

**Зайкова Ольга Николаевна**

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО БЕШЕНСТВУ В РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ В ПЕРИОД С 2013 ПО 2019 ГОДЫ И МОЛЕКУЛЯРНО-  
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЕГО ВОЗБУДИТЕЛЯ**

**14.02.02 - эпидемиология**

**03.02.02 - вирусология**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва 2021**

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

**Научный руководитель:**

**Гребенникова Татьяна Владимировна** – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, руководитель отдела молекулярной вакцинологии и иммунодиагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

**Официальные оппоненты:**

**Ботвинкин Александр Дмитриевич** - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии медико-профилактического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Свитич Оксана Анатольевна** - член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г. в \_\_11\_\_ часов на заседании Диссертационного Совета \_\_Д.208.130.02\_\_ при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (123098, Москва, ул. Гамалеи, 18)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра [www.gamaleya.org](http://www.gamaleya.org)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

Е.В. Русакова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы и степень её разработанности

Бешенство (*rabies*) – острая вирусная зоонозная инфекция, характеризующаяся симптомами панэнцефалита со 100% летальностью в случае развития клинических признаков у человека или животного [СП 3.1.7.2627-10]. При основном пути заражения возбудитель бешенства (*Lyssavirus, Rhabdoviridae*) передаётся со слюной больного животного через укус, или при ослюнении повреждённых участков кожи (слизистой), также зафиксированы случаи передачи вируса людям в результате трансплантации органов, и доказана возможность аспирационного пути заражения этой инфекцией [Srinivasan A et al., 2005; Брико Н.И. и др., 2013]. В мире от бешенства ежегодно умирают более 59000 человек, в основном, в странах Азии и Африки, при этом около 40% людей, подвергнувшихся укусам предположительно бешеных животных - дети до 15 лет [WHO, 2018]. Несмотря на то, что в целом с 2008 года в Российской Федерации (РФ) количество неблагополучных пунктов и заболевших бешенством животных снижается, ежегодно продолжают выявлять случаи бешенства среди животных и людей. В период с 2013 по 2019 годы наибольшее число неблагополучных пунктов было зафиксировано в Центральном, Приволжском и Южном федеральных округах [<http://www.fsvps.gov.ru/iac/rf/reports.html>].

Основными резервуарами возбудителя бешенства в природных очагах РФ являются дикие хищники семейства псовых и насекомоядные летучие мыши [Канторович Р.А., 1963; Полещук Е.М. и др., 2019]. В последние годы намечены тенденции к увеличению числа случаев заболевания бешенством в популяциях енотовидных собак, домашних и бродячих плотоядных. Сельскохозяйственные животные по числу выявляемых случаев бешенства занимают третье место, они являются «индикатором» рабической инфекции и наиболее полно подвергаются диагностике [Черкасский Б.Л. и др., 2005; Шабейкин А.А. и др., 2015; Симонова Е.Г. и др., 2017]. В наиболее урбанизированных территориях создаются особые условия для циркуляции возбудителя бешенства, поскольку в эпизоотический процесс вовлекаются домашние и безнадзорные плотоядные, меняется среда обитания диких животных в связи с антропогенной нагрузкой [Б.Л. Черкасский и др., 2005]. Заражение людей бешенством в РФ всё чаще обусловлено контактами с собаками и кошками [Vedernikov V.A., 1999; Балдина И.В., 2004; Сидоров Г.Н., 2019]. Следовательно, требует изучения вопрос о формировании урбанических очагов бешенства.

Поскольку особенностью рабической инфекции является длительность инкубационного периода, который может достигать у людей от нескольких дней до нескольких месяцев [Брико Н.И. и др., 2013], мониторинг эпидемической ситуации может быть затруднён. В числе причин заболевания и гибели людей от бешенства отмечают низкий уровень информированности населения, несвоевременное обращение пострадавших за антирабической помощью, отказ или нарушение схемы антирабической вакцинации, врачебные ошибки [Черкасский Б.Л. и др., 2005; Симонова Е.Г. и др., 2017; Полещук Е.М. и др., 2019].

Эпидемиологический надзор (ЭН) за бешенством в РФ позволяет охарактеризовать очаги бешенства, выявить особенности видового, территориального, половозрастного распределения заболеваемости у животных и людей, выявлять группы, контингенты, время риска [Симонова Е.Г. и др., 2017]. Система ЭН включает в себя 3 взаимосвязанные

подсистемы: информационную, диагностическую и управленческую. Различают эпидемиологический, микробиологический, иммунологический, зооэнтомологический и социально-экологический мониторинги [Фельдблюм И.В., 2009]. Мониторинг проявлений эпизоотического и эпидемического процесса (ЭП) предусматривает слежение за его состоянием и тенденциями [Коза Н.М. и др., 2009]. В настоящее время в мире известно 17 видов вирусов рода *Lyssavirus* [<https://talk.ictvonline.org/>], при этом на территории РФ, границ РФ и ряда стран Европы и постсоветского пространства, помимо вируса бешенства (*Rabies virus*), установлена циркуляция ещё 6 видов: *EBLV-1* (граница Россия – Украина – Беларусь), *EBLV-2* (граница Россия - Финляндия), *WCBV* (Западный Кавказ, Республика Адыгея, резервуар *Miniopterus schreibersii*), *Irkut virus* (Восточная Сибирь, резервуар *Murina leucogaster*), на границе со Средней Азией (Киргизия, Таджикистан) – *Aravan virus* (резервуар *Myotis blythii*), *Khujand virus* (резервуар *Myotis mystacinus*), представляющих угрозу для животных и патогенных для человека [Kuzmin I.V. et al., 2003; Полещук Е.М. и др., 2013; Cliquet F., 2019]. В связи с этим возникает необходимость разработки и использования быстрых, высокочувствительных и специфичных методов по выделению, накоплению и генотипированию возбудителя. В настоящее время в рамках микробиологического мониторинга при изучении случаев бешенства и энцефалитов неясной этиологии необходимо постоянно совершенствовать молекулярные методы при эпидемиологическом исследовании: секвенирование и филогенетический анализ геномов возбудителей бешенства. Изучение молекулярно-генетических особенностей возбудителей бешенства позволяет выявлять маркеры эпидемиологических связей и эпидемического и эпизоотического неблагополучия.

Лечения от бешенства на сегодняшний день не разработано, и единственным надежным способом предотвращения распространения и развития рабической инфекции является иммунопрофилактика: пред – и постэкспозиционная профилактика людей [Мовсесянц А.А. и др., 2019], оральная антирабическая вакцинация диких плотоядных, регулярная плановая антирабическая иммунизация домашних животных [Metlin A.E. et al., 2008; Елаков А.Л. и др., 2011; Cliquet F., 2019]. Профилактическая вакцинация показана, прежде всего, лицам, регулярно подвергающимся повышенному риску заражения, связанного с трудовой деятельностью, а также людям, которые могут оказаться подверженными риску заражения при неблагоприятной эпизоотической ситуации [СП 3.1.7.2627-10]. Лечебно-профилактическая иммунизация показана лицам после контакта с животными с неизвестной историей здоровья, и, в зависимости от категории повреждений, также назначается антирабический иммуноглобулин (АИГ). В рамках иммунологического мониторинга предусмотрено слежение за состоянием специфического иммунитета [СП 3.1.7.2627-10; ОИЕ, 2018] у вакцинированных людей и животных для объективной оценки эффективности проводимой иммунопрофилактики, выявления времени, территорий и групп риска инфицированности, а также для прогнозирования эпидемической ситуации. Ранее было показано, что состояние здоровья макроорганизма и его индивидуальные особенности могут влиять на формирование антирабических вируснейтрализующих антител (ВНА), играющих важную протективную роль [Селимов М.А., 1978; Ertl H.C.J., 2018; Бутырский А.Ю. и др., 2019]. В настоящее время в РФ иммунологический мониторинг необходимо дополнить современными методами оценки напряженности и длительности гуморального антирабического поствакцинального иммунитета, основанными на реакции нейтрализации в культуре клеток (FAVN, RFFIT)

[ОИЕ,2018; WHO, 2018]. Данные методы являются чувствительными и специфичными, а также используются с минимальными временными и экономическими затратами.

### **Цель работы**

Оценка современных проявлений эпидемического процесса на основе ретроспективного анализа заболеваемости бешенством в РФ в период с 2013 по 2019 годы и выявление молекулярно-генетических особенностей возбудителей бешенства, циркулирующих на территории РФ и некоторых сопредельных с РФ регионов Евразии.

### **Задачи**

1. Провести ретроспективный сравнительный анализ данных по заболеваемости бешенством людей и животных в РФ и на территории некоторых сопредельных с РФ регионов Евразии за 2013-2019 гг.

2. Исследовать напряжённость и длительность гуморального антирабического иммунитета у вакцинированных людей путём оценки уровня антирабических вируснейтрализующих антител с помощью реакции вируснейтрализации в культуре клеток ВНК-21 С13.

3. Разработать тест-систему для генотипирования лиссавирусов, циркулирующих на территории РФ и некоторых сопредельных с РФ регионов Евразии, на основе ОТ-ПЦР и секвенирования, определить её аналитическую чувствительность и специфичность.

4. Провести филогенетический анализ фрагментов геномов возбудителей бешенства на материале изолятов, выделенных на территории РФ и некоторых сопредельных с РФ регионов Евразии с использованием данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI).

### **Научная новизна**

1. Выявлены достоверные различия в структуре заболеваемости бешенством в европейской части РФ в период 2006-2012 гг. и 2013-2019 гг. Показано увеличение доли кошек и собак в эпизоотическом процессе на 3% и 4% соответственно и снижение доли лисицы на 6%. Выявлено снижение числа случаев гидрофобии (бешенства у людей) в 1,92 раза.

2. Показаны достоверные различия в структуре заболеваемости бешенством в европейской части РФ и некоторых сопредельных с РФ регионах Евразии. В странах Восточной Европы бешенство в большей степени выявлялось у собак, кошек, КРС и лисиц, но в меньшей степени у енотовидных собак, при сравнении с европейской частью РФ. На Кавказе, в Закавказье и Средней Азии, бешенство регистрировали в основном у собак и КРС. 100% случаев бешенства у летучих мышей приходится на страны Европы, при этом 71,8 % - на страны Западной Европы.

