

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-6-15

УДК 616.98:578.824.11

С.В. Борисевич, М.Н. Писцов, В.В. Рубцов, Д.А. Кутаев, А.В. Суровяткин, А.М. Бережной,
А.А. Петров, А.В. Казанцев, А.Ю. Зверев, А.В. Маношкин, В.Т. Кротков, Р.В. Сахаров,
О.В. Чухраля, С.Н. Хмуренко, С.В. Савенко, А.Ю. Поярков

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БЕШЕНСТВА. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И НАПРАВЛЕНИЕ РАЗВИТИЯ

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад,
Российская Федерация

В обзоре рассмотрены актуальные аспекты лабораторной диагностики бешенства. Приведены методы лабораторной диагностики рабической инфекции, стандартизованные ВОЗ в 2018 г., и их применение на территории Российской Федерации. Показана схема лабораторной диагностики бешенства, применяемая специалистами ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России для исследования поступивших проб биологического материала от погибших людей. В период 2002–2018 гг. изучение биоматериала проводили при помощи молекулярно-биологического, вирусологического методов диагностики и в некоторых случаях электронной микроскопии, что позволило выявить и идентифицировать возбудитель в 257 пробах от 71 человека, паспортизировать и депонировать новые изоляты вируса бешенства. Накопление и анализ опыта применения молекулярно-биологического метода диагностики бешенства позволяют рекомендовать к использованию наборы ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР-РВ (имеющие удостоверение о государственной регистрации) в практике здравоохранения и ветеринарии для идентификации возбудителя рабической инфекции. Применение молекулярно-биологических методов представляется перспективным в плане развития диагностики бешенства для совершенствования эпидемиологического надзора и повышения эффективности системы биологической защиты населения Российской Федерации.

Ключевые слова: бешенство, уличный вирус бешенства, лабораторная диагностика.

Корреспондирующий автор: Борисевич Сергей Владимирович, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Для цитирования: Борисевич С.В., Писцов М.Н., Рубцов В.В., Кутаев Д.А., Суровяткин А.В., Бережной А.М., Петров А.А., Казанцев А.В., Зверев А.Ю., Маношкин А.В., Кротков В.Т., Сахаров Р.В., Чухраля О.В., Хмуренко С.Н., Савенко С.В., Поярков А.Ю. Лабораторная диагностика бешенства. Современное состояние и направление развития. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:6–15. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-6-15
Поступила 09.01.2020. Отправлена на доработку 07.09.2020. Принята к публ. 24.12.2020.

S.V. Borisevich, M.N. Pistsov, V.V. Rubtsov, D.A. Kutaev, A.V. Surovyatkin, A.M. Berezhnoy,
A.A. Petrov, A.V. Kazantsev, A.Yu. Zverev, A.V. Manoshkin, V.T. Krotkov, R.V. Sakharov,
O.V. Chukhralya, S.N. Khmurenko, S.V. Savenko, A.Yu. Poyarkov

Laboratory Diagnosis of Rabies. Current State and Trends in Development

48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation

Abstract. The review considers the relevant aspects of laboratory diagnosis of rabies. The methods of laboratory diagnostics of rabies infection, standardized by WHO in 2018, and their use in the Russian Federation are presented. The scheme of laboratory diagnostics of rabies, applied by specialists of the “48th CRI” of the Ministry of Defense of Russia, for the study of biological samples from deceased people is outlined. Between 2002 and 2018, the study of biomaterial was carried out using molecular-biological, virological methods of diagnosis and in some cases electron microscopy, which allowed to detect and identify the pathogen in 257 samples from 71 people, to certify and deposit new isolates of the rabies virus. Accumulation and analysis of the lessons learned in the application of molecular-biological method of rabies diagnosis allows us to recommend the use of RT-PCR, real-time RT-PCR sets (having a certificate of state registration) in healthcare and veterinary medicine practice to identify the causative agent of rabies infection. The use of molecular-biological methods is promising in terms of the development of rabies diagnosis to improve epidemiological surveillance and raise the efficiency of the biological protection of the population of the Russian Federation.

Key words: rabies, street rabies virus, laboratory diagnostics.

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

Corresponding author: Sergey V. Borisevich, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Citation: Borisevich S.V., Pistsov M.N., Rubtsov V.V., Kutaev D.A., Surovyatkin A.V., Berezhnoy A.M., Petrov A.A., Kazantsev A.V., Zverev A.Yu., Manoshkin A.V., Krotkov V.T., Sakharov R.V., Chukhralya O.V., Khmurenko S.N., Savenko S.V., Poyarkov A.Yu. Laboratory Diagnosis of Rabies. Current State and Trends in Development. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 2:6–15. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-6-15
Received 09.01.2020. Revised 07.09.2020. Accepted 24.12.2020.

Borisevich S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Rubtsov V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4387-0367>

Kutaev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4236-1368>

Petrov A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9714-2085>

Kazantsev A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3072-9110>

Manoshkin A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6766-1917>

Krotkov V.T., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7674-2321>

Sakharov R.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6155-1365>

Khmurenko S.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2606-5705>

Savenko S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5175-916X>

Бешенство – опасная вирусная инфекция зоонозной природы с абсолютной летальностью, возбудителем которой является нейротропный вирус рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. По официальным данным [1], опубликованным в 2018 г. Международным комитетом по таксономии вирусов (МКТВ), род *Lyssavirus* представлен 16 видами. Случаи заболевания и гибели людей были вызваны 7 видами лиссавирусов: *Australian bat lyssavirus*, *Duvenhage lyssavirus*, *European bat 1 lyssavirus*, *European bat 2 lyssavirus*, *Irkut lyssavirus*, *Mokola lyssavirus*, *Rabies lyssavirus*. На территории Российской Федерации циркулирует преимущественно классический (уличный) вирус бешенства – *Rabies lyssavirus*, но зарегистрирована также циркуляция лиссавирусов других видов среди летучих мышей, а именно: *European bat 1 lyssavirus*, *Irkut lyssavirus*, *West Caucasian bat lyssavirus* [2, 3]. Сведения о представителях рода *Lyssavirus* приведены в табл. 1.

Бешенство является природно-очаговой инфекцией, общей для человека и животных. Абсолютная фатальность и эволюция этой болезни придают этой ветеринарно-медицинскую проблему в разряд первостепенных [4].

Главной задачей работы глобального Альянса (Всемирная организация здравоохранения, Всемирная организация по охране здоровья животных, Продовольственная и сельскохозяйственная организация Организации Объединенных Наций) по контролю за бешенством в мире является ликвидация к 2030 г. гибели людей от бешенства. В наши дни разработаны и разрабатываются программы по борьбе и ликвидации бешенства во многих странах на разных континентах [3, 5].

