УДК 616.98:578.824.11:606:604 https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-76-84 СПЕЦИАЛЬНОСТЬ Клиническая лабораторная диагностика Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)



Методы *in vitro* для выявления вируса бешенства и оценка их использования в производстве антирабического иммуноглобулина

Ю. К. Гаврилова^{1,*}, С. В. Генералов¹, Е. Г. Абрамова^{1,2}, А. К. Никифоров^{1,2}

- 1 Федеральное казенное учреждение здравоохранения
- «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Университетская, д. 46, Саратов, 410005, Российская Федерация
- 2 Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н. И. Вавилова»,

Театральная пл., 1, Саратов, 410012, Российская Федерация

Применение современных высокочувствительных методов исследования биологического материала с целью выявления вируса бешенства и антирабических антител актуально не только для диагностики данного заболевания и области экспериментальных исследований, но и для производства антирабических лекарственных препаратов, применяемых для постэкспозиционной профилактики бешенства. Цель работы — анализ существующих в настоящее время методов детекции вируса бешенства и антирабических антител с последующей оценкой возможности применения указанных методов на контрольных этапах производства препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. Поиск современных высокочувствительных методов контроля *in vitro*, способных конкурировать с биологическим методом — основным методом контроля свойств препарата антирабического иммуноглобулина, является важным аспектом совершенствования технологии производства и повышения качества препарата для профилактики бешенства. В ходе аналитического исследования было выявлено, что в условиях производства антирабического иммуноглобулина в качестве самостоятельных методов, а также в виде альтернативы применяемому в производстве биологическому методу на белых мышах возможно применение метода флуоресцирующих антител, иммуноферментного анализа, методов с применением клеточных культур, атомно-силовой микроскопии, проточной цитометрии. Выбор в пользу указанных методов исследования был обусловлен высокой степенью их чувствительности, специфичностью, скоростью постановки, экономичностью, простотой исполнения и автоматизированным процессом учета результатов.

Ключевые слова: вирус бешенства; методы *in vitro*; ИФА; FAVN-тест; RFFIT; клеточная культура; антирабический иммуноглобулин

Для цитирования: Гаврилова ЮК, Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Никифоров АК. Методы *in vitro* для выявления вируса бешенства и оценка их использования в производстве антирабического иммуноглобулина. *БИОпрепараты*. *Профилактика*, диагностика, лечение. 2021;21(2):76–84. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-76-84 * Контактное лицо: Гаврилова Юлия Кирилловна; ylia-93@list.ru

In vitro methods for rabies virus detection, and evaluation of their use in the production of rabies immunoglobulin

Yu. K. Gavrilova^{1,*}, S. V. Generalov¹, E. G. Abramova^{1,2}, A. K. Nikiforov^{1,2}

¹ Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe" of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russian Federation

² Saratov State Vavilov Agrarian University,

1 Teatralnaya Sq., Saratov 410012, Russian Federation

Current highly sensitive methods for rabies virus and rabies antibodies detection in biological material can be used not only for diagnosis and experimental research, but also for the production of antirabies medicines used for postexposure prophylaxis. The aim of the study was to analyse existing methods for rabies virus and rabies antibodies detection and to assess the potential for using these methods at the control stages during production of heterologous antirabies immunoglobulin obtained from equine serum. The search for cutting-edge highly sensitive *in vitro* control methods that could compete with the biological method, which is the main method used in antirabies immunoglobulin control, is an important prerequisite for improvement of the production technology and the quality of antirabies medicines. The study demonstrated that the following test methods can be used in the production of antirabies immunoglobulin: fluorescent antibody technique, enzyme-linked immunosorbent assay, cell culture methods, atomic force microscopy, and flow cytometry. These methods could be used alone or as an alternative to the biological method in white mice. These methods were chosen because of their high sensitivity, specificity, rapid and easy implementation, cost-effectiveness, and automatic recording of test results.

Key words: rabies virus; *in vitro* methods; ELISA; FAVN test; RFFIT; cell culture; antirabies immunoglobulin

For citation: Gavrilova YuK, Generalov SV, Abramova EG, Nikiforov AK. *In vitro* methods for rabies virus detection, and evaluation of their use in the production of rabies immunoglobulin. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2021;21(2):76–84. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-76-84

*Corresponding author: Yuliya K. Gavrilova; ylia-93@list.ru

Препарат антирабического иммуноглобулина (АИГ) предназначен для экстренной специфической профилактики бешенства у людей, входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. Согласно единой во всем мире схеме профилактики бешенства у людей введение данного препарата назначают перед началом антирабической вакцинации в случае получения укусов или множественных повреждений вследствие контакта с потенциально инфицированным бешенством животным 1. Единственным производителем препарата АИГ на территории России является ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. С 2004 г. на базе данного учреждения налажен серийный выпуск препарата гетерологичного АИГ из сыворотки крови лошади [1]. На сегодняшний день общий объем выпускаемого ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора лекарственного средства АИГ составляет около 400 л в год, что удовлетворяет ежегодную потребность населения Российской Федерации в данном препарате на 80% [2].

Процесс производства препарата состоит из ряда этапов, часть которых связана с работой с фиксированным вирусом бешенства (ВБ). Качество их выполнения контролируют биологическими методами с применением лабораторных белых мышей². Контролируемыми параметрами при этом являются активность и специфичность используемого штамма ВБ, полнота инактивации антигенного материала, специфическая активность иммунных лошадиных сывороток и готового препарата АИГ

Для выявления ВБ биологическая проба на белых мышах впервые была применена в 1935 г. L.T. Webster и J. R. Dawson³. Выбор исследователей в пользу методов *in vivo* основан на высокой степени их чувствительности, достоверности и надежности. Однако их выполнение требует использования большого количества животных, длительного времени получения результатов [3, 4]. Более того, эксперты Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) призывают к отказу от исследований с применением животных⁴. Указанные обстоятельства ставят перед исследователями задачу поиска альтернативного решения среди современных методов *in vitro*.

В России методы *in vitro* к настоящему времени нашли применение при диагностическом исследовании материала на содержание ВБ. Согласно ГОСТ 26075–2013⁵ для диагностики материала применяют метод размножения вируса на чувствительной культуре клеток с последующим окрашиванием флуоресцирующими антителами, иммуноферментный анализ, реакцию диффузной преципитации, полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Применение методов выявления ВБ и антирабических антител *in vitro* на различных этапах производства АИГ в настоящее время остается перспективной задачей для исследования.

Цель работы — анализ существующих в настоящее время методов детекции ВБ и антирабических антител с последующей оценкой возможности применения указанных методов на контрольных этапах производства препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади.

