

УДК 619:616.98:578.824.11:616-036.22

НІКІТОВА А.П., канд. вет. наук, e-mail: ms.mala@ya.ru,

НИЧИК С.А., д-р вет. наук, проф., e-mail: vet@ivm.kiev.ua,

ПОЛУПАН І.М., канд. вет. наук, e-mail: vetmedic@ukr.net,

РОЗУМНЮК А.В., канд. вет. наук, e-mail: aroz@mail.ru,

Інститут ветеринарної медицини НААН

НЕДОСЕКОВ В.В., д-р вет. наук, e-mail: nedosekov1@rambler.ru,

Національний університет біоресурсів і природокористування України

ІВАНОВ М.Ю., канд. вет. наук, e-mail: ivanovny@gmail.com

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

АНАЛІЗ БІОРИЗИКІВ ТА ЇХ НЕДОПУЩЕННЯ В РАЗІ РОБОТИ З ВІРУСОМ СКАЗУ В ЛАБОРАТОРІЇ

У статті наведені основні вимоги щодо біобезпеки й біозахисту в лабораторії в разі роботи з інфекційним вірусом сказу. Описано методи, які застосовуються в лабораторії для проведення діагностичних скринінгових, моніторингових і молекулярно-генетичних досліджень та тестування вакцин. Для зменшення впливу фактору біоризику при проведенні науково-дослідних робіт з вірусом сказу, авторами було запропоновано внесення змін у робочий процес шляхом використання альтернативних методик роботи зі збудником, які прості у постановці і безпечні для персоналу

Ключові слова: *сказ, біоризик, біозахист, метод НІН, реакція нейтралізації (РН), ELISA, ЗТ-ПЛР.*

Вступ. Важливою складовою здійснення діагностичних чи пошуково-наукових робіт зі збудниками інфекційних хвороб є оцінка ступеню біоризиків. Біоризик – це небезпека для здоров'я і життя людини, яка пов'язана з дією патогенів біологічної природи [1, 2].

Робота з інфекційними агентами в першу чергу передбачає забезпечення захисту персоналу та запобігання контамінації навколишнього середовища. Одним із основних методів контролю безпечної роботи є визначення біоризиків, які можуть виникати в процесі роботи, та їхня превенція.

Одним із особливо небезпечних зоонозних таксонів є вірус сказу (II група патогенності відповідно ДержСанПравил 9.9.5.035-99; III група відповідно класифікації ВООЗ). Лабораторна робота з цим агентом (проведення діагностики, створення й тестування діагностикумів, вакцин, проведення скринінгових, моніторингових і молекулярно-генетичних досліджень) має високий ступінь ризику для здоров'я робочого персоналу та навколишнього середовища, тому необхідно впроваджувати заходи і засоби попередження й мінімізації ризиків зараження інфекційним матеріалом, а також контамінації навколишнього середовища.

На наш погляд, оптимальною моделлю управління біоризиками є модель ОЗП (оцінка, зниження і продуктивність/виконання) [2].

Під **оцінкою** розуміється процес визначення факторів ризику під час роботи з вірусом сказу для вирішення або зменшення їхньої загрози. Для **зниження** або усунення встановлених біоризиків застосовують різні заходи (використання сучасного обладнання, впровадження нових діагностичних методів, засобів індивідуального захисту тощо), в тому числі й контрольні, що пов'язані з особливостями проведення робіт із біологічним агентом; в нашому випадку – з вірусом сказу. Ефективність роботи (**продуктивність/виконання**) можна оцінити шляхом реалізації вищеописаних заходів, які створюють і забезпечують функціонування цілої системи управління біоризиками. Додатковим, але не менш важливим, аспектом ефективності роботи є процес постійного вдосконалення цієї системи.

Що стосується сказу, то лабораторій, які науково чи виробничо пов'язані з цією інфекцією не багато (в межах тридцяти). В цих лабораторіях, крім отримання обов'язкових національних дозвільних документів, з метою попередження масштабних збитків і мінімізації можливої загрози здоров'ю персоналу, рекомендовано проводити оцінку існуючої системи управління біоризиками та залучати відповідних спеціалістів з компетентних міжнародних організацій.

