# ПРОУЧВАНЕ ЧУВСТВИТЕЛНОСТТА НА IN VITRO ДИАГНОСТИЧНО ВЕТЕРИНАРНОМЕДИЦИНСКО СРЕДСТВО С ТЕХНИКА ФЛОУРЕСЦЕНТЕН АНТИТЯЛОВ ТЕСТ

**Д. Илиева**

Национален диагностичен научноизследователски ветеринарномедицински институт – София

# INVESTIGATION OF THE SENSITIVITY OF IN VITRO DIAGNOSTIC VETERINARY MEDICINE MEANS WITH TECHNIQUE OF FLUORESCENT ANTIBODY TEST

**D. Ilieva**

National Diagnostic Research Veterinary Institute – Sofia

**Резюме**. Повишава се чувствителността на in vitro диагностичната ветеринарна медицина (ИДВМ) за диагностициране на бяс чрез антитялов флуоресцентен тест (ФАТ). Установено е, че търговски комплект, съдържащ поликлонални антитела, показва ниска чувствителност и не може да се използва за получаване на правилни резултати във връзка с диагнозата на бяс.

**Ключови думи:** бяс/диагностициране, флуоресцентен антитялов тест, in vitro диагностична ветеринарна медицина

**Abstract.** The sensitivity of the in vitro diagnostic veterinary medicine means (IDVM) for the rabies diagnosis by Fluorescent antibody test (FAT) is tested. It was found that the commercial kit, containing polyclonal antibodies, shows low sensitivity and cannot be used to obtain correct results in connection with the rabies diagnosis.

**Key words:** rabies/diagnosis, fluorescence antibody test, in vitro diagnostic veterinary medicine

## Въведение

За детекция на лизавирусите от сем. Rhabdoviridae се използват различни методи. Флуоресцентният антитялов тест (ФАТ) се препоръчва от WHO и OIE, като основен метод за директна диагностика на беса на отпечатъчни препарати от мозъчна тъкан на животни (Dean, 1996). Редица фактори влияят върху коректното изпълнение на FAT. Чувствителността на метода до голяма степен зависи от качеството на материалите – при автолиза и загниване на пробите тя се редуцира (Cliquet et al., 2010; Fooks et al., 2012). В свежи проби от мозъци, получени в рамките на няколко часа, възпроизводимостта на резултатите с техника FAT е 95-99% от случаите при положение, че се използват високо чувствителни и специфични антирабични конюгати (OIE, 2013). Използването на стандартни китове в рутинната лабораторна практика, композирани от моноклонални или поликлонални антитела, представлява критична точка по отношение на специфичността и чувствителността на FAT (Robardet, 2011; 2013).

През 2016 г. в НРЛ „Бяс и контрол на ефективността от ваксинирането“ беше изпитана чувствителността на in vitro диагностично ветеринарномедицинско средство (ИДВС) за диагностика на беса, съгласно Наредба № 10/20.12.13 г. на МЗХ, обн. ДВ, бр. 5/17.01.14 г.

Целта на настоящата статия е да представим лабораторните данни от изпитване чувствителността на ИДВС, базирано на основата на поликлонални антитела, предназначено за провеждане на техника FAT за диагностика и идентификация на вирусите на беса.

## Материал и методи

За изпитване чувствителността на 3 броя мостри от ИДВС (Antirabic and negative conjugate) с ФАТ бяха включени и анализирани седем образеца, получени през 2016 г. от Европейската референтна лаборатория на Общността по бяс (EU-RL, ANSES LRFSN, France) – една негативна референтна контрола и шест референтни щама, както следва:

1. Референтна негативна контрола, 13-15/08.09.15 – мозъчен хомогенат от незаразена с вируса на беса лисица.

2. Референтна позитивна контрола – фиксиран щам CVS-27-06/20.04.16, Франция.

3. Референтен щам GS7 11-15/27.07.15, Североизточна Франция.

