

М.А.Ефимова¹, К.С.Хаертынов^{1,2}, А.Ф.Арсланова¹, Р.М.Ахмадеев¹, А.И.Никитин¹, В.Г.Гумеров¹,
Э.А.Шуралев^{1,2,3}

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ОЦЕНКА СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИГЕНОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

¹ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань;

²Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань;

³ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Российская Федерация

Цель работы. Оценка серологической активности антигенов вируса бешенства, выделенных из мозговой ткани мышей и очищенных ультрацентрифугированием с предварительной дезинтеграцией на FastPrep. **Материалы и методы.** В работе использовали производственный штамм вируса бешенства «Овечий» ГНКИ. Вирус бешенства выделяли из мозговой ткани экспериментально зараженных мышей с последующим изучением электрофоретического профиля. Серологическую активность компонентов вируса оценивали иммуноблотом и ИФА с использованием специфических антирабических сывороток крови. **Результаты и выводы.** В ходе сравнения методов выделения и очистки антигена вируса бешенства наиболее оптимальным определено проведение гомогенизации на FastPrep-24 с последующим фракционированием в градиенте сахарозы. В результате фракционирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы с концентрацией 15–50 % при 25000 g в течение 120 мин получено пять фракций вируса бешенства. Максимально очищенной являлась белковая фракция, отобранная с зоны сахарозы 15–20 %, соответствующая молекулярной массе 67 кДа. Специфическая антигенная активность фракции в ИФА достигала титра 1:1280 (коэффициент специфичности 2,2). В результате иммуноблота антигенов, полученных с градиента сахарозы в диапазоне 40–45 и 20–35 % после ультрацентрифугирования, выявлена одна мажорная фракция полипептидов (54 кДа), проявившая наиболее высокую антигенную активность. Полученные результаты будут применимы при конструировании тест-систем для проведения скрининговых исследований на бешенство и мониторинга эффективности противоэпизоотических мероприятий.

Ключевые слова: вирус бешенства, антиген, FastPrep, электрофорез, иммуноблот.

Корреспондирующий автор: Ефимова Марина Анатольевна, e-mail: 2004r@mail.ru.

М.А.Efimova¹, К.С.Khaertynov^{1,2}, А.Ф.Arslanova¹, Р.М.Akhmadeev¹, А.И.Nikitin¹, V.G.Gumerov¹,
E.A.Shuralev^{1,2,3}

Isolation, Purification and Evaluation of Serological Activity of Rabies Virus Antigens

¹Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation; ²Kazan State Medical Academy – Affiliated Branch of Federal State-Funded Educational Institution for Further Vocational Education “Russian Medical Academy of Continuing Education”, RF Ministry of Health, Kazan, Russian Federation; ³Kazan (Privolzhsky) Federal University, Kazan, Russian Federation

Objective of the study is to evaluate the serological activity of rabies virus antigens isolated from the brain tissue of mice by homogenization on FastPrep followed by ultracentrifugation. **Materials and methods.** Producer strain of the rabies virus “Ovechiy” GNKI. The rabies virus was isolated from the brain tissue of experimentally infected mice, followed by the study of the electrophoretic profile. The serological activity of the virus components was assessed by immunoblot and ELISA using specific anti-rabies sera. **Results and conclusions.** In the course of comparing the methods of isolation and purification of the rabies virus antigen, it was found that most optimal one is to use a homogenization on FastPrep-24, followed by fractionation in a sucrose gradient. As a result of fractionation in a graded sucrose density gradient with a concentration of 15–50 % at 25000 g for 120 min, five fractions of the rabies virus components were obtained. The maximum purified protein fraction was from 15–20 % sucrose zone, which corresponded to a molecular weight of 67 kDa. The specific antigen activity of the fraction in ELISA reached up the titers of 1:1280 (Specificity coefficient 2.2). Using immunoblot of antigens, obtained from the sucrose gradient in the range of 40–45 % and 20–35 % after ultracentrifugation, one major fraction of polypeptides (54 kDa) was detected, which showed the highest antigenic activity. The results obtained will be useful in the design of test systems for rabies screening and monitoring the effectiveness of anti-epizootic measures.

