УДК 616.988.21:578.824.11-074

ОЛІЙНИК Н.М., канд. мед. наук, доц., e-mail: oliynyknimy@tdmu.edu.ua,
ПОКРИШКО О.В., канд. мед. наук, доц., e-mail: pokryshko@tdmu.edu.ua
Тернопільський державний медичний університет ім І.Я.Горбачевського

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКИ СКАЗУ – РЕАЛІЇ ТА ПЕРСПЕКТИВИ (оглядова стаття)

У статті проведений аналіз інформаційних даних наукової літератури щодо сучасних методів лабораторної діагностики сказу, які використовуються залежно від сформульованих завдань та можливостей лабораторії. Охарактеризовані класичні та сучасні методи лабораторної діагностики сказу, перспективність та можливість їх використання на різних етапах дослідження хворої тварини. Особливу увагу приділено впровадженню нових молекулярно-генетичних технологій, що забезпечують можливість своєчасної діагностики сказу, а як наслідок – зниження ризику інфікування тварин і людей.

Ключові слова: *сказ, рабдовірус, лабораторна діагностика, методи.*

Вступ. Сказ – особливо небезпечне вірусне захворювання спільне для людини і тварин із 100% летальністю, збудником якого є нейротропний вірус родини *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus* [1–3]. За оцінками ВООЗ, сказ входить до п’ятірки найнебезпечніших зооантропонозів, які завдають величезних соціально-економічних збитків [2, 3]. Захворювання людей на сказ реєструється на території близько 150 країн, благополучними є Австралія, Антарктида та деякі острівні держави. Щорічно в світі від сказу гине понад 55 тисяч людей і більше 1 мільйона тварин [3, 4].

В Україні останніми роками епізоотична ситуація щодо сказу залишається вкрай неблагополучною. Ризик інфікування людей небезпечним вірусом ускладнюється тим, що щорічно за медичною допомогою в зв’язку з нападами тварин звертається 100–120 тис. населення, з них понад 20 тис. отримують антирабічну вакцинацію [4].

У нашій країні природні осередки сказу реєструються в усіх областях з характерною тенденцією еволюції епізоотії як природно-вогнищевого, так і антропоургічного (міського) типу. В першому випадку резервуаром і джерелом збудника інфекції є дикі хижаки – лисиця (89,3% випадків діагностованих серед диких тварин), єнотовидна собака, куниця, вовк, у другому – безпритульні собаки та коти. Якщо раніше всі штами вірусу сказу розглядали в єдиному антигенному відношенні, то на сьогодні за допомогою генетичного аналізу виділено чотирнадцять видів роду *Lyssavirus.* Переважну більшість із них було діагностовано у кажанів. Вважають, що спільний предок роду *Lyssavirus* також викликав інфекцію у цих тварин [5]. На території України, поряд із класичними штамами вірусу сказу (RABV), в південно-східному регіоні має місце циркуляція європейських лісавірусів летючих мишей (генотип 5 (EBLV1). Протягом останніх 10-ти років випадки сказу у кажанів виявляються майже щорічно. Таким чином, тенденція розвитку епізоотії в Україні вимагає

проведення моніторингу сказу з виділенням вірусних ізолятів циркулюючих штамів збудника, їх ідентифікації та філогенетичного аналізу для встановлення відповідності вакцинним штамам.

Мета роботи. Провести аналіз літературних джерел, сучасних інформаційних даних стосовно перспективних методів лабораторної діагностики сказу.

Матеріали та методи дослідження. Аналітичний огляд проведено на основі наукових статей, авторефератів дисертаційних робіт, монографій, електронних ресурсів мережі Internet.

Результати дослідження та їх обговорення. На сьогодні діагностика сказу проводиться на основі комплексу епізоотологічних, клінічних, патологоанатомічних і лабораторних досліджень. Беручи до уваги особливу небезпечність захворювання, постановка остаточного діагнозу здійснюється лише за результатами лабораторних досліджень [6, 7].

