ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»

На правах рукописи

Метлин Артем Евгеньевич

КОМПЛЕКС СРЕДСТВ И МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ И БОРЬБЫ С БЕШЕНСТВОМ

06.02.02 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология»

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

Научный консультант
доктор биологических наук,
профессор К.Н. Груздев

ВЛАДИМИР – 2018 г.

СОДЕРЖАНИЕ

1 ВВЕДЕНИЕ....7
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ....18
2.1 Общая характеристика заболевания....18
2.2 Экономический ущерб от бешенства....18
2.2.1 Методы оценки ущерба от бешенства....19
2.2.2 Экономический ущерб от бешенства в разных странах....20
2.3 Ситуация по бешенству в различных регионах мира....21
2.3.1 Распространение бешенства в мире....21
2.3.2 Бешенство в Европе....24
2.3.3 Бешенство в граничащих с РФ странах....27
2.3.4 Бешенство в России....36
2.3.5 Бешенство в Азии....40
2.4 Характеристика вируса бешенства....43
2.4.1 Таксономические характеристики....43
2.4.2 Морфология вириона....44
2.5 Патогенез при бешенстве....50
2.6 Клинические признаки....52
2.7 Патологические изменения при бешенстве....54
2.8 Методы лабораторной диагностики бешенства....55
2.8.1 Нормативно-правовая база для диагностики бешенства....55
2.8.2 Классификация методов лабораторной диагностики бешенства....55
2.8.3 Реакция иммунофлуоресценции....56
2.8.4 Иммуноферментный анализ....58
2.8.5 Гистологическое исследование....58
2.8.6 Иммуногистохимическое исследование....59
2.8.7 Реакция агглютинации латекса....60
2.8.8 Выделение вируса....61
2.8.9 Методы молекулярной биологии для диагностики бешенства....63
2.8.10 Методы оценки поствакцинального антирабического иммунитета и поедаемости оральных антирабических вакцин....66
2.8.11 Методы прижизненной диагностики бешенства....67
2.9 Антигенные и молекулярно-биологические характеристики вируса бешенства....68

2.9.1 Антигенные характеристики вируса бешенства 68
2.9.2 Применение ферментов рестрикции для штаммовой дифференциации 70
2.9.3 Нуклеотидное секвенирование и филогенетический анализ 70
2.10 Меры борьбы с бешенством 73
2.10.1 Вакцины и вакцинные штаммы 73
2.10.2 Меры борьбы и профилактики бешенства 85
3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ 89
3.1 Материалы и методы исследований 89
3.1.1 Материалы 89
3.1.2 Методы исследований 91
3.2 Результаты собственных исследований 116
3.2.1 Разработка и внедрение мероприятий по диагностике, мониторингу бешенства и оценке эффективности антирабической вакцинации 116
3.2.1.1 Разработка схемы лабораторной диагностики бешенства 117
3.2.1.2 Разработка и адаптация методов лабораторной диагностики бешенства первого уровня 118
3.2.1.3 Разработка и адаптация методов лабораторной диагностики бешенства второго уровня 121
3.2.1.4 Разработка методов лабораторной диагностики бешенства третьего уровня 133
3.2.1.5 Система эпизоотологического мониторинга бешенства в Российской Федерации 154
3.2.1.6 Схема и методы оценки эффективности антирабической вакцинации животных 159
3.2.1.7 Результаты мониторинга эффективности антирабической вакцинации домашних животных в РФ 163
3.2.1.8 Мониторинг наличия антирабических антител у диких животных 168
3.2.1.9 Система межлабораторных сличительных испытаний как мероприятие по контролю качества проводимой диагностической работы 170
3.2.2 Изучение молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства 173
3.2.2.1 Методы изучения молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства и их дифференциации 174
3.2.2.2 Изучение молекулярно-биологических свойств вируса бешенства в России и сопредельных странах 180
3.2.2.3 Молекулярная эпизоотология бешенства собак на территории Королевства Камбоджа и Юго-Восточной Азии 190

3.2.2.4 Молекулярно-биологические и антигенные характеристики российских и зарубежных вакцинных штаммов вируса бешенства 202
3.2.3 Разработка и внедрение мероприятий по борьбе и профилактике бешенства в РФ и за рубежом 227
3.2.3.1 Результаты российско-финского сотрудничества по профилактике бешенства в граничащих с Финляндией регионах России 227
3.2.3.2 Результаты сотрудничества России со странами ЕС по искоренению бешенства в Калининградской области 238
3.2.3.3 Результаты сотрудничества с Эфиопией по внедрению метода культивирования вируса бешенства в культуре клеток для производства антирабической вакцины 240
3.2.3.4 Подходы к разработке программ по борьбе и профилактике бешенства 246
3.3 Обсуждение 262
3.3.1 Схема и методы лабораторной диагностики и мониторинга бешенства и оценки эффективности антирабической иммунизации животных 262
3.3.2 Изучение молекулярно-биологических характеристик, филогенетический анализ полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства 282
3.3.3 Разработка и внедрение мероприятий по борьбе и профилактике бешенства в РФ и за рубежом 301
4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ 313
5 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 317
6 ПРИЛОЖЕНИЯ 367

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВБ – вирус бешенства

ВНА – вируснейтрализующие антитела

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЕС – Европейский Союз

ИГХМ – иммуногистохимический метод

ИФА – иммуноферментный анализ

кДНК – копия ДНК с РНК-матрицы

КРС – крупный рогатый скот

МЕ – международные единицы

МКА – моноклональные антитела

МРС – мелкий рогатый скот

МЭБ – Международное эпизоотологическое бюро

н.о. – нуклеотидное основание

н.п. – неблагополучный пункт

ОТ-ПЦР – обратно-транскиптазная полимеразная цепная реакция

ПТ РИФ – прямой твердофазный вариант реакции иммунофлуоресценции

ПЖ РИФ – прямой жидкофазный вариант реакции иммунофлуоресценции

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

РАЛ – реакция агглютинации латекса

РИФ – реакция иммунофлуоресценции

РНК – рибонуклеиновая кислота

РН – реакция нейтрализации

РНП - рибонуклеопротеин

РФ – Российская Федерация

СНГ – Содружество Независимых Государств

ФАО – Всемирная продовольственная организация

ФБР – фосфатно-буферный раствор

ФИТЦ-иммуноглобулин – меченный флуоресцеинизотиоцианатом натрия антирабический иммуноглобулин

ФСК – фетальная сыворотка КРС

ЦНС – центральная нервная система

$TCID_{50}$ – 50%-ная культурально-клеточная инфекционная доза

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследований. Бешенство (*Rabies*) – широко распространенное инфекционное заболевание теплокровных животных и человека. Оно проявляется нарушением функции центральной нервной системы, сопровождается параличами и энцефаломиелитом. Летальность практически неизбежна. Бешенство наземных млекопитающих регистрируется на всех континентах земного шара, кроме Австралии и Антарктиды. Несмотря на успешное искоренение этого заболевания в некоторых европейских странах, эпизоотологическая ситуация с этим заболеванием на территории многих стран Евразии, Африки и Америки остается сложной. По данным ВОЗ, каждые 10 минут в мире от бешенства умирает один человек, а ежегодно – около 70 000, главным образом это дети из развивающихся стран.

Эпизоотологическая обстановка по бешенству в Российской Федерации (РФ) резко обострилась в последнее десятилетие XX века. Заболевание регистрируется чаще среди диких плотоядных животных, которые являются основным его переносчиком. Распределение очагов бешенства по регионам РФ и по годам отличается выраженной неравномерностью. Вместе с тем истинный ареал болезни гораздо шире данных официальной статистики. Неблагополучны по бешенству многие граничащие с Россией страны, такие как Республика Белоруссия, Азербайджан, Абхазия, Казахстан, Монголия, Китай, Украина. Прибалтийские страны сумели элиминировать бешенство благодаря интенсивной и широкомасштабной кампании по оральной вакцинации лишь несколько лет назад. Первенство же по числу случаев бешенства среди людей и животных занимают азиатские страны, с которыми РФ последнее время интенсифицирует торговые отношения и туристические связи. Так, в Камбодже в период с 1998 по 2007 гг. 124 749 пациентов обратились за постэкспозиционной профилактикой бешенства, кроме того, официально было отмечено 63 смертельных случая у людей. При этом используя математическую модель, было предсказано, что только в 2007 г. в Камбодже имело место не менее 810 случаев бешенства у людей.

В рамках глобальной инициативы Продовольственной сельскохозяйственной

Организации Объединенных Наций (ФАО), Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Всемирной организацией по охране здоровья животных (МЭБ) об элиминации переносимого собаками бешенства среди людей к 2030 г., принятой на глобальной конференции по бешенству в 2015 г., Российской Федерации, как члену этих международных организаций, предстоит предпринять определенные шаги в научно-исследовательском, информационно-методическом, законодательном и практическом направлениях.

Несмотря на то, что вышеупомянутая инициатива была принята совсем недавно, первые шаги в этом направлении начали предприниматься в Российской Федерацией с 2000 г., когда приказом Департамента ветеринарии Минсельхоза России № 32 от 19 октября 2000 г. Всероссийский научно-исследовательский институт защиты животных (ныне федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных», ФГБУ «ВНИИЗЖ») был определен диагностическим центром по исследованию на бешенство. Данным приказом за Центром были закреплены функции контроля за эпизоотологической ситуацией и внесения предложений по совершенствованию методов диагностики, диагностических и профилактических препаратов, организации и проведению специфической профилактики заболевания у домашних животных и в дикой фауне. Дополнительную поддержку данное направление приобрело благодаря решению Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии Содружества Независимых Государств от 12 мая 2016 г., в котором ФГБУ «ВНИИЗЖ» было поручено подготовить проект «Комплекса совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.».

Для достижения стойкого благополучия по бешенству и снижения экономического ущерба, наносимого этим заболеванием, необходим комплексный подход, включающий разработку и адаптацию методов лабораторной диагностики и схемы их применения; оценку эффективности антирабической иммунизации; проведение масштабных молекулярно-биологических исследований в России и ряде стран, с которыми РФ граничит либо имеет активные экономические и

культурные отношения; изучение молекулярно-биологических и антигенных свойств вакцинных штаммов, применяемых для профилактики этого заболевания. Перечисленные задачи невозможно решить без активного международного сотрудничества, включающего обмен опытом, знаниями и проведение совместных научно-исследовательских работ.

Цель и задачи исследований. Целью исследований является совершенствование средств и методов диагностики, борьбы с бешенством животных и оптимизация их применения в ветеринарной практике.

Достижение поставленной цели предполагает решение следующих задач:

1. Разработать комплекс методов лабораторной диагностики на основе существующих адаптированных, усовершенствованных и вновь разработанных методов лабораторной диагностики бешенства и схему их применения.

2. Разработать и внедрить на территории РФ программу мониторинга бешенства, проанализировать результаты её реализации.

3. Разработать комплекс методов оценки эффективности применения антирабической вакцинации на основе использования усовершенствованных лабораторных методов, а также схему их применения.

4. Провести мониторинг эффективности вакцинации различных видов животных с применением инактивированных антирабических вакцин.

5. Разработать и внедрить на территории РФ систему межлабораторных сличительных испытаний по диагностике бешенства, проанализировать результаты проведения сличительных испытаний.

6. Изучить молекулярно-биологические, антигенные характеристики, филогенетические связи полевых изолятов вируса бешенства, а также молекулярную эпизоотологию бешенства на территории России и ряда зарубежных стран.

7. Изучить молекулярно-биологические, антигенные характеристики и происхождение на основе филогенетических связей вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых в России и за рубежом.

8. Реализовать программы международного сотрудничества в области

борьбы и профилактики бешенства, действующие между Россией и Финляндией, Россией и странами ЕС, а также Россией и Эфиопией.

9. Разработать комплекс мер по профилактике бешенства в России, а также в странах СНГ.

Научная новизна работы. В результате проведенных исследований на основе существующих, адаптированных, усовершенствованных и разработанных нами диагностических реакций предложен комплекс методов лабораторной диагностики бешенства и расширенная схема их применения, позволяющая исследовать патологический материал любого качества.

Впервые разработана и внедрена на территории РФ система межлабораторных сличительных испытаний по диагностике бешенства.

Разработана и внедрена на территории России программа активного мониторинга бешенства. Предложена схема применения лабораторных методов, позволяющих проводить оценку эффективности применения антирабической вакцинации.

Изучены молекулярно-биологические и антигенные характеристики полевых изолятов вируса бешенства, а также молекулярная эпизоотология бешенства на территории РФ, Камбоджи др. и стран Юго-Восточной Азии.

Изучены молекулярно-биологические и антигенные характеристики вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых в России и за рубежом, установлены их филогенетические связи.

Все полученные в рамках данной работы последовательности генома изолятов и вакцинных штаммов ВБ депонированы в международной базе данных GeneBank. Предложены подходы к разработке национальных и международных программ по борьбе и профилактике бешенства включая «Комплекс совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.».

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты обосновывают новые идеи и методические подходы к комплексному решению проблем диагностики, активного мониторинга, оценки эффективности

специфической профилактики бешенства, программно-целевого подхода к решению проблем по разработке комплекса средств и методов диагностики и борьбы с бешенством, позволяют глубже оценить ситуацию с бешенством в России и других регионах мира с позиций молекулярной эпизоотологии. Молекулярно-генетические характеристики изученных изолятов и штаммов вируса бешенства дополняют научные знания о их свойствах.

Практическая значимость выполненной работы заключается в том, что научные выводы и методические рекомендации можно использовать в практике ветеринарных лабораторий, оценке их деятельности, при разработке перспективных программ и планов по профилактике и борьбе с бешенством, мониторинга и оценке эффективности специфической профилактики заболевания.

На основе полученных результатов адаптированы, разработаны и внедрены в лабораторную практику современные методы лабораторной диагностики бешенства, подготовлены и утверждены:

- Методические указания по отбору и пересылке проб головного мозга, сывороток крови и костной ткани с целью диагностики бешенства животных и оценки эффективности оральных антирабических вакцин.
- Методические рекомендации для диагностики бешенства животных методом иммунофлуоресценции.
- Методические рекомендации по выделению вируса бешенства в культуре клеток нейробластомы мыши.
- Методические рекомендации по выявлению антигенов вируса бешенства в головном мозге животных в твердофазном прямом сэндвич-варианте иммуноферментного анализа.
- Методические рекомендации по выявлению фрагментов генома вируса бешенства в обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).
- Методические указания по выявлению генома вируса бешенства и дифференциации вакцинного штамма «РВ-97» от полевых изолятов с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
- Методические указания по разработке метода диагностики бешенства

животных в реакции агглютинации латекса.

- Методические указания по выявлению антигена вируса бешенства в ткани головного мозга животных иммуногистохимическим методом.

Внедрена система активного мониторинга бешенства на территории России с применением разработанного комплекса методов лабораторной диагностики бешенства, позволившая уточнить эпизоотологическую ситуацию по бешенству в ряде регионов РФ. Разработана схема оценки эффективности антирабической иммунизации диких и домашних видов животных в зависимости от вида и качества поступающего для проведения исследований биологического материала. По результатам проведенных исследований подготовлены и утверждены:

- Методические указания по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (FAVN).
- Методические указания по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови диких плотоядных животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (RFFIT).
- Методические указания по ускоренному определению антирабических вируснейтрализующих антител в сыворотках крови диких плотоядных животных в реакции микронейтрализации.
- Методические указания по определению антител к гликопротеину вируса бешенства в сыворотках крови животных в иммуноферментном анализе.
- Методические рекомендации по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в тканях зубов и костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин.

С применением разработанных методов проведен мониторинг эффективности антирабической вакцинации различных видов животных на территории РФ, иммунизированных инактивированными антирабическими вакцинами.

Впервые разработана, внедрена на территории РФ программа межлабораторных сличительных испытаний по диагностике бешенства,

позволившая установить реальный уровень подготовки специалистов ряда региональных ветеринарных лабораторий, а также реализовать корректирующие мероприятия по снижению количества диагностических ошибок.

Впервые изучены молекулярно-биологические и антигенные характеристики полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории ряда регионов России, а также вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых в России и за рубежом, их филогенетические связи. Установлены филогенетические связи изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Камбоджи и других стран Юго-Восточной Азии, имеющих с РФ активные туристические и торговые связи.

Разработаны и представлены к утверждению методические рекомендации по борьбе с бешенством, разработан и утвержден «Комплекс совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.».

Успешно реализованы программы международного сотрудничества в области борьбы и профилактики бешенства между Россией и рядом зарубежных стран (Финляндия, ЕС, Эфиопия), проанализированы их результаты. В результате проделанной работы сохранено благополучие по бешенству Финляндии и Республики Карелия, полностью искоренено бешенство на территории Калининградской области, на основе роллерного культивирования внедрена технология производства инактивированной антирабической вакцины в Эфиопии, проведены ее предварительные испытания.

Методология и методы исследований. Для проведения исследований использовались вирусологические, серологические, молекулярно-биологические, гистологические методы, а также филогенетический анализ, применялись различные способы культивирования культур клеток и вирусов, что нашло отражение в подготовленных и утвержденных методических указаниях и рекомендациях.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Комплекс методов лабораторной диагностики бешенства и схема их применения.
- Метод лабораторной диагностики бешенства на основе агглютинации латекса и рекомендации по его применению.
- Метод лабораторной диагностики бешенства на основе иммуногистохимического исследования и рекомендации по его применению.
- Прямой жидкофазный вариант реакции иммунофлуоресценции для диагностики бешенства с использованием консервированных формалином проб.
- Программа мониторинга бешенства на территории России и результаты ее применения.
- Комплекс методов оценки эффективности применения антирабической вакцинации и схема их применения.
- Результаты мониторинга эффективности антирабической вакцинации различных видов животных с применением инактивированных антирабических вакцин в России.
- Результаты разработки и внедрения на территории России системы межлабораторных сличительных испытаний по диагностике бешенства.
- Результаты изучения молекулярно-биологических и антигенных характеристики полевых изолятов вируса бешенства, а также молекулярной эпизоотологии бешенства на территории России.
- Результаты изучения молекулярно-биологических характеристик и филогенетических связей полевых изолятов вируса бешенства, выделенных на территории Камбоджи и государств Юго-Восточной Азии.
- Результаты изучения молекулярно-биологических и антигенных характеристик вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых в России и за рубежом.
- Комплекс мер по профилактике бешенства в России и странах СНГ и дорожная карта по его реализации.
- Результаты реализации программ международного сотрудничества в области

борьбы и профилактики бешенства, действующие между РФ, Финляндией и другими странами ЕС, а также Россией и Эфиопией.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты работы опубликованы в ведущих российских и международных изданиях с высоким импакт-фактором. По материалам диссертации были представлены доклады на заседаниях ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ», а также российских и зарубежных международных научно-практических конференциях:

- «Ветеринарные вакцины и диагностика», IV Международная конференция, Осло, Норвегия, 2006 г.;
- «К искоренению бешенства в Евразии», II Международная конференция, Париж, Франция, 2007 г.;
- «Бешенство на Американском континенте», XIX Международная конференция, Атланта, США, 2008 г.;
- «Наука и образование для целей биобезопасности», V Международная конференция, г. Пущино, 2008 г.;
- «Вакцины-2008», I Всемирный конгресс, г. Фошан, Китай, 2008 г.;
- XXIX Международный конгресс биологов-охотоведов, г. Москва 2009 г.;
- «Балтийский форум», Международная научно-практическая конференция, г. Санкт-Петербург, 2010 г.;
- «Бешенство на Американском Континенте», XXI Международная конференция, г. Гвадалахара, Мексика, 2010 г.;
- «Актуальные проблемы биологии» «Всероссийская научно-практическая конференция», г. Чебоксары, 2011 г.;
- «Основные направления совершенствования ветеринарных услуг в эпоху могущества и счастья», Международная научно-практическая конференция, г. Ашхабад, 2013 г.;
- «Живая природа и инфекционные болезни животных», Северо-балтийский семинар о роле диких животных как резервуаров и/или в распространении инфекционных болезней в прибрежных районах стран Балтии, г. Гданьск, Польша, 2013 г.;

- «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных», II Всероссийская научно-практическая конференция, Ставрополь, 2017 г.;
- Заседание Комиссии по экономическому взаимодействию государств – участников СНГ, г. Москва, 2018 г.;
- «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», Международная научно-практическая конференция, посвященная 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина, г. Казань, 2018 г.;
- «Единый мир – единое здоровье», VIII Международный ветеринарный конгресс, г. Москва, 2018 г.

Личный вклад соискателя. В ходе выполнения научно-исследовательских работ по теме диссертации автором самостоятельно проведен комплекс вирусологических, серологических, гистологических, молекулярно-биологических и филогенетических исследований, полевые исследования по применению антирабических биопрепаратов, анализ российской и зарубежной научной литературы и нормативной документации. Автор лично принимал участие в работе международных программ по сотрудничеству в области профилактики бешенства, начиная с этапов их планирования и заканчивая подведением итогов.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 445 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение, заключение. Список литературы включает 481 источников, в том числе 134 опубликованных в отечественных и 347 в зарубежных научных изданиях. Диссертационная работа иллюстрирована 59 таблицами, 77 рисунками и дополнена 25 приложениями.

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 65 научных работах, в том числе 16 – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, и в 9 изданиях, включенных в международные базы данных научного цитирования (Scopus, PubMed). По материалам диссертации подготовлены и утверждены 13 методических рекомендаций и указаний, комплекс мер по профилактике бешенства в России и государствах-участниках СНГ, получено 2 патента РФ.

Благодарность. Автор выражает глубокую благодарность коллективу референтной лаборатории по бешенству и BSE, лаборатории профилактики ящура, отдела координации научной информации, информационно-аналитического центра и образовательного отдела ФГБУ «ВНИИЗЖ», сотрудникам Финского агентства по безопасности продуктов питания Evira и Хельсинского университета (г. Хельсинки, Финляндия), Эфиопского института здоровья и питания (г. Аддис-Абеба, Эфиопия), Института Пастера в Камбодже (г. Пномпень, Камбоджа) за активное содействие в проведении научно-исследовательских работ и подготовке диссертации.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Общая характеристика заболевания

Бешенство (Rabies) – вирусное заболевание теплокровных млекопитающих животных и человека, характеризующееся поражением центральной нервной системы и практически неизбежной летальностью.

История бешенства уходит далеко в античные времена. Об этом свидетельствуют клинописные таблички, обнаруженные в Ираке в 1945 и 1947 годах и рассказывающие о законах Есшуна (Laws of Eshunna), одного из наиболее влиятельных городов в период с 1950 по 1850 г. до н.э., расположенных на территории современного Ирака. Таблички датируются 1930 г. до н.э. и содержат правила и рекомендации, касающиеся бешенства, подтверждая, что связь между укусами больных бешенством собак и заболеванием человека бешенством была известна более 4000 лет назад (Yuhong, 2001). Другим свидетельством являются так называемые заклинания собаки, происходящие из Вавилона (1900-1600 гг. до н.э.), в которых ясно излагается факт о том, что бешенство вызывает нечто, присутствующее в слюне больных собак (Yuhong, 2001; Abusch et al., 1999). Более поздние упоминания о заболевании изложены в работах Гиппократа (460-377 гг. до н.э.), Аристотеля (384-322 гг. до н.э.), а также Цельсия, Галена и многих других (King et al., 2004).

