

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ  
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

**НІКІТОВА АЛІНА ПЕТРІВНА**

**УДК 619:612.017:615.37:616.98**

**ФОРМУВАННЯ АНТИРАБІЧНОГО ІМУНІТЕТУ  
ТА ВДОСКОНАЛЕННЯ МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ІМУНОГЕННОСТІ  
ІНАКТИВОВАНИХ АНТИРАБІЧНИХ ВАКЦИН**

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія,  
епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата ветеринарних наук

**Київ–2015**

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Національному університеті біоресурсів і природокористування України

**Науковий керівник** доктор ветеринарних наук, доцент  
**Недоссков Віталій Володимирович**  
Національний університет біоресурсів і природокористування України,  
завідувач кафедри епізоотології та організації ветеринарної справи

**Офіційні опоненти:** доктор ветеринарних наук,  
старший науковий співробітник  
**Клестова Зінаїда Сергіївна**  
Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,  
заступник директора з наукової роботи

доктор ветеринарних наук, професор  
**Корнієнко Леонід Євгенович**  
Білоцерківський національний аграрний університет,  
завідувач кафедри епізоотології та інфекційних хвороб

Захист відбудеться «22» жовтня 2015 р. о 10<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ–41, вул. Генерала Родімцева, 19, навчальний корпус №1, кімната 97

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ–41, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус №4, кімната 41а

Автореферат розісланий «21» вересня 2015 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

Н. Г. Грушанська

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Сказ – один із найнебезпечніших зоонозів, який реєструється у 112 країнах світу, у тому числі і в Україні (друге місце у Європі), за рівня 1500–2000 випадків захворювання на рік у тварин (Гришок Л. П. та ін., 2005; Rupprecht C., 2005; Іванов М. Ю., 2011; Головка М. А., 2013; Романенко О. А., 2014; Oviedo-Pastrana M. E., 2015).

Основним заходом ефективного контролю сказу є створення напруженого імунітету через щеплення високоімуногенними інактивованими вакцинами (Rupprecht C. E., 2004; Полупан І. М., 2010; WHO, 2015).

Нині розроблено і використовується широкий спектр інактивованих антирабічних вакцин як вітчизняного, так і закордонного виробництва. Однак аналіз складної ситуації свідчить, що лише застосування вакцин не дає змоги формувати напружений імунітет.

На наш погляд, це пов'язано із гетерогенністю популяційного та індивідуального захисту тварин, незважаючи на однакові умови проведення імунізації та активність вакцини. Крім того, не виключений вплив стрес-факторів на створення імунітету (Пьянов В. Д., 2004; Єфімов В. Г., 2009).

Комітет експертів ВООЗ зі сказу (1994) не рекомендує реєструвати і застосовувати інактивовані вакцини для тварин з імуногенною активністю менше 1,0 МО у дозі, що визначається методом НІН (National Institutes of Health), визнаним Європейською фармакопеею. Однак, незважаючи на його широке застосування, він має низку суттєвих недоліків та потребує вдосконалення (Barth R., 1988; Недосеков В. В., 2003; Krämer B., 2010; Lewis C., 2013; Nedosekov V., 2013; Schiffelers M., 2014; Servat A., 2015).

Отже, дослідження формування антирабічного імунітету та вдосконалення методів контролю імуногенності інактивованих антирабічних вакцин є актуальними проблемами у системі контролю сказу як у ветеринарії, так і в медицині.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана як самостійний фрагмент планової науково-дослідної роботи Науково-дослідного інституту здоров'я тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України «Вивчення еволюційно-екологічних особливостей епізоотології сказу тварин на сучасному етапі» (номер державної реєстрації 0110U003632).

**Мета і задачі дослідження.** Мета дослідження – формування антирабічного імунітету у вакцинованих тварин і вдосконалення методів контролю імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

– визначити особливості формування специфічних антитіл у різних видів тварин, після щеплення їх антирабічною вакциною;

– дослідити вплив несприятливих умов утримання тварин на формування антирабічного імунітету;

– дослідити рівні синтезу антирабічних антитіл за експериментально індукованої імуносупресії у лабораторних тварин і розробити метод оцінки імуногенності антирабічних вакцин на моделі тварин з індукованою імуносупресією;

– розробити метод оцінки імуногенної активності антирабічних вакцин, який моделює природні шляхи введення вакцини та інфікування тварин;

– провести тестування імуногенної активності антирабічних вакцин після контрольного зараження вуличними ізолятами вірусу сказу;

– розробити «серологічний» метод контролю імуногенної активності антирабічних вакцин;

– розробити уніфіковану систему оцінки імуногенної активності антирабічних вакцин.

*Об'єкт дослідження:* антирабічний імунітет, імуногенна активність антирабічних вакцин, методи визначення імуногенності інактивованих антирабічних вакцин.

*Предмет дослідження:* формування специфічних антитіл, вплив несприятливих умов утримання на формування антирабічного імунітету, імунологічні методи, система оцінки імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин.

**Методи дослідження:** вірусологічні (біологічна проба, титрування на білих мишах), імунологічні (ІФА, FAVN), гематологічні (морфологічний склад крові, лейкоцитарна формула) та статистичні методи дослідження.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше досліджено порівняльну динаміку формування антирабічного імунітету у лабораторних (білі миші, морські свинки), домашніх (собаки, коти) та продуктивних (велика рогата худоба (ВРХ) тварин, однократно щеплених вакциною «Рабістар». Визначено періоди максимального накопичення специфічних антитіл (21–27 доба), що стало підґрунтям для розроблення альтернативного методу тестування імуногенної активності антирабічних вакцин.

Уперше одержано результати щодо напруженості антирабічного імунітету та впливу вітчизняних антирабічних вакцин на гематологічні показники у щеплених тварин під дією різних стресових факторів, що може бути враховано під час планування протиепізоотичних заходів.

Проведено моделювання стану імуносупресії у лабораторних тварин та визначення імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин на даних тваринах.

Модифіковано класичний метод визначення імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин (тест НИ), що полягає в природному

шляху введення вакцини (внутрішньом'язове) та інфікування (підшкірне) тварин.

За використання у тесті НІН регіональних ізолятів вірусу сказу встановлено менший захист лабораторних тварин (на 17–25 %), аніж за використання референс-штаму CVS, що свідчить про гетерогенність ізолятів і штамів вірусу сказу та необхідність у польових умовах використовувати високоімуногенні серії вакцини.

Уперше розроблено альтернативний «серологічний» метод контролю імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин на основі визначення поствакцинальних антирабічних антитіл та встановлено кореляцію ( $r = 0,9$ ) між імуногенною активністю інактивованих антирабічних вакцин (тест НІН) і титром специфічних антитіл у лабораторних тварин.

Уперше розроблено уніфіковану систему оцінки імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин, яка містить: «периферичний» тест, «серологічний» метод, тест НІН з вуличними ізолятами вірусу сказу та тест НІН на тваринах з індукованою імуносупресією, що дає змогу більш об'єктивно контролювати вакцини.

Наукову новизну розробки підтверджено патентом України на корисну модель №99046. Україна, МПК А61К 39/00 – «Спосіб визначення імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин з використанням калібрувальної кривої».

**Практичне значення одержаних результатів.** Встановлена кореляція показників імуногенної активності антирабічних вакцин, що отримана при використанні референтного штаму та вуличних ізолятів вірусу сказу, може використовуватися у процесі планування протиепізоотичних заходів та під час розроблення програм контролю сказу.

Результати дисертації впроваджено у науково-дослідних інститутах України: Інститут ветеринарної медицини НААН (лабораторія нейроінфекцій); Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (науково-дослідний вірусологічний відділ); Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (відділ біотехнології і контролю вірусних препаратів), що підтверджено актами впровадження результатів дисертаційної роботи у виробничий процес.

Основні положення дисертаційної роботи використовуються у науковій і навчальній роботі на кафедрі епізоотології та організації ветеринарної справи Національного університету біоресурсів і природокористування України, що підтверджено актом із впровадження результатів досліджень у навчальний процес.