4. Референтен прилепен щам EBLV-1a 12-14/05.11.14, Франция.

5. Референтен прилепен щам EBLV-1b 10-14/16.07.14, Франция.

6. Референтен прилепен щам EBLV-2 05-16/31.03.16, Обединено кралство.

7. Референтен прилепен щам ABLV 06-13/06.05.13, Австралия.

Един комплект от ИДВС съдържа: лиофилизиран антирабичен конюгат и лиофилизиран негативен конюгат. Антирабичният (положителният) конюгат представлява специфичен имуноглобулин, изолиран от антирабичен серум на хиперимунизирани овце, и негативен конюгат – имуноглобулин, изолиран от нормален серум от овце. И двата конюгата, положителният и негативният, са белязани с флуоресцеинизотиоцианат (FITC) и се съхраняват в лиофилизирано състояние при T°C от 2° до 8°C на сухо и тъмно място, със срок на годност 2 години. Антирабичният и негативният конюгат са във флакони и преди употреба се разреждат с 1 ml от разредителя, включен в опаковката в количество от 2 ml. Разредителят представлява буфериран фосфат физиологичен разтвор (PBS). След като конюгатите се разтворят с приложения разтворител, те допълнително се разреждат с втори разредител – 20% суспензия от нормални миши мозъци в буфериран фосфат физиологичен разтвор (PBS), с pH-7,4 в съотношение 1 + 7.

Изпитваният материал се анализира чрез FAT, съгласно стандартна оперативна процедура, описана в OIE Manual, 2013. Възстановяването на образците (еталонни щамове), които бяха в лиофилизиран вид, е с 1 ml стерилна дестилирана $H_2O$. За миксиране беше използван вортекс и след 20 min образците бяха рехидратирани и готови за тестване. Образците са активни 48 h при 4°C, докато трае изпитването. Тест процедурите за приготвяне на препаратите бяха изпълнени съгласно инструкцията за употреба на ИДВС, както следва: намазка на образците, изсушаване на стайна T°C; фиксиране на препаратите; изсушаване на стайна T°C; накапване с конюгат; инкубиране във влажна камера при 37°C за 30 min; промиване с PBS 3 x 10 min; промиване с дестилирана $H_2O$; изсушаване на стайна T°C; накапване с буфериран 80% глицерин (pH 7,4) и изследване с флуоресцентен микроскоп.

Контролът на флуоресцентната специфичност е чрез накапване на положителния конюгат върху негативна натривка (образец) и негативният конюгат се накапва върху положителна натривка (образец).

*Изпитване за чувствителност:* Интензивността на флуоресценцията при инфектирани с вируса на беса клетки беше отчетена по 4-кръстната система, както следва: много силна жълто-зелена флуоресценция (++++); силна жълто-зелена флуоресценция (+++); отслабена жълто-зелена флуоресценция (++); много слаба, неясна (гаснеща) флуоресценция (+) и негативна флуоресценция (-).

*Забележка: При поява на „неспецифична" флуоресценция – отбелязва се „неспецифична".*

Микроскопирането на препаратите беше проведено от двама служители (СЛ) независимо един от друг при сравняване на отчетените резултати в края на всяка диагностична сесия.

Контролни препарати 2 броя – референтна позитивна контрола (CVS-27-06-16) и референтна негативна контрола – 13-15, бяха конюгирани с втори кит (лиофилизиран, адсорбиран антирабичен конюгат), пречистен хроматографски, композиран от поликлонални антитела, насочени срещу рибонуклеопротеиновия комплекс на вируса на беса, използван за рутинна диагностика в лабораторията по бяс. Лиофилизираният антирабичен конюгат се възстановява с 3 ml дестилирана $H_2O$, центрофугира се на 1500 rpm за 5 min и се накапва директно върху образците – референтна позитивна контрола CVS-27-06-16 и референтна негативна контрола – 13-15.

