



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-262-272>

УДК 619:616.98:578.824.11:616-076:577.2



Разработка тест-системы для выявления генома вируса бешенства на основе ПЦР в режиме реального времени с использованием эндогенного контроля: теоретический дизайн и оптимизация

С. А. Чупин, Е. В. Чернышова, Е. А. Чуфарова

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), ул. Гвардейская, 6, мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Бешенство в России, несмотря на снизившуюся в последние десять лет инцидентность, остается крайне актуальным заболеванием. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в разных вариантах является одним из методов обнаружения и характеристики вируса бешенства в патологическом материале. Для обеспечения надежной диагностики при разработке ПЦР должны быть учтены актуальные данные по генетическим особенностям изолятов, циркулирующих на определенной территории.

Цель исследования. Выполнение теоретического дизайна и оптимизация тест-системы на основе совмещенной обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (С-ОТ-ПЦР) для выявления фрагмента генома вируса бешенства с использованием эндогенного внутреннего контроля.

Материалы и методы. В работе использованы вакцинный штамм вируса бешенства «РВ-97» и лабораторный фиксированный штамм вируса бешенства «CVS», образцы головного мозга животных разных видов, положительные и отрицательные на вирус бешенства. Дизайн олигонуклеотидов и проверку специфичности *in silico* осуществляли с помощью онлайн-сервиса Primer Blast. Для проведения С-ОТ-ПЦР использованы реактивы НПК «Синтол» (Россия).

Результаты. В результате анализа 193 последовательностей гена N изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории России и сопредельных государств, был разработан дизайн шести праймеров и двух TaqMap-зондов. Экспериментальным путем из них были выявлены лучшие два праймера и зонд для создания тест-системы. В ходе серии экспериментов были оптимизированы такие параметры С-ОТ-ПЦР, как концентрация олигонуклеотидов, концентрация ионов магния и температура отжига. Для проведения контроля условий реакции в каждой пробирке была разработана система олигонуклеотидов для амплификации и детекции участка гена бета-актина млекопитающих. Экспериментально продемонстрирована возможность одновременного применения двух систем ПЦР в одной пробирке. Анализ 193 последовательностей гена N различных изолятов вируса бешенства показал, что разработанные олигонуклеотиды теоретически могут обеспечивать выявление подавляющего большинства вирусов, циркулирующих на территории Российской Федерации и сопредельных государств.

Заключение. Разработаны и оптимизированы основные компоненты и условия реакции тест-системы для выявления генома вируса бешенства методом С-ОТ-ПЦР с использованием эндогенного внутреннего контроля на основе гена бета-актина млекопитающих.

Ключевые слова: вирус бешенства, тест-система, ПЦР в режиме реального времени, одношаговая ОТ-ПЦР, совмещенная ОТ-ПЦР, эндогенный внутренний контроль, бета-актин, молекулярная диагностика бешенства

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

Для цитирования: Чупин С. А., Чернышова Е. В., Чуфарова Е. А. Разработка тест-системы для выявления генома вируса бешенства на основе ПЦР в режиме реального времени с использованием эндогенного контроля: теоретический дизайн и оптимизация. *Ветеринария сегодня*. 2026; 15 (3): 262–272. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-262-272>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Чупин Сергей Александрович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», ул. Гвардейская, 6, мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия, chupin@arriah.ru

Development of a test system for detection of the rabies virus genome using real-time PCR with an endogenous control: Theoretical design and optimization

Sergei A. Chupin, Elena V. Chernyshova, Ekaterina A. Chufarova

Federal Centre for Animal Health, ul. Gvardeyskaya, 6, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia

ABSTRACT

Introduction. Although rabies incidence in Russia has decreased over the past ten years, it still remains a highly relevant disease. Polymerase chain reaction (PCR) in its various modifications is one of the tools for detecting and characterizing rabies virus in pathological samples. To ensure reliable diagnosis, the current data on genetic properties of the isolates circulating in particular area should be considered when developing PCR.

© Чупин С. А., Чернышова Е. В., Чуфарова Е. А., 2026

Objective. Providing a theoretical foundation and optimizing the test system based on combined reverse transcription polymerase chain reaction (C-RT-PCR) for the detection of a rabies virus genome fragment using endogenous internal control.

Materials and methods. Rabies virus vaccine strain "RV-97" and laboratory fixed rabies virus strain "CVS", brain samples from animals of various species, both rabies virus positive and negative, were used in the work. Oligonucleotide design and *in silico* specificity testing were performed using Primer Blast online tool. Syntol reagents (Russia) were used for C-RT-PCR.

Results. As a result of the analysis of 193 N-gene sequences of rabies virus isolates circulating in Russia and neighboring countries, six primers and two TaqMan probes were designed. Two primers and a probe, optimal for the development of the test system, were experimentally identified. During a series of experiments, C-RT-PCR parameters such as oligonucleotide and magnesium ion concentrations, as well as annealing temperature were optimized. To control the reaction conditions in each tube, an oligonucleotide system was developed for the amplification and detection of the mammalian beta-actin gene region. The possibility of simultaneous application of two PCR systems in one test tube has been experimentally demonstrated. Analysis of 193 N-gene sequences of various rabies virus isolates showed that the developed oligonucleotides can theoretically ensure detection of the vast majority of the viruses circulating in the Russian Federation and neighboring countries.

Conclusion. The main components and reaction conditions of the test system for detecting the rabies virus genome by C-RT-PCR using mammalian beta-actin gene-based endogenous internal control have been developed and optimized.

Keywords: rabies virus, test system, real-time PCR, combined RT-PCR, one-step RT-PCR, endogenous internal control, beta-actin, rabies molecular diagnosis

Acknowledgements: The work was performed at the expense of the Federal Centre for Animal Health in the framework of scientific research on the topic "Animal Health Freedom".

For citation: Chupin S. A., Chernyshova E. V., Chufarova E. A. Development of a test system for detection of the rabies virus genome using real-time PCR with an endogenous control: Theoretical design and optimization. *Veterinary Science Today*. 2026; 15 (3): 262–272. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-262-272>

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

For correspondence: Sergei A. Chupin, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, Federal Centre for Animal Health, ul. Gvardeyskaya, 6, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia, chupin@arriah.ru

ВВЕДЕНИЕ

Бешенство в России, несмотря на снизившуюся в последние десять лет инцидентность [1], остается крайне актуальным заболеванием. За шесть лет (с 2020 по 2025 г.) зафиксировано в среднем в год 1180 случаев заболевания животных бешенством (минимально: 810 – в 2022 г., максимально: 1579 – в 2020 г.).

В российских ветеринарных диагностических учреждениях в рутинной диагностике бешенства первоначально используется метод флуоресцирующих антител. В случае получения отрицательных или сомнительных результатов прибегают к вспомогательным методам, таким как биопроба на чувствительных животных или в культуре клеток, иммуноферментный анализ, реакция иммунопреципитации [2, 3].

Всемирная организация здравоохранения животных (ВОЗЖ) также рекомендует полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в классическом варианте и в режиме реального времени для выявления вирусов рода *Lyssavirus*, а более узкоспецифичные варианты ПЦР – для сомнительных случаев [4]. Согласно последним данным Международного комитета по таксономии вирусов, род *Lyssavirus* включает 19 видов [5]. На территории РФ выявлялись вирусы только 4 видов: вирус классического бешенства (*Lyssavirus rabies*), лиссавирус Иркут (*Lyssavirus irkut*), лиссавирус западно-кавказских летучих мышей (*Lyssavirus caucasicus*) и лиссавирус европейских летучих мышей I типа, современное название которого – лиссавирус Гамбург (*Lyssavirus hamburg*) [6, 7, 8]. Однако подавляющее число случаев заболеваний человека и животных приходится на вирус классического бешенства (вирус бешенства).

Лиссавирусы последних трех видов в природе были обнаружены только у летучих мышей, зафиксировано менее 10 случаев поражения этими вирусами людей, имевших контакт с летучими мышами [9]. Таким образом, наиболее целесообразным представляется сфокусироваться на разработке тест-системы выявления вируса бешенства, а в тех редких случаях, где вовлечены летучие мыши, использовать соответствующие методы с родоспецифическими праймерами.

На основании филогенетического анализа изоляты вируса бешенства могут быть объединены в две крупные группы: Bat-related и Dog-related [10, 11, 12]. К группе Bat-related относятся вирусы Нового Света, циркулирующие среди летучих мышей, а также некоторых наземных хищных, таких как скунсы и еноты [13, 14, 15, 16]. К группе Dog-related относятся вирусы, циркулирующие по всему миру среди собак, а также диких хищных, таких как лисы и енотовидные собаки в Европе, лисы на Ближнем Востоке, лисы, енотовидные собаки и хорьковые барсуки в Азии, скунсы, лисы, койоты и мангусти в Америке и мангусти в Африке [13, 15, 17, 18, 19, 20, 21].

