

LAPIŲ ORALINĖS VAKCINACIJOS PRIEŠ PASIUTLIGĘ EFEKTYVUMO ĮVERTINIMAS IMUNOLOGINIAIS TYRIMAIS

Ingrida Jacevičienė¹, Eugenijus Jacevičius^{1,3}, Vytas Antanas Tamošiūnas², Jonas Milius^{1,4}, Kazimieras Lukauskas^{3,5}, Gediminas Pridotkas¹

¹Nacionalinis maisto ir veterinarijos rizikos vertinimo institutas, Kairiūkščio g. 10, LT-08409 Vilnius; tel. (8~5) 278 0498; el. paštas: ijaceviciene@nvl.lt

²Molekulinės imunologijos laboratorija, Vilniaus universiteto Imunologijos institutas, Molėtų pl. 29, LT-08409 Vilnius; tel. (8~5) 246 9231; el. paštas: vat@imi.lt

³Užkrečiamųjų ligų katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas;

⁴Maisto saugos ir gyvūnų higienos katedra, Lietuvos veterinarijos akademija, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas;

⁵LR valstybinė maisto ir veterinarijos tarnyba, Siesikų g. 19, LT-07170 Vilnius; tel. (8~5) 240 4361; el. paštas: klukauskas@vet.lt

Santrauka. Pasiutligė yra zoonozinė virusinė liga, kuri naminiams ir laukiniams gyvūnams, taip pat ir žmonėms, pasireiškia encefalomieliu ir sunkiais nerviniais veiklos sutrikimais. Lietuvoje per pastaruosius penketą metų pagrindiniu pasiutligės rezervuaru gamtoje išlieka laukiniai gyvūnai. Analizuojant pasiutligę infekuotų laukinių gyvūnų imunofluorescencijos (IF) tyrimų rezultatus 2003–2007 metų laikotarpiu nustatyta, kad didžiausią infekuotumą pasiutlige gamtoje sudarė mangutai (72,81 proc.) ir lapės (59,28 proc.)

2006 m. birželio – 2007 m. rugsėjo mėnesiais visoje šalyje „Lysvulpen“ vakcina (gamintojas „Bioveta“ Čekijos Respublika) atlikta oralinė pasiutligės laukinių gyvūnų vakcinacija. Dėl vakcinacijos antikūnų prieš pasiutligės virusą iširta 490 lapių kraujo mėginių. 238 mėginiuose rasti antikūnai (48,57 proc.). Imunologiniai tyrimai ir skaičiavimai atlikti Nacionalinės veterinarijos laboratorijoje, Virusologinių tyrimų skyriuje.

Imunologinių tyrimų tikslas buvo nustatyti pasiutligės vakcininių antikūnų kiekį tiriamų lapių kraujyje, t. y. mažiausią tiriamo serumo antikūnų (D_{50}) kiekį, kuris 50 proc. apsaugo nuo viruso. Lapių oralinės vakcinacijos prieš pasiutligę poveikiui nustatyti iš kraujo ir kraujo serumo rutininiais tyrimams buvo naudojamas komercinis imunofermentinės analizės (IFA) rinkinys „Bio-Rad“ (Prancūzija). Palyginus ($n=50$) lapių kraujo mėginius abiem metodais – fluorescuojančių antikūnų viruso neutralizacijos (FAVN) ir imunofermentinės analizės (IFA) – nustatyta, kad tų pačių lapių iš tos pačios apskrities mėginių tyrimo rezultatai buvo panašūs. IFA metodu galima patikimai titruoti kraujo mėginius, nes galima nustatyti vidutinį ir žemą titrą net su labai užterštais „kūno skysčiais“. Palyginti abiejų tyrimo metodų tų pačių mėginių rezultatai atitiko 92 proc.

Raktažodžiai: pasiutligė, lapės, oralinė, vakcinacija, IFA, FAVN.

THE EFFECT OF THE ORAL VACCINATION OF FOXES AGAINST RABIES BY IMMUNOLOGICAL TESTS

Ingrida Jacevičienė¹, Eugenijus Jacevičius^{1,3}, Vytas Antanas Tamošiūnas², Jonas Milius^{1,4}, Kazimieras Lukauskas^{3,5}, Gediminas Pridotkas¹

¹National Institute of Food and Veterinary Risk Assessment, Kairiūkščio g. 10, LT-08409 Vilnius, Lithuania; tel. +370 278 0474; e-mail: ijaceviciene@nvl.lt

²Laboratory of Molecular Immunology, Institute of Immunology of Vilnius University, Molėtų pl. 29, LT-08409, Vilnius, Lithuania

³Department of Infectious Diseases, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania

⁴Department of Food Safety and Animal Hygiene, Lithuanian Veterinary Academy, Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania

⁵LR, The State Food and Veterinary Service, Siesikų g. 19, LT-07170 Vilnius, Lithuania

Summary. During the last years the wild animals are vector and reservoir, and an important factor of the rabies in Lithuania. Analysis performed during the period from 2003 to 2007 by immunofluorescence (IF) had shown that 72.81% of raccoon dogs and 52.28% of foxes samples were positive for rabies.

Oral vaccination (ORV) of foxes with bites containing live rabies virus (Lysvulpen, Bioveta, Czech Republic) started in June 2006–September 2007. The present study investigated the effectiveness of ORV in Lithuania foxes considering that an antibody titer ≥ 0.5 IU/mL is protective. During the study period 490 of foxes sera samples were tested by ELISA Platelia Rabies II test (Bio-Rad, France) and in 238 of tested samples (48.57%) were found antibodies for rabies.

Furthermore, the comparison of 50 samples of fox sera using IF and fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) test methods had shown comparable sensitivity. Some wildlife specimens were cytotoxic in the FAVN, resulting in possible false positive reaction. In view of this ELISA is rapid and simple technique on field fox sera. We obtained, with fox sera sampled in the same area, the same distribution of high, medium and low titres within all categories of serum quality (high to very poor quality) and therefore conclude that this ELISA test allows a reliable titration even with highly contaminated body fluids. The results demonstrated 92% correlation between IF and FAVN methods.

Key words: Rabies, foxes, oral vaccination, ELISA, IF, FAVN.

Ivadas. Pasiutligė yra zoonozinė virusinė liga, kuri naminiams ir laukiniams gyvūnams, taip pat ir žmonėms, pasireiškia encefalomielitu ir sunkiais nerviniais veiklos sutrikimais. Pasiutligė (angl. – rabies, lyssa, hydrophobia) – virusinis specifinis encefalomielitas, kuriuo užsikrečiama pasiutusiam gyvūnui įkandus arba apseilėjus sužalotą odą, rečiau – gleivinę. Ligą sukelia neurotropinis RNR virusas, priklausantis *Rhabdoviridae* šeimai, *Lyssavirus* genčiai.

