість, але ці проби були успішно досліджені в ELISA.

Висновки: 1. Кореляція між значеннями титрів віруснейтралізуючих антитіл в сироватках крові м'ясоїдних, досліджених методами FAVN та ELISA знаходиться на високому рівні та становить 0,95.

2. Визначено високі рівні діагностичної чутливості і специфічності тест-системи Platelia Rabies Kit II для методу ELISA, що становлять для собак 96 і 90 %, для котів – 95 і 89 %, для лисиць – 93 і 94 %.

3. Метод ELISA менш залежний від якості сироваток та проблем, пов'язаних із гемолізом, цитотоксичністю та бактерійною забрудненістю досліджуваних сироваток.

4. Метод ELISA оптимальний для проведення масових досліджень сироваток крові м'ясоїдних на наявність віруснейтралізуючих антитіл до вірусу сказу при оцінці ефективності проведення протиепізоотичних заходів завдяки його стандартності, швидкості, легкості постановки, меншій чутливості до якості зразків, а також відсутності необхідності використання живого вірусу сказу та культури клітин.

Список використаної літератури

1. *Matouch O.* Rabies situation and rabies control in the Czech Republic 2000-2002 / *O. Matouch, J. Vitasek* // *Rabies Bulletin Europe*. – 2002. – No. 4. – P. 5–10.
2. *Романенко О. А.* Оцінка ефективності пероральної вакцинації проти сказу диких м'ясоїдних в Україні / *О. А. Романенко, Ж. М. Дрожже* // *Ветеринарна біотехнологія*. – 2008. - № 1. – С. 346–352.
3. *Cliquet F.* Elimination of Terrestrial Rabies in Western European Countries / *F. Cliquet M. Aubert* // *Dev Biol (Basel)*. – 2004. – Vol. 119. – P. 185–204.
4. The oral vaccination of foxes against rabies / Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, European Commission. – 2002.– 55 p.
5. *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. – London: MAFF publication, 1998. – p. 313.
6. *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 Europe*. – 1993. – Vol. 17. – No. 4. – p. 13.
7. EC Regulation № 998/2003 On the animal health requirements applicable to the non-commercial movements of pets animal: 26 may 2003 / European parliament and of council.

8. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines [Электронный ресурс]. – 2012. – Режим доступа: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.13_RABIES.pdf (25.07.2013). – Rabies.
9. Laboratory techniques in rabies [edited by. F.X. Meslin M.M. Kaplan H. Koprowski]. – 4th ed. – Geneva: WHO, 1996. – 476 p.
10. WHO Expert Consultation on Rabies: First Report / WHO Technical Report Series No. 931. – Geneva: WHO, 2004. – 121 p.

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ БЕШЕНСТВА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЖИВОТНЫХ / Дрожде Ж. Н.

В статье представлены результаты исследований сывороток крови плотоядных животных для определения титра поствакцинальных антител к вирусу бешенства методом ELISA по сравнению с результатами, полученными в реакции нейтрализации в культуре клеток

Ключевые слова: бешенство, вируснейтрализующие антитела, FAVN, ELISA

COMPARISON OF THE METHODS OF DETERMINING VIRUS-NEUTRALISING ANTIBODY TO RABIES VIRUS IN SERUM OF ANIMALS / Drozhzhe Zh. M

The article presents the results of research of animals serum for determining the postvaccinal antibodies titer to rabies virus with ELISA in comparison with the results obtained in the neutralization reaction in the cell culture

Key words: rabies, virus-neutralising antibody, FAVN, ELISA

Рецензент – кандидат ветеринарных наук М. Ю. Иванов.

Рукопис надійшов 30. 07. 2013р