Первая антирабическая вакцина была разработана французским ученым Луи Пастером в 1885 г. (Pasteur, 1885). С тех пор рабиология существенно продвинулась вперед в разработке и совершенствовании методов диагностики и профилактики, а также мероприятий по борьбе с бешенством (King et al., 2004).

2.2 Экономический ущерб от бешенства

Величина экономического ущерба, причиняемого инфекционным заболеванием имеет большое значение при расстановке приоритетов в ветеринарии и медицине при распределении ограниченных ресурсов для профилактики и борьбы с заболеванием, оценки эффективности проведенных мероприятий (Murray et al., 2002). Концепция «Глобального ущерба от болезней (Global Burden of

Diseases, GBD)» была разработана в 1980 г. Всемирным банком и в дальнейшем адаптирована более чем к 130 различным заболеваниям и состояниям. Благодаря современным достижениям науки были разработаны стандартизированные показатели, такие как «годы жизни, скорректированные по нетрудоспособности» (disability-adjusted life year, DALY). Такие показатели стали широко применяться для оценки ущерба, наносимого заболеванием на региональном и глобальном уровнях и представляют собой важный инструмент для принятия решений соответствующими руководящими инстанциями (Murray and Lopez, 1996; Stein et al., 2007).

2.2.1 Методы оценки ущерба от бешенства

В связи с наличием факторов, определяющих существенный недоучет человеческих жертв от бешенства во многих странах мира, был разработан ряд методов оценки смертности, связанной с бешенством, на основе отчетности стран, эндемичных по бешенству собак. Предсказательный подход был разработан для определения вероятности возникновения клинического бешенства у человека после укуса собаки, подозреваемой в заболевании бешенством (WHO, 2013). Этот метод, изначально применявшийся для исчисления человеческих смертей от бешенства в Танзании (Cleaveland et al., 2002), позволил произвести переоценку ущерба от бешенства в Африке и Азии (Knobel et al., 2005), а после дополнительной адаптации использовался для оценки смертности от бешенства в Бутане (Tenzin et al., 2011) и Камбодже (Ly et al., 2009).

DALY включает в себя как преждевременную смертность, так и нетрудоспособность (Stein et al., 2007). Наиболее важным элементом при подсчете DALY для бешенства является преждевременная смерть (Knobel et al., 2005) из-за короткой продолжительности болезни нетрудоспособность занимает довольно небольшую долю в ущербе, причиняемом бешенством. Тем не менее нетрудоспособность может иметь место после применения вакцин. Известно, что вакцины, приготовленные из тканей нервной системы животных, вызывают тяжелые побочные эффекты, которые могут проявляться в течение 4-7 месяцев, в

зависимости от типа вакцины в 0,3-0,8 случаях на 1000 (Knobel et al., 2005; WHO, 2013). Обычно экономический ущерб от заболевания подсчитывается путем комбинации прямых и непрямых затрат. Для бешенства прямые затраты постэкспозиционной профилактики зависят от вакцины, режима и способа ее введения в организм, а также от типа используемого антирабического иммуноглобулина. Непрямые затраты включают стоимость посещения учреждения здравоохранения (или сопровождения жертвы укуса в клинику) и связанные с этим потери дохода. Масштаб таких затрат особенно важен при бешенстве, так как отсутствие постэкспозиционной профилактики напрямую связано с гибелью людей. Следующим экономическим компонентом является потеря продуктивности, которая подсчитывается путем оценки потерянных лет жизни валовым внутренним производством продукции страны используя 3%-ю ставку уценки. Стоимость профилактики, контроля и искоренения бешенства (включая надзорные мероприятия) среди животных-резервуаров бешенства и потери производства в животноводческом секторе также должны приниматься во внимание. Дополнительным компонентом ущерба при бешенстве является эмоциональное и психологическое воздействие, в особенности травма и длительный период неопределенности после укуса больным животным, когда постэкспозиционная профилактика ненадежна или недоступна.

2.2.2 Экономический ущерб от бешенства в разных странах

Бешенство собак было ликвидировано в Западной Европе, Канаде, США, Японии, Малайзии и в нескольких странах Латинской Америки, кроме того, Австралия свободна от бешенства плотоядных животных, а многие тихоокеанские островные государства всегда были свободны от этого заболевания. На этих территориях случаи смерти человека от бешенства включают заразившихся в странах, неблагополучных по бешенству собак. В Европе, Северной Америке и Японии регистрируется порядка двух «импортированных» случаев бешенства человека ежегодно (Gauret, Parola, 2012; Malerczyk et al., 2011). В период с 1990 по 2010 г. треть случаев была «импортирована» из Южной и Юго-Восточной Азии

(главным образом из Индии и Филиппин), столько же из Африки, почти 20% из Латинской Америки и стран Карибского бассейна и более 10% - из Восточной Европы и Центральной Азии.

Ущерб от бешенства составляет миллионы в долларовом эквиваленте. Так, в США на мероприятия, связанные с ликвидацией и профилактикой бешенства, тратится порядка 300 млн долларов в год. Во Франции в период с 1988 по 1993 г. только на программу по профилактической вакцинации домашних и оральную вакцинацию диких животных было потрачено 261 млн долларов США. В Германии в период с 1983 по 2008 г. на программу по оральной вакцинации было потрачено 122 млн долларов, а в Эстонии в период с 2005 по 2010 г. – 15,5 млн долларов (WHO, 2013).

По данным ВОЗ, глобальный мировой ущерб от бешенства составляет около 6 млрд долларов в год, в том числе около 2 млрд долларов ущерба от потери продуктивности и преждевременной смерти и 1,6 млрд долларов прямых затрат на постэкспозиционную профилактику (WHO, 2013).

2.3 Ситуация по бешенству в различных регионах мира

2.3.1 Распространение бешенства в мире

Географическое распределение бешенства в мире характеризуется как нозоареал глобального масштаба. Количество стран, в которых регистрируется бешенство, как и количество стран, свободных от заболевания, из года в год разнится, ситуация подвержена периодическим флуктуациям, в целом незначительным в рамках глобального нозоареала (Макаров с соавт., 2002).

Бешенство широко распространено по всему миру: поражены более двух третей всех стран. Половина населения Земли проживает на эндемичных по бешенству территориях. Более 80% случаев гибели людей от бешенства имеют место в сельских районах, где не проводится полноценная информационно-разъяснительная работа, а постэкспозиционная профилактика заболевания малодоступна либо отсутствует. По данным ВОЗ, для человека наибольший риск заразиться бешенством определен на Евразийском и Африканском континентах

(рис. 1). Именно на этих территориях регистрируется более 95% случаев бешенства, а контроль бешенства собак находится на самом низком уровне (Shwiff et al., 2013). Средний уровень риска определен для территорий ряда стран как в Евразии (Россия, Беларусь, Украина, ряд стран Восточной Европы), так и на Американском континенте (Мексика, Бразилия и др.).

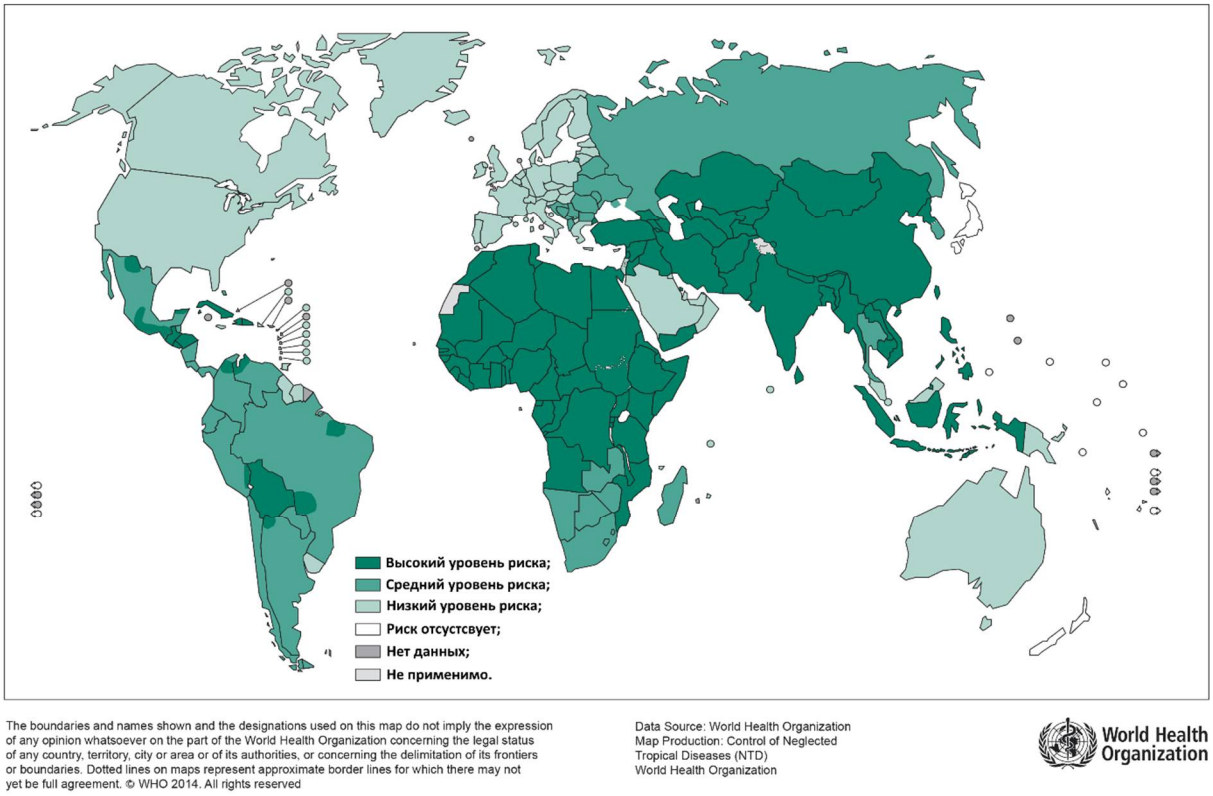
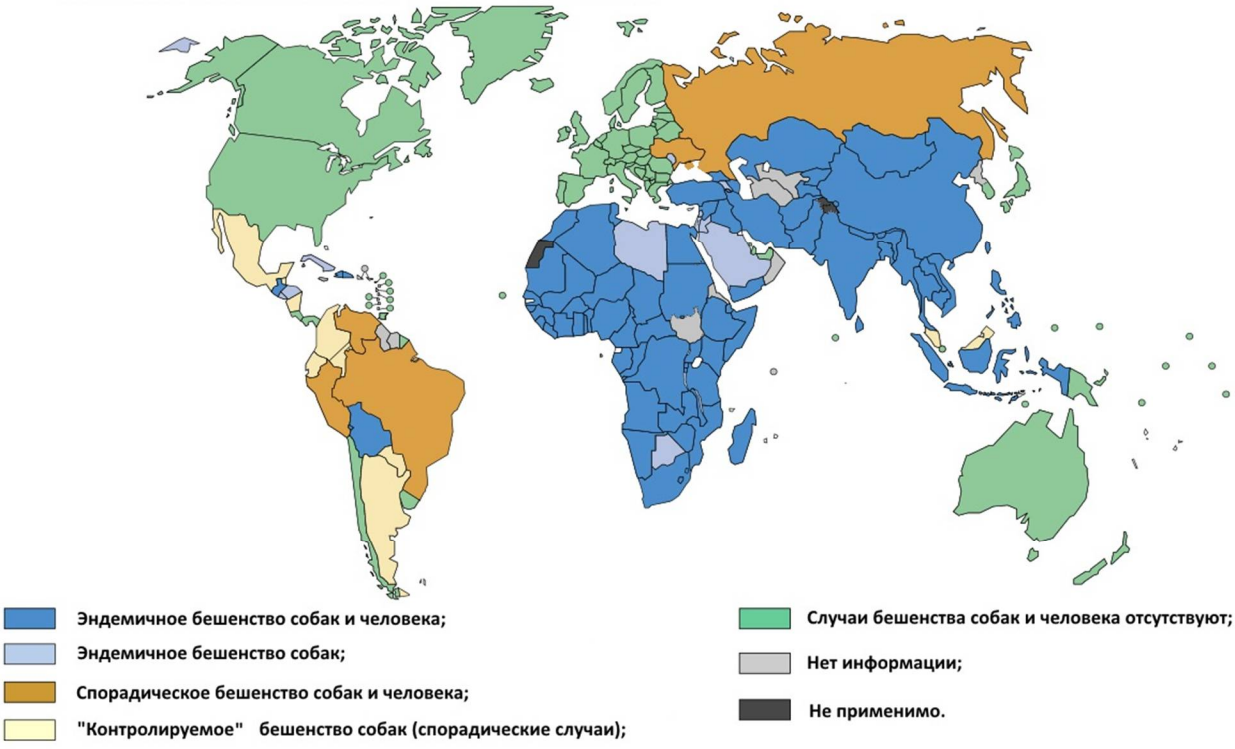


Рисунок 1 - Географическое распределение уровней риска заражения бешенством людей.

На территории большинства стран ЕС, а также Австралии, США, Канады и некоторых арабских государств риск заражения бешенством минимален. Полностью отсутствует риск заражения этим заболеванием только на территории островных государств, таких как Япония и Новая Зеландия.

По данным ВОЗ (рис. 2), бешенство собак и человека эндемично в большинстве азиатских и африканских стран, а также в ряде стран Латинской Америки. На территории РФ и большинства латиноамериканских стран отмечаются лишь спорадические случаи бешенства собак и вызванные контактами с больными бешенством собаками случаи бешенства человека.

В большинстве стран Европы бешенство собак и человека не регистрируется, при этом отмечаются случаи заболевания диких животных. Отсутствуют случаи бешенства собак и человека в Австралии и странах Северной Америки (США, Канада).



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.
© WHO 2017. All rights reserved – © OMS 2017. Tous droits réservés

Рисунок 2 - Распространение бешенства собак и случаев бешенства человека, обусловленных контактами с собаками.

По данным Института показателей и оценки состояния здоровья (the Institute for Health Metrics and Evaluation, IHME), в 2013 г. самый высокий уровень смертности от бешенства был отмечен в Мьянме, Чаде и Нигере, а также в ряде других слаборазвитых стран мира (рис. 3). В список стран с наиболее высоким уровнем смертности от бешенства входят развивающиеся страны Азии и Африки. Именно они вносят наибольший вклад в мировую инцидентность бешенства среди людей и являются поставщиками так называемых импортированных случаев бешенства в другие страны мира.

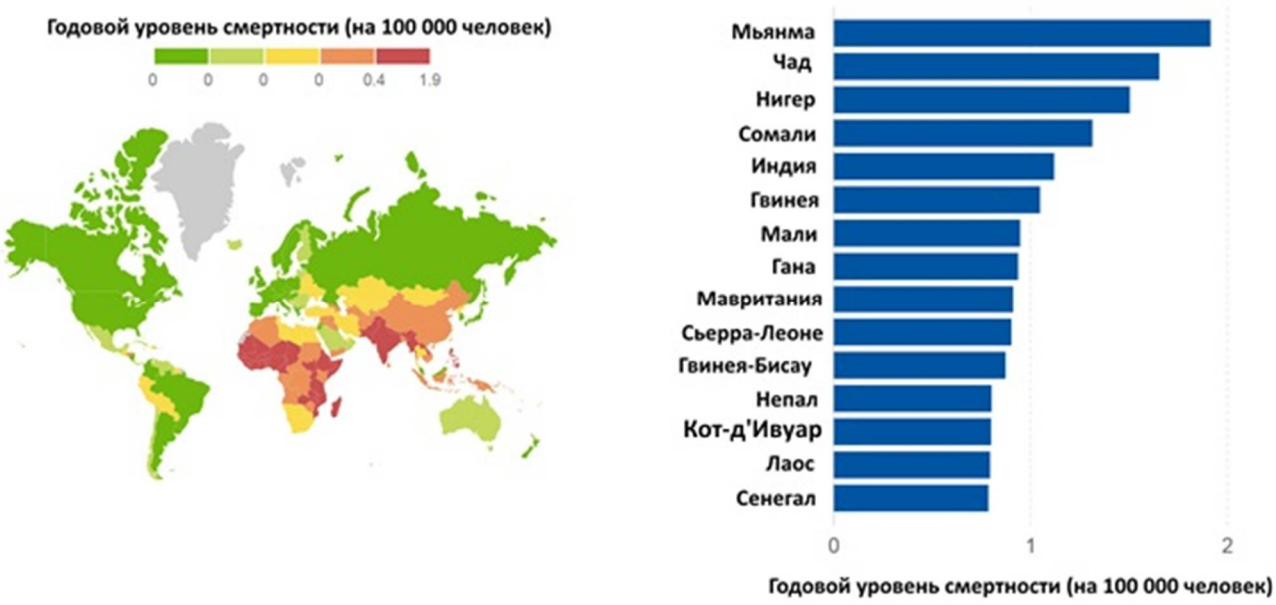


Рисунок 3 - Показатели годового уровня смертности от бешенства по странам.

Мировая статистика свидетельствует о том, что бешенством болеют чаще мужчины. Кроме того, заболевание чаще выявляется в детском/подростковом возрасте либо у пожилых людей (рис. 4).

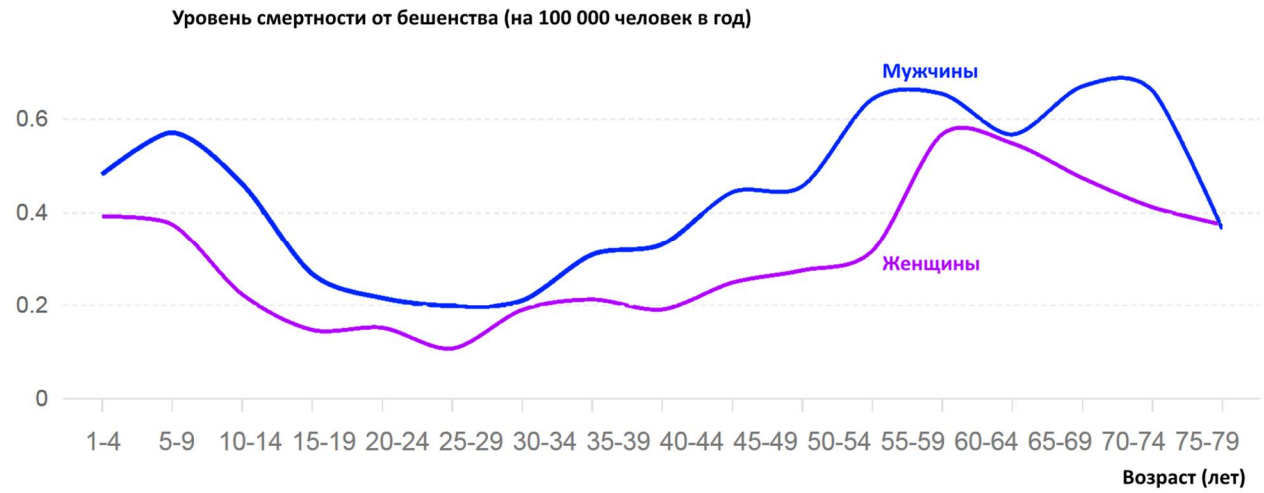


Рисунок 4 - Частота заболевания бешенством человека в зависимости от пола и возраста.

2.3.2 Бешенство в Европе

По данным Европейского бюллетеня по бешенству, большинство стран Западной Европы свободны от этого заболевания среди наземных млекопитающих. Страны Восточной Европы и европейская часть России продолжают оставаться

эндемичными по бешенству, выявляемому среди различных видов животных (рис. 5).

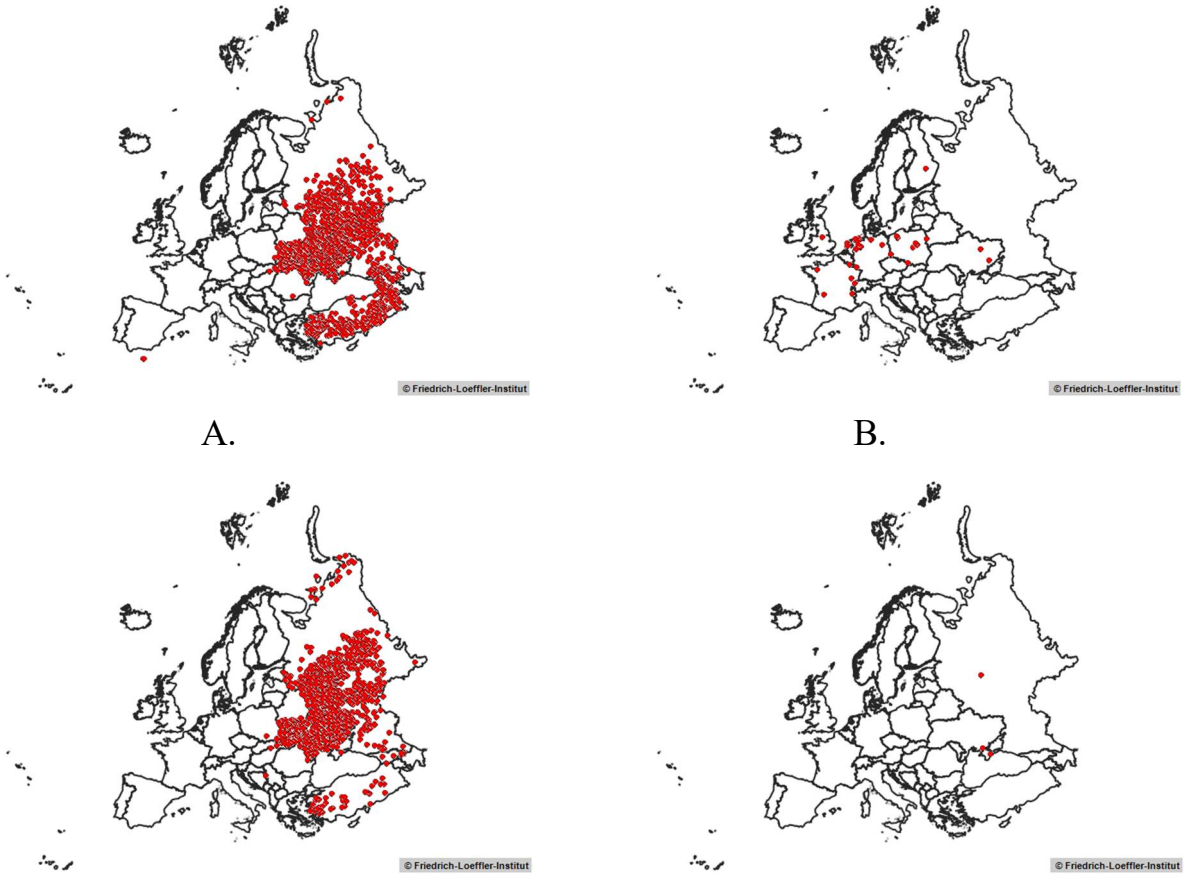


Рисунок 5 - Географическая локализация в Европе в 2017 г. A. Вспышки бешенства у домашних животных; B. вспышки бешенства у летучих мышей; C. вспышки бешенства у диких наземных млекопитающих; D. случаи бешенства у людей. Красными точками обозначена локализация вспышек/случаев бешенства.

Подробные данные о бешенстве в странах Европы за 2014-2016 гг. представлены в таблице 1. Наиболее неблагополучными по бешенству странами Европы являются Россия, Украина, Турция, Румыния, Молдавия и Белоруссия. В этих странах заболевание ежегодно регистрируется среди домашних и диких животных, что указывает на эндемичность инфекции на перечисленных территориях. В остальных странах, как правило, регистрируются спорадические случаи бешенства у наземных млекопитающих либо среди летучих мышей. Случаи бешенства человека за данный период кроме России отмечались только в Грузии и Испании в 2014 г.