Pasiutlige sergama Afrikoje, Artimuosiuose Rytuose, daugelyje Azijos šalių, Centrinėje ir Pietų Amerikoje, taip pat kai kuriose Europos šalyse. Baltijos valstybėse – Lietuvoje, Latvijoje ir Estijoje – *Lyssavirus* nustatomas dažniausiai laukiniams gyvūnams. Pasiutligės paplitimas laukinių ir naminių gyvūnų populiacijose kelia pavojų žmonių sveikatai (Vanaga et al., 2003).

Per pastaruosius penketą metų Lietuvoje pagrindiniu pasiutligės rezervuaru gamtoje išlieka rudoji lapė (*Vulpes vulpes*) ir mangutai (*Nyctereutes procyonoides*) (SFVS, 1999). Pavieniai infekcijos atvejai nustatyti kiaunėms (*Martes martes*), šėškams (*Mustela putorius*) ir kitiems laukiniams gyvūnams (SFVS, 1999). Vyraujant lapių ir mangutų pasiutligei, padidėja rizika užsikrėsti naminiams gyvūnams. Pasikeitė ne tik sergančių gyvulių rūšių struktūra, bet pirmiausia padidėjo sergamumas galvijų, kurie, ypač ganiavos metu, dažniausiai kontaktuoja su pasiutlige sergančiais laukiniais plėšrūnais (Zienius, 2007). Toks pasiutligės arealo išplitimas kelia nerimą, nors, kaip ir visoje Europoje (SFVS, 1999), Lietuvoje lapės išlieka pagrindiniu gamtiniu pasiutligės plitimo šaltiniu (Muller, et al., 1998).

Pasiutligės paplitimas mūsų šalies gyvūnų populiacijose buvo tirtas 1994–2003 metais ir registruotas visuose regionuose. Taigi pasiutligės profilaktikos klausimai labai aktualūs. Oralinė vakcinacija (POV) Lietuvoje pradėta 1995 metais ir rengiama pagal Nacionalinę pasiutligės prevencijos programą panaudojant žymėtąją SAG1 (angl. – Street Alabama Gif) („Virbac“, Prancūzija) vakciną iki 1997 metų. 1998 metais buvo naudojama kita žymėtoji „Lysvulpen“ („Bioveta“, Čekija) vakcina, o 1999–2000 metais – oralinė vakcina prieš pasiutligę „Rabifox“ (Vokietija) (Milius ir kt., 2004). Pagal šią programą buvo vakcinuojama du kartus per metus (kovo–balandžio ir spalio–lapkričio mėnesiais), jaukai buvo mėtomi didesnėje nei 10 tūkst. kv. km teritorijoje pagal standartinį dažnumą (15–20 masalų kv. km.). Dėl riboto biudžeto į laukinių gyvūnų vakcinacijos programą įtraukti ne visi šalies regionai. Tuo galima būtų paaiškinti iš dalies staigiai padidėjusį laukinių gyvūnų infekuotumą (Milius ir kt., 2004).

Vertinant 1997 metais SAG1 oralinės vakcinacijos efektyvumo tyrimų rezultatus skirtinguose regionuose nustatyta, kad didesnė serokonversija buvo tuose lapių populiacijos regionuose, kur vakcinacija buvo atlikta gegužės pabaigoje ir gegužės viduryje (Zienius, 2007). Manoma, kad ankstyva POV yra mažai efektyvi pirmiausia jaunų lapių populiacijai, be to, rudeninė POV taip pat mažai veiksminga, nes nesukelia pakartotinio imunizacijos efekto (Bruyere et al., 2000).

Po kelerių metų, 2006 m. birželio mėn., vėl pradėta

laukinių gyvūnų oralinė vakcinacija prieš pasiutligę su žymėtąja atenuota vakcina „Lysvulpen“ (Čekijos Respublika). Tokia vakcinacija atliekama visose Baltijos šalyse. Vakcinacijos poveikio tyrimas atliktas Nacionalinėje veterinarijos laboratorijoje (NVL), Virusologinių tyrimų skyriuje. Labai svarbu nuolat analizuoti pasiutligės epidemiologinę situaciją šalyje, nustatyti lapių paplitimą, aiškinti plitimo tendencijas, pavojų užsikrėsti žmonėms.

Darbo tikslas ir uždaviniai – atlikti oralinės pasiutligės vakcininių antikūnų kiekio tiriamų lapių kraujyje analizę ir įvertinti vakcinos efektyvumą skirtinguose Lietuvos regionuose taikant 2006–2007 metų imunologinius tyrimo metodus.

Tyrimų medžiaga ir metodai. 2006–2007 metais oralinė laukinės faunos vakcinacija prieš pasiutligę buvo atliekama du kartus per metus – pavasarį ir rudenį, esant vakcinos naudojimo instrukcijose numatytiems meteorologiniams sąlygoms. Lapės buvo vakcinuojamos gyva oraline „Lysvulpen“ vakcina, esančia žuvies ir maltos mėsos apvalkale. Gyvūnai, suėdę masalą, užsikrečia vakcinos sudėtyje esančiu pasiutligės virusu, kuris skatina susidaryti imunitetą. Vakcinos sudėtyje yra susilpnintas pasiutligės virusas, antibiotikai ir stabilizuojamoji medžiaga. Vakcina buvo įdėta į kapsulę, laukiniam gyvūnui ėdant masalą plyštanti kapsulė ir pažeidžia burnos gleivinę. Per ją virusas patenka į organizmą ir skatina imuniteto susidarymą.

Nuo 2006 m. birželio mėn. iki 2006 m. spalio mėn. mėginiai buvo renkami iš Neringos savivaldybės, Klaipėdos, Kretingos, Skuodo, Plungės, Šilutės rajono ir Pagėgių savivaldybės, Mažeikių, Telšių rajonų, Rietavo savivaldybės, Šilalės, Tauragės, Akmenės, Kelmės, Jurbarko, Raseinių, Šiaulių, Joniškio, Pakruojo, Radviliškio, Kėdainių, Panevėžio, Pasvalio, Jonavos, Biržų, Kupiškio, Anykščių, Ukmergės, Rokiškio, Molėtų rajonų, dalyje Zarasų, Utenos, Švenčionių rajonų – bemaž 60 proc. šalies teritorijos. 2006 m. spalio–2007 m. rugsėjo mėnesį mėginiai buvo renkami toje teritorijoje, kur buvo atliekama oralinė laukinių gyvūnų vakcinacija. Lapės sumedžio- tose rajonuose, kur ne mažiau kaip prieš 23 dienas buvo atlikta oralinė vakcinacija. Jų kraujo mėginiai buvo nedelsiant pristatyti į NVL Virusologinių tyrimų skyrių. Situacijai įvertinti 2006–2007 metais Lietuvoje imunologiniais tyrimo metodais atlikta pasiutligės vakcininių antikūnų duomenų analizė. Lapių kraujo mėginių oralinės vakcinacijos prieš pasiutligę antikūnų titrui nustatyti buvo naudojamas komercinis IFA (angl. – Bio-Rad Platelia™ Rabies II Kit) rinkinys. Diagnostika atlikta Tarptautinio epizootijų biuro standartizuotais metodais (TEB)(OIE, 2004). Vakcinacijos efektyvumui nustatyti šalyje taikyti du tyrimo metodai – imunfermentinės analizės (IFA) ir palyginimui – fluorescuojančių antikūnų viruso neutralizacijos (FAVN) (OIE, 2004).