Вірусологічна діагностика спрямована на: виявлення цитоплазматичних включень або специфічного антигену (світлова і люмінесцентна мікроскопія, реакція дифузної преципітації в агаровому гелі (РДП), імуноферментний аналіз (ІФА) тощо); виділення вірусу сказу (біологічна проба на лабораторних тваринах, або в культурі клітин); виявлення генетичного матеріалу збудника. Згідно із Національним стандартом, ветеринарні лабораторії України, в залежності від можливостей, повинні використовувати три методи, а саме: метод флуоресцентних антитіл (МФА), біопробу на білих мишах та виділення вірусу сказу за допомогою перещеплюваної культури клітин.

Методи виявлення специфічного антигену вірусу сказу. Гістологічний метод дозволяє виявити в мазках-відбитках нервових клітин головного мозку (частіше в Амоновому розі, корі), гангліях спинного мозку та слинних залозах специфічні цитоплазматичні включення – тільця Бабеша-Негрі. Їх наявність у гістологічних препаратах є достовірною діагностичною ознакою. Препарати фарбують за Селлером, Романовським-Гімзою, Манном [7]. Перевагою даного методу є можливість експрес-діагностики збудника сказу (45–60 хв). Проте, за даними окремих авторів, тільця Бабеша-Негрі виявляють лише в 65–85% випадків сказу і, як правило, при вираженій клінічній картині захворювання [7, 8]. Діагностика специфічних цитоплазматичних включень залежить від тривалості інкубаційного періоду, виду і властивостей штаму вірусу сказу. Тому їх відсутність не виключає діагнозу сказу, а матеріал продовжують досліджувати за допомогою інших методів (МФА, РДП, біопроба).

Метод флуоресцентних антитіл – це високочутливий, специфічний експрес-метод мікроскопічної діагностики вірусу сказу. На сьогодні частіше використовується прямий варіант МФА [9]. Реакція прямої імунофлуоресценції базується на мікроскопічному дослідженні під люмінесцентним мікроскопом мазків-відбитків мозкової тканини та заморожених зрізів тканин після інкубації з антирабічним поліклональним глобуліном або моноклональними антитілами, які кон’юговані з флуоресцеїнізотіоціонатом (ФІТЦ). Цей метод визнано ВООЗ

як «золотий стандарт» в лабораторній діагностиці сказу. Поріг чутливості МФА 3,8 Ig LD_{50}/см^3, тривалість дослідження 5–6 годин.

МФА використовується для прижиттєвого виявлення антигену рабдовірусу в епітеліальних клітинах рогівки і біоптатах шкіри хворих сказом тварин [9, 10]. Проте метод має ряд недоліків: можливість досліджувати лише свіжий або свіжозаморожений матеріал; неспецифічне світіння при використанні матеріалу, консервованого в гліцерині. На думку багатьох авторів МФА є високочутливим методом, при якому результати співпадають з даними біологічної проби до 98,7% [10]. Ефективність методу зростає при використанні МФА на основі моноклональних антитіл.

Реакція дифузної преципітації в агаровому гелі дозволяє виявити вірусний антиген у несвіжому, контамінованому бактеріальною мікрофлорою патологічному матеріалі. Консервований матеріал для цієї реакції не використовується. Суттєва перевага РДП – це експресність (45–60 хв), хоча результати враховують через 6, 24, 48 годин після її постановки. Варто зазначити, що за даними літературних джерел, РДП є низькочутливим тестом для виявлення вірусного антигену в досліджуваному матеріалі від 45 до 75%. Реакція буде позитивною при концентрації антигену 4,5% Ig LD_{50}/см^3 [11]. Варто зауважити, що негативна РДП не заперечує діагноз сказу. Таким чином, РДП не відноситься до абсолютно надійних методів.

Методи індикації вірусу сказу.