Опрацьована уніфікована система оцінки імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин, яка готова до використання у біологічній промисловості України.

**Особистий внесок здобувача.** Здобувач самостійно розробила програму досліджень, визначила мету і задачі дослідження, науково-методичні

підходи, провела експериментальні дослідження. Із методичною та консультативною допомогою наукового керівника, доктора ветеринарних наук В. В. Недосекова проаналізувала та узагальнила матеріали, провела статистичне опрацювання результатів експериментів, підготувала статті і сформулювала висновки роботи.

Глибоку вдячність за науково-консультативну допомогу у ряді експериментів досліджень здобувач висловлює кандидатам ветеринарних наук І. М. Полупану (Інститут ветеринарної медицини НААН) та М. Ю. Іванову (Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи).

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на засіданнях вченої ради Інституту ветеринарної медицини НААН у 2012–2014 рр.; XI Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу та аспірантів Навчально-наукового інституту ветеринарної медицини, якості та безпеки продукції тваринництва «Теоретичні та практичні підходи до вирішення проблем ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва» (2012, м. Київ); The International society for disease surveillance conference. Expanding collaborations to chart a new course in public health surveillance (2012, San Diego); XII Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу та аспірантів «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва» (2013, м. Київ); The 11th annual ASM biodefense and emerging diseases research meeting was held (2013, Washington); The 113th general meeting American society for microbiology (2013, Denver); The 62nd American society of tropical medicine and hygiene annual meeting (2013, Washington); XIII Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу та аспірантів «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва» (2014, м. Київ); Науково-практичній конференції молодих вчених ІВМ НААН «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (2014, м. Київ); Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию образования Иркутской государственной сельскохозяйственной академии и 10-летию первого выпуска ветеринарных врачей (2014, г. Иркутск); Міжнародній науково-практичній конференції «Основні напрями забезпечення ветеринарного благополуччя тваринництва» (2014, м. Біла Церква); на третьому засіданні Бюро експертів з питань сказу на Близькому Сході і в Східній Європі (2015, Ліон).

**Публікації.** Основні положення дисертації викладено у 19 наукових працях, у тому числі 7 у фахових виданнях України, 2 статті у наукових фахових виданнях України включених до міжнародних наукометричних баз даних, 6 тез доповідей; методичні рекомендації; 2 статті у наукових виданнях інших держав та деклараційний патент України на корисну модель.

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертацію викладено на 141 сторінках комп'ютерного тексту та містить такі розділи: вступ, огляд літератури, матеріали і методи, результати власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів дослідження, висновки, пропозиції виробництву, список використаних джерел, додатки. Робота ілюстрована 28 таблицями та 4 рисунками, містить 6 додатків. Список використаних джерел містить 238 найменувань, у тому числі 170 – латиницею.

### ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Дослідження виконано впродовж 2011–2015 рр. на кафедрі епізоотології та організації ветеринарної справи НУБіП України. Деякі дослідження проведено у лабораторії сказу, «Науково-дослідному центрі з питань вивчення та профілактики сказу в Україні» Інституту ветеринарної медицини НААН та Інституті фармакології та токсикології НАМН України.

**Матеріали.** *Віруси:* вірус сказу, міжнародний референс-штам CVS, задепонований 25.02.2002 р. у ДНКІБШМ (7,0–7,8 lg МЛД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>); вуличні ізоляти вірусу сказу, виділені від kota (10C289) та лисиці (09F94), з титром 3,25 та 2,60 lg МЛД<sub>50</sub>/0,03 см<sup>3</sup> відповідно.

*Антирабічні вакцини:* вакцина антирабічна інактивована рідка «Рабістар» зі штаму G 52 Wistar (Укрветпромстач, Україна), серії: 470911, 521211, 040412, 201112, 100713; вакцина антирабічна «Indirab» (Bharat Biotech, Індія), серія 62AN13009.

Для визначення імуногенності антирабічних вакцин за методом Національних Інститутів Здоров'я (НИН) (Bethesda, 1973) використано *Міжнародний робочий стандарт антирабічної вакцини* – International Working Standard of Rabies Vaccine I. P. (IWS) з імуногенною активністю 5,59 МО/доза (Bharat Biotech, India).

*Дослідні тварини:* для визначення інфекційної активності вірусомісних суспензій, постановки тесту НИН та модифікацій тесту НИН використовували безпородних білих мишей масою 9–11 г. Для визначення динаміки антитілоутворення використовували морських свинок масою тіла 600–700 г, безпородних білих мишей масою тіла 15–20 г, собак масою тіла 7–10 кг, котів масою тіла 2,7–3,0 кг, ВРХ масою тіла 500–600 кг.

*Фармакологічні препарати:* для індукування у тварин стану імуносупресії використано: Ендоксан (Бакстер Онколоджі ГмбХ, Німеччина), Доксорубіцин (ВАТ «Київмедпрепарат», Україна).

*Діагностичні набори:* набір Platelia Rabies Kit II для визначення вмісту антирабічних антитіл (BIO RAD, США).

**Методи.** *Визначення інфекційної активності вірусу сказу in vivo* проводили титруванням на білих мишах за методом Н. Koprowski (1973). Титр вірусу обчислювали за методом Spearman-Kärber (1973).

*Моделювання несприятливих умов утримання: зниженої температури навколишнього середовища* – утримували дослідних тварин за температури  $12\pm 2$  °С, яку підтримували за допомогою хладагентів (група I); *підвищеної температури навколишнього середовища* – тварин (група II) піддавали впливу температури  $32\pm 2$  °С за допомогою інфрачервоної лампи; *аліментарного стресу* – проводили згідно з методикою В. Д. Пьянова, 2004 (група III). Усіх тварин у таких умовах утримували впродовж 27 діб після вакцинації.

*Визначали імуногенність інактивованих антирабічних вакцин* класичним та модифікованими методами НІН з використанням для контрольного зараження референс-штаму CVS вірусу сказу та вуличних ізолятів вірусу сказу.

*Моделювання імуносупресивного стану у білих мишей* проведено фармакологічними препаратами: Ендоксан, який вводили інтраперитоніально одноразово у дозі 200 мг/кг (I група), одноразово у дозі 100 мг/кг (II група), дворазово з інтервалом в 1 добу у дозі 50 мг/кг (III група) та Доксорубіцин, який вводили інтраперитоніально впродовж 3 діб у дозі 3 мг/кг (IV група) та 2 мг/кг (V група).

*Постановку тесту з визначення імуногенності вакцин на імуносупресивних тваринах* проведено за умов штучно індукованої у тварин імуносупресії із подальшою постановкою стандартного тесту НІН.

*Постановку «периферичного» тесту* проведено шляхом введення білим мишам дослідної і референтної вакцин у розведеннях 1:5, 1:25, 1:125, 1:625 внутрішньом'язово (в область стегна) в об'ємі 0,15 см<sup>3</sup>. На 21 добу після щеплення мишей заражали підшкірно референс-штамом CVS вірусу сказу у дозі 10–50 ЛД<sub>50</sub>/0,15 см<sup>3</sup>.

*Постановку «серологічного» тесту* проводили досліджуючи титри антирабічних антитіл у мишей, щеплених референтною вакциною з різною імуногенною активністю (1 МО/см<sup>3</sup>, 2 МО/см<sup>3</sup>, 2,8 МО/см<sup>3</sup>, 3,9 МО/см<sup>3</sup>, 5,59 МО/см<sup>3</sup>) та дослідними вакцинами. Препарати вводили інтраперитоніально, у розведенні 1:5, об'ємом 0,5 см<sup>3</sup>.

*Титр антирабічних антитіл у сироватках крові тварин* досліджено методом ТФ-ІФА з використанням набору для визначення антитіл до вірусу сказу Platelia Rabies Kit II (BIO RAD, США) згідно з інструкцією виробника. Оптичну щільність визначено за допомогою комп'ютерної програми Magellan 4. Результати досліджень виражали у МО/см<sup>3</sup>.