Kraujo serumo mėginiai. Ištirta 490 lapių kraujo serumo mėginių IFA metodu ir palyginimui – 50 kraujo serumo mėginių naudojant FAVN. Visi mėginiai prieš tyrimus laikyti – 20°C temperatūroje.

Pasiutligės vakcininių antikūnų nustatymas IFA metodu. Etaloninės medžiagos: komercinis IFA (angl. – Bio-Rad Platelia™ Rabies II Kit) rinkinys; teigiamas referen-

tinis serumas 0,5 TV/ml ir teigiamas referentinis serumas 4 TV/ml gautas iš AFSSA (pranc. – Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments Prancūzija). Kontrolės kalibruotos pagal Pasaulio sveikatos organizacijos (PSO) ir TEB nurodymus (OIE, 2004). Visi reagentai naudotini išskirtinai *in vitro* diagnostikai.

Įranga: purtyklė „Vortex“, (Heidolph, Vokietija); termostatinė vandens vonelė (DJ, (Prancūzija); termostatas 37°C temperatūros (Jouan, Prancūzija); automatinis mikroplokštelių analizatorius (450 nm), tipas ELx808, (Bio-Tek, JAV); precizinės vienakanalės ir daugiakanalės pipetės, tipas „Researche“, (Eppendorf, Vokietija).

Lapių POV *in vitro* nustatyti iš kraujo ir kraujo serumo naudojame komercinį IFA rinkinį (angl. – Bio-Rad Platelia™ Rabies II Kit) (gamintojas Bio-Rad, Prancūzija). Rinkinys pritaikytas nustatyti ir titruoti IgG pasiutligės viruso glikoproteiną gyvūnų kraujyje ir kraujo serume. Anot PSO ir TEB ekspertų, antikūnų kiekis 0,5, TV/ml ar daugiau yra tinkama apsauga nuo užkrato. Jų kontrolė įgalina netiesiogiai įvertinti vakcinų efektyvumą oralinės laukinių gyvūnų vakcinacijos metu (Servat et al., 2007).

Metodas paremtas netiesiogine imunofermentine analize. Mikroplokštelė yra padengta pasiutligės glikoproteinu, gautu iš neaktyvuotos ir išgrynintos viruso membranos. Fermentinis konjugatas susideda iš proteino A, gauto iš *Staphylococcus aureus*, sujungto su peroksidaze. Teigiamos kontrolės – teigiamas referentinis serumas 0,5 TV/ml ir teigiamas referentinis serumas 4 TV/ml yra kalibruotos pagal PSO standartus, leidžia kokybiškai ir kiekybiškai nustatyti antikūnų prieš pasiutligės virusą titrą kraujyje ir kraujo serume (Servat et al., 2007).

Tiriamasis serumas bei referentinės teigiamos kontrolės yra išpilstomi į glikoproteinu padengtos mikroplokštelės šulinėlius. Per vieną inkubavimo valandą +37°C temperatūroje antikūnai prieš pasiutligės virusą, esantys mėginyje, susijungia su glikoproteinu, kuriuo padengti mikroplokštelės šulinėliai. Po inkubavimo nesusijungę antikūnai ir kiti serumo proteinais pašalinami plaunant su paruoštu naudoti Tris-NaCl (pH 7,2) plovimo tirpalu. Konjugatas (proteinas A su peroksidaze) išpilstomas į mikroplokštelės šulinėlius. Per antrą vienos valandos inkubavimą +37°C temperatūroje pažymėti antikūnai susijungia su antikūnų prieš pasiutligės virusą ir antigeno kompleksais, prisitvirtinusiems mikroplokštelės šulinėliuose. Nepripilęs konjugatas pašalinamas plaunant Tris-NaCl plovimo tirpalu. Imuninis kompleksas tampa akivaizdus papildant tirpalu, kurio sudėtyje yra peroksidazės substrato ir chromogenų, inicijuojančių spalvos ryškinimo reakciją. Rezultatai pateikiami optinio tankio vienetais (OT) mikroplokštelę nuskaičius 450 nm bangos ilgiu. Tiriamų mėginių OT vertė palyginama su teigiamomis kontrolėmis. Mėginio titrai kiekybiniuose testuose gaunami tiesiogiai nuskaičius standartinę kreivę ir išreiškiami ekvivalentiniais vienetais mililitre EV/ml. Vienetas ekvivalentiškas tarptautiniams vienetais (TV/ml), nustatytiems serumo neutralizacijai (Servat et al., 2007).

Pasiutligės vakcininių antikūnų nustatymas FAVN metodu. Etaloninės medžiagos: teigiamas referentinis serumas 0,5 TV/ml (Cliquet et al., 1998), neigiamas šuns

referentinis serumas, BHK-21 C13 (ATCC CCL-10) ląstelių linija (angl. – aby Hamster Kidney) (Cliquet et al., 1998), pasiutligės virusas CVS-11 (ATCC VR 959) (angl. – challenge virus standard CVS) gautas iš AFSSA (pranc. – Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Prancūzija).

Įranga: laminaras II saugos klasės „HERA safe“ (Vokietija); termostatas +37°C temperatūros su 5 proc. CO₂ (JAV); mikroplokštelės F 96 (JAV); fluorescencinis invertuotas mikroskopas „Leica“ (Vokietija).

FAVN principas yra *in vitro* pasiutligės viruso CVS-11 kiekio ir titro nustatymas užkrėtus jautrias pasiutligės virusui BHK-21 ląsteles (Cliquet et al., 1998). 100 proc. serumo titras skiedžiamas neutralizuojant virusą 50 proc. šulinėlių. Šis titras išreiškiamas TV/ml lyginant su standartinio serumo neutralizacijos skiedimu tokiais pat eksperimentinėmis sąlygomis. Mikrotitravimo metodas pagal J. S. Smith taikomas naudojant 96 šulinėlių F formos mikroplokštelę (Smith et al., 1973), modifikuotą pagal E. Zalan (Zalan et al., 1979) ir Perrin (Perrin et al., 1985) metodiką.

