



Бутырский А.Ю., Мухачева А.В., Мовсесянц А.А., Саркисян К.А.

Анализ результатов определения вируснейтрализующих антител в сыворотках крови лиц, привитых от бешенства

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва, Россия

Введение. Бешенство – инфекционное заболевание, характеризующееся 100% летальным исходом в случае развития у пациента клинической картины. Единственной возможностью предотвратить возникновение данного заболевания у людей является вакцинопрофилактика.

Цель работы – охарактеризовать уровень иммунного ответа у лиц, получивших курс лечебно-профилактической вакцинации против бешенства, рассмотреть роль факторов, которые могут влиять на формирование поствакцинального антирабического иммунитета.

Материал и методы. В лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России изучен уровень вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу бешенства в 48 сыворотках крови пациентов, получивших курс лечебно-профилактической вакцинации после повреждений, нанесённых больными или с подозрением на бешенство животными. Титр ВНА к вирусу бешенства в сыворотках крови привитых, определяемый в разведении не ниже, чем 1 : 64 (соответствует уровню ВНА не менее 0,5 МЕ/мл), при постановке реакции биологической нейтрализации на белых мышах, свидетельствует об эффективности проведённой вакцинопрофилактики.

Результаты и обсуждение. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии статистически значимых различий уровней ВНА в группах привитых, получивших полный и незавершённый (5 прививок) курс лечебно-профилактической вакцинации против бешенства. В зависимости от уровня ВНА все пациенты распределены на группы с условно низким, средним и высоким содержанием антител в сыворотках крови.

Заключение. Показано, что правильно проведённая вакцинация в большинстве случаев способствует формированию напряжённого иммунитета. Отсутствие защитного уровня ВНА требует дополнительного введения вакцины и анализа факторов, повлиявших на неэффективность вакцинации. В ряде случаев показано обязательное определение уровня ВНА после курса лечебно-профилактической вакцинации.

Ключевые слова: бешенство; вирус бешенства; вакцинопрофилактика; поствакцинальный антирабический иммунитет; вируснейтрализующие антитела к вирусу бешенства; вакцины для профилактики бешенства.

Для цитирования: Бутырский А.Ю., Мухачева А.В., Мовсесянц А.А., Саркисян К.А. Анализ результатов определения вируснейтрализующих антител в сыворотках крови лиц, привитых от бешенства. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(6):298-305. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-298-305>

Информация об авторах:

Бутырский А.Ю., <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X>Мухачева А.В., <https://orcid.org/0000-0003-0769-6867>Мовсесянц А.А., <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>Саркисян К.А., <https://orcid.org/0000-0003-0445-7086>

Для корреспонденции: Бутырский Алексей Юрьевич, ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва; <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X> . E-mail: Butirskiy@expmed.ru

Butirskiy A.Yu., Muhacheva A.V., Movsesyants A. A., Sarkisyan K.A.

Analysis of determination of rabies virus neutralizing antibody titres in the sera of vaccinated humans

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russia

Introduction. Rabies is an infectious disease that is always fatal following the onset of clinical symptoms. The only way to prevent the cases of rabies in humans is timely carried out the rabies post-exposure prophylaxis in accordance with the recommended schedule.

The aim of the study was to characterize the level of immune response in persons that received a post-exposure prophylaxis against rabies, to consider the role of the factors of the formation immune responses to rabies vaccines .

Material and methods. In the laboratory of viral vaccines of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, the 48 sera of patients that received the post-exposure prophylaxis of rabies after wounds from a rabid or suspected rabid animal has been studied. The titer of virus neutralizing antibodies (VNA) to the rabies virus in the sera of the vaccinated not less than 1:64 (corresponding to a level of VNA at least 0,5 IU /ml) in the mouse neutralization test indicates the effective vaccination.

Results and discussion. Our data confirm the absence of statistically significant differences in the level of VNA in the vaccinated persons that received a complete and incomplete (5 doses) course of post-exposure vaccination against rabies. Depending on the level of VNA, all patients are divided into groups with conditionally low, medium and high content of antibodies in sera.

Conclusion. It has been shown that in most cases properly administered vaccination contributed to the formation of effective immune response. The lack of a protective level of BHA requires additional administration of the vaccine and analysis of the factors that influenced the ineffectiveness of vaccination. In some patients the determination of rabies virus neutralizing antibody titres is necessary.

Keywords: rabies; rabies virus; vaccination; immune response to rabies virus; rabies virus neutralizing antibody; rabies vaccine.

For citation: Butirskiy A.Yu., Muhacheva A.V., Movsesyants, A.A., Sarkisyan K.A. Analysis of determination of rabies virus neutralizing antibody titres in the sera of vaccinated humans. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(6): 298-305. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-298-305>

For correspondence: Aleksey Yu. Butirskiy, leading expert of viral vaccines laboratory, Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, 127051, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X>. E-mail: Butirskiy@expmed.ru

Information about authors:

Butirskiy A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X>

Muhacheva A.V., <https://orcid.org/0000-0003-0769-6867>

Movsesyants A.A., <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Sarkisyan K.A., <https://orcid.org/0000-0003-0445-7086>

Acknowledgments. This work was conducted within the framework of the State assignment of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products No 056-00154-19-00 for conducting applied research (Agreement No AAAA-A18-118021590046-9).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 21 May 2019

Accepted 28 November 2019

Введение

Бешенство – это острая вирусная инфекция, вызываемая вирусом семейства *Rhabdoviridae* рода *Lyssavirus* и характеризующаяся симптомами поражения центральной нервной системы и абсолютной летальностью.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), бешенство занимает одно из первых мест среди инфекционных болезней, наносящих значительный экономический ущерб¹. Несмотря на меры, предпринимаемые для ограничения распространения бешенства и усиления мер профилактики, повсеместно ликвидировать заболевание не удаётся.