*Титр віруснейтралізуючих антитіл* визначено методом FAVN за методикою, наведеною в Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines (OIE, 2004)

*Гематологічні дослідження:* кількість еритроцитів, гемоглобін, показник гематокриту, лейкоцити, кров'яні пластинки та лейкограми крові проведено за допомогою гематологічного аналізатора MYTHIC 22 (C2 Diagnostics, Франція).

Статистичне опрацювання результатів досліджень та визначення достовірності даних проведено за Г. Ф. Лакіним (1990) з використанням програми MS Excel.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ АНАЛІЗ

**Визначення особливостей формування специфічних антитіл у різних видів тварин після щеплення їх антирабічною вакциною.** З метою уникнення маскуючого впливу бустер-ін'єкції, для дослідження особливостей формування антирабічного імунітету як у лабораторних (морські свинки, білі миші), так і у домашніх (собаки, коти) тварин проведено однократне їх щеплення антирабічною вакциною «Рабістар» (рис. 1).

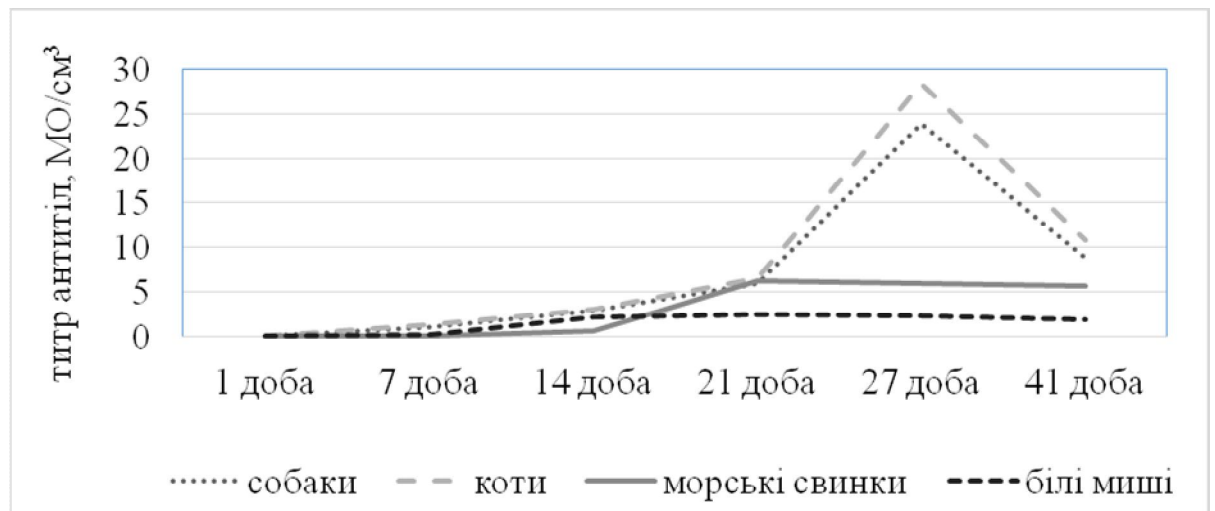


Рис. 1. Динаміка титрів антирабічних антитіл у сироватках крові дослідних тварин

Антирабічні антитіла у тварин виявлено на 7-у добу з моменту їх щеплення. Однак захисний рівень специфічних антитіл був лише у собак та котів ( $1,01 \pm 0,29$  та  $1,27 \pm 0,15$  МО/см<sup>3</sup>, відповідно), тоді як у морських свинок та білих мишей він набував цього значення лише на 14 добу з моменту імунізації ( $0,6 \pm 0,09$  та  $2,25 \pm 0,10$  МО/см<sup>3</sup>, відповідно).

Зростання рівня антирабічних антитіл до 27 доби з моменту імунізації реєструвалось у векторних (собаки –  $23,9 \pm 3,51$  МО/см<sup>3</sup>, коти –  $28,36 \pm 1,69$  МО/см<sup>3</sup>) та до 21 доби у лабораторних (морські свинки –  $6,2 \pm 0,83$  МО/см<sup>3</sup>, білі миші –  $2,5 \pm 0,04$  МО/см<sup>3</sup>) тварин, де набуло максимальних значень.

Отже, в умовах фізіологічного стану організму після однократного щеплення найінтенсивніше утворення специфічних антитіл спостерігали у котів ( $28,36 \pm 1,69$  МО/см<sup>3</sup>).

Визначення титрів специфічних антитіл у великої рогатої худоби (ВРХ) після однократної антирабічної вакцинації. У зв'язку з тим, що у ході досліджу виявилось, що тварини були спонтанно заражені лептоспірозом (титри від 1:100 до 1:800), мета цього експерименту – дослідження впливу ко-інфікування на формування антирабічного імунітету.

Тварин поділили на 2 дослідні групи: перша (5 голів) – серонегативні до лептоспірозу, та друга (8 голів) – серопозитивні до лептоспірозу.

Результати експерименту свідчать, що впродовж усього періоду дослідження титр антитіл у I групі тварин перебував на вищому рівні аніж у тварин II групи (табл. 1).

Таблиця 1

**Рівень специфічних віруснейтралізуючих антитіл після антирабічного щеплення у ВРХ ( $M \pm m$ )**

№ п/п	Група тварин	Титр антирабічних антитіл, МО/см <sup>3</sup>			
		106 доба	180 доба	274 доба	366 доба
I	Серонегативні (контроль) (n=5)	1,55±0,20	1,30±0,15	0,95±0,13	0,61±0,08
II	Серопозитивні на лептоспіроз (n=8)	0,86±0,11*	0,65±0,09**	0,46±0,10*	0,35±0,13

Примітки: \* – різниця достовірна щодо результатів контролю для  $P < 0,05$ ;

\*\* – різниця достовірна щодо результатів контролю для  $P < 0,01$ .

Так, на 274-у добу у тварин II групи титр антитіл становив  $0,46 \pm 0,10$  МО/см<sup>3</sup>, що на 51,6 % менше, ніж показник тварин I групи. Характеризуючи імунну відповідь у тварин на 366-у добу встановлено, що у тварин I групи зберігся захисний рівень антитіл ( $0,61 \pm 0,08$  МО/см<sup>3</sup>), у той час як у тварин, що були серопозитивними на лептоспіроз, титр антитіл становив  $0,35 \pm 0,13$  МО/см<sup>3</sup>.

Отже, на прикладі лептоспірозу встановлено, що спонтанне зараження тварин призводить до зниження рівня антирабічних антитіл більше як у 2 рази, що потребує дослідження тварин на наявність спонтанних інфектів перед вакцинацією.

**Вплив несприятливих умов утримання тварин на формування антирабічного імунітету.** Дослідження проводили, використовуючи два критерії оцінки: 1) дослідження рівня специфічних антирабічних антитіл; 2) дослідження морфологічних показників крові. Лабораторною моделлю обрано морських свинок, яким створювали умови гіпо-, гіпертермії та аліментарного стресу. Визначення рівня специфічних антитіл проведено на 1-, 7-, 14-, 21-, 27- та 41-у добу з моменту щеплення антирабічною вакциною (табл. 2).

Таблиця 2

**Рівень специфічних антитіл у сироватках крові морських свинок після антирабічного щеплення, МО/см<sup>3</sup> (M±m, n = 4)**

Група тварин (умови утримання)	Доба після щеплення					
	1	7	14	21	27	41
I (t = 12±2 °C)	0	0,1±0,05	1,2±0,07°*	3,0±0,70°*	3,2±0,76*	3,3±0,97
II (t = 32±2 °C)	0	≤0,04	0,5±0,35°	3,1±1,12°*	3,5±0,79*	4,0±0,52

*Продовж. табл.2*

III (аліментарний стрес)	0	≤0,04	0,2±0,12°*	0,7±0,19°*	0,8±0,25*	1,0±0,30*
IV (контроль)	0	≤0,04	0,6±0,09°	6,2±0,83°	6,0±0,74	5,7±0,76

Примітки: ° – різниця достовірна щодо результатів попередніх досліджень для  $p \leq 0,05$ ;

\* – різниця достовірна щодо контролю (IV група) для  $p \leq 0,05$ .