Нозоареал рабической инфекции имеет огромные масштабы. В представленных данных ВОЗ за период 2010–2018 гг. наиболее эпидемиологически

Таблица 1 / Table 1

Основные данные о представителях рода *Lyssavirus* [1–3]
Basic data on representatives of the genus *Lyssavirus*

Вид вируса Virus species	Распространение (территория циркуляции вируса) Dissemination (area of the virus circulation)	Животные – источники инфекции Animals – sources of infection	Патогенность для человека Pathogenicity for humans
<i>Aravan lyssavirus</i>	Центральная Азия Central Asia	Летучие мыши Bats	–
<i>Australian bat lyssavirus</i>	Австралия Australia	Летучие мыши Bats	+
<i>Bokeloh bat lyssavirus</i>	Западная и Восточная Европа West and East Europe	Летучие мыши Bats	–
<i>Duvenhage lyssavirus</i>	Южная Африка South Africa	Летучие мыши Bats	+
<i>European bat 1 lyssavirus</i>	Европа и европейская часть России Europe and European part of Russia	Летучие мыши Bats	+
<i>European bat 2 lyssavirus</i>	Европа Europe	Летучие мыши Bats	+
<i>Gannoruwa bat lyssavirus</i>	Южная Азия South Asia	Летучая лисица Flying fox	–
<i>Ikoma lyssavirus</i>	Восточная Африка East Africa	Циветта Civet	–
<i>Irkut lyssavirus</i>	Восточная Сибирь, Китай East Siberia, China	Летучие мыши Bats	+
<i>Khujand lyssavirus</i>	Центральная Азия Central Asia	Летучие мыши Bats	–
<i>Lagos bat lyssavirus</i>	Центральная и Южная Африка Central and South Africa	Летучие мыши, собака, кошка Bats, dogs, cats	–
<i>Lleida bat lyssavirus</i>	Юго-Западная Европа South-Western Europe	Летучие мыши Bats	–
<i>Mokola lyssavirus</i>	Центральная и Южная Африка Central and South Africa	Собака, кошка, землеройка Dogs, cats, shrews	+
<i>Rabies lyssavirus</i>	Европа, Азия, Америка, Африка Europe, Asia, America, Africa	Млекопитающие Mammals	+
<i>Shimoni bat lyssavirus</i>	Восточная Африка East Africa	Летучие мыши Bats	–
<i>West Caucasian bat lyssavirus</i>	Кавказ, Африка Caucasus, Africa	Летучие мыши Bats	–

Примечание: «–» – нет данных; «+» – зарегистрированы случаи заболевания и гибели людей.

Note: “–” – no data; “+” – registered cases of the disease and death of people.

неблагополучными в мире признаны страны Азии и Африки. В странах Европы наибольшее количество летальных случаев зарегистрировано на территории Российской Федерации [2, 3].

На протяжении последних лет эпидемиологическая обстановка по бешенству в Российской Федерации оценивается как неустойчивая. Проблема бешенства особенно актуальна для Центрального и Приволжского федеральных округов, где географически выделяется территория Среднерусского природно-очагового региона, в котором в последнее десятилетие произошло осложнение эпизоотической обстановки, обусловленное активизацией природных очагов [6]. Максимальная интенсивность эпизоотий среди диких плотоядных животных отмечается в регионах Центральной России и Поволжья с 2014 г., при этом основным резервуаром рабической инфекции является лисица. В эпизоотический процесс активно вовлекаются дикие (енотовидная собака, волк) и домашние (собаки, кошки) животные, служащие источником заражения людей вирусом бешенства [7]. В плотном кольце эпизоотий впервые оказалась Москва. И это неслучайно, так как Центральная Россия и прежде всего Московский регион являются наиболее урбанизированными территориями, на которых создаются особые условия для циркуляции возбудителя среди животных.

На современном этапе борьбы с бешенством особенное значение имеет система эпидемиологического надзора, непосредственно связанная с качественной диагностикой данного заболевания.

Цель работы – обобщить и проанализировать современное состояние и направление развития в области лабораторной диагностики бешенства и представить объективные информационные материалы о результатах применения лабораторных методов, используемых в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, для диагностического тестирования возбудителя бешенства.

Общепринятой в мире является комплексная стратегия диагностики бешенства, построенная на основании совокупности эпидемиологических, эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и лабораторных методов [3, 8, 9]. Окончательный диагноз бешенства может быть поставлен только с помощью лабораторных методов. Среди последних рекомендаций ВОЗ в 2018 г. стандартизованы и рекомендованы к применению следующие методы: иммунохимический, молекулярно-биологический и вирусологический с помощью биологической пробы на мышцах либо использования культуры клеток [3].

Применение того или иного метода зависит от задачи исследования. Для некоторых базовых методов (иммуногистохимический, иммуноферментный анализ) разработаны свои разновидности (варианты) диагностического теста.

Экспертами ВОЗ рекомендованы следующие методы лабораторной диагностики бешенства: ме-

тод флуоресцирующих антител (МФА) (FAT, direct fluorescent antibody test) – для прижизненного выявления антигена возбудителя в коже и волосяных фолликулах у подозрительных на инфицирование людей; метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) (RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction) – для идентификации вируса бешенства в коже, волосяных фолликулах, слюне, слезах, спинномозговой жидкости; культуральный метод с использованием клеток мышшиной нейробластомы (NA C1300) (RTCIT, rabies cell culture inoculation test) или биологической пробы на белых мышцах (MI, mouse inoculation test) – для выделения вируса из слюны, слез, спинномозговой жидкости. Для определения специфических антител в сыворотке крови и спинномозговой жидкости рекомендовано использовать экспресс-тест фокус-флуоресцентного ингибирования (RFFIT, rapid fluorescent focus inhibition test), или тест нейтрализации вируса флуоресцирующими антителами (FAVN, fluorescent antibody virus neutralization), или метод непрямой иммунофлуоресценции (ИФА, indirect immunofluorescence), иммуноферментный анализ (ИФА) (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) [3].

Необходимо отметить, что прижизненная диагностика бешенства на территории Российской Федерации не практикуется [10].

Для посмертной диагностики бешенства у людей ВОЗ рекомендует следующее: выявление антигена в образцах головного мозга, коже, волосяных фолликулах проводить с помощью МФА, или прямого быстрого иммуногистохимического теста (DRIT, direct rapid immunohistochemical test), или иммуногистохимического теста с фиксацией проб в формалине (ИНС, immunohistochemistry on formalin-fixed samples). Кроме того, для идентификации вируса бешенства в пробах головного мозга, коже, волосяных фолликулах рекомендуется применять ОТ-ПЦР, а выделение возбудителя из проб мозга проводить на мышцах либо культуре клеток мышшиной нейробластомы (NA C1300).

В отношении посмертной диагностики бешенства среди павших животных, согласно стандартизованным методам ВОЗ, действуют те же правила, что и для посмертного диагностического тестирования возбудителя рабической инфекции у человека [3].