Метою нашої **роботи** було провести аналіз потенційних біоризиків розповсюдження вірусу сказу в лабораторних умовах та їхня превенція.

Матеріали і методи досліджень. Аналіз біоризиків проводили в умовах лабораторії нейроінфекцій ІВМ НААН.

Методика отримання мозкової суспензії вірусу сказу. Мозкову суспензію вірусу сказу отримували з патологічного матеріалу (фрагментів мозку тварини) відповідно «Способу отримання мозкової суспензії вірусу сказу» [3].

Антирабічні вакцини. В експериментах використовували Міжнародний робочий стандарт антирабічної вакцини (*International Working Standard (IWS) of Rabies Vaccine I.P.*, Індія) з імуногенною активністю 5,59 МО/дозі. Стандарт розводили на ізотонічному розчині NaCl до кінцевої імуногенності: 1,00 МО/дозі; 2,00 МО/дозі; 2,80 МО/дозі; 3,90 МО/дозі та 5,59 МО/дозі.

Дослідною була вакцина антирабічна інактивована рідка «Рабістар», виготовлена зі штаму G 52 *Wistar* (виробник Укрветпромпостач); серії № 040412; № 100713 і № 201112 володіють імуногенною активністю 4,4; 7,2 і 9,1 МО/дозі відповідно.

Для моделювання умов оцінки низькоактивних серій вакцин готували розведення вакцини «Рабістар» (серії № 040412) до імуногенності 0,7 МО/дозі.

Визначення імуногенності інактивованих антирабічних вакцин за допомогою серологічного тесту проводили відповідно «Способу визначення імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин з використанням калібрувальної кривої» [4].

Для постановки ЗТ-ПЛР використовували праймери Est до N-гену вірусу сказу [5].

Тварини. Біопробу проводили на клінічно здорових білих мишах масою тіла 9–11 г, отримували вірусомісний матеріал (головний мозок) і визначали

його інфекційну активність. Для дослідження імуногенності інактивованих антирабічних вакцин використовували білих мишей масою тіла 13–15 г.

Діагностичний набір. Для виявлення антитіл до вірусу сказу використовували тест-систему BIO RAD Platelia Rabies Kit II. Постановку реакції проводили згідно настанови з використання, а результати досліджень виражали у Міжнародних одиницях в см³ (МО/см³).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили загальноприйнятими методами, за допомогою комп'ютерної програми MS Excel.

Результати досліджень та їх обговорення. *Оцінка біоризиків.* В лабораторії нейроінфекцій проводяться науково-дослідні роботи з польовими зразками, вакцинними й референтним штамми вірусу сказу. Тому, для безпеки здоров'я працівників, проведені щеплення антирабічними вакцинами за профілактичною схемою. Для безпосередньої роботи з вірусомісним матеріалом використовуються засоби індивідуального захисту: халати, окуляри, маски, рукавички тощо.

Досліди з використанням лабораторних тварин проходять у спеціально відведеному місці віварію і контролюються відповідальними фахівцями.

Відпрацьований матеріал зберігається в спеціальних окремих контейнерах: для колючих/ріжучих, інфікованих і рідких відходів. Для знезараження відходів використовують хімічну обробку й автоклавування, а боксові приміщення після вологого прибирання з дезінфектантами знезаражують бактерицидними лампами.

Штатними працівниками проводяться серологічні дослідження сироваток крові на наявність антирабічних антитіл від домашніх та лабораторних тварин.

Найпоширенішим методом визначення антитіл до вірусу сказу є реакція нейтралізації (РН) *in vivo* (на мишах), розроблена L.T. Webster та J.R. Dawson [6]. Цей метод застосовується більше 80-и років та є референс-тестом, який володіє високою чутливістю і точністю визначення віруснейтралізуючих антирабічних антитіл. Однак, незважаючи на доведені часом та практикою переваги цього тесту, він має деякі *недоліки*: використання вірулентного вірусу (штам CVS), тривалий період аналізу (15–21 діб), відносно висока вартість тварин тощо.