Біологічна проба – один із найбільш чутливих і достовірних методів лабораторної діагностики сказу. Вона вважається позитивною, якщо в препаратах головного мозку інфікованих мишей виявляють тільця Бабеша-Негрі або рабічний антиген в МФА та РДП. У разі позитивного результату мишенята хворіють і гинуть через 7–15 діб. Недоліком біопроби є тривалість досліджень (при негативному результаті до 30 діб), потенційна небезпека витоку збудника та неможливість дослідження матеріалу на етапі гниття та розкладу. До того ж це економічно витратний метод вірусологічної діагностики: потребує віварного приміщення та обслуговуючого персоналу.

Виділення вірусу сказу в культурі клітин є більш перспективним методом, оскільки дає змогу протягом 48 годин отримати результати. Для цього використовують лінії перещеплювальних культур клітин. Найбільш чутливою є культура клітин мишиної нейробластоми NA–1300 [12, 13]. Доведена ефективність використання перещеплювальної культури клітин невриноми Гасерового вузла щурів з подальшою ідентифікацією в МФА [12]. Антигени вірусу сказу виявляють в цитоплазмі клітин у вигляді жовто-зелених гранул різної форми та розмірів – від ледь помітних до 15–20 мкм в діаметрі.

Метод імуноферментного аналізу (ІФА) має низку переваг над іншими серологічними тестами: висока чутливість, специфічність, стабільність імунних комплексів, експресність, універсальність застосування, можливість проведення масових досліджень. Окрім того, візуальна оцінка результатів ІФА не потребує спеціальної апаратури, що дозволяє використовувати його в польових умовах. На практиці віддають перевагу сендвіч-методу ІФА, що має

ряд переваг над конкурентним методом, зокрема: вища чутливість та можливість використання неочищених антигенів [11–13]. Одночасне застосування ІФА і МФА сприяє більш ефективній діагностиці сказу.

Ідентифікація штамів рабічного вірусу за допомогою моноклональних антитіл (МКА). Ще одним перспективним напрямком у діагностиці сказу є використання моноспецифічних МКА для ідентифікації штамів рабічного вірусу, зокрема 1–13 серотипів вірусу сказу [12, 13].

На сьогодні МКА ефективно застосовують для діагностики, антигенного аналізу лісавірусів, селекції атенуйованих та імуногенних мутантів вакцинного вірусу, ідентифікації епізоотичних варіантів диких штамів, диференціації диких і вакцинних штамів, для оцінки ефективності оральної імунізації [14, 15]. Дані літератури свідчать про використання МКА в якості терапевтичного засобу для лікування експериментального сказу.

Для ідентифікації виділеного збудника сказу, кількісної оцінки і визначення активності антирабічної сироватки й імуноглобуліну використовують **реакцію нейтралізації** на білих мишах (mouse neutralization test – MNT). MNT використовується для дослідження віруснейтралізуючих антитіл з 1935 року. Недоліком методу є доготривалість (2 тижні) та необхідність використання лінійних дослідних тварин, що робить тест дороговартісним. Натомість використання нелінійних тварин, призводить до широкої варіабельності та низької відтворюваності результатів, а зрештою – недостатньої специфічності методу. У дослідженнях встановлено, що коефіцієнт варіації MNT становить близько 60%. З метою ефективного контролю рівня вакцинальних антитіл ВООЗ рекомендує використовувати РН в культурі клітин [16].

Для виявлення генетичного матеріалу вірусу сказу використовують дот-гібридизацію та зворотно-транскриптазну полімеразну ланцюгову реакцію (ЗТ-ПЦР). Принцип методу дот-гібридизації полягає у виявленні та ідентифікації РНК вірусу за допомогою специфічних ДНК-зондів, що являють собою мічений P^{32} фаг M^{13}, вставки якого комплементарні різним генам вакцинного штаму вірусу сказу (штам PV), або рекомбінантну плазміду з 96% кодувань послідовностей штаму ERA. Гібридизація in situ може застосовуватися для ретроспективної діагностики у тих випадках, коли виявлення специфічного антигену дає сумнівний результат і неможливо виділити вірус у культурі клітин або на лабораторних тваринах [17, 18].