Таблица 1 – Число случаев бешенства в Европе за 2014-2016 года

Показатель/ страна	2014 год					2015 год					2016 год				
	Домаш-ние	Дикие	Летуч. мыши	Чело-век	Всего	Домаш-ние	Дикие	Летуч. мыши	Чело-век	Всего	Домаш-ние	Дикие	Летуч. мыши	Чело-век	Всего
Беларусь	108	242	0	0	350	208	371	0	0	579	136	115	0	0	251
Бельгия	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Босния и Герцеговина	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Болгария	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Хорватия	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Чехия	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Финляндия	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Франция	0	0	3	0	3	2	0	5	0	7	0	0	6	0	6
Грузия	115	4	0	4	123	100	2	0	0	102	52	1	0	0	53
Германия	0	0	7	0	7	0	0	13	0	13	0	0	23	0	23
Греция	2	8	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Венгрия	2	21	0	0	23	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1
Литва	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0
Молдова	97	41	1	0	139	136	33	0	0	169	30	11	0	0	41
Норвегия	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Польша	16	82	7	0	105	18	75	4	0	97	3	13	6	0	22
Румыния	41	101	0	0	142	10	18	0	0	28	10	4	0	0	14
Россия*	899	951	0	2	1852	1815	1556	0	6	3377	888	886	0	5	1779
Сербия	0	3	0	0	3	0	3	0	0	3	0	4	0	0	4
Словакия	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0	0
Словения	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Испания	4	0	2	1	7	6	0	4	0	10	2	0	1	0	3
Нидерланды	0	0	3	0	3	0	0	5	0	5	0	0	9	0	9
Турция	624	95	0	0	719	495	68	0	0	563	367	52	0	0	419
Украина	615	469	2	0	1086	897	545	0	0	1442	875	475	3	0	1353
Великобритания	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	2	0	2
Итого:	**2524**	**2021**	**26**	**7**	**4578**	**3687**	**2678**	**35**	**6**	**6406**	**2363**	**1562**	**52**	**5**	**3982**

**Показаны случаи бешенства только в европейской части России.*

2.3.3 Бешенство в граничащих с РФ странах

Российская Федерация граничит с 16 странами, общая протяженность государственной границы, исключая границы на морях и океанах, превышает 23 115 км, в том числе: сухопутная граница составляет порядка 14 509 км; речная – 7 141 км; озерная – около 475 км; морская – приблизительно 990 км. Эпизоотологическая ситуация в сопредельных странах варьирует от длительного благополучия до эндемичности с регистрацией бешенства среди различных видов диких, сельскохозяйственных и домашних животных, а также среди летучих мышей.

Норвегия. На континентальной территории Норвегия благополучна по бешенству довольно длительное время, последний случай датируется приблизительно 1815 г. На островах архипелага Шпицберген периодически регистрируются вспышки бешенства среди диких животных. Так, весной 1980 г. бешенство было выявлено у 12 песцов, 3 северных оленей и одной кольчатой нерпы. С тех пор спорадические случаи бешенства выявлялись на островах в 1981 (2 песца), 1987 (2 песца и северный олень), 1990 (1 песец), 2011 (1 песец) и 2012 гг. (1 песец) (Westerling et al., 2004). Изучая вспышку бешенства, возникшую на островах в 1980 г., Johnson с соавт. предположили, что причиной заноса заболевания явилась миграция песцов с материковой территории России (Johnson et al., 2007). В 2015 г. у летучей мыши лиссавирус был выявлен EBLV-2. Филогенетические и эпизоотологические исследования показали, что вирус, скорее всего, циркулирует в популяции водяной ночницы (ночницы Добантона, *Myotis daubentonii*) (Modal et al., 2017).

Финляндия. С 1897 по 1935 г. случаи бешенства животных в Финляндии регистрировались ежегодно, особенно в районах юго-западной границы, главным образом у домашних, реже у диких животных (Holmberg, 1954). В 1940–1942 гг., во время Второй мировой войны, бешенство выявлялось у собак и КРС; в 1952–1954 гг. было выявлено 40 случаев бешенства у собак, 2 – у кошек и 1 – у лисицы, в 1956–1959 гг. бешенство выявили у 12 собак (Holmberg, 1954, 1981). Следующая вспышка бешенства в Финляндии возникла в 1998–1999 гг.

среди домашних и диких животных, главным образом енотовидных собак. С 1991 г. Финляндия благополучна по бешенству наземных млекопитающих. Однако, в 2003 г. у лошади, импортированной в Финляндию из Эстонии было выявлено бешенство (Nyberg et al., 1992; Sihvonen, 2003).

На территории Финляндии неоднократно выделяли лиссавирусы летучих мышей. Так, в 1985 г. у финского зоолога, работавшего с летучими мышами, был диагностирован энцефалит, ассоциированный с заражением лиссавирусом EBLV-2 (Roine et al., 1988). Позднее, в 2009 г., данный лиссавирус был обнаружен у водяной ночницы и оказался филогенетически близкородственен ранее выделенному изоляту (Jakava-Viljanen et al., 2010), а в октябре 2016 г. был обнаружен второй случай заболевания, вызванного EBLV-2, у водяной ночницы (Nokireki et al., 2017), а также предположительно новый генотип лиссавирусов у летучей мыши Брандта (Nokireki et al., 2018).

Эстония. По данным ежегодных отчетов Национальной ветеринарной лаборатории Эстонии, после второй мировой войны ежегодно регистрировалось от 300 до 500 случаев бешенства, главным образом у собак и кошек. После введения в 1951 г. обязательной вакцинации собак отмечалось резкое снижение числа случаев бешенства: в 1955 г. было выявлено 7 случаев, а в 1961 г. – только один. В период с 1961 по 1967 г. бешенство в этой стране не регистрировалось, однако в 1968 г. заболевание было выявлено у лисицы из юго-западной Эстонии. В 1970 г. бешенство было выявлено уже у 110 лисиц, 24 енотовидных собак, 10 других видов диких и домашних животных. С тех пор число случаев бешенства в стране варьировало с пиками каждые 3-5 лет, а изоляты принадлежали к арктическому антигенному варианту (Selimov et al., 1969).

К 2002 г. основным переносчиком бешенства в Эстонии стали енотовидные собаки (Niin et al., 2008). В 2005 г. на территории страны начали проводить широкомасштабную кампанию по оральной антирабической вакцинации, благодаря которой число случаев заболевания начало снижаться вплоть до полного исчезновения (Cliquet et al., 2012). По данным Европейского бюллетеня по бешенству, с 2012 г. заболевание в стране не выявлялось (рис. 6).

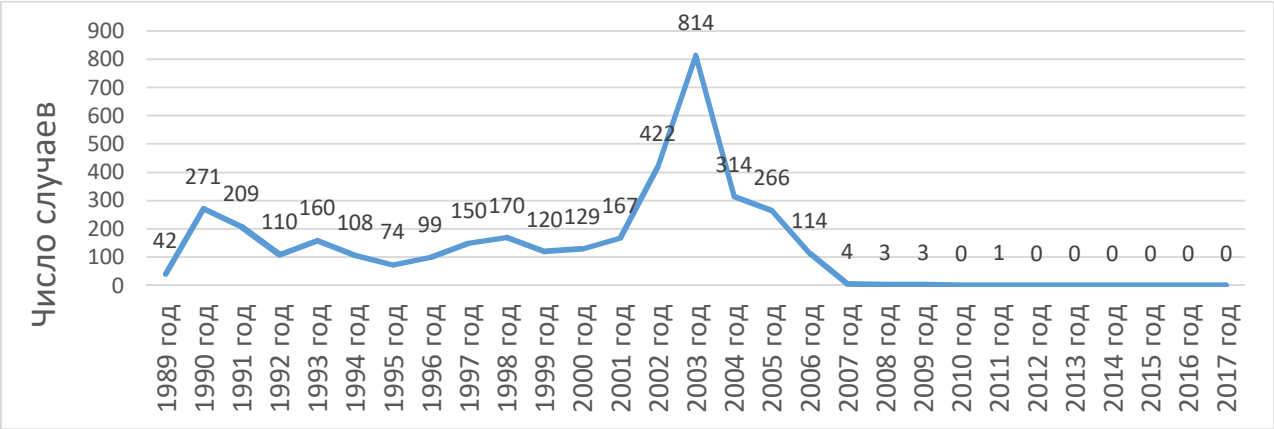


Рисунок 6 - Динамика изменения числа случаев бешенства в Эстонии за период с 1989 по 2017 г.

Латвия. Информация о наличии бешенства в Латвии датируется 1822 г. В газетах и журналах того времени описываются случаи смерти людей после покусов волками, лисицами и собаками. В соответствии с информацией, изложенной в отчетах провинциальных властей Латвии, в период с 1905 по 1913 г. только в районе Vidzeme было диагностировано 1738 случаев бешенства (Westerling et al., 2004). Известно о значительном росте числа случаев заболевания в стране в период между 1921 (96 случаев) и 1927 гг. (403 случаев), которое к 1939 г. снизилось до 68 случаев, при этом случаи бешенства среди собак регистрировались чаще (62,8%), чем среди других видов животных (Anonymous, 1939).

Первые после Второй мировой войны случаи бешенства в трех районах Восточной Латвии были выявлены в 1951 г. у лисиц и волков. С 1955 г. бешенство у диких животных регистрировалось ежегодно, однако, первый случай у енотовидной собаки был выявлен в 1958 г. Этот вид животных был завезен в Латвию из России с целью обогащения фауны в 1948 г. К 1961 г. бешенство в Латвии регистрировалось главным образом у диких животных. С 1960 по 1970 г. было выявлено 807 случаев бешенства животных, с 1971 по 1980 г. – 1054 случая, из которых около 65% - среди диких животных (Andersons, 1992). В период с 1981 по 1999 г. в стране было выявлено 4135 случаев бешенства животных. Заболевание регистрировалось до 2013 г.

Мероприятия по уменьшению численности популяций волков, лисиц и

енотовидных собак на 30-35% ежегодно не привели к значительному снижению числа случаев бешенства среди животных. В 1991 г. в стране была проведена первая кампания по оральной вакцинации диких животных, с 1998 г. вакцина применялась уже в рамках национальной программы по борьбе с бешенством в 14 районах Латвии, и только к 2003 г. вакцинацией была охвачена территория всей страны, используя ручной способ распространения вакцины. Первая же широкомасштабная вакцинация с применением авиации состоялась в 2005 г. В 2011-2012 гг. в стране регистрировались лишь единичные случаи бешенства, а с 2013 по 2017 г. случаев заболевания в Латвии выявлено не было (рис. 7).

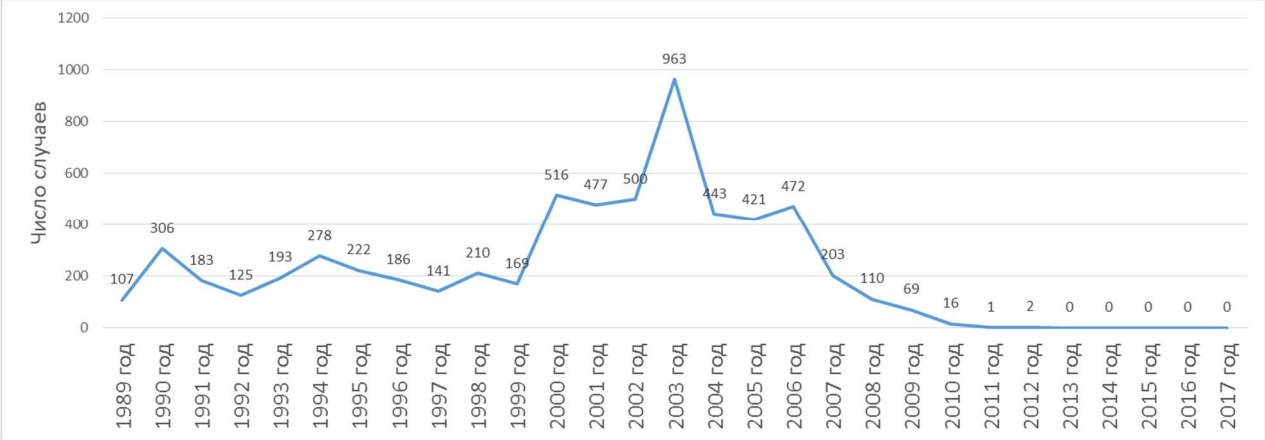


Рисунок 7 - Динамика изменения числа случаев бешенства в Латвии за период с 1989 по 2017 г.

Литва. Бешенство выявлялось в Литве с античных времен, но официальные сообщения об этих случаях поступали нерегулярно. Несмотря на то, что в период с 1919 по 1921 г. случаев бешенства животных в Литве диагностировано не было, очевидно, что заболевание в этот период в стране присутствовало, так как уже в 1922 г. было выявлено сразу 222 случая бешенства. В 40-е годы собаки и кошки чаще других видов животных заболевали бешенством. Так, в 1947 г. было выявлено 302 случая бешенства у собак и кошек, 15 – у КРС, 6 – у лошадей и 4 – у овец (Westerling et al., 2004). В 60-е годы в Литве было выявлено 1094 случая бешенства животных, в 70-е – 1333 случая, в 80-е – 1251. С 1995 г. начался рост числа случаев бешенства животных, которое достигло пика в 2006 г., когда было отмечено 2232 случая.

Оральная вакцинация в Литве была впервые применена в 1983 г.

Относительно масштабные кампании по оральной вакцинации диких животных в стране начали проводить лишь с 1995 г., а в национальном масштабе – с 2006 г. (Zienius et al., 2011). С 2013 г. в Литве регистрировались лишь единичные случаи, а с 2016 г. бешенство животных в стране не регистрировалось (рис. 8).

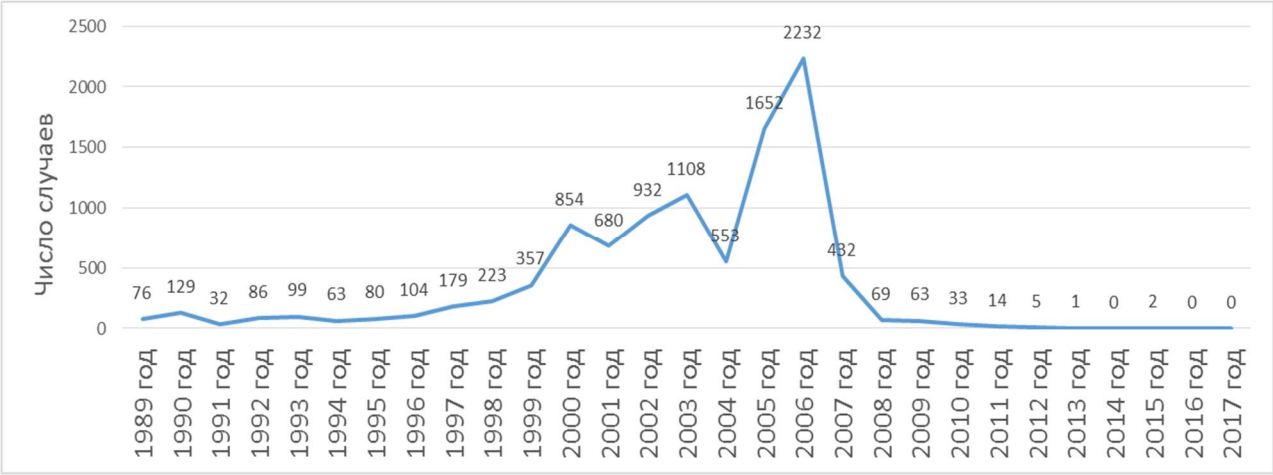


Рисунок 8 - Динамика изменения числа случаев бешенства в Литве за период с 1989 по 2017 г.

Польша. В начале 20-го века случаи бешенства в стране регистрировались только у домашних животных. Западные районы страны оставались практически свободными от заболевания, а наиболее частым источником заражения животных и людей были собаки. В период с 1919 по 1938 г. ежегодно регистрировалось порядка 5000 случаев бешенства животных и 622 случая бешенства человека. В 1922 г., когда 34 человека из 5801 покусанных погибли от бешенства, было уничтожено более 7000 собак, подозреваемых в заражении, а также около 4500 бездомных собак и кошек.

Обязательная вакцинация собак против бешенства стартовала в Польше в 1949 г. вследствие чего число случаев заболевания значительно уменьшилось – с 3749 до 264 в 1951 г. и до 65 в 1956 г. (Mol, 1971).

С конца 1980-х г. и до начала оральной антирабической вакцинации диких животных число случаев бешенства среди собак и кошек увеличилось: с 1989 по 1996 г. пало не менее 2271 голов. В настоящее время в стране регистрируются лишь единичные случаи бешенства, главным образом в восточных районах страны, граничащих с Украиной (рис. 9).

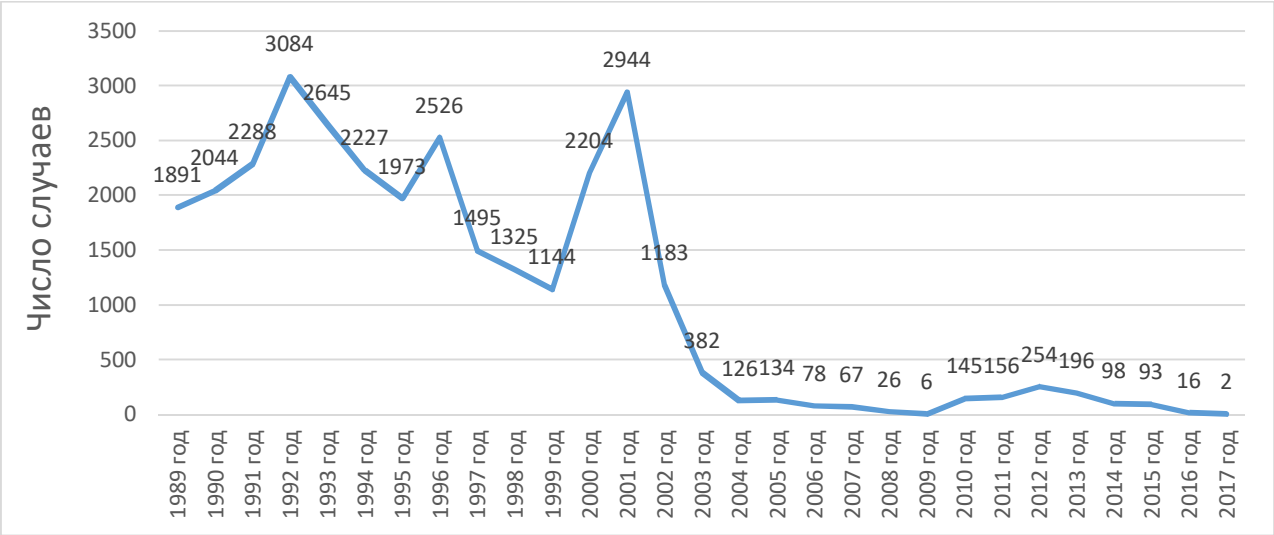
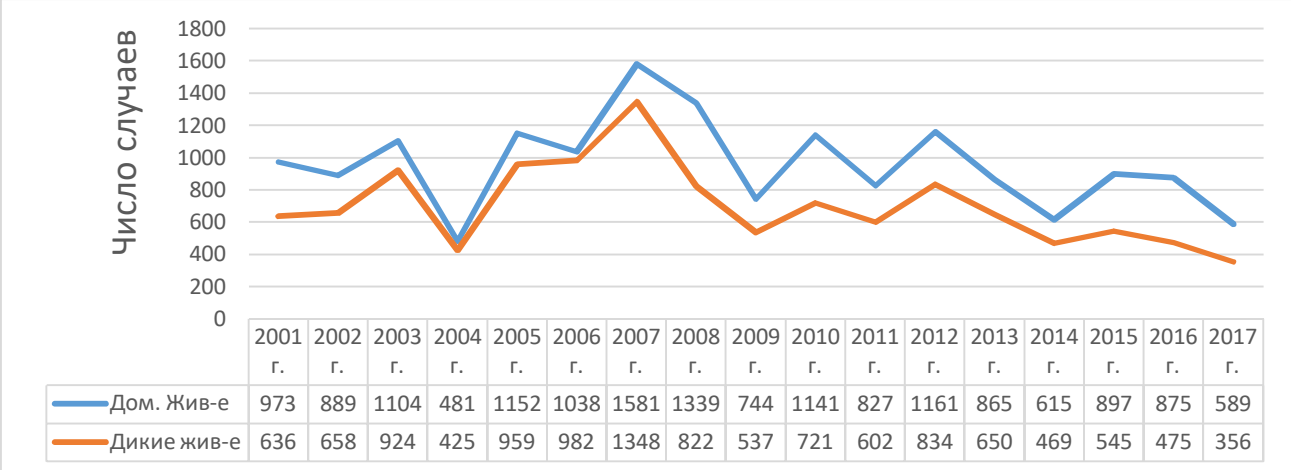


Рисунок 9 - Динамика изменения числа случаев бешенства в Польше за период с 1989 по 2017 г.

Украина. Очаги бешенства в Украине фиксируются в популяции лисиц, сельскохозяйственных и домашних животных, особенно кошек и собак. Напряженную эпизоотологическую ситуацию обуславливает рост числа вспышек заболевания среди лис и домашних животных (Недосеков с соавт., 2013). В стране регистрируется примерно одинаковое число случаев бешенства среди диких и домашних животных (рис. 10).



	2001 г.	2002 г.	2003 г.	2004 г.	2005 г.	2006 г.	2007 г.	2008 г.	2009 г.	2010 г.	2011 г.	2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015 г.	2016 г.	2017 г.
Дом. Жив-е	973	889	1104	481	1152	1038	1581	1339	744	1141	827	1161	865	615	897	875	589
Дикие жив-е	636	658	924	425	959	982	1348	822	537	721	602	834	650	469	545	475	356

Рисунок 10 - Динамика изменения числа случаев бешенства в Украине за период с 2001 по 2017 г.

Грузия. Информация о распространении бешенства в Грузии довольно скудна. Известно, что бешенство в стране регистрируется главным образом среди домашних животных, в то время как у диких животных выявляются лишь единичные случаи этого заболевания (рис. 11).