Группа Dog-related включает, в свою очередь, шесть больших клад: Africa-2, Africa-3, Arctic-related, Asian, Cosmopolitan и Indian subcontinent [11].

На территории РФ обнаруживаются вирусы бешенства, относящиеся к двумкладам: Arctic-related и Cosmopolitan. Клада Arctic-related делится на две большие генетические группы: Arctic и Arctic-like [12]. Аклада Cosmopolitan делится на множество генетических групп; на территории России выявляются представители групп C (steppe), D, E, F (Caucasion) [22, 23, 24].

Генетические группы Arctic, Arctic-like, C, в свою очередь, делятся на генетические подгруппы и более мелкие таксоны [12, 23].

Учитывая такое большое генетическое разнообразие, представляется целесообразным использовать при разработке методики изоляты клад Arctic-related и Cosmopolitan, охватывая все генетические группы и входящие в них подгруппы, которые были выявлены на территории России, а также сопредельных государств.

Актуальные нормативы предъявляют достаточно жесткие требования к качеству исследований, проводимых методом ПЦР. Применение внутренних контролей, свидетельствующих об успешном выделении нуклеиновой кислоты и наличии приемлемых условий реакций в каждой пробирке, является современным стандартом [25, 26]. Есть различные подходы к дизайну системы внутреннего контроля. Одним из наиболее привлекательных для разработки тест-системы является использование параллельной реакции амплификации и детекции какого-либо гена домашнего хозяйства из клеток исследуемого организма, которые в любом случае содержатся в тестируемом образце [27]. Такой подход позволяет сократить расходы на производство внутреннего контрольного образца (ВКО), исключает этап добавления ВКО в ходе проведения испытаний, что в конечном итоге снижает стоимость набора реагентов и сокращает время исследования.

Цель исследования – выполнение теоретического дизайна и оптимизация тест-системы на основе совмещенной обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (С-ОТ-ПЦР) для выявления фрагмента генома вируса бешенства с использованием эндогенного внутреннего контроля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Статистические данные о заболеваемости бешенством животных за 2020–2025 гг. получены из информационно-аналитического центра ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир.

В работе использованы вакцинный штамм вируса бешенства «РВ-97» и лабораторный фиксированный штамм вируса бешенства «CVS» с инфекционной активностью 6,2 и 7,6 lg ТЦИД₅₀/мл соответственно.

Материалом для исследования послужили образцы головного мозга животных разных видов, положительные и отрицательные на вирус бешенства, поступившие для анализа в референтную лабораторию по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир).

Выделение РНК проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-сорб» (ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя.

Олигонуклеотиды синтезированы в НПК «Синтол» (Россия).

Для С-ОТ-ПЦР использованы реактивы из «Набора реагентов для проведения ПЦР, совмещенной с реакцией обратной транскрипции» производства НПК «Синтол» (кат. № ОТ-02).

Выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли в программе BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.2.5 [28] с помощью алгоритма CLUSTAL с параметрами по умолчанию. Подсчет нуклеотидных отличий (%) между

последовательностями производили в той же программе с использованием утилиты Sequence Identity Matrix. Дизайн олигонуклеотидов и проверку специфичности *in silico* осуществляли с помощью онлайн-сервиса Primer Blast¹.

В качестве отрицательного контрольного образца использовали деионизированную воду, свободную от нуклеаз, производства НПО «Евроген» (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В базе данных GenBank преобладает информация о гене N изолятов вируса бешенства по сравнению с другими генами. Кроме того, ген N является наиболее консервативным среди всех генов вируса бешенства [29]. Поэтому этот ген был выбран мишенью для системы детекции генома вируса бешенства. Вирусы бешенства, циркулирующие на территории РФ, отличаются большим разнообразием. Анализ нуклеотидных последовательностей гена N изолятов вируса бешенства, информация о которых содержится в GenBank, показывает, что внутри клады Arctic-related нуклеотидные отличия между наименее родственными изолятами составляют до 9,0%. Внутри клады Cosmopolitan отличия составляют до 14,2%. Следовательно, требуется тщательный анализ последовательностей, чтобы подобрать праймеры таким образом, чтобы они подходили ко всем изолятам, для которых может потребоваться экспертиза на территории РФ, с минимальным числом несовпадений нуклеотидов. Также следовало учитывать изоляты, выявленные на территории соседних государств, ввиду возможности заноса вируса в РФ.

Исходя из вышеизложенных требований, для дизайна праймеров было получено выравнивание, содержащее, после исключения идентичных и почти идентичных, последовательности полноразмерного гена N (1353 н. о.) 190 изолятов вируса бешенства, а именно:

- 85 изолятов группы C (разные подгруппы);
- 33 изолята группы D;
- 6 изолятов группы E (NEE), включая 3 изолята из Эстонии;
- 7 изолятов группы F, включая 4 изолята из Грузии и по одному изоляту из Турции и Ирана;
- 33 изолята группы Arctic;
- 10 изолятов группы Arctic-like;
- 12 изолятов из стран Европы и Азии, представляющих группы EE, WE, CE, CA4;
- 4 изолята клады Asian, выявленные в Китае.

Кроме того, были учтены последовательности гена N трех вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых в России. Характеристика изолятов, использованных при дизайне праймеров, представлена в таблице 1, размещенной в разделе *Дополнительные файлы* по адресу <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2026-15-3-262-272>.

Подбор олигонуклеотидов проводили в соответствии с принципами, изложенными в работе S. Bustin and J. Huggett [30]. Поиск консервативных участков гена N осуществляли на выравнивании изолятов вируса бешенства в программе BioEdit и подбирали к ним олигонуклеотиды с помощью онлайн-сервиса Primer-Blast. В результате было получено 6 праймеров (3 прямых и 3 обратных) и 2 TaqMan-зонда (табл. 2).

¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>

Таблица 2

Первичная структура праймеров и зондов для разработки тест-системы для выявления генома вируса бешенства методом ПЦР в режиме реального времени

Table 2

Primary structure of primers and probes for the development of the test system for rabies virus RNA detection by real-time PCR

№	Наименование	Первичная структура (5'...3')	Положение в гене N	Ориентация
1	RRTF492_SC	CATTGCAGATAGGATAGAGCA	492–512	прямой
2	RRTR645_SC	GGAGAAAAACATGTCGTAGGT	625–645	обратный
3	RRTF796A_SC	GAGGAAGAGATAAGAAGRATGT	796–817	прямой
4	RRTF914_SC	TTGGTCATGTGTTAATCTCAT	914–935	прямой
5	RRTR1093_SC	CTTCTCATCTCTGAAGAATCT	1072–1093	обратный
6	RRTR1102_SC	CTGAAGTCTTCTCATCTCT	1081–1102	обратный
7	Probe-RRTF577_SC	FAM-ATGTGTGCTAATTGGAGTACTATAC-RTQ1	577–601	прямой
8	Probe-RRTR1016_SC	FAM-GCATGTGCTCCTCATGAGATGTC-RTQ1	1016–1038	прямой

Данные олигонуклеотиды теоретически могут сочетаться в системе ПЦР в пяти различных комбинациях (табл. 3). Эти комбинации были проверены *in silico* на специфичность относительно нуклеотидных последовательностей, представленных в GenBank, при этом потенциальных неспецифических совпадений с гетерологичными последовательностями выявлено не было.

Разработанные олигонуклеотиды были синтезированы, и каждая комбинация опробована в ПЦР на примере штаммов вируса бешенства «PB-97» и «CVS». При этом была использована программа температурно-временных режимов, рекомендованная инструкцией к «Набору реагентов для проведения ПЦР, совмещенной с реакцией обратной транскрипции». По результатам эксперимента лучшей комбинацией олигонуклеотидов, при использовании которой значение *Ct* было наименьшим (23,3 для «CVS» и 27,6 для «PB-97»), была RRTF492_SC, RRTR645_SC, Probe-RRTF577_SC, в то время как при использовании других комбинаций значение *Ct* было выше (24,1–25,6 для «CVS» и 27,8–28,9 для «PB-97»). Поэтому комбинация № 1 была выбрана для дальнейшей работы. Пример графика накопления флуоресцентного сигнала показан на рисунке 1. Соответствие олигонуклеотидов из комбинации № 1 нуклеотидным последовательностям различных изолятов вируса бешенства представлено на рисунке 2.