Враховуючи те, що в Україні використовують широкий спектр антирабічних вакцин, у лабораторії проводять дослідження з оцінки їхньої імуногенної активності. Відомий спосіб визначення останньої є метод НІН (*National Institutes of Health*), який був розроблений у США в 1953 р. [6]. Цим методом користується чимало лабораторій різного напрямку: виробничі лабораторії, біологічні фабрики, лабораторії контролю, наукові лабораторії тощо. Однак, не дивлячись на таке широке застосування цього тесту, відзначено його певні *недоліки*, які полягають у використанні великої кількості мишей (150 голів) і тривалий час досліду (28 діб). Також існують гуманні проблеми пов'язані з введенням вірусу в мозок тварин та ризик небезпеки для персоналу в разі роботи з інфекційним вірусом сказу [7–15].

Для отримання мозкової суспензії вірусу сказу застосовують метод, який передбачає подрібнення шматочків мозку з використанням фарфорової ступки й пестика, за допомогою яких, з додаванням стерильного річного піску, проводять розтирання тканин до утворення гомогенної маси. *Недоліком* цього методу є контакт мозку з навколишнім середовищем, що створює можливість контамінації вірусомісного середовища сторонньою мікрофлорою. Крім того, існує небезпека забруднення вірусом сказу боксового приміщення чи настільного боксу, що створює загрозу життю працівників лабораторії.

У лабораторії створена колекція вуличних ізолятів вірусу сказу, яка нараховує 1366 екземплярів, отриманих від різних видів тварин. Для виділення вірусу сказу проводять біопробу на білих мишах, метод вперше запропонований L. Webster і O. Dawson в 1935 році [6], який на сьогодні є одним із основних та обов'язкових референс-тестів для постановки діагнозу на сказ. *Недоліками* біопробу є тривалість дослідження (30 діб) і необхідність використання лабораторних тварин, що вимагає обладнаного відповідно вимог окремого приміщення.

Враховуючи вищенаведене виникає необхідність розробки більш безпечних правил роботи. Усунення або заміна кожного з етапів проведення досліджень є найбільш ефективним засобом зниження ризиків, який, зазвичай, супроводжується технічним й адміністративним контролем, практикою та засобами індивідуального захисту.

Зниження біоризиків. З метою швидкого та достовірного способу тестування сироваток крові на наявність антирабічних антитіл було впроваджено нові методики, такі, як ELISA.

Перевагою ELISA є його стандартність, швидкість і легкість виконання, а також відсутність необхідності використання живого вірусу сказу та культури клітин. Він менш залежний від якості сироваток і проблем, пов'язаних з їхнім гемолізом, цитотоксичністю та бактеріальною забрудненістю [16, 17].

З використанням тест-системи BIO RAD Platelia Rabies Kit II досліджено напруженість антирабічного імунітету в собак і котів для оцінки антирабічного популяційного імунітету; сироваток крові лабораторних тварин з метою визначення впливу несприятливих умов утримання тварин на показники гуморального імунітету; дослідженні імуностимулюючого впливу різних препаратів за антирабічної вакцинації тощо.

Крім того, в пошуках альтернативного методу тестування імуногенної активності антирабічних вакцин було запропоновано серологічний метод, який базувався на дослідженні титрів антитіл у вакцинованих мишей. У результаті досліджень було встановлено, що рівень специфічних антитіл корелює з імуногенністю вакцин у лабораторних тварин (табл. 1).

Результати свідчать, що на 14-ту добу після вакцинації рівень антитіл у сироватках крові мишей усіх дослідних груп набув захисного рівня ($>0,5$ МО/см³). У підсумку встановлено мінімальний рівень антирабічних антитіл, який повинен відповідати вакцині з імуногенністю 1 МО/дозі (0,7 МО/см³).

