

Гулюкин А.М.

Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза

ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» Минсельхоза России, 420075, г. Казань

Аналитический обзор современных методов лабораторной диагностики бешенства, а также результаты собственных исследований свидетельствуют о высокой чувствительности и специфичности таких экспресс-методов идентификации возбудителя бешенства, как иммуноферментный анализ, обнаружение генома вируса бешенства – обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция, выделение рабического вируса в культуре клеток нейробластомы или невриномы Гассерова узла крысы, а также об их перспективности для включения в государственный стандарт, что обеспечит раннюю диагностику бешенства у животных и в свою очередь снизит риск заболевания животных и людей.

Ключевые слова: бешенство; лабораторная диагностика; иммунологический мониторинг.

Significance of modern methods for laboratory detection of rabies agents and identification of the zoonose immunological survey

Gulyukin A. M.

Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 420075, Kazan, Russia

Analytical review of modern methods of the laboratory detection of rabies and findings of our research indicate high sensitivity and specificity of methods for rapid identification of rabies agents, such as ELISA, reverse-transcriptase PCR for identification of the rabies virus genome, and rabies virus isolation in rat Gasserian ganglion neuroinoma, as well as their potential to be included into the State Quality Standard for early detection of rabies in animals to reduce the infection risk among humans and animals.

Key words: rabies; laboratory detection; immunological survey.

Введение

Бешенство, наносящее во всем мире наибольший экономический ущерб, занимает исключительно важное место в инфекционной патологии человека и животных. Заболевание регистрируют на всех континентах Земного шара, кроме Австралии, оно является объектом постоянного повышенного внимания международных организаций медицинского и ветеринарного профиля (ВНО/ВОЗ, ОIE/МЭБ).

Ситуация по уровню заболеваемости бешенством в России остается крайне неблагоприятной [1–3]. На протяжении 20 лет в России регистрируется самая высокая смертность среди развитых стран [4]. За 2008–2012 гг. зарегистрирован 61 летальный исход заболеваний людей бешенством [5]. Ежегодно в России антирабическую помощь получают от 250 до 450 тыс. человек, пострадавших от укусов животных, из которых около 25% составляют дети. Ситуация по гидрофобии в стране складывается на фоне неблагоприятия по бешенству среди животных. По данным ФГБУ «Центр ветеринарии» лаборатории эпизоотологии ГНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко, в 2012 г. и за 10 мес в 2013 г. в России зарегистрировано 5817 случаев бешенства среди животных.

При проведении противоэпизоотических мероприя-

тий, а также назначении курса антирабических прививок пострадавшим от укусов животными немаловажное значение имеет своевременная и точная диагностика [6]. Необходимость постоянного контроля за состоянием природных очагов бешенства и расширение работ за последние годы по оральной вакцинации диких животных требуют совершенствования экспресс-методов выделения и индикации вируса.

Диагностику бешенства проводят на основании комплекса эпизоотологических, клинических данных и лабораторных методов исследования. Окончательный диагноз может быть поставлен только лабораторным методом.

Методы лабораторной диагностики бешенства основаны либо на обнаружении цитоплазматических включений или специфического антигена (световая и люминесцентная микроскопия, реакция диффузионной преципитации, иммуноферментный анализ (ИФА) и др.), либо на выделении рабического вируса (биопроба на лабораторных животных или в культуре клеток), а также на обнаружении генома возбудителя бешенства [7].

Диагноз на бешенство ставят при получении положительных результатов хотя бы по одному из методов лабораторного исследования.

Методы обнаружения специфического антигена вируса бешенства

Световая микроскопия. Сущность метода заключается в выявлении в клетках нервной ткани специфических цитоплазматических включений – телец Бабеша–Негри. Лабораторная диагностика с помощью обнаружения телец Бабеша–Негри описана во многих обзорах и руководствах по бешенству [8–14 и др.] Общеизвестно, что тельца Бабеша–Негри специфичны для бешенства, и их присутствие является достоверным диагностическим признаком.

Выявление телец Бабеша–Негри проводят методом световой микроскопии с применением мазков-отпечатков ткани мозга на предметном стекле и окрашивания с помощью красок по Селлерсу, Гимзе и Манну в соответствии с ГОСТом 26075-84 [10]. Одним из преимуществ метода является его экспрессность (45–60 мин). Вместе с тем, по данным ряда исследователей [11], тельца Бабеша–Негри чаще обнаруживают в стадии выраженной клинической картины болезни, поэтому у вынужденно убитых животных они могут отсутствовать или присутствовать в виде единичных мелких включений. Кроме того, метод световой микроскопии обладает низкой чувствительностью. Так, по данным некоторых авторов [13], тельца Бабеша–Негри выявляют лишь в 65–85% случаев бешенства, по данным других [6], – лишь в 40%. Частота выявления телец Бабеша–Негри зависит от продолжительности инкубационного периода, вида микроорганизмов и свойств штамма вируса бешенства, поэтому их отсутствие не является отрицательным ответом, и материал исследуют в других тестах (МФА; РДП; биопроба).

Реакция диффузионной преципитации в агаровом геле (РДП) разработана и используется для лабораторной диагностики бешенства [10]. В нашей стране выпускается «Набор компонентов для диагностики бешенства животных в реакции диффузионной преципитации (РДП)» (производитель – ФГБУ ВНИИТиБП, г. Щелково).