3. Для оценки напряженности и длительности гуморального антирабического иммунитета у вакцинированных лиц был применен флюоресцентный вируснейтрализующий тест (ФВН тест, или FAVN) в культуре клеток ВНК-21 С13. Данный метод позволил сократить сроки проведения анализа выявления вируснейтрализующих антител для изучения эффективности антирабической иммунопрофилактики у людей, привитых от бешенства.

4. Разработана оригинальная отечественная тест-система на основе двухэтапной ОТ-ПЦР и секвенирования, позволяющая генотипировать лиссавирусы, распространённые в РФ и некоторых сопредельных с РФ регионах Евразии, что позволит следить за

изменчивостью геномов вирусов бешенства для выявления рисков развития эпизоотического и эпидемического процесса.

5. Описаны специфические маркерные мутации C40S, V56I, L/V95W, D101N/S/T, N/G106D для геновариантов вируса бешенства (*Rabies virus*), распространённых на территории РФ и Республики Таджикистан, что позволило дополнить информацию о циркуляции геновариантов вируса бешенства на территории Центральной части РФ и Республики Таджикистан в ходе исследования изолятов, выделенных на данных территориях в период с 2002 по 2016 годы.

6. Показано, что общая предковая форма геновариантов вируса бешенства (*Rabies virus*), циркулировавших на территории РФ и Республики Таджикистан с 1985 по 2018 годы, выявляется на территории Евразии с 2001-2002 года.

7. Полученные данные о молекулярно-генетических особенностях и динамики изменчивости возбудителей бешенства дополняют информационный блок эпидемиологического надзора. В базу данных NCBI внесены 26 фрагментов гена N вируса бешенства.

### **Теоретическая и практическая значимость**

1. Эпидемиологическая оценка ситуации по бешенству в РФ с применением молекулярно-генетических методов исследования возбудителя бешенства позволила исследовать циркуляцию и генетическое разнообразие данного возбудителя в заданный промежуток времени, что важно для прогнозирования динамики и проявлений эпидемического процесса бешенства.

2. Результаты исследования указывают на необходимость усиления мероприятий для предупреждения распространения бешенства в населенных пунктах и усиления надзора за циркуляцией лиссавирусов среди рукокрылых.

3. Адаптированы современные методы диагностики для определения уровня вируснейтрализующих антител у людей после вакцинации против бешенства (FAVN) с целью изучения напряженности и длительности гуморального поствакцинального антирабического иммунитета и генотипирования лиссавирусов, циркулирующих на территории РФ и некоторых сопредельных с РФ регионах Евразии, которые могут быть использованы в системе эпидемиологического надзора за бешенством в РФ.

4. Практическое использование разработанной тест-системы для генотипирования лиссавирусов, распространённых в РФ и некоторых сопредельных с РФ регионах Евразии, может способствовать разработке и усовершенствованию антирабических вакцин.

5. Результаты исследования предназначены для применения в ветеринарных и медицинских клинических и научно-исследовательских учреждениях и могут быть использованы для диагностики рабической инфекции и исследования уровня антирабических антител в сыворотках крови людей и животных.

6. Подготовлены и утверждены Комиссией по интеллектуальной собственности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 22 от 23.06.2020) методические рекомендации:

1) «Выделение вируса бешенства в культуре клеток мышинной нейробластомы (RTSIT)»;

2) «Генотипирование лиссавирусов в образцах биологического материала методом полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием»;

3) «Определение уровня вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства с помощью флюоресцентного вируснейтрализующего теста (ФВН или FAVN тест)».

#### **Методология и методы исследования**

Методологической основой исследования послужили теоретические и практические основы эпидемиологии и современные подходы к диагностике бешенства и изучению напряженности антирабического иммунитета. В диссертационной работе использованы описательно-оценочные эпидемиологические, вирусологические, серологические, молекулярно-генетические и статистические методы.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Европейская часть РФ остается одним из наиболее неблагополучных регионов Европы по заболеваемости людей и животных бешенством; сохраняется важное значение диких животных в распространении бешенства, но более половины случаев в структуре заболеваемости приходится на собак, кошек и сельскохозяйственных животных.

2. Оценка напряженности и длительности гуморального антирабического иммунитета у вакцинированных людей путем исследования уровня антирабических вируснейтрализующих антител с помощью реакции вируснейтрализации в культуре клеток (FAVN тест) позволяет проанализировать эффективность профилактической и лечебно-профилактической вакцинации против бешенства.

3. Авторская тест-система для генотипирования лиссавирусов на основе ОТ-ПЦР и секвенирования позволяет проводить идентификацию возбудителей бешенства, циркулирующих в РФ, Европе и странах Средней Азии.

4. Прогнозирование течения эпизоотического и эпидемического процесса, изучение циркуляции геновариантов вируса бешенства, а также оценка возможности реверсии вакцинного штамма вируса бешенства, применяемого для оральной иммунизации диких плотоядных, на основании филогенетического анализа фрагментов геномов возбудителей бешенства.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации и результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 2,4 и 5 паспорта научной специальности 14.02.02 - эпидемиология и пунктам 4,7,8 и 10 паспорта научной специальности 03.02.02 – вирусология.

#### **Степень достоверности и апробация результатов**

Степень достоверности полученных результатов исследования определена адекватными методами статистического анализа полученных данных. Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на VII Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (2015), конференции Научного фонда «Биолог» (Вирусология, V, 2015), X Международной практической конференции (В сборнике: Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия, 2015), международных ветеринарных конгрессах «Единый мир – единое здоровье» (2017-2019), а также на заседаниях учёного совета ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

#### **Публикации**

По теме диссертации соискатель имеет 22 научных работы, из них 13 работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК, 3 работы в изданиях, входящих в Web of Science или Scopus, и 6 работ, представленных в материалах международных научно-практических конференций и съездов.

## Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 166 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований и их обсуждения, списка используемой литературы, включающего 83 отечественных и 62 зарубежных источников, включая интернет - ресурсы, а также 1 приложения. Диссертация иллюстрирована 17 таблицами и 34 рисунками.

### Личный вклад соискателя

Диссертационная работа оформлена автором самостоятельно. Автор непосредственно участвовал в адаптации методов, рекомендованных ВОЗ и Европейской фармакопеей, по выявлению возбудителя бешенства в биологическом материале, его накоплению и генотипированию, а также по определению уровня антирабических вируснейтрализующих антител у вакцинированных лиц, самостоятельно проводил молекулярно-генетический анализ лиссавирусов, сбор, анализ и интерпретацию полученных результатов. При непосредственном участии автора разработаны методические рекомендации по выделению и генотипированию возбудителя бешенства и определению уровня антирабических вируснейтрализующих антител.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Материалы и методы исследования

**Материалы.** *Эпидемиологические данные:* 1) отчеты ФГБУ «ВНИИЗЖ» ИАЦ Управления ветнадзора по эпизоотической ситуации в РФ и некоторых сопредельных с РФ регионах Евразии за 2013-2019 гг. [[www.fsvps.gov.ru/iac/rf/reports.html](http://www.fsvps.gov.ru/iac/rf/reports.html)]; Труды ФГБУ «ВНИИЗЖ», т.16, 2018]; 2) сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях в РФ за 2013-2018 гг. (форма 1) [[https://www.rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/?SHOWALL\\_1=1](https://www.rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/?SHOWALL_1=1)]; 3) информационно-аналитические данные о числе заболевших бешенством людей и животных за 2006-2012 гг. и 2013-2019 гг. в РФ и некоторых сопредельных с РФ регионах Евразии [<http://www.who.int/ru>; <https://www.oie.int/wahis2/>; Полещук Е.М., 2019; База данных Центра ветеринарии; А. А. Шабейкин, 2019].

*Лабораторные животные:* белые беспородные мыши и белые мыши линии BALB/C массой 8-10 г.

*Культуры клеток:* ВНК-21 С13, N2а.

*Исследуемые образцы:* 95 сывороток крови, полученных с 2007 по октябрь 2020 года от 78 человек в возрасте от 3 до 65 лет, прошедших антирабическую вакцинацию; 76 образцов головного мозга (ГМ) животных из 10 районов Брянской области и 9 районов Кировской области, 6 районов Республики Таджикистан, а также из коллекции лаборатории сравнительной вирусологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; тест-панель из 10 лиофилизированных образцов ГМ животных – предоставлена референс-центром по бешенству *OIE Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife ANSES* (г. Нанси, Франция) в рамках прохождения международной аккредитации по диагностике бешенства в 2016 г.; 52 очищенных продукта ПЦР (фрагменты гена N вируса бешенства), предоставленные ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир с 2015 по 2017 годы.

*Вакцины:* приманка с вакциной «Рабивак О/333» серии 23 производства ОАО «Покровский завод биопрепаратов».

*Нуклеотидные последовательности:* 213 фрагментов геномов (ген N) лиссавирусов, содержащихся в базе данных NCBI.



Праймеры представлены в таблице 1.

**Таблица 1** – Нуклеотидные последовательности праймеров, фланкирующих фрагмент гена N вируса бешенства (ВБ)

Источник	Название праймера	Последовательность	Позиция в геноме
P. Heaton et al., 1997	JW12	5'-ATGTAACACC(C/T)CTACAATTG-3'	55–73
	JW6 (DPL)	5'-CAATTCGCACACATTTTGTG-3'	660–641
	JW6 (E)	5'-CAGTTGGCACACATCTTGTG-3'	660–641
	JW6 (M)	5'-CAGTTAGCGCACATCTTATG-3'	660–641
Зайкова О.Н. и др., 2020	F2	5'-ТААСАСС(С\Т)СТАСААТГГА-3'	58–75
	R1	3'-ТАСАСАСГПТААССТСАТГ-5'	647–666

**Методы.** *Эпидемиологические методы.* Проведён анализ эпизоотической и эпидемической ситуации по бешенству в РФ в сравнении со странами постсоветского пространства и Европы, а также напряженности и длительности гуморального антирабического иммунитета у людей после вакцинации против бешенства. Картирование циркуляции геновариантов ВБ проведено с помощью электронного ресурса: URL: <https://bestmaps.ru/map/osm/Wikimapia/4/56.61/68.47/personal/218514>.