Методы исследования, основанные на выявлении антигенов вируса бешенства и антирабических антител

Гистологическое исследование

Гистологическое исследование материала на содержание ВБ включает окрашивание мазков-отпечатков мозговой ткани с последующим выявлением методом световой микроскопии характерных специфических включений — телец Бабеша-Негри. Включения представляют собой структуры, состоящие из фосфопротеинов и нуклеопротеинов, и принимают активное участие в процессе транскрипции вирусного генома и репликации вирусных частиц [5]. Открытие специфических включений А. Negri в 1903 г. 6 и последующее подтверждение их важной роли в диагностике бешенства L. Negri-Luzzani в 1913 г. 7 послужили началом долгого пути формирования комплекса диагностических методов лабораторного обнаружения вируса бешенства. Наличие в опытных образцах четко очерченных овальных или продолговатых гранулированных включений характерного розово-красного цвета считают абсолютным диагностическим признаком заболевания, вызываемого ВБ. В то же время большинство штаммов фиксированного ВБ не образуют тельца Бабеша-Негри, данное обстоятельство ограничивает применение гистологических исследований в производстве АИГ.

Иммуногистохимический экспресс-тест

Иммуногистохимический экспресс-тест, разработанный центром по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) и применяемый при гистологических исследованиях, обладает большей чувствительностью по сравнению с методом обнаружения телец Бабеша-Негри [6]. Метод основан на обнаружении нуклеопротеина ВБ в материале с помощью конъюгата биотинилированных моноклональных антител к нуклеопротеину ВБ, комплекса стрептавидин-пероксидазы и хромогенного субстрата. Результаты анализа, проведенного при помощи данного теста, учитывают с помощью световой микроскопии. Данная модификация имеет те же преимущества. что и традиционный гистохимический анализ: быстрое получение результата (в течение 1 ч), экономичность, отсутствие необходимости в приобретении сложного дорогостоящего оборудования. К дополнительным возможностям модифицированного иммуногистохимического теста следует отнести высокую чувствительность и специфичность, которые неоднократно показаны в сравнении с методами, основанными на применении флуоресцирующих антител [7], а также возможность исследования образцов, длительно хранившихся в глицерине или в замороженном состоянии. Существенным недостатком теста является ограниченность выпуска наборов реагентов, используемых для его постановки и одобренных ВОЗ. В настоящее время заказ диагностических наборов возможен исключительно через сотрудничество с CDC [8]. Следует отметить, что гистологические исследования непосредственно не связаны с обнаружением цельных вирионов. Для визуализации последних единственным возможным методом является электронная микроскопия [9].

¹ Бешенство в Российской Федерации. Информационно-аналитический бюллетень. Омск; 2019.

² Фармакопейная статья 3.3.1.0038.15 Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ Webster LT, Dawson JR. Early diagnosis of rabies by mouse inoculation. Measurement of humoral immunity to rabies by mouse protection test. Exp Biol Med. 1935;32(4):570–3.

⁴ WHO Expert Committee on biological standardization. WHO Technical Report Series No. 1024 (17th report); 2020.

⁵ ГОСТ 26075-2013. Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства.

⁶ Negri A. Contributo allow studio dell'eziologia della rabbia. Boll Soc Med-Chir Pavia. 1903;2:88-115.

⁷ Negri-Luzzani L. Le diagnostic de la rage par la demonstration du parasite specifique. Resultats de dix ans d'expkriences. Ann Inst Pasteur. 1913;27:1039–64.

Электронная микроскопия

Метод электронной микроскопии позволяет получать данные относительно размеров, формы вирусов, их расположения в клетке, а также внутриклеточных изменений, возникающих в результате инфицирования вирусом. Электронная микроскопия позволяет работать с неидентифицированным материалом, а имеющиеся комплексные подходы по очистке и концентрированию вируссодержащих суспензий [10] открывают возможность применения метода не только для фундаментальных исследований, но и для производственных задач [11]. В качестве основных факторов, ограничивающих активное применение электронной микроскопии на контрольных этапах производства АИГ, следует указать высокую стоимость оборудования и необходимость в специализированном помещении для работы с электронным микроскопом.

Метод флуоресцирующих антител

Метод флуоресцирующих антител (МФА) применяют для обнаружения вируса в материале с помощью меченных флуоресцентными красителями антител к цельному вирусу или его белкам. Образующиеся в результате взаимодействия вирусного антигена с антирабическими антителами специфически флуоресцирующие комплексы детектируют при помощи люминесцентной микроскопии. В России при исследовании материала на содержание ВБ методом флуоресцирующих антител применяют специфические поликлональные флуоресцирующие антирабические антитела производства ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань), ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) и ФГБНУ ВНИТИБП (г. Шелково). К наиболее распространенным красителям, применяемым для флуоресцентного мечения антител, принадлежит флуоресцеинизотиоцианат. Он довольно легко конъюгируется с антителами, что делает его особенно привлекательным для исследователей, сталкивающихся с необходимостью самостоятельного получения диагностических конъюгатов. В литературе имеются данные о возможности повышения показателя специфичности при исследовании материала МФА с использованием флуоресцирующих моноклональных антител к нуклеопротеину ВБ [12]. Исследование МФА в среднем занимает не более 6 ч, метод обладает высокой степенью чувствительности, порог которой составляет около 3,8 lg ЛД_{сл}/мл, и специфичности. В производстве АИГ МФА может быть применен для подтверждения бешенства у лабораторных животных на этапах приготовления рабического антигена, а также при контроле специфической активности АИГ.

Другим аспектом применения флуоресцирующих антител является анализ клеточных культур, инфицированных ВБ. Данный метод позволяет осуществлять контроль репродукции ВБ в клеточных культурах, например, при разработке и производстве культуральных вакцин [13], а также в исследованиях по получению культурального антигена, предназначенного для гипериммунизации продуцентов антирабической сыворотки.

В экспериментальных исследованиях выявление ВБ осуществляют на клеточных линиях ВНК (клетки почки сирийского хомячка), А-72 (клетки фибросаркомы собаки), ПС (клетки почки сайги), Vero (клетки почки африканской зеленой мартышки), МDВК (клетки почки быка) и др. В диагностических исследованиях применение клеточных линий мышиной нейробластомы (ССL-131) и невриномы Гассерова узла крысы

(НГУК-1) являются альтернативной заменой постановке биопробы на белых мышах [14]. В производстве антирабических препаратов клеточные культуры используют для накопления ВБ, оценки полноты инактивации вируса, контроля иммуногенности антирабических вакцин и специфической активности АИГ⁸. Применение клеточных культур на этапах производства антирабических препаратов открывает перспективы сокращения числа лабораторных животных, задействованных в контрольных методах исследования. Проведение исследований на клеточных культурах является актуальным и для производства гетерологичного АИГ при контроле специфической активности антирабических сывороток и готового препарата иммуноглобулина.

