

МЕТОД ОЦІНКИ ІМУНОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ АНТИРАБІЧНИХ ВАКЦИН ІЗ ВРАХУВАННЯМ ІМУНОСУПРЕСИВНОГО СТАНУ У ТВАРИН

А. П. Нікітова, аспірант

У статті викладено результати дослідження динаміки формування специфічних антирабічних антитіл у білих мишей з індукованою імуносупресією після щеплення їх антирабічною вакциною. Встановлено, що найбільш негативний вплив на тварин відбувався на фоні доксорубіцинової імуносупресії, де антитіла, практично, не утворювались. При оцінці імуногенної активності антирабічних вакцин із врахуванням імуносупресивного стану у тварин було встановлено, що імуногенна активність антирабічної вакцини становить 0,9 МО/доза, а при дослідженні класичним методом – 1,4 МО/доза.

Імуногенна активність, метод ПІН, інактивовані антирабічні вакцини, антирабічні антитіла, імуносупресія.

Як відомо, імунна система володіє високою чутливістю до змін в організмі, внаслідок чого, змінюється її функціональний стан. Ці зміни можуть виникати за рахунок придбаних імунодефіцитів, які можуть бути результатом впливу факторів навколишнього середовища, ендогенних та екзогенних субстанцій [1, 4, 5, 8]. Як наслідок – односпрямовані відхилення клітинних та гуморальних показників крові, зниження напруженості імунної відповіді проти різних інфекційних хвороб, в тому числі й сказу [1-3, 7].

Основним показником, який свідчить про захищеність тварин від захворювання на сказ, є рівень специфічних антитіл (не менше 0,5 МО/см³), який тісно залежить від фізіологічного стану тварини та імуногенної активності вакцини.

Тому, питання проведення профілактичних щеплень у тварин в стані імуносупресії є досить актуальним, а при виробництві вакцин цей фактор обов'язково повинен враховуватись.

Метою роботи було провести визначення імуногенної активності антирабічних вакцин, який би враховував імуносупресивний стан у тварин.

Матеріали та методи. Антирабічні вакцини. Для постановки досліду з визначення імуногенності антирабічних вакцин використовували референс-вакцину антирабічну, інактивовану, що є галузевим стандартним зразком імуногенності антирабічної вакцини, відкалібрований щодо 4-го міжнародного стандарту. Дослідними були комерційні серії інактивованих антирабічних вакцин (2 серії).

Вірус сказу. Міжнародний референс-штам CVS, задепонований в ДНКІБШМ. Інфекційний титр 7,0-7,8 Іг МЛД₅₀/см³.

Тварини, індукція імуносупресії, імунізація. Для проведення досліду використовували безпородних білих мишей чотирьохтижневого віку, масою 12-

14 г. Тварини, по принципу аналогів, були поділені на 6 груп (40 мишей в кожній). Тваринам першої групи вводили однократно Ендоксан, в дозі 200 мг/кг; другій групі – Ендоксан, однократно, в дозі 100 мг/кг; третій групі – Ендоксан, двократно, з інтервалом в 1 добу, в дозі 50 мг/кг; четвертій групі – Доксорубіцин, тричі, в дозі 3 мг/кг; п'ятій групі – Доксорубіцин, тричі, в дозі 2 мг/кг живої ваги. Шоста група була контрольною. На 5 добу досліду усіх тварин імунізували антирабічною вакциною. На 7, 14, 21 та 28 добу з моменту імунізації проводили забір крові та визначали у сироватках рівень специфічних антитіл до вірусу сказу методом ТФ-ІФА.

Діагностичний набір Platelia Rabies Kit II для визначення вмісту антирабічних антитіл, виробництва BIO RAD (США).

Отримані результати досліджень обробляли з використанням загальноприйнятих статистичних методів, використовуючи комп'ютерну програму MS Excel.

Постановку класичного методу NIH проводили відповідно методики [6].

Результати досліджень. В попередніх наших дослідженнях встановлено негативний вплив несприятливих умов утримання тварин (морських свинок) на формування антирабічного імунітету [3]. Враховуючи результати дослідження сироваток крові морських свинок, перший етап досліджень полягав у підборі імунодепресанта та дози для білих мишей, яка б забезпечувала аналогічне зниження рівня антирабічних антитіл в сироватках крові після імунізації антирабічною вакциною.