*Серологические методы.* Определение уровня антирабических антител в сыворотках крови людей проводили в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК 21 С13 (FAVN тест), рекомендованной ВОЗ и Европейской фармакопеей [European pharmacopoeia 7.0.01, 2008; OIE 2006-2018]. Данный метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью и позволяет в течение 48 часов количественно определить уровень ВНА после вакцинации против бешенства. Протективным для млекопитающих является уровень антирабических ВНА, равный 0,50 МЕ/мл и выше [Cliquet F. et al., 1998].

*Выявление антигена вируса бешенства* в биологическом материале (образцах ГМ) проводили с помощью метода флюоресцирующих антител (или реакции иммунофлюоресценции) согласно ГОСТ 26075 – 2013.

*Титрование вируса бешенства* проводили по стандартной методике с подсчётом титра с помощью формулы Спирмана – Кербера (*Spearman-Kärber*) и Рида и Менча.

*Выделение вируса бешенства* проводили методом биологической пробы на белых мышах и в культуре клеток мышинной нейробластомы (N2a) методом RTCIT, рекомендованным ВОЗ и МЭБ [OIE, 2018].

*Выделение РНК и проведение ОТ-ПЦР.* Для проведения ПЦР РНК выделяли с помощью как препарата TRI ® Reagent (*Sigma Aldrich*, США), так и неорганического носителя – сорбента (SiO<sub>2</sub>). ПЦР проводили одновременно с праймерами, предлагаемыми в работе P.Heaton et al, 1997 («контроль») и праймерами, разработанными в лаборатории [Зайкова О.Н. и др., 2020]. Подбор специфических олигонуклеотидов осуществляли с использованием программного обеспечения *Primer Premier 5* [Premier Biosoft int., Palo Alto, CA]. Учёт результатов ОТ-ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1 – 2% агарозном геле с добавлением буфера для нанесения образца на гель (метилловый оранжевый, вода и глицерин (100%)), гель просматривали с помощью УФ–трансиллюминатора.

*Филогенетический анализ* фрагментов геномов возбудителей бешенства проводили с использованием пакета программ DNASTAR V.3.12 («*Lasergen Inc.*», США), и программы BioEdit 7.0.4.1 [Hall T.A. 1999], MEGA v. 10.0.5., программ и компонентов

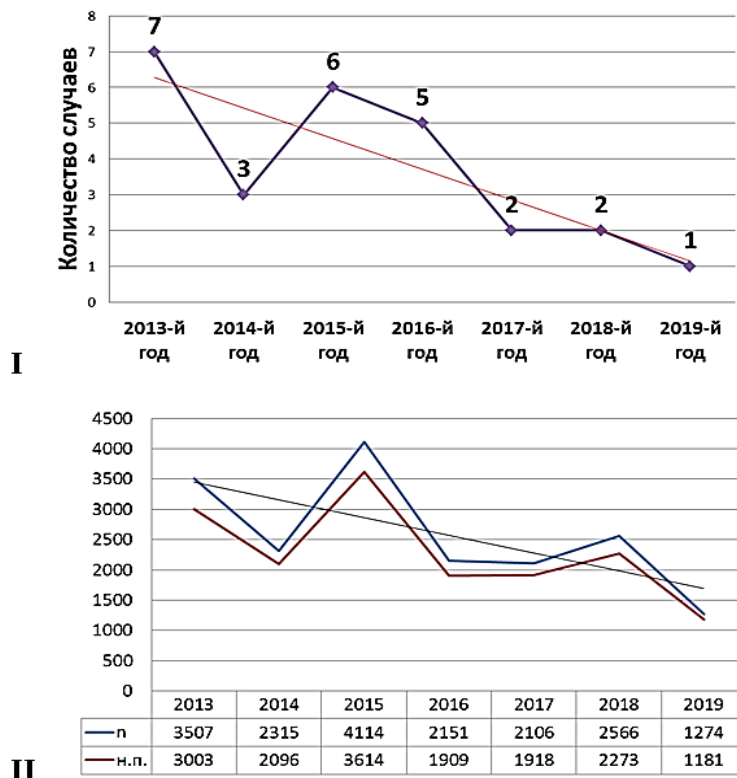
BEAST v1.10.4 [https://beast.community/, Suchard MA et al, 2018, Ayres et al, 2012, Shapiro B et al, 2010]. Использовали модель нуклеотидного замещения GTR и НКУ [Tavar S, 1985], модель неоднородности дискретного гамма-распределения [Yang Z, 1994], модель строгих молекулярных часов. Длина Марковской цепи (MCMC) составила 20000000, с адаптацией в 10000 шагов. Для отображения эволюционного дерева использовали FigTree v1.4.4.

**Статистическую обработку** результатов проводили общепринятыми методами с использованием компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007-2016 и статистических онлайн-калькуляторов [https://math.semestr.ru, https://medstatistic.ru], для выявления связи между изучаемыми признаками проводили корреляционно-регрессионный анализ и вычисляли коэффициент корреляции (r), уровень достоверности оценивали с помощью t-критерия Стьюдента-Фишера,  $\chi^2$  Пирсона при уровне надежности  $p=0,05$  и  $p=0,01$ .

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Анализ статистических данных о числе заболевших бешенством людей и животных в РФ и некоторых сопредельных с РФ регионах Евразии с 2013 по 2019 годы**

Всего в РФ в 2013-2019 гг. было зарегистрировано 18033 случая бешенства животных и 15994 очага бешенства, 13574 случая (75,3%) приходилось на европейскую часть РФ. Это может быть связано с несколькими факторами, в том числе с уровнем урбанизации и диагностики. Динамика случаев бешенства в РФ у людей и животных указывает на тенденцию к снижению абсолютных показателей заболеваемости (рисунок 1).



**Рисунок 1** – Количество случаев бешенства у людей (I) и животных (II) бешенством в РФ в период с 2013 по 2019 годы: n – абсолютное количество заболевших; н.п. – неблагополучные пункты.

Сравнительный анализ эпидемической и эпизоотической ситуации по бешенству в РФ и некоторых сопредельных с РФ регионах Евразии показал, что 41,1% случаев бешенства среди животных и 54,2% случаев бешенства, зарегистрированных у людей, приходится на европейскую часть РФ (таблица 2).

**Таблица 2** - Сравнительный анализ заболеваемости бешенством людей и животных в европейской части РФ и в некоторых сопредельных регионах Евразии (сумма за 2013-2019 гг.)

Регионы	Число случаев бешенства, в скобках % от общего числа в группе	
	Животные	Люди
Европейская часть РФ	13576 (41,1)	26 (54,2)
Восточная Европа (Албания, Беларусь, Босния-Герцеговина, Болгария, Хорватия, Греция, Косово, Молдова, Польша, Румыния, Испания, Сербия, Турция, Украина)	17338(52,4)	7 (14,6)
Западная Европа (Бельгия, Чехия, Финляндия, Франция, Германия, Венгрия, Великобритания, Литва, Нидерланды, Швейцария, Люксембург, Норвегия, Республика Словакия, Словения)	260 (0,79)	5 (10,4)
Кавказ и Закавказье (Грузия, Армения, Азербайджан)	841 (2,6)	10 (20,8)
Средняя Азия (Казахстан, Кыргызстан, Узбекистан, Таджикистан, Туркменистан)	1056 (3,2)	0
<b>Всего</b>	<b>33071 (100)</b>	<b>48 (100)</b>

При сравнении европейской части РФ со странами Восточной и Западной Европы (без учета Кавказа и Закавказья, а также стран Средней Азии) установлено, что на европейскую часть РФ приходится 43,5% случаев бешенства среди животных и 68,4% случаев бешенства выявлено у людей.

В европейской части РФ и странах Восточной Европы среди домашних и сельскохозяйственных животных в большинстве случаев бешенство регистрировали у собак, кошек и КРС (таблица 3). На территории Кавказа и Закавказья, а также стран Средней Азии бешенство регистрируется, главным образом, у собак и КРС, что, вероятно, может быть связано с хозяйственной деятельностью данных регионов, с вариантом возбудителя, и уровнем проводимой вакцинации домашних и сельскохозяйственных животных.

**Таблица 3 - Видовая структура заболеваемости бешенством среди домашних и сельскохозяйственных животных**

Регионы	Число случаев бешенства, в скобках % от общего числа в группе				
	Собака	Кошка	КРС	Другие сельскохозяйственные животные*	Другие домашние животные**
Европейская часть РФ	3244 (40,8)	2608 (43,9)	1181 (23,5)	295 (33,9)	109 (98,2)
Восточная Европа	3657 (46,0)	3268 (55,0)	3271 (65,1)	450 (51,7)	0
Западная Европа	7 (0,09)	1 (0,02)	2 (0,04)	3 (0,34)	0
Кавказ и Закавказье	436 (5,5)	17 (0,3)	302 (6,0)	40 (4,6)	1 (0,9)
Средняя Азия	606 (7,6)	46 (0,8)	267 (5,3)	81 (9,3)	1 (0,9)
<b>Всего</b>	7950 (100)	5940 (100)	5023 (100)	870(100)	111 (100)

Примечание: \*-лошадь (n=181), МРС (n=652), свинья (n=36), верблюд (n=1)

Примечание: \*\* -кролик (n=1), другие (n=110)

На территории европейской части РФ в дикой природе бешенство регистрируют, главным образом, в популяции лисиц и енотовидных собак, что говорит о сохранении ведущей роли данной группы животных в поддержании эпизоотического процесса бешенства. Похожая картина характерна для стран Восточной Европы. На территории Кавказа и Закавказья, а также стран Средней Азии в дикой природе бешенство регистрируется в гораздо меньше степени, но в эпизоотический процесс вовлекаются разные виды животных. Случаев бешенства у летучих мышей в европейской части РФ не выявлено, в то время как 71,8% всех случаев бешенства у данной группы животных приходится на страны Западной Европы (таблица 4).