Key words: rabies virus, antigen, FastPrep, electrophoresis, immunoblot.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Marina A. Efimova, e-mail: 2004r@mail.ru.

Citation: Efimova M.A., Khaertynov K.S., Arslanova A.F., Akhmadeev R.M., Nikitin A.I., Gumerov V.G., Shuralev E.A. Isolation, Purification and Evaluation of Serological Activity of Rabies Virus Antigens. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:27–31. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-27-31

Несмотря на значительный прогресс в области вирусологии, иммунологии и молекулярной биологии, а также колоссальные усилия многих поколений

ученых и практиков по борьбе с бешенством, этот зооноз продолжает оставаться чрезвычайно сложной проблемой для многих стран мира, в том числе и для

Российской Федерации [2, 6]. Заболевание проявляется и у людей, приводя к летальным исходам [13].

Основу мировых программ борьбы с бешенством составляет специфическая профилактика и своевременная диагностика с использованием современных лабораторных методов исследования. В настоящее время практическое применение получили различные методы: биопроба на лабораторных животных, морфологическое исследование головного мозга, метод иммунофлуоресценции, реакция преципитации в агаровом геле [14]. Однако все они, в той или иной степени, обладают значительными недостатками: низкая чувствительность и недостаточная специфичность (световая микроскопия и реакция преципитации), длительность получения результатов экспертиз и трудоемкость (биопроба и реакция нейтрализации) [7]. Усовершенствование существующих и разработка новых молекулярно-генетических [10] и ускоренных серологических [1] методов как эффективных средств диагностики бешенства остаются актуальными вопросами до настоящего времени [8, 12]. Такого рода исследования требуют предварительной наработки определенных специфических биологических компонентов тест-систем, в том числе антигенов, иммуноглобулинов [15]. Для приготовления основы иммунизирующего материала, с целью получения антител, используют клеточные культуры животных.

Каждый этап исследований требует не только учета генетических особенностей (вариабельности) вируса [4], но и проведения дополнительного, более углубленного изучения специфичности и чувствительности отдельных компонентов. Несоблюдение этих требований может привести к низкой диагностической эффективности тест-систем на финальном этапе разработки [9].

Целью данной работы была оценка серологической активности антигенов вируса бешенства, выделенных из мозговой ткани мышей с использованием гомогенизатора FastPrep с последующим ультрацентрифугированием.

Материалы и методы

В работе использовали производственный штамм вируса бешенства «Овечий» ГНКИ (коллекция ФЦТРБ-ВНИВИ), органо-тканевого происхождения, с инфекционным титром $5,25 \lg LD_{50}/0,03$ мл.

Для наработки вирусного материала белых мышей линии BALB/c живой массой 6–7 г заражали интрацеребрально вирусом бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ. Мышей с признаками неврологических нарушений через 5–8 сут после заражения усыпляли, декапитировали, стерильно извлекали мозг и готовили 20 % мозговую суспензию в 0,01 М фосфатно-буферном растворе.

С целью выделения вируса часть мозговой ткани подвергали дезинтеграции на приборе FastPrep®-24 Classic Instrument (MP Biomedicals), для мак-

симального извлечения вируса использовали пробирки Lising Matrix B; другую часть подвергали замораживанию-оттаиванию. Прибор FastPrep-24 был использован на предварительном этапе подготовки вирусного материала для полного разрушения клеток мозговой ткани, так как, в отличие от стеклянных гомогенизаторов, данный прибор обеспечивает стабильную повторяемость результатов и не зависит от человеческого фактора. Режим обработки на приборе FastPrep: скорость вибрации 6,0 миллисекунд, время обработки 60 с в присутствии однородных частиц карбида кремния.