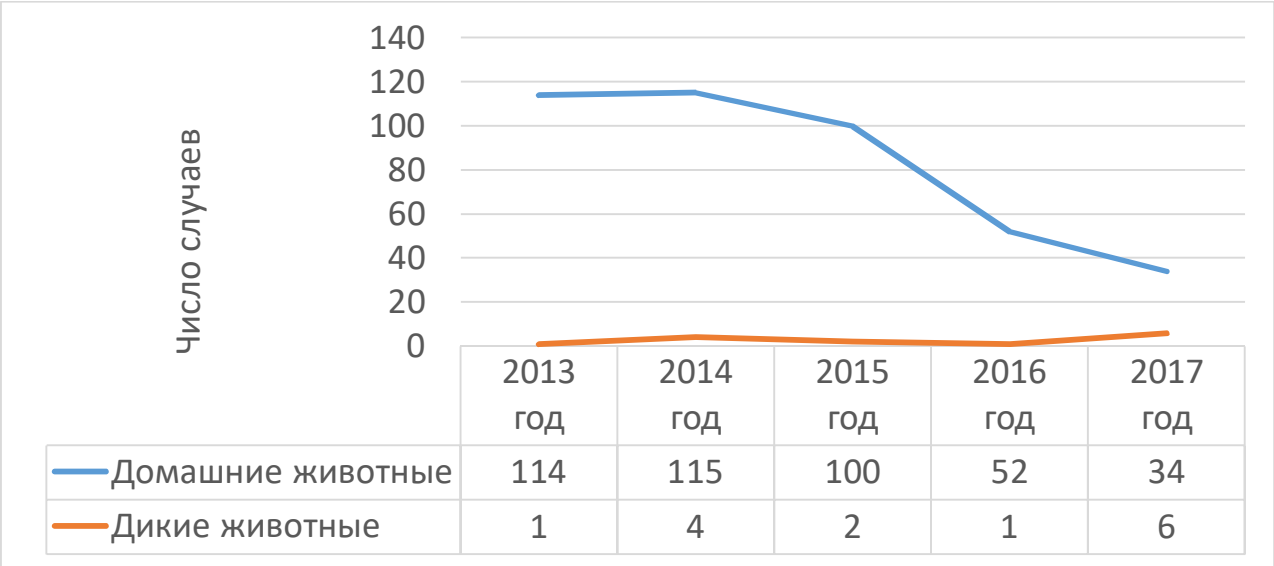


Рисунок 11 - Динамика изменения числа случаев бешенства в Грузии за период с 2013 по 2017 г.

Республика Абхазия. На территории Республики Абхазия эпизоотологическая обстановка по бешенству неблагополучна и имеет нестабильный характер в связи с широким ареалом дикой фауны, которая является средой обитания для таких видов животных, как шакал, волк, лисица. Этим обусловлены сменяющие друг друга периоды вспышек болезни и относительного благополучия. На протяжении 1998-2007 гг. было зарегистрировано 248 случаев заболевания бешенством среди животных, из них 47 случаев (18,5%) – в Гудаутском; 63 (24,8%) – в Гагрском; 39 (15,4%) – в Очамчирском; 44 (17,3%) – Гульрипшском; 1 случай (0,4%) – Ткуарчальском районах и 2 случая (0,8%) г. Гал.

В 2008 г. зарегистрировано 22 случая, из них 12 случаев в Очамчирском районе, по 2 случая в Гульрипшском, Сухумском и Гудаутском районах и городах. Сухум и Гал.

В 2009 г. за первое полугодие зарегистрировано и подтверждено лабораторными исследованиями: в Сухумском районе 5 случаев, в Гульрипшском – 3, в Гагрском, Очамчирском, Ткуарчальском районах по 2 случая бешенства. Мониторинг проводился среди диких животных. Из 7 отобранных проб две оказались положительными. Ежегодно в республике за медицинской помощью при укусах собак обращается до 1,5 тыс. человек,

регистрируются и смертельные случаи (Аншба с соавт., 2010). В 2012 г. в стране был зарегистрирован 21 случай лабораторно подтвержденного бешенства и 54 случая, диагностированные по клинической картине (Амичба с соавт., 2013). В первом полугодии 2016 г. в результате лабораторных исследований положительными на бешенство оказались две коровы, одна собака, одна кошка и одна голова МРС.

Азербайджан. В информационной системе WAHIS (МЭБ) данные по бешенству в Азербайджане доступны начиная с 2005 г. и заканчивая вторым полугодием 2014 г. Бешенство регистрировалось как среди диких, так и среди домашних, в том числе сельскохозяйственных, животных. Официальные данные свидетельствуют о том, что число случаев бешенства животных и людей, а также число покусов в стране увеличивается (Zeynalova et al., 2015).

Казахстан. По данным МЭБ, опубликованным в системе WAHIS, заболевание в стране присутствовало с 2005 по 2007 г. и с 2016 по 2017 г., однако количественные данные опубликованы только за первый квартал 2017 г., когда было зарегистрировано несколько случаев среди золотистых шакалов. Вместе с тем опубликованные материалы свидетельствуют о постоянной персистенции бешенства в стране. Так, Абдрахманов с соавт. (2017) указывает, что число случаев бешенства, регистрируемых у животных (лисица, енотовидная собака, волки, кошки и КРС), имеет тенденцию к росту в среднем на 7% в год. Ежегодно в республике от бешенства гибнет до 700 голов сельскохозяйственных животных и более 50% из них приходится на КРС, до 25% – на мелкий рогатый скот (Жолшоринов с соавт., 2004).

Анализ статистических данных за период с 2003 по 2012 г. среди диких, домашних плотоядных (собаки, кошки) и сельскохозяйственных животных показал, что случаи регистрации бешенства ежегодно чередуются скачками и спадами. При этом в последние три года, регистрация бешенства у с/х животных из года в год только возрастала: в 2009 – 17, 2010 – 58 и 2011 – 91 случаев, что в 5,4 раза больше, чем в 2009 г., в 2012 г. данный показатель составил 84. За этот период на территории Республики Казахстан наблюдается прямая

корреляционная связь между случаями регистрации бешенства среди домашних плотоядных (собаки, кошки) и сельскохозяйственных животных. В 2013 г. на территории республики было зарегистрировано 124 очага бешенства, наибольшее число неблагополучных пунктов зарегистрировано в Западно-Казахстанской (22), Восточно-Казахстанской (19), Жамбылской (18), Кустанайской (14) обл. Неблагополучие по бешенству отмечено в 12 из 14 областей республики. Исключение составляют Карагандинская и Мангистауская обл. (Абдрахманов с соавт., 2017). Наибольшая активность бешенства в 2013 г. проявлялась в феврале-мае; в 2014 г. – январе, феврале, декабре; в 2015 г. – январе-марте, что приходится на период гона у диких плотоядных животных, являющихся природными носителями вируса бешенства.

Монголия. В Монголии случаи бешенства среди людей и животных известны с давних пор и регистрируются по настоящее время. В дикой природе бешенство в этой стране циркулирует среди лисиц, волков, корсаков и манулов (Ботвинкин, Отгонбаатар., 2006). В период с 2005 по 2016 г. в Монголии бешенство регистрировалось на территории всей страны у различных видов животных. Известно, что уровень смертности от бешенства в Монголии в период с 1990 г. снизился на 72,2% и находится на уровне ниже среднего по Центральной Азии.

Китай. Бешенство широко распространено в Китае, регистрируется среди различных видов диких, сельскохозяйственных и домашних животных. Являясь высоко эндемичным заболеванием почти во всех провинциях Китая, оно вызвало более 5200 случаев бешенства у людей в период с 1987 по 1989 г. Число случаев бешенства значительно сократилось к 1990 г. и составило около 3500 и всего 2000 к 1995 г. Однако затем вновь возросло и составило 3300 случаев в 2007 г., в 2014 г. – менее тысячи. Установлено, что причиной возникновения бешенства среди людей в Китае является контакт с собаками, кошками, свиньями, КРС, хорьками и скунсами (Zhou et al., 2016). Собаки играют основную роль в распространении бешенства в Китае (Wang et al., 2014).

2.3.4 Бешенство в России

Эпизоотологическая обстановка по бешенству в РФ обострилась в последнее десятилетие XX в. и характеризуется как эмерджентная (Макаров с соавт., 2002).

В Российской Федерации бешенство регистрируется чаще среди диких плотоядных животных, которые являются основными переносчиками этого заболевания. Распределение очагов как по регионам РФ, так и по годам отличается выраженной неравномерностью (Пашкина, Сочнев, 2005). При этом истинный ареал болезни гораздо шире данных официальной статистики (Мовсесянц с соавт., 2012). Установлено, что в РФ наиболее активно в формировании эпизоотий бешенства участвуют дикие животные. На их долю приходится 50,2%; на долю домашних плотоядных соответственно 38,5%, в т.ч. на долю собак – 23,1% (Сочнев с соавт., 2017).

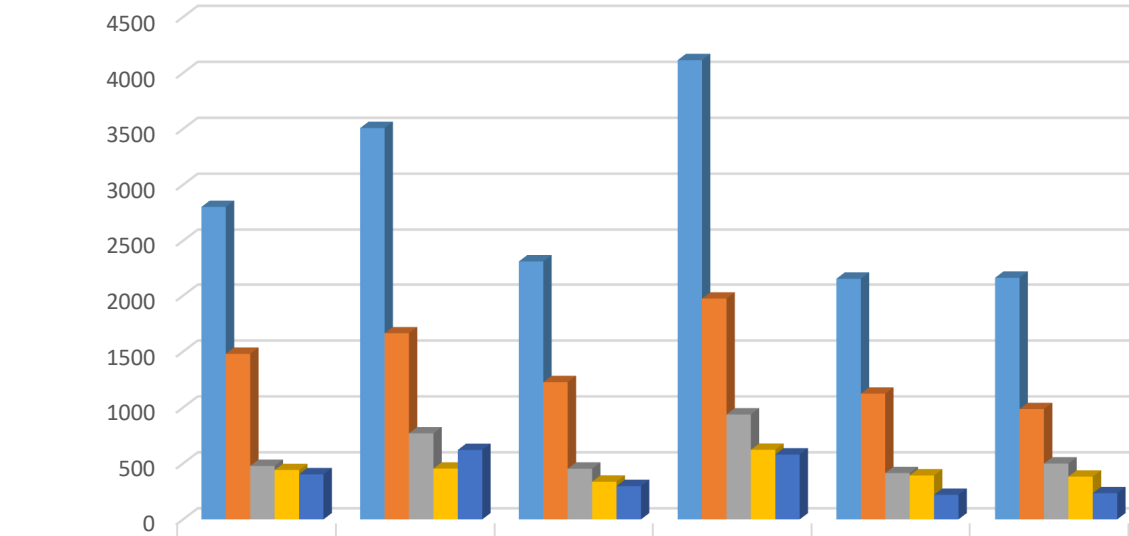
Количественный анализ ситуации показал, что экологическим хозяином вируса бешенства и преимущественным источником инфекции для субъектов антропургической принадлежности в Центральной России являются лисицы. В числе других видов диких животных в эпизоотические и эпидемические цепи вовлекаются енотовидные собаки (Макаров, Воробьев, 2004).

Эпизоотический процесс, как цепь закономерных передач возбудителя от зараженного животного интактным, при рабической инфекции имеет ряд особенностей, в том числе – передача возбудителя через укус, ослюнение (Саввин с соавт., 2005). Роль диких и синантропных грызунов в распространении бешенства, широко обсуждавшаяся ранее, в настоящее время не находит каких-либо достоверных подтверждений (Макаров с соавт., 2015). Выявление таких случаев является скорее исключением, чем правилом, часто вследствие постановки ложноположительных диагнозов.

География распространения бешенства животных на территории РФ в 2016 и 2017 гг. представлена на рисунке 12. По данным ФГБУ «Центр ветеринарии» в 2016 г. доля случаев выявления бешенства у диких животных составила 52%, в 2017 г. этот показатель превысил 45%.

Рисунок 12 - Карта распространения бешенства животных на территории РФ в 2016 и 2017 гг.

В большинстве случаев бешенство регистрируется у лисиц и енотовидных собак, реже у других видов диких животных, таких как барсук, волк, куница, песец, хорек. В первом квартале 2018 г. зарегистрирован 791 неблагополучный по бешенству пункт, где заболело 940 животных, в том числе 334 диких (35,5%), 446 домашних плотоядных (47,4%), 158 – с/х животных (16,8%). Наибольшее число неблагополучных пунктов за 3 месяца 2018 г. зарегистрировано в Липецкой обл. (101 н.п.) (рис. 13).



	2012 год	2013 год	2014 год	2015 год	2016 год	2017 год
Всего	2802	3507	2315	4114	2151	2160
Дикие	1480	1663	1227	1974	1124	986
Собаки	478	769	453	938	414	499
Кошки	441	454	337	622	393	382
Сельхоз. жив.	403	621	298	580	220	234

Рисунок 13 - Динамика изменения числа случаев бешенства животных в РФ в 2012-2017 г.

Случаи смерти людей от бешенства регистрируются ежегодно, как правило, среди лиц, не обратившихся после покуса за медицинской помощью. Остаются неясными редкие случаи смерти людей от бешенства в процессе и после полного курса специфического лечения (Мовсесянц с соавт., 2012). По данным Роспотребнадзора, ежегодно в РФ регистрируется более 360 тыс. случаев обращения людей за антирабической помощью после нападения животных, из них до 100 тыс. пострадавших – дети. В РФ за период с 1945 по 2015 г. между заболеваемостью бешенством людей и животных существует

достоверная коррелятивная связь (Макаров, 2017). Число случаев бешенства среди людей (по данным Роспотребнадзора) в РФ по годам представлено на рисунке 14.

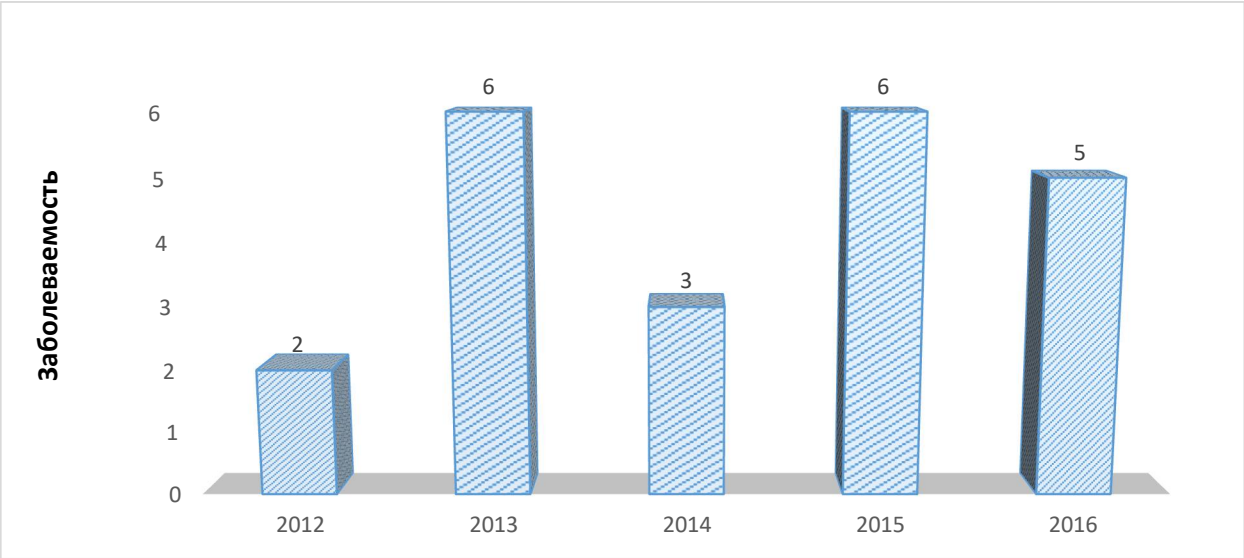


Рисунок 14 - Число случаев бешенства среди людей за 2012-2016 г.

Периодичность нарастания и спада эпизоотической напряженности в функционировании паразитарной системы бешенства в различных субъектах РФ не совпадают по времени (Авилов с соавт., 2004). Нарастание эпизоотического проявления этой инфекции, как правило, начинается в аутохтонных очагах среди обитателей дикой природы синхронно, но с некоторым запозданием происходит эпизоотическое «оживление» рабической инфекции в антропургических очагах – в популяции домашних плотоядных (собак) и среди КРС. Спад эпизоотической напряженности рабической инфекции в дикой природе немедленно отражается сокращением территориальных границ паразитарной системы рабической инфекции среди домашних животных (Авилов с соавт., 2004). Так, в условиях Поволжского экономического района за последние 30-50 лет сложились экологические природно-климатические и хозяйственно-технологические предпосылки для формирования и функционирования паразитарной системы рабической инфекции. Бешенство на территории Поволжского экономического района функционирует как полигостальная экологическая паразитарная система (вирус

бешенства + облигатные и факультативные хозяева) с четко контролируемыми территориальными, временными и популяционными границами (Авилов с соавт., 2004).

Основным фактором, активизирующим функционирование паразитарной системы рабической инфекции, является плотность популяции красной лисицы. Превышение плотности популяции свыше 0,8–1,0 особи на 1 км^2 часто сопровождается усилением напряженности эпизоотического процесса бешенства и возникновением аутохтонных очагов (Авилов с соавт., 2004). Деятельность человека при этом также играет определенное значение. Так, установлено, что в условиях Нижегородской и Волгоградской областей вырубка больших лесных массивов, зарастание бросовых земель «островными» лесами и перелесками оказали существенное влияние на формирование ареала и увеличение плотности популяции лисицы, которая практически не встречается в глубине лесных массивов, и особенно таежных лесах (Сочнев с соавт., 2015).

Основными факторами развития бешенства в дикой природе остаются: численность красной лисицы, наличие кормовой базы для ее популяции и ареал (лесостепная зона). Установлено, что целенаправленная иммунизация диких плотоядных против бешенства в ряде регионов является сдерживающим фактором развития эпизоотии бешенства (Саввин с соавт., 2005). При этом истребление волков – естественных врагов лисиц способствовало увеличению плотности их популяции. Расселение лисиц в регионах лесостепной зоны также могло произойти из-за снижения промыслового интереса на их охоту (Сочнев с соавт., 2015).

2.3.5 Бешенство в Азии

Бешенство регистрируется на территории большинства стран Юго-Восточной Азии, в подавляющем большинстве случаев – среди собак, но доступная информация по данному вопросу довольно ограничена. Например, в системе WAHIS отсутствуют данные по числу вспышек и числу случаев бешенства в Камбодже, Лаосе (указано лишь, что заболевание регистрируют на

территории страны), Тиморе-Лешти. По Индонезии присутствуют цифровые данные лишь за вторую половину 2013 г. Бешенство официально не регистрировалось на территориях Брунея, Малайзии и Сингапура.

В дополнение к данным МЭБ известно, что в Мьянме число случаев бешенства человека в год составляет не менее 1000, а в Таиланде – менее 25 (Gongal, Wright, 2011).

Достоверные сведения по бешенству в Камбодже изложены исключительно в отчетах Института Пастера в Камбодже, а также в ряде научных публикаций сотрудников этой организации. Рутинная диагностика бешенства в Камбодже стартовала в 1998 г., в то время как первые лабораторно подтвержденные случаи бешенства собак в этой стране были зарегистрированы в 1970-х (Reynes et al., 1999). Во второй половине 70-х гг. прошлого века собаки, наиболее значимый переносчик бешенства в Азии (Dodet et al., 2001), практически исчезли с территории Камбоджи по причине голода. Позднее они восстановили свою популяцию и вновь стали представлять опасность в плане распространения бешенства.

С середины 80-х гг. количество пациентов, обращавшихся за медицинской помощью по причине покусов собаками, составляло как минимум 4000 в год, число же зарегистрированных смертей от бешенства было очень низким, отчасти по причине появления более доступной постэкспозиционной профилактики, а также по причине того, что о смерти людей в домашних условиях обычно никуда не сообщалось.

С 1982 по 1991 г. было зарегистрировано в общей сложности 5437 покусов животными и 51 случай смерти людей от бешенства (WHO/Rab. Res./93.44). С 1994 г. бешенство в Камбодже перестало быть заболеванием, подлежащим обязательной нотификации.

В настоящее время бешенство в Камбодже распространено повсеместно. В период с 1998 по 2007 г. 124 749 пациентов обратились за постэкспозиционной профилактикой бешенства, кроме того, было отмечено 63 смертельных случая (у людей) вследствие покуса больными бешенством

собаками. Также в этот период было лабораторно подтверждено бешенство у 610 животных, главным образом у собак (Ly et al., 2009).

На начало этого века популяция собак в Камбодже оценивалась в 1 млн особей, при этом ее плотность тесно связана с количеством и доступностью еды: в это время повысились благосостояние и уровень жизни населения, поэтому больше пищевых отходов стали попадать в отбросы (Touch, 2001).

Ly et al. используя математическую модель, предсказали, что в 2007 г. в Камбодже имело место не менее 810 случаев бешенства человека (рис. 15) (Ly et al., 2009; Institut Pasteur du Cambodge Annual report, 2012, 2013; Virology Unit Public Health and Training Activities Report, 2014).

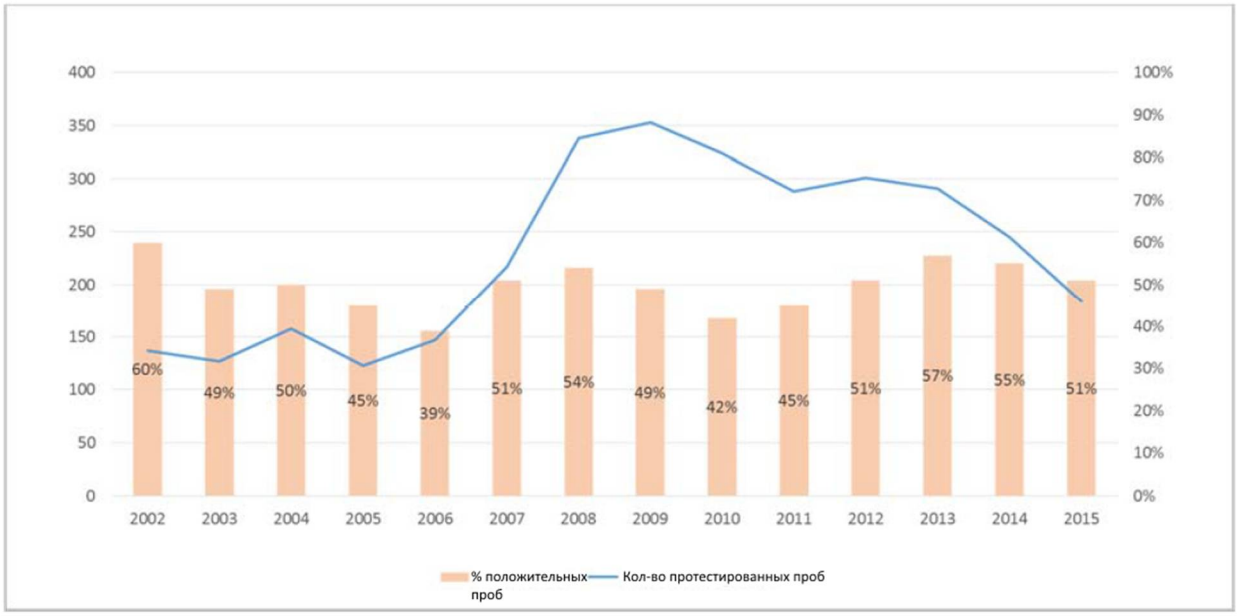


Рисунок 15 - Динамика изменения количества лабораторно подтвержденных случаев бешенства у собак в Камбодже по годам.

В настоящее время, по некоторым оценкам, популяция собак превышает 5 млн животных. Общая пропорция риска (общее число покусов собаками/общая численность населения) в стране составляет 5,6%, что примерно равно 1120 покусам собак на 100 000 человек (Lunney et al., 2012). Другие виды животных, такие как мангусты, летучие мыши и др. попадали под подозрение в плане переноса бешенства (Dodet et al., 2001; Touch, 2001). Reynes et al. обнаружил серологические доказательства наличия лиссавирусной

инфекции у летучих мышей, однако живой вирус бешенства либо фрагменты его генома при этом выделить не удалось (Reynes et al., 2004).