В ходе серии экспериментов были оптимизированы такие параметры С-ОТ-ПЦР, как концентрация олигонуклеотидов, концентрация ионов магния и температура отжига. Оптимизация проводилась с использованием двух штаммов вируса бешенства – «PB-97» и «CVS» – в качестве положительных контролей. Оптимальные концентрации олигонуклеотидов составили 0,4 мкМ для праймеров и 0,8 мкМ для зонда. Оптимальная концентрация ионов магния – 4 мМ. Оптимальная температура отжига – 56 °С. В конечном итоге программа для ОТ-ПЦР получила вид:

- 1) 45 °С – 20 мин;
- 2) 95 °С – 5 мин;
- 3) 37 циклов:
 - а) 95 °С – 15 с;
 - б) 56 °С – 15 с;
 - в) 72 °С – 15 с.

Таблица 3

Комбинации праймеров и зондов для разработки тест-системы для выявления генома вируса бешенства методом ПЦР в режиме реального времени

Table 3

Combinations of primers and probes for the development of the test system for rabies virus RNA detection by real-time PCR

№	Олигонуклеотиды	Размер ампликона
1	RRTF492_SC, RRTR645_SC, Probe-RRTF577_SC	154
2	RRTF796A_SC, RRTR1093_SC, Probe-RRTR1016_SC	297
3	RRTF796A_SC, RRTR1102_SC, Probe-RRTF1016_SC	306
4	RRTF914_SC, RRTR1093_SC, Probe-RRTF1016_SC	179
5	RRTF914_SC, RRTR1102_SC, Probe-RRTF1016_SC	188

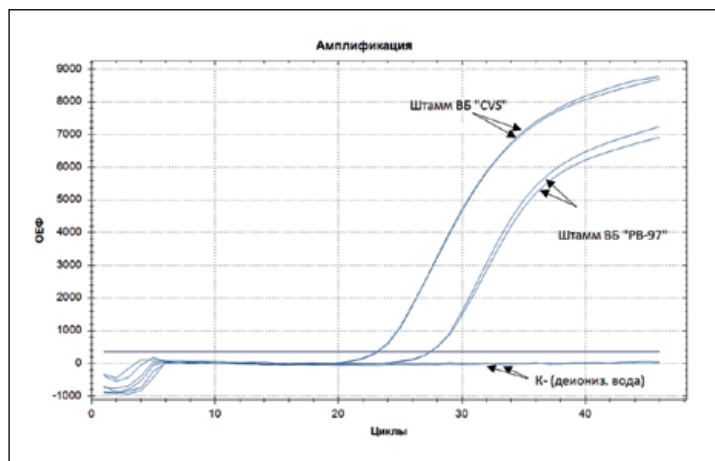


Рис. 1. График накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM в С-ОТ-ПЦР с олигонуклеотидами RRTF492_SC, RRTR645_SC и Probe-RRTF577_SC на примере штаммов вируса бешенства и отрицательного контроля (n = 2)

Fig. 1. Fluorescence signal accumulation curve for FAM channel in C-RT-PCR with oligonucleotides RRTF492_SC, RRTR645_SC, and Probe-RRTF577_SC by the example of rabies virus strains and a negative control (n = 2)

Флуоресцентный сигнал считывается по каналу FAM на шаге 3(б).

Для проведения контроля условий реакции в каждой пробирке был выбран подход с применением так

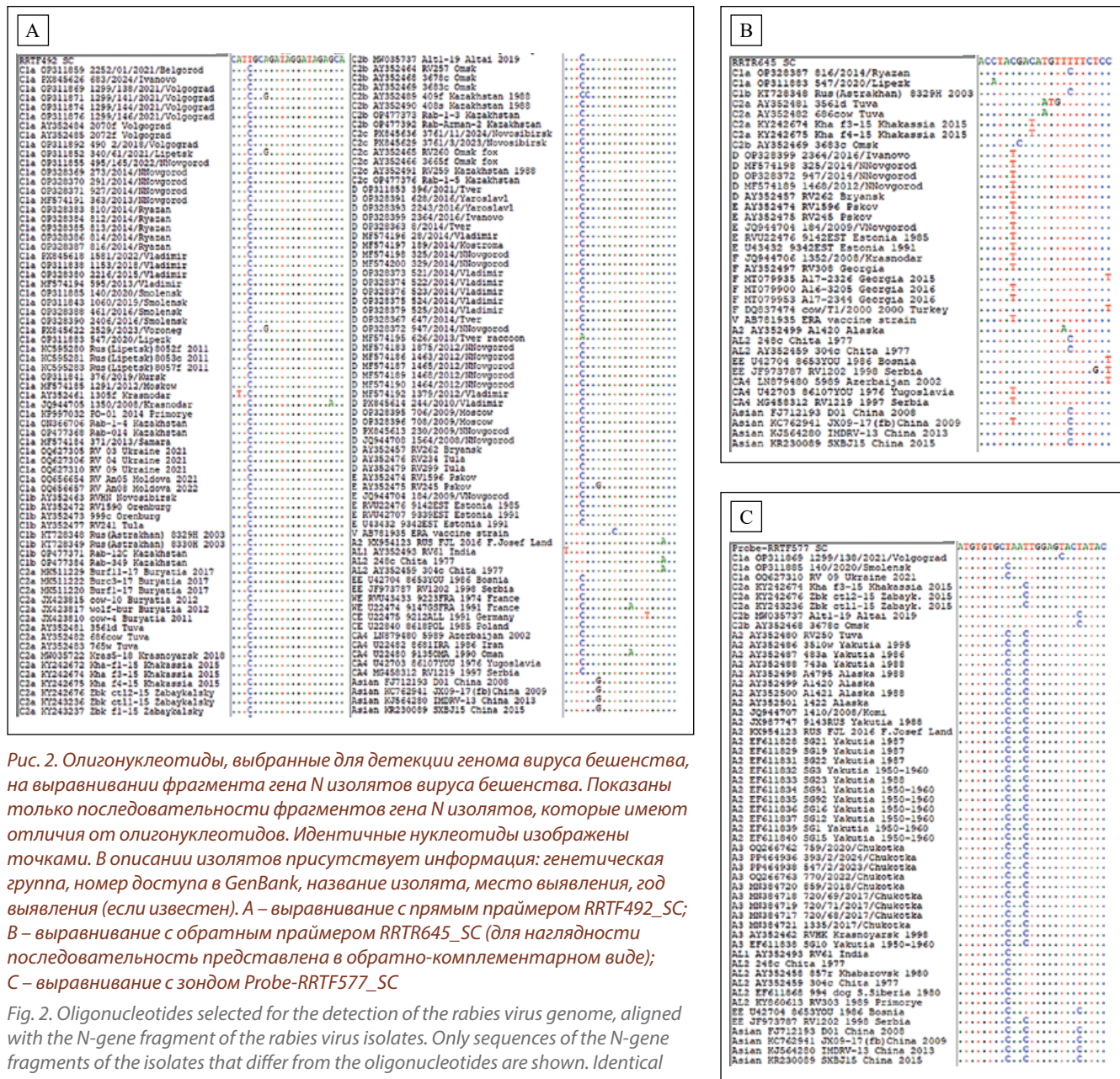


Рис. 2. Олигонуклеотиды, выбранные для детекции генома вируса бешенства, на выравнивании фрагмента гена N изолятов вируса бешенства. Показаны только последовательности фрагментов гена N изолятов, которые имеют отличия от олигонуклеотидов. Идентичные нуклеотиды изображены точками. В описании изолятов присутствует информация: генетическая группа, номер доступа в GenBank, название изолята, место выявления, год выявления (если известен). А – выравнивание с прямым праймером RRTF492_SC; В – выравнивание с обратным праймером RRTR645_SC (для наглядности последовательность представлена в обратном-комплементарном виде); С – выравнивание с зондом Probe-RRTF577_SC

Fig. 2. Oligonucleotides selected for the detection of the rabies virus genome, aligned with the N-gene fragment of the rabies virus isolates. Only sequences of the N-gene fragments of the isolates that differ from the oligonucleotides are shown. Identical nucleotides are featured as dots. The isolate description line includes the following information: genetic group, GenBank accession number, isolate name, site of detection, and year of detection (if known). A – alignment with the forward primer RRTF492_SC; B – alignment with the reverse primer RRTR645_SC (for clarity, the sequence is shown in reverse-complement format); C – alignment with Probe-RRTF577_SC

Таблица 4

Первичная структура праймеров и зондов для разработки тест-системы для выявления генома вируса бешенства методом ПЦР в режиме реального времени

Table 4

Primary structure of primers and probes for the development of the test system for rabies virus RNA detection by real-time PCR

№	Наименование	Первичная структура (5'...3')	Положение в гене бета-актина*	Ориентация
1	ICFHD_SC	SATGAAGATCAAGATCATYGC	1056–1076	прямой
2	ICR_SC	TTTGGCGTGSACGATGGAG	1186–1204	обратный
3	Probe-IC_SC	Cy5-CCAGCAGATGTGGATCAGCAAG-RTQ2	1140–1161	прямой

* нумерация приведена по последовательности гена бета-актина человека NM_001101 (numbering is given according to human beta-actin gene sequence NM_001101).



