

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДА КОНТРАСТНОЙ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ ИНДИКАЦИИ АНТИГЕНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА В ОТПЕЧАТКАХ РОГОВИЦЫ ГЛАЗА

*Истомина М.А., Клюкина В.И.*

*Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности,  
г. Щелково, Московская обл.*

Бешенство (лат. – *Lyssa*; – англ. – *Rabies*; франц. – *La Rage*; нем. – *Tollwut*; исп. – *Rabia*; водобоязнь, гидрофобия) – особо опасная острая зооантропонозная болезнь теплокровных животных всех видов и человека, характеризующаяся тяжелым поражением центральной нервной системы, необычным поведением, агрессивностью, параличами и летальным исходом.

В настоящее время бешенство остается одной из важнейших проблем здравоохранения и ветеринарии. Его эпидемиологическая значимость определяется абсолютной летальностью, повсеместным распространением, прямой связью с заболеванием среди животных, уровнем социально-экономического развития государства и оказания антирабической помощи населению [5].

Ежегодно в мире погибает от бешенства 55-70 тыс. человек, из которых половина приходится на детей [7, 11], и свыше 1 млн. животных, более 10 млн. человек получают специфическое антирабическое лечение, затраты на которое в наиболее неблагоприятных странах Азии и Африки составляют порядка 560 млн. долларов США [4, 5, 6, 12].

Для диагностики бешенства применяют различные методы, которые детализированы и стандартизированы согласно руководству ВОЗ по лабораторной диагностике бешенства [8, 9]. Эти методы различаются по эффективности, специфичности и надежности.

Для индикации вируса бешенства предпочтительно использование метода флуоресцирующих антител, который обеспечивает надежную диагностику в 98-100 % случаев. Он широко применяется для постмортальной диагностики бешенства. Показана возможность прижизненного обнаружения рабического антигена в эпителиальных клетках роговицы глаза с помощью метода иммунофлуоресценции (корнеальный тест) [10, 13].

Раннее выявление больных животных повышает эффективность противоэпизоотических мероприятий по ликвидации бешенства. Рекомендованные ВОЗ методы для диагностики бешенства, в основном, предназначены для постмортальной диагностики. Метод корнеальной пробы для прижизненной диагностики бешенства является экспрессным и доступным, с его помощью можно поставить диагноз «бешенство» в инкубационном периоде за несколько дней до появления клинических признаков [3].

**Целью работы** являлась оценка эффективности использования метода контрастной иммунофлуоресценции для выявления антигена вируса бешенства в отпечатках роговицы глаза.

**Материалы и методы.** Исследовали материал, полученный от 7 собак и 4 кошек, укушенных животными с подозрением на бешенство. У животных с подозрением на заболевание бешенством исследовали отпечатки роговицы глаза, у павших – отпечатки роговицы глаза и ткань мозга, у мышей в тесте биопробы – ткань мозга методами контрастной иммунофлуоресценции и прямой иммунофлуоресценции по ГОСТ 26075-84.

В работе использовали «Глобулин флуоресцирующий для диагностики бешенства животных» (ТУ 9388-03-00497963-97), в состав которого входят следующие компоненты: глобулин флуоресцирующий, глобулин флуоресцирующий контрольный, антирабическая сыворотка. Конъюгат бычьего сывороточного альбумина («Fluka») с изотиоционатом родамина В («Fluka») получали подбором оптимального соотношения флуорохром/белок, времени конъюгирования и температурного режима. Рабочее разведение конъюгата альбумин-родамин подбирали при одновременной его экспозиции на мазках-отпечатках с глобулином флуоресцирующим.

Постановку метода корнеальной пробы проводили следующим образом: фиксированные в холодном ацетоне отпечатки роговицы обрабатывали одновременно конъюгатом родамин-альбумин и ФИТЦ-антирабическим конъюгатом в рабочих разведениях в течение 30 минут при 37 °С, промывали забуференным физраствором и исследовали под люминесцентным микроскопом. В качестве отрицательного контроля использовали отпечатки, обработанные смесью конъюгата альбумин-родамин с глобулином флуоресцирующим контрольным. Результат реакции контрастной иммунофлуоресценции считали положительным при наличии в поле зрения на фоне неспецифического свечения красновато-кирпичного цвета не менее 10 флуоресцирующих желто-зеленым цветом типичных гранул при отсутствии специфического свечения в отпечатках роговицы глаза, обработанных глобулином флуоресцирующим контрольным.