Одним із найбільш ефективних методів детекції РНК вірусу сказу є виявлення збудника за допомогою ЗТ-ПЛР. Це зумовлено її високою специфічністю, чутливістю 1–10 LD_{50} / $см^3$ та швидкістю проведення (до 5-ти годин).

Метод дозволяє ідентифікувати збудника сказу на будь-якій стадії захворювання, оскільки в основу покладено аналіз генетичого матеріалу, а не його білків. Геном рабдовірусу складається з несегментованої односпіральної РНК довжиною 12 кілобаз, що кодує п’ять структурних білків: нуклеопротеїн (N), фосфопротеїн (P), матричний білок (M), глікопротеїн (G) та РНК-залежну

РНК-полімеразу (L). Суть ПЛР полягає у збільшенні кількості генетичного матеріалу, який ідентифікують у досліджуваних пробах. ЗТ-ПЛР використовують для прижиттєвої діагностики вірусної РНК у слині, спинномозковій рідині інфікованих тварин та біоптаті слинних залоз [18–20].

Висновки та перспективи подальших досліджень. Аналіз наукової літератури свідчить про широкий спектр впроваджених класичних та сучасних методів лабораторної діагностики сказу.

Зокрема, традиційні методи лабораторної діагностики сказу мають окремі недоліки: низька чутливість та специфічність (світлова мікроскопія), довготривалість досліджень (біологічна проба на білих мишах). Тому доцільним є активне впровадження таких ефективних експрес-методів діагностики як ІФА, виділення рабдовірусу у перещеплюваних культурах клітин, що характеризуються високою чутливістю і специфічністю.

Суттєвою перевагою ІФА є можливість досліджувати розкладений і консервований в гліцерині патматеріал, який не підлягає вивченню МФА. Однак, більш достовірний результат отримують при одночасному дослідженні матеріалу за допомогою МФА.

Використання молекулярно-біологічних методів, зокрема, ЗТ-ПЛР дозволяє ідентифікувати збудників на будь-якій стадії захворювання протягом 5-ти годин. ЗТ-ПЛР є значно чутливішою ніж ІФА, імуноблотинг та інші більш традиційні методи діагностики. Тому максимально перспективним, є використання тест-системи ПЛР для індикації та ідентифікації вірусу сказу, що дасть можливість не тільки проводити прижиттєву лабораторну діагностику захворювання, але й вивчати генетичну спорідненість вакцинних та диких штамів вірусу з метою підбору ефективних засобів специфічної профілактики.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Недосєков В.В. Оздоровлення території України від сказу – невідкладні завдання науки і практики / В.В. Недосєков, Л.П. Гришок, І.М. Полупан, М.Ю. Іванов // Ветеринарна медицина України. – 2009. – № 2. – С. 12–13.

2. Печенка А.М. Эпидемическая и эпизоотическая ситуация по бешенству в Украине и мире. Бешенство у животных / А.М. Печенка, А.И. Глей // Клиническая инфектология и паразитология. – 2013. – № 1 (04). – С. 96–109.

3. Анализ эпидемической и эпизоотической ситуации относительно инфекций, общих для человека и животных, в Украине за 2011–2012 гг. / И.Г. Маркович, А.И. Гриневич, А. Вержиховский, М.С. Троцкий // Клиническая инфектология и паразитология. – 2013. – № 1. – С. 60–68.

4. Кіселик І.О. Особливості клініки та діагностики сказу (огляд літератури та власні спостереження) / І.О. Кіселик, О.М. Зінчук // Сучасні інфекції. – 2010. – № 3. – С. 87–91.

5. Smith J.S. Monoclonal antibodies for the identification of rabies and non – rabies lyssaviruses / Smith J.S., King A.A. // In: Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva. – 1996. – P. 145–156.

6. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство; изд. 2-е, перераб. и доп. / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – С. 360.

7. Гулюкин А.М. Эпизоотологический мониторинг и совершенствование серологического контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.02.02 / А.М. Гулюкин. – Казань, 2011. – 24 с.