Встановлено, що на 14-у добу досліду у тварин I, II та IV груп титр специфічних антирабічних антитіл набув захисного рівня (понад 0,5 МО/см<sup>3</sup>). Під час утримання тварин за температури 12±2 °C (I група) синтез специфічних антитіл був інтенсивнішим (вищі титри) порівняно із тваринами контрольної групи (1,2±0,07 та 0,6±0,09 МО/см<sup>3</sup> відповідно), тоді як у тварин III групи рівень антирабічних антитіл перебував на рівні 0,2±0,12 МО/см<sup>3</sup>, що значно менше мінімального захисного рівня.

На 21-у добу у сироватках крові тварин I та II групи титр антирабічних антитіл був вдвічі нижчим за показники контрольної групи, а у тварин III групи він набув протективного рівня (0,7±0,19 МО/см<sup>3</sup>), хоча й був у 9 разів статистично достовірно нижчим за показник контрольної групи.

У процесі дослідження імунної відповіді на введення антирабічної вакцини у морських свинок встановлено, що за несприятливих умов утримання тварин титри антитіл перебувають на нижчому рівні, аніж у контролі.

Вплив імунізації та негативних факторів на морфологічні показники крові морських свинок досліджували по 6 показникам. Кров у тварин відбирали на 1-, 7-, 14-, 21-, 27- та 41-у добу дослідження, однак найпоказовішими були 1 та 27 доба експерименту (табл. 3).

Так, найбільших негативних змін завдавав аліментарний стрес. Зниження загальної кількості лейкоцитів на 27-у добу (4,6±0,84 Г/л) свідчить про пригнічення діяльності у кровотворних органах організму тварин.

Відбувалося зниження кількості лімфоцитів ( $34,0 \pm 2,32$  %) порівняно із показниками контрольної групи тварин ( $56,6 \pm 2,79$  %).

Також на 27-у добу ми спостерігали зменшення вмісту еозинофілів ( $1,6 \pm 0,15$  %) з одночасним зростанням числа моноцитів ( $9,6 \pm 2,05$  %), що згідно з даними літератури є ознакою впливу стресу на тварин.

Досліджуючи вплив високої температури ( $t = 32 \pm 2^\circ\text{C}$ ) на 27-у добу експерименту спостерігали зниження кількості лейкоцитів ( $4,4 \pm 1,25$  Г/л) у тварин, вміст яких був нижчий ніж у тварин контрольної групи ( $6,8 \pm 0,85$  Г/л). Також у цій групі тварин спостерігали еозинофілію з показником  $7,0 \pm 2,59$  %, у той час як у контрольній групі він становив  $2,7 \pm 0,77$  %.

Таблиця 3

**Морфологічні показники крові морських свинок за впливу антирабічної вакцинації та несприятливих умов утримання (M±m, n=4)**

Показник	1 доба дослідження				27 доба дослідження			
	I група (t=12±2 <sup>0</sup> C)	II група (t=32±2 <sup>0</sup> C)	III група (аліментарний стрес)	контроль	I група (t=12±2 <sup>0</sup> C)	II група (t=32±2 <sup>0</sup> C)	III група (аліментарний стрес)	контроль
Кількість лейкоцитів, 1x10 <sup>9</sup> в 1 дм <sup>3</sup>	8,0±0,20	8,3±0,18	7,3±0,57	8,4±1,17	3,6±2,10	4,4±1,25*	4,6±0,84*	6,8±0,85
базофіли, %	0,8±0,04	0,9±0,12	1,0±0,15	0,7±0,30	0,8±0,21	0,5±0,04	1,2±0,30	0,7±0,23
еозинофіли, %	4,0±0,10	4,6±1,05	4,0±0,97	4,3±1,05	2,1±0,54*	7,0±2,59*	1,6±0,15*	2,7±0,77
нейтрофіли, %	32,1±1,68	32,8±2,55	37,4±1,05	37,2±3,31	35,5±3,45	25,0±2,54*	53,6±2,71**	34,4±1,90
лімфоцити, %	57,1±0,91	56,2±2,50	51,2±2,40	51,2±3,87	56,3±5,15	63,0±3,31	34,0±2,32**	56,6±2,79
моноцити, %	6,0±0,56	5,5±0,34	6,4±1,52	6,6±0,92	5,3±1,72	4,5±0,76	9,6±2,05	5,6±0,62

Примітки: \* – різниця достовірна щодо результатів попередніх досліджень для p≤0,05;

\*\* – різниця достовірна щодо результатів попередніх досліджень для p≤0,01.

У разі дії на імунізованих тварин антирабічної вакцини за температури  $12\pm 2$  °С на 27-у добу показник загальної кількості лейкоцитів становив  $3,6\pm 2,10$  Г/л і був найнижчим показником серед усіх інших груп. Під час підрахунку лейкограм спостерігали зниження відсоткового числа еозинофілів ( $2,1\pm 0,54$  %), однак порівняно з контрольною групою тварин різниця була незначною.

Отже, найбільш негативний вплив на формування антирабічного імунітету має аліментарний стрес, внаслідок чого спостерігається загальна лейкоцитопенія завдяки лімфоцитозу.

**Розроблення методу оцінки імуногенної активності антирабічних вакцин на моделі тварин з ідукованою імуносупресією.** Відомо, що на тлі імуносупресивного стану у вакцинованих тварин відбувається формування низького рівня специфічних антитіл. Тому проведено визначення імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин методом НІН на тваринах з ідукованою імуносупресією.

На першому етапі досліджено рівень утворення антирабічних антитіл на тлі ідукованої імуносупресії у тварин. Для цього тваринам п'яти груп відповідно до розробленої схеми вводили препарати (Ендоксан або Доксорубіцин), тваринам шостої групи (контроль) вводили плацебо, а на 5-у добу проводили антирабічну імунізацію. За тваринами спостерігали 28 діб (табл. 4).

Таблиця 4

**Рівень поствакцинальних антирабічних антитіл у білих мишей з ідукованою імуносупресією, МО/см<sup>3</sup> (M±m, n = 10)**

Група 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 щодо контролю для  $p\leq 0,001$ .

Аналіз результатів досліджень свідчить, що у щеплених антирабічною вакциною білих мишей утворення специфічних антитіл відбувалося вже на 7 добу спостереження, але у тварин контрольної групи рівень специфічних антитіл був вищим.

На 14-у добу з моменту імунізації захисного рівня специфічних антитіл набули лише тварини II, III та контрольної груп ( $1,1\pm 0,07$ ,  $1,12\pm 0,04$  та  $2,25\pm 0,10$  МО/см<sup>3</sup> відповідно).

Подальше зростання рівнів специфічних антитіл спостерігали на 21 добу досліду, але захисного рівня він набув лише у тварин II, III та контрольної

груп. Після закінчення досліду (28 доба) рівень антитіл у тварин I групи не досяг мінімального захисного рівня, а у тварин IV та V груп впродовж всього дослідного періоду спостерігали лише фоновий рівень специфічних антитіл.

На 28-у добу після імунізації проведено гострий дослід з інфікування мишей летальною дозою ( $39,8 \text{ ЛД}_{50}/0,03 \text{ см}^3$ ) вірусу сказу референс-штаму CVS. Отримані результати показали 100 - відсоткову летальність у тварин I, IV та V груп, що свідчить про відсутність захисту у цих тварин внаслідок індукованої імуносупресії. Встановлено стійкість тварин II, III та контрольної груп (50, 40 та 60 % відповідно) до інтрацеребрального введення летальної дози вірусу. Встановлено кореляцію ( $r = 0,96$ ) між титрами антирабічних антитіл у тварин (на 28-у добу) та відсотком тварин, що вижили.

Встановлено, що в умовах індукованої імуносупресії у тварин відбулося зниження синтезу поствакцинальних антитіл, внаслідок чого збільшується ризик виникнення розвитку сказу після інфікування.

Зважаючи на отримані результати експерименту проведено порівняльні дослідження імуногенності антирабічних вакцин класичним методом НІН та НІН з використанням Ендоксану до тварин.