Этим методом допускается исследовать несвежий патологический материал, контаминированный бактериальной микрофлорой. Одним из преимуществ метода является его экспрессность (45–60 мин). Вместе с тем результаты РДП учитывают через 6, 24, 48 ч после ее постановки. Следует отметить, что, по данным ряда авторов [8, 15], РДП является низкочувствительным тестом, выявление вирусного антигена в исследуемом материале составляет от 45 до 70%. Реакция положительна лишь при достаточной концентрации вирусного антигена, составляющей не менее $4,5 \lg LD_{50}$ [13], и при отрицательных результатах РДП нельзя исключить бешенство.

Кроме того, материал, консервированный глицерином, формалином и другими средствами, для данной реакции не пригоден. Таким образом, РДП нельзя считать абсолютно надежным методом.

Метод флюоресцирующих антител (МФА) является наиболее точным из всех существующих методов микроскопической диагностики бешенства и признан высокочувствительным, специфичным и экспрессным методом. Наиболее широкое распространение получил прямой вариант МФА [6–9]. Порог чувствительности МФА $3,8 \lg LD_{50}/мл$, время анализа 5–6 ч [6]. Сообщается о возможности прижизненного выявления антигена вируса бешенства по МФА в эпителиальных клетках роговицы (корнеальная проба) и биоптатах кожи больных бешенством [16–18]. В частности, Н.А. Ковалевым и А.С. Шашенько (1970) [17] в опытах на экспериментально зараженных овцах и кроликах поставили положительный диагноз за 3–5 дней до появления характерных

признаков болезни; Н.А. Хисматуллина и соавт. (2003) [18] при исследовании отпечатков роговицы у больной Б. по МФА положительный диагноз поставили за 6 сут до смерти пострадавшей. Полученные результаты подтвердили клинически поставленный диагноз гидрофобии.

С помощью МФА окончательный диагноз на бешенство может быть поставлен уже на 4–8-е сутки после заражения мышью исследуемым материалом [13]. Вместе с тем для исследований по МФА пригоден только свежий или свежемороженый материал. Кроме того, нельзя исключить неспецифическое свечение при исследовании материала, консервированного в глицерине [6, 13].

Многие ученые считают, что МФА является высокочувствительным методом, и при высококвалифицированном выполнении полученные результаты совпадают с данными биологической пробы до 98,7% [6, 8, 13, 15]. В литературе имеются сообщения о применении МФА на основе моноклональных антител (МКА) к нуклеопротеину вируса бешенства [19, 20], что повышает результативность МФА.

В РФ МФА является одним из основных тестов при диагностике бешенства и выполняется с использованием коммерческих наборов «Флюоресцирующий антирабический глобулин» на основе поликлональных антител производства ФГБУ ФЦТРБ-ВНИВИ (г. Казань) [6] и ФГБУ ВНИИТиБП (г. Щелково) [21].

Методы выделения вируса бешенства

Биологическая проба – одна из наиболее чувствительных и достоверных методов лабораторной диагностики бешенства [10]. Биопробу считают положительной, если в препаратах из мозга зараженных мышей обнаруживают тельца Бабеша–Негри или выявляют рабический антиген по МФА или в РДП. Недостатками биопробы являются продолжительность исследования (в отрицательных случаях до 30 дней), потенциальная опасность выноса возбудителя, а также невозможность использования разложившегося материала. Кроме того, постановка биопробы неэкономична, требует особого виварного помещения и обслуживающего персонала [6].

Выделение вируса бешенства в культуре клеток. Реальная возможность использования систем культур тканей для диагностики бешенства появилась после установления высокой чувствительности клеток нейробластомы мыши, в частности клона N 18, а также клеток CER, ВНК-21 к уличному вирусу бешенства [22, 23].

Установлена перспективность использования перевиваемой культуры клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1) для выделения уличного вируса бешенства из патматериала с его последующей идентификацией с помощью МФА [6, 24, 25]. Время анализа 2–3 сут после заражения культуры клеток НГУК-1. Антиген вируса бешенства выявляют в цитоплазме клеток НГУК-1 в виде ярких желто-зеленых гранул, разной формы и величины – от едва заметных до имеющих 15–20 мкм в диаметре, иногда отмечают большое количество мелких желто-зеленых частиц (размером до 5 мкм) округлой и овальной формы. Метод выделения вируса бешенства в культуре клеток НГУК-1 авторы рассматривают как возможную замену биопробы на белых мышах, которая требует наличия вивария, обслуживающего персонала и продолжительного наблюдения за подопытными животными (до 30 сут согласно ГОСТа 26 075).

Метод иммуноферментного анализа (ИФА) имеет ряд преимуществ перед другими серологическими тестами: высокую чувствительность, стабильность соединений, меченных ферментами; кроме того, оборудование для измерения продукта иммуноферментной реакции отличается простотой и невысокой стоимостью, анализ

может быть легко автоматизирован, что позволяет применять его для проведения массовых обследований [81]. Порог чувствительности ИФА составляет $3,3 \text{ Ig LD}_{50}/\text{мл}$, а время анализа 5–6 ч [6, 25].

