

А.Г. Галеева¹ ✉,
Ш.М. Насыров¹,
Г.С. Кашеваров¹,
М.А. Ефимова^{1,2},
З.З. Алеева¹,
Г.С. Арутюнян¹,
Г.М. Яруллина¹,
Р.М. Ахмадеев¹,
В.В. Сальников³

¹ Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Казань, Россия

² Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана, Казань, Россия

³ Казанский институт биохимии и биофизики — обособленное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, Россия

✉ antonina-95@yandex.ru

Поступила в редакцию:
11.05.2023

Одобрена после рецензирования:
15.08.2023

Принята к публикации:
28.08.2023

Research article

 creative commons

Open access

DOI: 10.32634/0869-8155-2023-374-9-32-37

Antonina G. Galeeva¹ ✉,
Shamil M. Nasyrov¹,
Gleb S. Kashevarov¹,
Marina A. Efimova^{1,2},
Zamiliya Z. Aleeva¹,
Guzaliya S. Arutyunyan¹,
Gelfirya M. Yarullina¹,
Rafail M. Akhmadeev¹,
Vadim V. Salnikov³

¹ Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia

² Kazan state academy of veterinary medicine named after N.E. Bauman, Kazan, Russia

³ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics is a separate subdivision of the Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Kazan, Russia

✉ antonina-95@yandex.ru

Received by the editorial office:
11.05.2023

Accepted in revised:
15.08.2023

Accepted for publication:
28.08.2023

Иммунохроматографическая тест-система для экспресс-диагностики бешенства

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Бешенство (лат. *rabies*) входит в группу трансмиссивных вирусных зооантропонозов, глобально влияющих на здравоохранение и общественную экономику. В Российской Федерации, согласно ГОСТ 26075-2013, для диагностики бешенства приоритетен метод вирусовыделения с последующей детекцией методом флуоресцирующих антител (МФА), однако призыв Всемирной организации здравоохранения к отказу от исследований с применением животных делает актуальными дальнейшую разработку и совершенствование диагностических методов *in vitro*.

Цель исследования. Конструирование тест-системы на основе иммунохроматографического анализа (ИХА) для экспресс-диагностики бешенства.

Методы. Наночастицы коллоидного золота (НЧКЗ) с оптимальным диаметром (25–30 нм) были синтезированы посредством цитратного восстановления золотохлористоводородной кислоты и морфометрически охарактеризованы по результатам просвечивающей электронной микроскопии. Конъюгация НЧКЗ с антирабическими антителами осуществлена методом нековалентной сшивки, в результате чего были получены стабильные конъюгаты с коэффициентом иммобилизации $91,8 \pm 1,7\%$.

Результаты. Применялась классическая схема прямого (сэндвичного) ИХА, при котором жидкая фаза (образец, содержащий искомый антиген) связывается с мечеными специфическими антителами и в процессе миграции по твердой фазе образует в тестовой зоне окрашенный комплекс с нанесенными специфическими антителами («сэндвич» НЧКЗ-антитело — антиген — антитело). Постановка ИХА осуществлялась с положительными, отрицательными и гетерологичными антигенами. Итоговые данные исследования образцов методом ИХА находились в прямой корреляции с результатами иммуноферментного анализа (ИФА) и МФА и демонстрировали 100%-ную специфичность. Представленные данные подтверждают функциональность ИХА для детекции антигена вируса бешенства в патологическом материале.

Ключевые слова: бешенство, серологическая диагностика, экспресс-диагностика, иммунохроматографический анализ, гликопротеин вируса бешенства

Для цитирования: Галеева А.Г. и др. Иммунохроматографическая тест-система для экспресс-диагностики бешенства. *Аграрная наука*. 2023; 374(9): 32–37. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-374-9-32-37>

© Галеева А.Г., Насыров Ш.М., Кашеваров Г.С., Ефимова М.А., Алеева З.З., Арутюнян Г.С., Яруллина Г.М., Ахмадеев Р.М., Сальников В.В.

Immunochromatographic test-system for express diagnostics of rabies

ABSTRACT

Relevance. Rabies is included in the group of transmissible viral zoonoses that globally affect public health and the public economy. In Russian Federation, according to the State Standard 26075-2013, the method of virus isolation is a priority for the diagnosis of rabies, followed by detection by the method of fluorescent antibodies (MFA), however, the call of the World Health Organization to abandon research using animals makes it relevant to further develop and improve diagnostic methods *in vitro*.

The purpose of the study. Designing a test system based on immunochromatographic analysis (IHA) for rapid diagnosis of rabies.