К настоящему времени проведен ряд молекулярно-эпидемиологических исследований бешенства в Азии (Bourhy et al., 2008), в том числе во Вьетнаме (Nguyen et al., 2011; Yamagata et al., 2007), Таиланде (Ito et al., 1999) и Лаосе (Ahmed et al., 2015). Однако целостной картины филогенетического родства циркулирующих на этой территории изолятов вируса бешенства на основе опубликованных данных сформировать не удалось.

2.4 Характеристика вируса бешенства

2.4.1 Таксономические характеристики

Вирус бешенства относится к порядку *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae,* которое в настоящее время включает 11 родов, в том числе один не обозначенный (рис. 16).

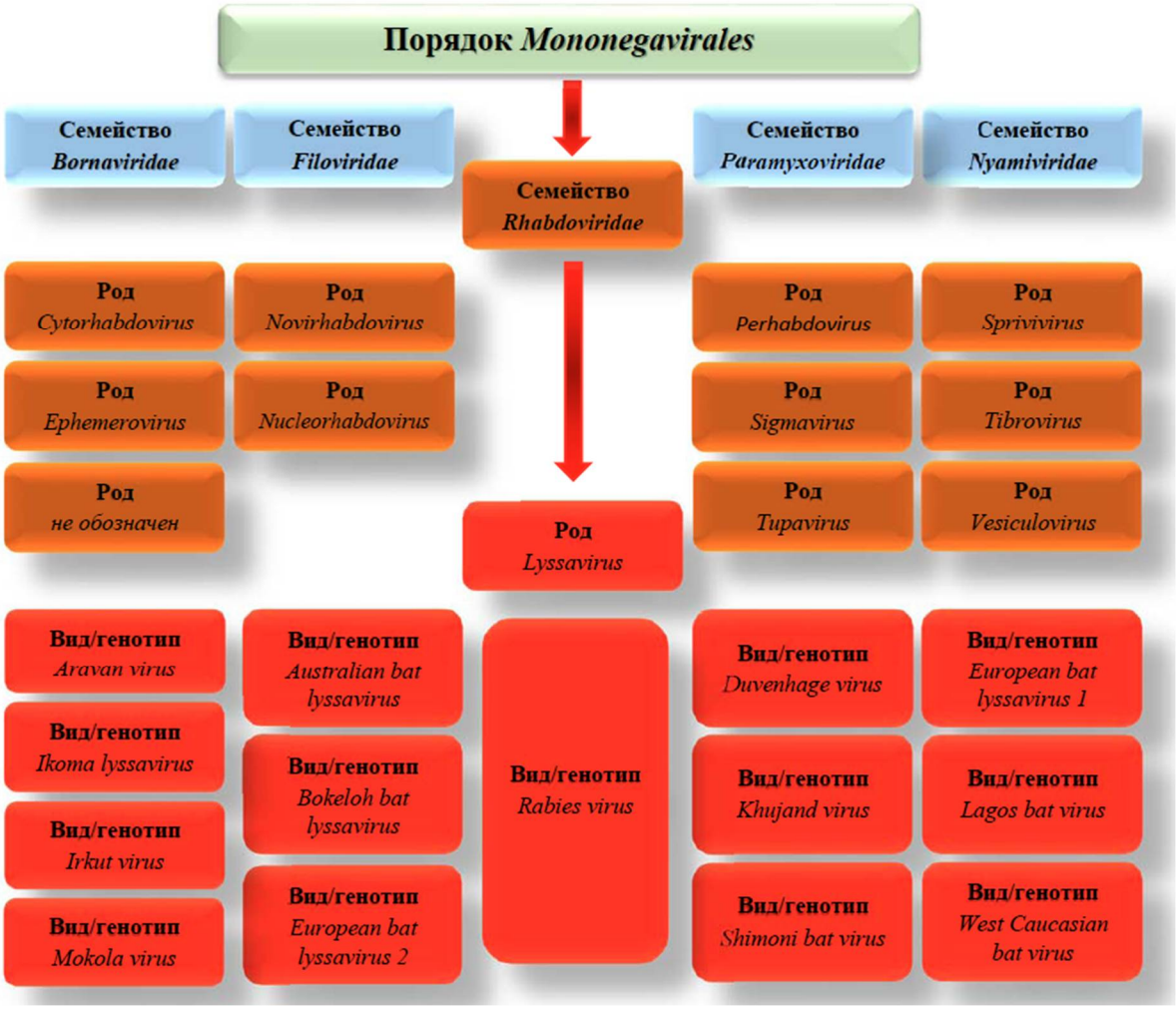


Рисунок 16 - Современная таксономия порядка *Mononegavirales*.

Род *Lyssavirus* включает классический вирус бешенства, распространенный среди различных видов млекопитающих по всему миру и 13 родственных видов/генотипов, из которых только 2 не были выделены от летучих мышей.

Упомянутые генотипы разделены на 4 филогенетические группы (Fooks et al., 2014; Malerczyk et al., 2014). Первая филогенетическая группа включает классический вирус бешенства (RABV), Дувенхаж вирус (*Duvenhage virus*, DUVV), Европейские лиссавирусы первого и второго типа (EBLV-1 и EBVL-2), Австралийский лиссавирус летучих мышей (ABVL) и Бакелох лиссавирус летучих мышей (*Bokeloh bat lyssavirus*, BBLV), а также вирус Араван (*Aravan virus*, ARAV), вирус Кхуянд (*Khujand virus*, KHUV) и вирус Иркут (*Irkut virus*, IRKV).

Вторая филогруппа включает вирус летучих мышей Лагос (*Lagos bat virus*, LBV), вирус Мокола (*Mokola virus*, MOKV) и вирус летучих мышей Шимони (*Shimoni bat virus*, SHIBV). Западно-Кавказский вирус летучих мышей (*West Caucasian bat virus*, WCBV) формирует третью филогенетическую группу, а лиссавирус Икома (*Ikoma lyssavirus*, IKOV) – четвертую филогенетическую группу. Существует предположение, что недавно обнаруженный у летучих мышей в Испании вирус Лейда (*Lleida bat lyssavirus*, LLBV) также принадлежит к четвертой филогенетической группе (Aréchiga Ceballos et al., 2013).

Потенциально новый член рода *Lyssavirus*, обозначенный как *Kotalahti bat lyssavirus* (*Myotis brandtii*), был недавно выделен от летучей мыши Брандта в Финляндии (Nokireki et al., 2018). Следует отметить, что рукокрылые являются первичным или единственным паразитосистемным хозяином и природно-очаговым резервуаром всех описываемых выше лиссавирусов, кроме вируса Мокола (Макаров с соавт., 2015; Макаров, Лозовой, 2016).

2.4.2 Морфология вириона

Вирион вируса бешенства имеет пулевидную форму диаметром около 75 нм и длиной 100-300 нм (Tordo et al., 1988). В состав вируса входит

одноцепочечная негативная спиральная РНК длиной приблизительно 12000 н.о. и 5 вирусных белков (рис. 17, Schnell et al., 2010).

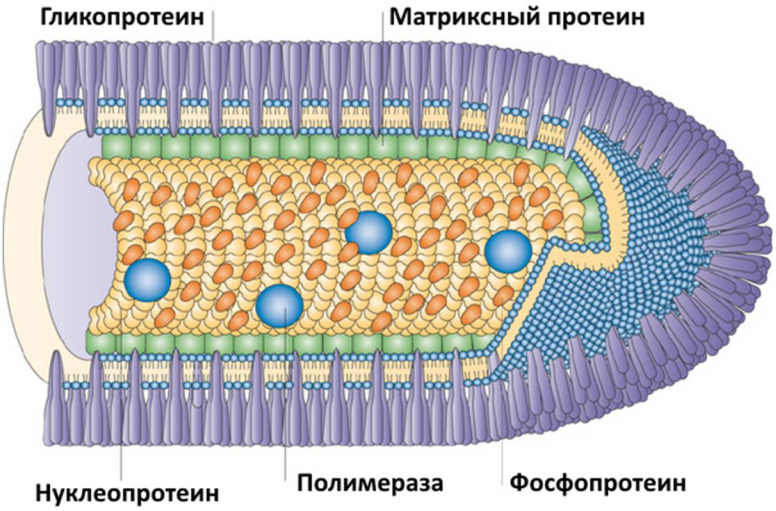


Рисунок 17 - Структура вириона вируса бешенства.

РНК вируса бешенства кодирует 5 белков: нуклеопротеин (N-белок), фосфопротеин (P-белок), матриксный протеин (M-белок), гликопротеин (G-белок) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (L-белок) (рис. 18).

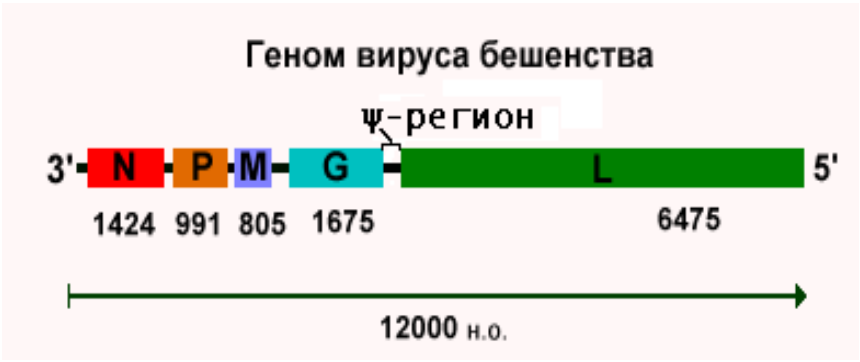


Рисунок 18 - Структура генома вируса бешенства.

Рибонуклеопротеин содержит геномную РНК, упакованную нуклеопротеином и тесно связанную с фосфопротеином и полимеразой. Указанные белки и связанная с ними РНК образуют активный РНК-комплекс, который контролирует процессы транскрипции и репликации (Iseni et al., 1998).

N-белок – длинный фосфорилированный полипептид, состоящий из 450 аминокислот. Он «упаковывает» геномную РНК, формируя спиральный

нуклеокапсид (Iseni et al., 1998), и выполняет функцию защиты РНК от действия рибонуклеаз во время морфогенеза (Albertini et al., 2006). В зрелом вирионе N-белок является основным компонентом внутреннего спирального нуклеокапсида и выполняет функции защиты генома. Он также вовлечен в процессы регулирования вирусной транскрипции и репликации (Albertini et al., 2011). Было показано, что пептид, расположенный около COOH- конца в позиции 298-352 (высоко-консервативная часть нуклеопротеина представителей семейства *Rhabdoviridae*), напрямую связан с вирусной РНК (Kouznetzoff et al., 1998). Отсутствие фосфорилирования нуклеопротеина существенно замедляет процессы транскрипции и репликации (Wu et al., 2002).

Антигенная структура нуклеопротеина вируса бешенства изучалась с использованием моноклональных антител (Lafon et al., 1985). Нуклеопротеин содержит как минимум четыре топографически независимых от других вирусных белков, но частично перекрывающихся между собой антигенных и иммунодоминантных сайтов (Minamoto et al., 1994). Антигенный сайт I расположен в позиции 358-367 и частично перекрывается с антигенным сайтом IV, который картирован в позициях 359-366 и 375-383 (Goto et al., 2000). Один из иммунодоминантных сайтов картирован в позиции 404-418 аминокислот нуклеопротеина (Dietzschold et al., 1987). Существование антигенных сайтов нуклеопротеина II и III установлено только с использованием моноклональных антител (Minamoto et al., 1994), считается, что антигенный сайт III расположен в позиции аминокислот 313-337 (Tordo, 1996).

P-белок – фосфорилированный вирусный белок, состоящий из 297 аминокислот, существует в двух формах с различной степенью фосфорилирования, принимает участие в процессах транскрипции и репликации вирусной РНК. Непосредственно взаимодействует с L-белком, функционируя в качестве кофактора в процессе полимеризации РНК. Он также тесно взаимодействует с N-белком, поддерживая правильную инкапсидацию РНК (Chenik et al., 1994, 1998; Jacob et al., 2001).

P-ген вируса бешенства также кодирует не менее 4 белков, которые

присутствуют в инфицированной клетке. Считается, что данные белки играют определенную роль при патогенезе бешенства на клеточном уровне, так как являются антагонистами интерферона (Chenik et al., 1995; Brzózka et al., 2006).

Наличие антигенных сайтов фосфопротеина изучали с использованием панелей моноклональных антител (Lafon et al., 1985). Два антигенных сайта были обнаружены в позиции 75-90 (Tordo, 1996). Домен в позиции 83-172 P-белка содержит главные антигенные детерминанты (Raux et al., 1997). Иммунодоминантный сайт фосфопротеина картирован в позиции 191-206 (Larson et al., 1991). Установлено, что этот сайт является антагонистом ά- и β-интерферона (Brozka et al., 2005).

Взаимодействие с другими белками обеспечивают специфические сайты фосфопротеина. Так, за связь с нуклеопротеином отвечают два сайта, локализованные между аминокислотами 69-177 и 268-297 (Chenik et al., 1994), в то время как сайт связывания с полимеразой расположен в районе первых 19 аминокислотных остатков фосфопротеина (Chenik et al., 1998). При этом комплексы с нуклеопротеином могут существовать во множестве конфигураций (Prehaud et al., 1992).

M-белок – полипептид, состоящий из 202 аминокислот, который расположен между двойным липидным слоем и спиралью рибонуклеопротеина (РНП). Его функцией является стягивание звеньев РНП в цилиндр со спиральной симметрией. М-белок обладает высокой гидрофобностью и принимает участие в заключительной стадии морфогенеза вируса в зараженной клетке. Именно этот белок отвечает за формирование пулевидной формы вириона вируса бешенства, он также связан с гликопротеином вируса (Mebatsion et al., 1999) и играет ключевую роль в процессе сборки и отпочкования (высвобождения) вириона (Harty et al., 1999; Finke et al., 2010), регулирует баланс синтеза вирусной РНК путем изменения активности синтеза в процессе транскрипции и репликации (Finke et al., 2003). Установлена важность наличия аргинина (для штаммов группы SAD) в позиции 58 аминокислотной последовательности матриксного протеина для регуляции синтеза вирусной

РНК. Finke и Conzelmann показали, что у рекомбинантного вируса, имеющего замену в позиции 58 аргинина на глицин, матриксный протеин теряет способность подавлять транскрипцию и стимулировать репликацию, в результате чего было выявлено увеличение уровня транскрипции в более чем 15 раз, что не повлияло на эффективность сборки и высвобождения вирионов (Finke и Conzelmann, 2003). Тем не менее при полном отсутствии матриксного протеина сборка и высвобождение вирионов оказываются сильно подавленными (Mebatsion et al., 1999). Матриксный протеин имеет вспомогательную функцию в манипуляциях клетками хозяина и адаптации к специфическому хозяину. Этот протеин выявлялся в ядрах инфицированных нейронов и тельцах Бабеша-Негри (Pollin et al., 2013). Nadin-Davis et al. установили, что М-ген и кодируемый им протеин намного более консервативен, чем Р-ген и фосфопротеин (Nadin-Davis et al., 1997).

С помощью моноклональных антител установлено, что основные антигенные детерминанты М-белка расположены в позициях 1-72 и 50-171 (Hiramatsu et al., 1992).

G-белок состоит из ≈524 аминокислот, содержит два гидрофобных сегмента, формирует около 400 треугольных выступов. Считается, что эктодомен G-белка играет ведущую роль в патогенезе бешенства, в том числе при адгезии вирионов к мембране клетки и связывании с вируснейтрализующими антителами (ВНА) (Tordo et al., 1988).

G-белок имеет трехмерную структуру (Gaudin et al., 1992). В зависимости от внешних условий и стадии жизненного цикла вируса он может иметь как минимум три различные конформационные структуры: нативное состояние (обнаруживается на поверхности вируса при pH ниже 7,0), активированное гидрофобное состояние (принимает участие на первой стадии процесса слияния) и неактивную конформацию (Gaudin et al., 1995). Наличие гликопротеина необходимо для возникновения апоптоза клеток (Prehaud et al., 2003; Lay et al., 2003). Его сверхэкспрессия приводит к усилению апоптоза и противовирусного иммунного ответа (Faber et al., 2002).

Первые 19 аминокислот в последовательности белка играют роль «сигнального» домена. Данный домен обнаруживается только у незрелого протеина. Гликопротеин имеет сложную антигенную структуру (Luo et al., 1998) и содержит несколько антигенных сайтов и эпитопов, важное значение в формировании которых имеет вторичная и третичная структуры белка (Dietzshold et al., 1982). Установлено, что эти сайты/эпитопы обладают различной антигенностью (Benmansour et al., 1991). Эпитоп I представлен единственным аминокислотным остатком в позиции 231 зрелого гликопротеина. Сайт II, конформационно-зависимый сайт и главный антигенный сайт гликопротеина вируса бешенства, включает в себя 2 отрезка в позициях 34-42 и 198-200, а также две позиции между ними – 147 и 184 (Prehaud et al., 1988). Антигенный сайт III представляет собой линейный сайт, расположенный в позиции 330-338 (Lafon et al., 1983, 1984; Seif et al., 1985; Bunschoten et al., 1989). Существуют также минорные антигенные сайты, например, минорный сайт «a», который отделен от антигенного сайта III тремя аминокислотами (Benmansour et al., 1991). Главный иммунодоминантный сайт гликопротеина расположен между аминокислотами 222 и 332 (Johnson et al., 2002). Аминокислотный остаток в позиции 333 зрелого гликопротеина тесно связан с патогенностью вируса бешенства (Dietzshold et al., 1983; Seif et al., 1985; Badrane et al., 2001a). В позиции аминокислот 14-19 зрелого гликопротеина идентифицирован консервативный линейный эпитоп, отвечающий за распознавание вируса В-клетками (Mansfield et al., 2004).

L-белок (РНК-зависимая РНК полимераза) имеет высокую относительную молекулярную массу и состоит из более 2000 аминокислот. Это самый «большой» вирусный белок, L-ген занимает более половины генома вируса бешенства (Tordo, 1996). Аминокислотная последовательность L-белка гомологична с другими представителями порядка *Mononegavirales*, что указывает на наличие у них общего предка (Tordo et al., 1995) и содержит несколько высококонсервативных доменов (Tordo et al., 1988; Poch et al., 1990).

Для эффективного инфицирования клетки вирус бешенства, как и другие

вирусы с негативной цепью РНК, должен содержать в вирионе свой полимеразный комплекс для запуска необходимой первичной транскрипции после релиза рибонуклеопротеина в цитоплазму и *de novo* синтеза вирусных белков. Только после этого может начаться последующая репликация полноразмерных геномных РНК и вторичная транскрипция.

У вируса бешенства прикрепление полимеразы к вирусному нуклеокапсиду (комплекс нуклеопротеина и РНК), который служит в качестве своеобразного шаблона для транскрипции и репликации РНК, опосредовано полимеразным кофактором, фосфопротеином, который формирует димеры, связывающиеся через свои С-терминальные домены с С-терминальными регионами нуклеопротеина (Ribeiro et al., 2009). Полимераза и фосфопротеин показывают колокализацию с нуклеопротеином в тельцах цитоплазматических включений, в то время как оболочечные белки (гликопротеин и матриксный протеин) в них отсутствуют (Morimoto et al., 1998).

Первичная транскрипция посредством работы полимеразы вируса бешенства регулируется динеиновой легкой цепью 1 (Tan et al., 2007). Она служит в качестве транскрипционного фактора, который увеличивает процессивность вирусной полимеразы в процессе первичной транскрипции. В более поздних фазах инфекции полимераза регулируется матриксным протеином с целью повышения уровня репликации (Finke et al., 2003; Finke, Conzelmann, 2003). L-белок вместе с фосфопротеином формирует PL-полимеразный комплекс, который принимает участие в процессах транскрипции и репликации. L-белок накапливается в ацетилированных и реорганизованных микротрубках. Установлено, что полимераза оказывает влияние на организацию микротрубок и посттрансляционную модификацию, тем самым играя важную роль в стадии вирусной репликации (Bauer et al., 2015).

2.5 Патогенез при бешенстве

Схематично патогенез при бешенстве представлен на рисунке 19. Воротами инфекции при бешенстве служат двигательные концевые пластинки

нейромышечного соединения (Макаров, 2017). Вирус бешенства обычно проникает в организм при укусе, нанесенном больным животным, а также оцарапывании либо ослюнении кожи или слизистых оболочек (Charlton, 1994). Крайне редко заражение происходит ингаляционным путем при вдыхании больших количеств аэрозоли, содержащей высокую концентрацию вируса бешенства.

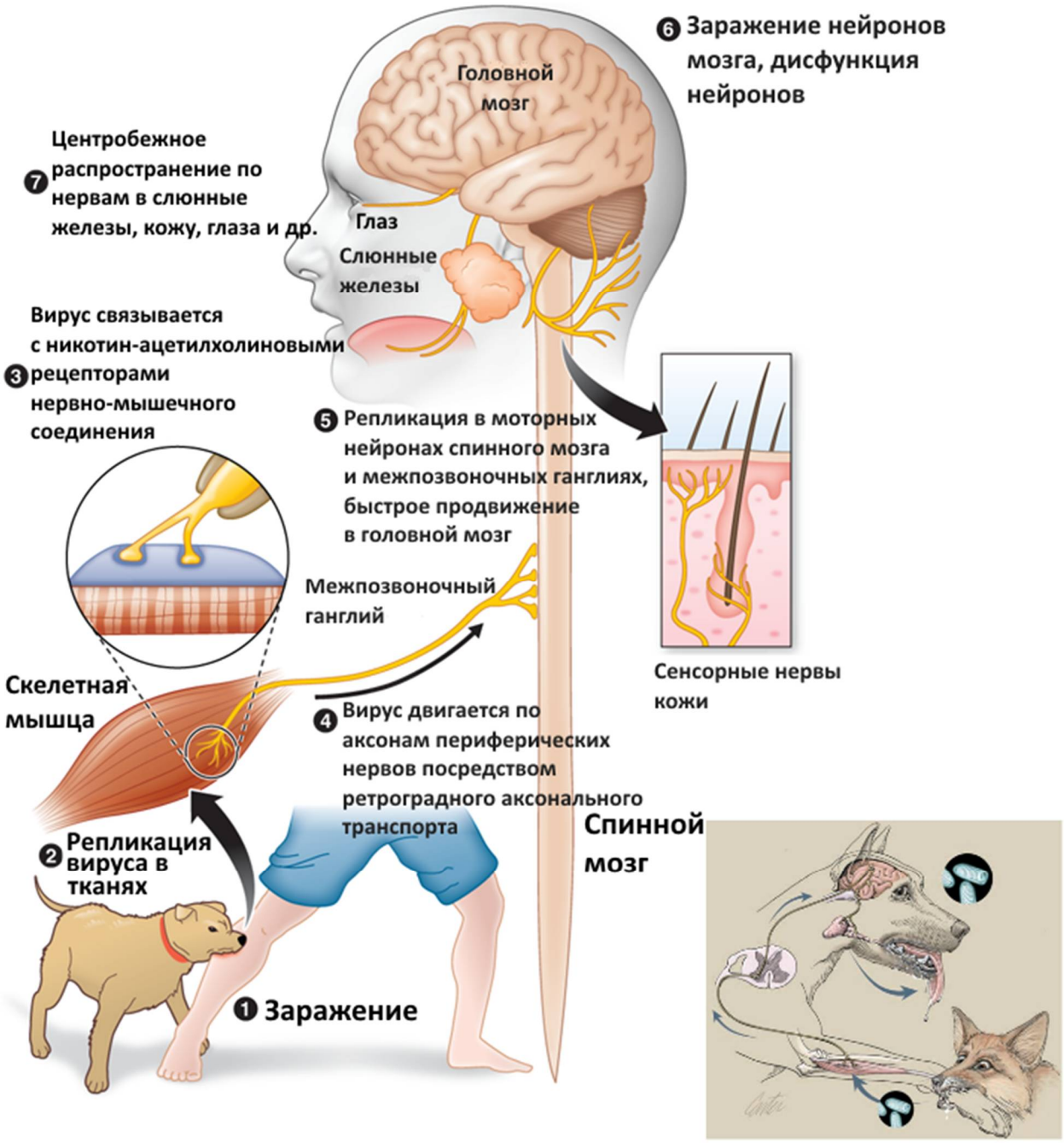


Рисунок 19 - Схема патогенеза при бешенстве.