В литературе имеются сообщения о применении ИФА для индикации вируса бешенства в культуральной жидкости или мозге экспериментально и спонтанно зараженных животных [25, 26]. Авторы показали, что ИФА может быть использован и как экспресс-способ для постановки предварительного диагноза, и в сочетании с МФА и биопробой, что расширяет возможности лабораторной диагностики бешенства.

В практике часто применяются так называемый сэндвич-вариант ИФА, преимуществом которого перед конкурентным методом являются большая чувствительность и возможность использования неочищенных антигенов [25]. Одновременное применение двух экспресс-методов – ИФА и МФА обеспечивает более надежный диагноз. При этом визуальный учет результатов ИФА не требует специальной аппаратуры, что позволяет использовать его в полевых условиях и лабораториях, не оснащенных люминесцентными микроскопами [6].

Итак, можно утверждать, что метод ИФА перспективен для диагностики бешенства. В регионах РФ применяют «Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства методом иммуноферментного анализа (ИФА)», разработанный и выпускаемый ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», утвержденный Россельхознадзором 03.03.2008 г. и сертифицированный в ФГБУ «ВГНКИ» (Москва) (6, 9).

Идентификация штаммов рабического вируса с помощью МКА. Перспективным в диагностике бешенства является и применение МКА, обладающих по сравнению с поликлональными антисыворотками моноспецифичностью и позволяющими проводить идентификацию штаммов рабического вируса, в частности дифференцировать серотипы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11 и 12 вирусов группы бешенства [27–32].

В настоящее время МКА успешно применяют для диагностики, антигенного анализа лиссавирусов, селекции аттенуированных и высокоиммуногенных мутантов вакцинного вируса, картирования антигенной структуры рабического гликопротеина, идентификации эпизоотических вариантов полевых штаммов, а также для дифференциации полевых и вакцинных вирусов при широких опытах оральной иммунизации [32–36].

Использование МКА позволяет проводить также оценку антирабических вакцин по выявлению тех эпитопов гликопротеина (и других структурных белков) вируса бешенства, которые участвуют в формировании иммунного ответа организма [15].

В литературе имеются данные о применении МКА в качестве терапевтического средства при экспериментальном бешенстве [37].

В нашей стране изучению антигенных особенностей вирусов бешенства, циркулирующих на территории России, занимались М.А. Селимов [14], М.А. Селимов и соавт. [31, 38–41], А.Д. Ботвинкин [34], А.Д. Ботвинкин и соавт. [33, 35], С.В. Грибенча [37], И.В. Кузьмин и соавт. [42]. Впервые в стране авторы использовали МКА к нуклеопротеиду панелей института Wistar (Филадельфия, США) [27], Центральной ветеринарной лаборатории Великобритании (CVL, Уэйбридж, Великобритания) [30] и Центра вирусных болезней животных (Тюбенген, Германия) [28].

А.Д. Ботвинкин и соавт. [33, 35] установили, что на территории России среди наземных млекопитающих распространены штаммы вирусов только серотипа 1. Эти же авторы на территории страны обнаружили среди

летучих мышей (рукокрылых) циркуляцию вирусов серотипов 1 и 5. Серотип 5 в настоящее время соответствует виду European bat lyssavirus-1 (EBLV-1, лиссавирус европейских летучих мышей 1-го типа). В России вирус этого генотипа был впервые выделен в 1985 г. от девочки, укушенной летучей мышью, в Белгороде [41]. В 2003 г. среди рукокрылых России была установлена циркуляция двух новых вирусов с оригинальными генотипами – “Иркут” (Irkut virus), выделенный А.Д. Ботвинкиным от трубноноса сибирского *Murina leucogaster* в Восточной Сибири (Иркутск), и в Западной Сибири – Кавказский лиссавирус летучих мышей (West Caucasian bat virus), обнаруженный Е.А. Полещук и соавт. и А.Д. Ботвинкиным и соавт. [32]. В 2007 г. в Приморском крае от погибшей женщины, укушенной летучей мышью, выделен штамм “Озерное”, аналогичный вирусу Irkut [43]. Это второй случай гибели людей от бешенства после укуса летучими мышами в стране и третий случай выделения лиссавирусов не серотипа 1 на территории России.

Среди представителей вирусов серотипа 1, циркулирующих среди наземных млекопитающих в России, выявлены девять антигенных вариантов [33–35]. При этом связь с каким-либо специфическим хозяином генетическое подтверждение не получила.

Методы обнаружения генома вируса бешенства. Для обнаружения генома вируса бешенства используют два метода: дот-гибридизацию и обратнотранскриптазную полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР).

Дот-гибридизация. Сущность метода дот-гибридизации заключается в выявлении и идентификации РНК вируса с использованием специфических ДНК-зондов, в качестве которых используют меченный R^{32} фаг M_{13} , несущий вставки размером 200–400 п.о., комплементарные различным генам вакцинного штамма вируса бешенства (штамм PV), или рекомбинантную плазмиду, содержащую 96% кодирующей последовательности гена нуклеопротеина вируса бешенства (штамм ERA). Гибридизация *in situ* может применяться для ретроспективной диагностики в тех случаях, когда выявление специфического антигена не всегда дает четкие результаты и невозможно выделить вирус в культуре клеток или на лабораторных животных [9].