**Результаты исследований.** Выбор отпечатков роговицы глаза в качестве объекта исследования объясняется особенностями патогенеза бешенства и свойством эпителиальных клеток постоянно слушиваться. У зараженного бешенством животного вирус после накопления в головном и спинном мозге по периферическим нервам продвигается в центробежном направлении и проникает в роговицу, имеющую самые короткие нервные связи с центральной нервной системой. Роговица обильно снабжена нервными рецепторами, находящимися в непосредственном контакте с эпителиальными клетками, что способствует множественному поражению их вирусом [2].

При исследовании отпечатков роговицы глаза под люминесцентным микроскопом часто наблюдается аутофлуоресценция некоторых эпителиальных клеток, т.е. неспецифическое свечение, не контрастирующее со свечением ФИТЦ, что затрудняет учет результатов при обнаружении антигена вируса бешенства. Одним из путей повышения надежности выявления вируса методом флуоресцирующих антител является подавление аутофлуоресценции путем контрастирования фона.

Для контрастирования фона при исследовании отпечатков роговицы глаза методом иммунофлуоресценции мы использовали конъюгат альбумина с родамином. Выбор альбумина, конъюгированного родамином, объясняется его способностью вызывать интенсивное неспецифическое окрашивание благодаря высокому отрицательному заряду молекул, а также высокой степени контрастирования красновато-кирпичного свечения родамина с желто-зеленым свечением флуоресцеинизотиоционата [1].

При оптимизации условий приготовления конъюгата альбумина с родамином были испытаны концентрации от 5 до 30 мкг красителя/мг белка, время экспозиции 2, 18 и 24 часа, температура 20 °С и 4 °С. Непрореагировавший краситель удаляли методом гель-хроматографии на колонке 1,5×40, заполненной сефадексом G-50 в 10мМ фосфатном буфере, pH 7,4-7,6. Соотношение родамин/альбумин устанавливали методом спектрометрии при  $OP_{450}/OP_{280}$  в разведении конъюгата 1:20-1:320.

В результате проведенных исследований установлено, что соотношение флуорохром/белок 20 мкг/мг является оптимальным при использовании альбумина в концентрации 6 мг/см<sup>3</sup>, времени конъюгирования 24 часа при pH 9,0 и температуре 4 °С. Гель-хроматография конъюгата на сефадексе G-50 позволила получить свободный от непрореагировавшего красителя ме-

## Розділ 1. Біобезпека та біозахист у ветеринарній медицині, емерджентні хвороби тварин

ченный флюорохромом белок, сходящий с колонки в первом пике. Соотношение родамин/альбумин ( $OP_{450}/OP_{280}$ ) в конъюгате составило 0,5:1.

Установлено оптимальное разведение конъюгата альбумин-родамин 1:80, при котором происходит полное контрастирование фона без подавления специфической флюоресценции.

Результаты индикации вируса бешенства в исследуемом материале представлены в таблице.

Таблица – Результаты индикации вируса бешенства в исследуемом материале

Виды животных	№	Результаты исследований материала			
		Корнеальная проба		Реакция иммуно-флюоресценции	Биопроба
		При жизни	Посмертно		
Собаки	1	-	+	+	не исслед.
	2	-	не исслед.	не исслед.	не исслед.
	3	-	+	+	не исслед.
	4	+	+	+	не исслед.
	5	-	-	-	+
	6	+	+	+	не исслед.
	7	-	не исслед.	не исслед.	не исслед.
Кошки	1	-	-	+	не исслед.
	2	+	+	+	не исслед.
	3	-	не исслед.	не исслед.	не исслед.
	4	-	+	+	не исслед.

**Примечание:** + положительный результат; - отрицательный результат

Прижизненные исследования роговицы глаза 7 собак и 4 кошек методом корнеальной пробы показали положительный результат у 2 собак и 1 кошки.

У павших 5 собак и 3 кошек исследовали отпечатки роговицы глаза методом контрастной иммунофлюоресценции, мазки ткани головного мозга – методом прямой иммунофлюоресценции. Постмортальные исследования роговицы глаза показали наличие антигена вируса бешенства в отпечатках от 4 собак и 2 кошек. При исследовании ткани мозга положительный результат был получен у 4 собак и 3 кошек и отрицательный результат – у 1 собаки. Головной мозг от этой собаки был подвергнут дополнительному исследованию методом биопробы на 10 белых мышах с подтверждением результатов методом иммунофлюоресценции. Результат биопробы был положительным. Положительный результат корнеальной пробы позволяет поставить диагноз «бешенство», однако отрицательный результат не исключает возможности заболевания.