В настоящее время в Российской Федерации лабораторную диагностику бешенства проводят согласно ГОСТ 26075-2013. Как правило, в лабораторной практике в учреждениях медицинского и ветеринарного профиля для выделения вируса бешенства используют МФА, ИФА, биопробу на белых мышцах, а также метод накопления вируса в культуре клеток. Перспективными и развиваемыми в применении для идентификации возбудителя бешенства являются молекулярно-генетические методы (ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ) и метод флуоресцирующих моноклональных антител (МКА) [11, 12].

Во многих научно-исследовательских органи-

зациях ветеринарного и медицинского профиля как в мире [2, 3], так и в России в качестве основного метода для обнаружения специфического антигена вируса бешенства широко используют МФА. Данный метод признан ВОЗ базовым для обнаружения антигена [3] и является наиболее точным из всех существующих методов микроскопической диагностики. Вместе с тем для исследований МФА пригоден только свежий или свежзамороженный материал [11]. Классический вариант постановки МФА с использованием люминесцентной микроскопии характеризуется длительностью, трудоемкостью и субъективностью. При использовании МФА не исключены случаи гипердиагностики. Для повышения точности и эффективности анализа при определении активности вируса и уровня нейтрализующих антител в сыворотке крови отечественные и зарубежные исследователи предлагают использовать автоматизированный вариант количественной оценки реакции иммунофлуоресценции на основе технологии импульсной проточной цитометрии [13, 14].

В последнее десятилетие одним из значимых достижений рабиологии является разработка и внедрение прямого экспресс-иммуногистохимического теста DRIT для выявления антигена вируса бешенства. Данный метод основан на визуализации реакции антигена нуклеопротеина (N) вируса бешенства в мазках-отпечатках мозга с биотинилированными моноклональными антителами, специфическими для белка N. DRIT предполагает обработку исследуемого материала стрептавидин-пероксидазным комплексом с последующим окрашиванием гематоксилином. Конечный результат учитывается под световым микроскопом. Данный метод интенсивно используется в развивающихся странах (Танзания, Афганистан, Ирак, Индия), считается простым, экономичным, эффективным и применимым в полевых условиях, что необходимо для улучшения централизованного эпиднадзора в странах с невысоким уровнем экономики. ВОЗ поддерживает развитие данного метода и считает его альтернативным методу МФА. В то же время изложенный метод имеет существенный недостаток, заключающийся в необходимости иметь реагенты для его применения (наборы анти-N моноклональных антител), которые выпускает разработчик данного метода – Центр по контролю и профилактике заболеваний США [8, 15].

Метод диффузионной преципитации в агаровом геле является низкокочувствительным тестом, выявление вирусного антигена в исследуемом материале составляет от 45 до 70 %. Реакция положительна лишь при достаточной концентрации вирусного антигена, составляющей не менее $4,5 \lg LD_{50}/мл$ [11].

Биологическая проба на мышах, несмотря на некоторые недостатки, до сих пор остается надежным, достоверным и высококочувствительным методом выделения вируса бешенства. Кроме этого, в лабораторной и научно-исследовательской практике в мире и в России для выделения вируса бешенства исполь-

зуют культуры клеток невральное происхождения, а именно клетки мышинной нейробластомы CCL-131, невринома Гассерова узла крысы НГУК-1, мышинной нейробластомы NA C1300 [3].

Для оценки уровня антирабических антител существует несколько методов лабораторной диагностики. В мировой лабораторной практике в основном используют RFFIT и FAVN. Последний позволяет максимально точно, количественно определить титр антирабических антител. Оба указанных метода выполняют с использованием культуры клеток и вируса бешенства. Тесты трудоемки и требуют квалифицированного исполнения [9, 15]. На территории Российской Федерации имеются отдельные аккредитованные лаборатории, выполняющие диагностические исследования при помощи данных тестов для оценки уровня антирабических антител у животных.

В практике диагностики бешенства не потерял своей значимости ИФА, отличающийся простотой и невысокой стоимостью оборудования для измерения продукта иммуноферментной реакции, возможностью автоматизации, стабильностью соединений, меченных ферментами. Многие практические и научно-исследовательские лаборатории в России используют метод ИФА, порог аналитической чувствительности которого составляет не менее $3,3 \lg LD_{50}/мл$ [11].

В Российской Федерации имеется экспериментальный препарат на основе моноклональных антител для диагностики бешенства, а также других лиссавирусных инфекций. Разработчики сообщают [12], что по специфичности связывания с наиболее распространенными на территории России вирусами бешенства данная панель не уступает американскому аналогу (стандарту).

На отдельной позиции, от которой ожидают результатов высокого уровня, стоит молекулярно-биологический метод исследования. В реалиях вчерашнего дня молекулярные методы использовались лишь как вспомогательные [2], но в настоящее время в официальных документах ВОЗ в направлении идентификации возбудителя бешенства рекомендуется их применение при исследовании аутопсийного материала, поступившего от погибших людей и животных [3]. Данные литературы показывают, что за рубежом во многих странах успешно используют молекулярные методы диагностики бешенства [16–18]. Иностранцы специалисты приводят результаты исследований по молекулярной диагностике бешенства с помощью технологии ПЦР, в том числе при детекции в реальном времени [19–21]. Указанный метод позволяет идентифицировать возбудитель бешенства в образцах прогнившего биологического материала (головного мозга) при исследовании большого количества биопроб от разных видов животных [22, 23].

В Российской Федерации ряд научно-исследовательских организаций (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ФГБУ «Институт полиомие-

лита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации) разрабатывают, апробируют [10, 24–26] и применяют [27, 28] наборы реагентов для определения РНК классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Диагностические системы ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР-РВ демонстрируют высокие показатели аналитической и диагностической чувствительности [10]. Зарегистрированный в Российской Федерации в качестве медицинского изделия «Набор реагентов для выявления и идентификации РНК вируса бешенства методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОМ-Скрин-Бешенство-РВ, РЗН 2016/3575 от 25.01.2016)» имеет показатель аналитической чувствительности не более $1,0 \cdot 10^3$ копий РНК в миллилитре пробы, диагностической чувствительности – не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %, диагностической специфичности – не менее 98 % с доверительной вероятностью 90 %. В то же время разработанная коллективом авторов [10] отечественная диагностическая система в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления штаммов классического вируса бешенства, циркулирующих на территории Российской Федерации («АмплиСенс® RABV-FL»), показала свою высокую специфичность, а значение аналитической чувствительности составляло $4,0 \cdot 10^3$ копий РНК в миллилитре пробы. Результаты изучения биопроб, полученных от погибших людей, подозрительных на инфицирование вирусом бешенства, проведенного специалистами Центра специальной лабораторной диагностики особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний, г. Сергиев Посад, за период с 2002 по 2015 год, дают основание заявлять о перспективности и целесообразности применения и развития молекулярно-биологических методов [27].