FAVN metodas (Cliquet et al., 1998) taikytas ant audinių kultūros 96 šulinėlių mikroplokštelėse, naudojant BHK-21 ląsteles ir pasiutligės viruso CVS-11 padermę. Virusų dauginimuisi ląstelės buvo suspenduotos T-75 flakonuose ir užkrėtos viena dalimi viruso su DMEM (angl. – Dulbecco's Modified Eagle Medium) auginimo terpe, į kurios sudėtį įeina 10 proc. fetalinio veršelio serumo (FVS) (DMEM+10%FVS), ir 48 val. inkubuotos termostate +37°C temperatūroje. Visas paruoštas viruso kiekis išpilstytas į mėgintuvėlius po 0,5 ml ir laikytas – 80°C temperatūros šaldiklyje. Virusų titras buvo 10^{5.1}TCID₅₀/ml (angl. – TCID₅₀-tissue culture infective dose). DMEM-10 proc. FVS terpė panaudota kontroliniam ir tiriamajam serumui skiesti išpilstant į mikroplokštelės šulinėlius po 0,1 ml; virusui skiesti išpilstyta po 0,15 ml.

Tiriamasis serumas išpilstytas po 0,05 ml į keturis kartotinius mikroplokštelės šulinėlius ir titruotas po 0,05 ml automatinė daugiakanalė pipete. Koncentruota viruso CVS-11 suspensija praskiesta ir po 0,05 ml išpilstyta į kiekvieną praskiesto serumo šulinėlį. Mikroplokštelė 60 min. inkubuota termostate +37°C temperatūroje su 5 proc. CO₂. Po inkubacijos į kiekvieną šulinėlį užpilta po 0,05 ml paruoštos BHK-21 4x10⁵ ląstelių suspensijos su (DMEM +10%FVS) auginimo terpe, ir plokštelės 48 val. inkubuotos +37°C temperatūroje su 5 proc. CO₂.

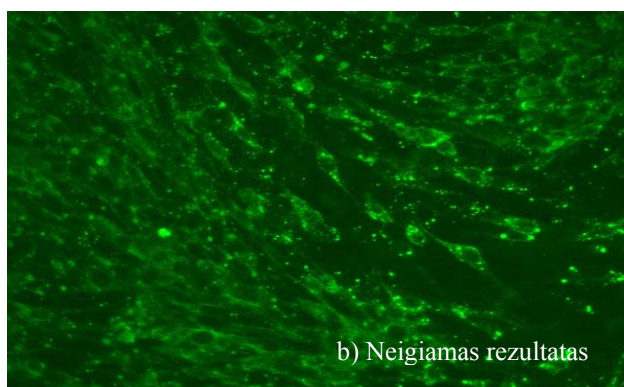
Kontrolinei mikroplokštei naudoti keturi šulinėliai su neužkrėstomis ląstelėmis, keturiuose kartotiniuose šulinėliuose viruso koncentracijos kiekiui nustatyti taip pat titruotas kontrolinis teigiamas (angl. – OIE reference serum) ir neigiamas (angl. – naive dog serum) referentinis serumas. Po 48 val. inkubacijos terpė nupilta į dezinfekcinį tirpalą (Virkon's 1%). Mikroplokštelė vieną kartą praplauta su fosfatiniu buferiniu druskos tirpalu (angl. – PBS, pH 7.4 Dulbecco). Tada užpiltas 80 proc. acetonas ir iš karto nupiltas, antrą kartą užpiltas 80 proc. acetonas ir fiksuotas palaikant 30 min. kambario temperatūroje. Išdžiovinatas. Dažyta konjugatu FITC (angl. – fluorescein isothiocyanate) su viruso nuo pasiutligės monokloniniais antikūnais (Fujirabio, JAV), skiestais 1:200, išpilstyta į

kiekvieną duobutę po 0,05 ml. Po 30 min. inkubacijos termostate +37°C temperatūroje praplauta du kartus su PBS. PBS nupiltas apverčiant mikroplokštelę, nusausinta sugeriamuoju popieriumi. Rezultatai įvertinti invertiniu mikroskopu fluorescencijai su 10 – kartiniu ir 1,25 kartiniu objektyvo padidiniu. Turi būti įvertintas visas šulinėlio plotas.

Rezultatas laikomas teigiamu, jei mikroskopuojant šulinėje neaptikta nė vienos fluorescuojančios ląstelės (1 pav. a). Rezultatas laikomas neigiamu, jei mikroskopuojant šulinėlį rasta nors viena fluorescuojanti ląstelė (1 pav. b).



a) Teigiamas rezultatas



b) Neigiamas rezultatas

1 pav. BHK-21 ląstelių fluorescencija

Mažiausias tiriamo serumo antikūnų (D_{50}) kiekis, 50 proc. apsaugantis nuo viruso, buvo skaičiuojamas Spearman–Kärber metodu (Spearman, 1908; Kärber, 1931). Serumo titras išreikštas tarptautiniais vienetais mililitre (TV/ml) palyginus su referentinio serumo titru, įeinančio į kiekvieną tyrimą.

Kiekvieno tyrimo rezultatai patvirtinti įvertinant kontrolinių diagramų titrus, gautus iš CVS ($TCID_{50}$), neigiamo (angl. – naive dog serum) serumo (D_{50}) ir teigiamo (angl. – OIE referente serum) referentinio serumo (D_{50}).

Kiekvienas testas buvo laikomas galiojančiu, jei vertės, surastos visoms šioms kontrolėms, nebuvo statistiškai kitokios, negu atitinkamas vidurkis verčių, gautų iš visų ankstesnių testų (Cliquet et al., 1998). Statistiniai tyrimai buvo atliekami dešimtainiu logaritmu (D_{50}) atitinkamai skiedžiant su 95 proc. limitu tikslumu taikant regresinę liniją (Cliquet et al., 1998). PSO ir TEB nurodymu, jei vakcinuoto gyvūno po pasiutligės antikūnų titras $\geq 0,5$ TV/ml, jis yra apsaugotas nuo pasiutligės.

Tyrimų rezultatai. Analizuojant pasiutlige infekuotų laukinių gyvūnų tyrimų rezultatus nustatyta, kad 2003–2007 metais didžiausią infekuotumą pasiutlige gamtoje sudarė lapės (2 pav.). Tačiau 2005–2006 metais daugiau infekuoti pasiutlige buvo mangutai (2 pav., 1 lentelė). Pasiutligės diagnostikai mūsų šalyje taikomas imunofluorescencinis (IF) tyrimo metodas (OIE, 2004). Šiam tikslui naudojamas komercinis diagnostinis FITC viruso nuopasiutligės polikloninis antikūnas, pagamintas „Bioveta“ (Čekijos Respublika). Fluorescencijos specifiškumui nustatyti atliekama kontrolė: FITC konjugatu nuo pasiutligės (teigiamas) + tiriamasis tepinėlis (galvos smegenys) ir neigiamas FITC konjugatas + tiriamasis tepinėlis (galvos smegenys).

Analizuodami lapių POV poveikį galime teigti, kad 2006 m. spalio–2007 m. rugsėjo mėnesiais atliekant visoje Lietuvos teritorijoje POV, per 2007 m. sumažėjo lapių pasiutligės atvejų. Lapių pasiutligės sergamumo epidemiologiniai situacijai 2003–2007 metais įvertinti atlikta NVL duomenų analizė (3 pav.).