Среди зооантропонозных заболеваний, регистрируемых в Российской Федерации, бешенство животных занимает лидирующие позиции по числу ежегодно выявляемых неблагополучных пунктов. За последние 25 лет заболеваемость животных бешенством остаётся на стабильно высоком уровне и охватывает значительную часть территории РФ [1]. Учитывая ареал заболевания, охватывающий большую часть регионов страны, можно констатировать отсутствие реальной возможности добиться полного искоренения эпизоотии в ближайшей и среднеотдалённой перспективе [2].

Эпидемиологическая значимость бешенства для практического здравоохранения определяется в том числе отсутствием эффективных способов его лечения в случае появления клинических признаков болезни и, как следствие, абсолютной летальностью.

В Российской Федерации за многолетний период эпидемиологического наблюдения бешенство среди людей можно охарактеризовать как инфекцию с циклическими колебаниями с промежутками в 2–3 года. С начала 1970-х годов в стране ежегодно регистрируются от 2 до 22 случаев заболевания, с 2005 по 2017 г. от бешенства умерли 113 чело-

век. Следует отметить, что на протяжении последних 5 лет наблюдается тенденция к снижению показателей заболеваемости людей².

На сегодняшний день единственной возможностью предотвратить случаи заболевания бешенством у людей является своевременно назначенная и проведённая в соответствии с инструкцией по применению антирабических препаратов вакцинопрофилактика.

Ежегодно в Российской Федерации от нападения животных страдают порядка 400–450 тыс. человек, из них более половины нуждаются в назначении антирабического лечения [3, 4]. Вакцины для профилактики бешенства, зарегистрированные в Российской Федерации, и схемы их применения приведены в табл. 1.

Различают профилактическую (плановую, предэкспозиционную) и лечебно-профилактическую (экстренную, постэкспозиционную) вакцинацию против бешенства.

Профилактическую вакцинацию против бешенства назначают лицам, относящимся по роду профессиональной деятельности к группам риска в плане возможного контакта с вирусом бешенства (сотрудники лабораторий, работающие с уличным вирусом, ветеринарные работники, егеря, охотники, лесники, лица, выполняющие работы по отлову и содержанию животных, и иные профессиональные группы).

Лечебно-профилактическую вакцинацию назначают в максимально короткие сроки в случае контакта и укусов больными бешенством или с подозрением на бешенство теплокровными животными. Учитывая вариабельность инкубационного периода при бешенстве (от 7 сут до 1 года, в редких случаях – до 2–3 лет), особенностью экстренной вакцинопрофилактики бешенства является комбинированное назначение антирабической вакцины и антирабического иммуноглобулина в случае тяжёлых повреж-

¹ WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. WHO Technical Report Series, N 1012. WHO; 2018.

² Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году». <http://15.rospotrebnadzor.ru>

Вакцины для профилактики бешенства, зарегистрированные в Российской Федерации

Торговое наименование	Производитель	Краткая характеристика	Схема применения		Данные о дополнительном введении вакцины в случае отсутствия защитного уровня антител
			профилактическая	лечебно-профилактическая	
КОКАВ Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная	АО «НПО «Микроген» (Россия)	Содержит вакцинный штамм «Внуково-32» вируса бешенства, выращенный в первичной культуре клеток почек сирийских хомячков, инактивированный ультрафиолетовыми лучами, концентрированный и очищенный методом ультрафильтрации	Назначают 3 дозы: по одной в 0-е, 7-е, 30-е сутки. Первая ревакцинация – 1 доза через 1 год. Последующие ревакцинации – 1 доза каждые 3 года	Назначают 6 доз: по одной в 0-е, 3-и, 7-е, 14-е, 30-е и 90-е сутки (при III категории укусов – первую дозу вводят в комбинации с антирабическим иммуноглобулином)	Назначают 3 дозы: по одной в 0-е, 7-е и 30-е сутки
Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная сухая	ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Россия)	Содержит вакцинный штамм «Внуково-32» вируса бешенства, выращенный в первичной культуре клеток почек сирийских хомячков, инактивированный ультрафиолетовыми лучами и формалином, концентрированный методом ультрафильтрации с последующей очисткой методом гель-хроматографии	Назначают 3 дозы: по одной в 0-е, 7-е, 30-е сутки. Первая ревакцинация – 1 доза через 1 год. Последующие ревакцинации – 1 доза каждые 3 года	Назначают 6 доз: по одной в 0-е, 3-и, 7-е, 14-е, 30-е и 90-е сутки (при III категории укусов – первую дозу вводят в комбинации с антирабическим иммуноглобулином)	Назначают 3 дозы: по одной в 0-е, 7-е и 30-е сутки
Рабипур® (вакцина антирабическая культуральная очищенная инактивированная)	Кайрон Беринг Вакцинс Приват Лтд (Индия)	Содержит вакцинный штамм «Flury LEP» вируса бешенства, выращенный в первичной культуре клеток фибробластов куриных эмбрионов, инактивированный β-пропиолактоном, концентрированный и очищенный методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы	Назначают 3 дозы: по одной в 0-е, 7-е, 21-е или 28-е сутки. Первая ревакцинация – 1 доза через 1 год. Последующие ревакцинации – 1 доза каждые 5 лет. Если возможно, определяют уровень ВНА у пациентов для решения вопроса о назначении бустерной инъекции	Назначают 6 доз: по одной в 0-е, 3-и, 7-е, 14-е, 30-е и 90-е сутки (при III категории укусов – первую дозу вводят в комбинации с антирабическим иммуноглобулином)	В случае снижения защитного уровня ВНА после профилактической вакцинации назначают 1 дозу вакцины однократно. В случае отсутствия защитного уровня ВНА после лечебно-профилактической вакцинации назначают 3 дозы вакцины: по одной в 0-е, 7-е, 21-е или 28 суток

