УДК 619:616.98:578.824.11

**М.А. Ефимова1, К.С. Хаертынов1,2, А.Ф. Арсланова1, Р.М. Ахмадеев1, А.И. Никитин1, В.Г. Гумеров1, Э.А. Шуралев1,2,3**

**ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ОЦЕНКА СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИГЕНОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА**

*1ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань, Российская Федерация; 2Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России,* *Казань, Российская Федерация;* *3ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»,* *Казань, Российская Федерация*

**Цель работы.** Оценка серологической активности антигенов вируса бешенства, выделенных из мозговой ткани мышей гомогенизацией на FastPrep с последующим ультрацентрифугированием. **Материалы и методы.** В работе использовали производственный штамм вируса бешенства «Овечий» ГНКИ. Вирусный материал выделяли из мозговой ткани экспериментально зараженных мышей. Электрофоретический профиль вируса изучали по белковой, полисахаридной и гликолипидной составляющим. Серологическую активность компонентов вируса определяли иммуноблотом и ИФА с использованием специфических антирабических сывороток крови. **Результаты и выводы.** В ходе сравнения методов получения 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%, и соответствовала молекулярной массе 67 кДа. Специфическая антигенная активность фракции составила 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). Полученные результаты будут применимы для усовершенствования диагностики бешенства.

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

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

**M.A. Efimova1, K.S. Khaertynov1,2, A.F. Arslanova1, R.M. Akhmadeev1, A.I. Nikitin1,**

**V.G. Gumerov1, E.A. Shuralev1,2,3**

**Isolation, Purification and Serological Activity Assessment of Rabies Virus Antigens**

*1Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation;* 2*Kazan State Medical Academy – Branch FSBEI FPE RMACPE Ministry of Healthcare of Russia, Kazan, Russian Federation; 3Kazan Federal University, Kazan, Russian Federation*

**Objective.** Evaluation of the serological activity of rabies virus antigens isolated from the brain tissue of mice by homogenization on FastPrep followed by ultracentrifugation. **Materials and methods.** The production strain of the rabies virus “Ovechiy” GNKI. The viral material was isolated from the brain tissue of experimentally infected mice. The electrophoretic profile of the virus was studied for protein, polysaccharide and glycolipid components. The serological activity of the virus components determined by immunoblot and ELISA using specific anti-rabies sera. **Results and conclusions.** In the course of comparing 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 25,000 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 antigenic activity of the fraction was at the titer 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. The obtained results will be applicable for improving the diagnosis of rabies.

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

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

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

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, 5]. Заболевание проявляется и у людей, приводя зачастую к летальным исходам [12].

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 [13]. 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) [6]. Усовершенствование существующих и разработка новых молекулярно-генетических [9] и ускоренных серологических [1] методов, как эффективных средств диагностики бешенства, остаются актуальными вопросами до настоящего времени [7, 11]. Такого рода исследования требуют предварительной наработки определенных специфических биологических компонентов тест-систем, в том числе антигенов, иммуноглобулинов [14]. В частности, в качестве основы иммунизирующего материала для получения диагностических антирабических сывороток используется выращенный на культурах клеток [3] или мышах вирус. Каждый этап исследований требует не только учета генетических особенностей (вариабельности) вируса [4], но и проведения дополнительного, более углубленного изучения специфичности и чувствительности отдельных компонентов. Не соблюдение этих требований может привести к низкой диагностической эффективности тест-систем на финальном этапе разработки [8].

**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) c инфекционным титром 5,25 lg LD50/0,03мл.

Для наработки вирусного материала белых мышей линии BALB/с живой массой 6-7г заражали интрацеребрально вирусом бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ. Мышей с признаками неврологических нарушений через 5-8 суток после заражения убивали, экстрагировали мозг и готовили 20% мозговую суспензию в 0,01М фосфатно-буферного раствора.

С целью выделения вируса, часть мозговой ткани подвергали дезинтеграции на приборе FastPrep®-24 Classic Instrument (MP Biomedicals), для максимального извлечения вируса использовали пробирки Lising Matrix B; другую часть подвергали замораживанию-оттаиванию. Мозговую ткань осаждали низкоскоростным центрифугированием, cупернатант концентрировали ультрацентрифугированием при 25000 g. Очистку вируса проводили в ступенчатом градиенте сахарозы 15-50% с использованием ультрацентрифуги Optima L-90K (Beckman) с 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.

