

РЕАКЦІЯ ПРЯМОЇ ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ В ЛАБОРАТОРНІЙ ДІАГНОСТИЦІ СКАЗУ ТВАРИН В УКРАЇНІ

Полупан І. М.

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Київ, Україна, e-mail: vetmedic@ukr.net

Метою роботи було проаналізувати роль реакції прямої імунофлуоресценції (РПІФ) у системі лабораторної діагностики сказу тварин в Україні. Для проведення аналізу були використані матеріали офіційної ветеринарної звітності за Формою № 2-ВЕТ «Звіт про роботу державних лабораторій ветеринарної медицини» щодо результатів лабораторних досліджень патологічного матеріалу з підозрою на сказ Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ) та вірусологічних відділів Державних регіональних лабораторій Держпродспоживслужби України, а також аналітичні матеріали: Звіт «Про проведену оцінку ризику поширення сказу серед домашніх та сільськогосподарських тварин при діючій системі контролю сказу тварин в Україні» та Звіт «Про проведену оцінку ризику поширення сказу тварин в Україні». Установлено, що протягом останніх 15 років (2006–2020 рр.) у державних лабораторіях проведено 194 079 досліджень патологічного матеріалу. Реакція прямої імунофлуоресценції є основною базовою методикою для діагностики сказу в Україні, за використання якої у 94,5 % випадків ставиться заключний діагноз «сказ». Упроваджено з 2020 року в роботу науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ стандартизовані підходи, у тому числі використання референс-штаму вірусу сказу CVS-11 (ATCC VR 959), для організації та проведення міжлабораторних раундів професійного тестування ВЕТ-ТЕСТ з виявлення антигену згідно з вимогами ISO 17043:2017 «Оцінка відповідності. Загальні вимоги щодо перевірки професійного рівня». РПІФ є основною реакцією для діагностики сказу серед тварин в Україні. З 2020 року впроваджено стандартизовані підходи та організовано проведення міжлабораторних раундів професійного тестування ВІТ-ТЕСТ з виявлення антигену вірусу сказу відповідно до стандарту якості ISO 17043:2017. Установлено необхідність запровадження нових методів лабораторної діагностики сказу, таких як вірусовиділення в культурі клітин і полімеразно-ланцюгова реакція

Ключові слова: моніторинг, експрес-тест, ATCC VR 959

Серед усіх відомих людству інфекційних захворювань особливе значення займає сказ. Чутливість до цього захворювання численних видів домашніх і диких тварин поряд із надзвичайною небезпекою для людини визначають його соціально-економічне значення, привертають увагу, як ветеринарної, так і медичної науки та практики [1, 2]. У комплексі всіх антирабічних заходів, що застосовуються для контролю цього захворювання, поряд із використанням цілого арсеналу вакцинних засобів (парентеральна та пероральна вакцинація тварин), загальних протиепізоотичних засобів (регулювання популяції диких тварин, гуманне регулювання чисельності безпритульних тварин), важливою ланкою є епізоотичний нагляд, який є базовою складовою будь-якої програми контролю сказу. Однак, достовірність епізоотичного нагляду базується виключно на результатах лабораторних досліджень, адже заключний діагноз «сказ» можна поставити тільки на підставі постмортальних результатів лабораторних досліджень головного мозку [3, 4]. Сказ є основним серед зоонозів, для якого діагностичні методи були стандартизовані на міжнародному рівні [5, 6]. Реакція прямої імунофлуоресценції (РПІФ), в основі якої використано метод флуоресціюючих антитіл, визнана ВООЗ «золотим стандартом» у діагностиці сказу та дозволяє отримати результат уже через декілька годин [7, 8].

Метою наших досліджень було визначити роль РПІФ в лабораторній діагностиці сказу тварин в Україні.

Матеріали та методи. У роботі використано звіти відповідно Форми № 2-ВЕТ «Звіт про роботу державних лабораторій ветеринарної медицини» щодо результатів лабораторних досліджень патологічного матеріалу з підозрою на сказ, що надійшли на дослідження до науково-дослідного вірусологічного відділу Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ) та вірусологічних відділів Державних регіональних лабораторій Держпродспоживслужби України, а також аналітичні матеріали: Звіт «Про проведену оцінку ризику поширення сказу серед домашніх та сільськогосподарських тварин за діючої системи контролю сказу тварин в Україні» та Звіт «Про проведену оцінку ризику поширення сказу серед диких тварин в Україні» [9].

Результати досліджень та обговорення. Відповідно до ветеринарної звітної документації в останні роки в Україні збільшується кількість діагностичних досліджень на сказ у Державних регіональних лабораторіях Держпродспоживслужби. Протягом останніх 15 років (2006–2020 рр.) у державних лабораторіях проведено 194 079 досліджень патологічного матеріалу від понад 40 видів тварин (рис. 1).