Исследование вируснейтрализующей активности: RFFIT и FAVN-тесты

Культуры восприимчивых к ВБ клеток также нашли применение при определении вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и антител. К наиболее распространенным методам следует отнести RFFIT (rapid fluorescent focus inhibition test) и FAVN-тест (fluorescent antibody virus neutralization test), суть которых заключается в осуществлении реакции нейтрализации (РН) ВБ на чувствительной клеточной культуре [15, 16]. Одним из главных отличий FAVN-теста от RFFIT является применение 96-луночных культуральных микропланшетов вместо 8-луночных слайд-камер, что позволяет увеличить количество исследуемых образцов при условии сохранения времени постановки теста. На основании результатов проведенных исследований установлено, что методы с применением клеточных культур обладают высокой степенью корреляции с методом нейтрализации ВБ на белых мышах [17]. При исследовании уровня вируснейтрализующих антител методами FAVN и RFFIT рекомендовано использование клеточной линии ВНК-21 и штамма вируса бешенства CVS-11. Существуют модификации этих методов, отличающиеся используемыми клеточной культурой и штаммом вируса [14, 18, 19]. С позиции повышения мер биобезопасности актуальными представляются модификации указанных методов, предполагающие использование непатогенных штаммов ВБ или близкородственных вирусов, например вируса везикулярного стоматита [20]. Другим аспектом совершенствования методов FAVN и RFFIT является применение генно-модифицированных штаммов ВБ, продуцирующих флуоресцирующий белок [21]. Такой подход позволяет исключить этап окрашивания клеточной культуры и сократить время исследования при условии сохранения надежности анализа in vitro.

Методы FAVN и RFFIT успешно применяют за рубежом для контроля антирабических препаратов⁹. В России эти методы используют для оценки уровня содержания антител у вакцинированных животных в аккредитованных ветеринарных лабораториях. Разработка и внедрение подобных методов в производство антирабических препаратов в настоящее время являются актуальными вопросами, требующими дополнительного изучения [22]. В ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора разработана модификация FAVN-теста с использованием штамма Москва 3253_{уего} ВБ и клеточной линии Vero с целью дальнейшего применения в производстве гетерологичного АИГ при определении показателя специфической активности иммунных сывороток и готового препарата иммуноглобулина [23].

Rabies immune globulin, USP41-NF36: 2019.

Brazilian Pharmacopeia 6th ed.; 2019.

⁸ Annex 2. Recommendations for inactivated rabies vaccine for human use produced in cell substrates and embryonated eggs. WHO; 2005.

⁹ 01/2015:0723 Human rabies immunoglobulin. European Pharmacopoeia 10th ed.; 2020.

Метод проточной цитометрии

Результат исследования инфицированных ВБ клеточных культур с использованием флуоресцентной микроскопии в значительной степени зависит от человеческого фактора, в особенности при анализе большого числа проб. Проведение исследований методами с автоматическим учетом флуоресценции в значительной степени увеличивает точность анализа. Одним из таких методов является проточная цитометрия. Благодаря возможности анализа интенсивности флуоресценции каждой отдельной клетки в популяции инфицированной клеточной культуры, указанный метод нашел применение для обнаружения различных вирусов [24], в том числе ВБ и его белков [25, 26]. Разработаны подходы определения данным методом уровня защитных антител в сыворотках крови животных [27]. В собственных исследованиях также была показана эффективность применения проточной цитометрии для оценки специфической активности АИГ [28].

Метод образования бляшек

Анализ субстанций, содержащих ВБ, на клеточных культурах возможен и без использования флуоресцентных тестсистем. К таким методам следует отнести метод образования бляшек, основанный на образовании погибших под влиянием вируса клеток в монослойных культурах, залитых агаром. При больших разведениях вируса, исключающих множественное инфицирование клеток или слияние групп зараженных клеток, каждая бляшка соответствует вирусной частице, содержащейся в исходной жидкости. Данный способ позволяет оценить количество вируса в бляшкообразующих единицах (БОЕ)¹⁰. Указанный метод не нашел широкого практического применения в силу своих недостатков — длительности и трудоемкости, в особенности при анализе материала с высоким содержанием вируса¹¹. Применение метода бляшек также ограничено способностью штамма ВБ оказывать цитопатическое действие на клеточную культуру, проявляющееся в деструктивных изменениях отдельных клеток или всего клеточного монослоя, наблюдаемых с применением световой микроскопии.

Метод определения цитопатического действия

Активность ВБ, а также антирабических сывороток определяют и по цитопатическому действию. Учет результата при этом составляет от 5 до 7 сут. Следует отметить, что чувствительность метода определения активности вируса по его цитопатическому действию обычно ниже, чем у других методов, в том числе метода образования бляшек [29]. Более того, к концу срока наблюдения происходит отмирание клеток, в том числе неинфицированных, что затрудняет учет результатов.

Метод атомно-силовой микроскопии

Повысить чувствительность обнаружения деструктивного воздействия вируса на клеточную культуру возможно за счет использования метода атомно-силовой микроскопии, который позволяет исследовать наноразмерную структуру различных поверхностей, в том числе биологических объектов. В экспериментах с применением атомно-силовой микроскопии было показано увеличение шероховатости поверхности клеток перевиваемых линий Vero в результате воздействия на них ВБ [30]. В этой связи применение атомно-силовой микроскопии перспективно и для контроля полноты инактивации вируссодержащих субстанций, а также при определении активности антирабических сывороток и иммуноглобулина [31].

Необходимо отметить, что представленные выше методические подходы к определению активности ВБ и уровню содержания антирабических антител предполагают использование живого вируса. Исключение возможности работы с патогенным биологическим агентом, например при определении антигенной активности инактивированной субстанции, создает предпосылки разработки и внедрения соответствующих методов *in vitro*.

Реакция диффузионной преципитации

Классическим методом для прямого обнаружения антигенов ВБ является реакция диффузионной преципитации (РДП) [32]. Этот методический прием основан на образовании линии преципитации в агаровом слое вследствие взаимодействия вирусного антигена со специфическим антителом. В России для проведения диагностических исследований материала на ВБ в РДП применяют Набор компонентов для диагностики бешенства животных в реакции диффузной преципитации производства ФГБНУ ВНИТИБП (г. Шелково). Детекция ВБ при постановке РДП возможна при условии присутствия в образце вируса в концентрации не менее 4,5 lg ЛД₅₀/мл, что указывает на достаточно низкую чувствительность метода по сравнению с биологической пробой на белых мышах [33]. Указанное обстоятельство затрудняет использование РДП при контроле этапов производства препарата АИГ, несмотря на экономичность, скорость и простоту исполнения.

Иммуноэлектрофорез

Более совершенным методом анализа по сравнению с РДП является иммуноэлектрофорез, использование которого по-казано при исследовании активности антирабических сывороток. Согласно экспериментальным данным, при сравнении результатов данного теста и реакции нейтрализации на мышах коэффициент корреляции составил 79,7% [34]. Успешное применение иммуноэлектрофореза было показано при оценке содержания гликопротеина ВБ в вакцинах [35]. Данные обстоятельства указывают на возможность применения иммуноэлектрофореза для оценки эффективности гипериммунизации продуцентов антирабических сывороток, а также качества антигенного материала, вводимого продуцентам.

Серологические методы

Применение в производстве гетерологичного АИГ таких классических серологических методов, как реакция гемагглютинации (РГА), реакция связывания комплемента (РСК), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), имеет ограничения вследствие ряда факторов.

Несмотря на такие преимущества РГА и РНГА, как возможность получения результатов в короткие сроки и простоту выполнения, методы характеризуются более низкой степенью чувствительности по сравнению с твердофазным иммуноферментным анализом (ИФА) [36]. К недостаткам РНГА следует отнести и использование нестабильных биологических компонентов для разработки диагностикума. Более удобным является использование латексных частиц вместо эритроцитов. Реакция агглютинации латексных частиц зарекомендовала себя как экспрессный и высокоспецифичный метод, позволяющий проводить анализ вне лаборатории [37]. При исследовании специфических антител в сыворотках крови лошадей-продуцентов показана высокая корреляция результатов метода с RFFIT [38]. Значительное влияние на результат реакции оказывают размер латексных частиц, условия адсорбции, время реакции, условия агглютинации (рН, ионная сила, температура).