Methods. Colloidal gold nanoparticles (CGN) with an optimal diameter (25–30 nm) were synthesized by citrate reduction of chloroauric acid and morphometrically characterized by the results of transmission electron microscopy. The conjugation of CGN with anti-rabies antibodies was carried out by non-covalent cross-linking, as a result of which stable conjugates were obtained with an immobilization coefficient of $91.8 \pm 1.7\%$.

Results. The classical scheme of direct (sandwich) was used IHA, in which the liquid phase (a sample containing the desired antigen) binds to labeled specific antibodies and, during migration through the solid phase, forms a colored complex with applied specific antibodies in the test zone («sandwich» NCHKZ-antibody — antigen — antibody). ICA was performed with positive, negative and heterologous antigens. The results of the study of samples by ICA were in direct correlation with the results of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and MFA and demonstrated 100% specificity. The presented data confirm the functionality of ICA for the detection of rabies virus antigen in pathological material.

Key words: rabies, serological diagnostics, express diagnostics, immunochromatographic assay, rabies virus glycoprotein

For citation: Galeeva A.G. et al. Immunochromatographic test-system for express diagnostics of rabies. *Agrarian science*. 2023; 374(9): 36–37 (In Russian). <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2023-374-9-32-37>

© Galeeva A.G., Nasyrov Sh.M., Kashevarov G.S., Efimova M.A., Aleeva Z.Z., Arutyunyan G.S., Yarullina G.M., Akhmadeev R.M., Salnikov V.V.

Введение/Introduction

Бешенство (лат. *rabies*) входит в группу трансмиссивных вирусных зооантропонозов, глобально влияющих на здравоохранение и общественную экономику [1]. Несмотря на низкие показатели заболеваемости людей гидрофобией в Российской Федерации (до 10 человек в год), в среднем около 400 тыс. подвергаются нападению подозрительных по заболеванию животных [2, 3], что свидетельствует о сохранении напряженной эпизоотолого-эпидемиологической ситуации на территории ряда регионов страны.

Согласно ГОСТ 26075-2013¹, для диагностики бешенства приоритетны МФА на культуре клеток, ИФА, реакция диффузной преципитации (РДП), полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). «Золотым стандартом» является биологическая проба на белых мышках с последующей индикацией вирусного антигена в МФА [4], однако метод, несмотря на свою достоверность и чувствительность, требует использования животных и характеризуется длительными сроками получения результата [5]. Наблюдается тенденция к отказу от исследований с применением животных делает актуальными дальнейшую разработку и совершенствование диагностических методов *in vitro*. Одним из перспективных экспресс-методов является иммунохроматографический анализ (ИХА), обладающий рядом преимуществ: низкой стоимостью, простотой проведения анализа, стабильностью при транспортировке без холодильной цепи, что делает его идеальным вариантом для первичной диагностики персоналом, не имеющим специальной квалификации [6, 7]. В ряде стран Азии и Африки, эндемичных по бешенству, тест-системы на основе ИХА широко используются для первичного мониторинга бешенства [7–9].

ИХА основан на движении элюента вдоль мембраны (метод бокового потока), которая сопровождается образованием на разных ее участках специфических иммунокомплексов, детектируемых в виде окрашенных полос. Для формирования визуального сигнала в тестах используются ферментные, латексные и металлические метки, наиболее распространенными среди которых являются наночастицы коллоидного золота (НЧКЗ). Метки на основе коллоидного золота в настоящее время широко применяются для индикации антигенов возбудителей бактериальных, вирусных, паразитарных и грибковых заболеваний, токсинов, растительных антигенов, а также для дот-блот гибридизации [10].

Цель исследования — конструирование иммунохроматографической тест-системы для экспресс-диагностики бешенства.

Материалы и методы исследований / Materials and methods

Исследования проведены в лаборатории вирусных антропозоонозов ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» («ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань, Россия) в 2022–2023 гг.

Выделение гликопротеина вируса бешенства. Вирус бешенства (штамм «Овечий» ВГНКИ, коллекция ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») с инфекционным титром ($6,23 \pm 0,1$) lg LD₅₀/0,03 мл культивировали на клетках почки

сирийского хомячка (БНК-21/13) при множественности инфицирования (МОИ) 0,01. Через 72 ч. культивирования клеточные монослои подвергали трехкратному криолизу, клеточный дебрис осаждали при 4000 g в течение 30 мин., после чего осветленный супернатант ультрацентрифугировали при 30 000 g в течение 4 ч. на центрифуге Optima XE-100 (Beckman Coulter, США). Вторичный супернатант подвергали очистке методом гель-фильтрации с поэтапным контролем очистки вируса посредством аналитического disc-электрофореза и вестерн-блоттинга [11].