Полимеразная цепная реакция. Одним из широко используемых методов детекции РНК вируса бешенства является ОТ-ПЦР [44–51]. С помощью ПЦР диагноз можно поставить до 5 ч. Кроме того, применение автоматического секвенирования позволяет получить характеристику изолятов в течение 16 ч.

В большинстве случаев ПЦР применяют для штаммовой дифференциации вируса бешенства [45, 47–49] и для идентификации полевых изолятов вируса бешенства [44–46]. Авторы отмечают высокую чувствительность этой реакции, которая составила $1–10 \text{ LD}_{50}/\text{мл}$.

Установлено применение ОТ-ПЦР для прижизненного обнаружения вирусной РНК в слюне, спинномозговой жидкости инфицированных животных [50] и биоптате слюнной железы [51].

С помощью молекулярно-генетических исследований [52–54] показано, что на территории России в популяциях наземных млекопитающих циркулируют две основные группы вирусов группы бешенства. Первая – это группа арктических вирусов, в которой выделяют две подгруппы: собственно арктических А и арктически подобных Б. Ко второй группе относят широко распространенные вирусы-космополиты, описанные Н. Bourhy и соавт. [48]. На территории России эта группа представлена четырьмя подгруппами (цит. и далее [32]). Описаны филогенетические подгруппы вирусов бешенства, соответствующие определенным географическим террито-

риям [49, 52–54]. При этом связь с каким-либо одним специфическим хозяином генетическое подтверждение не получила.

Реакция нейтрализации. Для идентификации возбудителя бешенства, а также для количественной оценки и определения активности антирабической сыворотки и иммуноглобулина используют реакцию нейтрализации (РН). РН на белых мышах – достаточно трудоемкий и длительный по времени метод [55]. Для контроля уровня поствакцинальных антирабических антител ВОЗ рекомендует применять РН в культуре клеток [56].

Заключение

Применяемые в ветеринарной практике традиционные методы и средства лабораторной диагностики бешенства согласно существующему ГОСТу 26 075-84 имеют определенные недостатки: низкую чувствительность и недостаточную специфичность (световая микроскопия), длительность получения результатов экспертиз и трудоемкость (биопроба на белых мышах). В связи с этим, перспективно включение в государственный стандарт эффективных экспресс-методов лабораторной диагностики бешенства, таких как ИФА и выделение возбудителя бешенства в перевиваемых культурах клеток нейроblastомы и НГУК-1, которые отличаются высокой чувствительностью и специфичностью, а также сокращением времени на проведение исследований экспертного материала. Так, порог чувствительности метода ИФА составляет 3,3 Ig LD₅₀/мл, время анализа проб – 5–6 ч. Время анализа проб методом выделения возбудителя бешенства в культуре клеток НГУК-1 составляет 24–72 ч против 28–30 сут при постановке биопробы согласно действующему ГОСТу при совпадении результатов анализа с последней в 100% случаев, по МФА и ИФА – в 97,4 и 98,4% соответственно. При этом одновременное проведение исследований патологического материала по МФА и ИФА позволяет получить более достоверный результат. Выделение возбудителя бешенства в культуре клеток НГУК-1 можно рассматривать как возможную замену биопробы на белых мышах.

Кроме того, по данным многих авторов [6, 26], методом ИФА можно исследовать гнилостный патологический материал и консервированный глицерином, т. е. в тех случаях, когда исследования по МФА не представляются возможными.

Вместе с тем научно-практический интерес представляет метод обнаружения генома вируса бешенства – ОТ-ПЦР, с помощью которого диагноз можно поставить до 5 ч, а применение автоматического секвенирования позволяет получить характеристику изолятов в течение 16 ч [44–51]. Авторы отмечают высокую чувствительность этой реакции, составляющую 1–10 LD₅₀/мл. Необходимо отметить также перспективность применения ОТ-ПЦР для штаммовой дифференциации [65, 68], в том числе для дифференциации вакцинных штаммов от эпизоотических изолятов вируса бешенства, выделенных на территориях проведения оральной антирабической вакцинации дикой фауны, а также для прижизненной диагностики данного зооноза.