Рис. 3. Олигонуклеотиды для системы эндогенного контроля на выравнивании фрагмента гена актина различных видов млекопитающих. Идентичные нуклеотиды изображены точками. В заголовке последовательностей присутствует информация: номер доступа в GenBank, биномиальное название вида животного / отряд / семейство. А – выравнивание с прямым праймером ICFHD_SC; В – выравнивание с обратным праймером ICR_SC (для наглядности последовательность представлена в обратном-комплементарном виде); С – выравнивание с зондом Probe-IC_SC

Fig. 3. Oligonucleotides for the endogenous control system aligned with the actin gene fragment of various mammalian species. Identical nucleotides are featured as dots. The sequence description lines include the following information: GenBank accession number, binomial species name / order / family. A – alignment with the forward primer ICFHD_SC; B – alignment with the reverse primer ICR_SC (for clarity, the sequence is shown in reverse-complement format); C – alignment with Probe-IC_SC

Специфичность дизайна праймеров была проверена с помощью интернет-сервиса Primer-BLAST. Проверка показала, что данная система в ряде случаев нацелена также на другие подвиды актина (альфа-актин, гамма-актин) и другие виды животных, включая беспозвоночных, что можно объяснить, по всей видимости, тем, что данные разновидности гена актина являются паралогами [37]. Последовательность зондов в этих случаях также совпадала с соответствующими участками генома. Подобная неспецифичность в данном случае не искажает результатов исследования, поскольку цель системы – подтвердить наличие

называемого эндогенного контроля (ЭК), когда наряду с целевой параллельно проводится реакция, направленная на амплификацию и детекцию участка какого-либо гена домашнего хозяйства, который непременно должен находиться в тестируемом образце. В ряде исследований, в том числе направленных на детекцию вируса бешенства, в качестве искомого гена домашнего хозяйства был выбран ген бета-актина млекопитающих [31, 32, 33, 34].

Одной из характерных особенностей бешенства является то, что заболеванию подвержен чрезвычайно широкий круг животных – все виды млекопитающих [35]. Поэтому, чтобы увеличить надежность методики, следовало взять имеющиеся последовательности гена бета-актина достаточно большого количества видов млекопитающих из различных отрядов. Для анализа была использована информация обо всех видах животных, которые чаще всего поступают на диагностику, а также имеющиеся в наличии данные о животных из других отрядов млекопитающих, с тем чтобы быть уверенными, что выбираемые участки гена актина действительно консервативны. Были проанализированы последовательности гена бета-актина 15 видов млекопитающих.

В процессе дизайна олигонуклеотидов для ЭК была использована та же методология, что и для вируса бешенства, с приблизительно той же температурой плавления. Были разработаны только два праймера и TaqMan-зонд (табл. 4), так как варибельность этого участка генома у различных видов млекопитающих не позволяла сделать несколько комбинаций для экспериментальной проверки. По структуре ген бета-актина млекопитающих представляет собой шесть экзонов, разделенных пятью интронами [36]. Дизайн прямого праймера для ПЦР ЭК (ICFHD_SC) выполнен таким образом, что 13 нуклеотидов на 5'-конце праймера соответствуют концу пятого экзона, а оставшиеся 8 нуклеотидов на 3'-конце праймера – началу шестого экзона. Пятый и шестой экзоны гена актина отделены друг от друга в геномной ДНК млекопитающих пятым интроном длиной более 100 нуклеотидов. Это препятствует амплификации фрагмента с матрицы геномной ДНК, но делает возможным обратную транскрипцию и ПЦР с матрицы зрелой мРНК, в которой интроны удалены. В зонде был использован краситель Cy-5 и соответствующий гаситель, чтобы можно было различить сигналы накопления фрагментов генома вируса бешенства и ЭК.

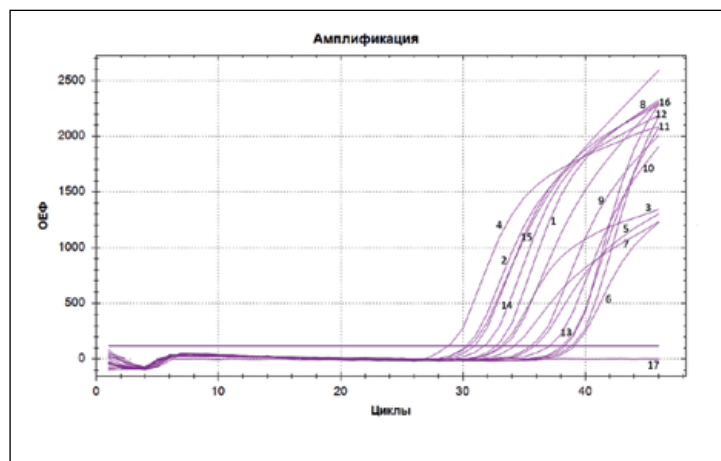


Рис. 4. График накопления флуоресцентного сигнала по каналу Cy-5 в С-ОТ-ПЦР с олигонуклеотидами ICFHD_SC, ICR_SC и Probe-IC_SC на примере образцов головного мозга от млекопитающих разных видов. Цифрами на графике обозначены виды животных: 1 – лисица, 2 – собака, 3 – кошка, 4 – енотовидная собака, 5 – КРС, 6 – волк, 7 – барсук, 8 – хорек, 9 – куница, 10 – норка, 11 – мышь, 12 – белка, 13 – медведь, 14 – верблюд, 15 – лось, 16 – коза, 17 – отрицательный контроль (деионизированная вода)

Fig. 4. Fluorescence signal accumulation curve for Cy-5 channel in C-RT-PCR with oligonucleotides ICFHD_SC, ICR_SC, and Probe-IC_SC using brain samples from mammals of various species. The numbers on the curve indicate the animal species: 1 – fox, 2 – dog, 3 – cat, 4 – raccoon dog, 5 – cattle, 6 – wolf, 7 – badger, 8 – ferret, 9 – marten, 10 – mink, 11 – mouse, 12 – squirrel, 13 – bear, 14 – camel, 15 – elk, 16 – goat, 17 – negative control (deionised water)

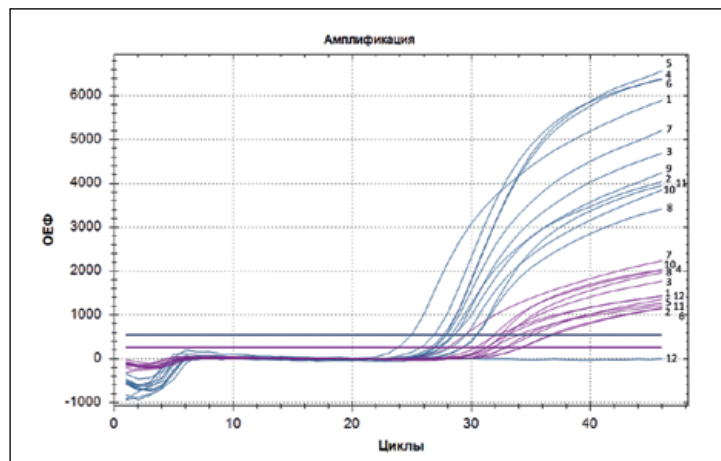


Рис. 5. График накопления флуоресцентного сигнала по каналам FAM (синий цвет) и Cy-5 (фиолетовый цвет) в С-ОТ-ПЦР с олигонуклеотидами RRTF492_SC, RRTR645_SC, Probe-RRTF577_SC, ICFHD_SC, ICR_SC, Probe-IC_SC на примере образцов головного мозга, положительных на вирус бешенства. Цифрами на графике обозначены: 1–11 – положительные образцы, 12 – отрицательный контроль (образец головного мозга, не содержащий вируса бешенства)

Fig. 5. Fluorescence signal accumulation curve for FAM (blue) and Cy-5 (purple) channels in C-RT-PCR with oligonucleotides RRTF492_SC, RRTR645_SC, Probe-RRTF577_SC, ICFHD_SC, ICR_SC, and Probe-IC_SC using rabies virus positive-brain samples. The numbers on the curve indicate the samples: 1–11 – positive samples, 12 – negative control (brain sample free from the rabies virus)

надлежащих условий для проведения С-ОТ-ПЦР. Наоборот, такая универсальность позволяет предположить, что выбранные участки действительно высококонсервативны и система будет работать даже с материалом от животных, геном которых не рассматривали в процессе дизайна олигонуклеотидов.