8. Груздев К.Н. Бешенство животных / К.Н. Груздев, В.В. Недосеков М.: «АКВАРИУМ», 2001. – С. 303.

9. Грибенча С.В. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства / С.В. Грибенча, А.Ю. Козлов, Л.В. Костина, А.Л. Елаков, М.А. Лосич., В.В. Цибезов // Вопросы вирусологии. – 2013. – № 5. – С. 38–43.

10. Blanton J.D. Rabies Surveillance in the United States during / J.D. Blanton, D. Palmer, J. Dyer, C. Rupprecht // JAVMA. – 2010. – Vol. 239 № 12 (6). – P. 773–783.

11. Zhang S. Competitive ELISA using a rabies glycoprotein-transformed cell line to semi-quantify rabies neutralizing-related antibodies in dogs / S. Zhang, Y. Liu, F. Zhang [et al.] // Vaccine. – 2009. – Vol. 26, № 27 (15). – P. 2108–2113.

12. Хисматуллина Н.А. Разработка экспресс-методов иммунологического мониторинга при бешенстве / Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов, М.А. Селимов, С.Р. Янбарисова // Вопросы вирусологии. 2001. – № 5. – С. 45–48.

13. Гулюкин А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза [Текст] / А.М. Гулюкин // М.: Вопросы вирусологии. 2014. – № 3. – С. 5–10.

14. Хисматуллина Н.А. Разработка и применение средств и методов диагностики бешенства / Н.А. Хисматуллина, А.Н. Чернов, Р.Х. Юсупов, А.М. Гулюкин [и др.] // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. – Казань, 2012. – С. 146-152.

15. Metlin A.E. Monoclonal antibody characterization of rabies virus isolates from Russia, Finland and Estonia / A.E. Metlin., J. Cox, S.S. Rybacov // J. Vet. Med. 2004. – № 51. – P. 94 – 96.

16. Black E.M. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. / E.M. Black, J.P. Lowings., J. Smith // J. Virol. Meth. 2002. – № 105 (1). – P. 25–35.

17. Waheley P.R. Development of a real-time, TaqMan Reverse Transcription PCR assay for detection and differentiation of Lyssavirus genotypes 1,5, and, 6 / P.R. Waheley, N. Johnson, Mc Elhinney [et al.] // J. Clin. Microbiology. – 2005. – Vol. 43. – P. 2786–2792.

18. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков [и др.]. – Москва: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.

19. Гришок Л.П. Вивчення молекулярно-генетичних варіантів вуличного вірусу сказу на території України / Л.П. Гришок, М.Ю. Іванов, О.М. Дерябін // Ветеринарна медицина України. 2010 – № 2. – С. 17–19.

20. Бешенство. Информационный бюллетень ВОЗ [Электронный ресурс]. – 2015. – № 99. – Режим доступа: http://www.who.int/ mediacentre/factsheets /fs099/ru/.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА – РЕАЛИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ (обзорная статья) / Олийнык Н.М., Покрышко О.В.

В статье отображен аналитический обзор информационных данных научной литературы о современных методах лабораторной диагностики бешенства, используемых в различных комбинациях в зависимости от поставленных заданий и возможностей лаборатории. Описаны классические и современные методы диагностики бешенства, перспективность и возможность их использования на разных этапах исследований. Особое внимание уделено внедрению новых молекулярно-генетических технологий, обеспечивающих раннюю диагностику бешенства, что, в свою очередь, приведет к снижению риска заболевания животных и людей.

Ключевые слова: *бешенство, рабический вирус, лабораторная диагностика.*

LABORATORY DIAGNOSTICS OF THE RABIES – THE REALITY AND PERSPECTIVES (review) / Oliinik N., Pokrysko O.