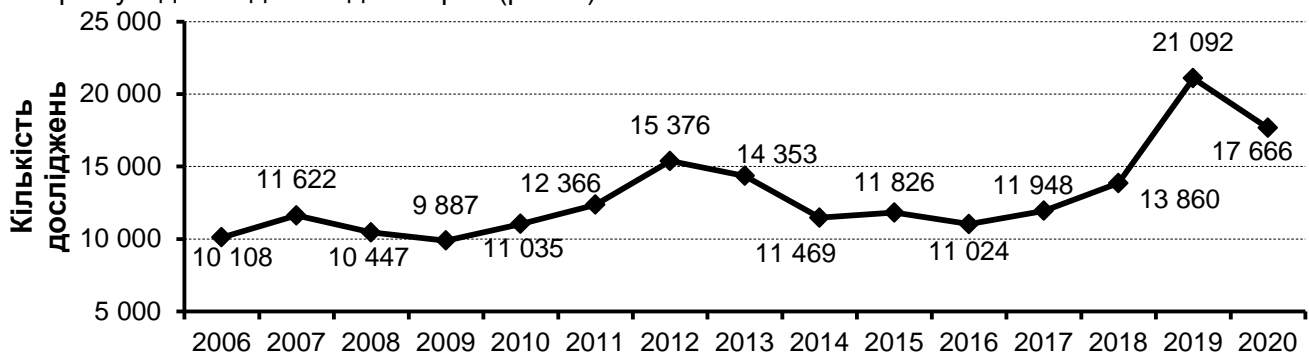


Рис. 1. Загальна кількість лабораторних досліджень на сказ, проведених у Державних регіональних лабораторіях Держпродспоживслужби та ДНДІЛДВСЕ протягом 2006–2020 рр.

Протягом 2001–2005 рр. щорічно в Україні досліджувалося близько восьми тисяч зразків патологічного матеріалу з підозрою на сказ, тоді як в останні 15 років (з 2006 року) кількість досліджень почала збільшуватися. Насамперед це пов'язано з проведенням пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу. Одним з елементів оцінки ефективності проведення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу є дослідження зубів лисиць на наявність біомаркеру тетрацикліну та сироваток крові на наявність антитіл до вірусу сказу. Однак цим дослідженням, відповідно до Методичних рекомендацій «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу», мають передувати дослідження мозку лисиць на наявність антигену вірусу сказу [10]. Саме завдяки широкомасштабним кампаніям з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, що розпочалися в Україні з 2018 року, та активному моніторингу значно збільшилася кількість лабораторних досліджень на сказ [11, 12].

В Україні лабораторна діагностика сказу на основі РПІФ є ключовою, оскільки всі Державні регіональні лабораторії Держпродспоживслужби акредитовані Державним акредитаційним агентством України на проведення досліджень цим методом і постійно його застосовують для рутинної лабораторної діагностики сказу тварин [3].

Відповідно до ДСТУ 7053:2009 «Ветеринарна медицина. Методи діагностики сказу» у разі негативного або сумнівного результату в РПІФ необхідно проводити дослідження іншим методом — біологічної проби на білих мишах або вірусовиділенням у культурі клітин з подальшою ідентифікацією в РПІФ. Аналіз ветеринарної звітності показав, що 94,5 % випадків постановки остаточного діагнозу «сказ» відбувається за допомогою РПІФ, а з використанням біологічної проби на мишах лабораторно встановлюється 5,5 % випадків захворювання.

З 2006 року спостерігається тенденція щодо зменшення частки позитивних результатів (у 2006 р. — 20 %, у 2020 р. — 7,2 %) у загальній кількості проведених лабораторних досліджень на сказ (рис. 2).

Причиною цього може бути непроведення Регіональними лабораторіями Держпродспоживслужби України постановки біологічної проби після отримання негативного результату в РПІФ у зразках, які направляються до лабораторій для оцінки ефективності