Примечание. ВНА – вируснейтрализующие антитела.

дений (III категория)³: любые ослюнения слизистых оболочек, любые укусы в области головы, пальцев конечностей, гениталий, одиночные или множественные глубокие, кровоточащие рваные раны, нанесённые домашними или сельскохозяйственными животными; любые повреждения, нанесённые дикими плотоядными животными, грызунами и летучими мышами. Назначение антирабического иммуноглобулина должно способствовать удлинению инкубационного периода до момента выработки организмом собственных антител в ответ на введение антирабической вакцины.

Несмотря на значительные достижения в изучении бешенства в последние десятилетия до сих пор не установлены закономерности в развитии и длительности поствакцинального антирабического иммунитета.

Материалы клинических исследований культуральных концентрированных инактивированных антирабических вакцин, приготовленных с использованием разных технологий, демонстрируют единую динамику антителообразования в ответ на введение вакцины [5]: первые антитела класса IgM появляются к 4-м суткам, к 7-м суткам в крови вакцинированных обнаруживаются антитела класса IgG, после чего их уровень постепенно нарастает, достигая максимальных значений к 28–42-м суткам, затем отмечается незначительное снижение антител. ВОЗ расценивает уровень вируснейтрализующих антител (ВНА) $\geq 0,5$ МЕ/мл (разведение 1 : 64 при постановке реакции нейтрализации на белых мышах) как защитный, свидетельствующий об эффективности проведённой вакцинации. В ряде исследований [6–9] было показано, что при назначении культуральных концентрированных антирабических вакцин к 14-м суткам наблюдается сероконверсия у 100% привитых, при этом уровень антител колеблется от 6,9 до 10,3 МЕ/мл в зависимо-

³Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата «КОКАВ Вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная».

сти от применяемой вакцины. Незначительное снижение уровня сероконверсии у 98,3–99,2% привитых исследователи регистрировали к 180-му дню после начала вакцинации.

В последние десятилетия проводятся исследования, направленные на установление факторов, влияющих на динамику антителообразования и длительность персистенции антирабических антител в организме привитых.

С.Е. Rupprecht и соавт. в своих исследованиях подтвердили роль генетического фактора в формировании поствакцинального антирабического иммунитета [10]. В частности, было установлено, что у лиц, имеющих группы В7 и DR2 антигенов гистосовместимости, иммунный ответ развивается быстрее и характеризуется более высоким уровнем ВНА, в то время как у пациентов, имеющих группу DR3 антигенов гистосовместимости, выработка антител начинается позднее, а сам уровень ВНА ниже, чем в группе сравнения.

В исследованиях роли возрастного фактора на уровень поствакцинального антирабического иммунитета было показано, что, несмотря на 100% уровень сероконверсии в опытных группах, уровень ВНА у лиц старше 50 лет несколько ниже, чем в группе пациентов от 11 до 25 лет [11, 12].

Вызывает интерес возможное влияние пола пациента на уровень иммунного ответа на вакцинацию против бешенства. Нам не удалось обнаружить в научной литературе ссылки на исследование этого вопроса для человеческой популяции. Однако в опытах на животных было показано, что иммунный ответ самок на вакцинацию против бешенства был достоверно выше, чем у самцов, получивших вакцинацию против бешенства по такой же схеме [13].

Исследования зарубежных авторов подтверждают, что при оценке эффективности антирабической вакцинации пристальное внимание надо обращать на пациентов, принимающих лекарственные препараты с выраженным иммуносупрессивным действием (глюкокортикостероиды, цитостатики и др.) и страдающих заболеваниями, которые сопровождаются угнетением функций иммунной системы [14, 15]. В работе D.J. Briggs и J.R. Schwenke [16] было показано, что у 88% добровольцев Корпуса мира, получивших антирабическую вакцину внутримышечно на фоне приёма хлорохина, спустя 1,5 года после профилактической вакцинации защитный уровень антител не определялся. При изучении поствакцинального иммунитета к вирусу бешенства у ВИЧ-инфицированных пациентов был продемонстрирован недостаточный уровень иммунного ответа на антирабическую вакцинацию у лиц с содержанием в сыворотке крови CD4⁺ в количестве менее 300/мм³ [17]. В исследовании также была показана целесообразность оценки напряжённости антирабического иммунитета у лиц, страдающих осложнёнными формами сахарного диабета [18].