¹⁰ Жданов ВМ, Гайдамович СЯ. Общая и частная вирусология. М.: Медицина; 1982.

¹¹ Троценко НИ, Белоусова РВ, Преображенская ЭА. Практикум по ветеринарной вирусологии. М.: Колос; 2000.

Реакция связывания комплемента в качестве метода исследования антирабических антител не может дать объективную оценку реального титра вируснейтрализующих антител, поскольку при анализе возможно обнаружение антител, образующихся в ответ на введение экспериментальному животному нуклеокапсида ВБ и не обладающих вируснейтрализующей активностью [39].

Иммуноферментный анализ

Для исследования антигенной активности ВБ и его компонентов, а также для оценки уровня специфических антител в антирабических сыворотках активно используют различные варианты ИФА, среди которых наиболее распространен твердофазный сэндвич-ИФА. В настоящее время модификации наборов для ИФА отличаются диагностическими компонентами, среди которых в зависимости от задач могут присутствовать как цельный вирус, так и его отдельные антигены, как правило, гликопротеин либо нуклеопротеин. Антитела, входящие в набор, могут отличаться специфичностью к антигенам вируса [40]. Разработаны наборы для ИФА с использованием антиидиотипических антител, позволяющие осуществлять исследования без вирусных антигенов [41]. Для детекции антирабических антител наиболее часто применяют непрямой ИФА.

В России при постановке ИФА для обнаружения ВБ в патогенном материале применяют конъюгат антирабических антител с пероксидазой (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань). ИФА можно охарактеризовать как метод со средней степенью чувствительности: положительную реакцию отмечают при наличии в образце ВБ в концентрации свыше 3,3 Ід ЛД₅₀/мл [32]. Результаты, получаемые при исследовании образцов методом ИФА, достаточно хорошо коррелируют с результатами МФА [40]. Преимуществом ИФА является возможность выявления в образце инактивированного ВБ, а также его отдельных антигенов. Более того, метод позволяет проводить количественную оценку содержания антигена ВБ или антител к нему, присутствующих в исследуемом образце.

При анализе антирабических сывороток чувствительность и специфичность этого метода сопоставима с данными параметрами для РН на культуре клеток [42]. В работе М. Stantic-Pavlinic с соавт. [4] показано наличие корреляции между результатами, полученными методом непрямого ИФА и в FAVN-тесте, но при этом отмечена более низкая степень чувствительности ИФА в сравнении с тестом на культуре клеток.

Указанные обстоятельства позволяют применять ИФА для оценки качества антирабических препаратов, что подтверждено результатами исследований специфической активности вакцин и их компонентов [43, 44] и сывороточных препаратов [45]. Следует отметить, что при использовании моноклональных антител к антигенному сайту III гликопротеина ВБ с помощью ИФА стало возможно контролировать содержание иммуногенных компонентов вакцины и вируснейтрализующих антител в сывороточных препаратах [46, 47].

Дот-иммуноанализ — разновидность ИФА, позволяющая проводить быстрое исследование образцов без необходимости использования какого-либо оборудования. При данном анализе для адсорбции антигенов или антител в качестве носителя применяют нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) 12. Нерастворимые продукты реакции при специфическом взаимодействии антигенов и антител проявляются на поверхности мембраны

в виде хорошо различимых ярких пятен, что позволяет осуществлять визуальный учет результата.

Для выявления продуктов реакции дот-анализа все чаще применяют наночастицы коллоидных металлов, в частности, золота или серебра [48, 49]. Активное использование диагностических конъюгатов на основе наночастиц коллоидных металлов связано с их высокой интенсивностью окрашивания, позволяющей производить учет результатов реакции без помощи какого-либо оборудования. Постановка дот-анализа проста в выполнении и характеризуется низкой стоимостью относительно других экспресс-тестов. Оценка применения данного теста в производстве гетерологичного АИГ дана в работе Н. А. Шараповой ¹³. Разработанная на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора диагностическая тест-система на основе наночастиц коллоидного золота позволяет эффективно определять активность антирабических сывороток и иммуноглобулина, а результаты данного теста коррелируют с результатами теста in vivo.

Иммунохроматографический анализ

Применение коллоидных наночастиц имеет место и при разработке иммунохроматографических тест-систем. Для проведения иммунохроматографического анализа (ИХА) отсутствует необходимость в каком-либо лабораторном оборудовании: исследуемый материал, подготовленный согласно инструкции тестового набора, вносят в тестовое устройство в заданном объеме и ожидают получения результата. Максимальное время ожидания результата теста составляет 10 мин. Появление линии в тестовой зоне устройства после внесения образца свидетельствует об успешной постановке теста, а появление линии в зоне контроля — о присутствии в опытном образце ВБ [50] или антирабических антител, в зависимости от вида теста. Применение высокоспецифичных ИХА-тестсистем для выявления антирабических антител с чувствительностью 0.5 МЕ/мл обосновано при исследовании иммуногенности антирабических вакцин [51]. В исследованиях S. Shiota с соавт. [52] показано применение ИХА-теста для выявления антирабических вируснейтрализующих антител (RAPINA) при исследовании большого количества образцов сывороток крови человека. При этом данные исследований свидетельствовали о средней степени корреляции между результатами RAPINA и RFFIT-тестом. Простота исполнения, высокая чувствительность, возможность исключения манипуляций с живым вирусом и клеточной культурой позволяют рассматривать ИХА-тесты в качестве успешного дополнения к комплексу контрольных методов исследования, используемых в производстве антирабических препаратов.

Молекулярно-генетические методы исследования вируса бешенства

В настоящее время методы молекулярной генетики получили большое распространение для диагностики и типирования микроорганизмов, в том числе лиссавирусов. Методы молекулярной генетики являются высокочувствительными и позволяют быстро получать результат при работе практически с любым видом патологического материала [53]. Особенностью молекулярно-генетических методов при работе с ВБ является проведение этапа обратной транскрипции. Для диагностических исследований разработаны наборы для ОТ-ПЦР, позволяющие учитывать результат как с помощью

¹² Коллинз У, ред. Новые методы иммуноанализа. М.: Мир; 1991.

¹³ Шарапова НА. Конструирование диагностикума с использованием наночастиц золота для определения активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в дот-иммуноанализе: дис. ... канд. биол. наук. Саратов; 2013.