Получение антирабических глобулинов. За основу выделения γ-глобулиновой фракции из пула сывороток овец, иммунизированных рабическим гликопротеином, был взят классический метод переосаждения раствором сульфата аммония (5,9 М, pH 5,4) из расчета 50% конечного насыщения [12]. Процедура переосаждения глобулинов проводили трижды, при каждом цикле исходный объем растворяемого осадка после центрифугирования при 5000 g уменьшали на 25%. Осадок промывали в растворе 2,78 М сульфата аммония, после чего проводили исчерпывающий диализ против 0,025 М трис-HCl буфера (pH 7,8). Конечные глобулиновые фракции подвергались концентрированию в закрытых диализных мешках при отрицательном давлении (-500 мБар) и хроматографической очистке на ДЭАЭ-целлюлозе со скоростью элюции 0,7 мл/мин. Специфичность полученных глобулинов определяли методом стрипового вестерн-блота с использованием контрольного антигена вируса бешенства.

Синтез наночастиц коллоидного золота. Наночастицы коллоидного золота (НЧКЗ) с диаметром 25–30 нм получали из золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК) модифицированным методом цитратного синтеза по Френсу², при этом объемы 1%-ного раствора ЗХВК и 1%-ного раствора цитрата натрия составляли 0,58 мл и 0,72 мл соответственно (на 50 мл золя). После синтеза золь охлаждали до комнатной температуры и доводили pH до 9,0 при помощи 0,2 М K₂CO₃. Гомогенность золя и размерность НЧКЗ контролировали микроскопически.

Просвечивающая электронная микроскопия. Образцы золя золота наносили на медные сетки с подложкой из пиолоформа и высушивали. Съемку НЧКЗ осуществляли в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100CX (JEOL Ltd., Япония) на увеличении 50 тыс. при ускоряющем напряжении 80 кВ. Измерения НЧКЗ проводили в программе ImageJ/FIJI³ [13].

Измеряли все частицы, индивидуально обнаруживаемые в зрительном поле, при условии, что граница частицы просматривается по всему периметру и не формирует слитный силуэт с соседней частицей. Дополнительно рассчитывали коэффициент округлости частиц по формуле:

$$C = 4 \pi \times \left(\frac{S}{P} \right)^2,$$

где C — коэффициент округлости, S — площадь, P — периметр.

Конъюгация наночастиц коллоидного золота с глобулинами. Предварительную характеристику связывания НЧКЗ с антителами определяли по стабилизации конъюгатов в солевом растворе согласно Сотникову и соавт.⁴.

¹ ГОСТ 26075-2013 Межгосударственный стандарт. Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства.

² Богачева Н.В., Смирнова Д.Н., Дармов И.В., Крупина К.А. Патент RU 2644466 C2. Способ получения наночастиц коллоидного золота диаметром 25–30 нм. Опубликовано 12.02.2018.

³ <https://fiji.sc/> Fiji разрабатывается участниками со всего мира и финансируется из различных источников. Он поддерживается группой Eliceiri/LOCi в Университете Висконсин-Мэдисон, группой Jug в Human Technopole в Милане и лабораторией Tomancak в MPI-CBG в Дрездене.

Стабилизирующую концентрацию определяли как концентрацию белка в точке выхода на плато флокуляционной кривой с превышением значения концентрации на 10% [14]. Далее к 10 мл золя золота (pH 9,0–9,5) добавляли по каплям раствор белка с выбранной концентрацией и инкубировали в течение 30 мин. при комнатной температуре с периодическим перемешиванием. По завершении конъюгации к смеси для блокирования несвязавшихся сайтов НЧКЗ и стабилизации препарата добавляли 0,25 мл 4%-ного раствора ПЭГ-20000 и БСА до конечной концентрации 0,25%. Для отделения несвязавшихся антител конъюгат осаждали в течение 30 мин. при 8000 g при +4 °C. Осадок ресуспендировали в 1 мл ФБР и хранили при +4 °C с добавлением NaN_3 . Для оценки эффективности иммобилизации глобулинов на НЧКЗ 200 мкл калибровочных растворов белка добавляли к 200 мкл НЧКЗ и инкубировали 1 час при комнатной температуре, после чего центрифугировали при 12 000 g. Количество свободных IgG в надосадке оценивали методом количественного НИФА.