Згідно з розробленою методикою білим мишам одноразово інтраперитоніально вводили Ендоксан у дозі 100 мг/кг, а на 6-у та 13-у добу проведено імунізацію із подальшим інтрацеребральним зараженням вірусом сказу аналогічно методу НІН. Паралельно проведено дослідження класичним методом НІН (табл. 5).

Таблиця 5

**Імуногенна активність інактивованих антирабічних вакцин згідно з класичним та модифікованим методами НІН досліджень ( $M \pm m$ ,  $n = 3$ )**

Номер серії вакцини	Тест НІН		Тест з використанням Ендоксану	
	Ig ЕД <sub>50</sub>	Активність, МО/см <sup>3</sup>	Ig ЕД <sub>50</sub>	Активність, МО/см <sup>3</sup>
1	2,75±0,10	1,40±0,10	1,93±0,30	0,90±0,30
2	3,10±0,20	3,20±0,20	2,35±0,20	2,40±0,20
Референтна вакцина	2,60±0,05	1±0,05	1,97±0,10	1±0,10

Дані свідчать, що імуногенна активність першої та другої серій вакцини, визначена класичним методом, становила  $1,40 \pm 0,10$  та  $3,20 \pm 0,20$  МО/см<sup>3</sup>, у той час як модифікованим тестом –  $0,90 \pm 0,30$  та  $2,40 \pm 0,20$  МО/см<sup>3</sup> відповідно.

Отримані результати свідчать про необхідність застосування для тварин з підозрою на імуносупресію лише високоімуногенних препаратів, оскільки вакцини з мінімально допустимим рівнем імуногенної активності не здатні забезпечити утворення протективного рівня антирабічних антитіл і захистити таких тварин від захворювання на сказ.

**Розроблення методу оцінки імуногенної активності антирабічних вакцин, яка моделює природні шляхи введення вакцини та інфікування тварин.** Оскільки класичний метод НІН не моделює природні шляхи введення антирабічної вакцини та інфікування вірусом тварин, а бустер-ін'єкція маскує результати першої, проведена модифікація цього методу.

Із цією метою проведено порівняльний аналіз сироваток крові білих мишей за одноразового (І група) та дворазового з інтервалом 7 діб (ІІ група) антирабічного щеплення. Встановлено, що на 14-у добу досліду рівень антирабічних антитіл у сироватках крові тварин І групи був нижчим порівняно із тваринами ІІ групи:  $2,25 \pm 0,10$  та  $3,15 \pm 0,01$  МО/см<sup>3</sup> відповідно. У подальшому у тварин ІІ групи на 21-у добу спостерігали значно вищі титри ( $4,8 \pm 0,02$  МО/см<sup>3</sup>) антирабічних антитіл порівняно із тваринами І групи ( $2,5 \pm 0,04$  МО/см<sup>3</sup>). Отримані результати стали основою для проведення досліджень імуногенної активності антирабічних вакцин шляхом одноразового щеплення мишей.

Оскільки більшість антирабічних щеплень проводять за допомогою внутрішньом'язового введення препарату, а проникнення вірусу в організм відбувається через пошкоджений шкірний покрив, запропоновано для визначення імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин вдосконалений метод НІН – «периферичний» тест.

У подальшому за допомогою класичного методу НІН та розробленого «периферичного» тесту, досліджено три серії інактивованих антирабічних вакцин з різною імуногенною активністю (табл. 6).

Таблиця 6

**Імуногенна активність інактивованих антирабічних вакцин за «периферичним» тестом та методом НІН ( $M \pm m$ ,  $n = 3$ )**

Серія вакцини	Тест НІН		«Периферичний» тест	
	Ig ЕД <sub>50</sub>	Активність, МО/см <sup>3</sup>	Ig ЕД <sub>50</sub>	Активність, МО/см <sup>3</sup>
1 серія	$3,56 \pm 0,10$	$1,23 \pm 0,10$	$3,08 \pm 0,20$	$0,69 \pm 0,20$
2 серія	$3,24 \pm 0,20$	$0,58 \pm 0,20$	$2,95 \pm 0,30$	$0,51 \pm 0,30$
3 серія	$3,82 \pm 0,10$	$2,24 \pm 0,10$	$3,39 \pm 0,10$	$1,41 \pm 0,10$
Референтна вакцина	$3,47 \pm 0,02$	$1 \pm 0,02$	$3,24 \pm 0,05$	$1 \pm 0,05$

Результати, наведені у табл. 6, свідчать про підвищення імуногенної активності усіх трьох серій інактивованих антирабічних вакцин, встановлених класичним методом НІН. Особливу увагу привертає вакцина 1-ї серії, імуногенність якої становить  $1,23 \pm 0,10$  МО/см<sup>3</sup>, у той час як при «периферичному» тесті її імуногенна активність становить лише  $0,69 \pm 0,20$  МО/см<sup>3</sup>.

Отже, отримані результати дають змогу використовувати «периферичний» тест для контролю інактивованих антирабічних вакцин, оскільки між ним та класичним методом НІН коефіцієнт кореляції – 0,9.

**Оцінка імуногенної активності антирабічних вакцин за контрольного зараження вуличними ізолятами вірусу сказу.** Для об'єктивної оцінки імуногенної активності антирабічних вакцин розроблено модифікований метод НІН із використанням, замість референс-штаму CVS, вуличних ізолятів вірусу сказу. Для постановки цієї модифікації методу НІН обрано антирабічні вакцини, що використовуються у медицині та ветеринарії України, референтна вакцина (РВ) і вуличні ізоляти, виділені в Україні впродовж 2012–2014 рр. (табл. 7).

Таблиця 7

**Імуногенна активність антирабічних вакцин з використанням референс-штаму CVS та вуличних ізолятів вірусу сказу ( $M \pm m$ ,  $n = 3$ )**

Вакцина	CVS		09F94 (лисиця)		10C289 (кіт)	
	Ig ЕД <sub>50</sub>	Активність, МО/см <sup>3</sup>	Ig ЕД <sub>50</sub>	Активність, МО/см <sup>3</sup>	Ig ЕД <sub>50</sub>	Активність, МО/см <sup>3</sup>
Рабістар	2,60±0,25	1,6±0,25	1,93±0,20	1,4±0,20	1,30±0,20	1,26±0,20
Indirab	2,91±0,10	3,2±0,10	2,20±0,40	2,5±0,40	1,56±0,30	2,3±0,30
РВ	2,40±0,04	1,0±0,04	1,80±0,10	1,0±0,10	1,20±0,06	1,0±0,06

Результати досліджень свідчать, що показники імуногенної активності дослідних антирабічних вакцин під час зараження вуличними ізолятами вірусу сказу були для вакцини Рабістар 1,4±0,20 МО/доза і 1,26±0,20 проти 1,6±0,25 МО/доза, а для вакцини Indirab 2,5±0,40 МО/доза і 2,3±0,30 проти 3,2±0,10 МО/доза порівняно з контрольним зараженням вірусом сказу, референс-штамом CVS.

Отже, аналіз отриманих результатів свідчить, що за контрольного зараження тварин вуличними ізолятами вірусу сказу при постійній дозі зараження (5–50 ЛД<sub>50</sub>/гол), імуногенна активність антирабічних вакцин вирізнялася від результатів, отриманих класичним методом НІН, а саме, на 17–25 % встановлено нижчий захист проти ізолятів вуличного вірусу сказу, аніж при використанні фіксованого референс-штаму вірусу сказу CVS.

**Розроблення серологічного методу контролю імуногенної активності антирабічних вакцин.** Критерієм оцінки ефективності антирабічних вакцин є визначення напруженості імунітету у тварин – рівня поствакцинальних антирабічних антитіл. На основі цього розроблено «серологічний» метод тестування імуногенної активності антирабічних вакцин. Цей метод складався з двох етапів. Перший – визначення титрів специфічних

антирабічних антитіл у сироватках крові мишей, щеплених референтною вакциною з різною імуногенною активністю (1 МО/см<sup>3</sup>, 2 МО/см<sup>3</sup>, 2,8 МО/см<sup>3</sup>, 3,9 МО/см<sup>3</sup>, 5,59 МО/см<sup>3</sup>). На 14-у добу після щеплення у сироватках крові тварин визначали рівень антирабічних антитіл (табл. 8).