Таблиця 1

Результати дослідження серологічної відповіді в мишей (на 14 добу) після щеплення антирабічною референс-вакциною, $M \pm m$, $n=10$

№ п/п	Групи тварин	Індекс імуногенності розведень референс-вакцини, МО/дозі	Середнє значення титру антитіл, МО/см ³
1	(IWS) - 1	1,00	0,7±0,01
2	(IWS) - 2	2,00	1,0±0,03
3	(IWS) - 3	2,80	1,3±0,02
4	(IWS) - 4	3,90	1,5±0,01
5	(IWS) - 5	5,59	1,8±0,02

Примітка: IWS – референс-вакцина.

За допомогою серологічного методу було оцінено ряд комерційних вакцин з різною імуногенною активністю (табл. 2).

Таблиця 2

Результати визначення імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин серологічним тестом і методом НІН, $M \pm m$, $n=10$

№ п/п	Групи тварин	Середнє значення титру антитіл, МО/см ³	Індекс імуногенності в тесті НІН, МО/дозі
1	(ДВ) - 1	1,6±0,05	4,4
2	(ДВ) - 2	2,2±0,02	7,2
3	(ДВ) - 3	3,2±0,10	9,1
4	(ДВ) - 4	≤0,25	0,7

Примітка: ДВ – дослідна вакцина.

В Україні законодавчо визначено мінімально-допустиму імуногенну активність антирабічних вакцин – 1 МО/дозі, а основним критерієм оцінки є титр специфічних антитіл у сироватках крові тварин на рівні 0,7 МО/см³, що відповідає рівню гуморальної відповіді мишей на введення референс-вакцини з імуногенною активністю 1 МО/доза.

Отже, було встановлено, що всі 3 серії вакцини відповідали необхідним критеріям якості, їхня імуногенність становила більше, як 3,9 МО/дозі. Однак, змодельована низькоактивна серія вакцини цього тестування не витримала, її активність становила менше 1 МО/дозі.

Був розроблений безпечний спосіб отримання мозкової суспензії, що містить вірус сказу зі збереженням максимальної інфекційної активності. Метод базується на приготуванні мозкової суспензії в стерильному герметично закритому поліпропіленовому флаконі шляхом триразового заморожування-відтаювання шматочків мозку з енергійним струшуванням у разі кожного відтаювання. Запропонований метод виключає тривалий контакт патологічного матеріалу з оточуючим середовищем і мінімізує контакт з працюючим персоналом. У результаті проведених експериментів було встановлено, що трикратне заморожування-відтаювання забезпечує максимальне збереження інфекційної активності вірусомісної суспензії до, та після видалення тканинного детриту ($6,85 \pm 0,2 - 6,78 \pm 0,3 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$).

Для біобезпечної ідентифікації вірусу сказу ми застосовували метод полімеразно-ланцюгової реакції. Для досліду підібрали дві пари праймерів, які комплементарні до консервативних ділянок початку гена нуклеопротеїну. Випробування специфічності праймерів проводили на моделі вірусу сказу референс-штаму CVS та завідомо позитивних у біопробі вуличних ізолятів вірусу сказу. В якості негативного контролю використовували матеріал від собаки, який був визнаний негативним у біопробі. В результаті, всі позитивні на сказ зразки були успішно ампліфіковані, за винятком негативного контролю (зразку, який був негативним у біопробі). Отримані результати досліджень підтверджують специфічність підібраних праймерів і можливість їхнього використання для ідентифікації вуличних ізолятів вірусу сказу методом ЗТ-ПЛР.

Продуктивність. Таким чином, для зменшення біоризиків, нами було запропоновано ряд змін у робочий процес. Це не знижувало його ефективності, як під час тестування сироваток крові, визначення імуногенності інактивованих антирабічних вакцин, так і отримання мозкового матеріалу й ідентифікації вірусу сказу.

Запропоновані методики володіють науковою новизною (підтверджені патентами України № 47938 і 99046), прості, швидкі у постановці та зменшують рівень біоризиків у лабораторії в разі проведення науково-дослідних робіт з вірусом сказу.