**Таблица 4 - Видовая структура заболеваемости бешенством среди диких животных**

Регионы	Число случаев бешенства, в скобках % от общего числа в группе					
	Летучие мыши	Лисица	Енотовидная собака	Волк	Барсук	Другие дикие животные*
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Европейская часть РФ	0	4837 (45,4)	865 (72,4)	45 (28,0)	20 (23,3)	372 (45,9)
Восточная Европа	74 (28,2)	5744 (53,9)	328 (27,5)	92 (57,1)	64 (74,4)	390 (48,1)
Западная Европа	188 (71,8)	56 (0,5)	1 (0,08)	0	0	2 (0,25)

**Таблица 4** (продолжение)

<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Кавказ и Закавказье	0	2 (0,02)	0	10 (6,2)	0	33 (4,1)
Средняя Азия	0	25 (0,23)	0	14 (8,7)	2 (2,3)	13 (1,6)
<b>Всего</b>	262 (100)	10664 (100)	1194 (100)	161 (100)	86 (100)	810 (100)

Примечание: \*- енот (n=115), куница (n=204), другие куньи (n=102), дикий кот (n=2), шакал обыкновенный (n=26), чепрачный шакал (n=2), корсак (n=2), другие (n=315), косуля (n=23), дикий кабан (n=6), олень (n=8), лань (n=5)

Таким образом, были установлены достоверные различия в структуре заболеваемости бешенством в европейской части РФ и некоторых сопредельных с РФ регионов Евразии (p<0,01).

В среднем в год в европейской части РФ в период 2013-2019 гг. регистрировалось 3,71 случая бешенства у людей (3,71±1,8; p=0,05), а в период 2006-2012 гг. было зарегистрировано 50 случаев гидрофобии (7,14±2,9; p=0,05). Таким образом, зафиксировано снижение случаев бешенства среди людей в 1,92 раза.

Выявлены достоверные различия в структуре заболеваемости бешенством в европейской части РФ за указанные периоды времени (p<0,01). Показано увеличение доли кошек и собак в эпизоотическом процессе на 3% и 4% соответственно и снижение доли лисицы на 6% (таблица 5).

**Таблица 5** – Сравнительный анализ структуры заболеваемости бешенством европейской части РФ за 2006-2012 и 2013-2019 гг.

<b>Группы животных</b>	<b>Число случаев бешенства, в скобках % от общего числа</b>	
	<b>2006-2012 гг.</b>	<b>2013-2019 гг.</b>
Собака	3426 (19,8)	3244 (23,9)
Кошка	2686 (15,5)	2608 (19,2)
КРС	2144 (12,4)	1181 (8,7)
Лисица	7228 (41,7)	4837 (35,6)
Енотовидная собака	992 (5,7)	865 (6,4)
Другие дикие животные	407 (2,4)	437 (3,2)
Другие домашние и с/х животные	431 (2,5)	404 (3,0)
Летучие мыши	2 (0,01)	0
<b>Всего</b>	17316 (100)	13576 (100)

**Исследование уровня антирабических вируснейтрализующих антител у людей после вакцинации против бешенства в реакции вируснейтрализации в культуре клеток (FAVN тест)**

Исследование напряженности гуморального антирабического иммунитета у лиц, прошедших курс профилактической вакцинации (таблица 6), показало, что в отдельных случаях титр антирабических антител в течение 4-6 лет с момента ревакцинации может

сохраняться в значениях, превышающих пороговый уровень в 3-12 раз. При этом с течением времени уровень антирабических ВНА может снижаться в случае отсутствия ревакцинации, а проведение ревакцинации способствует повышению титра антирабических ВНА.

Таким образом, целесообразно проводить ежегодный мониторинг уровня антирабических ВНА у лиц, входящих в группу риска, связанного с трудовой деятельностью, и прошедших курс профилактической антирабической вакцинации, поскольку в ряде случаев проведение ревакцинации каждые 3 года может быть не обязательным при достаточном уровне антирабических ВНА. В других случаях проведение ревакцинации может быть крайне важным, так как способствует формированию антирабических ВНА в необходимом количестве.

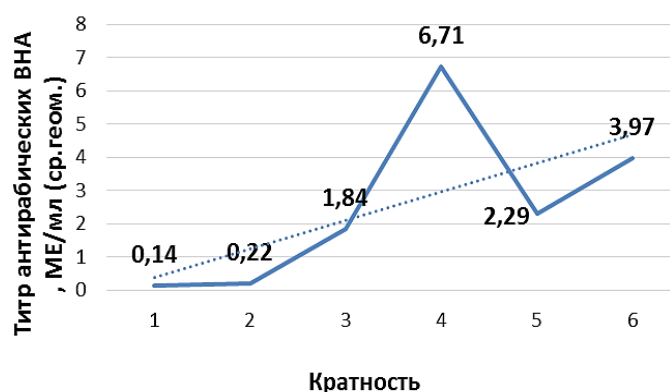
**Таблица 6** - Титр антирабических ВНА у людей, прошедших курс профилактической вакцинации против бешенства в динамике, n=3 (абсолютные показатели)\*

№	Антирабическая история	Пол	Возраст	Титр, МЕ/мл
1	Проф. вакцинация (0-7-14)	жен	22	18,15
	Через 1 год, ревакцинация 1-кратно		23	13,77
	Через 2 года, без ревакцинации		24	13,77
	Через 4 года без ревакцинации		28	6,01
2	Проф. вакцинация (0-7-14)	жен	37	7,92
	Через 4 года без ревакцинации		41	1,51
	Через 5 мес, ревакцинация 1-кратно		41	7,92
3	Проф. вакцинация (0-7-14)	муж	21	1,51
	Через 1 год без ревакцинации		22	0,22
	Через 1 мес, ревакцинация 1-кратно		22	1,99

Примечание: -\*сыворотки крови для анализа отбирали не ранее, чем через 30 дней с момента последней вакцинации

При анализе влияния кратности вакцинации на напряжённость гуморального антирабического иммунитета у лиц, завершивших и не завершивших курс лечебно-профилактической вакцинации, показано, что даже после 4-кратной вакцинации у пациентов могут формироваться антирабические ВНА в титрах, превышающих пороговый уровень. Линия тренда указывает на прямую зависимость уровня антирабических ВНА от кратности вакцинации (рисунок 2).

Средние геометрические значения титров антирабических ВНА в группе лиц, прошедших полный и неполный курс вакцинации против бешенства составили  $4,06 \pm 2,4$  МЕ/мл (n=19), и  $3,06 \pm 1,6$  МЕ/мл (n=25) соответственно, однако, разница средних величин в данном случае не достоверна, что может быть связано с отсутствием полного анамнеза у ряда пациентов и недостаточной выборкой. Следовательно, необходимо проводить дальнейшие исследования напряженности и длительности антирабического поствакцинального иммунитета у людей.



**Рисунок 2** - Зависимость уровня антирабических ВНА у людей с разной антирабической историей от кратности вакцинации.

Исследование уровня антирабических антител в динамике у вакцинированных лиц методом FAVN показало, что у ряда пациентов в течение года титры антител могут снижаться в 3,9 - 11,5 раз, при этом ревакцинация способствует повышению уровня антирабических ВНА, как и соблюдение схемы антирабической вакцинации (таблица 7).

**Таблица 7** - Исследование уровня вируснейтрализующих антирабических антител в динамике в сыворотках крови людей методом FAVN, завершивших и не завершивших курс лечебно-профилактической иммунизации (абсолютные показатели)\*

№	Возраст на момент исследования, лет	Пол	Время после последней вакцинации	Антирабическая история (со слов пациента)	Титр ВНА, МЕ/мл
1	45	жен	≥3 года	5 инъекций КОКАВ	<b>3,46</b>
	46		+1 год	-	<b>4,56</b>
	55		≥14 дней	Курс КОКАВ (6 инъекций)	<b>13,77</b>
2	19	жен	≥30 дней	5 инъекций КОКАВ (+ АИГ)	<b>3,46</b>
	20		+9 мес	-	<b>4,56</b>
3	7	жен	≥14 дней	Курс КОКАВ (6 инъекций)	<b>3,46</b>
	8		5 мес	-	<b>4,56</b>
4	39	жен	1 год 3 мес	Курс КОКАВ (6 инъекций)	<b>6,01</b>
	41		+ 2 года	-	<b>6,01</b>
5	32	жен	≥14 дней	5 инъекций КОКАВ	<b>0,87</b>
	32		3 мес	+6-я вакцинация КОКАВ	<b>1,15</b>
	33		7 мес	-	<b>0,10</b>
6	37	муж	7 мес	5 инъекций КОКАВ	<b>0,22</b>
	37		≥30 дней	+ 6-я и 7-я инъекция	<b>1,51</b>
	41		≥14 дней	+ 4 инъекции КОКАВ	<b>10,45</b>
7	64	жен	≥14 дней	2 инъекции КОКАВ + 3 инъекции Рабипур	<b>7,92</b>
	65		9 мес	-	<b>0,87</b>
8	Н.и.	жен	2 года	Курс КОКАВ (6 инъекций)	<b>2,62</b>
			8 мес	-	<b>2,62</b>
9	3	жен	≥14 дней	5 инъекций КОКАВ (+ АИГ)	<b>0,87</b>
			≥14 дней	6-я инъекция КОКАВ	<b>3,46</b>

Примечание: \*-полные данные приведены в диссертации

Результаты проведенных исследований напряженности и длительности гуморального поствакцинального иммунитета у людей с разной антирабической историей показали важность мониторинга уровня антирабических антител у людей как после профилактической, так и после лечебно – профилактической вакцинации против бешенства с учётом состояния здоровья, анамнеза, соблюдения схемы вакцинации.

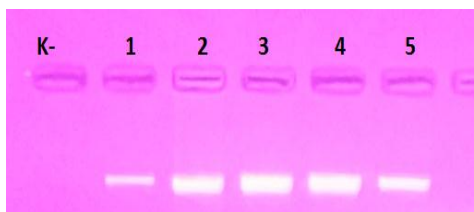
### **Разработка тест-системы на основе ОТ-ПЦР и секвенирования для генотипирования лиссавирусов в образцах биологического материала**

Необходимость разработки данной тест-системы была вызвана тем, что, несмотря на наличие в РФ диагностических тест-систем для выявления РНК вируса бешенства методом ОТ-ПЦР (ЗАО «Синтол») и ОТ-ПЦР в реальном времени («Амплисенс ®RABV-FL»), не было представлено ни одной отечественной тест-системы, позволяющей генотипировать лиссавирусы, циркулирующие на территории Евразии.