## Резултати и обсъждане

След проведения лабораторен анализ в НРЛ „БКЕВ", НДНИВМИ, София, при изпитване чувствителността на 3 мостри от ИДВС (Antirabic and negative conjugate) с техника FAT бяха отчетени 6 позитивни резултата за 6 референтни щама, съответно за два щама на класическия вирус на беса – фиксиран щам CVS-27 06-16, използван като референтна позитивна контрола, и референтен щам GS7, при три референтни европейски прилепни щама (EBLV-1a, EBLV-1b, EBLV-2) и един референтен австралийски прилепен щам (ABLV). В конюгираната референтна негативна контрола 13-15, резултатът не беше възможно да се интерпретира, тъй като наблюдавахме „неспецифична" флуоресценция, както и силен флуоресцентен фон и беше отчетен един фалшиво позитивен резултат. Поради констатираната „неспецифична" флуоресценция и силен флуоресцентен фон могат да бъдат получени фалшиво позитивни резултати за негативни мозъчни проби на животни от практиката (табл. 1). В по-ранни изследвания, проведени от Robardet et al. (2013) за оценка на различни комерсиални китове, предназначени за изпълнение на техника FAT и конкретно за споменатото по-горе ИДВС, са докладвани както фалшиво позитивни, така и фалшиво негативни резултати, вследствие на неинтерпретируеми резултати до 66%. Тези изследователи подобно на нас считат, че неспецифичните реакции и трудности при отчитане на резултатите се дължат на силния флуоресцентен фон и „неспецифичната" флуоресценция, които проявява конюгатът. Неспецифичната флуоресценция може да се яви вследствие на неспецифично свързване на левкоцити, бактерии или съединителна тъкан.

Двата контролни препарата: референтна позитивна контрола CVS-27 06-16 и референтна негативна контрола 13-15 бяха конюгирани с втори кит (Lyophilised, adsorbet anti-rabies nucleocapsid conjugate) и изследвани с техника FAT, при което бяха наблюдавани отчетливи резултати (табл. 2). Включването на втория конюгат беше с оглед верификация и съпоставимост на резултатите при контролните препарати от отделните диагностични сесии.

Необходимо е да се има предвид, че бесът е зооноза, която засяга животните и хората и завършва летално при 99-100% от случаите. Антирабичният конюгат е най-важният реагент, който се използва за детекция на антигена на вируса на беса чрез FAT. Лабораторната диагноза с техника FAT трябва да бъде точна, тъй като въз основа на

***Таблица 1. Изпитване чувствителността на 3 мостри от ИДВС (Antirabic and negative conjugate) с техника FAT***

| **I. Положителен конюгат + реф. нег. контрола** | **Отчитане/СЛ 1** | **Отчитане/СЛ 2** | **Резултат** |
|---|---|---|---|
| 1. Референтна негативна контрола 13-15 | 1 м неспецифична | 1 м неспецифична | false positive |
| | 2 м неспецифична | 2 м неспецифична | false positive |
| | 3 м неспецифична | 3 м неспецифична | false positive |
| **II. Негативен конюгат + № по ред – референтни щамове** | **Отчитане/СЛ 1** | **Отчитане/СЛ 2** | **Резултат** |
| 2. Референтна позитивна контрола – фиксиран щам CVS-27 06-16 | 1 м ++/+++ | 1 м ++ | pos |
| | 2 м ++/+++ | 2 м ++ | pos |
| | 3 м ++/+++ | 3 м ++ | pos |
| 3. Референтен щам от лисица – GS7 11-15, Североизточна Франция | 1 м ++ | 1 м ++ | pos |
| | 2 м ++ | 2 м ++ | pos |
| | 3 м ++ | 3 м ++ | pos |
| 4. Референтен прилепен щам - EBLV-1a 12-14, Франция | 1 м +/++ | 1 м ++ | pos |
| | 2 м +/++ | 2 м ++ | pos |
| | 3 м +/++ | 3 м ++ | pos |
| 5. Референтен прилепен щам EBLV-1b 10-14, Франция | 1 м + | 1 м + | pos |
| | 2 м + | 2 м + | pos |
| | 3 м + | 3 м + | pos |
| 6. Референтен прилепен щам EBLV-2 05-16, Обединено кралство | 1 м ++ | 1 м +/++ | pos |
| | 2 м ++ | 2 м +/++ | pos |
| | 3 м ++ | 3 м +/++ | pos |
| 7. Референтен прилепен щам ABLV 06-13, Австралия | 1 м ++/+++ | 1 м ++/+++ | pos |
| | 2 м ++/+++ | 2 м ++/+++ | pos |
| | 3 м ++/+++ | 3 м ++/+++ | pos |