Introduction. *Rabies is among the top five most dangerous zooanthroponoses. Annually more than 55 thousand people and more than 1 million animals die out of rabies in the world, in Ukraine – 100-120 thousand people requested for medical assistance due to animal attacks, and above 20000 receive antirabies vaccination.*

The goal of the work. *For the purpose of analysis of modern methods used for laboratory diagnostics of rabies, a review of scientific articles, dissertations dissertations, monographs, electronic resources of the Internet had been done.*

Materials and methods. *Meta-analysis was performed on the basis of published data on rabies research, dissertation abstracts, scientific articles, monographs and electronic resources.*

Results of research and discussion. *Nowadays the final diagnosis on rabies is carried out on the basis of laboratory tests. According to the National Standard, veterinary laboratories in Ukraine should use such methods, as: immunofluorescent test, biological test with white mice and isolation of rabies virus on continuous cell culture. The disadvantage of the histological method is that unavailability of Negri bodies does not exclude the diagnosis of rabies. The direct immunofluorescence test (IFT) is used for lifetime detection of rabies virus antigen. Nevetheless, it's possibile to examine fresh or frozen biomaterial only. Immune diffusion test in gel can be used to detect a viral antigen in a contaminated pathological material. But its negative result does not deny a positive diagnosis of rabies. The biological test is most sensitive and reliable methods of laboratory diagnosis of rabies. Its disadvantage is the duration of the test (a positive result is obtained after 7-15 days), the potential danger, requirement of a vivarium. The most effective method for diagnosis of rabies is the detection of RNA viruses by polymerase chain reaction. It can be used for retrospective diagnosis too.*

Conclusions and prospects for further research*. In the article the modern references concerning laboratory diagnostics of rabies were analyzed. The classical and modern methods of laboratory diagnostics of rabies, the possibility of their use at a certain stage of diagnostics of sick animals and their advantages and disadvantages are described. Particular attention is paid to such promising rapid methods of identification of the virus as enzyme immunosorbent assay and polymerase chain reaction, which allows timely diagnosis of rabies in animals and, as a consequence, reduce the risk of infection of animals and humans.*

Keywords: *rabies virus, laboratory diagnosis, methods.*

REFERENCES

1. Nedosiekov, V.V., Hryshok, L.P., Polupan, I.M., & Ivanov, M.Yu. (2009). Ozdorovlennia terytorii Ukrainy vid skazu – nevidkladni zavdannia nauky i praktyky [Recovery from rabies in Ukraine – than urgent task of science and practice]. *Veterynarna medytsyna Ukrainy – Veterinary Medicine of Ukraine,* 2, 12-13 [in Ukrainian].

2. Pechinka, A.M., & Gley, A.I. (2013). Epidemicheskaya i epizoicheskaya situatsiya po beshenstvy v Ukraine i mire. Beshenstvo u zhyvotnykh [Epidemic and epizootic situation with rabies in Ukraine and in the world. Rabies in animals]. *Klinicheskaja infektologija i parazitologija – Clinical infectology and parasitology*, 1(04), 96–109 [in Russian].

3. Markovych, I., Grynevych, O., & Verzhyhovskyy, A. (2013). Analiz epidemicheskoy i thizooticheskoy situatsii otnositelno infectsiy, obshchih dlya cheloveka i zhivotnyh v Ukraine za 2011–2012 hh [Analysis of epidemic and epizootic situation of infections common to humans and animals in Ukraine in 2011-2012]. *Klinicheskaja infektologija i parazitologija – Clinical infectology and parasitology*, 1, 60–68 [in Russian].

4. Kiselyk, I. & Zinchuk, A. (2010). Osoblyvosti kliniky ya diahnostyky skazy (Ohlyad lyteratury ta vlasni sposterzhennya) [Special klinik and diagnoctik rabies (review literature and personal observation)]. *Suchasni infekcii' – Modern infections*, 3, 87–91[in Ukrainian].

5. Smith, J.S. & King, A.A. (1996). Monoclonal antibodies for the identification of rabies and non – rabies lyssaviruses. *In: Laboratory techniques in rabies.* 4th ed. Geneva, 145–156.

6. Onishchenko, G.G. & Kutyryov, V.V. (eds.) (2013). Laboratornaya diagnostica opasnih infekzionnikh bolezney [Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases]. *Guidance.* Moscow: ZAO «Shyko» [in Russian].