В результате выравнивания последовательностей нуклеотидов гена N лиссавирусов (n=66) были выбраны следующие праймеры: **F2:** 5' – ТААСАСС(С\Т)СТАСААТGGA - 3'; **R1:** 3' – ТАСАСАСGTTТААССТСАТG - 5' [Зайкова О.Н. и др., 2020]. Размер амплифицируемого фрагмента гена N в результате ПЦР - 609 н.о.

Оптимизацию условий ПЦР проводили на матрице РНК вируса бешенства штамм CVS-11. Проводили ПЦР в градиенте температур: 51°C, 49,5°C, 47°C. Оптимальной была признана температура отжига 49°C.

Исследование специфичности разработанной методики на основе ОТ-ПЦР и секвенирования для генотипирования лиссавирусов проводили в несколько этапов. На первом этапе проводили ОТ-ПЦР и секвенирование с использованием матрицы РНК, выделенной из «полевых» образцов (рисунок 3).



**Рисунок 3** - Апробирование разработанной тест-системы на «полевых» образцах: K<sup>-</sup> - отрицательный контроль, № 1- CVS-11, 2- 5 – образцы для исследования и последующего секвенирования с целью установления видовой принадлежности.

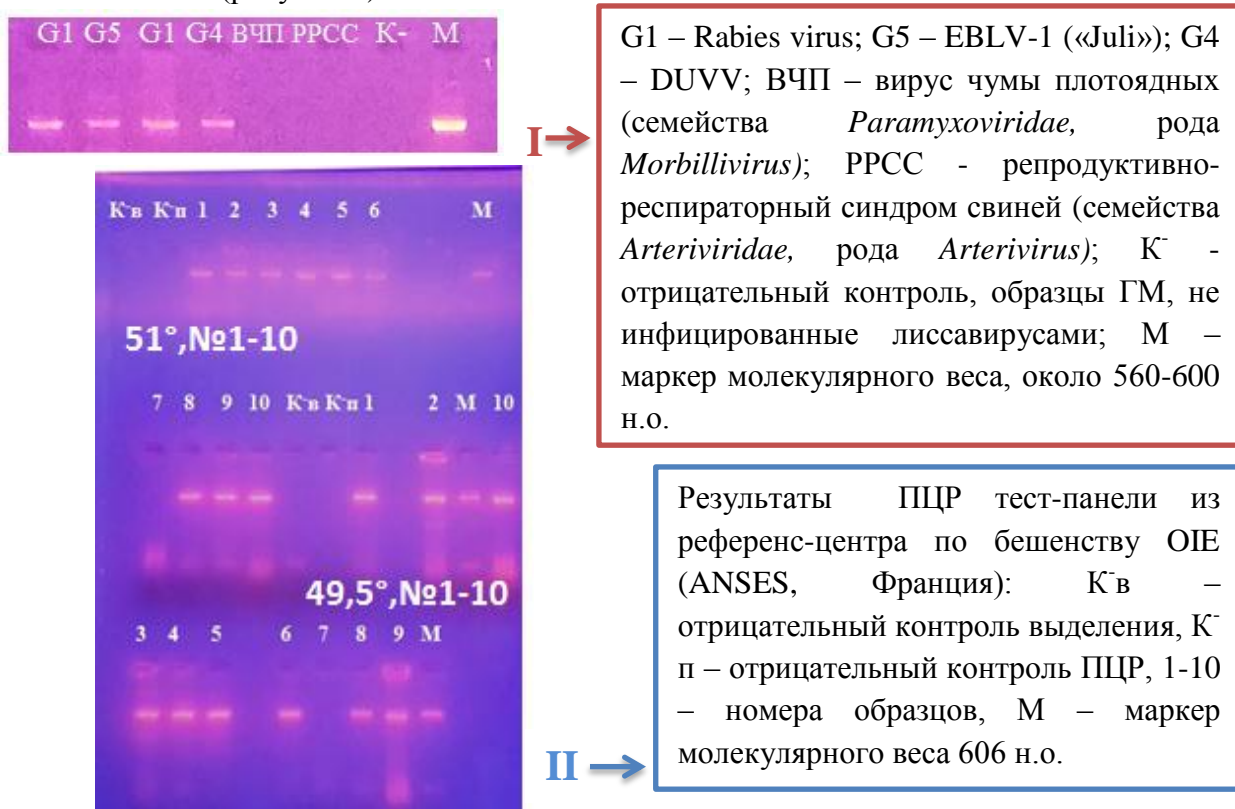
Секвенирование ампликонов и последующий BLAST – анализ показали, что в образце №2 содержатся фрагменты генома *Rabies virus*, что позволило скорректировать заявленное описание образца, где предполагалось наличие вируса *Lagos bat*. В образце №3 выявили фрагменты генома *Rabies virus* (изолят «Shuvalov»), в образце №4 - EBLV-1 (изолят «Juli»), в образце № 5 – DUVV, что соответствовало описанию, прилагаемому к данным образцам. Нуклеотидные последовательности фрагмента гена N изолятов лиссавирусов «Shuvalov» и «5\_DUVV» получены впервые в рамках данной работы.

Изолят «Shuvalov» был выделен из мозга человека, умершего от гидрофобии после контакта с кошкой в 2002 году в Центральной части РФ. Изолят «5\_DUVV» был выделен из мозга летучей мыши в 2010 году в Южной Африке и был ранее охарактеризован как *Duvenhage lyssavirus*. Изоляты «Shuvalov» и «5\_DUVV» были описаны ранее Грибенча С.В. с соавт. в рамках разработки моноклонального антирабического конъюгата [Грибенча С.В. и др., 2013]. С использованием разработанной нами тест-системы для



генотипирования лиссавирусов был также исследован изолят «Юли» («Juli»), выделенный из ГМ человека, укушенного летучей мышью [Ботвинкин А.Д., 2011; С.В. Грибенча, 2013]. Было показано, что данный изолят относится к подгруппе EBLV-1a.

Следующим этапом было проведение исследования специфичности разработанной тест-системы с использованием РНК и ДНК-матрицы вирусов других семейств и родов, а также образцов экзаменационной панели, предоставленной референс-центром по бешенству OIE (ANSES, Франция). ПЦР проводили в двух температурах: 51°C, 49,5 °C соответственно (рисунок 4).



**Рисунок 4** - Исследование специфичности разработанной тест-системы.

В результате секвенирования ампликонов с использованием тех же праймеров, что и при проведении ОТ-ПЦР, были получены нуклеотидные последовательности 5 видов лиссавирусов в образцах экзаменационной тест-панели, предоставленной референс-центром по бешенству OIE (ANSES, Франция) (таблица 8).

**Таблица 8** - Апробирование разработанной тест-системы с использованием образцов экзаменационной панели, предоставленной референс-центром по бешенству OIE (ANSES, Франция)

№	Результат ПЦР	Результат секвенирования
1	+	<i>Australian bat lyssavirus</i>
2	+	<i>European bat lyssavirus-2</i>
3	+	<i>European bat lyssavirus -1</i>
4	+	<i>Rabies virus</i>
5	+	<i>Rabies virus</i>
6	+	<i>Rabies virus</i>
7	-	-
8	+	<i>Rabies virus</i>
9	+	<i>Bokeloh bat lyssavirus</i>
10	+	<i>Rabies virus</i>

Таким образом, разработанная тест-система позволяет выявлять и генотипировать 6 видов (*Rabies virus*, *EBLV-1*, *EBLV-2*, *BBLV*, *ABLV*, *DUVV*) вирусов рода *Lyssavirus* и не выявляет вирусы других родов и семейств. Показана 100% специфичность разработанной методики.

Для исследования аналитической чувствительности разработанной методики на основе ОТ-ПЦР и секвенирования готовили серию 10-кратных разведений (от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ ) фиксированного культурального штамма CVS-11, отбирали по 200,0 мкл каждого разведения для выделения РНК и проведения ОТ-ПЦР в сравнении с «контролем». Параллельно проводили титрование вируса бешенства штамм CVS-11 в культуре клеток ВНК-21 С13. Титр составил  $T = 20 \times 10^{5,667}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл. Аналитическая чувствительность разработанной методики на основе ОТ-ПЦР и секвенирования для генотипирования лиссавирусов составляет  $9,29 \times 10^4$  ТЦД<sub>50</sub>/мл, соответствует разведению вируса 1:100.

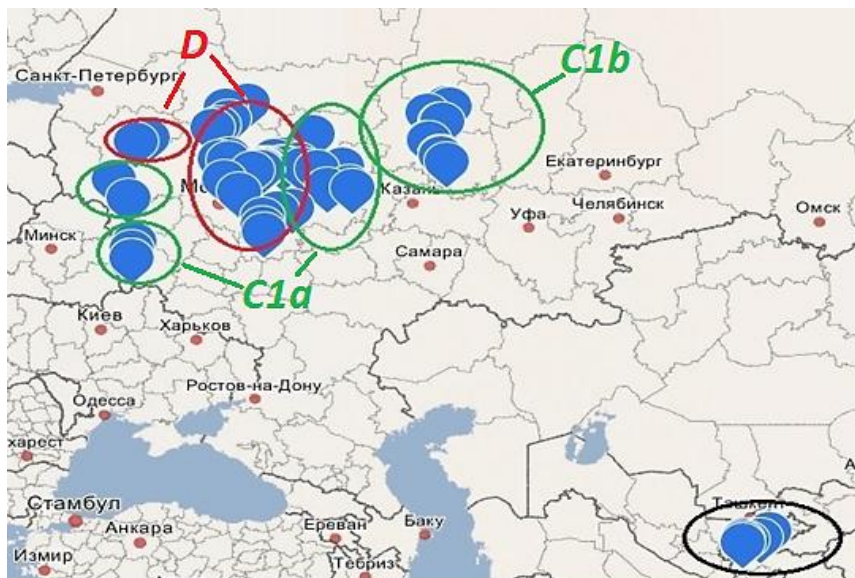
#### **Анализ молекулярно-генетических особенностей возбудителей бешенства, циркулирующих на территории РФ и некоторых сопредельных с РФ регионов Евразии**

Выбор территорий сравнения обусловлен наличием общих границ с РФ, генетической близостью вирусов бешенства, циркулирующих на данных территориях [BLAST, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>] и ранее установленными научными контактами. Изоляты ВБ, нуклеотидные последовательности которых получены в ходе текущего исследования, были выделены на территории Центрального и Приволжского ФО РФ, а также Республики Таджикистан. Как известно, существует 6 геновариантов вируса бешенства (*Rabies virus*), распространенных на территории РФ и некоторых сопредельных стран [Ботвинкин А.Д. и др., 2004; Чупин С.А. и др., 2013; Полещук Е.М. и др., 2013; Девяткин А.А. и др., 2017].