Висновки та перспективи подальших досліджень. В результаті застосування моделі ОЗП для оцінки біоризиків встановлено рівень небезпеки в лабораторії та розроблено шляхи його мінімізації. В роботі, що передбачає тестування сироваток крові, було усунуто фактор ризику (не потребує роботи зі штамми вірусу сказу), шляхом заміни роботи *in vivo* на *in vitro*. Серологічний аналіз є швидким методом для тестування імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин і не потребує використання живого вірусу сказу. Використання розробленої схеми, що базується на триразовому замороженні-відтаюванні мозкового матеріалу, дає можливість отримати мозкову суспензію вірусу сказу з максимально високим титром інфекційної активності. Результати ЗТ-ПЛР у 100 % відповідали результатами біопроби. Це вказує на можливість використання методу ЗТ-ПЛР в якості скринінгового тесту для ідентифікації ізолятів з метою створення їх колекції.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Безпека роботи з мікроорганізмами I–II груп патогенності. Міністерство охорони здоров'я України на 1999 рік / Міністерство охорони здоров'я України. – Київ, 1999 – 69 с.2.
2. International Biological and Chemical Threat Reduction Program [Електронний ресурс] // Sandia National Laboratories. – Режим доступу до ресурсу: biosecurity.sandia.gov/gbrmc.
3. Пат. № 47938 Україна, МПК А61К 39/205. Спосіб отримання мозкової суспензії вірусу сказу / Недосєков В.В., Гришок Л.П., Полупан І.М., Іванов М.Ю., Щербань Ю.П.; заявник і патентовласник Інститут ветеринарної медицини НААН України – № u200910290; заявл. 09.10.2009; опубл. 25.02.20104, бюл. № 4.
4. Пат. №99046. Україна, МПК А61К 39/00. Спосіб визначення імуногенної активності інактивованих антирабічних вакцин з використанням калібрувальної кривої /

Нікітова А.П., Недосеков В.В., Полупан І.М.; заявник і патентовласник Інститут ветеринарної медицини НААН України. – № u201414119; заявл. 29.12.2014; опубл. 12.05.2015, Бюл. № 9, 2015 р.

5. Іванов М.Ю. Епізоотологічна та молекулярно-біологічна характеристика вуличних ізолятів вірусу сказу в Україні: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук : спец. 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія» / М.Ю. Іванов. – Київ, 2011. – 24 с.

6. Laboratory techniques in rabies, 4-ed. Geneva // WHO. – 1996. – 476 p.

7. Barth R. NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine / R. Barth, G. Diderrich, E. Weinmann // Vaccine. – 1988. – Vol. 6. – № 4. – P. 369 – 377.

8. Standardisation and establishment of a rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns / F. Cliquet, T. Müller, F. Mutinelli [et al.] // Vaccine. – 2003. – Vol. 21. – P. 2986–2993.

9. Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method / J. Fournier-Caruana, B. Poirier, G. Haond [et al.] // Biologicals. – 2003. – Vol. 31. – P. 9–16.

10. Gamoh K. Use of ELISA for in vitro potency test of rabies vaccines for animal use / K. Gamoh, M. Senda, O. Itoh // Biologicals. – 1996. – Vol. 24. – No. 2. – P. 95–101.

11. Krämer B. The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines / B. Krämer, H. Schildger, H. A. Behrendorf-Nicol // Biologicals. – 2009. – Vol. 37. – No. 2. – P. 119–126.

12. Nedosekov V. Critical review of the NIH-method for testing potency of inactivated rabies vaccines / V. Nedosekov // Ветеринарна медицина України. – 2013. – № 10. – С. 26–29.

13. Пат. №47782. Україна, МПК А61К 39/12. Спосіб визначення імуногенної активності антирабічних вакцин / Недосеков В.В., Полупан І.М., Іванов М.Ю.; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. – № u200908606; заявл. 14.08.2009; опубл. 25.02.2010, Бюл. № 4, 2010 р.

14. Недосеков В.В. Методы тестирования инактивированных антирабических вакцин / В.В. Недосеков, И.Ф. Вишняков, К.Н. Груздев // Вопросы вирусологии. – 2001. – № 5. – С. 9–12.