Сборка мультимембранного композита и постановка иммунохроматографического анализа. Для проведения ИХА в прямом (сэндвичном) варианте был собран мультимембранный композит из мембран MDI Easypack (MDI, Индия) в следующем порядке: на аналитической мембране CNPF-SN12-L2-P25 со скоростью потока 2 см/мин, закрепленной на пластиковой подложке, формировали тестовую (антирабические глобулины барана) и контрольную (афинно-очищенные антиидовые антитела кролика против барана (ООО «Имтек», Россия) зоны. К нижнему краю подложки крепили мембрану для образца GFB-R4 и стекловолоконную подложку PT-R5, пропитанную нанозолотым конъюгатом и высушенную в течение 20 ч. при комнатной температуре, к верхнему краю — адсорбирующую мембрану AP080. Собранные композиты размещали в пластиковых микроассетах, после чего осуществляли постановку ИХА путем нанесения в соответствующую зону анализируемого образца в объеме 100 мкл. Результаты регистрировали визуально в течение 3 мин.

Валидация результатов. О специфичности ИХА судили по количеству совпадений отрицательных результатов (в процентном отношении) тестирования 20 образцов стандартной диагностической панели с результатами их исследования в непрямом ИФА и РИФ. Для оценки специфичности в исследуемую панель были включены 10 образцов, в которых вирусный антиген не был выявлен ни одним из вышеперечисленных методов, а также 10 образцов, полученных из головного мозга мышей, экспериментально зараженных эпизоотическим

штаммом вируса болезни Ауески «Арский» (инфекционный титр $3,0 \pm 0,2 \text{ Ig LD}_{50} / 0,03 \text{ мл}$).

Статистический анализ. Обработку первичных данных и статистические тесты проводили с использованием пакетов программ MS Excel и Statistica 6.0 (StatSoft, США).

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Характеристики синтезированных наночастиц коллоидного золота. Имеются сведения, что основными недостатками большинства методов, основанных на химическом восстановлении ЗХВК, являются широкий диапазон размерностей частиц и ограниченная стабильность золей [10], однако метод Френса позволяет получить относительно монодисперсные НЧКЗ диаметром 10–60 нм. Выбор определенного расчетного диаметра НЧКЗ был сделан исходя из того, что он существенно влияет на эффективность мечения. Так, наиболее распространенными в биотехнологическом применении являются НЧКЗ диаметром 20–40 нм.

На первом этапе исследований была синтезирована и морфометрически охарактеризована экспериментальная партия золей золота, параметры НЧКЗ в которых указаны в таблице 1 и на рисунке 1.

Из таблицы 1 видно, что цитратный синтез по протоколу получения НЧКЗ с прогнозируемым диаметром 25–30 нм позволяет получить НЧКЗ с фактическим диаметром $26,5 \pm 3,5$ (95% CI 26,0–26,9), а основное количество частиц попадает в размерный класс 25–30 нм (рис. 1), что позволяет определить их как кондиционные и пригодные для дальнейшей конъюгации с антителами. Согласно данным электронной микроскопии, полученные частицы относительно однородны по размеру

Рис. 1. Распределение НЧКЗ по размерным классам

Fig. 1. Distribution of CGN by size classes

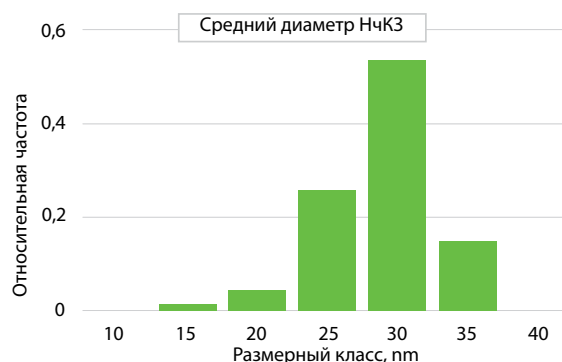


Таблица 1. Размерные характеристики синтезированных НЧКЗ (на основании 325 промеров)

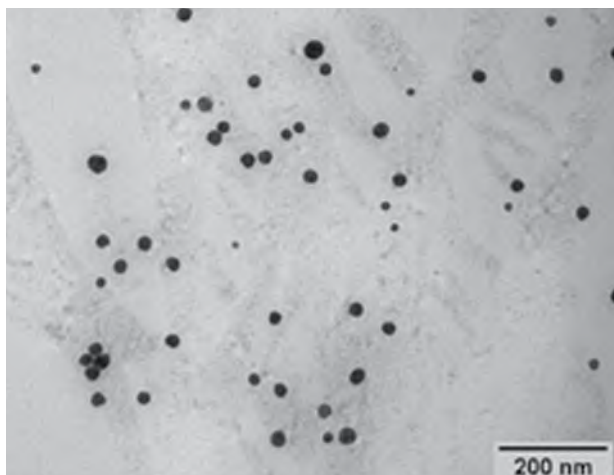
Table 1. Dimensional characteristics of the synthesized CGN (based on 325 measurements)