Мозговую ткань осаждали низкоскоростным центрифугированием, супернатант концентрировали ультрацентрифугированием при 25000 g. Очистку вируса проводили в ступенчатом градиенте сахарозы 15–50 % с использованием ультрацентрифуги Optima L-90K (Beckman) и последующим исследованием промежуточных стадий флотации. На каждом этапе очистки вируса проводили контроль при помощи аналитического электрофореза и иммуноблотинга для выявления локализации полипептидов и их серологической активности.

Концентрацию белка определяли на спектрофотометре UV5 (Mettler Toledo) при длине волны 280 нм согласно инструкции к прибору.

Электрофоретический профиль вируса бешенства изучали по методу U.K.Laemmli [11]. Методом иммуноблотинга (Bio-Rad) определяли серологическую активность полученного материала с использованием гипериммунных сывороток с высокой активностью, а также сыворотки овец, вакцинированных против бешенства антирабической инактивированной сухой культуральной вакциной из штамма «Щелково-51» (ФКП «Щелковский биокомбинат»).

Выделение иммуноглобулинов из сыворотки крови овец, иммунизированных вирусом бешенства, проводили методом высаливания насыщенным раствором 2,78 М сульфата аммония с последующим диализом против 0,025 М трис-HCl буфера, pH 7,8. Процедуру переосаждения иммуноглобулинов сульфатом аммония проводили 3 раза.

Результаты и обсуждение

На первом этапе проведено сравнительное изучение чистоты используемых иммуноглобулинов, полученных из сыворотки крови овец, иммунизированных вирусом бешенства. Иммуноглобулины овцы после первого, второго и третьего цикла осаждения сульфатом аммония и диализа очищали при помощи ионообменной хроматографии с целью получения отдельно и препаративно IgG1 и IgG2 для повышения их чувствительности и специфичности. Степень чистоты полученного гипериммунного иммуноглобулина оценивали методом электрофореза на ацетатцеллюлозной мембране, рис. 1 [5]

В супернатанте уже после первого осаждения отсутствовала зона иммуноглобулинов, что свиде-

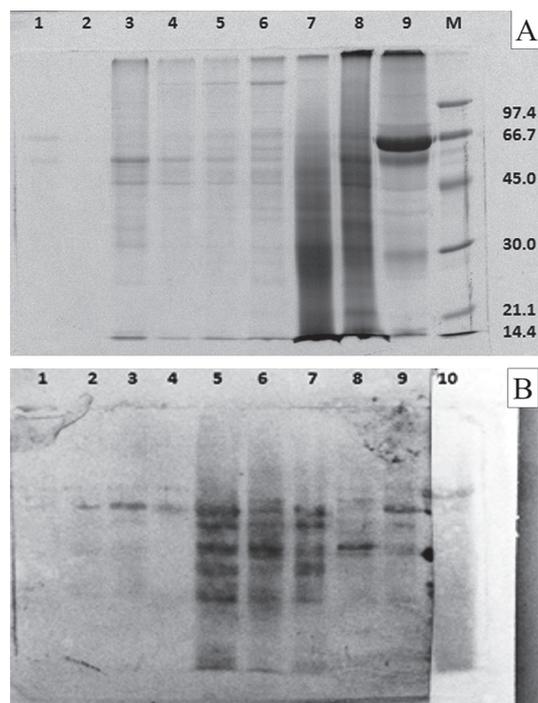


Рис. 1. Электрофорез проб в процессе получения антирабических глобулинов после осаждения сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе:

1, 2, 3 – IgG1; 4, 5, 6, 7 – IgG2; 8 – препарат иммуноглобулина после третьего осаждения и 7-дневного диализа; 9 – исходная овечья гипериммунная сыворотка

тельствует о полном их осаждении. После второго и третьего осаждения отмечали наличие незначительного количества иммуноглобулинов в супернатанте. Конечный продукт после диализа характеризовался высоким содержанием иммуноглобулина и отсутствием примесей сывороточных белков.