15. Perrin P. In vitro rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immunocapture method with a neutralizing anti-glycoprotein monoclonal antibody / P. Perrin, S. Morgeaux, P. Sureau // Biologicals. – 1990. – Vol. 18. – P. 63–67.

16. Servat A. Collaborative study to evaluate a new ELISA test to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic carnivores / A. Servat, F. Cliquet // Virus Research. – 2006. – Vol. 120 – P. 17–27.

17. Wasniewski M. Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores / M. Wasniewski, F. Cliquet // Journal of Virological Methods. – 2012. – Vol. 179. – P. 166–175.

АНАЛИЗ БИОРИСКОВ И ИХ НЕДОПУЩЕНИЕ ПРИ РАБОТЕ С ВИРУСОМ БЕШЕНСТВА В ЛАБОРАТОРИИ / Нікітова А.П., Нычик С.А., Полупан І.Н., Розумнюк А.В., Недосеков В.В., Іванов М.Ю.

В статье приведены основные требования по биобезопасности и биозащите в лаборатории при работе с инфекционным вирусом бешенства. Описаны методы, которые применяются в лаборатории для проведения диагностических скрининговых, мониторинговых и молекулярно-генетических исследований и тестирования вакцин. Для уменьшения влияния фактора биориска при проведении научно-исследовательских работ с вирусом бешенства, авторами было предложено внесение изменений в рабочий процесс путем использования альтернативных методик работы с возбудителем, которые просты в постановке и безопасны для персонала.

Ключевые слова: бешенство, биориск, биозащита, метод НИИ, реакция нейтрализации (РН), ELISA, ОТ-ПЦР.

ANALISYS OF BIORISKS AND THEIR PREVENTION DURING WORKING WITH RABIES VIRUS IN THE LABORATORY / Nikitova A.P., Polupan I.M., Nychyk S.A., Rozumnyuk A.V., Nedosekov V.V., Ivanov M.JU.

Introduction. Biorisk generally refers to the risk associated with biological materials and/or infectious agents. An international Laboratory Biorisk Management Standard developed under the auspices of the European Committee for Standardization, defines biorisk as the combination of the probability of occurrence of harm and the severity of that harm where the source of harm is a biological agent or toxin.

The goal of the work. Analysis of biorisks of rabies virus spreading in the laboratory and its prevention.

Materials and methods of research. In our research we used the standard of rabies vaccine – International Working Standard (IWS) of Rabies Vaccine I.P. and commercial rabies vaccine Rabistar. For direction rabies virus in pathological materials on bioassay method and serological testing of rabies vaccines we used white mice weighing 9–15 g. For the detection of antibodies to the rabies virus we used test device BIO RAD Platelia Rabies Kit II.

Results of research and discussion. The article presents main requirements of organization biosafety system in laboratory during work with rabies virus, describe main methods that are used in laboratory during diagnostics, testing of vaccines, making screening, monitoring and molecular-genetic researches. As a result of use model VDP (valuation, decrease and productivity) for decreasing of biosecurity factor influence, authors proposed to make changes in working process. These changes do not reduce the effectiveness of the work while we are testing serum of blood, definition of potency of inactivated rabies vaccines, obtaining brain material and identification of rabies virus.

In this work, that involves testing serum of blood, was eliminated factor of risk (rabies virus) by changing work in vivo for in vitro.

The article showed that serological analysis is fast method for testing potency of inactivated rabies vaccines. Thus, duration of examination declines to 14 days and used less amount of mice that makes it effective and not expensive. It is required for safe work of laboratories staff, because test doesn't use live rabies virus. Presented method can be alternative for classic method NIH for testing potency rabies vaccines.

Using of developed scheme, that based on three time defrost-melt of brain material, gives an opportunity to get brain suspension of rabies virus with maximum high titer of infection potency after elimination of contamination laboratory equipment and instruments for minimizing danger for life of staff.

Results of RT-PCR in 100 % replied to results of biotest. It enables to use of RT-PCR method as diagnostic and screening test for identification isolates to make the collection of it.

Conclusions and prospects for further research. Proposed methodic have scientific novelty (confirmed by patents of Ukraine 47938 and 99046), simple, express by making them and decrease biorisk level in laboratory during scientific researches with rabies virus.