Показатель	Значение ($M \pm m$)	95%-ный доверительный интервал
Калиперометрический диаметр, нм	$27,9 \pm 4,1$	27,4–28,3
Калиперометрический диаметр (малый), нм	$25,1 \pm 3,8$	24,6–25,5
Среднее малых и больших диаметров, нм	$26,5 \pm 3,5$	26,0–26,9
Площадь, nm^2	$540,4 \pm 151,8$	523,8–556,9
Периметр, нм	$100,2 \pm 15,8$	98,5–101,9
Коэффициент округлости	$0,7 \pm 0,1$	0,7–0,7

⁴ Sotnikov D.V., Radchenko A.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Determination of the composition and functional activity of the conjugates of colloidal gold and antibodies. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*. 2016; 11(3): 169–179. <https://www.elibrary.ru/xfozcf>

Рис. 2. Микрофотография лабораторного образца НЧКЗ (просвечивающий электронный микроскоп JEM-100CX (JEOL Ltd., Япония))

Fig. 2. Micrograph of CGN laboratory sample (transmission electron microscope «JEM-100CX» («JEOL Ltd.», Japan))



и форме и не образуют конгломератов, что свидетельствует об их стабильности (рис. 2).

Получение конъюгатов наночастиц коллоидного золота с антирабическими антителами. Конъюгирование НЧКЗ с белками — сложный многофакторный процесс; протоколы получения подобных конъюгатов основываются преимущественно на эмпирических представлениях, противоречиво характеризующих процесс иммобилизации. Известно, что оптимальный состав конъюгата антител с НЧКЗ, обладающего максимальной аффинностью взаимодействия в иммунохимических реакциях, зависит от индивидуальных особенностей иммобилизуемого глобулинового препарата [15, 16]. Так, на втором этапе исследований была осуществлена иммобилизация антирабических антител на поверхности НЧКЗ методом прямой (нековалентной) сорбции. Применяемый лабораторный образец антирабического иммуноглобулина имел активность (предельный титр) в непрямом ИФА — 1:20480, в реакции нейтрализации флуоресцирующими антителами (модификация FAVN) — $(8,2 \pm 0,7)$ МЕ/мл, а также не проявлял кросс-реактивности с гетерологичными антигенами. Количественные характеристики процесса иммобилизации представлены в таблице 2.

Постановка иммунохроматографического анализа. Проведение ИХ-серодиагностики может быть реализовано в нескольких вариантах, которые отличаются

Таблица 2. Количественные характеристики процесса иммобилизации антирабических антител на НЧКЗ
Table 2. Quantitative characteristics of the process of immobilization of anti-rabies antibodies on CGN

Наименование показателя	Значение
«Золотое число» (минимальная стабилизирующая концентрация белка по флоккуляционной кривой), мкг/мл	$15,4 \pm 0,2$
Концентрация вносимого белка при конъюгации, мкг/мл	$60,2 \pm 0,9$
Концентрация белка в надосадке после конъюгации, мкг/мл	$4,9 \pm 0,2$
Коэффициент иммобилизации, %	$91,8 \pm 1,7$

Таблица 3. Результаты тестирования образцов методами ИХА, ИФА и МФА

Table 3. Results of testing samples by ICA, ELISA and MFA

Образец	Результаты тестирования		
	ИХА (наличие окрашенного комплекса в тестовой зоне)	Оптическая плотность (ОП) в ИФА, опт. ед. (ОЕ)	МФА (по 4-крестовой системе)
1	+	$0,959 \pm 0,051$	4+
2	+	$1,068 \pm 0,099$	4+
3	+	$0,767 \pm 0,043$	3+
4	+	$0,812 \pm 0,071$	3+
5	+	$1,233 \pm 0,112$	4+
6	+	$0,933 \pm 0,032$	4+
7	+	$0,634 \pm 0,021$	3+
8	+	$0,431 \pm 0,019$	2+
9	+	$0,514 \pm 0,037$	3+
10	–	$0,232 \pm 0,019$	+
11	–	$0,059 \pm 0,009$	–

порядком образования иммунокомплексов на мембранах, а следовательно, и составом НЧКЗ-меченого комплекса [14]. В исследовании применялась классическая схема прямого (сэндвичного) ИХА, при котором жидкая фаза (образец, содержащий искомым антиген) связывается с мечеными специфическими антителами и в процессе миграции по твердой фазе образует в тестовой зоне окрашенный комплекс с нанесенными специфическими антителами («сэндвич» НЧКЗ-антитело — антиген — антитело). Результаты сравнительного тестирования образцов стандартной диагностической панели методами ИХА, ИФА и МФА представлены в таблице 3.