гель-электрофореза, так и с помощью флуоресцентных меток [54]. Метод ОТ-ПЦР эффективен при обнаружении низких концентраций ВБ в образце, перспективен в осуществлении прижизненной диагностики бешенства [55], а также при проведении штаммовой дифференциации ВБ [56]. Применение ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов позволяет определять выход продукта реакции после каждого цикла амплификации, а также рассчитывать относительную концентрацию субстрата на основании анализа стандартной кинетической кривой, построенной по полученным данным¹⁴. Указанные особенности явились основанием для применения ОТ-ПЦР-РВ в производстве антирабических препаратов, в частности, для количественной оценки содержания антигена в материале для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки 15. Неоднократно отмечено использование ОТ-ПЦР-РВ в комплексе с методами иммунофлуоресценции для оценки полноты инактивации вируса при изготовлении вакцин [57-59].

Перспективным направлением применения молекулярногенетических методов является оценка стабильности производственных штаммов ВБ, используемых при изготовлении антирабических препаратов [60]. Для проведения подобных исследований используют методы ПЦР и полногеномного секвенирования. Полногеномное секвенирование вакцинных штаммов ВБ активно проводят как в России [61, 62], так и за рубежом [63, 64]. Актуальность подобных исследований обусловлена повышенной изменчивостью ВБ при его репродукции. Сравнение генетических последовательностей позволяет оценить возможность реверсии штаммов ВБ, используемых при оральной вакцинации животных [65], а также контролировать стабильность иммуногенных эпитопов вакцинных штаммов ВБ [60], что имеет значение и для штаммов, используемых в производстве сывороточных антирабических препаратов.

Заключение

Обзор методов исследования и выявления ВБ и антирабических антител показал их широкое применение в сферах диагностики бешенства у людей и животных и производства препаратов для профилактики данного заболевания. Применительно к процессу производства препарата гетерологичного АИГ следует отметить значимость методов исследования с применением культуры клеток, МФА, ИФА, атомно-силовой микроскопии и проточной цитометрии. Такие свойства, как скорость постановки тестов, высокая степень чувствительности, специфичность, возможность одновременного исследования большого количества проб и автоматизация процесса учета результатов, составляют преимущества данных методов в сравнении с биологическим методом на белых мышах, являющимся в настоящее время основным методом контроля активности гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Как результат использования методов in vitro следует рассматривать потенциальное снижение уровня биологического риска при работе с вирусом бешенства. Применение указанных перспективных тестов in vitro позволит расширить перечень методов контроля качества препарата антирабического иммуноглобулина в соответствии с требованиями ведущих зарубежных фармакопей и рекомендациями ВОЗ по применению методов in vitro, а также обозначить возможные пути дальнейшего совершенствования технологии производства препарата с целью повышения качества конечного продукта.

Вклад авторов. *Ю. К. Гаврилова* — написание текста, оформление рукописи, сбор и систематизация данных научной литературы; *С. В. Генералов* — идея аналитического обзора, редактирование и переработка рукописи, доработка текста, формулировка выводов; *Е. Г. Абрамова* — редактирование и переработка рукописи, окончательное утверждение рукописи для публикации; *А. К. Никифоров* — окончательное утверждение рукописи для публикации.

Authors' contributions. Yuliya K. Gavrilova—writing of the text, formatting of the paper, scientific literature review and systematisation; Sergey V. Generalov—elaboration of the study idea, revision and editing of the paper, finalisation of the text, formulation of conclusions; Elena G. Abramova—revision and editing of the paper, final approval of the paper version to be published; Aleksey K. Nikiforov—final approval of the paper version to be published.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература/References

- Абрамова ЕГ, Никифоров АК, Лобовикова ОА, Еремин СА, Васин ЮГ, Михеева ТА и др. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина итоги первых пяти лет. Проблемы особо опасных инфекций. 2010;(3):58–62. [Abramova EG, Nikiforov AK, Lobovikova OA, Eremin SA, Vasin YuG, Mikheeva TA, et al. Heterologous anti-rabies immunoglobulin results of the first five years of production. Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections. 2010;(3):58–62 (In Russ.)] https://doi.org/10.21055/0370-1069-2010-3(105)-58-62
- 2. Онищенко ГГ, Попова АЮ, Ежлова ЕБ, Демина ЮВ, Пакскина НД, Писцов МН и др. Эпидемиологическая обстановка и вопросы идентификации вируса бешенства среди людей на территории Российской Федерации в период 2002–2015 гг. Проблемы особо опасных инфекций. 2017;(3):27–32. [Onishchenko GG, Popova AYu, Ezhlova EB, Demina YuV, Pakskina ND, Pistsov MN, et al. Epidemiological situation on and problems of identification of rabies virus in humans in the territory of the Russian Federation during the period of 2002–2015. Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections. 2017;(3):27–32 (In Russ.)] https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-27-32
- Kuzmin IV. Virus isolation in animals: the mouse inoculation test. In: Rupprecht Ch, Nagarajan Th, eds. Current Laboratory Techniqes in Rabies Diagnosis, Research and Prevention. Vol. 2. San Diego: Elsevier Academic Press; 2015. P. 13–23. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801919-1.00002-6
- Stantić-Pavlinić M, Hostnik P, Levičnik-Stezinar S, Zaletel-Kragelj L. Vaccination against rabies and protective antibodies comparison of ELISA and fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) assays. *Vet Arhiv*. 2006;76(4):281–9.
- Lahaye X, Vidy A, Pomier C, Obiang L, Harper F, Gaudin Y, Blondel D. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: evidence that NBs are sites of

¹⁴ Ребриков ДВ, Саматов ГА, Трофимов ДЮ, Семенов ПА, Савилова АМ, Кофиади ИА и др. ПЦР «в реальном времени». М.: БИОНОМ. Лаборатория знаний; 2009.

¹⁵ Матвеева ЖВ. Разработка и совершенствование биотехнологических приемов приготовления рабического антигена для производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина: дис. ... канд. биол. наук. Саратов; 2013.