Следует отметить, что результаты двух исследований [19, 20] свидетельствовали об адекватном иммунном ответе беременных женщин на вакцинацию при отсутствии нежелательных явлений на течение беременности.

До настоящего времени дискутируется вопрос о длительности эффективного иммунного ответа на вакцинацию. Изучение уровня ВНА в сыворотках крови лиц, получивших профилактическую вакцинацию, включающую три прививки, показало, что среднегеометрическое значение уровня антител спустя 1 год варьировало от 1,0 до 3,5 МЕ/мл, однако через 2 года отмечалось снижение защитного уровня у 15–20% привитых. В зарубежной литературе имеются сообщения об обнаружении ВНА в 80% сывороток крови, исследованных спустя 9 лет после первичной вакцинации [21]. Эти данные могут свидетельствовать о формировании механизмов иммунной памяти в ответ на введение антирабической вакцины.

Цель настоящей работы – охарактеризовать уровень иммунного ответа у лиц, получивших курс лечебно-профилактической вакцинации против бешенства, и рассмотреть роль факторов, которые могут влиять на формирование поствакцинального антирабического иммунитета.

Материал и методы

С целью исследования уровня антител к вирусу бешенства использовали 48 сывороток крови пациентов, получивших курс лечебно-профилактической вакцинации против бешенства отечественными вакцинами для профилактики бешенства. Сыворотки поступали на исследование в лабораторию вирусных вакцин ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России в 2016–2018 гг. Исследовали напряжённость антирабического иммунитета после окончания полного курса вакцинации (28 сывороток), сыворотки крови 17 пациентов исследовали после проведения пяти инъекций, сыворотки крови двух пациентов – после четырёх инъекций и сыворотку крови одного пациента – после одной инъекции. Сыворотки крови привитых доставляли на исследование не ранее, чем через 10 сут с момента получения последней дозы вакцины. При необходимости хранения до момента постановки анализа сыворотки однократно замораживали. В день исследования сыворотки крови прогревали при температуре 56 °С в течение 30 мин с целью исключения факторов, ингибирующих ход реакции биологической нейтрализации.

Для проведения реакции биологической нейтрализации использовали фиксированный вирус бешенства штамм CVS-24, хранящийся в рабочей коллекции лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России. Фиксированный вирус бешенства, применяемый для работы, соответствовал следующим требованиям: был типоспецифичен, стерилен (не содержал бактерий и грибов), имел инфекционную активность не менее 10^{-6,0} ЛД₅₀/0,03 мл при внутрицеребральном заражении беспородных белых мышей.

Исследование сывороток привитых против бешенства проводили методом биологической нейтрализации в соответствии с методикой, рекомендованной ВОЗ⁴. Для испытания использовали мышей с массой

⁴ Laboratory techniques in rabies. 4th edition. WHO; 1996.

Таблица 2

Результаты исследования уровня вируснейтрализующих антител в сыворотке крови привитых от бешенства, получивших полный курс лечебно-профилактической вакцинации

Сыворотка, №	Пациент	Пол	Возраст, годы	Титр сыворотки
1	С-а	Ж	29	1 : 91
2	Д-в	М	20	1 : 141
3	Л-в	М	48	1 : 182
4	Т-в	М	41	1 : 363
5	Т-а	Ж	39	1 : 512
6	Т-а	Ж	7	1 : 512
7	С-я	Ж	46	1 : 413
8	П-а	Ж	42	1 : 363
9	С-в*	М	54	1 : 166
10	О-а	Ж	26	1 : 355
11	Ш-о**	Ж	52	1 : 158
12	Л-н	М	41	1 : 162
13	Т-в	М	39	1 : 200
14	Л-а	Ж	9	1 : 105
15	К-а	Ж	27	1 : 512
16	Ш-о**	Ж	53	1 : 219
17	С-в*	М	55	1 : 275
18	Ш-о**	Ж	54	1 : 603
19	Н-о	Ж	37	1 : 912
20	С-в*	М	56	1 : 282
21	П-в	М	6	1 : 1024
22	Л-м	Ж	58	1 : 97
23	К-в	М	31	1 : 90
24	К-а	Ж	8	1 : 71
25	К-а	Ж	6	1 : 32
26	Х-а	Ж	23	1 : 232
27	Г-а	Ж	61	1 : 170
28	Ш-а	Ж	49	1 : 256

Примечание. */** – исследование сыворотки у одного и того пациента в разные сроки.