Таблиця 8

**Рівень антирабічних антитіл у білих мишей на 14-у добу після щеплення референтною вакциною (M±m, n = 10)**

№ п/п	Група тварин	Індекс імуногенності розведень референс-вакцини, МО/см <sup>3</sup>	Середнє значення титру антитіл, МО/см <sup>3</sup>
1	Референтна вакцина (IWS) - 1	1	0,7±0,01
2	Референтна вакцина (IWS) - 2	2	1±0,03***
3	Референтна вакцина (IWS) - 3	2,8	1,31±0,20**
4	Референтна вакцина (IWS) - 4	3,9	1,52±0,01***
5	Референтна вакцина (IWS) - 5	5,59	1,84±0,02***

Примітки: \*\* – різниця достовірна щодо референтної вакцини з імуногенною активністю 1 МО/см<sup>3</sup> для p≤0,01;

\*\*\* – різниця достовірна щодо референтної вакцини з імуногенною активністю 1 МО/см<sup>3</sup> для p≤0,001.

Дані, наведені в табл. 8, вказують, що на 14-у добу після вакцинації, рівень антитіл у сироватках крові мишей усіх дослідних груп набув захисного рівня (> 0,5 МО/см<sup>3</sup>). У подальшому побудовано регресійну калібрувальну криву, в основу якої покладено залежність титрів антирабічних антитіл від імуногенної активності вакцин і використано її як шаблон для визначення імуногенної активності дослідних антирабічних вакцин.

Другий етап дослідження полягав у визначенні титрів специфічних антирабічних антитіл у сироватках крові білих мишей, щеплених дослідними вакцинами. Постановку досліду проведено аналогічно методиці із використанням референтної вакцини. Використано чотири варіанти дослідних вакцин з різною імуногенною активністю.

Отримані результати оцінки титрів поствакцинальних антирабічних антитіл спроектовано на розроблений шаблон, за допомогою якого визначили імуногенну активність дослідних серій вакцин (табл. 9).

Таблиця 9

**Імуногенна активність дослідних антирабічних вакцин визначена «серологічним» тестом (M±m, n = 10)**

№ п/п	Група тварин	Середнє значення титру антитіл, МО/см <sup>3</sup>	Індекс імуногенності у серологічному
-------	--------------	--	--------------------------------------

			тести, МО/доза
1	Дослідна вакцина (ДВ)- 1	1,62±0,05	4,4±0,1
2	Дослідна вакцина (ДВ) -2	2,25±0,02	≥5,59
3	Дослідна вакцина (ДВ) -3	3,15±0,10	≥5,59
4	Дослідна вакцина (ДВ) -4	≤0,25	<1

Основним критерієм оцінки є титр антирабічних антитіл у мишей на 14-у добу –  $0,7 \pm 0,01$  МО/см<sup>3</sup>, що узгоджується з вакциною з імуногенністю 1 МО/см<sup>3</sup>.

Результати, наведені в табл. 7, свідчать про те, що імуногенність перших трьох дослідних серій вакцин відповідає необхідним критеріям якості.

Щодо четвертої дослідної вакцини, то її імуногенна активність становить менше 1 МО/см<sup>3</sup>, тому вона не придатна до застосування. Ці результати корелюють із результатами, отриманими під час дослідження імуногенності антирабічних вакцин класичним методом НІН ( $r = 0,95$ ).

Крім того, спосіб визначення імуногенної активності за допомогою «серологічного» тесту є більш експресним методом для тестування імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин.

Отже, у цьому тесті термін випробовування скорочується до 15 діб та зменшуються потреби у кількості мишей для тестування, що робить його більш ефективним та дешевим. До цього слід додати ще й безпечність роботи працівників виробничих лабораторій, оскільки проведення цього тесту не потребує використання живого вірусу сказу.

**Розроблення уніфікованої системи оцінки імуногенної активності антирабічних вакцин.** На основі розроблених методів створено систему оцінки імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин, що забезпечує достовірний та жорсткий контроль препаратів (табл. 10).

*Таблиця 10*

**Система оцінки імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин**

№ п/п	Метод	Періодичність використання	Тривалість дослідження	Коефіцієнт кореляції з НІН
1	«Периферичний» тест	Кожна серія	35	0,90
2	«Серологічний» метод		15	0,95
3	Тест НІН з вуличними ізолятами вірусу сказу	Один раз на рік	28	0,90
4	Тест НІН на тваринах з імуносупресією	За необхідністю	28	0,90

Система передбачає дослідження кожної серії вакцини за допомогою «серологічного» тесту, оскільки між ним та методом НІН встановлена найвища кореляція, крім цього він є простим у постановці та більш економічним. Альтернативою цьому методу є «периферичний» тест, що

відображає природне проникнення вірусу в організм та наслідуює шлях класичного введення вакцини.

З огляду на генетичну та антигенну мінливість вірусу сказу, необхідно один раз на рік досліджувати вакцини у тесті з вуличними ізолятами вірусу сказу. Оскільки під час вакцинації можуть траплятися тварини з ослабленим імунним статусом, то на такий фактор необхідно обов'язково зважати і за необхідності перевіряти серії вакцин модифікованим методом НІН, використовуючи тварин з індукованою імуносупресією.

Отже, розроблено системи оцінювання імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин та показано їх місце до застосування, що дає змогу лабораторіям обирати найприйнятніший для них метод та допускати до застосування лише високоімуногенні препарати.

## ВИСНОВКИ

У дисертації на підставі експериментальних досліджень у порівняльному аспекті викладено результати динаміки формування антирабічних антитіл у різних видів тварин (нормальний фізіологічний стан та індукована імуносупресія), розроблено модифікації методу НІН, альтернативний серологічний метод оцінки імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин та уніфіковану систему оцінки імуногенності антирабічних вакцин.

1. Встановлено динаміку показників антитілоутворення у тварин різних видів після їх щеплення антирабічною вакциною «Рабістар» в умовах нормального фізіологічного стану. Так, на 14-у добу у собак рівень антитіл становив  $2,98 \pm 0,04$  МО/см<sup>3</sup>, котів –  $3,13 \pm 0,21$ , морських свинок –  $0,6 \pm 0,09$ , мишей –  $2,25 \pm 0,12$  МО/см<sup>3</sup>.

2. Визначено вплив несприятливих умов утримання тварин на формування антирабічного імунітету. Так, вплив аліментарного стресу спричиняє низький рівень синтезу специфічних антитіл (на 14-у добу титр становив  $0,2 \pm 0,12$  МО/см<sup>3</sup>). При гіпо- та гіпертермії спостерігали утворення антирабічних антитіл, рівень яких на 41-у добу був  $3,3 \pm 0,97$  та  $4,0 \pm 0,52$  МО/см<sup>3</sup>, що на 73 та 43 % відповідно менший за показники контрольної групи тварин. У процесі дослідження морфологічних показників крові, на тлі аліментарного стресу спостерігали лейкоцитопенію (27 доба) завдяки лімфоцитозу ( $34,0 \pm 2,32$  %).

3. Встановлено, що в умовах індукованої доксорубіцином імуносупресії спостерігали фоновий рівень ( $\leq 0,04$  МО/см<sup>3</sup>) антитілоутворення після щеплення мишей антирабічною вакциною. Показано, що ендоксан в одноразових дозах 200 мг/кг, 100 мг/кг та дворазовій дозі 50 мг/кг на 14-у добу знижує титр антитіл до:  $0,37 \pm 0,03$  МО/см<sup>3</sup>,  $1,1 \pm 0,07$  та  $1,12 \pm 0,04$  МО/см<sup>3</sup> відповідно, що достовірно менше порівняно із тваринами контрольної групи.

4. Розроблений метод визначення імуногенної активності антирабічних вакцин із використанням лабораторних мишей зі штучно індукованою імуносупресією встановив активність вакцини з імуногенністю

$3,2 \pm 0,20$  МО/см<sup>3</sup> на рівні  $2,4 \pm 0,20$  МО/см<sup>3</sup>, а вакцини з імуногенністю  $1,4 \pm 0,10$  МО/см<sup>3</sup> –  $0,9 \pm 0,30$  МО/см<sup>3</sup>, що обумовлює необхідність застосовувати у зоні імуносупресії вакцину з імуногенністю не менше як  $2$  МО/см<sup>3</sup>.