- viral transcription and replication. *J Virol*. 2009;83(16):7948–58. https://doi.org/10.1128/JVI.00554-09
- Niezgoda M, Rupprecht CE. Standard Operating Procedure for the Direct Rapid Immunohistochemistry Test (DRIT) for the Detection of Rabies Virus Antigen. National Laboratory Training Network Course. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention; 2006.
- Madhusudana SN, Subha S, Thankappan U, Ashwin YB. Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. *Virol Sin.* 2012;27(5):299–302. https://doi.org/10.1007/s12250-012-3265-6
- Mani RS, Madhusudana SN. Laboratory diagnosis of human rabies: recent advances. Sci World J. 2013:569712. https:// doi.org/10.1155/2013/569712
- Horwitz JA, Jenni S, Harrison SC, Whelan SPJ. Structure of a rabies virus polymerase complex from electron cryo-microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(4):2099–107. https://doi.org/10.1073/pnas.1918809117
- Зайцев БН, Таранов ОС, Рудометова НБ, Щербакова НС, Ильичев АА, Карпенко ЛИ. Оптимизированный метод подсчета количества вирусных частиц с помощью электронной микроскопии. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(3):337–42. [Zaitsev BN, Taranov OS, Rudometova NB, Shcherbakova NS, Ilyichev AA, Karpenko LI. An optimized method for counting viral particles using electron microscopy. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019;23(3):337–42 (In Russ.)] https://doi.org/10.18699/VJ19.498
- 11. Петрова ИД, Зайцев БН, Таранов ОС. Концентрирование вирусов и электронная микроскопия. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(3):276–83. [Petrova ID, Zaitsev BN, Taranov OS. Concentration of viruses and electron microscopy. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020;24(3):276–83 (In Russ.)] https://doi.org/10.18699/VJ20.620
- 12. Грибенча СВ, Козлов АЮ, Костина ЛВ, Елаков АЛ, Лосич МА, Цибезов ВВ и др. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства. Вопросы вирусологии. 2013;58(5):38–43. [Gribencha SV, Kozlov AYu, Kostina LV, Elakov AL, Losich MA, Tsibezov VV, et al. Production of the monoclonal antibodies to the rabies virus nucleoprotein. Voprosy virusologii = Problems of Virology. 2013;58(5):38–43 (In Russ.)]
- Rourou S, Ben Zakkour M, Kallel H. Adaptation of Vero cells to suspension growth for rabies virus production in different serum free media. *Vaccine*. 2019;37(47):6987–95. https:// doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.092
- 14. Хисматуллина НА, Гулюкин АМ, Шуралев ЭА, Хаертынов КС, Чернов АН, Филимонова МН и др. Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1). Гены и клетки. 2014;9(3):276–80. [Khismatullina NA, Gulyukin AM, Shuralev EA, Khaertynov KS, Chernov AN, Filimonova MN, et al. Rapid diagnostic test of rabies using rat Gasser's ganglion neurinoma cell culture (RGGN-1). Geny i kletki = Genes and Cells. 2014;9(3):276–80 (In Russ.)]
- Cliquet F, Wasniewski M. The fluorescent antibody virus neutralization test. In: Rupprecht Ch, Nagarajan Th, eds. Current Laboratory Techniqes in Rabies Diagnosis, Research and Prevention. Vol. 2. San Diego: Elsevier Academic Press; 2015. P. 217–31. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801919-1.00018-X
- Yager ML, Moore SM. The rapid fluorescent focus inhibition test. In: Rupprecht Ch, Nagarajan Th, eds. Current Laboratory Techniqes in Rabies Diagnosis, Research and Prevention. Vol. 2. San Diego: Elsevier Academic Press; 2015. P. 199– 215. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801919-1.00017-8

- Cliquet F, Aubert M, Sagné L. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J Immunol Methods*. 1998;212(1):79–87. https://doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00212-3
- 18. Баркова ЕП, Нагиева ФГ, Никулина ВГ, Лисаков АН. Быстрый культуральный метод для индикации антигенов вируса бешенства в инфицированных клеточных культурах. Инфекция и иммунитет. 2013;3(4):323–6. [Barkova EP, Nagieva FG, Nikulina VG, Lisakov AN. The rapid culture method for the indication of rabies virus antigen in infected cell cultures. Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity. 2013;3(4):323–6 (In Russ.)]
- Bedeković T, Lemo N, Lojkić I, Mihaljević Ž, Jungić A, Cvetnić Ž, et al. Modification of the fluorescent antibody virus neutralization test — elimination of the cytotoxic effect for the detection of rabies virus neutralising antibodies. *J Virol Methods*. 2013;189(1):204–8. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.01.022
- Moeschler S, Locher S, Conzelmann KK, Krämer B, Zimmer G. Quantification of *Lyssavirus*-neutralizing antibodies using vesicular stomatitis virus pseudotype particles. *Viruses*. 2016;8(9):254. https://doi.org/10.3390/v8090254
- Qin S, Volokhov D, Rodionova E, Wirblich C, Schnell MJ, Chizhikov V, Dabrazhynetskaya A. A new recombinant rabies virus expressing a green fluorescent protein: a novel and fast approach to quantify virus neutralizing antibodies. *Biologicals*. 2019;59:56–61. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.03.002
- 22. Мовсесянц АА, Олефир ЮВ. Современные проблемы вакцинопрофилактики бешенства. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2019;19(1):10–6. [Movsesyants AA, Olefir YuV. Current challenges of preventive vaccination against rabies. BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2019;19(1):10–6 (In Russ.)] https://doi.org/10.30895/2221-996X-2019-19-1-10-16
- 23. Гаврилова ЮК, Генералов СВ, Абрамова ЕГ, Савицкая ЛВ, Галкина МВ, Кочкин АВ. Экспресс-анализ активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в клеточных культурах методом иммунофлуоресценции. Биотехнология. 2018;34(4):83—8. [Gavrilova YuK, Generalov SV, Abramova EG, Savitskaya LV, Galkina MV, Kochkin AV. Express analysis of activity of anti-rabies serum and anti-rabies immunoglobulin in cell cultures by immunofluorescence method. Biotekhnologiya = Biotechnology. 2018;34(4):83—8 (In Russ.)] https://doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-4-83-88
- Hanners NW, Eitson JL, Usui N, Richardson RB, Wexler EM, Konopka G, Schoggins JW. Western Zika virus in human fetal neural progenitors persists long term with partial cytopathic and limited immunogenic effects. *Cell Reports*. 2016;15(11):2315–22. https://doi.org/10.1016/j.cel-rep.2016.05.075
- Fontana D, Prieto C, Kratje R, Etcheverrigaray M. Target cells for antibodies detection in rabies vaccine control. *Vaccine*. 2014;32(24):2805–7. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.030
- Rupprecht ChE, Fooks AR, Abela-Ridder B. Demonstration of Lyssavirus antigens by flow cytometry. In: Rupprecht ChE, Fooks AR, Abela-Ridder B. Laboratory Techniques in Rabies. 5th ed., Vol. 1. Geneva: WHO; 2018. P. 169–75.
- Vengatesan D, Raj GD, Raja A, Ramadass P, Gunaseelan L. Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry. *Cytometry*. 2006;70B(5):335–43. https://doi.org/10.1002/cyto.b.20104
- Генералов СВ, Кравцов АЛ, Кожевников ВА, Гаврилова ЮК, Абрамова ЕГ, Никифоров АК. Проточная цитометрия при анализе вируснейтрализующей активности антирабических сывороток и иммуноглобулина. Инфекция и иммунитет. 2019;9(1):107–14. [Generalov SV,