Аналіз досліджень показав, що в білих мишей, щеплених антирабічною вакциною, утворення специфічних антитіл відбувалось вже на 7 добу досліду. Представлені результати досліджень показали, що на 14 добу з моменту імунізації, захисного рівня специфічних антирабічних антитіл набули лише тварини II, III та контрольної групи ($1,1 \pm 0,07$, $1,12 \pm 0,04$ та $2,25 \pm 0,10$ МО/см³ відповідно) (табл. 1).

1. Рівень специфічних антитіл у сироватках крові білих мишей, з індукованою імуносупресією, після імунізації антирабічною вакциною, МО/см³ ($M \pm m$, $n=10$)

Номер групи тварин	Доба відбору крові			
	7	14	21	28
I	$\leq 0,04$	$0,37 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,01$	$0,35 \pm 0,02^*$
II	$\leq 0,04$	$1,1 \pm 0,07$	$1,3 \pm 0,08$	$1,38 \pm 0,09^*$
III	$\leq 0,04$	$1,12 \pm 0,04$	$1,25 \pm 0,05$	$1,3 \pm 0,07^*$
IV	$\leq 0,04$	$\leq 0,04$	$\leq 0,04$	$\leq 0,04$
V	$\leq 0,04$	$\leq 0,04$	$\leq 0,04$	$\leq 0,04$
контроль	$\leq 0,25$	$2,25 \pm 0,10$	$2,5 \pm 0,04$	$2,41 \pm 0,05$

Примітка: * – різниця достовірна відносно контролю при $p \leq 0,05$.

У тварин цих же груп тенденція до збільшення антитіл продовжувала спостерігатись і на 21 добу досліду.

По закінченню спостереження (28 доба), статистично достовірно встановлено, що у тварин I групи рівень антитіл знаходився нижче мінімального захисного рівня – $0,35 \pm 0,02$ МО/см³. У тварин IV та V груп, протягом всього дослідного періоду, у сироватках крові спостерігався лише фоновий рівень антитіл ($\leq 0,04$ МО/см³).

Наступний етап нашого дослідження полягав у зараженні мишей вірусом сказу на 28 добу з моменту імунізації. За тваринами спостерігали впродовж 14 діб. Отримані результати виживших тварин, у відсотковому співвідношенні, ми зобразили у вигляді рисунку (Рис.1).

Аналіз рисунку вказує на те, що у тварин I, IV та V груп летальність склала 100 %, що свідчить про відсутність захисту у тварин від зараження вірусом сказу внаслідок індукованої імуносупресії. Встановлено кореляцію на високому рівні між титром специфічних антирабічних антитіл у тварин (на 28 добу) та відсотку тварин, що вижили ($r=0,96$).



Рис.1. Відсоткове співвідношення виживших тварин після зараження вірусом сказу

Отримані результати спонукали нас до проведення досліджень з визначення імуногенної активності антирабічних вакцин на тваринах з індукованою імуносупресією (модифікація класичного методу NIH). Згідно нашої методики, тваринам вводили один із підібраних препаратів (Ендоксан в дозі 100 мг/кг), після чого проводили імунізацію із послідовним інтрацеребральним зараженням вірусом сказу, аналогічно методу NIH. В досліді використовували 2 серії комерційної інактивованої антирабічної вакцини з різною імуногенною активністю.

Отримані результати визначення активності вакцин класичним та модифікованим методом NIH зазначені в таблиці 2.

2. Результати порівняльного визначення імуногенної активності інактивованих вакцин традиційним методом NIH та його модифікацією

Номер серії вакцини	тест NIH		Тест з використанням Ендоксану	
	Lg ЕД ₅₀	Активність, МО/см ³	Lg ЕД ₅₀	Активність, МО/см ³
1	2,75	1,4	1,93	0,9
2	3,10	3,2	2,35	2,4
Референтна вакцина	2,60	1	1,97	1

Отримані результати показали, що імуногенна активність першої та другої серії вакцини, визначена традиційним методом, становила 1,4 та 3,2 МО/см³, в той час, як модифікованим нами тестом – 0,9 та 2,4 МО/см³ відповідно.

В Україні законодавчо дозволено використання антирабічних вакцин для імунізації тварин з активністю не менше як 1 МО/доза. Однак, отримані нами результати вказують на необхідність застосування для тварин з підозрою на

імуносупресію тільки високоімуногенних препаратів, так як вакцини з мінімально допустимим рівнем імуногенної активності не здатні забезпечити утворення протективного рівня антирабічних антитіл та захистити таких тварин від зараження вірусом сказу.