7. Hulyukin, A.M. (2011). Epizootolohicheskiy monitiring i sovershenstvovaniye serologicheskoho kontrolya effectivnosty vaktsinoprofilaktiki beshenstva [Epizootological monitoring and improvement of serological control of the effectiveness of rabies vaccine prophylaxis]. *Extended abstract of candidate's thesis.* Kazan [in Russian].

8. Gruzdev, K.H. & Nedosiekov, V.V. (2001). *Beshenstvo zhyvotnykh [Rabies of animals]* Moscow: «Akvarium» [in Russian].

9. Gribencha, S.V., Kozlov, A.Yu. & Kostina, L.V. (2013). Polucheniye monoklonalnykh antitel k nukleotroteinu virusa beshenstva [Production of the monoclonal antibodies to the rabies virus nucleoprotein]. *Voprosy virusologii – Problems of Virology***,** 5, 38–43 [in Russian].

10. Blanton, J.D., Palmer, D., & Dyer, J.C. (2010). Rupprecht Rabies Surveillance in the United States during. *JAVMA*, Vol. 239, 12 (6), 773– 783.

11. Zhang, S.Y. & Liu, F. (2009). Zhang Competitive ELISA using a rabies glycoprotein-transformed cell line to semi-quantify rabies neutralizing-related antibodies in dogs. *Vaccine*. Vol. 26, 27 (15), 2108–2113.

12. Khismatulina, N., Yusupov, R. & Selimov, M. (2001). Razrabotka jekspress-metodov immunologicheskogo monitoringa pri beshenstve [Development of rapid methods of immunological monitoring in rabies]. *Voprosy virusologii – Problems of Virology*, 5, 45–48 [in Russian].

13. Hulyukin, A.M. (2014). Znachimost sovremennykh metodov laboratornoy diahnostiky i identifikatsii vozbuditelya beshenstva dlya immunolohicheskoho monitorinha dannoho zoonoza [Significance of modern methods for laboratory detection of rabies agents and identification of the zoonose immunological survey]. *Voprosy virusologii – Problems of Virology,* 3, 5–10 [in Russian].

14. Khismatulina, N.A., Chernov, A.N., Yusupov, R.K. & Hulyukin, A.M. (2012). Razrabotka i primeneniye sredstv i metodov diahnostiki beshenstva [Development and application of ways and methods of diagnosis of rabies]. Proceedings from the conference *Scientific principles of production and quality assurance of biological preparations for the AIC*. Kazan, 146-152 [in Russian].

15. Metlin, A.E., Cox, J. & Rybacov, S.S. [et al.]. (2004). Monoclonal antibody characterization of rabies virus isolates from Russia, Finland and Estonia. *J. Vet. Med*., 51, 94–96.

16. Black, E.M., Lowings, J.P. & Smith, J. [et al.]. (2002). A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. *J. Virol. Meth*., 105 (1), 25–35.

17. Waheley, P.R., Johnson, N. & Mc Elhinney [et al.]. (2005). Development of a real-time, TaqMan Reverse Transcription PCR assay for detection and differentiation of Lyssavirus genotypes 1,5, and, 6. *J. Clin. Microbiology*, Vol. 43, 2786–2792.

18. Rebrikov, D.V. (2009). *PTsR «v realnom vremeni»* [*Real-time PCR*]. Moscow: Binom, Laboratoria znaniy [in Russian].

19. Grishok, LP, Ivanov, M.Y. & Deryabin, O.M. (2010). Vyvchennya molekulyarno-henetychnykh variantiv vulychnoho virusu skazu na terytoriyi Ukrayiny [Study of molecular genetic variants of street rabies virus on the territory of Ukraine]. *Veterinary Medicine of Ukraine,* 2, 17–19 [in Ukrainian].

20. Beshenstvo [Rabies]. Informatsionniy byuleten VOZ 2015 – WHO newsletter 2015*,* 99. *www.who.int.* Retrieved from http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/ru/ [in Russian].