Соответствие олигонуклеотидов для системы ЭК нуклеотидным последовательностям генов актина различных млекопитающих представлено на рисунке 3.

Работоспособность данной системы была проверена на примере образцов головного мозга лисицы, крупного рогатого скота (КРС) и собаки с применением той же программы температурно-временных режимов, что и для вируса бешенства. Для обеспечения проверки этапа обратной транскрипции образцы РНК были обработаны ДНКазой. Была оптимизирована концентрация олигонуклеотидов.

Оптимальными концентрациями были 8 мкМ для праймеров и зондов, однако с учетом того, что целевая реакция должна иметь преимущество, решено было в дальнейшем использовать праймеры в концентрации 4 мкМ и зонд в концентрации 8 мкМ. Оптимизация других параметров не проводилась, поскольку оптимальные условия уже были найдены для более приоритетной целевой реакции.

Была проведена проверка разработанной системы ЭК на примере образцов головного мозга 16 различных видов млекопитающих, которые поступают в лабораторию для анализа на бешенство (лисица, собака, кошка, енотовидная собака, КРС, волк, барсук, хорек, куница, норка, мышь, белка, медведь, верблюд, лось, коза), положительных или отрицательных на вирус бешенства. Во всех случаях был получен флуоресцентный сигнал по каналу для ЭК, свидетельствующий о прохождении реакции (рис. 4). Таким образом, была подтверждена надежность разработанной системы в отношении видов животных, которые не учитывались (ввиду отсутствия данных) при дизайне олигонуклеотидов.

На следующем этапе была испытана совместимость разработанной системы ЭК с системой для детекции вируса бешенства (рис. 5). Было показано, что использование ЭК не снижает чувствительность целевой реакции.

ОБСУЖДЕНИЕ

На данный момент накоплен достаточно большой объем данных по характеристике геномов изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории РФ. При этом большая их часть получена в последние десять лет [23, 24, 38, 39, 40, 41]. Поэтому методы выявления вируса бешенства в полевом материале требуют учета этой информации. Между тем на данный момент единственной работой, в деталях описывающей разработку тест-системы для выявления вируса бешенства на основе ПЦР в режиме реального времени, выполненной с учетом генетических особенностей российских изолятов, является статья В. Г. Дедкова и соавт. [42], опубликованная в 2016 г. Очевидно, что разработка тест-системы, отвечающей современным данным, является актуальной задачей.

Олигонуклеотиды из комбинации, выбранной опытным путем для дизайна тест-системы, имеют достаточное соответствие участкам генома изолятов вируса бешенства, выявленных на территории РФ и прилегающих государств. Действительно, как видно из рисунка 2А, праймер RRTF492_SC подходит по всем позициям

к 51 изоляту (не представлены на рисунке). Он имеет одно так называемое мягкое несовпадение G-T [43] ближе к 5'-концу с 123 изолятами из разных стран, по одному несовпадению ближе к 5'-концу с изолятами клады Asian из Китая, одно несовпадение в середине праймера с вакцинным штаммом ERA, одно несовпадение на 5'-конце с индийским штаммом линии AL2, по два несовпадения в 5'-половине с 5 изолятами из России и одним из Казахстана. Наиболее критичны случаи со штаммом из Казахстана (два несовпадения подряд ближе к 5'-концу), с 3 изолятами из Франции, Германии и Омана из филогенетических групп, не встречающихся на территории России (имеют по два несовпадения, одно из которых в 3'-половине праймера); 4 изолята генетических линий A2, AL2 и C1a имеют «мягкое» несовпадение в третьей позиции от 3'-конца.

Как видно из рисунка 2B, праймер RRTR645_SC подходит по всем позициям к 156 изолятам (не представлены на рисунке). 21 изолят имеет по одному несовпадению от этого праймера в 5'-половине; 9 изолятов имеют единичные несовпадения в 3'-половине, но ближе к середине праймера – все «мягкие»; 1 изолят из Китая имеет два несовпадения в середине, одно из которых «мягкое»; изоляты из Грузии, Турции, Боснии и Азербайджана имеют по одному «мягкому» несовпадению на 3'-конце; изолят из Сербии имеет два несовпадения через один нуклеотид на 3'-конце, одно из которых «мягкое»; наибольшее число несовпадений у 1 изолята из Тувы: три несовпадения подряд в середине праймера.

Как видно из рисунка 2C, зонд Probe-RRTF577_SC подходит по всем позициям к 139 изолятам (не представлены на рисунке). 12 изолятов имеют по одному несовпадению приблизительно в середине зонда; 2 изолята имеют по одному несовпадению в пятой позиции от 3'-конца зонда; 34 изолята, относящиеся к генетической группе Arctic, и 1 изолят из Сербии имеют по два «мягких» несовпадения в середине зонда; 1 изолят из Боснии имеет два «мягких» несовпадения, одно из которых находится в пятой позиции от 3'-конца зонда; наибольшее число отличий (три несовпадения, все «мягкие») присутствует у изолятов из Китая клады Asian.

Таким образом, сравнение последовательностей олигонуклеотидов, разработанных для детекции вируса бешенства, и геномов изолятов вируса бешенства, выявленных в РФ или имеющих потенциал быть занесенными на территорию РФ, показало, что данные олигонуклеотиды в большинстве случаев подходят полностью, в ряде случаев имеют незначительные или «мягкие» несовпадения, в очень небольшом числе случаев вызывают сомнения, как, например, с изолятами из Китая и одним изолятом из Тувы. Стоит отметить, что изоляты клады Asian до сих пор еще не были обнаружены на территории России и были включены в анализ только потому, что Китай граничит с Россией и занос потенциально возможен, а изолят из Тувы, с тремя несовпадениями нуклеотидов подряд, представляет собой исключение, по-видимому, редкую мутацию, которая отсутствует у всех других изолятов, в том числе выявленных на территории Республики Тува. Таким образом, теоретический дизайн рассмотренных олигонуклеотидов представляется удовлетворительным для разработки тест-системы. Влияние конкретных выявленных несовпадений на эффективность амплификации экспериментально не оценивалось в рамках

настоящей работы и является одним из ограничений исследования.

При дизайне тест-системы нами был применен метод С-ОТ-ПЦР (также известный как combined RT-PCR, одношаговая ОТ-ПЦР, one-step RT-PCR), при котором в одну пробирку с реакционной смесью сразу добавляют обратную транскриптазу и Taq-полимеразу, реакции обратной транскрипции и ПЦР проводят последовательно друг за другом в одной пробирке. Такой подход снижает риск кросс-контаминации, уменьшает время выполнения анализа и снижает себестоимость компонентов набора [44, 45].

В ранее проводимых исследованиях, где использовался подход с применением эндогенного контроля на основе гена бета-актина млекопитающих при разработке ПЦР-методик для выявления лиссавирусов, количество видов животных, геном которых при этом учитывался, было ограничено. Так, в работе С. М. Freuling et al. [31] были использованы только геномы КРС и овцы, а в других работах [33, 34] хотя и был использован больший спектр видов животных (овца, летучая мышь, КРС, морская свинка, лошадь, человек, мышь и крыса), но все же, с учетом разнообразия млекопитающих, недостаточный.

Как видно из рисунка 3, олигонуклеотиды, разработанные для детекции фрагмента гена актина млекопитающих, почти полностью соответствуют целевым последовательностям. Так, прямой праймер ICFHD_SC имеет одно несовпадение в середине с геномом летучей мыши большой подковонос; обратный праймер ICR_SC имеет одно несовпадение в середине с геномом собаки и по одному несовпадению в предпоследней позиции с геномами домового мыши и девятипоясного броненосца; зонд Probe-IC_SC имеет по одному «мягкому» несовпадению в крайней 3'-позиции (наименее критичной для TaqMan-зондов) для геномов четырех видов млекопитающих и одно несовпадение в крайней 5'-позиции для генома китайского ящера. Во всех остальных случаях совпадение полное.