Таким образом, метод двукратного переосаждения сульфатом аммония позволяет получить чистый препарат иммуноглобулина из гипериммунной сыворотки овец без наличия примесей сывороточных белков.

На следующем этапе проводили очистку вирусного антигена. В качестве исходного материала использовали вирусный материал с инфекционным титром $5,25 \text{ Ig LD}_{50}/0,03 \text{ мл}$, полученный на основе штамма «Овечий» ГНКИ, репродуцированного в мозговой ткани экспериментально зараженных мышей. Концентрация вирусного белка после очистки от мозговой ткани и концентрирования составила $64,7 \text{ мг/мл}$. В результате фракционирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы с концентрацией 15–50 % при 25000 g в течение 120 мин получено пять фракций вируса бешенства. Электрофоретическое разделение фракций методом вертикального диск-электрофореза в 12,5 % ПААГ показало, что максимально очищенной является белковая фракция, отобранная с зоны сахарозы 15–20 % и соответствующая молекулярной массе 67,0 кДа. При этом было отмечено, что данная фракция содержала также незначительную примесь других белков. Активность белковых фракций вируса бешенства подтверждена в сэндвич-ИФА (таблица).

Специфичность белковых фракций вируса бешенства после фракционирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы

Исследуемый материал	Титр, $\text{LD}_{50}/\text{мл}$	Концентрация белка, мг/мл	Титр антигена в ИФА, $1/\mu^*$
Концентрированный антиген	$10^{5,5}$	$64,7 \pm 0,22$	2560
Фракция зоны 15–20 % градиента плотности	–	$0,78 \pm 0,03$	1280
Фракция зоны 45–50 % градиента плотности	–	$0,45 \pm 0,07$	640

*Обратные значения титров антигена вируса бешенства.

Специфическая антигенная активность фракций составила 1:640–1:1280 ($K_{\text{сн}}=2,1-2,2$). Высокая активность зоны 15–20 % градиента плотности, по всей видимости, связана с локализацией в данной зоне пептидов, соответствующих антигенным детерминантам вируса бешенства.

Далее специфичность и активность различных фракций антигена, после концентрирования и очистки через градиент сахарозы, проверяли в реакции иммуноблот с использованием антирабических иммуноглобулинов овцы (рис. 2).

В осадке ультрацентрифугированного антигена вируса бешенства (УЦФ-АГ) (трек 1) выявили 2 минорные фракции полипептидов в области 45–66,7 кДа. Антиген, полученный при ультрацентрифугировании при 25000 g в градиенте сахарозы 15–20 % (трек 6), содержал все основные полипептиды вируса, а антиген, полученный с градиента сахарозы 40–45 % (трек 3), содержал дополнительно две фракции полипептидов с молекулярной массой в области от 30 до 45 кДа. Обработка вируса бешенства на FastPrep-24 не обеспечивала четкой картины разделения полипептидов (трек 7). Характерная картина разделения в 12,5 % ПААГ установлена при использовании исходного вируса бешенства (трек 9). При этом обнаруживаются 2 мажорные и 8 минорных фракций полипептидов.

В результате иммуноблота антигенов, полученных с градиента сахарозы в диапазоне 40–45 и 20–35 %, выявлялась одна мажорная фракция по-

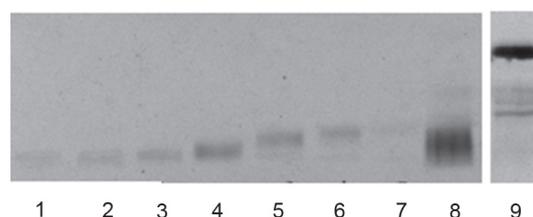


Рис. 2. Результаты электрофореза (А) и иммуноблота (В) УЦФ-АГ вируса бешенства с овечьими антирабическими глобулинами:

1 – осадок после центрифугирования в градиенте сахарозы; 2 – антиген с градиента сахарозы 45–50 %; 3 – антиген с градиента сахарозы 40–45 %; 4 – антиген с градиента сахарозы 20–35 %; 5 – антиген с градиента сахарозы 20–40 %; 6 – антиген с градиента сахарозы 15–20 %; 7 – супернатант зараженной мозговой ткани после обработки на FastPrep-24; 8 – осадок зараженной мозговой ткани после обработки на FastPrep-24; 9 – вирус бешенства штамм «Овечий» ГНКИ; М – маркеры молекулярных масс (кДа)

липептидов, соответствующая 54 кДа. При анализе результатов иммуноблота и электрофореза белков с градиента сахарозы 15–20 % и супернатанта, полученного после центрифугирования при 3000 г в течение 30 мин взвеси зараженной мозговой ткани после обработки на FastPrep-24, установлен идентичный полипептидный профиль получаемых антигенов, при этом последний способ прост в исполнении и не требует значительных затрат.

Таким образом, в ходе сравнения методов получения и очистки антигена вируса бешенства наиболее оптимальным определено проведение гомогенизации на FastPrep-24 с последующим фракционированием в градиенте плотности сахарозы. В результате иммуноблота антигенов, полученных с градиента сахарозы в диапазоне 40–45 и 20–35 % после ультрацентрифугирования, выявлена одна мажорная фракция полипептидов, соответствующая 54 кДа. Показано, что максимально очищенной является белковая фракция с молекулярной массой 67 кДа, отобранная с зоны сахарозы 15–20 %. Высокая специфическая антигенная активность данной фракции подтверждена в ИФА и иммуноблоте. В последующем, будет оценена возможность использования выделенной фракции антигена вируса бешенства в качестве иммунизирующего антигена для получения иммуноглобулинов с высокой активностью, что позволит повысить диагностическую чувствительность и специфичность совершенствуемых тест-систем на основе ИФА и РИФ для проведения скрининговых исследований на бешенство и мониторинга эффективности противоэпизоотических мероприятий.

Биоэтика. Все стадии исследования соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам ФЦТРБ-ВНИВИ.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Комиссаров А.В. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 2:95–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-95-101.
2. Бельчихина А.В., Караулов А.К. Ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по бешенству животных на территории Российской Федерации. *Ветеринария сегодня.* 2016; 1(16):64–70.
3. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Савицкая Л.В., Лобовикова О.А. Оптимизация условий масштабированного культивирования фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в культуре клеток Vero. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 2:101–3.
4. Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Зайкова О.Н., Полякова И.В., Забережный А.Д., Хисматуллина Н.А., Самерханов И.И. Особенности эпизоотического процесса и молекулярно-генетических характеристик изолятов вируса бешенства в Республике Татарстан. *Ветеринарный врач.* 2015; 6:3–11.
5. Кондрахин И.П., Курилов Н.В., Малахов А.Г., Архипов А.В., Белов А.Д., Беляков И.М., Блинов Н.И., Коробов А.В., Фролова Л.А., Севастьянова Н.А. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии: справочное издание. М.: Агропромиздат; 1985. 287 с.
6. Шабейкин А.А., Зайкова О.Н., Гулюкин А.М. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации за

период с 1991 по 2015 год. *Ветеринария Кубани.* 2016; 4:4–6.