Случаи заражения человека от человека исключительно редки (Ботвинкин, 2017) и возникают, как правило, не вследствие покуса человека человеком, а, например, при трансплантации органов или тканей (Krebs et al., 1995; Hellenbrand et al., 2005; Smith et al., 2006; Chen et al., 2018; Shingde et al., 2018).

Концентрация вируса бешенства в слюнных железах может достигать высоких титров, в некоторых случаях выше, чем в головном мозге (Charey, McLean, 1983). Вирулентность различных штаммов вируса и клиническое проявление вызываемого ими заболевания может существенно различаться (Kaplan, 1996; Dietzschold et al., 2005). Известно, что аттенуированные штаммы вируса бешенства активируют иммунный и противовирусный ответ хозяина, в то время как патогенные штаммы «уклоняются» от него (Wang et al., 2005).

После укуса (Kasper et al., 2015) вирусные частицы «продвигаются» к ближайшим нервам, затем по нервным волокнам в головной мозг со скоростью несколько миллиметров в сутки (Jackson, 1991). Предполагается, что вирус продвигается от места внедрения по направлению в ЦНС благодаря взаимодействию между Р-белком вируса бешенства и легкой цепью динеина LC8 (Poisson et al., 2001).

Из головного мозга вирус распространяется центробежно по нервным волокнам в различные органы и ткани (слюнные железы, глаза и др.) (рис. 19, Krebs et al., 1995).

2.6 Клинические признаки

Клинические признаки бешенства хорошо известны и подробно описаны в различных литературных источниках (Blancou et al., 1994; Макаров В.В. соавт., 2002). Инкубационный период при бешенстве может варьировать от нескольких дней до месяцев. Его продолжительность зависит от места и глубины укуса, концентрации и вирулентности вируса, вида животного, возраста, состояния его здоровья. Согласно Кодекса здоровья наземных животных МЭБ (OIE Code, 2017) инкубационный период при бешенстве

составляет 6 месяцев, а инфекционный период для собак, кошек и хорьков (наиболее длительный период, в течение которого зараженное животное может являться источником инфекции) – 10-14 сут.

Клинические признаки бешенства проявляются только после вовлечения в процесс большого числа нейронов жизненно важных нервных центров (Schneider, 1975), при этом различают три клинические фазы:

I. ***продромальный период*** длится от 1 до 3 сут, после того как вирус достиг головного мозга. Клиническая картина начинает быстро проясняться – некоторые животные могут становиться более спокойными, у некоторых проявляется повышенная саливация.

II. ***стадия возбуждения*** длится следующие 2-3 сут. Животные внезапно становятся агрессивными, нападают на людей и других животных. Некоторые животные поедают несъедобные предметы (деревянные предметы, камни и т.д.). Наблюдаются признаки параличей, пропадает способность глотать, во рту появляется пена.

III. ***паралитическая стадия*** – следует за стадией возбуждения либо в ряде случаев сразу за продромальным периодом. Гортань и жевательные мышцы парализованы, животное не может глотать, появляется обильное слюнотечение, отвисание нижней челюсти. На этой стадии особенно вероятно заражение человека при контакте с сельскохозяйственными животными (лошади, КРС, МРС и многие другие) в случае неправильной постановки диагноза в процессе обследования этих животных. Именно на этой стадии дикие животные теряют страх перед человеком, а «ночные» животные проявляют активность в дневное время. Паралич распространяется от нижней челюсти и шеи на другие участки тела, животное впадает в кому и погибает в течение нескольких часов.

В среднем продолжительность болезни составляет около 10 сут после чего животное или человек практически неизбежно погибает.

Клинические признаки бешенства в условиях реальных эпидемиологических инцидентов различны у животных разных видов. Встречаются такие клинические признаки, как депрессивность, дромомания, агрессивность, буйство, фотофобия, гидрофобия и многие другие. Это имеет важное значение в первичном распознавании и идентификации подозрительных по бешенству особей (Макаров В.В. с соавт., 2002).

У летучих мышей бешенство может иметь латентную форму и остается незамеченным до обнаружения погибших животных и проведения лабораторных исследований (Ronsholt et al., 1998).

Tepsumethanon et al. разработали наглядную схему клинической диагностики бешенства собак и изучили чувствительность и специфичность клинической диагностики данного заболевания (Tepsumethanon et al., 2005). Проведенные авторами широкомасштабные исследования показали, что данная схема клинической диагностики позволяет выявить бешенство с точностью 94,6% (чувствительность метода составляет 90,2%, специфичность – 96,2%).

2.7 Патологические изменения при бешенстве

Патологические изменения при бешенстве, как правило, не позволяют поставить диагноз на эту инфекцию (Конопаткин и с соавт., 1984). При наружном осмотре отмечают истощение, следы укусов, расчесов, шерсть головы и шеи может быть смочена слюной. При вскрытии трупов выявляется застойное полнокровие внутренних органов, желудок обычно пуст, у плотоядных в нем могут быть обнаружены несъедобные предметы. У жвачных животных в преджелудках (сетке и книжке) обнаруживают сухие и плотные кормовые массы. Слизистые оболочки желудка и кишечника с признаками катарального воспаления и кровоизлияний. Головной мозг и его оболочки отечны, часто с мелкими кровоизлияниями. Следует отметить, что в связи с высоким риском заражения людей, трупы убитых и павших от бешенства животных (за исключением головы) не подлежат вскрытию, их сжигают или утилизируют на ветеринарно-санитарных предприятиях (Макаров, 2017).

2.8 Методы лабораторной диагностики бешенства

2.8.1 Нормативно-правовая база для диагностики бешенства

Согласно Ветеринарным правилам ВП 13.3.1103-96 диагноз «бешенство» ставят на основании комплекса эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатов лабораторных исследований. Для исследования на бешенство в лабораторию направляют свежий труп или голову мелких животных, а от крупных – голову или головной мозг.

Лабораторные исследования на бешенство проводят незамедлительно. О результатах сообщают ветеринарному учреждению или ветеринарному специалисту, направившему биоматериал в лабораторию, и главному государственному ветеринарному инспектору района (города).

В 2013 г. в качестве национального стандарта Российской Федерации введен в действие новый регламентирующий документ – ГОСТ 26075-2013 «Межгосударственный стандарт. Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства». Этот документ действует на территории РФ, Республик Беларусь, Молдова, Киргизия, Узбекистан и распространяется на все виды млекопитающих животных.

2.8.2 Классификация методов лабораторной диагностики бешенства

Методы диагностики бешенства подразделяются на 3 группы: методы детекции антигена, методы детекции фрагментов генома ВБ и методы выделения жизнеспособного вируса (Недосеков, 2002).

Для диагностики бешенства ранее широко применялись методы классической гистологии, а также выявление телец Бабеша-Негри, которые в виду своей низкой чувствительности более не рекомендованы к применению (OIE Manual, 2017). Та же ситуация сложилась с широко применявшейся ранее на постсоветском пространстве реакцией диффузионной преципитации (РДП).

Более подробно классификация современных методов лабораторной диагностики бешенства представлена на рисунке 20.

Рисунок 20 - Классификация методов лабораторной диагностики бешенства.

2.8.3 Реакция иммунофлуоресценции

В 1958 г. Goldwasser и Kissling впервые опубликовали работу о применении РИФ для выявления антигена вируса бешенства в тканях головного мозга экспериментально инфицированных мышей. Впоследствии этот метод стал основным для диагностики бешенства (Beauregard et al., 1965) и начал применяться в России (Селимов с соавт., 1963). Постановка РИФ предполагает применение очищенных поликлональных или моноклональных антирабических иммуноглобулинов, меченных флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ-иммуноглобулин) (Грибенча с соавт., 2013).

Сущность метода заключается в соединении антирабического флуоресцирующего иммуноглобулина со специфическим антигеном, представленным скоплениями нуклеопротеина вируса бешенства в нейронах, и

наблюдении светящихся комплексов «антиген-антитело» в поле зрения флуоресцентного микроскопа (рис. 21).

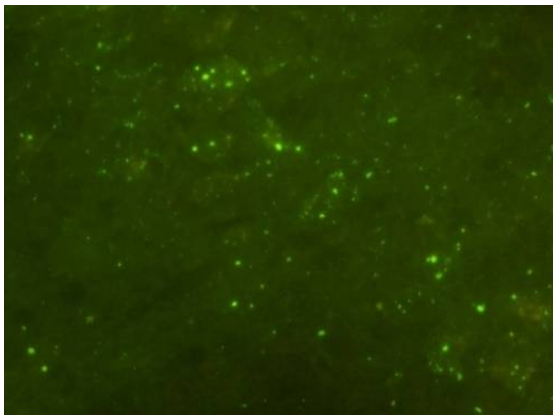


Рисунок 21 - Реакция иммунофлуоресценции при диагностике бешенства.

Метод может быть реализован как в прямом, так и в непрямом (с использованием антивидовых антител) варианте. Однако в практике ветеринарных лабораторий для рутинной диагностики бешенства применяется только прямой вариант РИФ.

РИФ позволяет проводить с высокой точностью детекцию антигенов вируса бешенства (ВБ) в отпечатках головного мозга, слюнных желез, биоптатах кожи. Этот метод также используется для визуализации результатов выделения ВБ в культуре клеток и для подтверждения специфичности гибели лабораторных мышей при постановке биопробы (Bryceson et al., 1975; Warrell et al., 1988; Goldwasser et al., 1958).

Существует ряд ограничений в применении РИФ, так, исследование фиксированных формалином проб головного мозга делает невозможным использование стандартной методики. Диагностику бешенства посредством РИФ можно проводить с использованием свежего, замороженного, консервированного материала (глицерин). Срок постановки метода составляет порядка 2-3 ч, что дает ему значительные преимущества (Palmer et al., 1985; Dean et al., 1996). ФИТЦ-иммуноглобулин наносят на предварительно высушенные и фиксированные ацетоном мазки-отпечатки, приготовленные из различных отделов головного мозга (кора больших полушарий, аммонов рог, мозжечок, продолговатый мозг). Затем препараты инкубируют во влажной

камере, промывают, высушивают и исследуют с использованием флуоресцентного микроскопа. Вирус реплицируется в цитоплазме клеток, формируя крупные включения округлой или овальной формы, которые состоят из вирусного нуклеопротеина.

2.8.4 Иммуноферментный анализ

Высокая чувствительность и специфичность непрямого сэндвич-варианта иммуноферментного анализа (ИФА) позволяет использовать его для выявления антигенов ВБ в патологическом материале – мозговой ткани животных, подозреваемых на бешенство. Непрямой сэндвич-вариант ИФА основывается на методе RREID (Rapid Rabies Enzyme Immunodiagnosis), предложенном Perrin et al. в 1986 г. Разработана тест-система на основе непрямого варианта ИФА для детекции и количественного определения нуклеопротеина ВБ, позволяющая использовать в качестве улавливающих кроличьи поликлональные антитела, полученные на РНП (Назаров с соавт. 2002, 2003).

В РФ разработан и успешно применяется целый ряд тест-систем для диагностики бешенства в ИФА (Мукаптаев К.Н., 2006; Иванов с соавт., 2007; Дяченко с соавт. в 2015). Некоторые из них были разработаны на основе моноклональных антител, что существенно повышает чувствительность метода (Мукаптаев, 2006; Дяченко с соавт. в 2015), однако в виде коммерческих наборов такие разработки до настоящего времени недоступны.

2.8.5 Гистологическое исследование

Гистологическое исследование проб головного мозга при бешенстве малоинформативно и заключается обычно в выявлении энцефалитов и миелитов (Perl, 1975). Эозинофильные включения в цитоплазме нейронов (тельца Бабеша-Негри) часто обнаруживаются при бешенстве, особенно в пирамидальных клетках гиппокампа и клетках Пуркинье в мозжечке (Negri et al., 1903; Young, Sellers, 1927), которые варьируют в размерах от 0,25 до 27 нм и являются зонами активной репликации вируса (Schneider et al., 1975).

Гистопатологические изменения при бешенстве обычно проявляются признаками энцефалита и миелита, которые определяются при окраске гистологических срезов ткани головного мозга погибших от бешенства животных гематоксилином и эозином. Наиболее часто встречающимся гистопатологическим изменением при бешенстве является периваскулярная негнойная инфильтрация лимфоцитами (Perl, 1975). Эозинофильные цитоплазматические тельца-включения размером 0,25-27 мкм, называемые тельцами Бабеша-Негри, нередко обнаруживаются в пирамидальных клетках аммонова рога и клетках Пуркинье мозжечка (Negri et al., 1903; Yang, Sellers, 1927).

2.8.6 Иммуногистохимическое исследование

Иммуногистохимическое (ИГХМ) исследование представляет собой метод лабораторной диагностики, позволяющий идентифицировать скопления антигена в исследуемых тканях посредством связывания его с мечеными антителами, обеспечивая при этом обнаружение локализации в тканях вирусных белков. Данный метод по принципу действия схож с РИФ, с той лишь разницей, что при постановке, например, непрямого варианта ИГХМ антиген ВБ и связанные с ним комплексы, состоящие из антирабических антител, антивидовых биотинилированных антител и конъюгата экстравидин-пероксидаза, образуют нерастворимый продукт окисления диаминобензидина, имеющий коричневую окраску (Abreu et al., 2014).

ИГХМ в первую очередь интересен в плане проведения научно-исследовательских работ, имеющих целью изучение локализации антигена ВБ в различных органах и тканях. Так, при использовании этого метода для исследования проб различных органов и тканей КРС, больного бешенством, было установлено наличие антигена ВБ в поясничных спинномозговых ганглиях в 92,31% случаев, тройничных ганглиях – 90,9%, звездчатых ганглиях – 41,67% и в ганглиях брюшной полости – 16,67%. В единичных случаях присутствие антигена вируса бешенства определялось в цитоплазме

феохромоцитов надпочечников, клетках нейрогипофиза и аденогипофиза (Abreu et al., 2014).

ИГХМ – один из немногих методов, позволяющих исследовать материал, консервированный раствором формалина (Вишняков с соавт., 1997). Кроме того, для учета результатов при использовании ИГХМ достаточно наличия светового микроскопа. В связи с этим был разработан целый ряд вариантов ИГХМ (в том числе непрямой, прямой и непрямой с использованием микроволновой обработки) в первую очередь с целью применения в регионах с жарким климатом, где затруднены транспортировка и хранение замороженных образцов, а также в развивающихся странах, где флуоресцентные микроскопы недоступны либо слишком дороги (Feiden et al., 1988; Abreu et al., 2012; Stein et al., 2010; Dürr et al., 2008). Сравнительные исследования показали, что результаты, полученные с помощью прямого варианта ИГХМ, совпадают с результатами РИФ (Prabhu et al., 2018), однако для постановки этого метода предпочтительно использовать моноклональные антитела (Feng et al., 2018).

2.8.7 Реакция агглютинации латекса

Наряду с хорошо зарекомендовавшими себя, разрабатываются новые методы лабораторной диагностики бешенства, более простые как в логистическом, так и в аппаратном плане. К таким методам относится реакция агглютинации латекса (Kasempimolporn et al., 2000, 2007).

Реакция агглютинации латекса (РАЛ) – метод выявления антигенов и антител, основанный на агглютинации сферических частиц латекса, сенсибилизированных антителами или антигенами в зависимости от объекта детекции. Преимущество этого метода, по сравнению с традиционными, заключается в быстроте и простоте постановки реакции (10-30 мин). Применение метода не требует наличия дорогостоящего оборудования, поэтому доступно и может применяться в диагностических лабораториях любого уровня и степени оснащенности. По своей чувствительности РАЛ значительно превышает иммунодиффузные тесты, реакцию преципитации в геле и

встречный иммуноэлектрофорез, а использование специальных анализаторов для учета степени агглютинации позволяет ему конкурировать с иммуноферментным и радиоиммунным анализами (Старовойтова с соавт., 2006). Известно, что латексные тесты хорошо работают с поликлональными антителами. Кроме того, требуется один вид антител или антигена, тогда как для многих других методов (иммунохроматография), как правило, требуется несколько видов моноклональных антител. К недостаткам РАЛ можно отнести возможность получения ложноположительных результатов. Однако современные технологии изготовления латексов и использование новых материалов позволяют минимизировать количество неспецифических реакций (Скуркис, 2005).

В настоящее время диагностические системы на основе РАЛ широко используются как в медицинской, так и ветеринарной лабораторной диагностике. Kasempimolporn et al., 2000 изучили возможность использования РАЛ для выявления ВБ в слюне собак. Авторами были испытаны два полистирольных латексных препарата: полистирольный латекс с диаметром частиц 0,50 мкм Takeda Pharmaceutical Co. (Япония) и голубой полистирольный латекс с диаметром частиц 0,25 мкм Sigma. Латексы, разведенные до концентрации 1%, сенсибилизировали антирабическим иммуноглобулином лошади в концентрации 3 мг/мл. Наилучшие результаты в экспериментах по выявлению ВБ в слюне собак были получены при использовании полистирольного латекса с диаметром частиц 0,25 мкм. Чувствительность и специфичность метода по отношению к традиционной РИФ составила 95% и 99%, соответственно.

2.8.8 Выделение вируса

Многие достижения вирусологии были обусловлены возможностью выращивать вирусы в условиях лаборатории. Исторически вирусовыделение проводили на лабораторных животных (белые лабораторные мыши) и куриных эмбрионах, но многие методы выделения вируса основаны на применении

культур клеток. Предпочтительность применения культур клеток для выделения ВБ связана с тем, что данный метод, по сравнению с методами, предполагающими применение лабораторных животных, дешевле и безопаснее для персонала. Кроме того, современные требования биоэтики и благополучия животных требуют исключения использования лабораторных животных при наличии других методов, сравнимых по чувствительности и специфичности (Corona et al., 2018).

При оптимальных условиях (правильно отобранный патологический материал, высокочувствительная линия культур клеток) эти методы могут быть высокочувствительны и специфичны. Ввиду отсутствия явного цитопатического действия при заражении культур клеток ВБ, результаты выделения вируса должны визуализироваться посредством одной из иммунохимических реакций (иммунофлуоресценция, иммуногистохимия), используя меченые вирусоспецифические антитела (Jeffer, Aarons, 2009).

Многочисленными исследованиями была установлена возможность размножения ВБ в монослойных культурах клеток (Kissling, 1958; Fenje, 1960; Abelseth et al., 1964) и возможность детекции этого процесса методом иммунофлуоресценции (Kaplan et al., 1960). Известно, что культуры клеток, полученные из тканей нервной системы, наиболее чувствительны к заражению вирусом бешенства, что обусловлено в первую очередь его тропизмом в условиях организма хозяина (Smith et al., 1978; Tollis et al., 1988; Nogueira, 2004). В связи с этим для выделения вируса бешенства в лабораторной диагностической практике широко применяются клетки мышиной нейробластомы (MNA, N2a). Кроме того, испытана и успешно применяется с этой целью культура клеток НГУК-1 (невринома гассерова узла крысы), обладающая высокой чувствительностью к вирусу бешенства (Хисматуллина с соавт., 2014).

Основными преимуществами выделения вируса является возможность наработки вирусного материала для последующих антигенных и генетических исследований, высокая чувствительность и возможность адаптации таких

методов для быстрого получения результатов. К недостаткам относят возможность выделения и последующей детекции только живого вируса, необходимость поддержания «чистых» культур клеток, длительность постановки, необходимость привлечения высококвалифицированного персонала, трудоемкость, а также вопросы биологической безопасности.

2.8.9 Методы молекулярной биологии для диагностики бешенства

Молекулярно-биологические методы обеспечивают получение как количественных, так и качественных результатов. Это одна из наиболее быстро и интенсивно развивающихся областей лабораторной диагностики (Jeffery, Aarons, 2009). Следует отметить, что применение методов молекулярной биологии является одним из самых перспективных направлений в прижизненной лабораторной диагностике бешенства, позволяет быстро получать результат и использовать практически любой вид патологического материала. Для этих целей разработаны различные варианты обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции, а также полу-гнездовые ее варианты и ПЦР в реальном времени (Nagaraj et al., 2006; Wacharapluesadee, Hemachudha, 2010).

Обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) с последующим нуклеотидным секвенированием позволяет проводить диагностику бешенства, типирование и молекулярно-эпидемиологические исследования. Поскольку вирус бешенства имеет РНК-геном, процедура амплификации включает обратную транскрипцию геномной РНК с получением комплементарной ДНК (кДНК) и последующей амплификацией кДНК в ПЦР (Tordo et al., 1995, 1996).

Постановка ОТ-ПЦР включает выделение общей РНК, синтез кДНК, амплификацию кДНК с использованием специфических праймеров и визуализацию результатов с использованием горизонтального электрофореза в агарозном геле, содержащем этидиум бромид, который просматривают в ультрафиолетовом свете (Heaton et al., 1999). ПЦР включает следующие

основные этапы (Viljoen et al., 2009):

- денатурация (молекулу двухцепочечной ДНК прогревают до 95°С, при этом комплементарные цепи ДНК разделяются, т. е. денатурируют, что открывает доступ праймерам к одноцепочечной ДНК);

- присоединение, или отжиг (реакционную смесь охлаждают до 50-55°С для гибридизации праймеров к комплементарному участку одноцепочечной ДНК-молекулы пробы);

- удлинение (реакционную смесь нагревают до 72-75°С, процедура репликации проходит в присутствии термостабильной ДНК-полимеразы, ПЦР-буфера, смеси нуклеотидов и магния).

ОТ-ПЦР применяется как для посмертной, так и для прижизненной диагностики бешенства (David et al., 2002; Rimhanen-Finne et al., 2010; Dacheux et al., 2010), а также для дифференциации штаммов с использованием специфических праймеров (Цыбанов с соавт., 2002).

ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР) широко применяется для диагностики бешенства. Для этого из исследуемого материала выделяют РНК, которую используют в качестве матрицы для реакции обратной транскрипции. Полученную кДНК используют в ПЦР-РВ. В ходе ПЦР амплифицируется участок генома, амплификация происходит с участием специфических праймеров. Для детекции накопления амплифицированных фрагментов ДНК служат зонды. Благодаря тому, что зонды имеют флуорофоры с различной длиной волны флуоресценции, по характеру сигнала судят о наличии в исследуемом материале генома полевого изолята или вакцинного штамма ВБ.

Следует отметить, что достоверность диагностики с использованием разработанной для исследования проб биопсии кожи головы RT-hnPCR составляет ≥98% (Dacheux et al., 2008). Разработана ПЦР-РВ для диагностики бешенства с диагностической чувствительностью и специфичностью в 100% при полном совпадении полученных результатов с результатами применения золотого стандарта в диагностике бешенства – РИФ (Dedkov et al., 2018).