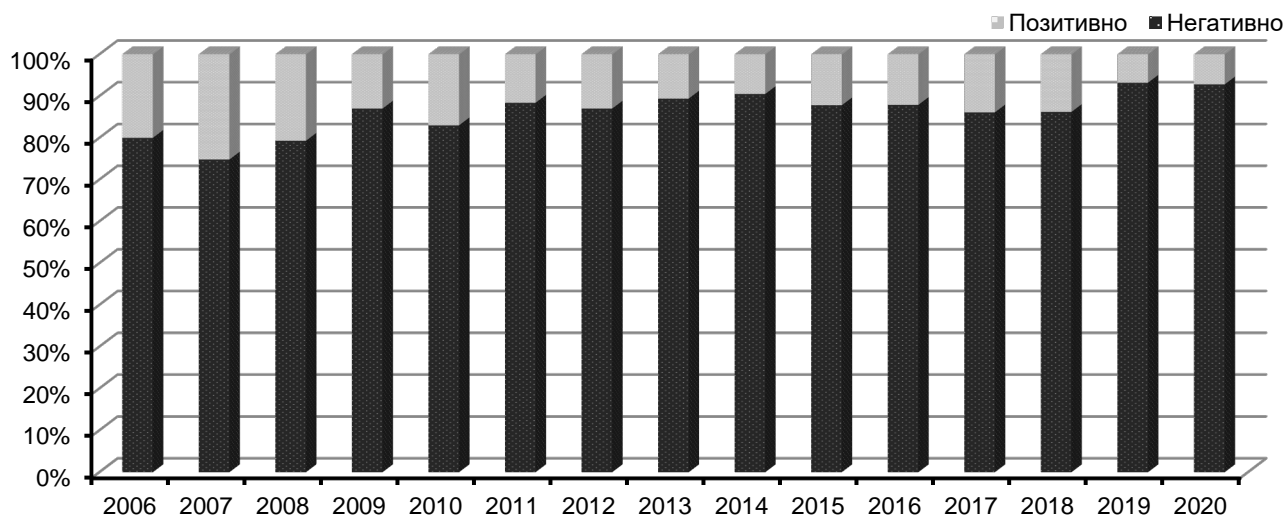


Рис. 2. Відсоткове співвідношення кількості позитивних і негативних досліджень на сказ в Україні у 2006–2020 рр.

пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу в рамках активного моніторингу. Постановка біологічної проби для цих зразків не проводиться у зв'язку з обмеженими ресурсами Регіональних лабораторій Держпродспоживслужби України, що може мати негативний вплив на ефективність моніторингу, адже використання дублюючого тесту (у тому числі біологічної проби на мишах) підвищує достовірність діагностики сказу [9].

Отже, РПІФ є швидким, чутливим і специфічним методом діагностики сказу, а також відноситься до експрес-тестів (результати можна отримати протягом кількох годин). Однак точність тесту залежить від таких факторів, як досвід працівників лабораторії, якість діагностичного кон'югату, обладнання (флуоресцентний мікроскоп) тощо.

Підтвердження спроможності та кваліфікації співробітників вірусологічних відділів Регіональних лабораторій Держпродспоживслужби України відбувається шляхом проведення незалежного професійного тестування ВЕТ-ТЕСТ, провайдером якого є ДНДІЛДВСЕ.

Упровадження в науково-дослідному вірусологічному відділі ДНДІЛДВСЕ визначених стандартизованих підходів у підготовці контрольних зразків, у тому числі й референс-штаму вірусу сказу CVS-11 (ATCC VR 959), дало змогу з 2020 року забезпечити організацію та проведення міжлабораторних раундів професійного тестування ВЕТ-ТЕСТ з виявлення антигену вірусу сказу відповідно до ISO 17043:2017 «Оцінка відповідності. Загальні вимоги до перевірки професійного рівня». Усі лабораторії, які приймали участь у незалежному професійному тестуванні ВЕТ-ТЕСТ у 2020 році, успішно його пройшли, що свідчить про належну кваліфікацію співробітників вірусологічних відділів у питаннях діагностики сказу [9].

Поряд з перевагами та широким упровадженням у лабораторну практику України РПІФ і біологічної проби для діагностики сказу указані методи мають деякі суттєві недоліки. Світовий досвід та експертна думка свідчать про необхідність імплементації системи культур клітин для діагностичних досліджень в Україні [8, 9]. Крім того, необхідно впровадити в лабораторну практику України різні варіанти полімеразно-ланцюгової реакції, що в рекомендаціях МЕБ з 2018 року визначено як діагностичний тест [5]. Забезпечення належної діагностики сказу та впровадження нових методів повинно створювати умови для ідентифікації усіх випадків сказу серед тварин.

Висновки. 1. Реакція прямої імунофлуоресценції є основною базовою методикою для діагностики сказу в Україні, за використання якої в 94,5 % випадків встановлюється остаточний діагноз «сказ».

2. Упроваджено стандартизовані підходи в організацію та проведення міжлабораторних раундів професійного тестування ВЕТ-ТЕСТ з виявлення антигену вірусу сказу відповідно до ISO 17043:2017 «Оцінка відповідності. Загальні вимоги до перевірки професійного рівня».

3. Установлено виробничу та наукову необхідність упровадження нових методів лабораторної діагностики сказу, таких як вірусовиділення в культурі клітин і полімеразно-ланцюгову реакцію як альтернативу біологічній пробі на мишах.

