

УДК 619:616.98:636.028.083:612.017

НІКІТОВА А.П., мол. наук. співробітник

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ

ms.mala@ya.ru

СЕРОЛОГІЧНИЙ МЕТОД ТЕСТУВАННЯ ІМУНОГЕННОСТІ ІНАКТИВОВАНИХ АНТИРАБІЧНИХ ВАКЦИН

У статті наведений серологічний метод визначення імуногенної активності антирабічних вакцин. Принцип постановки передбачав імунізацію білих мишей референс-вакциною у різних розведеннях. На 14 добу (з моменту імунізації) у тварин проводили забір крові, в сироватці визначали титри антитіл за допомогою ТФ-ІФА. Після цього будували калібрувальну криву – пропорційну залежність титрів антитіл від імуногенної активності антирабічної вакцини. За допомогою цієї системи було досліджено 3 серії вакцин. Встановлено кореляційну залежність між серологічним методом тестування імуногенної активності антирабічних вакцин та класичним тестом NIH ($r=0,95$), що дозволяє використовувати перший як альтернативний метод тестування імуногенної активності антирабічних вакцин.

Ключові слова: антирабічна вакцина, антирабічні антитіла, імуногенна активність, тест NIH, ТФ-ІФА.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. Імуногенність є одним з основних показників вакцин, від якого залежить ефективність проведених протиепізоотичних заходів[6]. Для оцінки імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин розроблено тест NIH (National Institutes of Health) та ряд його модифікацій [7,8,10]. Однак, незважаючи на рекомендації міжнародних організацій метод має ряд недоліків[1, 5, 8]. Для постановки методу необхідна велика кількість мишей (150 голів) та тривалий час досліду (28 днів). До цього слід додати ризик небезпеки для персоналу під час роботи з інфекційним вірусом сказу. Також існують гуманні проблеми, пов'язані з введенням вірусу в мозок тварин. Враховуючи наведене вище, виникає необхідність розробки альтернативного способу визначення імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин, який би був простий у постановці, експресний та відповідав сучасним умовам етичного поводження з тваринами.

В літературі представлені деякі варіанти серологічних підходів аналізу імуногенної активності вакцин [2-5, 9, 10]. Однак, в Україні не розроблений серологічний метод оцінки вакцин.

Мета дослідження – розробити серологічний метод тестування імуногенності інактивованих антирабічних вакцин.

Матеріали та методи досліджень. Антирабічні вакцини. В експериментах використовували Міжнародний робочий стандарт антирабічної вакцини (International Working Standard (IWS) of Rabies Vaccine I.P., Індія), імуногенна активність 5,59 МО/доза. Стандарт розводили на фізіологічному розчині до кінцевої імуногенності: 1 МО/доза; 2 та 5,59 МО/доза.

Дослідною була вакцина антирабічна інактивована рідка «Рабістар», виготовлена зі штаму G 52 Wistar (виробник Укрветпромполіс). Серії: №040412; №100713; №201112 з імуногенною активністю 4,4; 7,2 та 9,1 МО/дозі відповідно.

Для моделювання умов оцінки низькоактивних серій вакцин (які не мають бути ліцензовані та застосовані для тварин) ми приготували розведення вакцини «Рабістар» (серії №040412) до імуногенності 0,7 МО/дозі.

Тварини та імунізація. Використовували 4-тижневих білих мишей, масою 13-15г, що були поділені за принципом аналогів на дев'ять груп (10 мишей в кожній).

За аналогією з традиційним методом NIH, з референс-вакцин (різні розведення) та дослідних готували розведення 1:5, кожній миші однократно вводили інтраперитонеально по 0,5 см³ вакцини. Референс-вакцину вводили групам: IWS-1 (імуногенність 1 МО/доза), IWS-2 (імуногенність 2 МО/доза), IWS-3 (імуногенність 2,8 МО/доза), IWS-4 (імуногенність 3,9 МО/доза) та IWS-5 (імуногенність 5,59 МО/доза). Дослідну вакцину вводили групам: ДВ-1 (імуногенність 4,4 МО/доза), ДВ-2 (імуногенність 7,2 МО/доза), ДВ-3 (імуногенність 9,1 МО/доза) та ДВ-4 (імуногенність 0,7 МО/доза).