Иммунохроматографический анализ. Данный метод основан на принципе иммунохроматографического «сэндвич»-анализа, при котором определяемый антиген, находящийся в анализируемом образце, связывается со специфическими моноклональными антителами, иммобилизированными на нитроцеллюлозной мембране в тестовой зоне. Результат оценивается с помощью детектирующих специфических моноклональных антител, меченных коллоидным золотом. Иммунохроматографические тесты, реализованные на основе стрип-полосок, имеют большой потенциал для экспресс-диагностики бешенства, особенно в странах или регионах, где общепринятая лабораторная диагностика недоступна (Kasempimolporn et al., 2011; Ahmed et al., 2012).

Во ВНИТИБП (г. Щелково) разработан и испытан «сэндвич»-вариант иммунохимического анализа (ИХА), который использует стратегию выявления антигена ВБ на нитроцеллюлозной мембране с предварительно фиксированными конъюгатом высокоаффинных антирабических IgG с частицами коллоидного золота (подушка конъюгата), антинуклеокапсидными IgG и антивидовыми IgG (Клюкина, Анисина, 2012; Анисина, 2016).

Kasempimolporn et al., 2011 сообщили о разработке иммунохроматографического теста для детекции антигена ВБ в пробах слюны и головного мозга, по чувствительности и специфичности сравнимого с гнездовым вариантом ПЦР.

Servat et al. опубликовали материалы о разработке иммунохроматографического теста с чувствительностью, превышающей 88% и специфичностью 100% и способного определять в пробах головного мозга наличие антигена ВБ штаммов, принадлежащих к генотипам 1, 5, 6 и 7 (Servat et al., 2012). В настоящее время доступны коммерческие наборы для диагностики бешенства методом иммунохроматографии, которые при сравнительных испытаниях показали неудовлетворительные результаты по ряду показателей, в том числе по чувствительности и объему исследуемого материала. Тем не менее данный тест оценивается как весьма перспективный, но требует дальнейшей доработки (Eggerbauer et al., 2016).

2.8.10Методы оценки поствакцинального антирабического иммунитета и поедаемости оральных антирабических вакцин

Детекция антирабических антител. Для оценки поствакцинального иммунитета при проведении парентеральной или оральной антирабической вакцинации животных могут применяться следующие лабораторные методы:

- реакция нейтрализации (РН) в культуре клеток;
- реакция агглютинации латекса;
- иммунохроматография;
- иммуноферментный анализ.

Из перечисленных методов РН признана золотым стандартом. Остальные методы рекомендуется применять для скрининговых исследований, для упрощенной экспресс-диагностики. Визуализация результатов реакции проводится с использованием метода иммунофлуоресценции. Также был разработан иммунопероксидазный вариант, не требующий использования флуоресцентного микроскопа (Недосеков с соавт., 1997). Этот метод был разработан в качестве замены РН на мышах (Atanasiu et al., 1956) в 60-х годах прошлого века, вначале в непрямом варианте (Thomas et al., 1963), а затем и в прямом (King et al., 1965). Позднее были разработаны различные варианты этого метода с использованием референтных антирабических сывороток (Louie et al., 1975; Cliquet et al., 1998). Также с этой целью была разработана и валидирована тест-система на основе ИФА (Wasniewski et al., 2014).

Оценка поедаемости оральных антирабических вакцин. Поедаемость вакцинных приманок дикими животными может оцениваться путем визуального учета с использованием цветных флажков или контрольно-следовых площадок, а также с помощью биомаркеров – химических веществ, включенных в состав вакцинных приманок, способных при попадании в организм животного накапливаться в костной ткани и сохраняться в ней на протяжении многих месяцев (Johnston et al., 2005). В каждую вакцинную приманку, предназначенную для оральной иммунизации диких животных, включают 150-200 мг антибиотиков тетрациклинового ряда. Тетрациклины –

группа антибиотиков, относящаяся к кальцифильным веществам. Это свойство позволяет использовать их в качестве биомаркеров для оценки поедаемости оральных антирабических вакцин, так как при попадании в организм животного они склонны образовывать хелатные соединения с гидроксиапатитом в процессе минерализации костной ткани, формируя долговременные метки в костях и зубах, которые выявляют в отраженном свете флуоресцентного микроскопа (Linhart et al., 1967).

2.8.11Методы прижизненной диагностики бешенства

Прижизненное подтверждение диагноза на бешенство в первую очередь актуально в медицине и необходимо для своевременного принятия решения об изоляции больного, применения к нему соответствующей терапии (Mani et al., 2013), а также принятия мер санитарно-эпидемиологического характера. К основным критериям для прижизненного лабораторного подтверждения диагноза у человека и животного отнесены выделение вируса, обнаружение вирусного антигена в любых тканях и жидкостях организма, обнаружение антител к ВБ в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) (Bell et al., 1971), а также обнаружение фрагментов вирусной РНК. В качестве биологического материала для прижизненной диагностики бешенства используют биоптаты кожи, отпечатки роговицы глаза, пробы слюны, ЦСЖ, сыворотки крови, слез, мочи (Dacheux et al., 2008; Wacharapluesadee, Hemachudha, 2010). С целью прижизненной диагностики бешенства у животных и людей предлагалось применять РИФ, используя отпечатки роговицы глаза (Cifuentes et al., 1971; Истомина, Клюкина, 2011). В Российской Федерации имеется опыт прижизненной лабораторной диагностики бешенства с помощью РИФ в отпечатках роговицы глаза, обнаружения антигена ВБ в слезной жидкости и слюне методом ИФА и ОТ-ПЦР (Баширова с соавт., 2007; Фазылов с соавт., 2014; Хисматуллина с соавт., 2015). Обнаружение фрагментов РНК ВБ является одним из самых перспективных направлений в прижизненной лабораторной диагностике бешенства в связи с возможностью быстрого получения результата

и использования любого вида патологического материала (Nagaraj et al., 2006; Wacharapluesadee, Hemachudha, 2010; Dacheux et al., 2008).

Антитела к ВБ у больных людей обычно удается обнаружить с конца первой недели болезни в сыворотке крови и спинномозговой жидкости (Udow, 2013). Если больной не умер на ранних сроках, то в дальнейшем отмечается интенсивное накопление антител, что удается проследить при исследовании парных проб в динамике (Manoj et al., 2016).

Параллельное исследование сыворотки крови и ЦСЖ используется в качестве дифференциального теста, так как у вакцинированных пациентов без активного инфекционного процесса вируснейтрализующие антитела выявляются только в сыворотке крови. Концентрация антител также имеет значение, так как после лечебно-профилактических прививок титры вируснейтрализующих антител обычно не превышают 10 МЕ/мл, но в случае заболевания могут быть на 1-2 порядка выше (Udow, 2013).

2.9 Антигенные и молекулярно-биологические характеристики вируса бешенства

2.9.1 Антигенные характеристики вируса бешенства

Многие годы вирус бешенства считался однородным в антигенном отношении, несмотря на чрезвычайно широкий спектр естественных хозяев и глобальное распространение. Довольно долго бытовало представление о четырех серотипах ВБ, которые первоначально были определены с помощью рутинных серологических тестов. Однако эти методы не позволяли различать географические варианты ВБ, существование которых было очевидным (Ботвинкин с соавт., 2004). В 1978 г. Wiktor и Koprowski впервые сообщили о получении моноклональных антител к ВБ (Wiktor, Koprowski, 1978). Благодаря этому достижению начались научно-исследовательские работы по изучению антигенных характеристик отдельных структурных белков ВБ, а также идентификации серотипов и штаммов (Okoh, 2000; Nadin-Davis et al., 2000; Mebatsion et al., 1992; Delpietro et al., 1997).

С помощью моноклональных антител были изучены антигенные и функциональные свойства вирусных белков. Так, Luo et al. изучили гликопротеин ВБ с применением панели из 35 моноклональных антител и сделал заключение, что вирусный гликопротеин представляет собой сложную антигенную структуру и содержит конформационно-зависимые антигенные сайты и эпитопы (Luo et al., 1998) Позднее Goto et al. с помощью моноклональных антител картировал антигенные эпитопы и провел анализ структуры антигенных сайтов вирусного нуклеопротеина (Goto et al., 2000).

Моноклональные антитела широко применялись для изучения эпизоотических изолятов ВБ и идентификации их антигенных групп в Финляндии, Эстонии и других странах Европы (Kulonen et al., 1993; Cox et al., 1992), Африке (Umoh et al., 1990; Mebatsion et al., 1992). В России для изучения антигенных характеристик полевых изолятов ВБ применяли несколько панелей моноклональных антител. В 1983 г. Селимов с соавт. сообщил об изучении 39 полевых изолятов ВБ с использованием трех моноклональных антител, не обнаружив при этом каких-либо антигенных различий между ними (Селимов с соавт., 1983). Завершение работы, начатой Селимовым было опубликовано Ботвинкиным А.Д. с соавт. в 2004 г. Пять изолятов (один от человека и четыре от летучих мышей) значительно отличались от других по антигенному профилю и были отнесены к вирусам, родственным ВБ: три из них – к серотипу 5 (EBLV-1) (Ботвинкин с соавт., 2004).

В 1989 г. Грибенча с соавт. сообщили о разработке панели из 7 антинуклеокапсидных антител и 3 антител против гликопротеина вируса бешенства, благодаря которым были идентифицированы несколько антигенных вариантов вируса бешенства (Грибенча с соавт., 1989).

В 1990 г. Ботвинкин с соавт. сообщили о применении более широкой панели (39 моноклональных антител) для изучения 98 полевых изолятов ВБ идентифицировав несколько антигенных вариантов вируса (Botvinkin et al., 1990).

2.9.2 Применение ферментов рестрикции для штаммовой дифференциации

Эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) – ферменты класса гидролаз, катализирующие гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических (бактерии и сине-зеленые водоросли) и некоторых других организмах и выполняющие тем самым «иммунную» функцию. Распознавание чужеродной ДНК осуществляется в специфических нуклеотидных последовательностях – сайтах. Рестриктазы при определенных условиях расщепляют нуклеотидную последовательность ДНК, имеющую заведомо известную структуру, что впоследствии контролируется с использованием гель-электрофореза. Благодаря этому свойству, рестриктазы широко используются при проведении клонирования (Nadin-Davis et al., 1993), а также непосредственно для дифференциации штаммов ВБ (Цыбанов с соавт., 2002; Ito et al., 2003).

2.9.3 Нуклеотидное секвенирование и филогенетический анализ

Нуклеотидное секвенирование фрагментов генома либо полноразмерной последовательности генома с последующим филогенетическим анализом позволяют проводить дифференциацию на филогенетические группы, различать полевые изоляты и вакцинные штаммы ВБ, определять новые генотипы (виды) данного возбудителя. С этой целью использовались различные области генома ВБ. При этом, как правило, выявляется географическая приуроченность филогенетических групп, реже приуроченность по видам животных (это чаще касается летучих мышей) (Smith et al., 1992; Kissi et al., 1995; Bourhy et al., 1999; Nadin-Davis et al., 1999; Holmes et al., 2002; Kuzmin et al., 2004; Real et al., 2005).

Установлено также наличие генетической линии ВБ, циркулирующей независимо среди енотов и скунсов, но являющейся близкородственной к изолятам вируса, циркулирующим среди летучих мышей, что, вероятно, является следствием вторичной передачи вируса от летучих мышей в популяцию енотов и скунсов (Davis et al., 2006).

Филогенетические исследования позволили получить достоверные доказательства того, что в истории эволюции лиссавирусов происходило изменение вида основного хозяина. Установлено, что лиссавирусы в популяциях летучих мышей эволюционировали гораздо раньше, чем возникло бешенство у наземных млекопитающих (Badrane, Tordo, 2001). Несмотря на то, что ВБ является «древним» вирусом, предполагается, что филогенетические различия в пределах генотипа 1 лиссавирусов в географически различных регионах произошли в пределах последних 500 лет (Holmes et al., 2002).

Известно, что G-ген и G-L межгенная область (псевдоген, ψ-регион) являются более вариабельными фрагментами генома ВБ чем, например, N-ген, и эволюционная нагрузка на различные гены, кодирующие вирусные белки, значительно отличается (Johnson et al., 2002a). Область псевдогена использовалась для изучения молекулярно-биологических характеристик, о чем свидетельствует целый ряд опубликованных научных работ (Hyun et al., 2005; Bourhy et al., 1999; Nel et al., 2005). Считается, что анализ нуклеотидной последовательности гена нуклеопротеина является достаточным для проведения достоверного филогенетического исследования, в то время как анализ последовательности гена гликопротеина важен для изучения антигенных характеристик и иммуногенных свойств вакцинных штаммов (Kuzmin et al., 2004; Kasempimolporn et al., 2004).

Молекулярно-эпизоотологические исследования показали, что в течение прошлого века ВБ распространялся на запад и юг через Европу. При этом естественные географические барьеры, такие как река Висла в Польше, ограничивали распространение вируса (Bourhy et al., 1999). Bourhy et al. классифицировали изоляты ВБ европейского происхождения, разделив на 4 основные группы: «NEE-группа» (North-Eastern Europe, Северо-Восточная Европа), «EE-группа» (East Europe, Восточная Европа), WE-группа (Western Europe, Западная Европа) и «CE-группа» (Central Europe, Центральная Европа) (Bourhy et al., 1999). Позднее Kuzmin et al. изучили большое количество изолятов вируса бешенства, собранных на территории бывшего СССР, и

классифицировали их на 5 генетических групп: A, B, C, D и E (Kuzmin et al., 2004). В ходе этих исследований было установлено, что изоляты, имеющие одинаковое географическое происхождение, часто попадают в одну и ту же группу по результатам филогенетических исследований. Mansfield et al. доказал существование двух «Арктических» групп: «Arctic 1» и «Arctic 2», последняя из которых включает 2 подгруппы и отдельную близкородственную «Arctic-like» группу (Mansfield et al., 2006).

Изучение изолятов вируса бешенства из стран Среднего и Ближнего Востока показало существование нескольких близкородственных групп, которые тем не менее филогенетически существенно отличались от изолятов, циркулирующих в Европе и Африке, при этом какой-либо приуроченности этих филогенетических групп к конкретному хозяину выявлено не было (David et al., 2000).

Молекулярно-биологические исследования, проведенные в Бразилии, выявили существование 3 основных филогенетических групп, приуроченных к конкретным хозяевам – летучим мышам и их основным жертвам (Bernardi et al., 2005). Некоторые авторы сочетали использование моноклональных антител и методы молекулярной биологии для изучения генетических и антигенных характеристик ВБ (Mebatsion et al., 1993; De Mattos et al., 1996, 1999; Favoretto et al., 2002; Nadin-Davis et al., 2001, 2003).

Подавляющее большинство случаев бешенства, выявляемых среди животных и человека, вызваны ВБ, принадлежащим к первому генотипу. Выявление же лиссавирусов летучих мышей среди наземных млекопитающих остается довольно редким явлением. Muller et al. сообщили о выделении в Германии EBLV-1 у куницы в естественных условиях (Muller et al., 2004). Также имели место случаи заболевания людей со смертельным исходом, вызванные лиссавирусами EBLV и ABLV в Канаде, Австралии и некоторых Европейских странах (Lumio et al., 1986; McColl et al., 2000; Spooner, 2003; Jakava-Viljanen et al., 2015).

2.10 Меры борьбы с бешенством

В Российской Федерации, согласно ветеринарным правилам (ВП 13.3. 1103-96) во всех населенных пунктах все собаки, независимо от их принадлежности, а в необходимых случаях и кошки подлежат обязательной профилактической иммунизации против бешенства с использованием принятых в практику антирабических вакцин в порядке и в сроки, предусмотренные наставлениями по их применению. В зонах стационарного неблагополучия по бешенству диких хищников проводят плановую профилактическую антирабическую вакцинацию сельскохозяйственных животных (прежде всего – крупного рогатого скота), подвергающихся риску заражения.

2.10.1Вакцины и вакцинные штаммы

В истории профилактики бешенства можно выделить два основных исторических периода, имевших место до конца 19-го века. Первый период – до появления антирабических вакцин – характеризуется попытками лечения бешенства с использованием препаратов, приготовленных из тканей животных, а также путем применения местной обработки ран. Имели место и попытки применения специфической профилактики этого заболевания. Так, Eusebio Valli в Италии (18 век) пытался «вакцинировать» людей и инфицированных животных слюной больной бешенством собаки, предварительно обработанной желудочным соком лягушек (Blancou, 1994).

В дальнейшем наступила эпоха вакцин. С 1885 по 1975 год антирабические вакцины готовились из тканей нервной системы (спинной и головной мозг) кроликов, затем овец, а позднее мышей (Pasteur, 1885; Semple, 1919; Fuenzalida, 1964). Попытки выращивания ВБ в культуре клеток *in vitro* опубликованы в работах Noguchi и Levaditi, датируемых 1913 г. (Noguchi, 1913; Levaditi, 1913), которые сообщили о продолжительном выделении ВБ из культивируемых фрагментов нервных тканей, полученных от животных. Позднее было установлено, что фиксированный ВБ может размножаться как в культурах клеток мозга эмбрионов мышей и крыс, так и в опухолевых клетках

(Crick, King, 1988). О восприимчивости первичных культур клеток почек мышей к ВБ впервые сообщили Vieuchange et al. в 1956. Kissling в 1958 г. сообщили о проведении успешных серийных пассажей полевых изолятов и фиксированных штаммов ВБ в первичной культуре клеток почек хомяка (Kissling, 1958).

В 1963 г. была показана потенциальная возможность использования вирусной массы, полученной путем культивирования вируса в культуре клеток, для производства вакцин (Kissling, Reese, 1963). В 1965-1969 гг. была показана возможность широкомасштабного культивирования ВБ в первичных культурах клеток, включая обезьяньи, собачьи и свиные почки, куриные эмбрионы и фибробласты утиных эмбрионов, а затем и в перевиваемых культурах клеток, таких как ВНК-21 и Vero (Crick, King, 1988). После 1975 г. началось применение культуральных инактивированных вакцин по схеме Эссена в комбинации с антирабическим иммуноглобулином (Thraenhart, 2004).

Вакцинные штаммы вируса бешенства. Одним из первых был получен пастеровский штамм «PV», выделенный от больной бешенством коровы в 1882 г. (Smith, Seidel, 1993). Он подвергался многочисленным серийным пассажам на различных видах животных с целью снижения его вирулентности: на собаках (был получен более короткий инкубационный период), на кроликах (получена более высокая вирулентность для кроликов и собак). Этот штамм был назван фиксированным вирусом (virus fixe), который затем использовался Луи Пастером для научных целей и впервые применялся для изготовления антирабической вакцины в 1885 г. (Pasteur, 1885; Bazin, 2008, 2011).

Второго мая 1885 г. доктора Roux и Rigal впервые применили препарат, представлявший собой выдержанный в течение 5 сут в эксикаторе эмульгированный спинной мозг павшего от бешенства кролика, на человеке. С тех пор пациенты начали прибывать в лабораторию Пастера со всех уголков Европы, а также из России и США. Кроме того, новые центры антирабической вакцинации, названные позднее Пастеровскими станциями и институтами, стали открываться по всему миру (Bazin, 2011). Доступная информация по наиболее распространенным вакцинным штаммам ВБ представлена в таблице 2.

Таблица 2 - Происхождение и характеристики наиболее распространенных вакцинных штаммов вируса бешенства

Название	Страна происхождения	Историческая справка и характеристики	Источник литературы
1	2	3	4
Louis Pasteur virus (PAS)	Франция	Выделен в 1882 г. от коровы. Прошел многочисленные пассажи на кроликах. Пассаж 2061 был впервые адаптирован к культуре клеток Vero путем проведения 19 пассажей, затем к культуре клеток BSR путем проведения 5 пассажей. Использовался для производства ветеринарных и медицинских антирабических вакцин. Передан в Россию в 1886 г., где стал родоначальником ряда вакцинных штаммов.	Pasteur, 1885; Bazin, 2008; Гамалея и др., 1946. Sacramento et al., 1992
Pasteur Virus (PV)	Аргентина	Был получен в 1965 г. из панамериканского центра по зоонозам (Pan-American Zoonoses Center, Buenos Aires, Argentina). Предполагалось, что он был получен из оригинального Пастеровского штамма (Louis Pasteur virus). Прошел один дополнительный пассаж в головном мозге кролика, и затем был адаптирован к культивированию в фетальных клетках почки КРС (33 пассажа).	Atanasiu et al., 1974; Sacramento et al., 1992
Flury и дериваты	США	Выделен в 1939 г. из мозга человека в американском штате Джорджия (Georgia, USA). Прошел 136 пассажей в головном мозге однодневных цыплят, адаптирован к культивированию на куриных эмбрионах. После третьего пассажа на куриных эмбрионах оказался авирулентен для собак и кроликов, сохранил низкую вирулентность для мышей и хомяков при интрацеребральном введении (штамм «**Flury-LEP**» использовался для производства живой вакцины для собак). После 180-го пассажа на куриных эмбрионах утратил вирулентность для мышей и хомяков при интрацеребральном введении (штамм «**Flury-HEP**»). После адаптации к культивированию в культуре клеток ВНК-21 получил обозначение «**HEP-675**».	Koprowski, Cox, 1948, 1950; Koprowski et al., 1954; Wiktor et al., 1969; Sacramento et al., 1992; Rhodes, 1981

таблица 2 - продолжение

1	2	3	4
Pitman Moore (PM, PV-11)	США	Считается, что происходит от оригинального пастеровского вируса, пассажировался в США в головном мозге кроликов. После адаптации к росту в диплоидных клетках человека (52 пассажа) серийно культивировался в культуре клеток ВНК-21 и культуре клеток Vero. Использовался для производства инактивированных ß-пропиолактоном антирабических вакцин. После адаптации в 1962-1963 г. к культивированию в культуре диплоидных клеток человека получил обозначение «**PM-HDC**».	Wiktor et al., 1964, 1973; Cox et al., 1978; Montagnon, 1989; Rhodes, 1981.
Challenge Virus Strain (CVS) и дериваты	США	Считается, что происходит от оригинального пастеровского вируса. После множества пассажей в головном мозге мышей используется в качестве лабораторного штамма. Впоследствии был адаптирован к культивированию в первичной культуре клеток почки хомяка, культуре клеток ВНК-21 (получил наименование «**CVS-11**») и линиях диплоидных клеток человека. Штаммы-дериваты «**AvO-1**» и «**AvO-2**» являются антигенными мутантами родительского штамма CVS, не патогенны для взрослых мышей, при этом они сохранили вирулентность для мышей-сосунов. «**AvO-1**» и «**AvO-2**» не чувствительны к изменениям температуры и одинаково хорошо культивируются в культурах клеток ВНК-21 и CER при температурах 33 и 38,5 °С, достигая при этом того же титра, что и родительский штамм «**CVS**».	Sacramento et al., 1992; Rhodes, 1981; Coulon et al., 1982; Flamand et al., 1980a,b.
CTN-1	Китай	Выделен из ткани мозга человека в Zibo в 1956 г. в провинции Shandong. Подвергся 56 пассажам в организме мышей и 50 – в диплоидных клетках человека. Использовался для производства медицинских антирабических вакцин с 1983 г. Вариант штамма, адаптированный к культивированию в клетках куриных эмбрионов, получил обозначение «**CTNCEC25**».	Du et al., 2008; Zhu et al., 2014; Huang et al., 2013
aG (pG)	Китай	Выделен от больной бешенством собаки в Beijing в 1931 г. Прошел 50 пассажей в организме кроликов, затем после 68 пассажей был адаптирован к культивированию в культуре клеток Vero. По другим данным, прошел 30 пассажей в головном мозге кроликов, 55 – пассажей в первичной культуре клеток почки хомяка и серийные перемежающиеся пассажи в организме морских свинок и в первичной культуре клеток почки хомяка. Использовался для производства медицинских антирабических вакцин с 1981 г.	Jiao et al., 2011; Huang et al., 2013.