Таким образом, данные литературы, а также результаты собственных исследований свидетельствуют о высокой чувствительности и специфичности таких экспресс-методов идентификации возбудителя бешенства, как ИФА, обнаружение генома вируса бешенства – ОТ-ПЦР, выделение рабического вируса в культуре клеток нейроblastомы или НГУК-1, а также об их перспективности для включения в государственный стандарт, что обеспечит раннюю диагностику бешенства у животных и снизит риск заболевания животных и людей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гулюкин М.И., Ведерников В.А. Ситуация уже кризисная. *Ветеринарная жизнь*. 2008; 12: 6–8.
2. Гулюкин А.М. *Эпизоотологический мониторинг и совершенствование серологического контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства: Автореф. дис... канд. биол. наук*. Казань; 2011.
3. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Грибенча С.В. Итоги изучения антигенного и генетического разнообразия вируса бешенства в популяциях наземных млекопитающих России. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(3): 9–16.
4. Грибенча С.В., Львов Д.К. Рабдовирусы. В кн.: *Львов Д.К., ред. Медицинская вирусология*. М.: МИА; 2008: 586–94.
5. Онищенко Г.Г. *Об усилении мероприятий по борьбе с бешенством в Российской Федерации. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 1 февраля 2012 г. № 13 «Об усилении мероприятий, направленных на профилактику бешенства в РФ»*. Зарегистрировано в Минюсте РФ 15 марта 2012 г. № 23493.
6. Хисматуллина Н.А., Юсупов Р.Х., Селимов М.А., Янбарисова С.Р. Разработка экспресс-методов иммунологического мониторинга при бешенстве. *Вопросы вирусологии*. 2001; 5: 45–8.
7. Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. In: *Laboratory techniques in rabies. 4-th ed.* Geneva: WHO; 1996: 9–27.
8. Селимов М.А. *Бешенство*. М.: Медицина; 1978.
9. Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Чернов А.Н., Гулюкин А.М. *Бешенство: этиология, эпизоотология, диагностика: учебно-методическое пособие в иллюстрациях*. М.: Колос; 2010: 20–35.
10. *Государственный стандарт СССР 26075-84. Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики бешенства*. Введ. 9.01.1984. М.: Государственный комитет СССР по стандартам; 1984.
11. Tierkel E.S. Reaped microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological test. In: *Kaplan M.M., Koprowski H., eds. Laboratory techniques in rabies*. Geneva: WHO; 1973: 41.
12. Atanasiu P. Animal inoculation and the Negri body. In: Baer G.M., ed. *The natural history of rabies vol. 1*. New York: Academic Press; 1975: 373.
13. Груздев К.Н., Недосеков В.В. *Бешенство животных*. М.: «АК-ВАРИУМ»; 2001.
14. Селимов М.А. *Современные достижения в области рабиологии: обзорная информация*. М.: ВНИИМИ; 1987: 4.
15. Недосеков В.В. *Разработка и совершенствование средств и методов диагностики бешенства животных и контроля эффективности антирабических вакцин: Автореф. дис. ... д-ра вет. наук*. Псков; 2003.
16. Schneider L.G. The cornea test: a new method for the intra-vital diagnosis of rabies. *Zentralbl. Veterinaer. Med.* 1969; 16 (1): 24–31.
17. Ковалев Н.А., Шашенько А.С. Иммунофлуоресцентное исследование отпечатков роговицы при бешенстве. *Ветеринария*. 1970; 9: 44–6.
18. Хисматуллина Н.А., Савицкая Т.А., Тимиргалеев Р.В. и др. Прижизненная диагностика гидрофобии. В кн.: *Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: Труды Международной научно-практической конференции, посвящ. 45-летию создания ВНИИВВиМ*. Псков; 2003: 157–61.
19. Грибенча С.В., Козлов А.Ю., Костина Л.В., Елаков А.Л., Лосич М.А., Цибезов В.В., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2013; 5: 38–43.
20. Тимиргалеев Р.В. *Усовершенствование методов идентификации вируса бешенства и выявления антирабических антител: Автореф. дис. ... канд. вет. наук*. Казань; 2006.
21. Самуйленко А.Я., Рубан Е.А., Еремец В.И., Гринь С.А., Ключкина В.И. и др. Современные биотехнологические методы при промышленном производстве ветеринарных препаратов. В кн.: *Материалы Международной научно-практической конференции*. Щелково; 2007: 6–10.
22. Smith A.L., Tignor G.H., Emmons R.W., Woodie J.D. Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures. *Intervirology*. 1978; 96: 359–61.
23. Rudd R.J. Neurablastoma cell line sensitized with DEA-dextran for routine isolation of street strain rabies virus. *Rabies Information Exchange*. 1985: 12–20.
24. Татаров А.Г., Хисматуллина Н.А., Селимов М.А., Кармышева В.Я. Выделение рабического вируса и экспресс-диагностика бешенства в культуре перевиваемых клеток нейробластомы Гассерова узла крысы. *Вопросы вирусологии*. 1987; 6: 619–21.