Как было показано в серии экспериментов (см., например, рис. 5), в целом сигнал на ЭК срабатывает позже, чем на вирус бешенства, при тестировании типичных для анализа полевых образцов. Следовательно, целевая реакция имеет конкурентное преимущество перед контрольной, что важно для обеспечения надлежащей чувствительности анализа.

Таким образом, при проведении экспертизы патологического материала на наличие вируса бешенства с использованием ЭК в каждой пробирке будет нарабатываться фрагмент гена актина млекопитающих, о чем будет свидетельствовать соответствующий флуоресцентный сигнал. Наличие данного сигнала должно подтверждать соблюдение необходимых условий анализа: надлежащее выделение РНК, отсутствие ингибиторов обратной транскрипции и ПЦР, удовлетворительное качество химических реактивов, олигонуклеотидов и ферментов для обратной транскрипции и ПЦР, приемлемые температурно-временные режимы. Отсутствие сигнала свидетельствует о нарушении одного или нескольких из этих условий, за исключением возможных случаев, когда сигнал для ЭК отсутствует, но присутствует сигнал для вируса бешенства (положительный результат на вирус бешенства), тогда результаты в данной пробирке считаются валидными, так как целевая реакция имеет конкурентное преимущество

перед контрольной и может подавлять последнюю. При отсутствии же сигналов как по целевой реакции, так и по ЭК результат считается невалидным и образец подлежит повторному исследованию.

Для дополнительного обеспечения качества анализа в тест-системе будут также использованы внешние контрольные образцы: положительный контрольный образец, представляющий собой культуральную суспензию инактивированного штамма вируса бешенства «РВ-97», и отрицательный контрольный образец, представляющий собой деионизированную воду, свободную от нуклеаз. Данные образцы вносятся в отдельные пробирки на этапе выделения РНК и проходят те же этапы анализа, что и тестируемые образцы.

В ходе следующего этапа разработки данной тест-системы будут изучены аспекты валидации, а именно предел обнаружения, чувствительность, специфичность, воспроизводимость, повторяемость, правильность, эффективность ПЦР, оценка неопределенности измерения. Также будет проведена апробация тест-системы с полевыми образцами патологического материала.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны и оптимизированы основные компоненты и условия реакции тест-системы для выявления генома вируса бешенства методом С-ОТ-ПЦР с использованием ЭК на основе гена бета-актина млекопитающих. Показано, что использование ЭК позволяет контролировать условия проведения всех этапов исследования в каждой пробирке при использовании биоматериала от млекопитающих.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гулюкин А. М., Шабейкин А. А. Обзор современной эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации. Динамика изменений за 35-летний период, закономерности, влияющие факторы. *Ветеринария сегодня*. 2025; 14 (3): 232–240. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-232-240>
- ГОСТ 26075-2013 Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства. <https://docs.cntd.ru/document/1200104625>
- Хисматуллина Н. А., Юсупов Р. Х., Чернов А. Н., Янбарисова С. Р., Тятигачев Ш. А., Селимов М. А. и др. Методические указания по лабораторной диагностике бешенства животных: утв. Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 14.05.1997. 11 с.
- Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2023; Chapter 3.1.18. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.18_RABIES.pdf
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). MSL41: 2025–2026 ICTV taxonomy release. International 2026. <https://ictv.global/msl>
- Полещук Е. М., Кузьмин И. В., Газарян С. В., Ботвинкин А. Д. Западно-кавказский лиссавирус рукокрылых: отсутствие вакцинной защиты. *Plecotus et al.* 2003; (6): 67–71.
- Botvinkin A. D., Poleschuk E. M., Kuzmin I. V., Borisova T. I., Gazaryan S. V., Yager P., Rupprecht C. E. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerging Infectious Diseases*. 2003; 9 (12): 1623–1625. <https://doi.org/10.3201/eid0912.030374>
- Leonova G. N., Somova L. M., Belikov S. I., Kondratov I. G., Plekhova N. G., Krylova N. V., et al. The fatal case of lyssavirus encephalitis in the Russian Far East. In: *Encephalitis*. Ed. by S. E. Tkachev. Croatia: InTechOpen; 2013; Chapter 13: 231–250. <https://doi.org/10.5772/52869>
- Полещук Е. М., Тагакова Д. Н., Сидоров Г. Н., Орлова Т. С., Гордейко Н. С., Кайсаров А. Ж. Случаи летальной лиссавирусной инфекции у людей после контактов с рукокрылыми на Дальнем Востоке России в 2019–2021 гг. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68 (1): 45–58. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-156>
- Badrane H., Tordo N. Host switching in *Lyssavirus* history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *Journal of Virology*. 2001; 75 (17): 8096–8104. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.17.8096-8104.2001>
- Bourhy H., Reynes J.-M., Dunham E. J., Dacheux L., Larrous F., Huang V. T., et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus. *Journal of General Virology*. 2008; 89 (11): 2673–2681. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003913-0>
- Kuzmin I. V., Hughes G. J., Botvinkin A. D., Gribencha S. G., Rupprecht C. E. Arctic and Arctic-like rabies viruses: distribution, phylogeny and evolutionary history. *Epidemiology and Infection*. 2008; 136 (4): 509–519. <https://doi.org/10.1017/S095026880700903x>
- Kuzmin I. V., Shi M., Orciari L. A., Yager P. A., Velasco-Villa A., Kuzmina N. A., et al. Molecular inferences suggest multiple host shifts of rabies viruses from bats to mesocarnivores in Arizona during 2001–2009. *PLoS Pathogens*. 2012; 8 (6): e1002786. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002786>
- Biek R., Henderson J. C., Waller L. A., Rupprecht C. E., Real L. A. A high-resolution genetic signature of demographic and spatial expansion in epizootic rabies virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104 (19): 7993–7998. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700741104>
- Davis R., Nadin-Davis S. A., Moore M., Hanlon C. Genetic characterization and phylogenetic analysis of skunk-associated rabies viruses in North America with special emphasis on the central plains. *Virus Research*. 2013; 174 (1–2): 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.02.008>
- Kuzmina N. A., Lemey P., Kuzmin I. V., Mayes B. C., Ellison J. A., Orciari L. A., et al. The phylogeography and spatiotemporal spread of south-central skunk rabies virus. *PLoS ONE*. 2013; 8 (12): e82348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082348>
- Bourhy H., Kissi B., Audry L., Smreczak M., Sadkowska-Todys M., Kulonen K., et al. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *Journal of General Virology*. 1999; 80 (10): 2545–2557. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2545>
- Nel L. H., Sabeta C. T., von Teichman B., Jaftha J. B., Rupprecht C. E., Bingham J. Mongoose rabies in southern Africa: a re-evaluation based on molecular epidemiology. *Virus Research*. 2005; 109 (2): 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.12.003>
- Oem J.-K., Kim S.-H., Kim Y.-H., Lee M.-H., Lee K.-K. Complete genome sequences of three rabies viruses isolated from rabid raccoon dogs and a cow in Korea. *Virus Genes*. 2013; 47 (3): 563–568. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0923-1>
- Tsai K. J., Hsu W. C., Chuang W. C., Chang J. C., Tu Y. C., Tsai H. J., et al. Emergence of a sylvatic enzootic formosan ferret badger-associated rabies in Taiwan and the geographical separation of two phylogenetic groups of rabies viruses. *Veterinary Microbiology*. 2016; 182: 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.030>
- Zhao J., Liu Y., Zhang S., Zhang F., Wang Y., Mi L., et al. Molecular characterization of three ferret badger (*Melogale moschata*) rabies virus isolates from Jiangxi province, China. *Archives of Virology*. 2014; 159 (8): 2059–2067. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2044-0>
- Kuzmin I. V., Botvinkin A. D., McElhinney L. M., Smith J. S., Orciari L. A., Hughes G. J., et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *Journal of Wildlife Diseases*. 2004; 40 (4): 617–631. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.617>
- Deviatkin A. A., Lukashov A. N., Poleschuk E. M., Dedkov V. G., Tkachev S. E., Sidorov G. N., et al. The phylogenetics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS ONE*. 2017; 12 (2): e0171855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
- Chupin S. A., Sprygin A. V., Zinyakov N. G., Guseva N. A., Shcherbinin S. V., Korennoy F. I., et al. Phylogenetic characterization of rabies virus field isolates collected from animals in European Russian Regions in 2009–2022. *Microorganisms*. 2023; 11 (10): 2526. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102526>
- Bustin S. A., Ruijter J. M., van den Hoff M. J. B., Kubista M., Pfaffl M. W., Shipley G. L., et al. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clinical Chemistry*. 2025; 71 (6): 634–651. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaf043>
- Validation of diagnostic assays for infectious diseases of terrestrial animals. In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2023; Chapter 1.1.6. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf
- Mittelberger C., Obkircher L., Oberkofler V., Ianeselli A., Kerschbamer C., Gallmetzer A., et al. Development of a universal endogenous qPCR control for eukaryotic DNA samples. *Plant Methods*. 2020; 16:53. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00597-2>
- Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41: 95–98.
- Troupin C., Dacheux L., Tanguy M., Sabeta C., Blanc H., Bouchier C., et al. Large-scale phylogenomic analysis reveals the complex evolutionary history of rabies virus in multiple carnivore hosts. *PLoS Pathogens*. 2016; 12 (12): e1006041. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006041>
- Bustin S., Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2017; 14: 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
- Freuling C. M., Hoffmann B., Fischer M., McElhinney L. M., Marston D. A., Fooks A. R., Müller T. F. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Demonstration of Lyssavirus Nucleic Acid. In: *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research, and Prevention*. Ed. by C. Rupprecht, T. Nagarajan. San Diego: Academic Press; 2014; Chapter 7: 75–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800014-4.00007-X>
- Toussaint J. F., Sailleau C., Breard E., Zientara S., De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *Journal of Virological Methods*. 2007; 140 (1–2): 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.007>
- Fischer M., Wernike K., Freuling C. M., Müller T., Aylan O., Brochier B., et al. A step forward in molecular diagnostics of lyssaviruses – results of a ring trial among European laboratories. *PLoS ONE*. 2013; 8 (3): e58372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058372>