Следует отметить, что кроме изложенного метода ОТ-ПЦР зарубежные исследователи ведут работы по разработке диагностических систем на основе методик петлевой изотермической амплификации, так называемой LAMP (Loop-mediated isothermal amplification), и амплификации нуклеиновых кислот NASBA (Nucleic acid sequence – based amplification). К преимуществам данных методик относят высокую специфичность, чувствительность, технологичность [15].

В то же время в рабиологии актуальным является изучение первичной структуры геномов полевых изолятов вируса бешенства. Как известно, ген N, кодирующий нуклеопротеин, является более консервативным для всех представителей рода *Lyssavirus*, чем ген G, кодирующий белок оболочки

вируса. Полученные знания могут быть полезны для контроля антирабических мероприятий и профилактики бешенства на территории Российской Федерации [29, 30].

Проведенное группой авторов сравнительное изучение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена N [29] подтвердило, что изоляты вируса бешенства, выделенные на одной территории или близлежащих территориях, генетически наиболее близки и имеют характерные молекулярные различия. При этом выявленные «маркерные» замены в предсказанных аминокислотных последовательностях нуклеопротеина позволяют предположить принадлежность изолята к той или иной группе вируса бешенства и предсказать движение эпизоотии. Исследование, проведенное в Кировской области [31], установило, что в данном случае реверсия вакцинного штамма отсутствует, так как выявлены существенные геномные различия между исследуемыми образцами и штаммом ERA333, используемым в вакцине.

Следовательно, в целях усиления мероприятий, направленных на профилактику бешенства в стране, предупреждения заболевания людей рабической инфекцией, обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации необходимо проведение качественной и эффективной лабораторной диагностики. При этом важным направлением является разработка, внедрение и применение современных диагностических наборов для исследования на вирус бешенства.

Для оказания консультативно-методической и практической помощи органам и учреждениям Роспотребнадзора и медицинским организациям субъектов Российской Федерации по вопросам эпидемиологии, профилактики и диагностики бешенства в настоящее время активно работает Референс-центр по мониторингу за бешенством, организованный согласно приказу Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116 на базе ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора.

С ноября 1999 г. в системе Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и Министерства обороны Российской Федерации функционирует штатный Центр специальной лабораторной диагностики особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний (далее – Центр) (приказы Министра обороны РФ и Минздрава РФ от 20.11.1999 № 558/416, от 14.08.2014 № 588/873), деятельность которого напрямую связана с противоэпидемической защитой территории России [32–34].

Одной из важных задач, возложенных на Центр, является проведение лабораторной диагностики на наличие вируса бешенства у людей, погибших от гидрофобии, а также выделение возбудителя данной опасной инфекции из поступивших проб, с его последующей идентификацией, консервацией и депонированием.

Практическую помощь субъектам Российской Федерации в направлении диагностики особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний, а также бешенства Центр осуществляет согласно приказу Роспотребнадзора от 01.12.2017 № 1116.

Лабораторные диагностические исследования в Центре проводят по отработанной и зарекомендовавшей себя схеме (рис. 1) в соответствии с СП 3.1.7.2627-10, СП 1.3.3118-13, ГОСТ 26075-2013, МУ 1.3.2569-09, рекомендациями ВОЗ от 2018 г. [3]. При этом объектом исследования служат пробы участков головного мозга: аммонов рог, мозжечок, кора больших полушарий, в некоторых случаях фрагменты гиппокампа, дна 3-го и 4-го желудочков, ствола мозга, лобной доли и продолговатого мозга. В некоторых случаях исследованию подвергаются также пробы слюнных желез и миндалин. Пробы от погибших людей получают согласно требованиям МУ 4.2.2839-11. Выделение вируса и определение его биологической активности проводят на белых мышях массой 6–8 г либо на мышках-сосунках. Для идентификации возбудителя бешенства используют медицинское изделие для диагностики *in vitro*, набор реагентов на основе метода одностадийной ОТ-ПЦР-РВ «ОМ-Скрин-Бешенство-РВ» (РЗН 2016/3575 от 25.01.2016) (производство компании «Синтол», Москва). Верификацию результатов ОТ-ПЦР-РВ обязательно осуществляют с помощью набора реагентов на основе метода ОТ-ПЦР «ВЦ-ПЦР-Бешенство» (ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России). Кроме этого, при работе с отдельными некачественными пробами выполняют электронно-микроскопическое выявление вирионов вируса методами негативного контраста и ультратонких препаративных срезов.

Для лучшего понимания представленной схемы (рис. 1) необходимо более подробно изложить отдельные ее составляющие.

На этапе выделения возбудителя бешенства по-

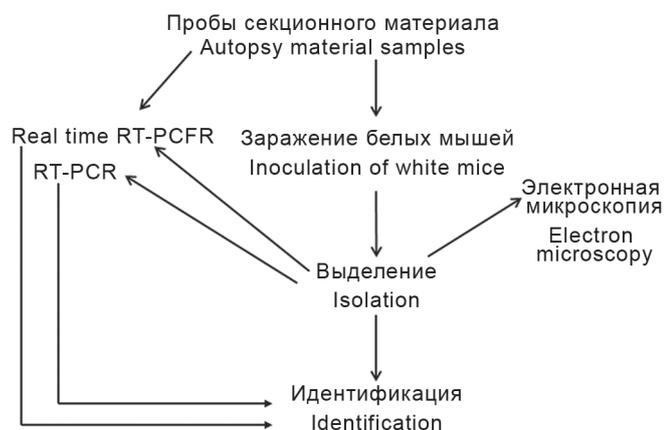


Рис. 1. Схема лабораторной диагностики бешенства, применяемая специалистами Центра для исследования поступивших проб биологического материала от погибших людей

Fig. 1. The scheme of laboratory diagnostics of rabies, used by specialists of the Center to study the received samples of biological material from deceased people

ступившие пробы растирают в фарфоровой ступке с кварцевым песком, далее на растворе Хенкса получают 10 % гомогенизированную суспензию и центрифугируют ее при 2000 об/мин в течение 10 мин. Из надосадочной жидкости готовят 10⁻¹ разведение рабочего материала вируса на растворе Хенкса. Часть приготовленного рабочего материала используют для идентификации возбудителя, а другую часть – для заражения интрацеребрально белых беспородных мышей массой 6–8 г либо мышей-сосунков. Срок наблюдения за мышами – 30 сут. От павших мышей отбирают головной мозг и готовят 10 % гомогенизированную суспензию вируса, после этого к данной суспензии добавляют 10 % раствор сахарозы с 10 % сыворотки крупного рогатого скота и лиофилизируют. Высушенный материал вируса бешенства паспортизируют по биологической активности вируса и отсутствию посторонней микрофлоры и депонируют в количестве не менее 10 ампул в музейную коллекцию вирусов.

Результаты отдельных исследований, представленные в табл. 2, свидетельствуют, что титр вируса бешенства имел значение от 1,9 до 4,4 lg ЛД₅₀/мл, а сроки гибели мышей колебались от 12 до 24 сут. Полученные данные соответствуют классическим представлениям о вирусе уличного бешенства.