2006 m. birželio–2007 m. rugsėjo mėnesiais visoje Lietuvos teritorijoje atlikta oralinė pasiutligės laukinių gyvūnų vakcinacija „Lysvulpen“ vakcina, kuri yra atenuota SAD Berne vakcina (Matouch et al., 2006). Masalai su vakcina buvo išmėtyti iš lėktuvo. 2006 m. visoje šalies teritorijoje vakcinacija atlikta pavasario ir rudens–žiemos laikotarpiu, iš lėktuvų išmėtyta 2 mljn. 100 tūkst. masalų. Pirmas vakcinacijos etapas pradėtas 2006 m. pavasarį, kai laukiniai gyvūnai buvo vakcinuojami 60 proc. Lietuvos teritorijos: išmėtyta 800 tūkst. masalų su vakcina. Antruoju etapu oralinė vakcinacija atlikta visoje šalies teritorijoje: išmėtyta 1 mljn. 300 tūkst. masalų su vakcina.

FAVN ir IFA metodams palyginti ėmėme tuos pačius mėginius – iš visų 10 apskričių po 5 mėginius. IFA tyrimo metodu buvo ištirti ($n=50$) lapių kraujo mėginiai, iš kurių (28) IFA metodu buvo nustatyti antikūnai. Tie patys ($n=50$) lapių kraujo mėginiai buvo tirti FAVN tyrimo metodu, iš kurių (23) mėginiams nustatyti antikūnai (2 lentelė).

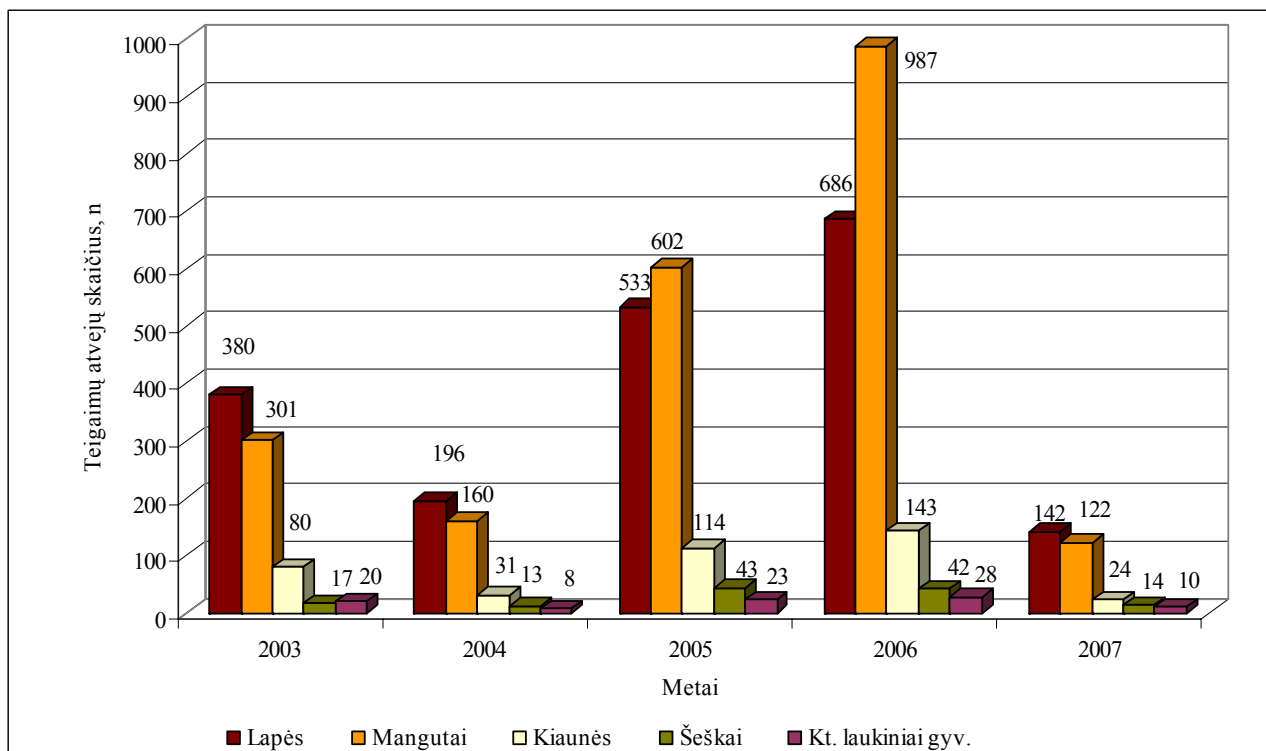
Atlikdami FAVN tyrimą palyginome ir IFA tyrimo rezultatus, nevakcinuotų ($n=22$) ir vakcinuotų lapių ($n=28$) mėginių titrus. Tyrimo rezultatai parodo atitikimą – šiuo atveju 92 proc. (2 lentelė). Analizuojant FAVN tyrimo metodo rezultatus ($n=1$) mėginio titras buvo 0,38 TV/ml arti 0,5 TV/ml, todėl klasifikuojamas kaip neigiamas, o kiti ($n=4$) buvo toksiški, nes neaugo ląstelės. IFA tyrimo metodo penkių mėginių rezultatai buvo teigiami. Abiem metodais nustatyti mėginių titrai išreiškiami TV/ml (angl. – IU/ml).

Po 2006 spalio–2007 rugsėjo mėn. POV programos netiesiogine IFA įvertinus lapių serumo imunizacijos efektyvumą, kai mikroplokštelės buvo padengtos glikoproteinu, patvirtintas pakankamas metodo jautrumas ir specifiškumas. Palyginti su FAVN metodu IFA metodo technika yra daug greitesnė (4 val.), saugesnė (laboratorijai nėra griežtų reikalavimų, nereikia naudoti virusinio virulentiško kamieno) ir paprastesnė (nereikalauja daugybės techninio personalo apmokymų), spalvoti reagentai ir kalibruotos kontrolės naudojami pagal tarptautinius patvirtintus standartus. Kitoms vakcinacijos programoms

prieš pasiutligę rekomenduojama taikyti IFA įvertinant serumo imunizaciją.

Oralinės vakcinacijos prieš pasiutligę efektyvumo tyrimus IFA metodu atlikome NVL Virusologinių tyrimų

skyriuje. 2006–2007 metais ištirta 490 lapių kraujo mėginių. 238 mėginiuose (48,57 proc.) nustatyti antikūnai (3 lentelė).



2 pav. Laukinių gyvūnų pasiutligės atvejai Lietuvoje 2003–2007 m.