Электрофоретический профиль вируса бешенства изучали по белковой, полисахаридной и гликолипидной составляющим по Laemmli [10]. Методом иммуноблотинга (BIO-RAD) определяли серологическую активность полученного материала на модели гипериммунных сывороток, а также с использованием коллекции сывороток 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, рН 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 для 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.



**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

В супернатанте уже после первого осаждения отсутствовала зона иммуноглобулинов, что свидетельствует 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 lg LD50/0,03мл, 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 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 соответствует молекулярной массе 67,0 кДа. При этом было отмечено, что данная фракция содержала также незначительную примесь других белков. Активность белковых фракций вируса бешенства была подтверждена в сэндвич-ИФА (таблица 1). Специфическая антигенная активность фракций составила 1:640-1:1280 (Ксп=2,1-2,2).

**Таблица 1. Специфичность белковых фракций вируса бешенства после фракционирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Исследуемый материал | Титр, LD50/мл | Концентрация белка, мг/мл | Титр антигена в ИФА, 1/n\* |
| Концентрированный антиген | 105,5 | 64,7 ± 0,22 | 2560 |
| Фракция зоны 15-20% градиента плотности | – | 0,78 ± 0,03 | 1280 |
| Фракция зоны 45-50% градиента плотности | – | 0,45 ± 0,07 | 640 |

Примечание: \* - обратные значения титров антигена 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).



**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** и **10** – маркеры молекулярных масс (кДа)

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

**Заключение**

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. 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 результате иммуноблота антигенов, полученных с градиента сахарозы в диапазоне 40-45% и 20-35% после ультрацентрифугирования, выявлена одна мажорная фракция полипептидов, соответствующая 54 кДа. Полученные результаты будут применимы для усовершенствования диагностики бешенства.

**Биоэтика.** Все стадии исследования соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности». Эксперименты на животных одобрены Комитетом по биоэтике ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности».

**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. *Проблемы особо опасных инфекций*. 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. https://elibrary.ru/item.asp?id=27175046.
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. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; 2: 101-3. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-2-101-103.
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. <https://elibrary.ru/item.asp?id=25021251>.
5. Шабейкин А.А., Зайкова О.Н., Гулюкин А.М. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации за период с 1991 по 2015 годы. *Ветеринария Кубани*. 2016; 4: 4-6. https://elibrary.ru/item.asp?id=26534058.
6. 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.
7. Duong V., Tarantola A., Ong S., Mey C., Choeung 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; 46:107-14. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.03.016.
8. 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.
9. 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.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.
11. Léchenne 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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]. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016; 2: 95-101. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-95-101.
2. Belchihina 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. (In Russ.). https://elibrary.ru/item.asp?id=27175046.
3. Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Z.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]. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2014; 2: 101-3. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2014-2-101-103.
4. Gulyukin A.M., Shabejkin A.A., Zaykova O.N., Polyakova I.V., Zaberezhny A.D., Khismatullina N.A., Samerkhanov I.I. [Epidemiological features and molecular-genetic characterization of rabies virus isolates at the Republic Tatarstan]. *Veterinarny Vrach*. 2015; 6: 3-11. (In Russ.). <https://elibrary.ru/item.asp?id=25021251>.
5. Shabeikin A.A., Zaikova O.N., Gulyukin A.M. [Overview on epizootic situation on rabies in the Russian Federation for the period from 1991 to 2015]. *Veterinariya Kubani*. 2016; 4: 4-6. (In Russ.). https://elibrary.ru/item.asp?id=26534058.
6. 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.
7. Duong V., Tarantola A., Ong S., Mey C., Choeung 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; 46:107-14. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.03.016.
8. 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.
9. 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.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.
11. Léchenne 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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, Nauchniy Gorodok-2, Kazan, Tatarstan, 420075, Russian Federation. E-mail: vnivi@mail.ru.

*Khaertynov K.S.* Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchniy Gorodok-2, Kazan, Tatarstan, 420075, Russian Federation. Kazan State Medical Academy – Branch FSBEI FPE RMACPE Ministry of Healthcare of Russia, 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, Nauchniy Gorodok-2, Kazan, Tatarstan, 420075, Russian Federation. Kazan State Medical Academy – Branch FSBEI FPE RMACPE Ministry of Healthcare of Russia, 36 Butlerova St., Kazan, Tatarstan, 420012, Russian Federation. Kazan 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, г.Казань, Научный городок-2. E-mail: vnivi@mail.ru.

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

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