Следует отметить, что результаты корнеальной пробы показали корреляцию с результатами обнаружения антигена вируса бешенства в головном мозге методом иммунофлюоресценции. Специфичность метода составила 100 %, чувствительность при интравитальных исследованиях составила 37,5 %, а при постмортальных исследованиях – 75 %.

**Выводы и перспективы дальнейших исследований.** Использование конъюгата альбумина с родамином при обнаружении антигена вируса бешенства в отпечатках роговицы глаза методом корнеальной пробы позволило предотвратить ложноположительные результаты и достичь высокой специфичности (100 %). Для прижизненной и постмортальной диагностики бешенства возможно применение метода контрастной иммунофлюоресценции.

### Список литературы

1. Антитела. Методы. Кн. 2 / Под ред. Д. Кэтти: Пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – 384 с.
2. Использование корнеального теста для прижизненной экспресс – диагностики бешенства у человека и животных / Н.П. Мишаева, Н.А. Ковалев, С.О. Вельгин, В.В. Щерба. – Минск, 2008.
3. Ковалев, Н.А. Иммунофлуоресцентное исследование отпечатков роговицы при бешенстве / Н.А. Ковалев, А.С. Шашенько // Ветеринария. – 1970. – № 9. – С. 44-46.
4. Основные принципы специфической профилактики бешенства, обеспечивающие эффективность антирабических мероприятий / А.В. Саввин, Ю.В. Пашкина, К.Н. Груздев, В.В. Сочнев // Ветеринарная патология. – 2005. – № 4. – С. 102-106.
5. Управление Роспотребнадзора по республике Дагестан. Надзор за бешенством. – Режим доступа: [http://www.dagsen.ru/news\\_show.php?nid=640](http://www.dagsen.ru/news_show.php?nid=640) (проверено 10.02.2011).
6. Черкасский, Б.Л. Эпидемическая ситуация и меры профилактики бешенства / Б.Л. Черкасский, О.С. Хадарцев, А.А. Мовсесянц // Вет. и мед. аспекты зооантропонозов. – Покров, 2003. – Ч. 1. – С. 98.
7. Arai, Y.T. Epidemiology of rabies virus and other lyssaviruses / Y. T. Arai // Nippon Rinsho. – 2005. – 63(12). – P. 2167-2172.
8. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals // OIE Terrestrial Manual, 2008. – Part 2, section 1, chapter 2.1.13. – P. 304-323.
9. Meslin, F.X. Laboratory Techniques in Rabies / F.X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski // 4-th ed. – Geneva: WHO, 1996. – P. 9-27.
10. Schneider, L.G. The cornea test: a new method for the intra-vital diagnosis of rabies / L.G. Schneider // Zentrabl. Vet. Med. – 1969. – № 16. – P. 24-31.
11. Smith, A. Bat rabies in the United Kingdom / A. Smith, J. Morris, N. Crowcroft // BMJ. – 2005. – 330(7490). – P. 491-492.
12. The origin and phylogeography of dog rabies virus / H. Bourhy, J.-M. Reynes, E.J. Dunham, [et al.] // J. Gen. Virol. – 2008. – Vol. 89. – P. 2673-2681.
13. Zimmerman J. Zur brauchbarkeit der cornea getestet de Tollwut diagnose / J. Zimmerman // Berl. Munch. Tierarztl. Eachr. – 1971. – Vol. 84, № 9. – P. 172-174.

## EVALUATION OF THE CONTRAST IMMUOFLUORESCENCE METHOD FOR THE RABIES VIRUS ANTIGEN DETECTION IN CORNEAL IMPRESSION SMEARS

Istomina M.A., Klyukina V.I.

All-Russian Scientific Research Technical Institute for Biological Industry, Schelkovo, Russian Federation

The contrast immunofluorescence method was evaluated in corneal impression smears from suspicious of rabies 7 dogs and 4 cats. The bovine serum albumin, conjugated with rhodamine, was used as a contrast agent. A specificity of 100 % was found. A positive corneal test result would confirm the diagnosis of rabies, but a negative one would not exclude the possibility of disease.