- Kravtsov AL, Kozhevnikov VA, Gavrilova YuK, Abramova EG, Nikiforov AK. Flow cytometry for the analysis of virus-neytralizing activity of antirabies serum and immunoglobulin drug. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2019;9(1):107–14 (In Russ.)] https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-107-114
- 29. Жилин EC, Акматова ЭК, Сансызбай AP. Выбор системы определения биологической активности вируса бешенства штамм «VRC-RZ2». Известия ВУЗов Кыргызстана. 2013;(4):131–8. [Zhilin ES, Akmatova EK, Sansyzbai AR. The choice of system of determination of biological activity of rabies virus strain "VRC-RZ2". Izvestiya VUZov Kyrgyzstana = Bulletin of Universities of Kyrgyzstan. 2013;(4):131–8 (In Russ.)]
- 30. Генералов СВ, Ерохин ПС, Красовская ТЮ, Осина НА, Абрамова ЕГ, Никифоров АК, Щербакова СА. Изучение ультраструктуры поверхности клеток линии Vero, инфицированных вирусом бешенства (RABV, Lissavirus, Rhabdoviridae). Вопросы вирусологии. 2017;62(5):227–32. [Generalov SV, Erokhin PS, Krasovskaya TYu, Osina NA, Abramova EG, Nikiforov AK, Shcherbakova SA. A study of the ultrastructure of the surface of the transplantable line Vero cells infected with the rabies virus (RABV, Lissavirus, Rhabdoviridae). Voprosy virusologii = Problems of Virology. 2017;62(5):227–32 (In Russ.)] https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-5-227-232
- 31. Генералов СВ, Ерохин ПС, Абрамова ЕГ, Осина НА, Савицкая ЛВ, Кузнецов ОС и др. Способ определения специфической активности антирабического иммуноглобулина на клеточной культуре с применением атомно-силовой микроскопии. Патент Российской Федерации № 2688334; 2019. [Generalov SV, Erokhin PS, Abramova EG, Osina NA, Savitskaya LV, Kuznetsov OS, et al. Method for determining specific activity of anti-rabies immunoglobulin on cell culture using atomic force microscopy. Patent of the Russian Federation No. 2688334; 2019 (In Russ.)]
- 32. Гулюкин АМ. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза. Вопросы вирусологии. 2014;59(3):5–10. [Gulyukin AM. Significance of modern methods for laboratory detection of rabies agents and identification of the zoonose immunological survey. Voprosy virusologii = Problems of Virology. 2014;59(3):5–10 (In Russ.)]
- 33. Недосеков ВВ. Сравнительная оценка методов лабораторной диагностики бешенства. Ветеринарная патология. 2002;1:41–7. [Nedosekov VV. Comparative evaluation of methods for laboratory diagnosis of rabies. Veterinarnaya patologiya = Veterinary Pathology. 2002;1:41–7 (In Russ.)]
- Silva LHQ da, Bissoto CE, Carvalho C de, Cardoso TC, Pinheiro DM, Perri SHV. Comparison between the counter immunoelectrophoresis test and mouse neutralization test for the detection of antibodies against rabies virus in dog sera.
 Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97(2):259–61. https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000200020
- 35. Волкова РА, Рунова ВМ, Романова ЛН, Храпова ИС, Эльберт ЛБ, Мальдов ДГ. Применение ракетного иммуноэлектрофореза для определения гликопротеина в концентрированных антирабических вакцинах. Вопросы вирусологии. 1994;39(2):68–71. [Volkova RA, Runova VM, Romanova LN, Hrapova IS, El'bert LB, Mal'dov DG. The use of rocket immunoelectrophoresis for the determination of glycoprotein in concentrated rabies vaccines. Voprosy virusologii = Problems of Virology. 1994;39(2):68–71 (In Russ.)]
- De Franco M, Massa S, Vassão RC, Siqueira M, Sant'Anna OÁ. Polygenic control of antibody production and correlation with vaccine induced resistance to rabies virus in high and low antibody responder mice. *Arch Virol*. 1996;141(8):1397–406. https://doi.org/10.1007/BF01718243

- Madhusudana SN, Saraswati S. Development and evaluation of a latex agglutination test for rabies antibodies. *J Clin Virol*. 2003;27(2):129–35. https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00135-x
- Saengseesom W, Kasempimolporn S, Akesowan S, Ouisuwan S, Sitprija V. Use of latex agglutination test to determine rabies antibodies in production of rabies antisera in horses. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2010;41(6):1387–92.
- 39. Сугобаева БП, Дадабаева ЖС, Сайдулдин ТС. Выявление рабических антител с помощью РСК. В кн.: Диагностика, лечение и профилактика инфекционных болезней животных Казахстана. Алма-Ата; 1989. С. 45–53. [Sugobaeva BP, Dadabaeva ZhS, Sajduldin TS. Detection of rabid antibodies using CFT. In: Diagnostics, Treatment and Prevention of Infectious Animal Diseases in Kazakhstan. Alma-Ata; 1989. P. 45–53 (In Russ.)]
- 40. Сухарьков АЮ, Назаров НА, Метлин АЕ. Диагностика бешенства животных методом иммуноферментного анализа, сравнение прямого и непрямого сэндвич-варианта. Ветеринария Кубани. 2011;(6):12–4. [Sukharkov AYu, Nazarov NA, Metlin AE. Diagnostics of animal rabies by enzyme immunoassay. Comparison of direct and indirect sandwich ELISA options. Veterinaria Kubani = Kuban Veterinary Medicine. 2011;(6):12–4 (In Russ.)]
- 41. Жилин ЕС, Кошеметов ЖК, Татыбаева АТ, Матвеева ВМ, Алиева АБ, Мыктыбаева ГБ. Способ получения антиидиотипических антител к антигенам вируса бешенства. Патент Республики Казахстан № 27436; 2013. [Zhilin ES, Koshemetov ZhK, Tatybaeva AT, Matveeva VM, Alieva AB, Myktybaeva GB. Method for producing antiidiotypic antibodies to antigens of the rabies virus. Patent of the Republic of Kazakhstan No. 27436; 2013(In Russ.)]
- 42. Shankar BP. Advances in diagnosis of rabies. *Veterinary World*. 2009;2(2):74–8.
- 43. Цетлин ЕМ, Волкова ВА. Отработка оптимальной схемы учета результатов при применении иммуноферментной тест-системы для определения антигенной активности культуральной антирабической вакцины. Вопросы вирусологии. 1996;(1):21–4. [Cetlin EM, Volkova VA. Development of the optimal scheme for recording the results when using the enzyme immunoassay test system to determine the antigenic activity of the cultural rabies vaccine. Voprosy virusologii = Problems of Virology. 1996;(1):21–4 (In Russ.)]
- 44. Маркова ЕВ, Матвеева ИН, Попова ВМ. Инновационный подход к количественной оценке гликопротеина в вакцинах против бешенства. *Таврический вестник аграрной науки*. 2017;(2):17–28. [Markova EV, Matveeva IN, Popova VM. An innovative approach to quantitative evaluation of glycoprotein in vaccines against rabies. *Tavricheskiy vestnik agrarnoy nauki = Tavrichesky Bulletin of Agrarian Science*. 2017;(2):17–28 (In Russ.)]
- Salvi NC, Deopurkar RL, Waghmare AB, Khadilkar MV, Kalolikar MY, Gade SK, Mohite LS. Validation of indirect ELISA for quantitative testing of rabies antibodies during production of antirabies serum using equines. *Proc Vaccinol*. 2010;2(1):3–11. https://doi.org/10.1016/j.provac.2010.03.001
- Jallet C, Tordo N. In Vitro ELISA test to evaluate rabies vaccine potency. J Vis Exp. 2020;159:e59641. https://doi. org/10.3791/59641
- Korimbocus J, Dehay N, Tordo N, Cano F, Morgeaux S. Development and validation of a quantitative competitive ELISA for potency testing of equine anti rabies sera with other potential use. *Vaccine*. 2016;34(28):3310–6. https:// doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.04.086
- Dykman LA, Khlebtsov NG. Immunological properties of gold nanoparticles. Chem Sci. 2017;8(3):1719–35. https://doi. org/10.1039/C6SC03631G
- 49. Asgary V, Shoari A, Baghbani-Arani F, Shandiz SAS, Khosravy MS, Janani A, et al. Green synthesis and evaluation of silver nanoparticles as adjuvant in rabies veterinary vac-