Таблица 3

Результаты исследования уровня вируснейтрализующих антител в сыворотке крови привитых от бешенства, получивших незавершённый курс лечебно-профилактической вакцинации

Сыворотка, №	Пациент	Пол	Возраст, годы	Количество прививок на момент исследования	Титр сыворотки
29	В-а	Ж	37	5	1 : 256
30	Т-в	М	36	5	1 : 324
31	З-в	М	32	5	1 : 118
32	Б-н	М	41	5	1 : 363
33	А-а	Ж	45	5	1 : 1024
34	П-а	Ж	28	5	1 : 234
35	О-а	Ж	11	5	1 : 16
36	С-н	М	34	4	1 : 512
37	А-н	М	12	5	1 : 90
38	А-а	М	16	5	1 : 97
39	А-а	Ж	18	5	1 : 140
40	А-а	Ж	37	5	1 : 72
41	С-а	Ж	69	5	1 : 25
42	С-в	М	45	1	1 : 16
43	Г-а	М	43	5	1 : 107
44	Л-я	Ж	60	4	1 : 84
45	Ф-а	Ж	11	5	1 : 178
46	Б-а	Ж	81	5	1 : 45
47	З-й	М	7	5	1 : 92
48	К-н	М	3	5	1 : 72

нокислот), отвечающему за индукцию гуморального иммунного ответа;

– не требует использования дорогостоящего оборудования и специфических реактивов;

– отличается простотой учёта результатов и даёт возможность точной количественной оценки уровня антителообразования в ответ на специфическую вакцинацию.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием программы Statistica (version 10). Нормальность распределения оценивали по критерию Шапиро–Уилка, статистическую значимость различий определяли по критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$.

Титр сыворотки (ВНА) рассчитывали методом Рида и Менча⁵.

Результаты

Результаты исследования выражали в виде величины разведения исследуемой сыворотки (титр), которая в смеси с фиксированным вирусом бешенства в рабочем разведении защищала 50% экспериментальных животных в опытной группе. Гибель мышей в первые 4 сут после заражения расценивали как неспецифическую и в расчётах не учитывали. В качестве нормативного (референс) значения использовали защитное разведение сыворотки 1 : 64 [22]. Результаты ис-

тела 11 ± 1 г (возраст 4 нед) без различия пола. Сохраняли животных и проводили манипуляции с ними в соответствии с требованиями ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур».

Разведения сывороток готовили в диапазоне 1 : 16 – 1 : 1024, используя двукратный шаг разведения. Фиксированный вирус бешенства использовали в рабочем разведении, содержащем 20–50 ЛД₅₀/0,03 мл. За животными наблюдали в течение 14 сут, ежедневно регистрируя гибель мышей с клиническими симптомами бешенства: взъерошенная шерсть, замедленные и/или круговые движения, дрожание, парез, параличи.

Выбор биологического метода исследования с использованием лабораторных животных обусловлен следующими особенностями:

– характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью. Методика позволяет определять наличие антител к определённому антигену вируса бешенства – гликопротеину (белок G, содержит 505 ами-

⁵ Методы лабораторных исследований по бешенству. 3-е изд. ВОЗ, 1975.

Таблица 4

Влияние гендерной принадлежности пациентов и полноты курса вакцинации на уровень вируснейтрализующих антител ($p < 0,05$)

Исследуемый фактор	Значение медианы (25–75%)	Критерий Шапиро–Уилка (W)	Гипотеза о нормальности распределения	Критерий Манна–Уитни (U)	Гипотеза о статистической значимости различий в сравниваемых группах
Пол	Ж – 1 : 170 (1 : 84 – 1 : 363)	0,80275 ($p = 0,00015$)	Отклонена	203,0000 ($p = 0,753465$)	Отсутствует
	М – 1 : 164 (1 : 102 – 1 : 344)	0,69889 ($p = 0,00016$)			
Полнота курса вакцинации	п – 1 : 191 (1 : 123 – 1 : 388)	0,81323 ($p = 0,00049$)	Отклонена	151,5000 ($p = 0,063079$)	Отсутствует
	н – 1 : 107 (1 : 72 – 1 : 256)	0,69195 ($p = 0,0004$)			

Примечание. Ж – женщины; М – мужчины; п – полный курс лечебно-профилактической вакцинации (6 прививок); н – незавершённый на момент исследования курс вакцинации (4 или 5 прививок).

следования учитывали в случае соответствия условий опыта критериям достоверности испытания:

1. При титровании вируса бешенства в рабочем разведении гибель животных в опытной группе, получившей рабочее разведение вируса, составила 100%.

2. Неспецифическая гибель животных в опытной группе при исследовании каждой сыворотки не превышала 1 мыши.

3. В рабочем разведении вируса, по результатам титрования, содержалось от 20 до 50 ЛД₅₀/0,03 мл. Если количество вируса превышало 50 ЛД₅₀/0,03 мл, но защитное разведение сыворотки равнялось референс-значению или превышало его, то результаты исследования считали валидными; если при превышении дозы вируса защитное разведение сыворотки было менее референс-значения, проводили повторное испытание сыворотки.

Результаты исследования приведены в табл. 2, 3.

Всего было исследовано 48 сывороток, полученных от 44 пациентов, из них 26 (59%) были привиты вакциной производства ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», 4 (9%) человека – вакциной производства АО «НПО «Микроген», у 5 (11%) человек курс проводился вакцинами разных производителей, в 9 (21%) случаях данные о производителе отсутствуют. При анализе медицинской документации установлено: 17 (39%) пациентов получили повреждение от животных с лабораторно установленным диагнозом бешенства, 7 (16%) – от диких животных с подозрением на бешенство, 20 (45%) – от домашних животных с подозрением на бешенство.