*Kt. laukiniai gyvūnai – šernai, bebrai, pelės, bursukai, stirnos, voverės, ondatros, briedžiai, audinės, ūdros, žiurkės

1 lentelė. Laukinių gyvūnų skirtingų rūšių infekuotumas pasiutlige Lietuvoje 2003–2007 metais

Gyvūnų rūšis	Tirtų gyvūnų skaičius, n	Teigiamų atvejų skaičius, n	Teigiami atvejai, %
Lapės	3268	1937	59,28
Mangutai	2983	2172	72,81
Kiaunės	990	392	39,59
Šeškai	530	129	24,33
Kt. laukiniai	576	89	15,45
Iš viso:	8347	4719	56,53

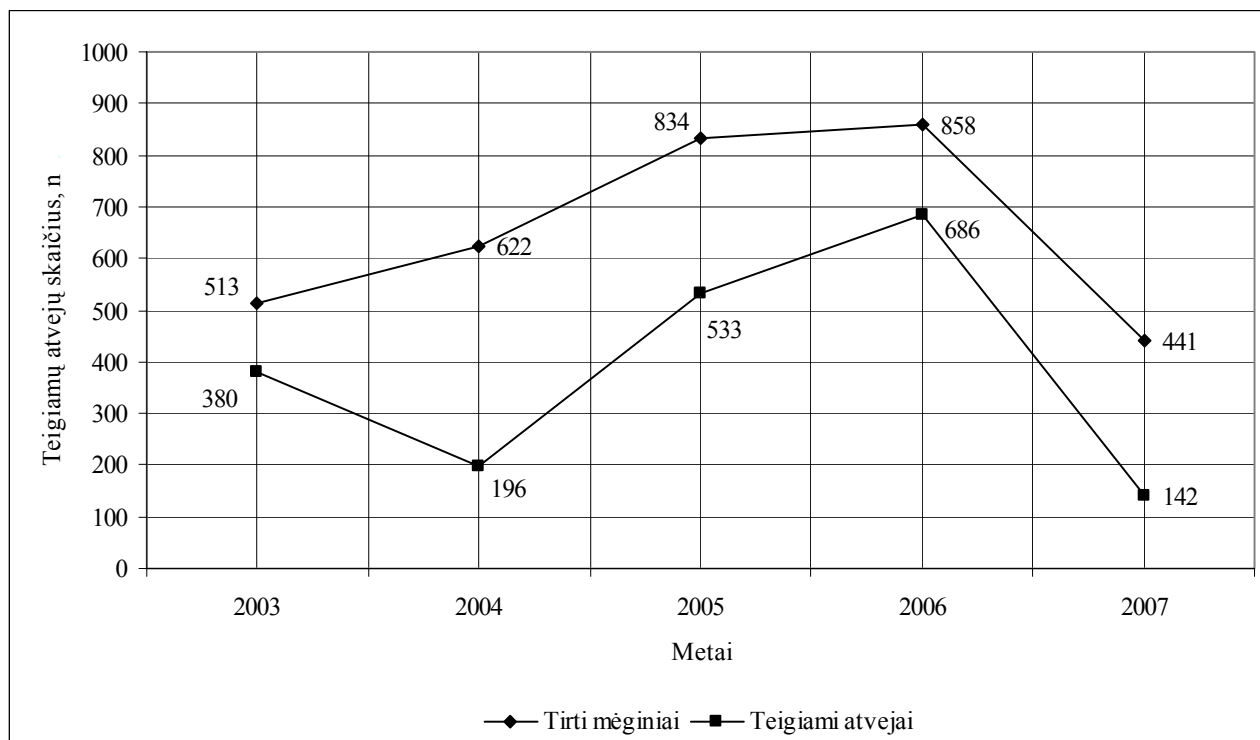
Aptarimas. Pasiutligės epidemiologinė būklė yra tiesiogiai susijusi su populiacijos imuniniu statusu. Analizuojant registruotų susirgimų lapių pasiutlige skaičius pastebėta, kad 2007 metais susirgimų sumažėjo (2, 3 pav.). Tai tiesiogiai siejama su pasiutligės kaip gamtinės infekcijos aktyvumo svyravimais: įgyvendinus ilgalaikes POV programas, dideliuose regionuose padaugėja susirgimų pasiutlige. Pasiutligės virusams infekuojant lapių populiaciją, individų skaičius joje ima mažėti iki slenkstinės imlių gyvūnų koncentracijos, užtikrinančios pasiutligės persistentinį perdavimo tipą ploto vienetu. Taigi pasiutligės atvejų natūraliai sumažėja (2004 metais sumažėjo ir sumedžiotų lapių ir susirgimų skaičius). Vėliau lapių populiacija pradeda gausėti, kartu gausėja ir susirgimų (2005–2006 m. lapių susirgimų pasiutlige daugėjo). Tokie susirgimų svyravimai galimi kas 5–10 metų (Zienius,

2007).

Atliekant POV taip pat labai svarbu žinoti „Lysvulpen“ atenuotos vakcinės stabilumą nepalankiomis oro sąlygomis, iki ji bus suėsta gyvūno. Šiam tyrimui išbandytos dvi partijos „Lysvulpen“ vakcinės, pagamintos „Bioveta“. Vakcinės titras gamintojo buvo nustatytas ne mažiau kaip 107,0 TCID₅₀/dose (angl. – TCID₅₀-tissue culture infective dose). 100 vienetų vakcinės masalų pavasarį ir rudenį rankomis buvo išmėtyta miške ir pamiškėse. Kasdien buvo stebima ir fiksuojama oro temperatūra, krituliai ir saulės šviesa, buvo stebimas vakcinės masalo apvalkalo pastovumas (Mačiulskis et al., 2008). Vakcina titruota NVL Virusologinių tyrimų skyriuje. Lauko sąlygomis masalų stabilumas yra labai svarbus atliekant oralinę vakcinaciją. Bandymai parodė, kad oralinės pasiutligės viruso vakcinės efektyvumas lauke priklauso nuo dozės, vakcinės viruso titro

stabilumo ir masalo apvalkalo. Bandymais įrodyta, kad masalo apvalkalas stabilesnis išlieka šešėlyje nei saulės šviesoje. Paveiktas kritulių masalo apvalkalas tapo minkštas ir ištirpęs. Sausomis oro sąlygomis nustatytas pakankamas pasiutligės vakcinos viruso titras, o drėg-

nomis vakcinos viruso titras sumažėjęs. Išvadoje pabrėžiama, kad masalų dalijimas drėgnomis oro sąlygomis gali būti neveiksmingas įgyvendinant oralinės pasiutligės vakcinacijos programą (Mačiulskis et al., 2008).



3 pav. Pasiutligės virusu infekuotų lapių dinamika 2003–2007 m.