Висновки

1. Антирабічна вакцина забезпечує утворення специфічних антитіл у крові білих мишей з титром на протективному рівні вже на 14-у добу дослідів та максимальним титром на 21-у – $2,5 \pm 0,04$ МО/см³.

2. У тварин, з індукованою доксорубіцином імуносупресією, після введення антирабічної вакцини, специфічні антитіла практично не утворювались, впродовж дослідного періоду спостерігався лише фоновий рівень ($\leq 0,04$ МО/см³). У тварин, яким перед імунізацією вводили Ендоксан однократно в дозах 200 мг/кг, 100 мг/кг та двократно в дозі 50 мг/кг, титр антитіл на 14 добу дослідів становив: $0,37 \pm 0,03$, $1,1 \pm 0,07$ та $1,12 \pm 0,04$ МО/см³ відповідно, що достовірно менше, порівняно з тваринами контрольної групи.

3. Показано низький рівень захисту вакцинованих мишей, з індукованою імуносупресією, від зараження вірусом сказу, з летальністю 38-100 %.

4. Модифікований метод визначення імуногенної активності антирабічних вакцин з використанням лабораторних мишей із штучно індукованою імуносупресією, що відображає вплив несприятливих умов утримання тварин, показав активність вакцини з імуногенністю 1,4 та 3,2 МО/доза на рівні 0,9 та 2,4 МО/доза відповідно.

Список літератури

1. Зміни лейкограми крові мурчаків у разі поєднаного впливу антирабічної вакцинації та стресових факторів / В. В. Недосєков, А. П. Нікітова, І. М. Полупан та ін. // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – № 23. – С. 182-185.

2. Москвичов Є. П., Рожковський Я. В. Порівняльний вплив імунокоректорів на стан факторів проти інфекційного імунітету в умовах доксорубіцинової моделі імуносупресії / Є. П. Москвичов, Я. В. Рожковський // Одеський медичний журнал. – 2013. – №1 (135). – С.10-16.

3. Недосєков В. В. Вплив несприятливих умов утримання тварин на формування антирабічного імунітету / В. В. Недосєков, А. П. Нікітова, І. М. Полупан // Біологія тварин. – 2013. – Т. 15. – № 4. – С. 80-84.

4. Daynes R. A., Araneo B. A. Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4 / R. A. Daynes, B. A. Araneo // Eur. J. Immunol. – 1989. – Vol. 19. – P. 2319-2325.

5. Knoferl M. W. Immunomodulatory effects of dehydroepiandrosterone in proestrus female mice after traumahemorrhage / M. W. Knoferl, M. K. Angele, R. A. Catania // J. Appl. Physiol. – 2003. – Vol. 95. – № 2. – P. 529-535.

6. Laboratory techniques in rabies 4-ed. Geneva. – 1996. – 476p.

7. Quantitative assessment of humoral immunosuppression in water deprived semi nomadic sheep / E. Barbour, G. Banat, W. Itani et. al. // Intern. J. Appl. Res. Vet. Med. – 2004. – №. 4. – Vol. 2. – P. 310-320.

8. Response of CD4 lymphocytes and clinical consequences of treatment using ddI or ddC in patients with advanced HIV infection / A. I. Goldman, B. P. Carlin, L. R. Crane, C. Launer // J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol. – 1996. – Vol. 11. – № 2. – P. 161-169.

В статье изложены результаты исследования динамики формирования специфических антирабических антител у белых мышей, с индуцированной иммуносупрессией, и после иммунизации их антирабической вакциной. Установлено, что наибольшее негативное влияние на животных происходило на фоне доксорубициновой иммуносупрессии, где антитела практически не образовывались. При оценке иммуногенной активности антирабических вакцин с учетом иммуносупрессивного состояния у животных было установлено, что иммуногенная активность антирабической вакцины составляет 0,9 МЕ/доза, а при исследовании классическим методом – 1,4 МЕ/доза.

Иммуногенная активность, метод НИИ, инактивированные антирабические вакцины, антирабические антитела, иммуносупрессия.

The article represents results of a study of the formation dynamics of specific antibodies rabies in white mice with induced immunosuppression after inoculation of rabies vaccine. Found that the most negative impact on the animals took place against a background of doksorubitsyn immunosuppression where antibodies are practically not formed. In assessing the immunogenic activity of rabies vaccines with regard to immunosuppressive state in animals was found to be immunogenic activity of rabies vaccine is 0,9 IU/dose, and the study of the classical method – 1,4 IU/dose.

Immunogenic activity, method NIH, inactivated rabies vaccine, rabies antibody, immunosuppression.