Как следует из данных табл. 2 (при анализе не учитывали сыворотки № 16, 17, 18, 20, которые проверяли у двух пациентов повторно с интервалами 1 год на протяжении 2 лет), защитный уровень антител определялся у 23 (95,8%) пациентов, а уровень антител ниже защитного (1 : 64) зарегистрирован у 1 (4,2%) человека. Среднее арифметическое значение уровня ВНА составило 1 : 297 (95% доверительный интервал 1 : 190 – 1 : 404), при этом минимальное значение было 1 : 32, а максимальное 1 : 1024. Уровень антител менее 1 : 190 условно расценивался как низкий, в пределах 1 : 191 – 1 : 404 – как средний, более 1 : 404 – как высокий. Таким образом, у 50% привитых определялся средний уровень антител, у 25% – низкий и у остальных 25% – высокий.

По результатам исследования 20 сывороток крови привитых, не закончивших предписанный курс вакцинации по тем или иным причинам, защитный уровень антител определялся у 16 (80%) пациентов, а уровень антител ниже защитного (1 : 64) зарегистрирован у 4 (20%) человек. При дальнейшей статистической обработке полученных данных результат по сыворотке крови № 42 (пациент получил одну инъекцию) не учитывали.

Среднее арифметическое значение уровня ВНА составило 1 : 203 (95% доверительный интервал 1 : 88 – 1 : 317), при этом минимальное значение было 1 : 16, а максимальное 1 : 1024. Уровень антител менее 1 : 88 условно расценивали как низкий, в пределах 1 : 89 – 1 : 317 – как средний, более 1 : 317 – как высокий. Таким образом, у 58% привитых определялся средний уровень антител, у 31% – низкий, у 11% – высокий.

У двух пациентов (1-й пациент – сыворотки № 9, 17, 20; 2-й пациент – сыворотки № 11, 16, 18) сыворотки исследовали трёхкратно с интервалом между получением сывороток 10–12 мес. У 1-го пациента защитный уровень антирабических антител составлял соответственно 1 : 166, 1 : 275, 1 : 282, при этом дополнительных введений вакцины в интервалы между исследованиями не было. Фактически, можно говорить о том, что уровень антител с момента вакцинации находился на одном уровне (в диапазоне разведения сыворотки 1 : 128 – 1 : 256). У 2-го пациента защитный уровень специфических антител определялся в разведениях 1 : 158; 1 : 219; 1 : 603, при этом за 1 мес до 3-го предоставления сыворотки пациенту была введена 1 доза вакцины.

Полученные результаты определения уровня ВНА были обработаны статистически для оценки возможного влияния гендерной принадлежности пациентов и полноты курса лечебно-профилактической вакцинации на величину уровня ВНА.

Данные, представленные в табл. 4, свидетельствуют о том, что статистически значимые различия в уровне ВНА у женщин и мужчин отсутствуют, а величина ВНА у лиц, получивших курс из 5 инъекций антирабической вакцины, и лиц с завершённым курсом вакцинации статистически не различается.

Обсуждение

Результаты исследования сывороток крови свидетельствуют о том, что у 89% привитых определяется защитный уровень ВНА после проведённого курса лечебно-профилактической вакцинации. Установлено, что у 58,5% лиц, получивших 5 или 6 прививок, уровни антител можно расценивать как средние и высокие.

У 11% привитых уровень ВНА был ниже рекомендованного. В одном случае (сыворотка крови № 25) пациентка 6 лет обратилась за медицинской помощью спустя 2 сут после укуса собаки с установленным диагнозом бешенства, получила полный курс вакцинации в соответствии с инструкцией по применению. При анализе медицинской документации нарушений в оказании антирабической помощи не установлено. Однако следует отметить, что сыворотка на исследование поступила спустя 3 мес после окончания курса вакцинопрофилактики. По результатам исследования было назначено дополнительное введение вакцины.

Среди лиц, не имеющих защитного уровня антител, один пациент (сыворотка № 42) получил одну прививку антирабической вакцины, после чего отказался от дальнейшего курса вакцинации. При анализе медицинской документации установлено, что пациенту была начата антирабическая вакцинация в связи с проведением противоэпидемических мероприятий в очаге бешенства, при этом повреждения (ослушение, укусы, царапины), нанесённые больным животным, отсутствовали. Предполагаемый контакт был отнесён нами к I категории повреждений, предусмотренной инструкцией по применению, что не требовало назначения полного курса вакцинопрофилактики против бешенства.

В одном случае (сыворотка № 35) пациентка 11 лет обратилась в медицинское учреждение в день получения повреждения – укушенной раны II пальца правой руки, нанесённой хомяком, павшим на следующий день. Пациентке был назначен курс комбинированной вакцинопрофилактики бешенства. При анализе медицинской документации установлено, что в момент оказания антирабической помощи нарушена последовательность введения антирабических препаратов: сначала была введена вакцина и спустя некоторое время антирабический иммуноглобулин. Указанная ситуация была оценена нами как нарушение инструкции по применению препаратов для профилактики бешенства, что могло повлечь неэффективность проведённого курса вакцинопрофилактики. По результатам исследования было назначено дополнительное введение вакцины.