2 lentelė. IFA ir FAVN metodų rezultatų palyginimas tiriant lapių POV (n=50) mėginius

Apskritis	Lapės					
	Bendras kraujo mėginių skaičius, n	Neigiamas mėginių skaičius, n		Teigiamas mėginių skaičius, n		
		IFA	FAVN	IFA	FAVN	
					toksiškas serumas	
Alytaus	5	3	3	2	2	
Kauno	5	2	2	3	2	1
Klaipėdos	5	3	3	2	2	
Marijampolės	5	3	3	2	2	
Panevėžio	5	1	2	4	2	1
Šiaulių	5	3	3	2	2	
Tauragės	5	2	2	3	3	
Telšiai	5	2	2	3	3	
Utenos	4	2	2	2	1	1
Vilniaus	6	1	1	5	4	1
Iš viso:	50	22	23	28	23	4
Atitikimas, %		92 %				

1994–1996 metais lapių infekuotumo pasiutligės virusu lygis išliko palyginti stabilus. 1997 metais atliktos dvi vakcinacijos – pavasari (gegužės mėn.) ir rudenį (spalio–lapkričio mėn.). 22 rajonų 4338 kv. km plote buvo paskleista 200 tūkst. masalų. 1998 metais buvo vakcinuojama 6375 kv. km plote, kuris apėmė 26 rajonus Šiaurės ir

Vakarų Lietuvos dalyse. 1998 metais paskleista 200 tūkst. masalų. 1999–2000 metais taip pat buvo atlikta pavasarinė ir rudeninė vakcinacija 29 rajonuose. 1997–2003 metais infekuotų lapių kasmet daugėjo. 2001–2003 metais oralinė lapių vakcinacija prieš pasiutligę nebuvo atlikta. Galbūt tuo galima būtų paaiškinti padidėjusį laukinių gy-

vūnų infekuotumą, nes dalis gausėjančių laukinių gyvūnų populiacijos (lapių ir mangutų) liko nevakcinuota (Milius ir kt., 2004).

Apibendrinus tyrimo rezultatus galima teigti, kad oralinės imunizacijos programa yra efektyvus būdas kontroliuoti ir kovoti su lapių pasiutlige. Pradėjus 2006 m. POV programą, tais pačiais metais padaugėjo lapių susirgimų pasiutlige. Vakcinacijos poveikis matuojamas imuninio

statuso kiekybiniais rodikliais, t. y. kiek vakcinuotų lapių įgavo imunitetą. Lapių populiacijos imunitetas intensyvėja su kiekviena vakcinacija, bet ir tobulai parengus POV programą gali siekti 50–90 proc., titruojant serumą Ak – 30–80 proc. (0,5 TV/ml) (Zienius, 2007). Stiprėjant populiacijos imunitetui gausėja populiacija, t. y. padidėja imlių infekcijai gyvūnų skaičius, o ypač jauniklių grupėje vasaros metu (Anon, 2002).

3 lentelė. Lapių oralinės vakcinacijos prieš pasiutligę efektyvumo įvertinimas IFA metodu iš kraujo mėginių 2006 06 01–2007 09 30

Apskritis	Bendras kraujo mėginių skaičius, n	Lapės		Teigiamų mėginių, %
		Neigiamas mėginių skaičius, n	Teigiamų mėginių skaičius, n	
Alytaus	76	30	46	60,52
Kauno	26	22	4	15,38
Klaipėdos	57	18	39	68,42
Marijampolės	50	38	12	24
Panevėžio	67	31	36	53,73
Šiaulių	21	12	9	43
Tauragės	54	30	24	44,44
Telšių	45	20	25	55,55
Utenos	81	44	37	45,67
Vilniaus	13	7	6	46,15
Iš viso:	490	252	238	48,57

PSO nurodo, kad po vakcinacijos antikūnų titras 0,5 TV/ml yra riba, kuri rodo gerą apsaugą žmonėms. Tokia pati titro vertė 0,5 TV/ml yra taikoma vakcinuotų lapių antikūnams nustatyti (Matouch et al., 1998).

Prieš pasiutligės virusą vakcinuotų gyvūnų antikūnams nustatyti dažniausiai taikomi kiekybiniai serologinės neutralizacijos tyrimo metodai užkrečiant peles arba lašteles. PSO rekomenduojami metodai yra MNT (angl. – Mouse Neutralisation Test) (Webster et al., 1935) ir RFFIT (angl. – Rapid Fluorescent Focus Inhibition) (Smith et al., 1973). Remdamiesi MNT metodu turėtume naudoti laboratorinius gyvūnus (peles), bet šis metodas turi trūkumą, mat tyrimas yra ilgas (28 d.). RFFIT metodas taikomas ląstelių kultūroms, o atlikimo technika labai panaši į FAVN (Cliquet et al., 2000).

Lapių oralinės pasiutligės vakcinacijos imuninis atsakas dažniausiai nustatomas FAVN arba IFA tyrimo metodais. FAVN tyrimo metodas taikomas ląstelių kultūroms (Cliquet et al., 2000), bet FAVN reakcija labai jautri ląstelių citotoksiškumui, atliekant plataus masto apžvalginius tyrimus (angl. screening) laukinių gyvūnų serume. Daugumos lapių serumo mėginiai iš tikrųjų buvo „lavono skystis“ („body fluids“), kurį ėmė medžiotojai, jėgeriai arba laboratorijos specialistai. Kuo greičiau atidaroma nugaišusio gyvūno krūtinės lašta, tuo greičiau kraujas hemolizuoja, todėl mėginiai į laboratoriją tyrimams buvo siunčiami +18 +22°C temperatūroje kuo greičiau. FAVN tyrimo metodas turi trūkumą, nes dėl prastos serumo kokybės titruojant pasiutligės antikūnus neįmanoma atlikti priežiūros kontrolės ir palyginti vakcinacijos poveikį (Cliquet et al., 2000). Mūsų tyrimų rezultatai rodo, kad IFA metodas yra daug jautresnis ir dėl prastos mėginio kokybės nespecifiškai nereaguoja. (Cliquet et al.,

2000).

P. Atanuosiu ir P. Perrin (Atanuosiu, Perrin, 1979) patvirtino antikūnų prieš pasiutligę nustatymo IFA metodą. Šis metodas yra pranašesnis: greitas, paprastas taikyti ir yra standartizuotas (Cliquet et al., 2003). Jam nereikia naudoti viruso ir ląstelių kultūrų, neturi reikšmės serumo kokybė, taip pat galima išvengti ląstelių toksiškumo susiduriant su hemolizuotais mėginiais (Cliquet et al., 2000). Tyrimai buvo atlikti su „Rabies Platelia™ II“ testo rinkiniu, kuris yra pakeista Platelia Rabies rinkinio versija ir paversto komercija „Sanofi Diagnostics Pasteur“ (Prancūzija), tada – „Bio-Rad“ (JAV). Šis naujas IFA rinkinys pagrįstas pasiutligės viruso antikūnų serumo susijungimu su pasiutligės glikoproteinu G. Susijungus A-peroksidazės baltymui susidaro antigeno + antikūno kompleksas (Servat et al., 2007).

Kovos su pasiutlige rezultatus Lietuvoje reikia vertinti teigiamai. Mūsų nuomone, atliekama oralinė vakcinacija duoda teigiamų rezultatų kovojant su šia pavojinga užkrečiamąja gyvūnų liga. Pasiutligės likvidavimas laukinių gyvūnų tarpe užkirs kelią ligai plisti tarp naminių gyvūnų. Manoma, kad per pastaruosius metus laiku ir sklandžiai atlikta oralinė vakcinacija prieš pasiutligę ateityje padės įveikti šią pavojingą užkrečiamąją ligą.