***Таблица 2. Контролни препарати, конюгирани с Lyophilised, adsorbet anti-rabies nucleocapsid conjugate, изследвани с FAT***

| Lyophilised, adsorbet anti-rabies nucleocapsid conjugate | Отчитане/СЛ 1 | Отчитане/СЛ 2 | Резултат |
|---|---|---|---|
| 1. Референтна негативна контрола 13-15 | – | – | negative |
| 2. Референтна позитивна контрола фиксиран щам CVS-27 06-16 | ++/+++ | ++/+++ | positive |

резултата от FAT при хората се провежда постекспозиционна профилактика (PEP). Съобразявайки PEP при хората, за диагностициране на беса трябва да се използват търговски китове, с които се постигат категорични диагностични резултати. Понастоящем се дистрибутират антирабични конюгати с добра чувствителност за диагностика на беса с FAT, които се употребяват лесно, след разреждане с дестилирана вода, а при други работните разреждания се приготвят с PBS. Не е за пренебрегване фактът, че за да се използва ИДВС (Antirabic and negative conjugate), се изисква закупуване на лабораторни бели мишки за приготвяне на втори разредител – 20% мозъчна суспензия. Това е свързано с допълнителен финансов ресурс за доставка на опитни животни и труд и с допълнително натоварване на персонала.

## Заключение

При изпитване чувствителността на ИДВС беше установен фалшиво позитивен резултат за конюгираната референтна негативна контрола 13-15. Поради констатираните „неспецифична" флуоресценция и силен флуоресцентен фон могат да бъдат отчетени фалшиво позитивни резултати за негативни мозъчни проби от животни, получени от практиката. Лабораторният анализ показа, че ИДВС притежава слаба чувствителност и не може да служи за получаване на точни и възпроизводими резултати във връзка с диагностиката на беса.

**Библиография**


1. Cliquet F, Freuling C, Smreczak M et al. Development of harmonized schemes for monitoring and reporting of rabies in animals in the EU. EFSA Scientific report, 2010, 60.
2. Dean D, Abelseth MK et Atanasiu P. FAT. – In: Meslin, F.X., M.M.Kaplan, H. Koprowski. (Eds.). Laboratory techniques in rabies. WHO, Geneva, 1996, 88-95.
3. Fooks, AR, McElhinney LM, Horton D et al. Molecular tools for rabies diagnosis in animals. – In: Fooks, A.R., T. Műller (Eds.). Compendium of the Global Conference on Rabies Control., 2012, 75-87.
4. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 2013, p.4.
5. Robardet, E, Picard-Meyer E, Andrieu S et al. International interlaboratory trials on rabies diagnosis: An overview of results and variation in reference diagnosis techniques (FAT, RTCIT, MIT) and molecular biology techniques. J Virol Meth, 2011, 177: 15-25.
6. Robardet, E, Andrieu S, Rasmussen B et al. Comparative assay of FAT results among 11 European NRL using various anti-rabies conjugates. J. Virol. Meth., 2013, 191: 88-94.


✉ *Адрес за кореспонденция:*
Доц. д-р Даринка Илиева, двм
НДНИВМИ
бул. "Пенчо Славейков" № 15 А
1606 София
GSM: 0877399322
e-mail: emd@mail.orbitel.bg