Из таблицы 3 видно, что при исследовании 9 из 10 заведомо положительных (в ИФА и МФА) образцов методом ИХА результаты демонстрировали высокую корреляцию (во всех случаях в тестовых зонах мембран наблюдалось формирование иммунокомплекса в виде дискретных полос разной степени насыщенности). Наиболее яркие (сопоставимые с окрашиванием контрольной зоны) тестовые полосы формировались при исследовании явно положительных образцов, для которых характерна ОП в ИФА в диапазоне $0,412\text{--}1,345$ ОЕ, а также флуоресценция специфических комплексов в МФА, оцениваемая не менее чем в три креста (3+). Внешний вид иммунохроматографической тест-системы (на примере результата реакции с положительным

Рис. 3. Внешний вид иммунохроматографической тест-системы (на примере результата реакции с положительным образцом № 7 из диагностической панели)

Fig. 3. External view of the immunochromatographic test system (on the example of the reaction result of positive sample No. 7 from the diagnostic panel)



образцом № 7 из диагностической панели) представлен на рисунке 3.

Образец № 10 с ОП ($0,232 \pm 0,019$) ОЕ, соответствующей «зоне сомнительных результатов» для используемой ИФА-тест-системы, в ИХА не реагировал, что объясняется меньшим содержанием антигена, а также заведомо более высоким порогом чувствительности ИХА-теста относительно аналогичных реакций в жидкой фазе [16]. При тестировании подборки отрицательных образцов, а также гетерологичных антигенов сопоставимость результатов составила 100%, что свидетельствует об отсутствии ложноположительных реакций и кросс-реактивности.

Выводы/Conclusion

В результате исследований был сконструирован прототип иммунохроматографической тест-системы для экспресс-диагностики бешенства животных. Ее первичные испытания подтвердили функциональность

предлагаемого подхода для экспресс-индикации антигена вируса бешенства в образцах патологического материала: при исследовании образцов диагностической панели ИХА продемонстрировал прямую корреляцию с результатами ИФА и МФА, отсутствие ложноположительных реакций и кросс-реактивности. Однако образцы, характеризующиеся меньшим содержанием антигена и оптической плотностью, соответствующей зоне «сомнительных результатов» в ИФА, демонстрировали отрицательный результат в ИХА. Исходя из этого, в контексте дальнейших исследований актуальна задача снижения порога чувствительности тест-системы, которая может быть решена усилением контраста между тестовой и контрольной зонами путем взаимодействия иммунозолотого маркера с атомами серебра (silver enhancement), а также применением инструментальной регистрации результатов.

Все авторы несут ответственность за работу и представленные данные.

Все авторы внесли равный вклад в работу.

Авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут равную ответственность за плагиат.

Авторы объявили об отсутствии конфликта интересов.

All authors bear responsibility for the work and presented data.

All authors made an equal contribution to the work.

The authors were equally involved in writing the manuscript and bear the equal responsibility for plagiarism.