На этапе выделения нуклеиновых кислот пробы подготавливают к исследованию с помощью набора реагентов «ОМ-Скрин-Бешенство-РВ». Далее пробирки с исследуемыми образцами помещают в передаточный шлюз, где их орошают 30 % раствором перекиси водорода и выдерживают в течение 30 мин. Всю последующую работу проводят по I санитарной зоне, где аликвоты РНК из полученных препаратов анализируют методом одностадийной ПЦР-РВ с использованием анализатора нуклеиновых кислот АНК-32М (производство Института аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург).

Подтверждение результатов ОТ-ПЦР-РВ обязательно осуществляют с помощью «Набора реагентов для выявления РНК вируса бешенства методом обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (ВЦ-ПЦР-Бешенство)», разработанного специалистами ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Анализ с помощью набора реагентов проводится в три этапа: проведение обратной транскрипции, проведение собственно ПЦР, проведение электрофоретической детекции продуктов ОТ-ПЦР.

Необходимо отметить, что по времени исследования и технике выполнения выигрывает метод ОТ-ПЦР-РВ. Специалистами Центра накоплен опыт использования ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ при диагностической работе с аутопсийными пробами, который показывает, что единственным источником перекрестной контаминации является этап пробоподготовки и выделения нуклеиновой кислоты, что обусловлено значительной концентрацией вирусной РНК в пробах головного мозга. Строгое использование отрицательного контроля выделения РНК позво-

Таблица 2 / Table 2

Результаты определения биологической активности уличного вируса бешенства, выделенного из отдельных проб биологического материала от погибших людей методом интрацеребрального заражения белых мышей массой 6–8 г

The results of determining the biological activity of street rabies virus isolated from individual samples of biological material from deceased people applying the method of intracerebral infection of white mice weighing 6–8 g

Обозначение погибшего человека Designation of a deceased person	Год исследования Study year	Сроки гибели белых мышей, сут Time frame of death of white mice, day	Биологическая активность, lg ЛД ₅₀ /мл Biological activity, lg LD ₅₀ /ml
Д. / D.	2002	13–19	2,8
Л. / L.	2002	12–19	4,4
О. / O.	2005	14–21	2,3
И. / I.	2006	16–20	1,9
Т. / T.	2009	18–24	2,1
Г. / G.	2014	14–20	2,9
П. / P.	2018	15–20	3,1

ляет исключить ложноположительный результат.

Для изучения поступивших проб секционного материала ненадлежащего качества проводят электронную микроскопию (рис. 2).

Данные исследования осуществляют методом негативного контраста, который позволяет изучать структуру поверхности вируса бешенства, либо методом ультратонких срезов, который предоставляет возможность определять внутреннюю структуру возбудителя. Проведение электронной микроскопии обеспечивает выявление вирионов с «пулеподобной» морфологией, длиной 170–200 нм и диаметром 70 нм, что характерно для вируса уличного бешенства.

За многолетний период (2002–2018 гг.) в Центр поступила и исследована 261 проба биологического материала от 72 погибших людей из 29 субъектов Российской Федерации. Выявлен и идентифицирован вирус бешенства в 257 пробах от 71 человека.

Единственный лабораторно неподтвержденный случай был зарегистрирован в 2015 г. при исследовании с помощью методов ОТ-ПЦР-РВ биопробы и электронной микроскопии четырех проб головного мозга погибшей Щ. [27].

За период с 2002 по 2018 год биологический материал для лабораторной диагностики бешенства у людей, погибших от гидрофобии, поступал из семи федеральных округов Российской Федерации,

а именно Центрального, Южного, Приволжского, Северо-Западного, Северо-Кавказского, Уральского, Дальневосточного.

Наибольшее количество проб, а именно 55,3 % от общего числа проб, содержащих вирус бешенства, получили из Центрального федерального округа; 19 и 10,9 % – соответственно из Приволжского и Южного федеральных округов. Из Уральского федерального округа получены 8 % от общего количества проб; из Северо-Кавказского, Северо-Западного и Дальневосточного федеральных округов – соответственно 3,3; 2,3 и 1,2 %. Наиболее неблагоприятными являются Центральный федеральный округ с 38 погибшими от бешенства и Приволжский федеральный округ с 13 погибшими. Полученные данные согласуются с ранее проведенными исследованиями по определению территории наибольшего риска заражения бешенством за период 2002–2015 гг., отметившими лидирующее положение Центрального федерального округа в общей структуре заболеваемости населения гидрофобией [27].

В последние годы Роспотребнадзор и Министерство сельского хозяйства Российской Федерации проводят усиленную совместную работу в сфере организационных и профилактических мероприятий по борьбе с бешенством. При этом Управление Роспотребнадзора налаживает взаимодействие с силовыми, природоохранными и охотничьими ведомствами. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации утверждено постановление от 18.04.2018 № 30 «О дополнительных мерах, направленных на профилактику бешенства в Российской Федерации», зарегистрированное в Министерстве юстиции Российской Федерации 08.08.2018 № 51814. В 2017 г. в Москве состоялся XI съезд Всероссийского научно-практического Общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения», где на отдельной секции рассматривались вопросы борьбы с бешенством. В 2018 г. в г. Липецке состоялся Всероссийский семинар по бешенству, где обсуждались наиболее острые проблемы бешенства в современных условиях. Специалисты Центра выступали с

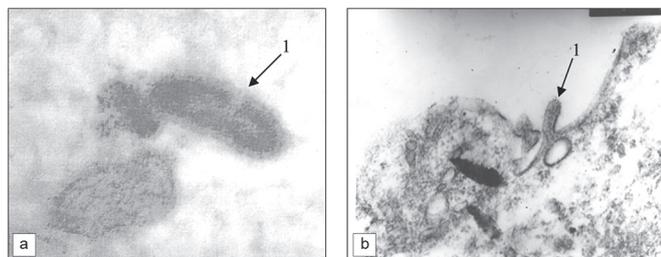


Рис. 2. Электронно-микроскопическое изучение вируса бешенства:

a – метод негативного контраста ($\times 200000$); *b* – метод ультратонких срезов ($\times 110000$); *1* – вирион вируса бешенства

Fig. 2. Electron microscopic study of rabies virus:

a – negative contrast method ($\times 200000$); *b* – the method of ultra-thin sections ($\times 110,000$); *1* – rabies virus virion

докладами на данных мероприятиях по теме лабораторной диагностики бешенства. Основой для докладов являлись результаты диагностического изучения биопроб, отобранных от подозрительных на инфицирование вирусом бешенства людей. Докладчиками продемонстрирована применяемая в Центре лабораторно-диагностическая схема с использованием наборов для идентификации вируса бешенства.

Изложенные и проанализированные данные позволяют выделить следующее направление развития в области лабораторной диагностики бешенства: более широкое применение молекулярно-биологических методов исследования для изучения географического распределения изолятов возбудителя этой инфекции в целях совершенствования эпидемиологического надзора, повышения эффективности системы биологической защиты населения Российской Федерации.