25. Хисматуллина Н.А. *Разработка и усовершенствование лабораторных методов диагностики бешенства: Автореф. дис.... канд. биол. наук.* Казань; 1989.
26. Чернов С.М., Ботвинкин А.Д., Грибанова Л.Я. и др. Анализ эффективности твердофазного иммуоферментного метода для ускоренной диагностики бешенства. В кн.: *Природноочаговые болезни человека.* Омск; 1989: 90.
27. Wiktor T.J., Koprowski H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978; 75: 3938–42.
28. Schneider L.G. Application of monoclonal antibodies for epidemiological investigation and oral vaccination studies. II. Arctic viruses. In: *Rabies in the tropics: Proceedings of the international conference on rabies control in the tropics.* Tunis, 1983. Berlin: Springer-Verlag; 1985: 47–59.
29. Smith J.S., King A.A. Monoclonal antibodies for the identification of rabies and non – rabies lyssaviruses. In: *Laboratory techniques in rabies. 4th ed.* Geneva; 1996: 145–56.
30. King A., Davies P., Lawrie A. The rabies viruses of bats. *Vet. Microbiol.* 1990; 23: 165–74.
31. Селимов М.А., Ботвинкин А.Д., Татаров А.Г. Идентификация штаммов сивлятического и арктического бешенства с помощью моноклональных антител. *Вопросы вирусологии.* 1983; 2: 243–44.
32. Полешук Е.М., Сидоров Г.Н., Березина Е.С. Бешенство в Российской Федерации. *Информационно-аналитический бюллетень.* Омск; 2013: 1–65.
33. Ботвинкин А.Д., Селимов М.А., Ключева Е.В., Грибанова Л.Я., Хисматуллина Н.А. Антигенная характеристика полевых штаммов вируса бешенства из различных районов СССР с помощью антинуклеокапсидных моноклональных антител. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1990; 1: 50–4.
34. Ботвинкин А.Д. *Особенности эпидемиологии гидрофобии и экология вируса бешенства в условиях преобладания очагов природного типа: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук в форме научного доклада.* М.; 1992.
35. Ботвинкин А.Д., Кузьмин И.В., Хисматуллина Н.А. Итоги изучения антигенного разнообразия вируса бешенства на территории бывшего СССР. *Ветеринарная патология.* 2004; 3: 117–26.
36. Metlin A.E., Cox J., Rybacov S.S. et al. Monoclonal antibody characterization of rabies virus isolates from Russia, Finland and Estonia. *J. Vet. Med.* 2004; 51: 94–6.
37. Гривенча С.В. *Современные аспекты биологии и профилактики лиссавирусных инфекций: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.* М.; 1993.
38. Селимов М.А., Ботвинкин А.Д., Хозинский В.В., Грибанова Л.Я. Новые данные о распространении Р-41 положительных штаммов рабического вируса в арктическом и внearктическом регионах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1994; 2: 53–6.
39. Selimov M.A., Tatarov A.G., Botvinkin A.D., Kulikova L.I., Khismatullina N.A. Lissa-like Juli virus and its identification using nucleocapsid monoclonal antibodies. *Rabies information Exchange.* 1987; June: 5–15.
40. Selimov M., King A., Kluyeva E. et al. Antigenic variation in rabies viruses of the USSR. *Rabies Information Exchange.* 1988; 17: 40–2.
41. Selimov M.A., Tatarov A.G., Botvinkin A.D., Kulikova L.G., Khismatullina N.A. Rabies – Related Yuli – virus; identification with a panel of Monoclonal Antibodies. *Acta Virol.* 1989; 33: 542–5.
42. Кузьмин И.В., Ботвинкин А.Д., Рыбин С.Н., Баялиев А.В. Лиссавирус с необычной антигенной структурой, выделенный от летучей мыши на юге Кыргызстана. *Вопросы вирусологии.* 1992; 5–6: 256–9.
43. Леонова Г.Н., Беликов С.И., Кондратьев И.Г. и др. Изоляция и изучение лиссавируса, вызвавшего летальную инфекцию у человека в Приморском крае. В кн.: *Актуальные проблемы природной очаговости болезней: Материалы Всероссийской конференции с международным участием.* Омск: ИЦ «Омский издательский центр»; 2009: 115–7.
44. Метлин А.Е. *Молекулярно-биологические характеристики полевых изолятов и аттенуированных штаммов вируса бешенства: Автореф. дис. ... канд. вет. наук.* Владимир; 2004.
45. Black E.M., Lowings J.P., Smith J. et al. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. *J. Virol. Meth.* 2002; 105 (1): 25–35.
46. Sacramento D., Bourhy H., Tordo N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol. Cell. Probes.* 1991; 5 (3): 229–40.
47. Tordo N., Sacramento D., Bourhy H. The polymerase chain reaction (PCR) technique for diagnosis, typing and epidemiological studies of rabies. In: *Kaplan M.M., Koprowski H., Meslin F.-X., eds. Laboratory techniques in rabies.* Geneva: WHO; 1996: 157–70.
48. Bourhy H., Reynes J., Dunham E. et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 2673–81.
49. Nadin-Davis S.A., Simani S., Armstrong J., Fayaz A., Wandeler A.I. Molecular and antigenic characterization of rabies viruses from Iran identifies variants with distinct epidemiological origins. *Epidemiol. Infect.* 2003; 131: 777–90.
50. Crepin P., Audru L., Rotivel Y. et al. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36. (4): 1117–21.
51. Nagaraj T., Vasanth J.P., Desai A. et al. 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.
52. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., McElhinney L.M. et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *J. Wildlife Dis.* 2004; 40 (4): 617–31.
53. Kuzmin I.V., Hughes G.J., Botvinkin A.D. et al. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. *Virus Res.* 2005; 111 (1): 28–43.
54. Kuzmin I.V., Wu X., Tordo N. et al. Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention to the polymerase gene and non-coding regions. *Virus Res.* 2008; 136 (1–2): 81–90.
55. Stantic-Pavlinic M., Hostnik P., Levicnik-Stezinar S., Zaletel-Kragelj L. Vaccination against rabies and protective antibodies – comparison of ELISA and fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) assays. *Veterinarski Arhiv.* 2006; 76 (4): 281–89.
56. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. In: *OIE terrestrial manual.* 2008; Pt 2, sect. 1, Ch. 2.1.13: 304–23.