The authors declare no conflict of interest.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Новикова Е.Н., Коба И.С., Скориков А.В. Мониторинг бешенства животных в Краснодарском крае и Российской Федерации. *Ветеринария, зоотехника и биотехнология*. 2022; (11): 69–75. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202211009>
- Ботвинкин А.Д. и др. Возвращение бешенства после многолетнего межэпизоотического периода (Амурская область, Россия). *Ветеринария сегодня*. 2022; 11(4): 309–318. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-309-318>
- Ахметзянова Н.М., Свадеб Я.С. Бешенство: на пути от эпидемии к экологической болезни. *Архитектура здоровья*. 2020; (1): 18–29. <https://www.elibrary.ru/uljcos>
- Webster L.T., Dawson, Jr. J.R. Early Diagnosis of Rabies by Mouse Inoculation. Measurement of Humoral Immunity to Rabies by Mouse Protection Test. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1935; 32(4): 570–573. <https://doi.org/10.3181/00379727-32-7767P>
- Гаврилова Ю.К., Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К. Методы *in vitro* для выявления вируса бешенства и оценка их использования в производстве антирабического иммуноглобулина. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021; 21(2): 76–84. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-76-84>
- Peng D.P. et al. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2007; 117(1–2): 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.01.022>
- Tenzin T. et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test kit to the gold standard fluorescent antibody test for diagnosis of rabies in animals in Bhutan. *BMC Veterinary Research*. 2020; 16: 183. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02405-4>
- Kasempimolporn S., Saengseesom W., Huadsakul S., Boonchang S., Sitprija V. Evaluation of a rapid immunochromatographic test strip for detection of Rabies virus in dog saliva samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2011; 23(6): 1197–1201. <https://doi.org/10.1177/1040638711425576>
- Nishizono A. et al. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. *Microbiology and Immunology*. 2008; 52(4): 243–249. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00031.x>
- Дыкман Л.А., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы. *Acta Naturae*. 2011; 3(2): 36–58. <https://www.elibrary.ru/oxlvgyl>
- Ефимова М.А., Ахмадеев Р.М., Галеева А.Г., Валеева А.Р., Мифтахов Н.Р., Мукминов М.Н., Хаертенов К.С., Шуралев Э.А. Выделение гликопротеина вируса бешенства методом трехфазной экстракции и характеристика его антигенных свойств. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 1: 86–93. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-1-86-93>
- Efimova M.A., Shamaev N.D., Shuralev E.A., Mukhamedzhanova A.G., Khaertynov K.S. Optimization of the conditions for preparation of antirabic diagnostic globulins. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2018; 12(4): 1384–1389.
- Schindelin J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012; 9(7): 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. 3rd ed. New York: Academic Press. 2013; 1200. ISBN 9780123822390

REFERENCES

- Novikova E.N., Koba I.S., Skorikov A.V. Monitoring of animal rabies in the Krasnodar Territory and the Russian Federation. *Veterinary, Zootechnics and Biotechnology*. 2022; (11): 69–75 (In Russian). <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202211009>
- Botvinkin A.D. et al. Rabies re-emergence after long-term disease freedom (Amur Oblast, Russia). *Veterinary Science Today*. 2022; 11(4): 309–318 (In Russian). <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-309-318>
- Akhmetzyanova N.M., Svadeba Ya.S. Rabies: on the way from epidemic to exotic disease. *Arkhitectura zdorov'ya*. 2020; (1): 18–29 (In Russian). <https://www.elibrary.ru/uljcos>
- Webster L.T., Dawson, Jr. J.R. Early Diagnosis of Rabies by Mouse Inoculation. Measurement of Humoral Immunity to Rabies by Mouse Protection Test. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1935; 32(4): 570–573. <https://doi.org/10.3181/00379727-32-7767P>
- Gavrilova Yu.K., Generalov S.V., Abramova E.G., Nikiforov A.K. In vitro methods for rabies virus detection, and evaluation of their use in the production of rabies immunoglobulin. *BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021; 21(2): 76–84 (In Russian). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-2-76-84>
- Peng D.P. et al. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2007; 117(1–2): 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.01.022>
- Tenzin T. et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test kit to the gold standard fluorescent antibody test for diagnosis of rabies in animals in Bhutan. *BMC Veterinary Research*. 2020; 16: 183. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02405-4>
- Kasempimolporn S., Saengseesom W., Huadsakul S., Boonchang S., Sitprija V. Evaluation of a rapid immunochromatographic test strip for detection of Rabies virus in dog saliva samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2011; 23(6): 1197–1201. <https://doi.org/10.1177/1040638711425576>
- Nishizono A. et al. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. *Microbiology and Immunology*. 2008; 52(4): 243–249. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00031.x>
- Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Gold nanoparticles in biology and medicine: recent advances and prospects. *Acta Naturae*. 2011; 3(2): 34–55. <https://www.elibrary.ru/oxkwj>
- Efimova M.A., Akhmadeev R.M., Galeeva A.G., Valeeva A.R., Miftakhov N.R., Mukminov M.N., Khaertynov K.S., Shuralev E.A. Isolation of Rabies Virus Glycoprotein Using Three-Phase Extraction and Characteristics of its Antigenic Properties. *Problems of Particularly Dangerous Diseases*. 2022; 1: 86–93 (In Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-1-86-93>
- Efimova M.A., Shamaev N.D., Shuralev E.A., Mukhamedzhanova A.G., Khaertynov K.S. Optimization of the conditions for preparation of antirabic diagnostic globulins. *Asian Journal of Pharmaceutics*. 2018; 12(4): 1384–1389.
- Schindelin J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012; 9(7): 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. 3rd ed. New York: Academic Press. 2013; 1200. ISBN 9780123822390

15. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Количественные закономерности иммобилизации антител на золотых наночастицах: изучение состава и функциональной активности. *Современная химическая физика на стыке физики, химии и биологии. Сборник тезисов Международной научной конференции*. Черноголовка: Институт проблем химической физики РАН. 2021; 283, 284. <https://www.elibrary.ru/fyiabj>

16. Ярков С.П., Третьяков С.И., Шаулина Е.К., Бровкина А.Н., Храмов Е.Н. Повышение чувствительности иммунохроматографических тестов для выявления возбудителя сибирской язвы и стафилококкового энтеротоксина типа В на основе усиления серебром и инструментальной регистрации. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2019; 21(3): 454–463. <https://www.elibrary.ru/ksfst>

ОБ АВТОРАХ

Антонина Глебовна Галеева¹,
кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник
antonina-95@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2650-6459>

Шамиль Минесалихович Насыров¹,
кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник
shamyl777@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9483-8383>

Глеб Сергеевич Кашеваров¹,
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
kaschewarow@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4520-7596>

Марина Анатольевна Ефимова^{1, 2},
• доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник¹
• доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник²
marina-2004r@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0908-4058>

Замиля Загитовна Алеева¹,
младший научный сотрудник
<https://orcid.org/0000-0001-6205-9460>

Гузалия Салиджановна Арутюнян¹,
младший научный сотрудник
<https://orcid.org/0000-0002-9146-6855>

Гельфия Минзагитовна Яруллина¹,
младший научный сотрудник
<https://orcid.org/0000-0002-0413-5936>

Рафаил Мазитович Ахмадеев¹,
кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник
ahm_rafail@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1732-6977>

Вадим Владимирович Сальников³,
доктор биологических наук, профессор, заведующий кабинетом электронной микроскопии
salnikov_russ@yahoo.com
<http://orcid.org/0000-0002-2367-672X>

¹ Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности, Научный городок-2, Казань, 420075, Россия

² Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана, ул. Сибирский тракт, д. 35, Казань, 420029, Россия

³ Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное подразделение ФИЦ «Казанский научный центр Российской академии наук», ул. Лобачевского, 2, Казань, 420111, Россия

15. Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Quantitative measurements of antibody immobilization on gold nanoparticles: study of composition and functional activity. *Modern chemical physics at the intersection of physics, chemistry and biology. Collection of abstracts of the International scientific conference*. Chernogolovka: Institute of Problems of Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences. 2021; 283, 284 (In Russian). <https://www.elibrary.ru/fyiabj>

16. Yarkov S.P., Tretyakov S.I., Shaulina E.K., Brovkina A.N., Khramov E.N. Elevation the sensitivity of immunochromatographic tests to identify the causative agent of anthrax and staphylococcal enterotoxin type B based on silver amplification and instrumental recording. *Medicine of Extreme Situations*. 2019; 21(3): 454–463 (In Russian). <https://www.elibrary.ru/ksfst>

ABOUT THE AUTHORS

Antonina Glebova Galeeva¹,
Candidate of Veterinary Sciences, senior researcher
antonina-95@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-2650-6459>

Shamil Minesalikhovich Nasyrov¹,
Candidate of Veterinary Sciences, leading researcher
shamyl777@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0001-9483-8383>

Gleb Sergeevich Kashevarov¹,
Candidate of Biological Sciences, senior researcher
kaschewarow@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4520-7596>

Marina Anatolyevna Efimova^{1, 2},
• Doctor of Biological Sciences, leading Researcher¹
• Doctor of Biological Sciences, Professor, leading Researcher²
marina-2004r@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-0908-4058>

Zamilya Zagitovna Aleeva¹,
Junior researcher
<https://orcid.org/0000-0001-6205-9460>

Guzaliya Salidzhanovna Arutyunyan¹,
Junior researcher
<https://orcid.org/0000-0002-9146-6855>

Gelfirya Minzagitovna Yarullina¹,
Junior researcher
<https://orcid.org/0000-0002-0413-5936>

Rafail Mazitovich Akhmadeev¹,
Candidate of Veterinary Sciences, Leading researcher
ahm_rafail@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-1732-6977>

Vadim Vladimirovich Salnikov³,
Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of electron microscopy Department
salnikov_russ@yahoo.com
<http://orcid.org/0000-0002-2367-672X>

¹ Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchny gorodok-2, Kazan, 420075, Russia

² Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman, 35 Sibirsky trakt, Kazan, 420029, Russia

³ Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics is a separate subdivision of the Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 2 Lobachevskogo Str., Kazan, 420111, Russia