Список літератури

1. World Health Organization. WHO expert consultation on rabies: Third report. Geneva: WHO, 2018. 195 pp. (WHO Technical Report Series, Vol. 1012). ISBN: 9789241210218. URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/272364>.
2. Недосеков В. В., Гришок Л. П., Полупан І. М., Іванов М. Ю. Оздоровлення території України від сказу — невідкладні завдання науки і практики. *Ветеринарна медицина України*. 2009. № 2. С. 12–13.
3. Mazur N., Nedosekov V., Polupan I. The role of the fat in laboratory diagnosis of rabies. *Veterinary Biotechnology* : bulletin. Kyiv, 2015. Iss. 26. С. 232–236. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/vbtb_2015_26_33.
4. Polupan I. M., Nedosekov V. V., Stepanova T. V., Rudoi O. V., Parshikova A. V., Drozdova E. I. Molecular characteristics isolates of rabies virus isolated from humans in Ukraine. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021. Vol. 677. P. 042025. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/677/4/042025>.
5. World Organisation for Animal Health (OIE). Chapter 3.1.17. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses) [version adopted in May 2018]. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*. 8th ed. Paris : OIE, 2018. P. 578–612. URL: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.17_RABIES.pdf.
6. Hanlon C. A., Smith J. S., Anderson G. R. (1999). Recommendations of a national working group on prevention and control of rabies in the United States. Article II: Laboratory diagnosis of rabies. The National Working Group on Rabies Prevention and Control. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1999. Vol. 215, iss. 10. P. 1444–1446. PMID: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10579039>.
7. Tepsumethanon V., Lumlerdacha B., Mitmoonpitak C., Fagen R., Wilde H. Fluorescent antibody test for rabies: prospective study of 8,987 brains. *Clinical Infectious Diseases*. 1997. Vol. 25, iss. 6. P. 1459–1461. DOI: <https://doi.org/10.1086/516151>.
8. Robardet E., Picard-Meyer E., Andrieu S., Servat A., Cliquet F. International interlaboratory trials on rabies diagnosis: An overview of results and variation in reference diagnosis techniques (fluorescent antibody test, rabies tissue culture infection test, mouse inoculation test) and molecular biology techniques. *Journal of Virological Methods*. 2011. Vol. 177, iss. 1. P. 15–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.06.004>.
9. Державна служба України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів. Звіти про проведені оцінки ризиків. URL: <https://dpss.gov.ua/diyalnist/ocinka-riziku/zviti>.
10. Полупан І. М., ред. Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу : метод. реком. Київ : ПП «Тім-Сервіс К», 2019. 30 с.
11. Polupan I., Bezymennyi M., Gibaliuk Y., Drozhzhe Z., Rudoi O., Ukhovskiy V., Nedosekov V., De Nardi M. An analysis of rabies incidence and its geographic spread in the buffer area among orally vaccinated wildlife in Ukraine from 2012 to 2016. *Frontiers in Veterinary Science*. 2019. Vol. 6. P. 290. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00290>.
12. Полупан І. М., Дрожде Ж. М., Гібальюк Ю. О., Шарай Я. М. Удосконалення системи антирабічних заходів в Україні. *Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету*. 2018. № 1–2. С. 149–152. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/vddau_2018_1-2_28.

DIRECT FLUORESCENT ANTIBODY TEST IN LABORATORY DIAGNOSIS OF ANIMAL RABIES IN UKRAINE

Polupan I. M.

State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv, Ukraine

The aim of the study was to analyze the role of the direct fluorescent antibody (DFA) test in the system of laboratory diagnosis of animal rabies in Ukraine. For the analysis, materials of official veterinary reporting were used according to Form No. 2-VET "Report on the work of the state laboratories of veterinary medicine" regarding the results of laboratory studies of pathological material suspicious of rabies, the State Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise (SRILDVSE) and virology departments of the State Regional Laboratories of the State Food and Consumer Service of Ukraine, and analytical materials: Report "On the assessment of the risk of spread of rabies among domestic and farm animals under the current animal rabies control system in Ukraine" and the Report "On the assessment of the risk of spread of rabies among wild animals in Ukraine". It has been determined that, over the past 15 years (2006–2020), 194,079 tests of the pathological material were carried out in state laboratories. The direct fluorescent antibody test is the main technique for the diagnosis of animal rabies in Ukraine, when used in 94.5% of cases, the final diagnosis of rabies is made. We have used standardization of approaches, including the use of the reference rabies virus CVS-11 (ATCC VR 959), to the organization and conducting of interlaboratory rounds of professional testing VET-TEST to identify of rabies virus antigen within the requirements ISO 17043:2017 "Conformity assessment. General requirements for testing professional level". DFA test is the main reaction for the diagnosis of rabies in animals in Ukraine. Standardized approaches were introduced and interlaboratory rounds of professional testing BET-TEST have been organized in 2020 for the detection of rabies virus antigen in accordance with the quality standard ISO 17043:2017. The necessity of introducing new methods of laboratory diagnostics of rabies, such as viral isolations in tissue culture and polymerase chain reaction, has been established

Keywords: monitoring, express test, ATCC VR 959