Сравнительный анализ фрагментов гена N геновариантов вируса бешенства, распространенных на территории РФ и некоторых сопредельных стран, и вакцинных штаммов позволил выявить 5 маркерных позиций: С40S (для группы арктических и арктически-подобных вирусов), V56I (для группы евразийских (степных) вирусов (С), L/V95W (для центрально-российских вирусов (D), а также D101N/S/T, N/G106D. Вирусы в пределах каждой из данных групп имели 98-100% гомологии на заданном участке генома. В результате сравнительного анализа фрагментов нуклеопротеина ВБ, выделенных на территории Брянской и Кировской области в 2013-2014 годах, где проводилась оральная иммунизация диких плотоядных в указанный период, и вакцинных штаммов (ERA, ERA G333, SAD B19, SAG 2, RV-97 и других) показано, что случаи бешенства, выявленные у диких плотоядных на данных территориях, не ассоциированы с вакцинным штаммом ERA G333, поскольку было установлено 6 замен в исследуемом фрагменте гена N ВБ: H21Y, S61N, V95L, D101T, G106D, P135S.

Сравнение фрагментов геномов изолятов, выделенных от собак и кошек, и человека, погибшего от гидрофобии после контакта с кошкой («Shuvalov»), с изолятами, выделенными от диких животных (лис, енотовидных собак) указывают на то, что домашние и безнадзорные плотоядные, заражаясь от диких животных, остаются важным потенциальным звеном в передаче вируса бешенства, циркулирующего в дикой природе, человеку. Изоляты, выделенные на территории Московской, Тверской, Ярославской, а также часть изолятов из Владимирской и Нижегородской области были отнесены к подгруппе центрально-российских вирусов (D). При изучении геновариантов, выделенных

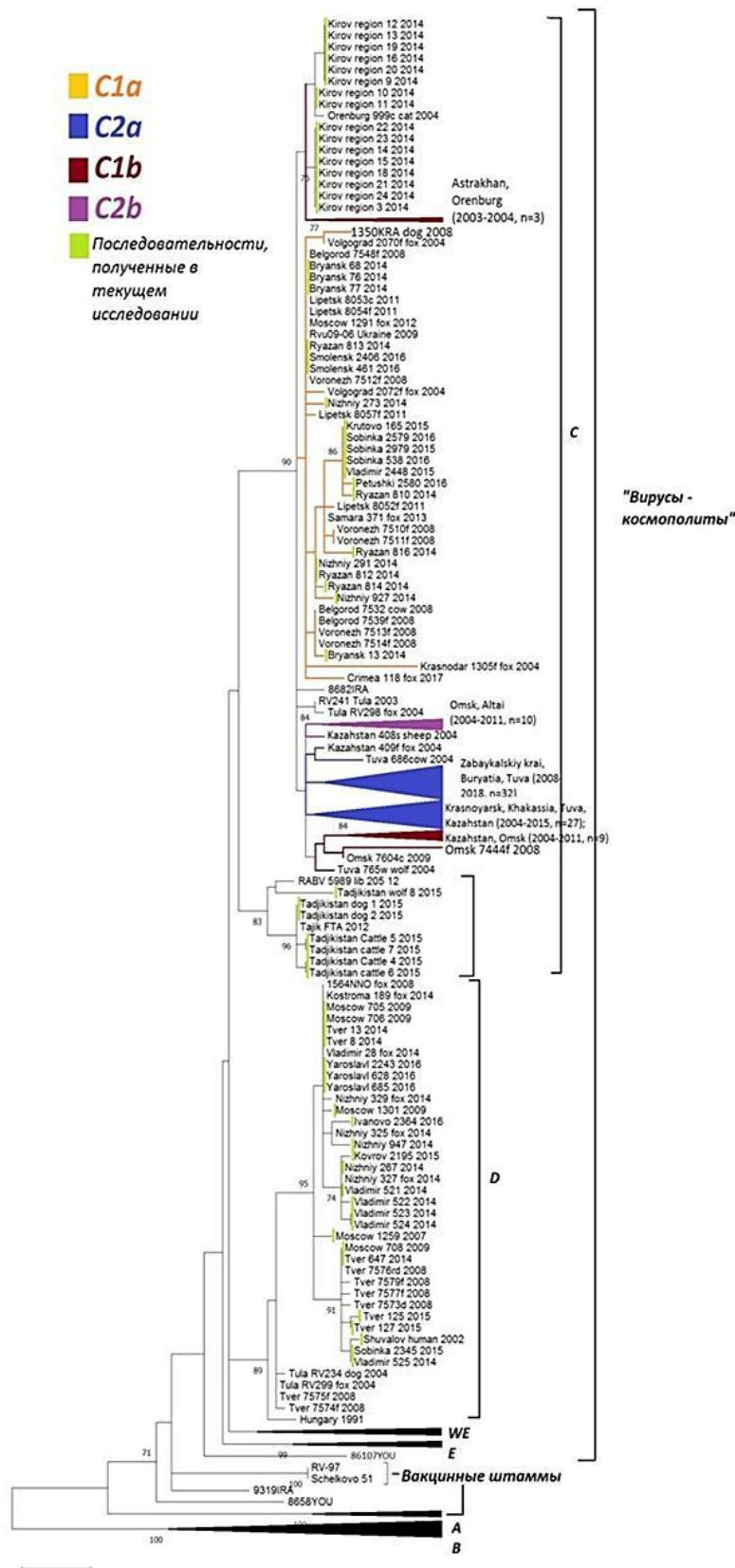
на территории Кировской области показано, что данная группа вирусов филогенетически ближе к подгруппе евразийских (степных) вирусов, подгруппе C1b. Изоляты, выделенные на территории Брянской, Рязанской, Смоленской, а также Нижегородской и Владимирской области были отнесены к группе евразийских (степных) вирусов, подгруппе C1a (замена D101T) (рисунок 5-6).



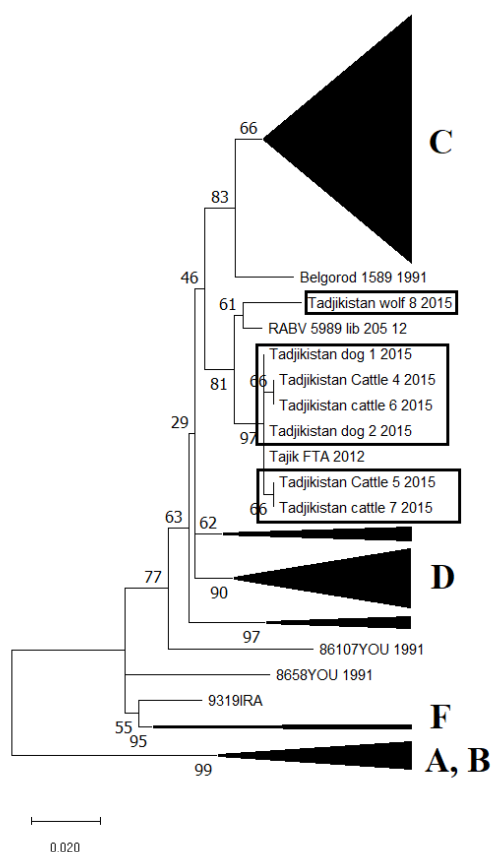
**Рисунок 5** – Карта, отражающая области циркуляции геновариантов ВБ в Центральной части РФ и Республики Таджикистан с учетом данных, полученных при исследовании изолятов ВБ в рамках данной работы: красным показана циркуляция группы центрально-российских вирусов (территория Московской, Тверской, частично Владимирской и Нижегородской областей); зелёным показана циркуляция группы евразийских (степных) вирусов (территория Кировской, Брянской, Смоленской, Владимирской, Нижегородской, Рязанской областей); черным показана циркуляция группы вирусов, выделенных на территории Республики Таджикистан в 2015 году

Сравнительный молекулярно-генетический анализ проводился совместно с лабораторией эпизоотологии ФГБУ ВИЭВ РАН. При изучении возможных эволюционных связей ВБ, циркулирующих на территории Республики Таджикистан и РФ, было установлено, что 6 изолятов из Таджикистана идентичны друг другу на заданном участке фрагмента нуклеопротеина, в то время как изолят, выделенный от волка («Tadjikistan\_wolf»), отличается своей структурой в позиции C40S, что роднит его с RABV\_AY956319 (выделен из слюны реципиента после трансплантации органов, предоставленных в Германию из Индии) и с подгруппой арктических и арктически-подобных вирусов. Маркерной также является позиция V95W, что, в свою очередь, указывает на сходство изолята «Tadjikistan\_wolf» с центрально-российской группой ВБ. Филогенетический анализ изолятов ВБ, циркулирующих на территории РФ, постсоветского пространства и Европы, показал, что изоляты, выделенные на территории Таджикистана в 2015 году вместе с изолятом из Азербайджана («RABV\_5989\_lib\_205\_12»), формируют кластер, отделяясь от остальных представителей подгруппы С, с поддержкой 81-83%. Данная группа вирусов не входит в состав подгруппы кавказских вирусов (F), является внешней по отношению к другим представителям

подгруппы С, и изолята «Belgorod\_1589\_1991», который был ранее предположительно отнесен к подгруппе С0 (рисунок 7).