REFERENCES

- Gulyukin M. I., Vedernikov V. A. The situation is already critical. *Veterinarnaya zhizn.* 2008; 12: 6–8. (in Russian)
- Gulyukin A.M. *Epizootological monitoring and improving serologic control methods of rabies vaccine prevention efficiency: Diss.* Kazan; 2011. (in Russian).
- Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Gribencha S.V. Results of investigation of rabies virus antigenic and genetic variety in land mammals populations in Russia. *Voprosy virusologii.* 2013; 58(3): 9–16. (in Russian)
- Gribencha S.V., Lvov D.K. Rabdoviruses. In: L'vov D.K., ed. *Medicinskaya virusologiya.* Moscow: MIA; 2008: 586–94. (in Russian)
- Onischinko G.G. *On strengthening rabies control measures in the Russian Federation. Decree of chief state sanitation doctor of Russian Federation of 1st February, 2012 N 13 "On strengthening rabies control measures in the Russian Federation".* Registered in Russian Federation Ministry of Justice of March 15, 2012 № 23493. (in Russian)
- Khismatullina N.A., Yusupov R.Kh., Selimov M.A., Yanbarisova S.R. Developing rabies immunological monitoring rapid methods. *Voprosy virusologii.* 2001; 5: 45–8. (in Russian)
- Meslin F.X., Kaplan M.M., Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. In: *Laboratory techniques in rabies. 4-th ed.* Geneva: WHO; 1996: 9–27.
- Selimov M.A. *Rabies.* M.: Medicine, 1978. (in Russian)
- Ivanov A.V., Khismatullina N.A., Chernov A.N., Gulyukin A.M. *Rabies: etiology, epizootology, diagnostics: manual with pictures.* Moscow: Kolos; 2010: 20–35. (in Russian)
- State Standart 26075-84 USSR. *Livestock animals. Methods of laboratory diagnosis of rabies.* Introduced. 09.01.1984, Moscow: USSR State Committee for Standards; 1984. (in Russian)
- Tierkel E.S. Reaped microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological test. In: *Kaplan M.M., Koprowski H., eds. Laboratory techniques in rabies.* Geneva: WHO; 1973: 41.
- Atanasiu P. Animal inoculation and the Negri body. In: Baer G.M., ed. *The natural history of rabies vol. 1.* New York: Academic Press; 1975: 373.
- Gruzdev K.N., Nedosekov V.V. *Animal rabies.* Moscow: "AQUARIUM"; 2001. (in Russian)
- Selimov M.A. *Sovremennye dostizheniya v oblasti rabiologii: Review.* Moscow: VNIIMI; 1987: 4. (in Russian)
- Nedosekov V.V. *Developing and improving the methods for animal rabies detection and anti-rabies vaccines efficiency control: Diss.* Pokrov; 2003. (in Russian)
- Schneider L.G. The cornea test: a new method for the intra-vital diagnosis of rabies. *Zentrabl. Veterinaer. Med.* 1969; 16 (1): 24–31.