Ещё в одном случае (сыворотка № 41) на исследование поступила сыворотка крови от пациентки 69 лет, привитой в связи с проведением противоэпидемических мероприятий в очаге бешенства. Нарушений при оказании антирабической помощи на этапе обращения в медицинское учреждение не установлено, однако факт незавершения полного курса вакцинации на момент обращения был расценен нами как нарушение инструкции, и пациентке было рекомендовано повторное исследование после введения 6-й дозы

вакцины. Повторно сыворотка крови на исследование не поступала.

Анализ медицинской документации, поступившей с образцами сыворотки крови № 46, показал, что лечебно-профилактическая вакцинация была назначена пациентке 81 года в связи с обширными укушенными ранами обеих кистей, нанесённых собакой с установленным диагнозом бешенства. Первые пять прививок курса были проведены в сроки, регламентированные инструкцией по применению. После 5-й прививки сыворотка поступила на исследование, по результатам которого уровень ВНА был ниже регламентированного уровня. Факт незавершения полного курса вакцинации на момент обращения был расценен как нарушение инструкции по применению, и пациентке было рекомендовано повторное исследование после введения 6-й дозы вакцины. Повторно сыворотка крови на исследование не поступала.

Обращает на себя внимание тот факт, что в двух случаях отсутствие защитного уровня антител зарегистрировано у лиц детского возраста и в одном случае у лица старческого возраста, по классификации ВОЗ. Однако установление окончательного вывода невозможно в связи с небольшим количеством пациентов указанных возрастов в нашей выборке. В дальнейшем целесообразно продолжить изучение влияния возраста пациента на уровень антителобразования после курса вакцинопрофилактики против бешенства.

При оценке причин отсутствия защитного уровня ВНА необходимо учитывать условия оказания антирабической помощи. Необходимым условием выработки поствакцинального иммунитета является точное соблюдение требований инструкции по применению антирабических препаратов. Проведённый нами анализ карт пациентов, обратившихся за антирабической помощью (форма № 045/у), свидетельствует о том, что в 15% случаев были нарушения при оказании антирабической помощи: со стороны медицинских работников – неправильная оценка категории полученных повреждений, нарушение последовательности введения антирабических препаратов, несоблюдение интервалов введения доз вакцины, неправильный выбор места инъекции; со стороны пациентов – несвоевременное начало вакцинации, преждевременное прекращение курса вакцинации и др.

Результаты зарубежных исследований⁶, свидетельствуют, что базовый уровень поствакцинальных ВНА формируется на 28–42-е сутки, а назначение 6-й инъекции не вызывает статистически значимого подъёма уровня специфических антител. Полученные нами данные не противоречат данным зарубежных учёных: нам не удалось обнаружить статистически значимых различий в группах привитых, получивших полный и незавершённый курс лечебно-профилактической вакцинации против бешенства. Однако окончательно

⁶Immunological basis for immunization series. Module 17: Rabies. WHO, 2017

ные выводы делать преждевременно, необходимо изучение большего количества сывороток крови.

Заключение

Оценка уровня напряжённости поствакцинального антирабического иммунитета имеет важное диагностическое значение.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что неукоснительное соблюдение требований инструкции по применению антирабических препаратов в большинстве случаев является гарантией эффективности проведённого курса вакцинации. Даже условно низкий рекомендованный уровень ВНА предупреждал развитие клинической картины бешенства у пациентов, получивших повреждения от животных с установленным диагнозом бешенства.

Единичные случаи отсутствия защитного уровня антител должны быть предметом анализа для лечащего врача с целью установления возможных причин, влияющих на иммунный ответ, и их исключения на период вакцинации против бешенства.

Определение уровня ВНА к вирусу бешенства в первую очередь показано для оценки эффективности лечебно-профилактической вакцинации у привитых с нарушениями инструкции по применению антирабических препаратов; у лиц с заболеваниями иммунной системы (первичные иммунодефициты, ВИЧ-инфекция, онкологические заболевания) или получивших курс вакцинации на фоне приёма лекарственных препаратов с иммуносупрессивным действием (глюкокортикостероиды, цитостатики и т.п.).

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учёта НИР АААА-А18-118021590046-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 5-21 см. REFERENCES)

1. Шабейкин А.А., Зайкова О.Н., Гулюкин А.М. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации за период с 1991 по 2015 годы. *Ветеринария Кубани*. 2016; (4): 4-6.
2. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Хисматуллина Н.А., Цареградский П.Ю., Паршикова А.В., Роб ван Герwijen. Обзор эпизоотической ситуации бешенства, сложившейся в Российской Федерации в 2014 году. *Ветеринария и кормление*. 2015; (2): 19-23.
3. Мовсесянц А.А., Олефир Ю.В. Современные проблемы вакцинопрофилактики бешенства. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019; 19(1): 10-6. Doi: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-10-16>
4. Никифоров В.В., Авдеева М.Г. Бешенство. Актуальные вопросы. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22(6): 295-305. Doi: <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-6-295-305>
22. Селимов М.А. *Бешенство*. М.: Медицина; 1978.