Keywords: rabies, biorisk, biosafety, NIH method, mouse inoculation test (MIT), ELISA, RT-PCR.

REFERENCES

1. Ministerstvo ohoroni zdorov'ja Ukraini (1999). *Bezpeka roboti z mikroorganizmami I–II grup patogennosti [Safety precautions with microorganisms of I-II groups of pathogenicity]*. Kyi'v [in Ukrainian].
2. Sandia National Laboratories. International Biological and Chemical Threat Reduction Program: biosecurity.sandia.gov/gbrmc.
3. Nedosekov, V.V., Gryshok, L.P. & Polupan, I.M. (2010). Sposib otrimannja mozkovoi suspensii virusu skazu [Method for preparing suspension of rabies virus from brain]. *Patent na korysnu model*, 47938, 4 [in Ukrainian].

4. Nikitova, A.P., Nedosekov, V.V. & Polupan, I.M. (2015). Sposib viznachennja imunogennoi aktivnosti inaktivovanih antirabichnih vakcin z vikoristannjam kalibruval'noi krivoi [Method determining of the potency of inactivated rabies vaccine using a calibration curve]. *Patent na korysnu model*, 99046, 9. [in Ukrainian].
5. Ivanov, M.Ju. (2011). Epizootologichna ta molekularno-biologichna charakteristika vulichnih izoljativ virusu skazu v Ukraïni [Epizootological and molecular-biological characterization of street rabies virus isolates in Ukraine.] *Extended abstract of candidate's thesis*. Kyi'v [in Ukrainian].
6. WHO (1996). *Laboratory techniques in rabies* (4 ed.). Geneva.
7. Barth, R., Diderrich, G. & Weinmann, E. (1988). NIH test, a problematic method for testing potency of inactivated rabies vaccine. *Vaccine*, 6, 4, 369–377.
8. Cliquet, F., Müller, T. & Mutinelli, F. (2003). Standardisation and establishment of a rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns. *Vaccine*, 21, 2986–2993.
9. Fournier-Caruana, J., Poirier, B. & Haond G. (2003). Inactivated rabies vaccine control and release: use of an ELISA method. *Biologicals*, 31, 1, 9–16.
10. Gamoh, K., Senda, M. & Itoh O. (1996). Use of ELISA for in vitro potency test of rabies vaccines for animal use. *Biologicals*, 24, 2, 95–101.
11. Krämer, B., Schildger, H. & Behrendorf-Nicol, H. A. (2009). The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines. *Biologicals*, 37, 2, 119–126.
12. Nedosekov, V. (2013). Critical review of the NIH-method for testing potency of inactivated rabies vaccines. *Veterynarna medytsyna Ukrainy – Veterinary medicine of Ukraine*, 10, 26–28 [in Ukrainian].
13. Nedosekov, V.V., Polupan, I.M. & Ivanov, M.Yu. (2010). Sposib vyznachennya imunogennoi aktivnosti antyrabichnykh vakcyn [Method for determination of immunogenic activity of antirabic vaccines]. *Patent na korysnu model*, 47782, 4. [in Ukrainian].
14. Nedosekov, V.V., Vyshnyakov, Y.F. & Gruzdev, K. N. (2001) Metody testirovaniia inaktivirovannykh antirabicheskikh vaktzin. [Methods for evaluating the potency of inactivated rabies vaccines are reviewed]. *Voprosy virusologii – Virology questions*, 5, 9-12 [in Russian].
15. Perrin, P., Morgeaux, S. & Sureau, P. (1990). In vitro rabies vaccine potency appraisal by ELISA: advantages of the immunocapture method with a neutralizing anti-glycoprotein monoclonal antibody. *Biologicals*, 18, 321–330.
16. Servat, A. & Cliquet, F. (2006). Collaborative study to evaluate a new ELISA test to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic carnivores. *Virus Research*, Vol. 120, 17–27.
17. Wasniewski, M. & Cliquet, F. (2012) Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores. *Journal of Virological Methods*, Vol. 179, 166–175.