17. Kovalev N.A., Shashenko A.S. Immunofluorescence study of corneal prints furious. *Veterinariya*. 1970; 9: 44–6.
18. Khismatullina N.A., Savitskaya T.A., Timirgaleev R.V. et al. Hydrophobia in-vivo diagnostics. In: *Zooathropozoses veterinary and medical aspects: Proceedings of international scientific conference dedicated to the 45th anniversary VNIIVVM*. Pokrov; 2003: 157–61. (in Russian)
19. Gribencha S.V., Kozlov A.Yu., Kostina L.V., Elakov A.L., Losich M.A., Tsibezov V.V., Zaberezhny A.D., Aliper T.I. Producing monoclonal antibodies against rabies virus nucleoprotein. *Voprosy virusologii*. 2013; 5: 38–43. (in Russian)
20. Timirgaleev R.V. *Improving rabies virus identification methods and rabies antibody detection: Diss.* Kazan; 2006. (in Russian)
21. Samuylenko A.Ya., Ruban Ye.A., Yeremets V.I., Grin S.A., Klyukina V.I. et al. *Modern biotechnological methods in veterinary preparations production*. In: *Proceeding from international research conference*. Scholkovo; 2007: 6–10. (in Russian)
22. Smith A.L., Tignor G.H., Emmons R.W., Woodie J.D. Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures. *Intervirology*. 1978; 96: 359–61.
23. Rudd R.J. Neurblastoma cell line sensitized with DEA-dextran for routine isolation of street strain rabies virus. *Rabies Information Exchange*. 1985: 12–20.
24. Tatarov A.G., Khismatullina N.A., Selimov M.A., Karmysheva V.Ja. Rabies virus isolation and rapid detection using passed cells of rat Gasserian ganglion neurinoma. *Voprosy virusologii*. 1987; 6: 619–21. (in Russian)
25. Khismatullina N.A. *Rabies detection laboratory methods development and improvement: Diss.* Kazan; 1989. (in Russian)
26. Chernov S.M., Botvinkin A.D., Gribanova L.D. et al. ELISA method efficiency analyses for rabies rapid detection. In: *Prirudnoochagovye bolezni cheloveka*. Omsk; 1989: 90. (in Russian)
27. Wiktor T.J., Koprowski H. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978; 75: 3938–42.
28. Schneider L.G. Application of monoclonal antibodies for epidemiological investigation and oral vaccination studies. II. Arctic viruses. In: *Rabies in the tropics: Proceedings of the international conference on rabies control in the tropics*. Tunis, 1983. Berlin: Springer-Verlag; 1985: 47–59.
29. Smith J.S., King A.A. Monoclonal antibodies for the identification of rabies and non – rabies lyssaviruses. In: *Laboratory techniques in rabies. 4th ed.* Geneva; 1996: 145–56.
30. King A., Davies P., Lawrie A. The rabies viruses of bats. *Vet. Microbiol.* 1990; 23: 165–74.
31. Selimov M.A., Botvinkin A.D., Tatarov A.G. Identification of silvatic and arctic rabies strains using monoclonal antibodies. *Voprosy virusologii*. 1983; 2: 243–44. (in Russian)
32. Poleschuk E.M., Sidorov G.N., Berezina E.S. Rabies in the Russian Federation. *Information and analytical bulletin*. Omsk; 2013. (in Russian)
33. Botvinkin A.D., Selimov M.A., Klyuyeva E.V., Gribanova L.Ya., Khismatullina N.A. Using nucleocapsid monoclonal antibodies for antigenic characterization of rabies virus field strains from various regions of the USSR. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 1990; 1: 50–4. (in Russian)
34. Botvinkin A.D. *Specific features of hydrophobia epidemiology and rabies virus ecology at natural foci prevalence: Diss.* Moscow; 1992. (in Russian)
35. Botvinkin A.D., Kuzmin I.V., Khismatullina N.A. Results of rabies virus antigenic diversity investigation in former USSR area. *Veterinarnaya pathology*. 2004; 3: 117–26. (in Russian)
36. Metlin A.E., Cox J., Rybacov S.S. et al. Monoclonal antibody characterization of rabies virus isolates from Russia, Finland and Estonia. *J. Vet. Med.* 2004; 51: 94–6.
37. Gribencha S.V. *Modern aspects of biology and lissaviral infections prevention: Diss.* Mosow; 1993. (in Russian)
38. Selimov M.A., Botvinkin A.D., Hozinsky V.V., Gribanova L.J. New data on distribution of rabies virus P-41 positive strains in the Arctic and Non-arctic regions. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 1994; 2: 53–6. (in Russian)
39. Selimov M.A., Tatarov A.G., Botvinkin A.D., Kulikova L.I., Khismatullina N.A. Lissa-like Juli virus and its identification using nucleocapsid monoclonal antibodies. *Rabies information Exchange*. 1987; June: 5–15.
40. Selimov M., King A., Kluyeva E. et al. Antigenic variation in rabies viruses of the USSR. *Rabies Information Exchange*. 1988; 17: 40–2.
41. Selimov M.A., Tatarov A.G., Botvinkin A.D., Kulikova L.G., Khismatullina N.A. Rabies – Related Yuli – virus; identification with a panel of Monoclonal Antibodies. *Acta Virol.* 1989; 33: 542–5.
42. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., Rybin C.N., Bayaliyev A.V. Lissavirus with the unusual antigenic structure isolated from a bat in the south of Kyrgyzstan. *Voprosy virusologii*. 1992; 5–6: 256–9. (in Russian)
43. Leonova G.N., Belikov S.I., Kondratyev I.G. et al. Isolation and study of lissavirus that caused human lethal infection in Primorsky Territory. In: *Current problems of natural foci illnesses: Proceedings from All-Russian conference with international participation*. Omsk: Publishing Center “Omsk publishing centre”; 2009: 115–7. (in Russian)
44. Metlin A.E. *Molecular and genetic characteristics of rabies virus field isolates and attenuated strains: Diss.* Vladimir; 2004. (in Russian)
45. Black E.M., Lowings J.P., Smith J. et al. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. *J. Virol. Meth.* 2002; 105 (1): 25–35.
46. Sacramento D., Bourhy H., Tordo N. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Mol. Cell. probes*. 1991; 5 (3): 229–40.
47. Tordo N., Sacramento D., Bourhy H. The polymerase chain reaction (PCR) technique for diagnosis, typing and epidemiological studies of rabies. In: *Kaplan M.M., Koprowski H., Meslin F.-X., eds. Laboratory techniques in rabies*. Geneva: WHO; 1996: 157–70.
48. Bourhy H., Reynes J., Dunham E. et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 2673–81.
49. Nadin-Davis S.A., Simani S., Armstrong J., Fayaz A., Wandeler A.I. Molecular and antigenic characterization of rabies viruses from Iran identifies variants with distinct epidemiological origins. *Epidemiol. Infect.* 2003; 131: 777–90.
50. Crepin P., Audru L., Rotivel Y. et al. Intravitam diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36. (4): 1117–21.
51. Nagaraj T., Vasanth J.P., Desai A. et al. 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.
52. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., McElhinney L.M. et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *J. Wildlife Dis.* 2004; 40 (4): 617–31.
53. Kuzmin I.V., Hughes G.J., Botvinkin A.D. et al. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition. *Virus Res.* 2005; 111(1): 28–43.
54. Kuzmin I.V., Wu X., Tordo N. et al. Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention to the polymerase gene and non-coding regions. *Virus Res.* 2008; 136 (1–2): 81–90.
55. Stantic-Pavlinic M., Hostnik P., Levicnik-Stezinar S., Zaletel-Kragelj L. Vaccination against rabies and protective antibodies – comparison of ELISA and fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) assays. *Veterinarski Arhiv.* 2006; 76 (4): 281–9.
56. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. In: *OIE terrestrial manual*. 2008; Pt 2, sect. 1, Ch. 2.1.13: 304–23.

Поступила 16.01.14

Received 16.01.14