34. Wakeley P. R., Johnson N., McElhinney L. M., Marston D., Sawyer J., Fooks A. R. Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43 (6): 2786–2792. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.6.2786-2792.2005>

35. Stuchin M., Machalaba C. M., Olival K. J., Artois M., Bengis R. G., Caceres-Soto P., et al. Rabies as a threat to wildlife. *Revue Scientifique et Technique*. 2018; 37 (2): 341–357. <https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2858>

36. Nakajima-Iijima S., Hamada H., Reddy P., Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82 (18): 6133–6137. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.18.6133>

37. Vedula P., Kurosaka S., Leu N. A., Wolf Y. I., Shabalina S. A., Wang J., et al. Diverse functions of homologous actin isoforms are defined by their nucleotide, rather than their amino acid sequence. *eLife*. 2017; 6:e31661. <https://doi.org/10.7554/eLife.31661>

38. Chupin S. A., Botvinkin A. D., Zarva I. D., Chernyshova E. V. Phylogenetic analysis and the spatial spread of arctic rabies virus in Chukotka. *Acta Biologica Sibirica*. 2024; 10: 1805–1817. <https://doi.org/10.5281/zenodo.14555704>

39. Чупин С. А., Чернышова Е. В., Чернышев Р. С., Груздев К. Н., Спиридонов А. Н., Варкентин А. В. и др. Филогенетический анализ изолятов вируса бешенства, выделенных от животных на территории Волгоградской области. *Ветеринария сегодня*. 2025; 14 (3): 241–248. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-241-248>

40. Ботвинкин А. Д., Зарва И. Д., Мельцов И. В., Чупин С. А., Полещук Е. М., Зиняков Н. Г. 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>

41. Yakovchits N. V., Adelshin R. V., Zarva I. D., Chupin S. A., Melnikova O. V., Andaeiev E. I., et al. Fox rabies outbreaks in the republic of Buryatia: Connections with neighbouring areas of Russia, Mongolia and China. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2021; 68 (2): 427–434. <https://doi.org/10.1111/tbed.13692>

42. Дедков В. Г., Десяткин А. А., Полещук Е. М., Сафонова М. В., Маркелов М. Л., Шипулин Г. А. Разработка и апробация набора реагентов для определения РНК классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (5): 235–240. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-235-240>

43. Allawi H. T., Santa Lucia J. Jr. Thermodynamics and NMR of internal G-T mismatches in DNA. *Biochemistry*. 1997; 36 (34): 10581–10594. <https://doi.org/10.1021/bi962590c>

44. Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006; 27 (2–3): 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>

45. de Almeida Campos A. C., Melo F. L., Romano C. M., Araujo D. B., Cunha E. M. S., Sacramento D. A. V., et al. One-step protocol for amplification of near full-length cDNA of the rabies virus genome. *Journal of Virological Methods*. 2011; 174 (1–2): 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.030>

REFERENCES

1. Gulyukin A. M., Shabeikin A. A. Rabies in the Russian Federation: A 35-year review of trends, patterns, and influencing factors. *Veterinary Science Today*. 2025; 14 (3): 232–240. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-232-240>

2. GOST 26075-2013 Animals. Methods of Laboratory Diagnostic of Rabies. <https://docs.cntd.ru/document/1200104625> (in Russ.)

3. Khismatullina N. A., Yusupov R. Kh., Chernov A. N., Yanbarisova S. R., Tyatigachev Sh. A., Selimov M. A., et al. Methodical guidance for animal rabies laboratory diagnosis: approved by the Veterinary Department of the Ministry of Agriculture and Food of Russia on 14.05.1997. 11 p. (in Russ.)

4. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses). In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2023; Chapter 3.1.18. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.18_RABIES.pdf

5. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). MSL41: 2025–2026 ICTV taxonomy release. International 2026. <https://ictv.global/msl>

6. Poleshchuk E. M., Kuzmin I. V., Gazaryan S. V., Botvinkin A. D. West Caucasian lyssavirus of bats: lack of vaccine protection. *Plecotus et al*. 2003; (6): 67–71. (in Russ.)

7. Botvinkin A. D., Poleschuk E. M., Kuzmin I. V., Borisova T. I., Gazaryan S. V., Yager P., Rupprecht C. E. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerging Infectious Diseases*. 2003; 9 (12): 1623–1625. <https://doi.org/10.3201/eid912.030374>

8. Leonova G. N., Somova L. M., Belikov S. I., Kondratov I. G., Plekhova N. G., Krylova N. V., et al. The fatal case of lyssavirus encephalitis in the Russian Far East. In: *Encephalitis*. Ed. by S. E. Tkachev. Croatia: InTechOpen; 2013; Chapter 13: 231–250. <https://doi.org/10.5772/52869>

9. Poleshchuk E. M., Tagakova D. N., Sidorov G. N., Orlova T. S., Gordeiko N. S., Kaisarov A. Zh. Lethal cases of lyssavirus encephalitis in humans after contact with bats in the Russian Far East in 2019–2021. *Problems of Virology*. 2023; 68 (1): 45–58. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-156>

10. Badrane H., Tordo N. Host switching in *Lyssavirus* history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *Journal of Virology*. 2001; 75 (17): 8096–8104. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.17.8096-8104.2001>

11. Bourhy H., Reynes J.-M., Dunham E. J., Dacheux L., Larrous F., Huang V. T., et al. The origin and phylogeography of dog rabies virus. *Journal of General Virology*. 2008; 89 (11): 2673–2681. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003913-0>

12. Kuzmin I. V., Hughes G. J., Botvinkin A. D., Gribencha S. G., Rupprecht C. E. Arctic and Arctic-like rabies viruses: distribution, phylogeny and evolutionary history. *Epidemiology and Infection*. 2008; 136 (4): 509–519. <https://doi.org/10.1017/s095026880700903x>

13. Kuzmin I. V., Shi M., Orciari L. A., Yager P. A., Velasco-Villa A., Kuzmina N. A., et al. Molecular inferences suggest multiple host shifts of rabies viruses from bats to mesocarnivores in Arizona during 2001–2009. *PLoS Pathogens*. 2012; 8 (6): e1002786. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002786>

14. Biek R., Henderson J. C., Waller L. A., Rupprecht C. E., Real L. A. A high-resolution genetic signature of demographic and spatial expansion in epizootic rabies virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007; 104 (19): 7993–7998. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700741104>

15. Davis R., Nadin-Davis S. A., Moore M., Hanlon C. Genetic characterization and phylogenetic analysis of skunk-associated rabies viruses in North America with special emphasis on the central plains. *Virus Research*. 2013; 174 (1–2): 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.02.008>

16. Kuzmina N. A., Lemey P., Kuzmin I. V., Mayes B. C., Ellison J. A., Orciari L. A., et al. The phylogeography and spatiotemporal spread of south-central skunk rabies virus. *PLoS ONE*. 2013; 8 (12): e82348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082348>

17. Bourhy H., Kissi B., Audry L., Smreczak M., Sadkowska-Todys M., Kulonen K., et al. Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *Journal of General Virology*. 1999; 80 (10): 2545–2557. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2545>