Таким образом, для лабораторной диагностики бешенства в Российской Федерации преимущественно применяют метод флуоресцирующих антител, для оценки уровня специфических антител – метод иммуоферментного анализа. Кроме МФА и ИФА в мировой лабораторной практике активно используют прямой экспресс-иммуногистохимический тест, экспресс-тест фокус-флуоресцентного ингибирования, тест нейтрализации вируса флуоресцирующими антителами, ОТ-ПЦР. Проведение исследований по разработанной в Центре комплексной схеме, включающей использование молекулярно-биологического, вирусологического методов и в некоторых случаях электронной микроскопии, позволило выявить и идентифицировать возбудитель в 257 пробах от 71 человека, паспортизовать и депонировать новые изоляты вируса бешенства. На основании опыта применения молекулярно-биологических методов исследования (ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР-РВ) для лабораторной диагностики бешенства рекомендуем использовать наборы ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР-РВ (имеющие удостоверение о государственной регистрации) в практике здравоохранения и ветеринарии для идентификации возбудителя рабической инфекции. Данный диагностический подход согласуется с последними рекомендациями ВОЗ 2018 г. Применение молекулярно-биологических методов исследования придало положительный вектор развитию диагностики бешенства, что имеет существенное значение для совершенствования эпидемиологического надзора за данной инфекцией и повышения эффективности системы биологической защиты населения Российской Федерации.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

- World Health Organization 2018. [Электронный ресурс]. URL: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp/> (дата обращения 20.11.2018).
- WHO Expert Consultation on Rabies: Second report. WHO technical report series. No. 982. WHO Press, World Health Organization. 1211 Geneva 27, Switzerland; 2013. 139 p.
- WHO Expert Consultation on Rabies: Third report. WHO technical report series. No. 1012. WHO Press, World Health Organization. Geneva 27, Switzerland; 2018. 183 p.
- Макаров В.В., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И. Бешенство: естественная история на рубеже столетий. М.: ЗооВетКнига; 2015. С. 5–13.
- WHO Immunological Basis for Immunization Series. Module 17: Rabies. Update 2017. World Health Organization. Switzerland, Geneva 27; 2017. 40 p.
- Ходякова И.А., Смольянинов Д.И. Об эпидемиологическом надзоре за бешенством на территории Липецкой области. *Санитарно-эпидемиологический вестник*. 2018; 3:6–8.
- Сидоров Г.Н., Полещук Е.М., Сидорова Д.Г. Источники заражения людей бешенством в России за последние 5 веков. *Здоровье населения и среда обитания*. 2016; 11:22–6.
- Madhusudana S.N., Subha S., Thankappan U., Ashwin Y.B. Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. *Virol. Sin.* 2012; 27(5):299–302. DOI: 10.1007/s12250-012-3265-6.
- Madhusudana S.N., Malavalli B.V., Thankappan U.P., Sundramoorthy S., Belludi A.Y., Pulagumbaly S.B., Sanyal S. Development and evaluation of a new immunohistochemistry-based test for the detection of rabies virus neutralizing antibodies. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014; 10(5):1359–65. DOI: 10.4161/hv.28042.
- Дедков В.Г., Девяткин А.А., Полещук Е.М., Сафонова М.В., Маркелов М.Л., Шипулин Г.А. Разработка и апробация набора реагентов для определения РНК классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5):235–240. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-235-240.
- Гулюкин А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза. *Вопросы вирусологии*. 2014; 3:5–10.
- 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; 6:38–43.
- Кравцов А.Л., Генералов С.В., Кожевников В.А., Гаврилова Ю.К., Абрамова Е.Г., Кочкин А.В., Никифоров А.К. Определение доли инфицированных вирусом бешенства клеток линии Vero с помощью проточной цитометрии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 3:18–25.
- Vengatesan D., Raj G.D., Raja A., Ramadass P., Gunaseelan L. Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2006; 70(5):335–43. DOI: 10.1002/cyto.b.20104.
- Mani R.S., Madhusudana S.N. Laboratory diagnosis of human rabies: recent advances. *Scientific World Journal*. 2013; 2013:569712. DOI: 10.1155/2013/569712.
- Wacharapluesadee S., Phumesin P., Supavonwong P., Khawplod P., Intarut N., Hemachudha T. Comparative detection of rabies RNA by NASBA, real-time PCR and conventional PCR. *J. Virol. Methods*. 2011; 175(2):278–82. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.05.007.
- Fischer M., Wernike K., Freuling C.M., Müller T., Aylan O., Brochier B., Cliquet F., Vázquez-Morón S., Hostnik P., Huovilainen A., Isaksson M., Kooi E.A., Mooney J., Turcitu M., Rasmussen T.B., Revilla-Fernández S., Smreczak M., Fooks A.R., Marston D.A., Beer M., Hoffmann B. A step forward in molecular diagnostics of lyssaviruses – results of a ring trial among European laboratories. *PLoS One*. 2013; 8(3):e58372. DOI: 10.1371/journal.pone.0058372.
- Hayman D.T.S., Banyard A.C., Wakeley P.R., Harkess G., Marston D., Wood J.L.N., Cunningham A.A., Fooks A.R. A universal real-time assay for the detection of Lyssaviruses. *J. Virol. Methods*. 2011; 177(1):87–93. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.07.002.
- Faye M., Dacheux L., Weidmann M., Diop S.A., Loucoubar C., Bourhy H., Sall A.A., Faye O. Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for broad detection of rabies virus. *J. Virol. Methods*. 2017; 243:120–30. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.12.019.
- Dacheux L., Larrous F., Lavenir R., Lepelletier A., Faouzi A., Troupin C., Nourlil J., Buchy P., Bourhy H. Dual combined real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the diagnosis of lyssavirus infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(7):e0004812. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004812.
- Mani R.S., Madhusudana S.N., Mahadevan A., Reddy V., Belludi A.Y., Shankar S.K. Utility of real-time Taqman PCR for antemortem and postmortem diagnosis of human rabies. *J. Med. Virol.* 2014; 86(10):1804–12. DOI: 10.1002/jmv.23814.
- Prabhu K.N., Isloor S., Veeresh B.H., Rathnamma D., Sharada R., Das L.J., Satyanarayana M.L., Hegde N.R., Rahman S.A. Application and comparative evaluation of fluorescent antibody, immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction tests for the detection of rabies virus antigen or nucleic acid in brain samples of animals suspected of rabies in India. *Vet. Sci.*

2018; 5(1):24. DOI: 10.3390/vetsci5010024.

23. Beltran F.J., Dohmen F.G., Del Pietro H., Cisterna D.M. Diagnosis and molecular typing of rabies virus in samples stored in inadequate conditions. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2014; 8:1016–21. DOI: 10.3855/jidc.4136.