На 14-й день з моменту імунізації проводили забір крові в усіх тварин та досліджували титри антитіл у сироватці крові до вірусу сказу методом ТФ-ІФА.

Діагностичний набір. Для виявлення антитіл до вірусу сказу використовували тест-систему BIO RAD Plateli Rabies Kit II, що рекомендована референс-лабораторією ЄС/ВООЗ/МЕБ (Фран-

ція, м. Нансі). Постановку реакції проводили відповідно до настанови щодо використання тест-системи, а результати досліджень виражали у Міжнародних одиницях (МО/см³).

Статистичну обробку даних проводили загальноприйнятими методами, використовуючи комп'ютерну програму MS Excel.

Результати досліджень та їх обговорення. Гуморальна відповідь тварин на введення антирабічної референс-вакцини в серологічному тесті з визначення імуногенності наведена в таблиці 1.

Таблиця 1 – Результати дослідження серологічної відповіді у мишей (на 14 добу) після щеплення їх антирабічною референс-вакциною (M±m, n=10)

№ п/п	Група тварин	Індекс імуногенності розведень референс-вакцини (МО/доза)	Середнє значення титру антитіл (МО/см ³)
1	(IWS)-1	1	0,7±0,01
2	(IWS)-2	2	1,0±0,03
3	(IWS)-3	2,8	1,31±0,02
4	(IWS)-4	3,9	1,52±0,01
5	(IWS)-5	5,59	1,84±0,02

Результати свідчать, що на 14-ту добу після вакцинації рівень антитіл в сироватці крові мишей усіх дослідних груп набув захисного рівня (>0,5 МО/см³). У підсумку встановлено мінімальний рівень антирабічних антитіл (0,7 МО/см³), який має відповідати вакцині з імуногенністю 1 МО/доза.

Надалі було побудовано калібрувальну криву, в основу якої покладено залежність титрів антирабічних антитіл від імуногенної активності вакцин (рис. 1).

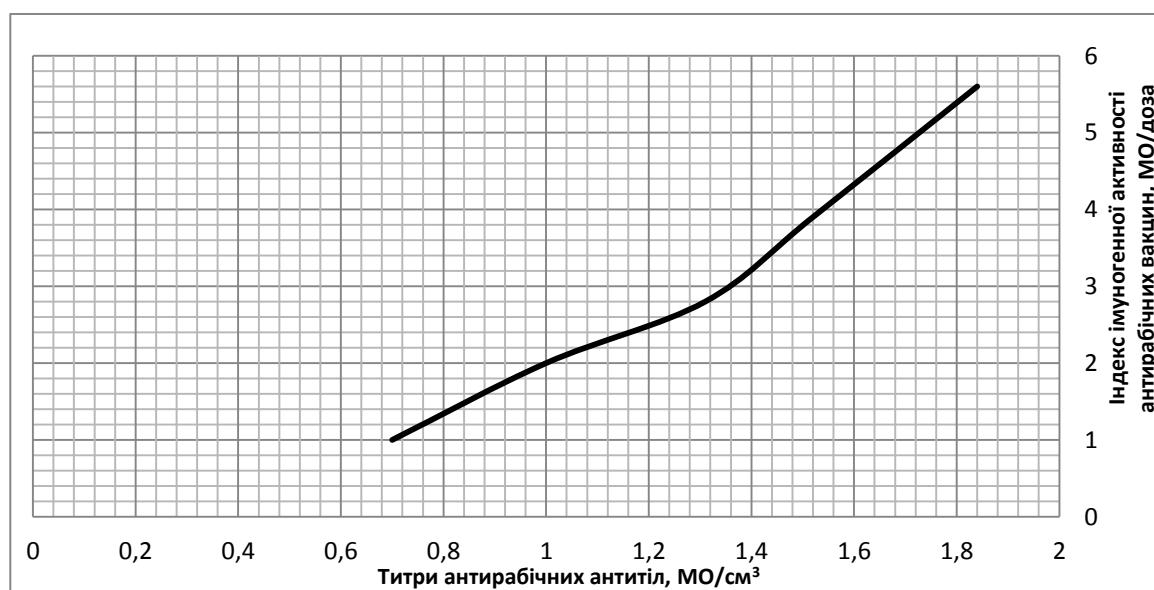


Рисунок 1 – Калібрувальна крива.