5. Проведено модифікацію методу НІН, який відображає природні шляхи введення вакцини та інфікування тварин, що полягає в однократній внутрішньом'язовій імунізації мишей та підшкірному контрольному зараженні референс-штамом CVS вірусу сказу, при високому ступені кореляції ( $r = 0,90$ ) порівняно з традиційним тестом НІН.

6. Встановлено імуногенну активність інактивованих антирабічних вакцин класичним методом НІН (інфікування референс-штамом вірусу сказу CVS) та при зараженні білих мишей вуличними ізолятами вірусу сказу (виділені від лисиці та kota) на рівні  $1,6 \pm 0,25$  МО/доза проти  $1,4 \pm 0,20$  і  $1,26 \pm 0,20$  для вакцини «Рабістар» та  $3,2 \pm 0,10$  МО/доза проти  $2,5 \pm 0,40$  і  $2,3 \pm 0,30$  для вакцини «Indirab», що демонструє на 17–25 % нижчий захист проти ізолятів вуличного вірусу сказу, аніж проти штаму CVS.

7. Розроблено «серологічний» метод контролю імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин, який містить однократну імунізацію мишей з подальшим визначенням титрів специфічних антитіл у сироватках крові тварин методом ТФ-ІФА, що дало змогу зменшити кількість мишей для дослідження, виключити використання вірусу та скоротити час для визначення імуногенності вакцин з 28 до 15 діб. Коефіцієнт кореляції між результатами, отриманими серологічним тестом і класичним методом НІН, був на високому рівні ( $r = 0,95$ ).

8. Розроблено уніфіковану систему оцінки імуногенної активності антирабічних вакцин, яка передбачає проведення більш достовірного контролю вакцин завдяки тестуванню кожної серії за допомогою «серологічного» або «периферичного» методів, один раз на рік досліджувати вакцини у тесті з вуличними ізолятами вірусу сказу та, за необхідності, у тесті з імуносупресією.

## **ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ**

Розроблено і запропоновано для використання у практиці ветеринарної медицини:

1. Для дослідження імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин пропонуємо використовувати «серологічний» метод тестування (Пат. № 99046. Україна, МПК А61К 39/00. «Спосіб визначення імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин з використанням калібрувальної кривої»).

2. Для достовірної оцінки імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин пропонуємо використовувати методичні рекомендації «Система оцінки імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин» (затверджена Науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 25.12.2014 р.).

3. Рекомендовано отриманий експериментальний матеріал внести до програм вищих навчальних закладів під час вивчення дисципліни «Епізоотологія та інфекційні хвороби тварин».

## СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових фахових виданнях України:

1. Критична оцінка методів тестування антирабічного імунітету / [Недосєков В. В., **Нікітова А. П.**, Мартинюк О. Г. та ін.] // Вісник Житомирського національного агроекологічного університету. – 2012. – Т. 3, № 1(32). – С. 11–13. *(Здобувач проаналізувала літературу та підготувала статтю до друку).*

2. Морфологічні показники крові морських свинок за антирабічної вакцинації в умовах стресу / [**Нікітова А. П.**, Недосєков В. В., Ничик С. А. та ін.] // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – № 22. – С. 395–401. *(Здобувач виконала експериментальну частину та статистичне опрацювання результатів).*

3. Зміни лейкограми крові мурчаків у разі поєданого впливу антирабічної вакцинації та стресових факторів / [Недосєков В. В., **Нікітова А. П.**, Полупан І. М. та ін.] // Ветеринарна біотехнологія. – 2013. – № 23. – С. 182–185. *(Здобувач провела дослідження лейкограми крові та оформила статтю).*

4. Напруженість антирабічного імунітету при моделюванні природних умов утримання тварин / [**Нікітова А. П.**, Недосєков В. В., Іванов М. Ю. та ін.] // Ветеринарна біотехнологія. – 2014. – № 24. – С. 139–145. *(Здобувач виконала статистичне опрацювання результатів та оформила статтю).*

5. Недосєков В. В. Вдосконалення методу оцінки інактивованих антирабічних вакцин / В. В. Недосєков, **А. П. Нікітова** // Науково-технічний бюлетень Науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. – 2014. – Т. 2, № 1. – С. 119–121. *(Здобувач виконала експериментальну частину, статистичне опрацювання результатів та оформила статтю).*

6. Особливості формування антирабічного імунітету у вакцинованих тварин / [Недосєков В. В., **Нікітова А. П.**, Полупан І. М. та ін.] // Ветеринарна біотехнологія. – 2014. – № 25. – С. 71–74. *(Здобувач провела дослідження та підготувала статтю до друку).*

7. Нікітова А. П. Серологічний метод тестування імуногенності інактивованих антирабічних вакцин / А. П. Нікітова // Науковий вісник ветеринарної медицини: зб. наук. праць Білоцерківського Національного аграрного університету. – 2014. – Вип. 14 (114). – С. 84–87.

### Статті у наукових фахових виданнях України включених до міжнародних наукометричних баз даних:

8. Недосєков В. В. Вплив несприятливих умов утримання тварин на формування антирабїчного імунітету / В. В. Недосєков, **А. П. Нікітова**, І. М. Полупан // Біологія тварин. – 2013. – Т. 15. – №4. – С. 80–84. (Здобувач протестувала сироватки крові морських свинок на наявність антирабїчних антитїл та оформила роботу).

9. Нікітова А. П. Метод оцїнки імуногенної активності антирабїчних вакцин із врахуванням імуносупресивного стану у тварин / А. П. Нікітова // Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. – 2014. – Вип. 201. – Ч. 1. – С. 126–130.

#### **Статті у наукових виданнях інших держав:**

10. Антигенная вариабельность генетических кластеров уличных изолятов вируса бешенства в Украине / [Полупан И. Н., Недосєков В. В., Иванов Н. Ю., Нычик С. А., Дерябин О. Н., **Никитова А. П.**] // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2013. – № 2. – С. 55–59. (Здобувач виконала статистичне опрацювання результатів та оформила статтю).

11. **Никитова А. П.** Альтернативный метод тестирования иммуногенности инактивированных антирабических вакцин / **А. П. Никитова**, И. Н. Полупан, В. В. Недосєков // Иппология и ветеринария. – 2015. – № 1 (15). – С. 47–51. (Здобувач провела дослідження, опрацювала матеріали та оформила статтю)

#### **Методичні розробки:**

12. Система оцїнки імуногенної активності інактивованих антирабїчних вакцин : [методичні рекомендації] / [Недосєков В. В., Полупан І. М., **Нікітова А. П.**, Иванов М. Ю., Ничик С. А.]. – К., 2015. – 21 с. (Здобувач опрацювала отримані авторським колективом дані, що лягли в основу методичних рекомендацій).

#### **Деклараційні патенти на корисну модель**

13. Пат. №99046. Україна, МПК А61К 39/00. Спосіб визначення імуногенної активності інактивованих антирабїчних вакцин з використанням калібрувальної кривої / **Нікітова А. П.**, Недосєков В. В., Полупан І. М.; заявник і патентовласник Інститут ветеринарної медицини НААН України. – № u201414119; заявл. 29.12.2014; опубл. 12.05.2015, Бюл. № 9, 2015 р.

#### **Тези наукових доповідей:**

14. Molecular-epizootological characterization of street isolates of rabies virus in Ukraine / Golovko A., Nychyk S., Polupan I., Ivanov M., Deriabin O., Nedosekov V., **Nikitova A.** // Abstracts Book 113-th General Meeting American Society for Microbiology, Denver, Colorado, May 18–21, 2013, Y–2143. (Здобувач проаналізувала літературні джерела та оформила роботу).