24. Дедков В.Г., Бекова М.В., Девяткин А.А., Кулешов К.В., Поleshchuk E.M., Маркелов М.Л., Шипулин Г.А. Ретроспективная диагностика двух случаев бешенства у пациентов из Астраханской области. В кн.: Молекулярная диагностика – 2014: сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. М.; 2014. С. 453–4.

25. Девяткин А.А., Бекова М.В., Дедков В.Г., Поleshchuk E.M., Шипулин Г.А. Характеристика набора реагентов для выявления РНК вируса бешенства (rabies virus) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени «Амплисенс® RABV-FL». *Инфекция и иммунитет.* 2014; 4(1):61–2.

26. Dedkov V.G., Deviatkin A.A., Poleschchuk E.M., Safonova M.V., Blinova E.A., Shchelkanov M.Yu., Sidorov G.N., Simonova E.G., Shipulin G.A. Development and evaluation of a RT-qPCR assay for fast and sensitive rabies diagnosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 90(1):18–25. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.009.

27. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Писцов М.Н., Рубцов В.В., Суровяткин А.В., Петров А.А., Казанцев А.В., Бережной А.М., Зверев А.Ю., Манюшкин А.В., Кротков В.Т., Кутаев Д.А., Максимов В.А., Кузнецов С.Л., Вахнов Е.Ю., Тимофеев М.А., Мовсесянц А.А., Борисевич С.В. 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. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-27-32.

28. Dedkov V.G., Lukashev A.N., Deviatkin A.A., Kuleshov K.V., Safonova M.V., Poleschchuk E.M., Drexler G.F., Shipulin G.A. Retrospective diagnosis of two rabies cases in humans by high throughput sequencing. *J. Clin. Virol.* 2016; 78:74–81. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.03.012.

29. Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Полякова И.В., Метлин А.Е. Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(3):101–8. DOI: 10.18821/0507-4088-2017-62-3-101-108.

30. Поleshchuk E.M., Sidorov G.N., Gribencha S.V. Итоги изучения антигенного и генетического разнообразия вируса бешенства в популяциях наземных млекопитающих России. *Вопросы вирусологии.* 2013; 58(3):9–16.

31. Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Елаков А.Л., Кочергин-Никитский К.С., Алипер Т.И., Чучалин С.Ф., Гулюкин А.М. Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(4):186–92. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-186-192.

32. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Максимов В.А., Марков В.И., Борисевич И.В., Федоров Ю.М. Центр специальной лаборатории диагностики и лечения особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний в системе противозидемической защиты территории Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2001; 6:114–5.

33. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Максимов В.А., Марков В.И., Меркулов В.А., Писцов М.Н., Бережной А.М., Сыромятникова С.И., Зубов В.В. Выделение и идентификация возбудителя тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС) от больного атипичной пневмонией. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2003; 5:109–12.

34. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Максимов В.А., Писцов М.Н., Степанов Н.Н., Борисевич С.В., Ручко С.В., Евстигнеев О.В., Хамитов Р.А., Зверев А.Ю., Меркулов В.А., Ионов С.Н., Марков В.И., Мовсесянц А.А. Идентификация «уличного» вируса бешенства из биопроб головного мозга погибшего ребенка. *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2009; 1-2(33-34):37–40.

References

1. World Health Organization 2018. (Cited 20 Nov 2018). Available from: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp/>.

2. WHO Expert Consultation on Rabies: Second report. WHO technical report series. No. 982. WHO Press, World Health Organization. 1211 Geneva 27, Switzerland; 2013. 139 p.

3. WHO Expert Consultation on Rabies: Third report. WHO technical report series. No. 1012. WHO Press, World Health Organization. Geneva 27, Switzerland; 2018. 183 p.

4. Makarov V.V., Gulyukin A.M., Gulyukin M.I. [Rabies: Natural History at the Turn of the Centuries]. Moscow: ZooVetKniga; 2015. P. 5–13.

5. WHO Immunological Basis for Immunization Series. Module

17: Rabies. Update 2017. World Health Organization. Switzerland, Geneva 27; 2017. 40 p.

6. Khodyakova I.A., Smol'yaninov D.I. [On epidemiological surveillance of rabies in the territory of the Lipetsk Region]. *Sanitarno-Epidemiologicheskyy Vestnik [Sanitary-Epidemiological Bulletin]*. 2018; 3:6–8.

7. Sidorov G.N., Poleschchuk E.M., Sidorova D.G. [Sources of human infection with rabies in Russia over the past 5 centuries]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitania [Public Health and Life Environment]*. 2016; 11:22–6.

8. Madhusudana S.N., Subha S., Thankappan U., Ashwin Y.B. Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. *Virol. Sin.* 2012; 27(5):299–302. DOI: 10.1007/s12250-012-3265-6.

9. Madhusudana S.N., Malavalli B.V., Thankappan U.P., Sundramoorthy S., Belludi A.Y., Pulugumbaly S.B., Sanyal S. Development and evaluation of a new immunohistochemistry-based test for the detection of rabies virus neutralizing antibodies. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014; 10(5):1359–65. DOI: 10.4161/hv.28042.

10. Dedkov V.G., Devyatkin A.A., Poleschchuk E.M., Safonova M.V., Markelov M.L., Shipulin G.A. [Development and evaluation of the reagent kit for RNA detection of classical rabies virus using real-time RT-PCR]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2016; 61(5):235–40. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-235-240.

11. Gulyukin A.M. [Significance of modern methods for laboratory diagnostics and identification of rabies agent for immunological monitoring of this zoonotic infection]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2014; 3:5–10.

12. Gribencha S.V., Kozlov A.Yu., Kostina L.V., Elakov A.L., Losich M.A., Tsibezov V.V., Zaberezhny A.D., Aliper T.I. [Production of the monoclonal antibodies to the rabies virus nucleoprotein]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2013; 6:38–43.

13. Kravtsov A.L., Generalov S.V., Kozhevnikov V.A., Gavrilova Yu.K., Abramova E.G., Kochkin A.V., Nikiforov A.K. [Determination of the rabies virus-infected vero line cell portion by flow cytometry]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2018; 3:18–25.

14. Vengatesan D., Raj G.D., Raja A., Ramadass P., Gunaseelan L. Detection of rabies virus antigen or antibody using flow cytometry. *Cytometry B Clin. Cytom.* 2006; 70(5):335–43. DOI: 10.1002/cyto.b.20104.

15. Mani R.S., Madhusudana S.N. Laboratory diagnosis of human rabies: recent advances. *Scientific World Journal.* 2013; 2013:569712. DOI: 10.1155/2013/569712.

16. Wacharapluesadee S., Phumehin P., Supavonwong P., Khawplod P., Intarut N., Hemachudha T. Comparative detection of rabies RNA by NASBA, real-time PCR and conventional PCR. *J. Virol. Methods.* 2011; 175(2):278–82. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.05.007.