Як видно із лінії, представленої на рисунку, рівень специфічних антирабічних антитіл залежить від того, з якою імуногенною активністю використовували вакцину для імунізації тварин. Цю криву використовували як шаблон для визначення імуногенної активності дослідних серій інактивованої антирабічної вакцини.

Основним критерієм оцінки був титр специфічних антирабічних антитіл у сироватках крові тварин на рівні 0,7 МО/см³, що відповідало рівню гуморальної відповіді мишей на введення референс-вакцини з імуногенною активністю 1 МО/доза.

Наступним етапом було дослідження сироватки крові від білих мишей, які вакциновані дослідними вакцинами. Отримані результати спроектовано на розроблений нами шаблон, за допомогою якого вдалося визначити імуногенну активність дослідних серій вакцин (табл. 2).

Таблиця 2 – Результати визначення імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин серологічним тестом і методом НИН ($M \pm m$, $n=10$)

№ п/п	Група тварин	Середнє значення титру антитіл (МО/см ³)	Індекс імуногенності в серологічному тесті (МО/доза)	Індекс імуногенності в тесті НИН (МО/доза)
1	(ДВ)-1	1,62±0,05	4,4	4,4
2	(ДВ)-2	2,25±0,02	≥5,59	7,2
3	(ДВ)-3	3,15±0,10	≥5,59	9,1
4	(ДВ)-4	≤0,25	<1	0,7

Отже, результати представлені в табл. 2, свідчать, що імуногенність перших трьох дослідних серій вакцин відповідала необхідним критеріям якості. Щодо четвертої дослідної вакцини, її імуногенна активність становила менше 1 МО/доза (імуногенність визначена класичним методом НИН – 0,7 МО/доза), тому така вакцина не придатна до застосування. Отримані нами результати корелюють із результатами, які отримані за дослідження імуногенності антирабічних вакцин класичним методом НИН ($r=0,95$).

Висновок. Наші дослідження показали, що серологічний аналіз є швидким методом для тестування імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин. Завдяки тесту скорочується термін випробовування до 14 діб та використовується менша кількість мишей, що робить його ефективним та недорогим. До цього слід додати безпечність роботи працівників виробничих лабораторій, оскільки тест не потребує використання живого вірусу сказу.

Отже, розроблений нами метод може бути альтернативою класичному методу НИН для тестування імуногенної активності серій інактивованих антирабічних вакцин як в процесі виробництва, так і після.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Barth R. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine /R. Barth, G. Diderrich, E. Weinmann //Vaccine, 1988 –Vol. 6, no. 4).
2. Fournier-Caruana J., Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method / J. Fournier-Caruana, B. Poirier, G. Haond. //Biologicals, 2003 – Vol. 31, no. 1.
3. Gamoh K. Use of ELISA for in vitro potency test of rabies vaccines for animal use /K. Gamoh, M. Senda, O. Itoh //Biologicals, 1996 – Vol.24, no.2.
4. Krämer B. The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines / B. Krämer, H. Schildger, H. A. Behrendorf-Nicol //Biologicals, 2009 – Vol.37, no. 2.
5. Nedosekov V. Criticalreviewofthe NIH-methodfortestingpotencyof inactivatedrabiesvaccines /V. Nedosekov //Veterynarna medycyna Ukrayiny, 2013 – No. 10).
6. Nedosekov V. Strategiya pidvyshchennya imunogennosti inaktyvovanykh antyrabichnykh vakcyn [Strategy forimproving potency of inactivated rabies vaccines] /V. V. Nedosekov, L. P. Gryshok, I. M. Polupan, M. Yu. Ivanov // Nauk. tex. byuleten` L`viv, 2009 – Vyp.10, n. 4.
7. Пат. 47782 / Україна Nedosekov V. Sposib vyznachennya imunogennoyi aktyvnosti antyrabichnykh vakcyn [Method for determination of immunogenic activity of antirabic vaccines] /V. Nedosekov, I. Polupan, M. Ivanov // Byul. n. 4
8. Nedosekov V. Metody testirovaniya ynaktyvovannykh antyrabichnykh vakcyn [Methods for evaluating the potency of inactivated rabies vaccines are reviewed] //V. Nedosekov. Y. Vyshnyakov, K. Gruzdev //Voprosy virusology, 2001.
9. Perrin P. In vitro rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immunocapture method with a neutralizing anti-glycoprotein monoclonal antibody /P. Perrin, S. Morgeaux, P.Sureau //Biologicals, 1990 – Vol.18
10. WHO Laboratorytechniquesinrabies (4ed.). – Geneva, 1996.