7. Chacko K., Parakadavathu R.T., Al-Maslamani M., Nair A.P., Chekura A.P., Madhavan I. Diagnostic difficulties in human rabies: A case report and review of the literature. *Qatar Med. J.* 2017; 2016(2):15. DOI: 10.5339/qmj.2016.15.
8. Duong V., Tarantola A., Ong S., Mey C., Choeng R., Ly S., Bourhy H., Dussart P., Buchy P. Laboratory diagnostics in dog-mediated rabies: an overview of performance and a proposed strategy for various settings. *Int. J. Infect. Dis.* 2016; 46:107–4. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.03.016.
9. Eggerbauer E., de Benedictis P., Hoffmann B., Mettenleiter T.C., Schlottau K., Ngoepe E.C., Sabeta C.T., Freuling C.M., Müller T. Evaluation of six commercially available rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of rabies in brain material. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(6):e0004776. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004776.
10. 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.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5.
12. Lèchenne M., Naïssengar K., Lepelletier A., Alfaroukh I.O., Bourhy H., Zinsstag J., Dacheux L. Validation of a rapid rabies diagnostic tool for field surveillance in developing countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(10):e0005010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005010.
13. Manoj S., Mukherjee A., Johri S., Kumar K.V. Recovery from rabies, a universally fatal disease. *Mil. Med. Res.* 2016; 3:21. DOI: 10.1186/s40779-016-0089-y.
14. Maxwell M.J., Freire de Carvalho M.H., Hoet A.E., Vigilato M.A., Pompei J.C., Cosivi O., Del Rio Vilas V.J. Building the road to a regional zoonoses strategy: A survey of zoonoses programmes in the Americas. *PLoS One.* 2017; 12(3):e0174175. DOI: 10.1371/journal.pone.0174175.
15. Tekki I.S., Ponfa Z.N., Nwosuh C.I., Kumbish P.R., Jonah C.L., Okewole P.A., Shamaki D., Ahmed S.M. Comparative assessment of seller's staining test (SST) and direct fluorescent antibody test for rapid and accurate laboratory diagnosis of rabies. *Afr. Health Sci.* 2016; 16(1):123–7. DOI: 10.4314/ahs.v16i1.16.

References

1. Abramova E.G., Generalov S.V., Matveeva Z.V., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K., Komissarov A.V. [Experimental substantiation of cultural technologies introduction into manufacturing of anti-rabies immunoglobulin]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 2:95–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-95-101.
2. Belchikhina A.V., Karaulov A.K. [Retrospective analysis of rabies epizootic situation in animals in the territory of the Russian Federation]. *Veterinariya Segodnya.* 2016; 1(16):64–70.
3. Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Savitskaya L.V., Lobovikova O.A. [Optimization of specifications for scaled-up fixed rabies virus cultivation ("Moscow 3253" strain) in Vero cell culture]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 2:101–3.
4. Gulyukin A.M., Shabeikin A.A., Zaikova O.N., Polyakova I.V., Zaberezhny A.D., Khismatullina N.A., Samerkhanov I.I. [Epidemiological features and molecular-genetic characterization of rabies virus isolates in the Republic of Tatarstan]. *Veterinarny Vrach.* 2015; 6:3–11.
5. Kondrakhin I.P., Kurilov N.V., Malakhov A.G., Arkhipov A.V., Belov A.D., Belyakov I.M., Blinov N.I., Korobov A.V., Frolova L.A., Sevast'yanova N.A. [Clinical laboratory diagnostics in veterinary medicine: reference edition]. Moscow: "Agropromizdat"; 1985. 287 p.
6. Shabeikin A.A., Zaikova O.N., Gulyukin A.M. [Overview of epizootic situation on rabies between 1991 and 2015 in the Russian Federation]. *Veterinariya Kubani.* 2016; 4:4–6.
7. Chacko K., Parakadavathu R.T., Al-Maslamani M., Nair A.P., Chekura A.P., Madhavan I. Diagnostic difficulties in human rabies: A case report and review of the literature. *Qatar Med. J.* 2017; 2016(2):15. DOI: 10.5339/qmj.2016.15.
8. Duong V., Tarantola A., Ong S., Mey C., Choeng R., Ly S., Bourhy H., Dussart P., Buchy P. Laboratory diagnostics in dog-mediated rabies: an overview of performance and a proposed strategy for various settings. *Int. J. Infect. Dis.* 2016; 46:107–4. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.03.016.
9. Eggerbauer E., de Benedictis P., Hoffmann B., Mettenleiter T.C., Schlottau K., Ngoepe E.C., Sabeta C.T., Freuling C.M., Müller T. Evaluation of six commercially available rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of rabies in brain material. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(6):e0004776. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004776.
10. 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.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5.
12. Lèchenne M., Naïssengar K., Lepelletier A., Alfaroukh I.O., Bourhy H., Zinsstag J., Dacheux L. Validation of a rapid rabies diagnostic tool for field surveillance in developing countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(10):e0005010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005010.
13. Manoj S., Mukherjee A., Johri S., Kumar K.V. Recovery from ra-