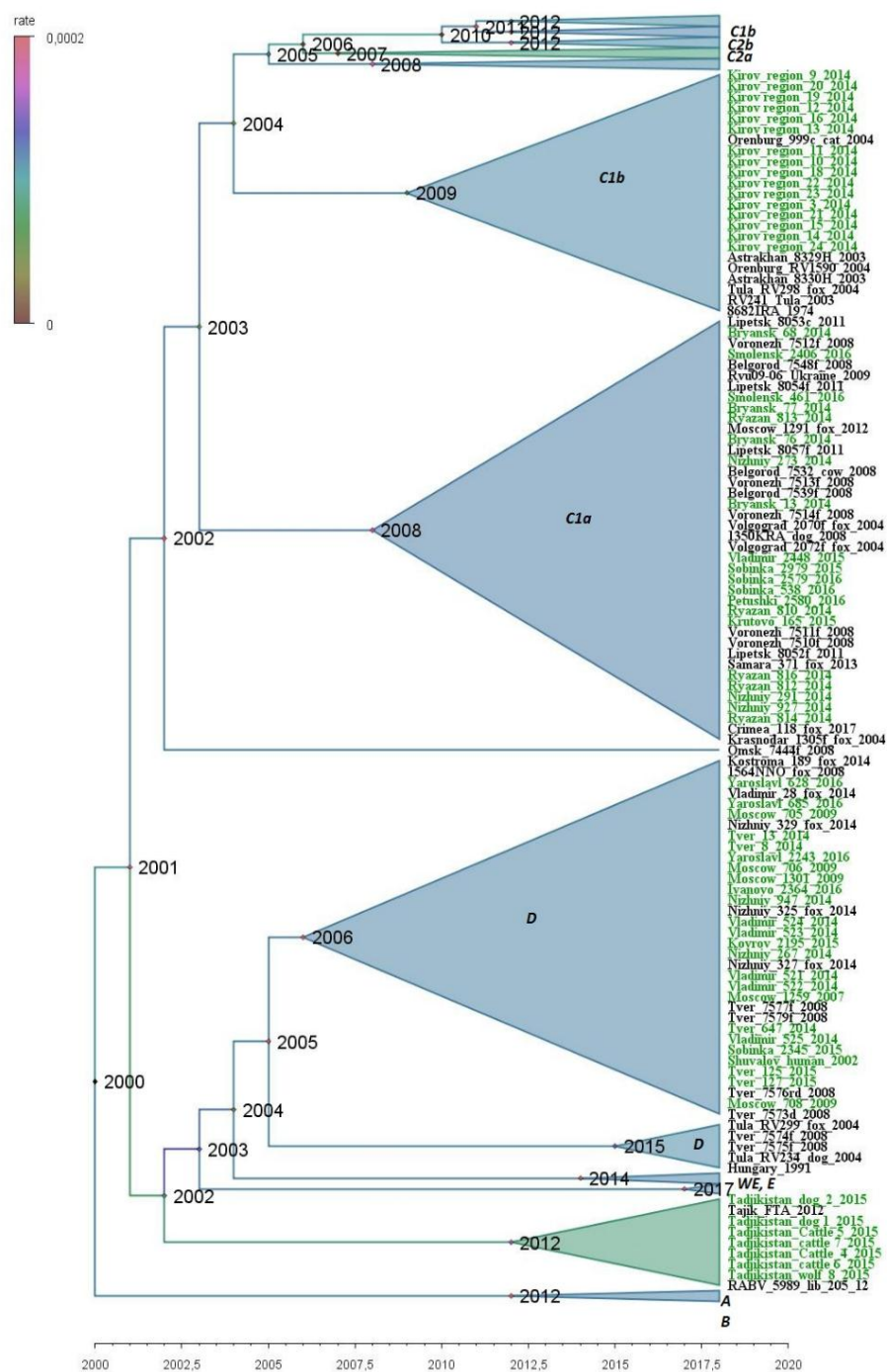


**Рисунок 6** - Филогенетическая дендрограмма, полученная на основании выравнивания 235 нуклеотидных последовательностей фрагментов гена N ВБ (387 нуклеотидов) методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood method) с помощью эволюционной модели Tamura-Nei с использованием MEGA v. 10.0.5..



**Рисунок 7** - Филогенетическая дендрограмма, полученная на основании выравнивания 198 нуклеотидных последовательностей фрагментов гена N ВБ (387 нуклеотидов) методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood method) с помощью эволюционной модели Tamura-Nei с использованием MEGA v. 10.0.5.: сравнение изолятов из Республики Таджикистан (выделены черным), изолята «Belgorod\_1589\_1991» (AY352456) и представителей подгруппы F.

Филогенетический анализ фрагментов геномов изолятов вируса бешенства, проведенный в рамках данной работы, показал, что предковая форма вирусов, циркулирующих на территории Кировской, Брянской, Рязанской, Смоленской, Владимирской и Нижегородской области, выделенных в 2014-2016 годах, и других представителей группы С, выявляется с 2002 года. Предковая форма вирусов, выделенных на территории Республики Таджикистан в 2015 году, и других представителей группы С выявляется с 2001 года (рисунок 8). Установленная скорость замен  $1,07 \times 10^{-5}$  замен/сайт/год (95% HPD  $1,12 \times 10^{-6}$  -  $4,08 \times 10^{-5}$ ) значительно ниже, чем было представлено в предыдущих исследованиях [Чупин С.А. и др., 2013; Девяткин А.А. и др., 2017]. Вероятно, это связано с тем, что в данной работе мы рассматривали сравнительно небольшой фрагмент гена N, включающий в себя маркерные замены, характерные для того или иного геноварианта, но достаточно стабильные по своей молекулярной структуре.



**Рисунок 8** - Эволюционная дендрограмма вирусов бешенства (n=218), выделенных на территории РФ, стран постсоветского пространства и Европы: цветом выделены последовательности, полученные в рамках данной работы.

Таким образом, в результате проведенных исследований дополнена информация о циркуляции геновариантов вируса бешенства на территории европейской части РФ, получены данные о молекулярной структуре фрагмента гена N вируса бешенства, позволяющие проследить скрытые механизмы распространения возбудителя. Установлена циркуляция вирусов-космополитов на территории Республики Таджикистан, которые могут быть отнесены либо к подгруппе C0, либо к отдельной генетической линии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сравнительный ретроспективный анализ заболеваемости бешенством в РФ и некоторых сопредельных с РФ регионах Евразии в период с 2013 по 2019 годы показал, что риск инфицирования людей бешенством при контакте с животными сохраняется. Представляется важным усиление противоэпизоотических мер, направленных на плановую вакцинацию домашних животных, в том числе сельскохозяйственных, регулирование численности и вакцинацию безнадзорных плотоядных и продолжение программы по оральной вакцинации диких плотоядных с соблюдением регламента и обязательным мониторингом. На основании проведенных исследований представляется целесообразным повышать информированность населения об опасности бешенства и о важности проведения профилактической и лечебно-профилактической вакцинации, а также дополнить систему иммунологического мониторинга в РФ изучением напряженности и длительности гуморального антирабического иммунитета у людей с помощью быстрого, количественного FAVN теста. Разработанная тест-система на основе ОТ-ПЦР и секвенирования может применяться для генотипирования лиссавирусов в биологическом материале с целью изучения их распространения и слежения за изменчивостью геномов возбудителя, что будет способствовать развитию системы микробиологического мониторинга в РФ. Методами молекулярного анализа удалось уточнить циркуляцию геновариантов вируса бешенства (*Rabies virus*) на территории европейской части РФ и Республики Таджикистан и установить, что общая предковая форма данных геновариантов выявляется с 2000-2001 года.

## ВЫВОДЫ

1. В период с 2013 по 2019 год на европейскую часть РФ приходится 43,5% всех зарегистрированных в Европе случаев бешенства животных и 68,4% случаев бешенства у людей. Видовая структура заболеваемости животных характеризуется увеличением доли собак и кошек при сохранении важной роли лисиц и енотовидных собак в распространении инфекции.

2. Эффективность профилактической и лечебно-профилактической вакцинации против бешенства у людей может быть проанализирована путем оценки уровня антирабических ВНА с помощью реакции вируснейтрализации в культуре клеток ВНК-21 С13 (FAVN тест). Показано, что проведение ревакцинации через год (и более) способствует повышению уровня антирабических антител, однако у ряда пациентов в течение года титры антител могут снижаться в 3,9 - 11,5 раз.

3. Показано, что разработанная тест-система на основе ОТ-ПЦР и секвенирования позволяет генотипировать лиссавирусы, циркулирующие на территории РФ, Европы и странах Средней Азии со 100% специфичностью и аналитической чувствительностью, равной  $9,29 \times 10^4$  ТЦД<sub>50</sub>/мл.

4. Анализ молекулярно-генетических особенностей геновариантов вируса бешенства (*Rabies virus*), выделенных на территории РФ и некоторых сопредельных с РФ регионов Евразии от людей и животных, показал наличие маркерных замен: С40S, V56I, L/V95W, D101N/S/T и N/G106D, характерных для центрально-российских, евразийских (степных), арктических и арктически-подобных групп вируса бешенства.

5. Показано, что предковая форма геновариантов вируса бешенства, циркулировавших на территории Республики Таджикистан в 2015 году и РФ и Европы в

период с 1987 по 2018 годы выявляется с 2001-2002 года. Вирусы бешенства, выделенные на территории Республики Таджикистан в 2015 году, формируют отдельный кластер на филогенетической дендрограмме с поддержкой более 80% в составе «вирусов-космополитов».