- cine. Int J Nanomedicine. 2016;(11):3597–605. https://doi.org/10.2147/JJN.S109098
- Kasempimolporn S, Saengseesom W, Huadsakul S, Boonchang S, Sitprija V. Evaluation of a rapid immunochromatographic test strip for detection of *Rabies virus* in dog saliva samples. *J Vet Diagn Invest*. 2011;23(6):1197–201. https:// doi.org/10.1177/1040638711425576
- Wang H, Feng N, Yang S, Wang C, Wang T, Gao Y, et al. A rapid immunochromatographic test strip for detecting rabies virus antibody. *J Virol Methods*. 2010;170(1–2):80–5. https:// doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.09.002
- Shiota S, Mannen K, Matsumoto T, Yamada K, Yasui T, Takayama K, et al. Development and evaluation of a rapid neutralizing antibody test for rabies. *J Virol Methods*. 2009;161(1):58–62. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.05.018
- David D, Yakobson B, Rotenberg D, Dveres N, Davidson I, Stram Y. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains. *Vet Microbiol*. 2002;87(2):111–8. https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00041-X
- 54. Дедков ВГ, Девяткин АА, Полещук ЕМ, Сафонова МВ, Маркелов МЛ, Шипулин ГА. Разработка и апробация набора реагентов для определения РНК классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Вопросы вирусологии. 2016;61(5):235–40. [Dedkov VG, Deviatkin AA, Poleshchuk EM, Safonova MV, Markelov ML, Shipulin GA. Development and evaluation of the RT-PCR kit for the rabies virus diagnosis. Voprosy virusologii = Problems of Virology. 2016;61(5):235–40 (In Russ.)] https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-235-240
- Nagaraj T, Vasanth JP, Desai A, Kamat A, Madhusudana SN, Ravi V. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques. *J Clin Virol*. 2006;36(1):17–23. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.01.009
- Bourhy H, Reynes J, Dunham E, Dacheux L, Larrous F, Huong VTQ, et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus. *J Gen Virol*. 2008;89(11):2673–81. https://doi. org/10.1099/vir.0.2008/003913-0
- 57. Moreira BLC, Pereira LA, Gimenez APL, Inagaki JMF, Raboni SM. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for the quantification of rabies virus as quality control of inactivated rabies vaccines. *J Virol Methods*. 2019;270:46–51. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.04.025
- Moreira BLC, Gimenez APL, Inagaki JMF, Raboni SM. Inactivated rabies vaccines: Standardization of an *in vitro* assay for residual viable virus detection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;14(3):e0008142. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008142
- Sekar T, Premkumar AA, Mohan GC, Sekar B, Sundaran B, Sivakumar S. Quantification of rabies virus by Real Time PCR in comparison with mouse inoculation test (MIT) and fluorescent antibody test (FAT). *Madridge J Vaccines*. 2019;3(1):80–5. https://doi.org/10.18689/miy-1000118
- 60. Игнатьев ГМ, Оксанич АС, Антонова ЛП, Самарцева ТГ, Мосолова СВ, Мефед КМ и др. Молекулярно-генетическое исследование стабильности

- и подтверждение подлинности штамма Внуково-32, применяемого для производства вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2020;20(2):107–15. [Ignatyev GM, Oksanich AS, Antonova LP, Samartseva TG, Mosolova SV, Mefed KM, et al. Molecular genetic testing of stability and identification of Vnukovo-32 strain used for production of the cultural concentrated purified inactivated dry rabies vaccine. BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2020;20(2):107–15 (In Russ.)] https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-107-115
- 61. Тучков ИВ, Краснов ЯМ, Горяев АА, Матвеева ЖВ, Степанов АВ, Майоров НВ, Никифоров АК. Нуклеотидная последовательность и филогенетический анализ G гликопротеина российского фиксированного штамма «Москва 3253» вируса бешенства. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;4:73–5. [Tuchkov IV, Krasnov YM, Goryaev AA, Matveeva ZV, Stepanov AV, Mayorov NV, Nikiforov AK. Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of G glycoprotein of the rabies virus strain "Moscow 3253" from Russia. Problemy osobo opasnykh infektsii = Problems of Particularly Dangerous Infections. 2013;4:73–5 (In Russ.)] https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-4-73-75
- 62. Лосич МА, Зайкова ОН, Непоклонова ИВ, Гребенникова ТВ, Верховский ОА, Одноворов АИ, Алипер ТИ. Молекулярно-биологическая характеристика вакцинного штамма ERA-CB 20M вируса бешенства. Вопросы вирусологии. 2018;63(5):224—32. [Losich MA, Zajkova ON, Nepoklonova IV, Grebennikova TV, Verhovskij OA, Odnovorov AI, Aliper TI. Molecular and biological characteristics of vaccinary ERA-CB 20M of rabies virus. Voprosy virusologii = Problems of Virology. 2018;63(5):224—32 (In Russ.)] https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-224-232
- Tao X, Han N, Guo, Z, Tang Q, Rayner S, Liang G. Molecular characterization of China human rabies vaccine strains. Virol Sin. 2013;28(2):116–23. https://doi.org/10.1007/s12250-013-3314-9
- 64. Zhu S, Wang C, Zhang P, Li H, Luo S, Guo C. Sequencing and molecular characterization of CTNCEC25, a China fixed rabies virus vaccine strain CTN-1 adapted to primary chicken embryo cells. *Virol J.* 2014;11:176. https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-176
- 65. Зайкова ОН, Гребенникова ТВ, Гулюкин АМ, Шабейкин АА, Полякова ИВ, Метлин АЕ. Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей. Вопросы вирусологии. 2017;62(3):101–8. [Zaykova ON, Grebennikova TV, Gulyukin AM, Shabeykin AA, Polyakova IV, Metlin AE. Molecular-genetic characterization of field isolates of rabies virus identified in the territory of Vladimir, Moscow, Tver, Nizhny Novgorod and Ryazan regions. Voprosy virusologii = Problems of Virology. 2017;62(3):101–8 (In Russ.)] https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-101-108

Об авторах / Authors

Гаврилова Юлия Кирилловна. Yuliya K. Gavrilova. ORCID: https://orcid.org/0000-0001-7919-3412

Генералов Сергей Вячеславович, канд. биол. наук. Sergey V. Generalov, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** https://orcid.org/0000-0003-1461-5383

Абрамова Елена Геннадьевна, д-р биол. наук. *Elena G. Abramova*, Dr. Sci. (Biol.). **ORCID:** http://orcid.org/0000-0002-8798-1547

Никифоров Алексей Константинович, д-р биол. наук. Aleksey K. Nikiforov, Dr. Sci. (Biol.). SPIN-код РИНЦ: 3202-3979

Поступила 15.02.2021 После доработки 24.03.2021 Принята к публикации 10.06.2021 Received 15 February 2021 Revised 24 March 2021 Accepted 10 June 2021