bies, a universally fatal disease. *Mil. Med. Res.* 2016; 3:21. DOI: 10.1186/s40779-016-0089-y.

14. Maxwell M.J., Freire de Carvalho M.H., Hoet A.E., Vigilato M.A., Pompei J.C., Cosivi O., Del Rio Vilas V.J. Building the road to a regional zoonoses strategy: A survey of zoonoses programmes in the Americas. *PLoS One.* 2017; 12(3):e0174175. DOI: 10.1371/journal.pone.0174175.

15. Tekki I.S., Ponfa Z.N., Nwosuh C.I., Kumbish P.R., Jonah C.L., Okewole P.A., Shamaki D., Ahmed S.M. Comparative assessment of seller's staining test (SST) and direct fluorescent antibody test for rapid and accurate laboratory diagnosis of rabies. *Afr. Health Sci.* 2016; 16(1):123–7. DOI: 10.4314/ahs.v16i1.16.

Authors:

Efimova M.A., Arslanova A.F., Akhmadeev R.M., Nikitin A.I., V.G. Gumerov. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchny Gorodok-2, Kazan, Tatarstan, 420075, Russian Federation. E-mail: vnivi@mail.ru.

Khaertynov K.S. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety; Nauchny Gorodok-2, Kazan, Tatarstan, 420075, Russian Federation. Kazan State Medical Academy – Affiliated Branch of Federal State-Funded Educational Institution for Further Vocational Education “Russian Medical Academy of Continuing Education”; 36 Butlerova St., Kazan, Tatarstan, 420012, Russian Federation. E-mail: ksma.rf@tatar.ru.

Shuralev E.A. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchny Gorodok-2; Kazan, Tatarstan, 420075, Russian Federation. Kazan State Medical Academy – Affiliated Branch of Federal State-Funded Educational Institution for Further Vocational Education

“Russian Medical Academy of Continuing Education”; 36 Butlerova St., Kazan, Tatarstan, 420012, Russian Federation. Kazan (Privolzhsky) Federal University; 18, Kremlyovskaya St., Kazan, Tatarstan, 420008, Russian Federation. E-mail: ecology@kpfu.ru.

Об авторах:

Ефимова М.А., Арсланова А.Ф., Ахмадеев Р.М., Никитин А.И., Гумеров В.Г. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности. Российская Федерация, 420075, Татарстан, Казань, Научный городок-2. E-mail: vnivi@mail.ru.

Хаертынов К.С. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности; Российская Федерация, 420075, Татарстан, Казань, Научный городок-2. Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; Российская Федерация, 420012, Татарстан, Казань, ул. Бултерова, 36. E-mail: ksma.rf@tatar.ru.

Шуралев Э.А. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности; Российская Федерация, 420075, Татарстан, Казань, Научный городок-2. Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; Российская Федерация, 420012, Татарстан, Казань, ул. Бултерова, 36. Казанский (Приволжский) федеральный университет; Российская Федерация, 420008, Татарстан, Казань, ул. Кремлевская, 18. E-mail: ecology@kpfu.ru.

Поступила 04.10.17.