Viruso izoliacijos ir serologinės reakcijomis teigiamai mėginiai turi būti panaudoti tolimesniems virusologiniams tyrimams, t. y. taikyti molekulinis tyrimo metodus – pasiutligės viruso fenotipizavimą ir filogenetinę analizę. Atlikę tokius tyrimus galėtume identifikuoti šalyje paplitusius pasiutligės ekotipus, taip pat atskirti vakcininius virusų kamienus nuo epizootinių.

Išvados.

1. Laukinių gyvūnų tarpe lapės yra viena iš pagrindinių pasiutligės viruso išplitimo priežasčių (59,28 proc.).

2. Lietuvoje lapių oralinė vakcinacija prieš pasiutligę daro teigiamą įtaką – nustatytas mažesnis infekuotumas pasiutlige. Per 2006 metus pasiutlige infekuotos lapės gamtoje sudarė 79,95 proc., o 2007 metais – tik 32,19 proc.

3. Kasmēt atliekama POV efektyviai stabilizuoja pasiutligės plitimą laukinių gyvūnų. POV poveikio tyrimai iš sumedžiotų laukinių lapių kraujo parodė, kad 48,57 proc. buvo įgiję antikūnus prieš pasiutligę.

4. Palyginę IFA ir FAVN diagnostinius metodus pas-tėbėjome, kad IFA metodas yra greitesnis, saugesnis ir paprastesnis atlikimo technika, o serumo kokybė neturi reikšmės tyrimo rezultatams.

Literatūra

- Anon. Office International des Epizooties (O. I. E.). Multian-nual animal diseases status. Europe/Rabies. 2002. P. 1–12.
- Atanuosiu P., Perrin P. Microméthode immunoenzymatique de titrage des anticorps antirabique et de la protéine conjuguées à la peroxydase. *Ann Microbiol.* 1979. 130 A. P. 257.
- Bruyere V., Vuillaume P., Cliquet F., Aubert M. Oral rabies vaccination of foxes with one or two delayed distribution of SAG-2 baits during the spring. *Vet. Res.*, Vol. 31, 3. 2000. P. 339–345.
- Cliquet F., Aubert M. F. A. Sagné L. Development of a fluores-cent antibody virus neutralization test (FAVN test) for quantitation of rabies-neutralizing antibody. *J Immunol Meth-ods.* 1998. 212: P. 79–87.
- Cliquet F., Muller T., Mutinelli F., Geronutti S., Brocherier B., Sehors T., Schereffer J. L., Kraft N., Burow J., Schameita A., Schuler H., Aubert M. Standardisation and establishment of rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns. *Vaccine.* 2003. 21: P. 21–22.
- Cliquet F., Sagné L., Scereffer J., Aubert M. ELISA test for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine.* 2000. 18: P. 3272–3279.
- Elmgren L. D., Wandeler, A. I. Competitive ELISA for the detection of rabies virus neutralizing antibodies. In: Meslin F. X.; Kaplan N. M. M. & Koprowski H., ed. *Laboratory techniques in rabies.* 4.ed. Geneva, WHO, 1996. 17: P. 200–208.
- Hostnik P., Barlič-Maganja D., Tolpak I., Grom J. Persistence of rabies virus antibodies in sera of fox cubs vaccinated with the Vaccine Lysvulpen. *Acta Vet. Brno* 2003. 72: P. 207–212.
- Käber G. Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologis-cher Reihenversuche. *Arch. Exp. Pathol. Pharmakologis-cher.* 1931. 162: 480 S.
- Muller W. W., Cox J. H., Hohnsbeen K. P. Summary of rabies in Europe [July-September 1998]. *Rabies Bull. EU.* 1998. 22 (3): P. 3–15.
- Matouch O., Jaroš J., Vrazal. Oral vaccination of fox cubs against rabies in the vicinity of dens. *Vet MedCzech.V.* 1998. 43: P. 245–248.
- Matouch O., Vitasek J., Semerad Z., Malena M. Elimination of rabies in the Czech Republic. *Dev Biol.* 2006. 125:P. 141–143.
- Mačiulskis P., Lukauskas K., Milius J., Jacevičius E., Kiudulas V., Jokimas J., Počkevičius A. Intake and Stability of Rabies Vaccine. *Dev Biol.* 2008.131: P. 439–449.
- Milius J., Razmuvienė D., Jacevičius E., Tamošiūnas V., Lu-kauskas K. Pasiutligės epidemiologinė situacija Lietuvoje (1994–2003 m.). *Veterinarija ir zootechnika.* 2004. 27: P. 11–18.
- OIE (Office International des Epizooties), 2004. *Manual of Standarts Diagnostics Tests and Vaccines. Rabies.* Chapter 2.2.5: P. 328–346.
- Perrin P., Lafon M., Versmisse P., Sureau P. Application d'une méthode immunoenzymatique au titrage des anticorps antirabiques neutralisants en cultures cellulaires. *J. Biol. Stand.,* 1985. 13: P. 35–42.
- SFVS (State Food and Veterinary Service of the Republic of Lithuania). Rabies situation and oral vaccination of foxes in Lithuania. Rabies annual reports. Bern, Switzerland. 1999. P. 1–5.
- SFVS (State Food and Veterinary Service of the Republic of Lithuania). Rabies situation and oral vaccination of foxes in Lithuania. Rabies annual reports. Tallin, Estonia. 2000. P. 1–3.
- Servat A., Feysaguet M., Blanchard I., Morize J. L., Schereffer J. L., Boue F., Cliquet F. A Quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores. *J Immunol Methods.* 2007. 318: P. 1–10.
- Smith J. S., Yager P. A., Baer G. M. A rapid reproducible test for determining rabies neutralising antibody. *Bull. WHO.* 1973. 48:P. 535–41.
- Spearman C. The method of right and wrong case (constant stimuli) with Gauss formulae. *Br. J Psychol.* 1908. 2: 227.
- Smith J. S., Yager P. A., Baer G. C. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody. *Bull. WHO.* 1973. 48: P. 535–541.
- Zalan E., Wilson C., Pukitis. A. Microtest for quantitation of rabies virus. *J. Biol. Stand.,* 1979. 7: P. 213–220.
- Zienius D. Lietuvos Laukinių gyvūnų pasiutligė: Prevencijos priemonių efektyvumo kriterijai. *Veterinarija ir zootechnika.* 2007. 38: P. 84–90.
- Vanaga S., van der Heide R., Joffe R., Vander Poel WH., Ra-bies in wildlife in Latvia. *Vector Borne Zoonotic. Dis.* 2003. 3: P. 117–24.
- Webster L. T., Dawson J. R. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1935. 32:P. 570–3.

Gauta 2008 04 22

Priimta publikuoti 2008 06 02