REFERENCES

1. Shabaykin A.A., Zaykova O.N., Gulyukin A.M. Overview of the epizootic situation in the Russian Federation from 1991 to 2015. *Veterinariya Kubani*. 2016; (4): 4-6. (in Russian)
2. Shabaykin A.A., Gulyukin A.M., Khismatullina N.A., Tsaregradskiy P.Yu., Parshikova A.V., Rob van Herwijen. Overview of the epizootic situation of rabies in the Russian Federation in 2014. *Veterinariya i kormlenie*. 2015; (2): 19-23. (in Russian)
3. Movsesyants A.A., Olefir Yu.V. Current challenges of preventive vaccination against rabies. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2019; 19(1): 10-6. Doi: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-10-16> (in Russian)

4. Nikiforov V.V., Avdeeva M.G. Rabies. Actual issues. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni*. 2017; 22(6): 295-305. Doi: <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-6-295-305> (in Russian)
5. Johnson N., Cunningham A.F., Fooks A.R. The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine*. 2010; 28(23): 3896-901. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.039>
6. Jones R.L., Froeschle J.E., Atmar R.L., Matthews J.S., Sanders R., Pardalos J., et al. Imminogenicity, safety and lot consistency in adults of a chromatographically purified Vero-cell rabies vaccine: a randomized, double-blind trial with diploid cell rabies vaccine. *Vaccine*. 2001; 19(32):4635-43. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00238-9](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00238-9)
7. Briggs D.J., Dreesen D.W., Nicolay U., Chin J.E., Davis R., Gordon C., et al. Purified chick embryocell culture rabies vaccine: interchangeability with human diploid cell culture rabies vaccine and comparison of one- versus two-dose post-exposure booster regimen for previously immunized persons. *Vaccine*. 2000; 19(9-10): 1055-60. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00342-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00342-x)
8. Wiktor T.J., Plotkin S.A., Grella D.W. Human cell culture rabies vaccine: antibody response in man. *JAMA*. 1973; 224(8): 1170-1.
9. Bernard K.W., Roberts M.A., Sumner J., Winkler W.G., Mallonee J., Baer G.M., et al. Human diploid cell rabies vaccine: effectiveness of immunization with small intradermal or subcutaneous doses. *JAMA*. 1982; 247(8): 1138-42. Doi: <https://doi.org/10.1001/jama.247.8.1138>
10. Rupprecht C.E., Nagarajan T., Ertl H. Rabies vaccines. In: Plotkin S.A., Orenstein W., Offit P.A., Edwards K.M., eds. *Vaccines*. Philadelphia: Elsevier; 2017.
11. Mastroeni L., Vescia N., Pompa M.G., Cattaruzza M.S., Marini G.P., Fara G.M. Immune response of the elderly to rabies vaccines. *Vaccine*. 1994; 12(6): 518-20. Doi: [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(94\)90310-7](https://doi.org/10.1016/0264-410x(94)90310-7)
12. Leder K., Weller P.F., Wilson M.E. Travel vaccines and elderly persons: review of vaccines available in the United States. *Clin. Infect. Dis*. 2001; 33(9): 1553-66. Doi: <https://doi.org/10.1086/322968>
13. Mansfield K.L., Burr P.D., Snodgrass D.R., Sayers R., Fooks A.R. Factors affecting the serological response of dogs and cats to rabies vaccination. *Vet. Rec*. 2004; 154(14): 423-6. Doi: <https://doi.org/10.1136/vr.154.14.423>
14. Rotivel Y., Weber P., Goudal M. Post-exposure treatment of patients with impaired or suboptimal immunity. In: Dodet B., Meslin F.X., eds. *Rabies Control in Asia. Proceedings of the Fourth International Symposium, Hanoi, Viet Nam*. Paris: John Libbey Eurotext; 2001: 61-5.
15. Thisyakorn U., Pancharoen C., Wilde H. Immunologic and virologic evaluation of HIV-1-infected children after rabies vaccination. *Vaccine*. 2001; 19(11-12): 1534-7. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00322-4](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00322-4)
16. Briggs D.J., Schwenke J.R. Longevity of rabies antibody titre in recipients of human diploid cell rabies vaccine. *Vaccine*. 1992; 10(2): 125-9. Doi: [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(92\)90029-j](https://doi.org/10.1016/0264-410x(92)90029-j)
17. Jaijaroensup W., Tantawichien T., Khawplod P., Tepsumethanon S., Wilde H. Postexposure rabies vaccination in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis*. 1999; 28(4): 913-4. Doi: <https://doi.org/10.1086/517241>
18. Deshmukh R.A., Yemul V.L. Fatal rabies encephalitis despite post-exposure vaccination in a diabetic patient: a need for use of rabies immune globulin in all post-exposure cases. *J. Assoc. Physicians India*. 1999; 47(5): 546-7.
19. Abazeed M.E., Cinti S. Rabies prophylaxis for pregnant women [letter]. *Emerg. Infect. Dis*. 2007; 13(12): 1966-7. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid1312.070157>
20. Sudarshan M.K., Madhusudana S.N., Mahendra B.J. Post-exposure prophylaxis with purified Vero cell rabies vaccine during pregnancy: safety and immunogenicity. *J. Commun. Dis*. 1999; 31(4): 229-36.
21. Mansfield K.L., Andrews N., Goharriz H., Goddard T., McElhinney L.M., Brown K.E., et al. Rabies pre-exposure prophylaxis elicits long-lasting immunity in humans. *Vaccine*. 2016; 34(48): 5959-67. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.058>
22. Selimov M.A. *Rabies [Beshenstvo]*. Moscow: Meditsina; 1978. (in Russian)

Поступила 21.05.19

Принята в печать 28.11.19