18. Nel L. H., Sabeta C. T., von Teichman B., Jaftha J. B., Rupprecht C. E., Bingham J. Mongoose rabies in southern Africa: a re-evaluation based on molecular epidemiology. *Virus Research*. 2005; 109 (2): 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.12.003>

19. Oem J.-K., Kim S.-H., Kim Y.-H., Lee M.-H., Lee K.-K. Complete genome sequences of three rabies viruses isolated from rabid raccoon dogs and a cow in Korea. *Virus Genes*. 2013; 47 (3): 563–568. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-0923-1>

20. Tsai K. J., Hsu W. C., Chuang W. C., Chang J. C., Tu Y. C., Tsai H. J., et al. Emergence of a sylvatic enzootic formosan ferret badger-associated rabies in Taiwan and the geographical separation of two phylogenetic groups of rabies viruses. *Veterinary Microbiology*. 2016; 182: 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.030>

21. Zhao J., Liu Y., Zhang S., Zhang F., Wang Y., Mi L., et al. Molecular characterization of three ferret badger (*Melogale moschata*) rabies virus isolates from Jiangxi province, China. *Archives of Virology*. 2014; 159 (8): 2059–2067. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2044-0>

22. Kuzmin I. V., Botvinkin A. D., McElhinney L. M., Smith J. S., Orciari L. A., Hughes G. J., et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *Journal of Wildlife Diseases*. 2004; 40 (4): 617–631. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-40.4.617>

23. Deviatkin A. A., Lukashev A. N., Poleshchuk E. M., Dedkov V. G., Tkachev S. E., Sidorov G. N., et al. The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS ONE*. 2017; 12 (2): e0171855. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>

24. Chupin S. A., Sprygin A. V., Zinyakov N. G., Guseva N. A., Shcherbinin S. V., Korennoy F. I., et al. Phylogenetic characterization of rabies virus field isolates collected from animals in European Russian Regions in 2009–2022. *Microorganisms*. 2023; 11 (10): 2526. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102526>

25. Bustin S. A., Ruijter J. M., van den Hoff M. J. B., Kubista M., Pfaffl M. W., Shipley G. L., et al. MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. *Clinical Chemistry*. 2025; 71 (6): 634–651. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaf043>

26. Validation of diagnostic assays for infectious diseases of terrestrial animals. In: *WOAH. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2023; Chapter 1.1.6. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf

27. Mittelberger C., Obkircher L., Oberkofler V., Ianeselli A., Kerschbamer C., Gallmetzer A., et al. Development of a universal endogenous qPCR control for eukaryotic DNA samples. *Plant Methods*. 2020; 16:53. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00597-2>

28. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41: 95–98.

29. Troupin C., Dacheux L., Tanguy M., Sabeta C., Blanc H., Bouchier C., et al. Large-scale phylogenomic analysis reveals the complex evolutionary history of rabies virus in multiple carnivore hosts. *PLoS Pathogens*. 2016; 12 (12): e1006041. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006041>

30. Bustin S., Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomolecular Detection and Quantification*. 2017; 14: 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>

31. Freuling C. M., Hoffmann B., Fischer M., McElhinney L. M., Marston D. A., Fooks A. R., Müller T. F. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction for the Demonstration of Lyssavirus Nucleic Acid. In: *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research, and Prevention*. Ed. by C. Rupprecht, T. Nagarajan. San Diego: Academic Press; 2014; Chapter 7: 75–84. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800014-4.00007-X>

32. Toussaint J. F., Sailleau C., Breard E., Zientara S., De Clercq K. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *Journal of Virological Methods*. 2007; 140 (1–2): 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.007>
33. Fischer M., Wernike K., Freuling C. M., Müller T., Aylan O., Brochier B., et al. A step forward in molecular diagnostics of lyssaviruses – results of a ring trial among European laboratories. *PLoS ONE*. 2013; 8 (3): e58372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058372>
34. Wakeley P. R., Johnson N., McElhinney L. M., Marston D., Sawyer J., Fooks A. R. Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005; 43 (6): 2786–2792. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.6.2786-2792.2005>
35. Stuchin M., Machalaba C. M., Olival K. J., Artois M., Bengis R. G., Caceres-Soto P., et al. Rabies as a threat to wildlife. *Revue Scientifique et Technique*. 2018; 37 (2): 341–357. <https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2858>
36. Nakajima-Iijima S., Hamada H., Reddy P., Kakunaga T. Molecular structure of the human cytoplasmic beta-actin gene: interspecies homology of sequences in the introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1985; 82 (18): 6133–6137. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.18.6133>
37. Vedula P., Kurosaka S., Leu N. A., Wolf Y. I., Shabalina S. A., Wang J., et al. Diverse functions of homologous actin isoforms are defined by their nucleotide, rather than their amino acid sequence. *eLife*. 2017; 6: e31661. <https://doi.org/10.7554/eLife.31661>
38. Chupin S. A., Botvinkin A. D., Zarva I. D., Chernyshova E. V. Phylogenetic analysis and the spatial spread of arctic rabies virus in Chukotka. *Acta Biologica Sibirica*. 2024; 10: 1805–1817. <https://doi.org/10.5281/zenodo.14555704>
39. Chupin S. A., Chernyshova E. V., Chernyshev R. S., Gruzdev K. N., Spiridonov A. N., Varkentin A. V., et al. Phylogenetic analysis of rabies virus isolates recovered from animals in Volgograd Oblast. *Veterinary Science Today*. 2025; 14 (3): 241–248. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-3-241-248>
40. Botvinkin A. D., Zarva I. D., Meltsov I. V., Chupin S. A., Poleschuk E. M., Zinyakov N. G., et al. Rabies re-emergence after long-term disease freedom (Amur Oblast, Russia). *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (4): 309–318. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-4-309-318>
41. Yakovchits N. V., Adelshin R. V., Zarva I. D., Chupin S. A., Melnikova O. V., Andaev E. I., et al. Fox rabies outbreaks in the republic of Buryatia: Connections with neighbouring areas of Russia, Mongolia and China. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2021; 68 (2): 427–434. <https://doi.org/10.1111/tbed.13692>
42. Dedkov V. G., Deviatkin A. A., Poleschuk E. M., Safonova M. V., Markelov M. L., Shipulin G. A. Development and evaluation of the RT-PCR kit for the rabies virus diagnosis. *Problems of virology*. 2016; 61 (5): 235–240. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-235-240> (in Russ.)
43. Allawi H. T., Santa Lucia J. Jr. Thermodynamics and NMR of internal G.T mismatches in DNA. *Biochemistry*. 1997; 36 (34): 10581–10594. <https://doi.org/10.1021/bi962590c>
44. Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2006; 27 (2–3): 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
45. de Almeida Campos A. C., Melo F. L., Romano C. M., Araujo D. B., Cunha E. M. S., Sacramento D. A. V., et al. One-step protocol for amplification of near full-length cDNA of the rabies virus genome. *Journal of Virological Methods*. 2011; 174 (1–2): 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.03.030>

Поступила в редакцию / Received 26.06.2026

Поступила после рецензирования / Revised 31.07.2026

Принята к публикации / Accepted 14.08.2026

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Чупин Сергей Александрович, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2114-5589>, chupin@arriah.ru

Sergei A. Chupin, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2114-5589>, chupin@arriah.ru

Чернышова Елена Владимировна, канд. вет. наук, заведующий референтной лабораторией по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>, chernishova@arriah.ru

Elena V. Chernyshova, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Head of Reference Laboratory for Rabies and BSE, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4054-8532>, chernishova@arriah.ru

Чуфарова Екатерина Александровна, канд. вет. наук, младший научный сотрудник референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0009-0008-4992-6695>, chufarova@arriah.ru

Ekaterina A. Chufarova, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Junior Researcher, Reference Laboratory for Rabies and BSE, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0009-0008-4992-6695>, chufarova@arriah.ru

Вклад авторов: Чупин С. А. – формирование идеи, формулировка и развитие ключевых целей и задач, проведение исследований, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста; Чернышова Е. В. – принятие ответственности за все аспекты работы, целостность всех частей статьи и за ее окончательный вариант; Чуфарова Е. А. – выполнение отдельных этапов экспериментальной работы.

Contribution of the authors: Chupin S. A. – conception of the idea, formulation and development of the key objectives and tasks, conducting research, analysis and interpretation of the obtained data, preparation and editing of the text; Chernyshova E. V. – responsible for all aspects of the work, ensuring the integrity of all parts of the article and its final version; Chufarova E. A. – performing individual stages of the experimental work.