17. Fischer M., Wernike K., Freuling C.M., Müller T., Aylan O., Brochier B., Cliquet F., Vázquez-Morón S., Hostnik P., Huovilainen A., Isaksson M., Kooi E.A., Mooney J., Turcitu M., Rasmussen T.B., Revilla-Fernández S., Smreczak M., Fooks A.R., Marston D.A., Beer M., Hoffmann B. A step forward in molecular diagnostics of lyssaviruses – results of a ring trial among European laboratories. *PLoS One.* 2013; 8(3):e58372. DOI: 10.1371/journal.pone.0058372.

18. Hayman D.T.S., Banyard A.C., Wakeley P.R., Harkess G., Marston D., Wood J.L.N., Cunningham A.A., Fooks A.R. A universal real-time assay for the detection of Lyssaviruses. *J. Virol. Methods.* 2011; 177(1):87–93. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.07.002.

19. Faye M., Dacheux L., Weidmann M., Diop S.A., Loucoubar C., Bourhy H., Sall A.A., Faye O. Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for broad detection of rabies virus. *J. Virol. Methods.* 2017; 243:120–30. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.12.019.

20. Dacheux L., Larrous F., Lavenir R., Lepelletier A., Faouzi A., Troupin C., Nourlil J., Buchy P., Bourhy H. Dual combined real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for the diagnosis of lyssavirus infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(7):e0004812. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004812.

21. Mani R.S., Madhusudana S.N., Mahadevan A., Reddy V., Belludi A.Y., Shankar S.K. Utility of real-time Taqman PCR for antemortem and postmortem diagnosis of human rabies. *J. Med. Virol.* 2014; 86(10):1804–12. DOI: 10.1002/jmv.23814.

22. Prabhu K.N., Isloor S., Veeresh B.H., Rathnamma D., Sharada R., Das L.J., Satyanarayana M.L., Hegde N.R., Rahman S.A. Application and comparative evaluation of fluorescent antibody, immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction tests for the detection of rabies virus antigen or nucleic acid in brain samples of animals suspected of rabies in India. *Vet. Sci.* 2018; 5(1):24. DOI: 10.3390/vetsci5010024.

23. Beltran F.J., Dohmen F.G., Del Pietro H., Cisterna D.M. Diagnosis and molecular typing of rabies virus in samples stored in inadequate conditions. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2014; 8:1016–21. DOI: 10.3855/jidc.4136.

24. Dedkov V.G., Bekova M.V., Devyatkin A.A., Kuleshov K.V., Poleschchuk E.M., Markelov M.L., Shipulin G.A. [Retrospective

diagnosis of two cases of rabies in patients from the Astrakhan region]. In: [Molecular Diagnostics – 2014: Proceedings of the VIII All-Russian Scientific and Practical Conference with international participation]. Moscow; 2014. P. 453–4.

25. Devyatkin A.A., Bekova M.V., Dedkov V.G., Poleshchuk E.M., Shipulin G.A. [Characteristic of a kit of reagents for detecting RNA of rabies virus (rabies virus) by real-time polymerase chain reaction (PCR) “Amplisens® RABV-FL”]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2014; 4(1):61–2.

26. Dedkov V.G., Devyatkin A.A., Poleshchuk E.M., Safonova M.V., Blinova E.A., Shchelkanov M.Yu., Sidorov G.N., Simonova E.G., Shipulin G.A. Development and evaluation of a RT-qPCR assay for fast and sensitive rabies diagnosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 90(1):18–25. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.009.

27. Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Paksina N.D., Pistsov M.N., Rubtsov V.V., Surovyatkin A.V., Petrov A.A., Kazantsev A.V., Berezhnoy A.M., Zverev A.Yu., Manoshkin A.V., Krotkov V.T., Kutaev D.A., Maksimov V.A., Kuznetsov S.L., Vakhnov E.Yu., Timofeev M.A., Movsesyants A.A., Borisevich S.V. [Epidemiological situation of 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. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-27-32.

28. Dedkov V.G., Lukashev A.N., Devyatkin A.A., Kuleshov K.V., Safonova M.V., Poleshchuk E.M., Drexler G.F., Shipulin G.A. Retrospective diagnosis of two rabies cases in humans by high throughput sequencing. *J. Clin. Virol.* 2016; 78:74–81. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.03.012.

29. Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Gulyukin A.M., Shabeykin A.A., Polyakova I.V., Metlin A.E. [Molecular-genetic characterization of the 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. DOI: 10.18821/0507-4088-2017-62-3-101-108.

30. Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Gribencha S.V. [A summary of the data about antigenic and genetic diversity of rabies virus circulating in the terrestrial mammals in Russia]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2013; 58(3):9–16.

31. Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Elakov A.L., Kochergin-Nikitsky K.S., Aliper T.I., Chuchalin S.F., Gulyukin A.M. [Molecular-genetic characterization of genomes of rabies virus iso-

lates circulating in the Kirov Region]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2016; 61(4):186–92. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-186-192.

32. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Maksimov V.A., Markov V.I., Borisevich I.V., Fedorov Yu.M. [Center for Special Laboratory Diagnostics and Treatment of Particularly Dangerous and Exotic Infectious Diseases as an element of anti-epidemic protection system in the territory of the Russian Federation]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2001; 6:114–5.

33. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Maksimov V.A., Markov V.I., Merkulov V.A., Pistsov M.N., Berezhnoy A.M., Syromyatnikova S.I., Zybov V.V. [Isolation and identification of the causative agent of severe acute respiratory syndrome (SARS) from a patient with atypical pneumonia]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2003; 5:109–12.

34. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Maksimov V.A., Pistsov M.N., Stepanov N.N., Borisevich S.V., Ruchko S.V., Evstigneev O.V., Khamitov R.A., Zverev A.Yu., Merkulov V.A., Ionov S.N., Markov V.I., Movsesyants A.A. [Identification of “street” rabies virus in bioassays of the brain tissues of a deceased child]. *Biopreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2009; 1-2(33-34):37–40.

Authors:

Borisevich S.V., Pistsov M.N., Rubtsov V.V., Kutaev D.A., Surovyatkin A.V., Berezhnoy A.M., Petrov A.A., Kazantsev A.V., Zverev A.Yu., Manoshkin A.V., Krotkov V.T., Sakharov R.V., Chukhraya O.V., Khmurenko S.N., Savenko S.V., Poyarkov A.Yu. 48 Central Scientific-Research Institute. 11, Oktyabrskaya St., Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation. E-mail 48cnii@mil.ru.

Об авторах:

Борисевич С.В., Писцов М.Н., Рубцов В.В., Кутаев Д.А., Суровяткин А.В., Бережной А.М., Петров А.А., Казанцев А.В., Зверев А.Ю., Маношкин А.В., Кротков В.Т., Сахаров Р.В., Чухраля О.В., Хмуренко С.Н., Савенко С.В., Поярков А.Ю. 48 Центральный научно-исследовательский институт. Российская Федерация, 141306, Московская область, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11. E-mail: 48cnii@mil.ru.