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность за методическую и консультативную помощь научному руководителю д.б.н., профессору, чл.-корр. РАН Гребенниковой Т.В., д.б.н., профессору Коренбергу Э.И., д.б.н., профессору Бобковой М.Р., д.м.н., профессору Симоновой Е.Г., за практическую помощь в выполнении отдельных этапов работы сотрудникам ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» к.б.н. Лосич М.А., к.б.н. Елакову А.Л., к.б.н. Южакову А.Г., д.б.н. Алиперу Т.И., к.б.н. Мусиенко М.И., д.б.н., проф. Баринскому И.Ф., руководству и отделу аспирантуры ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, президенту АНО «НИИ ДПБ» д.б.н., профессору Верховскому О.А., руководителю отдела к.в.н. Непоклоновой И.В., директору ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН д.б.н. Гулюкину А.М., руководителю лаборатории эпизоотологии к.в.н. Шабейкину А.А., д.б.н., чл.-корр. РАН профессору Забережному А.Д., заместителю директора ФГБУ «ВНИИЗЖ» д.в.н. Метлину А.Е., а также ветеринарным службам г. Брянска, г. Кирова и Республики Таджикистан – за предоставление образцов для исследования.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК

1. Елаков А.Л. Мониторинг бешенства у диких животных в Брянской области/А.Л. Елаков, **О.Н. Зайкова**, К.С. Кочергин-Никитский, Т.В. Гребенникова, Т.И. Алипер //Ветеринария. 2015. №1. С. 11-14
2. Гулюкин А.М. Особенности эпизоотического процесса и молекулярно-генетических характеристик изолятов вируса бешенства в Республике Татарстан/А.М. Гулюкин, **О.Н. Зайкова**, И.В. Полякова, Н.А. Хисматуллина, И.И. Самерханов//Ветеринарный врач, 2015,№ 6, С.3-11
3. **Зайкова О.Н.** Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области/ О.Н. Зайкова, Т.В. Гребенникова, А.Л. Елаков, К.С. Кочергин-Никитский, Т.И. Алипер, С.Ф. Чучалин, А.М. Гулюкин//Вопросы вирусологии. 2016; 61(4), С. 186-192
4. Шабейкин А.А. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации за период с 1991 по 2015 годы/А.А. Шабейкин, А.М. Гулюкин, **О.Н. Зайкова**//Ветеринария Кубани, 2016, №4, С. 4-6
5. Гуламадшоева Л.Г. Особенности молекулярно-генетической характеристики изолятов вируса бешенства в Республике Таджикистан/Л.Г. Гуламадшоева, Т.В. Гребенникова, М.М. Аноятбеков, А.Н. Мамадшоев, А.А. Шабейкин, И.В. Полякова, А.Г. Южаков, С.В. Лахтюхов, А.М. Гулюкин, **О.Н. Зайкова**//Ветеринария и кормление. 2016. № 6. С. 24-34
6. **Зайкова О.Н.** Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей/ О.Н. Зайкова, Т.В. Гребенникова, А.М. Гулюкин,



А.А. Шабейкин, И.В. Полякова, А.Е. Метлин//Вопросы вирусологии, Издательство «Медицина», Москва, - Т. 62, №3, 2017, С. 101-108

7. Непоклонова И.В. Сравнительный анализ факторов формирования антирабического иммунитета у мелких домашних животных/И.В. Непоклонова, М.А. Лосич, **О.Н. Зайкова**, О.А. Верховский, Т.И. Алипер// Ветеринария. 2017. № 4. С. 26-34

8. Гулюкин А.М. Особенности эпизоотологического процесса и молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Тверской области/А.М. Гулюкин, А.А. Шабейкин, В.В. Макаров, **О.Н. Зайкова**, Т.В. Гребенникова, А.Д. Забережный, И.В. Полякова, А.Г. Южаков//Вопросы вирусологии. 2018. Т. 63. № 3. С. 115-123. DOI:10.18821/0507-4088-2018-63-3-115-123

9. Паршикова А.В. Эпизоотологические особенности бешенства животных в Центральном, Центрально-Черноземном и Волговятском экономических районах за 2013-2017 гг/ А.В. Паршикова, **О.Н. Зайкова**//Ветеринария и кормление. 2018. № 4. С. 42-45. DOI:10.30917/АТТ-VK-1814-9588-2018-4-15

10. Мухин А.Н. Длительность и напряженность антирабического иммунитета у кошек после вакцинации вакциной «РАБИФЕЛ»/А.Н. Мухин, С.А. Раев, М.А. Лосич, **О.Н. Зайкова**, О.В. Остапчук, И.В. Непоклонова, О.А. Верховский, Т.И. Алипер//Ветеринария и кормление. 2018. № 6. С. 37-39

11. Лосич М.А. Молекулярно-биологическая характеристика вакцинного штамма ERA СВ-20М вируса бешенства/М.А. Лосич, **О.Н. Зайкова**, И.В. Непоклонова, Т.В. Гребенникова, О.А. Верховский, А.И. Одноров, Т.И. Алипер//Вопросы вирусологии, 2018, Т.63 №5, С.224-232

12. Pina E.N. Generation and characterization of a neutralizing monoclonal antibody against rabies virus/E.N. Pina, D.A. Dolgikh, M.P. Kirpichnikov, O.N. Solopova, P.G. Sveshnikov, D.S. Balabashin, M.V. Larina, T.K. Aliev, T.V. Grebennikova, M.A. Losich, **O.N. Zaykova**//Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2018. Т. 44. № 6. С. 695-704

13. **Зайкова О.Н.** Сравнительный молекулярно - генетический анализ изолятов вируса бешенства в РФ: роль кошек/О.Н. Зайкова, М.А. Лосич, О.А. Верховский, И.В. Непоклонова, А.Л. Елаков, Т.В. Гребенникова, Т.И. Алипер, А.М. Гулюкин, //Ветеринария. 2020. № 3. С. 21-28

#### Статьи в рецензируемых международных журналах

14. Ильина Е.Н. Получение и характеристика нейтрализующего моноклонального антитела против вируса бешенства/ Е.Н. Ильина, О.Н. Солопова, Д.С. Балабашин, М.В. Ларина, Т.К. Алиев, Т.В. Гребенникова, М.А. Лосич, **О.Н. Зайкова**, П.Г. Свешников, Д.А. Долгих, М.П. Кирпичников //Биоорганическая химия. 2019. Т. 45. № 1. С. 58-68

15. **Зайкова О.Н.** Сравнительная молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства (*Rabies Lyssavirus*, *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*), циркулировавших на территории Российской Федерации в период с 1985 по 2016 год/О.Н. Зайкова, Т.В. Гребенникова, М.А. Лосич, А.Л. Елаков, А.М. Гулюкин, А.Е. Метлин//Вопросы вирусологии. 2020. Т. 65. № 1. С. 41-48

16. Шмаров М.М. Иммуногенные и защитные свойства рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа, экспрессирующего ген гликопротеина G вируса бешенства вакцинного штамма РВ-97/ М.М.Шмаров, Е.С. Седова, А.Э. Никонова, А.Л. Елаков, Д.Н. Щербинин, Э.А. Артемова, Е.С. Лебедева, М.М. Чулкина, М.А. Лосич, **О.Н.**

**Зайкова, Е.В.** Чернышова, С.В. Алексеева, И.Л. Тутыхина, О.В. Сергеев, Л.В. Верховская, А.В. Пичугин, А.Е. Метлин, И.Ф. Баринский, Т.В. Гребенникова, Д.Ю. Логунов, Р.И. Атауллаханов, Б.С. Народицкий, А.Л. Гинцбург// Иммунология. 2020; 41 (4): 312–325. DOI: <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-4-312-325>

### Тезисы докладов и материалы конференций

17. **Зайкова О. Н.** Мониторинг бешенства у диких животных в Брянской области после оральной иммунизации животных/О. Н. Зайкова, А. Л. Елаков, К. С. Кочергин-Никитский, Т.В. Гребенникова, Т.И. Алипер, А.М. Гулюкин// Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, 2015, с.128

18. **Зайкова О.Н.** Мониторинг бешенства у диких животных в Кировской области после оральной иммунизации/О.Н. Зайкова, Т.В. Гребенникова, А.Л. Елаков, К.С. Кочергин-Никитский// Научный фонд «Биолог», Вирусология, V (9), 2015, С 12-15

19. Шабейкин А.А. Использование ГИС-технологий при оценке рисков в эпизоотическом исследовании/А.А. Шабейкин, **О.Н. Зайкова**, А.В. Паршикова, А.Г. Южаков// В сборнике: Научные перспективы XXI века. Достижения и перспективы нового столетия. X Международная практическая конференция. Главный редактор: Вершинин Б.М.. 2015. С. 50-54

20. Гулюкин А.М. Эпизоотологические аспекты бешенства на территории Российской Федерации/А.М. Гулюкин, **О.Н. Зайкова**, А.В. Паршикова//В Сборнике: Единый Мир - Единое Здоровье Материалы Конгресса. 2017. С. 259-264

21. Лосич М.А. Сравнительный анализ уровня антирабических антител у мелких домашних животных после вакцинации против бешенства/ М.А. Лосич, **О.Н. Зайкова**, И.В. Непоклонова, О.А. Верховский // В Сборнике: Единый Мир - Единое Здоровье, Материалы Конгресса, Зооантропонозы, 2018

22. Лосич М.А. Бешенство. Особенности формирования поствакцинального антирабического иммунитета у собак и кошек/М.А. Лосич, **О.Н. Зайкова**, И.В. Непоклонова, О.А. Верховский//В Сборнике: Единый Мир - Единое Здоровье, Материалы Конгресса, 2019.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

<b>АИГ</b> – антирабический иммуноглобулин	<b>ЮФО</b> - Южный Федеральный округ
<b>ВБ</b> – вирус бешенства	<b>ВНК-21</b> - baby hamster kidney
<b>ВНА</b> - вируснейтрализующие антитела	<b>CVS</b> – Challenge virus standard
<b>ВОЗ</b> – Всемирная организация здравоохранения	<b>EBLV</b> – European bat lyssavirus
<b>ЛМ</b> - летучие мыши	<b>FAVN</b> – fluorescent antibody virus neutralization test
<b>ОТ-ПЦР</b> – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией	<b>RABV</b> – Rabies virus
<b>ПФО</b> – Приволжский Федеральный округ	<b>OIE</b> – World Organization for Animal Health
<b>с/х</b> - сельскохозяйственный	<b>RTCIT</b> –Rabies tissue culture infection test
<b>ЦФО</b> – Центральный Федеральный округ	<b>WHO</b> – World Health Organization
<b>ЭН</b> – эпидемиологический надзор	<b>WCBV</b> –West Caucasian bat lyssavirus
<b>ЭП</b> – эпидемический процесс	