REFERENCES

1. Barth R., Diderrich G., Weinmann E. (1988). NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine (vol. 6, no. 4). Vaccine.
2. Fournier-Caruana J, Poirier B, Haond G. (2003). Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method (vol. 31, no. 1). Biologicals.
3. Gamoh K, Senda M, Itoh O. (1996). Use of ELISA for in vitro potency test of rabies vaccines for animal use (vol. 24, no. 2). Biologicals.
4. Krämer B, Schildger H, Behrendorf-Nicol H A. (2009). The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines (vol. 37, no. 2). Biologicals.
5. Nedosekov V. (2013). Critical review of the NIH-method for testing potency of inactivated rabies vaccines (no. 10). Veterynarna medycyna Ukrayiny [in Ukrainian].

6. Nedosykov V. Strategiya pidvyshhennya imunogennosti inaktyvovanykh antyrabichnykh vakcyn [Strategy for improving potency of inactivated rabies vaccines] /V. V. Nedosykov, L. P. Gryshok, I. M. Polupan, M. Yu. Ivanov // Nauk. tex. byulleten'. L`viv, 2009 – Vyp.10, n. 4.
7. Пат. 47782 / Україна Nedosykov V. Sposib vyznachennya imunogennoyi aktyvnosti antyrabichnykh vakcyn [Method for determination of immunogenic activity of antirabic vaccines] /V. Nedosykov, I. Polupan, M. Ivanov // Byul. n. 4
8. Nedosekov V. Metody testyrovannya ynaktyvyrovannykh antyrabycheskykh vakcyn [Methods for evaluating the potency of inactivated rabies vaccines are reviewed] //V. Nedosekov. Y. Vyshnyakov, K. Gruzdev //Voprosy vyirusology, 2001.
9. Perrin P. In vitro rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immunocapture method with a neutralizing anti-glycoprotein monoclonal antibody /P. Perrin, S. Morgeaux, P.Sureau //Biologicals, 1990 – Vol.18
- 10.WHO (1996). Laboratory techniques in rabies (4 ed.). Geneva.

Серологический метод тестирования иммуногенности инактивированных антирабических вакцин

А.П. Никитова

В статье показан серологический метод определения иммуногенной активности антирабических вакцин. Принцип постановки предусматривал иммунизацию белых мышей референс-вакциной в различных разведениях. На 14 сутки (с момента иммунизации) у животных проводили забор крови, в сыворотке определяли титры антител с помощью ТФ-ИФА. После этого строили калибровочную кривую – пропорциональную зависимость титров антител от иммуногенной активности антирабической вакцины. С помощью данной системы было исследовано 3 серии вакцин. Установлено корреляционную зависимость между серологическим методом тестирования иммуногенной активности антирабических вакцин и классическим тестом НИИ ($r = 0,95$), что позволяет использовать первый как альтернативный метод тестирования иммуногенной активности антирабических вакцин.

Ключевые слова: антирабическая вакцина, антирабические антитела, иммуногенная активность, тест НИИ, ТФ-ИФА.