15. Efficiency of antirabies vaccines and immunoglobulin against rabies street virus isolates belonging to various genetic clusters / Nychyk S., Ivanov M., Polupan I., **Nikitova A.**, Nedosekov V. // Abstracts Book 14-th International Conference of the Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine

«The livestock-human-wildlife interface», Johannesburg, South Africa, 25–29 August, 2013. – P. 42–43. *(Здобувач провела статистичне опрацювання матеріалів).*

16. Search of anthropurgic reasons for rabies in Ukraine / Nychyk S., Polupan I., **Nikitova A.**, Ivanov M., Nedosekov V. // Abstracts Book 62-nd American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting, Washington, DC, November 13–17. – 2013. – P. 424. *(Здобувач оформила матеріали).*

17. Development of system for the application of antirabic vaccines in Ukraine / Nychyk S., Polupan I., **Nikitova A.**, Nedosekov V. // Abstracts Book 62-nd American Society of Tropical Medicine and Hygiene Annual Meeting, Washington, DC, November 13–17. – 2013. – P. 424. *(Здобувач узагальнила дані щодо застосування антирабічної вакцини в Україні).*

18. **Нікітова А. П.** Спосіб серологічного тестування імуногенності інактивованих антирабічних вакцин / **А. П. Нікітова**, І. М. Полупан // Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин», 26 червня 2014 року, м. Київ. – С. 13–15. *(Здобувач провела дослідження і оформила матеріали).*

19. Нікітова А. П. Альтернативний підхід до тестування антирабічних вакцин / А. П. Нікітова // Матеріали Міжнародної науково-практичної конференції «Основні напрями забезпечення ветеринарного благополуччя тваринництва», 6 листопада 2014 року, м. Біла Церква. – 58 с.

## АНОТАЦІЯ

**Нікітова А. П. Формування антирабічного імунітету та вдосконалення методів контролю імуногенності інактивованих антирабічних вакцин.** – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія. – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2015.

У дисертації на основі комплексних серологічних досліджень вивчено динаміку формування антирабічного імунітету у щеплених лабораторних (білі миші, морські свинки), домашніх (собаки, коти) та сільськогосподарських (велика рогата худоба) тварин.

Проведено 3 варіанти удосконалення методу оцінки імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин (тест НИИ): постановка тесту на тваринах з індукованою фармакологічними препаратами імуносупресією; метод, який відображає природний шлях введення вакцини та інфікування тварин; використання у тесті вуличних ізолятів вірусу сказу замість CVS.

За допомогою встановленої кореляції між імуногенною активністю інактивованих антирабічних вакцин та титром специфічних антирабічних антитіл у лабораторних тварин розроблено альтернативний метод

«серологічного» тестування імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин на основі визначення поствакцинальних антирабічних антитіл. Цей тест скорочує термін випробовування, кількість мишей та виключення використання вірусу.

**Ключові слова:** антирабічна вакцина, антирабічні антитіла, імуногенна активність.

### АННОТАЦІЯ

**Никитова А. П. Формирование антирабического иммунитета и усовершенствование методов контроля иммуногенности инактивированных антирабических вакцин.** – На правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология, эпизоотология, инфекционные болезни и иммунология. – Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, Киев, 2015.

В диссертации на основе комплексных серологических исследований установлена динамика показателей антителиобразования у лабораторных (белые мыши, морские свинки), домашних (собаки, кошки) и сельскохозяйственных (КРС) животных, после их иммунизации антирабической вакциной в условиях нормального физиологического состояния и неблагоприятных условий содержания.

Показан заниженный уровень специфических антител в группах животных, которых подвергали различным стрессовым факторам в отношении контрольных групп, находящихся в условиях нормального физиологического состояния.

Основным методом определения иммуногенной активности антирабических вакцин является метод НИИ, предусматривающий двукратное интраперитонеальное введение вакцины, из которых вторая доза бустерная. В течение многолетних исследований установлен ряд недостатков этого теста. Поэтому с целью тщательного контроля качества иммуногенной активности антирабических вакцин, разработан ряд модификаций классического метода НИИ.

Разработанный метод определения иммуногенной активности антирабических вакцин с использованием лабораторных мышей с искусственно индуцированной иммуносупрессией дает возможность жестко оценивать антирабические вакцины. При исследовании антирабических вакцин тест установил активность вакцины с иммуногенностью  $3,2 \pm 0,20$  МЕ/доза на уровне  $2,4 \pm 0,20$  МЕ/доза, а вакцины с иммуногенностью  $1,4 \pm 0,10$  МЕ/доза –  $0,9 \pm 0,30$  МЕ/доза. Это позволяет сделать вывод, что в зоне иммуносупрессии необходимо применять вакцину с иммуногенностью не менее 2 МЕ/доза.

Проведен тест, отражающий естественный путь введения вакцины и инфицирования животных, который заключается в однократной внутримышечной иммунизации мышей и подкожном контрольном заражении референс-штаммом вируса бешенства CVS. Проведенный

корреляционный анализ результатов исследования иммуногенной активности антирабических вакцин показал высокое соответствие между классическим методом НИИ и разработанной модификацией с коэффициентом корреляции  $r = 0,90$ .

Благодаря генетической гетерогенности и быстрой эволюции со временем может возникать антигенное расхождение между изолятами вируса бешенства, вакцинными штаммами и референс-штабмом CVS, для выявления и сравнения этого расхождения разработан модифицированный метод НИИ с использованием уличных изолятов вируса бешенства, выделенных на территории Украины. В результате проведенных исследований установлена иммуногенная активность инактивированных антирабических вакцин классическим методом НИИ (инфицирование референс-штабмом вируса бешенства CVS) и при заражении белых мышей уличными изолятами вируса бешенства (выделенные от лисы и кота) на уровне  $1,6 \pm 0,25$  МЕ/доза против  $1,4 \pm 0,20$  и  $1,26 \pm 0,20$  для вакцины «Рабистар» и  $3,2 \pm 0,10$  МЕ/доза против  $2,5 \pm 0,40$  и  $2,3 \pm 0,30$  для вакцины «Indirab», что демонстрирует на 17–25 % ниже защиту против изолятов уличного вируса бешенства, чем против штамма CVS.

Применение разработанных методов показало завышение результатов при испытании иммуногенной активности антирабических вакцин с помощью классического теста НИИ.

С помощью установленной корреляции между иммуногенной активностью инактивированных антирабических вакцин и титром специфических антирабических антител у лабораторных животных разработан альтернативный метод «серологического» тестирования иммуногенной активности инактивированных антирабических вакцин на основе определения поствакцинальных антирабических антител. Преимущество данного метода состоит в уменьшении количества мышей для исследования, исключении использования вируса и сокращении времени при определении иммуногенности вакцин с 28 до 15 суток.

На основе проведенных методов исследований иммуногенной активности антирабических вакцин разработана унифицированная система оценки иммуногенной активности антирабических вакцин, использование которой будет залогом достоверного исследования иммуногенности антирабических вакцин, что, в свою очередь, обеспечит использование в ветеринарной медицине только высокоиммуногенных препаратов.

**Ключевые слова:** антирабическая вакцина, антирабические антитела, иммуногенная активность.

#### ABSTRACT

**Nikitova A.P. Formation of rabies immunity in vaccinated animals and improve method of potency of rabies vaccine. – Manuscript.**

Thesis of veterinary sciences candidate according to speciality 16.00.03 – veterinary microbiology, epizootology, infectious diseases and immunology. – National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The thesis is based on the complex dynamics of serological tests studied the formation of rabies immunity in vaccinated laboratory (white mice, guinea pigs), domestic animals (dogs, cats) and agricultural (cattle) animals.

Three options for improving the assessment method immunogenic activity of inactivated rabies vaccines (test NIH): staging test on animals with induced immunosuppression by pharmacological agents; method, which provides a natural way and getting the vaccine virus in the body; using of street virus in the test instead CVS-rabies virus.

With installed correlation between the immunogenic activity of inactivated rabies vaccine and the titer of specific rabies antibody in laboratory animals developed an alternative method of «serum» test immunogenic activity of inactivated rabies vaccines based on the definition of post-rabies antibodies. This test reduces the trials, the number of mice and exclusion using virus.

**Keywords:** rabies vaccine, rabies antibody, immunogenic activity.