таблица 2 - продолжение

1	2	3	4
Street Alabama Dufftring (SAD) и дериваты	США	Выделен в штате Алабама из слюнных желез собаки в 1935 г., аттенуирован путем многочисленных пассажей в головном мозге мышей, 25 пассажей в культуре клеток ВНК и 10 пассажей в куриных эмбрионах. Основные дериваты: - «**Evelyn-Rokitnicki-Abelseth**» **(ERA)** Получен в 1960 г. из штамма «**SAD**» путем проведения 35-45 пассажей в культуре клеток почки свиньи с адаптацией к культуре клеток ВНК-21 (6 пассажей). С помощью методов обратной генетики произведена замена аргинина глутаминовой кислотой в позиции 333 эктодомена гликопротеина, в результате был получен авирулентный мутант «**ERA G333**», адаптированный к BSR и ВНК-21. - «**SAD-Berne**» получен в начале 1970-х из штамма «**ERA**» в Институте ветеринарной микробиологии Бернского Университета, Швейцария, сохранил остаточную патогенность для некоторых видов животных. Использовался для изготовления оральных антирабических вакцин. - «**Внуково-32»** – получен путем пассажей в культуре клеток почки хомяка при 32°С. Использовался для изготовления культуральных вакцин (на уровне 107 пассажа) для медицинского применения, а также испытывалась для оральной вакцинации плотоядных животных. **-** «**SAD-B19**» – получен путем селекции по показателям чувствительности к температуре и низкой остаточной патогенности после прямого культивирования в культуре клеток ВНК-21. **-** «**SAG1»/«SAG2**» – вакцинные штаммы, полученные посредством воздействия моноклональных антител к гликопротеину вируса бешенства (штамм «**SAD Berne**») и несут одну и 2 мутации соответственно в кодоне, кодирующем аминокислоту в позиции 333 гликопротеина. Штамм «**SAG 2**» считается более стабильным и апатогенен для мышей всех возрастов при оральном, внутримышечном и интрацеребральном введении (http://www.who.int/rabies/vaccines/oral_immunization/en/). Другие дериваты: «**SAD- Potsdam 5/88**», «**SK**», «**SAD-CL60**», «**SAD-CL77**», «**SAD VA1**», «**SAD 1-3670 Wistar**» и др.	Sacramento et al., 1992; Fenje, Amies, 1960; Bankovskiy et al., 2008; Баньковский Д.О., 2010; Селимов с соавт., 1977; Селимов с соавт., 1987; Bingham et al., 1995; Грибенча с соавт., 1975; Geue et al., 2008; Schumacher et al., 1993.

таблица 2 - продолжение

1	2	3	4
KeLev	Египет/Израиль	Выделен в 1950 г., по одним данным в Египте (http://www.european-virus-archive.com/virus/live-rabies-virus-kelev-rv2324), по другим – в Израиле (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF154998) от собаки, прошел 4 пассажа на мышах, затем прошел более 100 пассажей на куриных эмбрионах. Утратил патогенность для взрослых кроликов, мышей, хомяков и собак при введении внутримышечно или в мозг, сохранив патогенность для мышей-сосунов.	Komarov, Hornstein, 1953; Bunn, 1988.
Nishighara и дериваты	Япония	Происходит от оригинального Пастеровского вируса, переданного в Японию приблизительно в 1915 г. Претерпел несколько серийных пассажей на различных видах животных и в культурах клеток. Патогенен для взрослых мышей при интрацеребральном введении. Основные дериваты: - «**RC-HL**»**:** получен из штамма «**Nishigahara**» (который поддерживался путем пассажей в головном мозге кролика), после 294 пассажей в куриных эмбрионах, 8 пассажей в фибробластах куриных эмбрионов (CEF), 5 пассажей в клетках Vero и 23 пассажей в клетках легких хомяка (HmLu). При интрацеребральном введении взрослым мышам вызывает заболевание, проявляющееся взъерошенностью шерсти и снижением массы тела (не вызывая гибели). **- «Ni-Ce»:** получен из штамма «**Nishigahara**» после 100 пассажей в культуре клеток CEF, что привело к появлению авирулентных свойств.	Sakamoto et al., 1994; Ishikawa et al., 1989; Ito et al., 2001; Shimizu et al., 2007.
VRG	США	Получен в Wistar Institute (Филадельфия) путем встройки генно-инженерным путем ДНК-транскрипта гена гликопротеина вируса бешенства в геном вируса коровьей оспы (*Vaccinia virus*). Полученный штамм «**vaccina-rabies-glycoprotein**» («**VRG**») был с успехом испытан в лабораторных и полевых условиях в различных странах.	Kieny et al., 1984; Desmettre et al., 1990; Wandeler 2000; Brochier et al., 1996; Olson et al., 2000.
Рекомбинантные штаммы на основе аденовирусов	США	Получен путем встройки гена гликопротеина штамма «**ERA**» в делетированный участок E3 генома аденовируса человека 5-го типа «**Ad5-RG1**». Аналогичные работы проводились с целью получения рекомбинантного штамма на основе аденовируса собак 1-го типа «**CAV-1**».	Wandeler et al., 1990.

таблица 2 - продолжение

1	2	3	4
«Москва» и дериваты	СССР	Получен из оригинального Пастеровского штамма путем 3500 внутримозговых пассажей этого штамма на кроликах. - «**Овечий-ВГНКИ**» – является производным штамма «**Москва**», полученным в результате 80 пассажей в мозговой ткани овец. Патогенен при интрацеребральном введении животным. **-** «**Щелково-51**» – получен путем культивирования в перевиваемых клетках почки детеныша хомячка (ВНК) из штамма «**Овечий-ВГНКИ**», вирулентен для овец и лабораторных животных при внутримозговом введении. Из штамма «**Овечий-ВГНКИ**» были получены вакцинные штаммы «**О-73 Уз-ВГНКИ**», «**Краснопресненский-85**», имеющие сходные биологические свойства. Штамм «**РБ-71**» (БелНИИЭВ-ВГНКИ) получен из исходного «**Овечий-ВГНКИ**» (80 пассаж в мозге овец) путем проведения 23 перемежающихся пассажей в головном мозге белых мышей культуре клеток SHK, 33 прямых пассажей в этой культуре клеток, 2 пассажей в культуре клеток QEC, 3 перемежающихся пассажей на овцах и в культуре клеток RK и 5 прямых пассажей в этой культуре клеток. Патогенен для лабораторных мышей и кроликов при внутримозговом заражении В 1996-1997 гг. из данного штамма сотрудниками ФГБУ «ВГНКИ» и ФГБУ «ВНИИЗЖ» был получен штамм «**РВ-97**», обладающий повышенной инфекционной активностью при культивировании в перевиваемых культурах клеток ВНК-21 и ПС. Штамм «**РВ-97**» использовался для производства оральной антирабической вакцины, а его близкородственный вариант – штамм **«ВНИИЗЖ»** - для производства инактивированных ветеринарных вакцин. Штамм «**РБ-71**» был адаптирован к сублинии культуры клеток ПС и обозначен как «**ВИРАБ-2001**».	Тучков с соавт. 2013; Груздев, Недосеков, 2001; Иванов, 2001; Баньковский, 2010; Kovalev et al., 1990; Патент на изобретение №: 2244557 (авторы: Жестерев, Горшкова, Лаптева, Балышева, Хрипунов, Ковалев, Усеня)

таблица 2 - продолжение

1	2	3	4
ТС-80		Получен из штамма V-319, выделенного от вампирной летучей мыши в Мексике, после чего аттенуирован путем проведения серии пассажей в мозге мышей-сосунов и адаптирован к культивированию в культуре клеток фибробластов эмбриона летучей мыши. Позднее штамм был адаптирован к перевиваемой культуре клеток ВНК-21 и получил название ТС-80. Авирулентен для овец при внутримозговом введении, а также для телят, собак и кошек при внутримышечной инокуляции. В 1990 г. штамм ТС-80 на уровне 10 пассажа был адаптирован к культивированию в перевиваемой культуре клеток ПС, а в 1995 г. на уровне 70-го пассажа в этой же культуре клеток стал применяться для изготовления инактивированной антирабической вакцины для ветеринарного применения. Данный штамм является авирулентным для овец, кроликов и тхорзофреток при интрацеребральной, внутримышечной и подкожной инокуляции, однако сохранил вирулентность для новорожденных и взрослых мышей, новорожденных крольчат и морских свинок при интрацеребральном заражении.	Bjilenga , Hernander, 1980; Сафонов с соавт., 1991; Балабанов с соавт., 1990; Вишняков с соавт., 1998; Сливко, 2000.

Одной из главных проблем предложенной Пастером антирабической вакцины и множества ее вариантов было присутствие в конечном продукте тканей нервной системы животных. Это вызывало аллергические реакции и энцефалиты, в связи с чем требовалось внедрить культивирование вируса *in vitro*, исключив присутствие ткани нервной системы (Koprowski, 2011). С этой целью в 1946 г. доктор Koprowski разработал метод культивирования ВБ с использованием куриных эмбрионов. Для проведения экспериментов он использовал штамм Flury, полученный доктором Johnson и адаптированный к однодневным цыплятам (Koprowski, Cox, 1948).

Происхождение некоторых вакцинных штаммов остается неясным. Ряд исследователей предпринимали попытки внести ясность в этот вопрос, проведя молекулярно-биологические и филогенетические исследования (Sacromento et al., 1992.), но ответы на поставленные вопросы так и не нашли.

Инактивированные антирабические вакцины. Механизм формирования поствакцинального иммунитета основан на индукции ВНА, стимуляции цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), убивающих зараженные клетки, и активации клеток Т-хелперов (Тх), ускоряющих иммунный ответ и продукцию гамма-интерферона (ИФН-γ). В связи с этим важным условием разработки новых вакцин является выбор штамма вируса и адъюванта, сочетание которых позволит стимулировать у привитых животных напряженный и длительный антирабический иммунитет (Лосич с соавт., 2011).

Для повышения иммуногенной активности антирабических вакцин традиционно применяют адъюванты из группы сапонинов и гидроокись алюминия. Однако молекулы алюминия, остающиеся длительное время в тканях в месте введения вакцины, могут вызывать у кошек новообразования, прежде всего гранулемы или саркомы (Лосич с соавт., 2012). В связи с этим, а также для повышения иммуногенности антирабических вакцин, продолжается поиск более эффективных и безопасных адъювантов, таких как этоний и полиоксидоний (Матвеева с соавт., 2016), а также более сложных адъювантов, созданных на

основе ISCOM-технологии (Лосич с соавт., 2011, 2012). Во ВНИТИБП была разработана жидкая универсальная инактивированная антирабическая этанол-вакцина УНИРЭВ, производство которой основано на современных биотехнологических методах – культивировании инфицированных ВБ (штамм «Щелково-51») клеток перевиваемой линии ВНК-21/13 в биореакторах суспензионным и псевдосуспензионным (на микроносителях) способами (Пухова с соавт., 2012, 2015).

Живые антирабические вакцины. Живые антирабические вакцины в настоящее время применяют главным образом для иммунизации диких животных, что является наиболее перспективным способом борьбы с бешенством (Пухова с соавт., 2014).

Меры борьбы с бешенством в дикой природе всегда сводились к «удалению» восприимчивых животных из популяции. С этой целью предлагалось использовать антифертильные препараты, временно блокирующие размножение животных (Bacon, Macdonald, 1980). Кроме того, применяли запрещенную в настоящее время во многих странах мира депопуляцию, т. е. сокращение численности диких плотоядных животных путем отстрела, отлова, травления и т. д. Эта мера, в случае ее применения на изолированных территориях (острова), имела положительный эффект (Aubert, 1994). Однако в большинстве случаев она оказывалась неэффективной, стимулируя миграцию животных из соседних регионов, которые вновь «приносили» с собой бешенство.

Оральная вакцинация позволяет достичь поставленной цели без депопуляции. Идея проведения активной иммунизации диких плотоядных животных возникла во второй половине прошлого века (Baer, 1975). Однако до применения оральных вакцин на практике предстояло разработать оптимальную форму вакцины и состав вакцинной приманки, способ вакцинации и методики контроля эффективности оральной вакцинации, кроме того, оставался открытым вопрос остаточной вирулентности аттенуированных вакцинных штаммов и др. (Wachendorfer, 1976; Clark, 1980). С тех пор было проведено множество

лабораторных и полевых испытаний различных методов вакцинации (Winkler, Bogel, 1992; Wandeler et al., 1988; Matter et al., 1998).

Процесс разработки комплекса мер по вакцинации диких плотоядных животных неразрывно связан с эволюцией способов «доставки» вакцинного вируса в организм вакцинируемого дикого животного. Одной из первых концепций вакцинации диких плотоядных был парентеральный способ введения вакцины животным, для чего животных отлавливали, а после вакцинации отпускали. Данный подход был испытан и дал хорошие результаты, однако оказался слишком трудоемким и дорогостоящим, поэтому нашел лишь ограниченное применение (Wandeler, 2000). Следующим шагом стала разработка различного рода механических устройств, таких как вакцинные капканы, которые оказались слишком опасными и не нашли широкого применения. Дальнейшие научные исследования в этой области велись в направлении создания вакцинных приманок и разработки концепции оральной вакцинации диких плотоядных. Испытывались различные виды и формы приманок, при этом оптимальной оказалась приманка, внутрь которой помещен пластиковый контейнер-блистер объемом 1,5-2,0 мл, заполненный вирусной суспензией. Первоначально блистеры размещали под кожей куриных голов (Steck et al., 1982), позднее стали применять различные смеси кормов с ароматическими веществами, привлекающими животных (Linhart et al., 1997).

Практически все современные оральные антирабические вакцины имеют примерно одинаковую компоновку: блистер с вакциной, помещенный внутрь вкусовой приманки, с небольшими вариациями в размерах, составах вкусовой приманки и типах блистеров. В России применялись вакцины «LISVULPEN» (BIOVETA Ivanovice, Czech Republic) из штамма «SAD Bern» (Matouch et al., 2006), «FUCHSORAL» (KLOCKE Pharma-Service GmbH, Германия) из штамма «SAD B19» (Vos et al., 1999), «СИНРАБ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир) и «ОРАЛРАБИВАК» (Покровский завод биопрепаратов, г. Покров) из штамма «РВ-97» (Borisov et al., 2006). В некоторых регионах России применялась

оральная вакцина на основе штамма «Внуково-32» и сухая оральная антирабическая вакцина из штамма «ТС-80» производства ВНИИВВиМ, г. Покров (Груздев, Недосеков, 2001).

Более современными и не обладающими остаточной вирулентностью, являются штаммы, подвергшиеся генетическим мутациям. Например, делеционные мутанты, которые сохранили свои иммуногенные свойства, но утратили патогенность благодаря направленной мутации гена гликопротеина в позиции 333. К таким штаммам относятся «SAG1», «SAG2», «ERA G 333» (Tuffereau et al., 1989; Kihm et al., 1992; Bankovskiy et al., 2007, 2008).

Другим способом устранения остаточной вирулентности является разработка рекомбинантных антирабических вакцин (Wandeler, 2000). Такие вакцины не содержат патогенных вирусных частиц. Впервые рекомбинантную антирабическую вакцину разработали в Wistar Institute (Филадельфия) (Kieny et al., 1984), встроив ДНК-транскрипт гена гликопротеина ВБ в геном вируса вакцины (Vaccinia virus) и успешно испытав ее в лабораторных и полевых условиях (Brochier et al., 1996). Были также разработаны вакцины на основе аденовируса (Tims et al., 2000), герпесвируса собак (Xuan et al., 1998) и осповируса енотов (Hu et al., 1997), в которые был встроен гликопротеин ВБ.

Считается, что рекомбинантные вакцины являются более эффективными в отношении элиминации заболевания, чем цельновирионные препараты. Они просты в производстве, устойчивы к воздействию внешней среды и не обладают патогенностью для мышевидных грызунов, индуцируют у плотоядных выраженный и продолжительный иммунный ответ (Горбачева, Макаров, 2010).

Разработана и проходит клинические испытания вакцина на основе мРНК ВБ. Установлено, что при введении данной вакцины внутрикожно безыгольным способом, у 71% пациентов образовались антирабические ВНА (Abbasi, 2017). Доказана также высокая термостабильность таких вакцин (Stitz et al., 2017).

2.10.2Меры борьбы и профилактики бешенства

Бешенство – это классический пример функционирования эволюционно сформировавшейся инфекционной паразитарной системы практически во всех странах мира, соактантами которой, кроме возбудителя – вируса бешенства, являются дикие и домашние плотоядные, сельскохозяйственные животные, а также люди (Сочнев, 2015).

Бездомные животные остаются серьезной проблемой для регионов РФ, так как их численность точно не определена (количество безнадзорных животных в Москве порядка 25-27 тыс. особей) (Анисина с соавт., 2015). Однако мероприятия по частичному уничтожению популяции бездомных животных в городах часто не дают желаемого эффекта. Так, в ходе реализации программы регулирования численности бездомных собак в г. Санкт-Петербурге установлено, что разрушение структуры группировок бездомных собак путем уничтожения доминирующей группы влечет за собой передел территории между ранее подчиненными группами животных и увеличение частоты контактов между ними. Возникает омоложение состава (за счет щенков, занимающих места погибших взрослых особей), происходит вторжение особей из соседних группировок и появление одиночных кочующих животных, изгоняемых в результате вторжения чужаков. В результате непродуманных истребительных мероприятий наступает кратковременное снижение численности, сопровождаемое омоложением состава популяции и увеличением общего числа контактов. Возникает ложное впечатление, что всех этих негативных последствий можно избежать, проводя регулярно массовые и широкомасштабные истребительные мероприятия с вовлечением большого числа исполнителей (Алиев с соавт., 2005).

Для достижения успешных результатов по элиминации вируса в среде собак перспективным направлением может служить иммуноконтрацепция совместно с антирабической вакцинацией (Анисина с соавт., 2015).

Универсальный практический вывод из постулата природной очаговости

лисьего бешенства – необходимость сокращения численности основного хозяина возбудителя и вектора инфекции, как наиболее рациональной меры воздействия на эпизоотический процесс, и контроля заболевания в сложившихся условиях путем уменьшения плотности популяции лисицы и ее поддержание ниже критического уровня путем истребления либо снижение популяционной восприимчивости до аналогичного уровня (Макаров, 2010). Первый прием исходно сомнителен, так как концентрация ниже 0,1 гол/км^2 не обеспечивает репродуктивных требований сохранения биологического вида (Kaplan, 1977).

Успешный опыт применения стратегии оральной иммунизации в странах Западной Европы позволил установить требования, обусловливающие такую убедительную эффективность мероприятия, важнейшие из которых:

- применение стабильного во внешней среде вакцинного вируса;
- высокая иммуногенность для лисиц/енотовидных собак;
- безопасность для животных других видов;
- устойчивость вакцинной приманки во внешней среде и ее привлекательность для целевых видов животных;
- наличие биомаркера в составе приманки;
- научно-обоснованное планирование, четкая организация и координация работы;
- участие специалистов природоохранных организаций (охотников);
- секторная стратегия вакцинации с определением тактики для каждой зоны (кратность, сезонность, кольцевая и вынужденная вакцинации, естественные преграды и т. п.);
- одновременный охват мероприятием всей неблагополучной территории (области, страны), независимо от площади, исключающий сохранение остаточных очагов инфекции;
- применение авиации для распространения приманок с вакциной;
- многократная (двух-трехкратная) вакцинация с весенне-осенним циклом (март-май и сентябрь-ноябрь) в зависимости от фенологии

основного хозяина бешенства на данной территории;

- контроль потребления приманок по тетрациклиновому биомаркеру и иммунного статуса по титрам ВНА с уровнем обследования не менее 4-8 лисиц на 100 км^2;
- корректировка проводимых мероприятий по результатам мониторинга, в случае выявления поедаемости ниже 75% приманок (по тетрациклиновому маркеру) и уровня сероконверсии ниже 70% (по наличию антирабических вируснейтрализующих антител);
- систематический эпизоотологический мониторинг на бешенство в зоне оральной вакцинации;
- дифференциация вакцинного вируса от эпизоотического с помощью одного из методов молекулярной биологии.

В условиях России необходимо строго контролировать процесс и анализировать результаты (Макаров, 2010). На примере Удмуртии показано, что поступление оральной вакцины в республику в 2014 и 2016 г. не обеспечивало нормированную потребность доз вакцины в расчете на площадь обслуживаемой территории. Это привело к необходимости регулирования численности диких животных – хозяев бешенства (Бурдов с соавт., 2016). На фоне временного сокращения государственного финансирования программ по оральной иммунизации диких хищников ряд авторов считают оптимальным применение материальных ресурсов для снижения эпидемиологического риска. Это, прежде всего, более тщательный контроль выполнения вакцинации домашних плотоядных, сокращение численности безнадзорных и диких животных, создание буферных зон вакцинации диких хищников вокруг всех крупных населенных пунктов глубиной не менее 50 км (Гулюкин, Шебейкин, 2016).

Таким образом, проанализированные научные публикации, статистические отчеты и другие источники информации свидетельствуют об остроте и крайней актуальности проблем, связанных практически со всеми аспектами диагностики, а также мероприятиями по борьбе и профилактике

бешенства. Количество вновь открываемых видов (генотипов) ВБ продолжает неуклонно расти, представляя собой новый вызов рабиологии в плане разработки надежных средств диагностики и профилактики заболевания.

В арсенале лабораторной диагностики бешенства присутствует целый ряд надежных методов, однако по разным причинам далеко не все из них широко применяются в России. Сохранение напряженной ситуации по бешенству среди собак на территории РФ в условиях наличия и доступности антирабических вакцин ставит под сомнение эффективность проведения антирабических мероприятий в целом, делая еще более актуальной разработку мероприятий по надзору и мониторингу, разработке программ по борьбе с этим заболеванием, контролю качества диагностической работы, мониторингу иммуногенности антирабических вакцин, а также повышению квалификации ветеринарных врачей.

Сложность эпизоотологической ситуации в ряде стран, имеющих общую сухопутную границу с Россией, в том числе странах- участниках СНГ, наряду с проблемами транспарентности приводит к необходимости совместного планирования и проведения антирабических мероприятий. В свою очередь, активизация международной торговли и туристических связей поднимает вопрос об интенсификации изучения проблем распространения бешенства в ряде стран дальнего зарубежья, анализе молекулярно-эпизоотологических данных по циркуляции и эволюции ВБ, в том числе в странах Юго-Восточной Азии.

С другой стороны, активизация международного сотрудничества позволяет проводить обмен опытом и знаниями, осваивать новые методы и подходы к решению тех или иных проблем рабиологии. Это в конечном итоге приведет к достижению глобальной цели, поставленной ФАО/ВОЗ/МЭБ, по ликвидации бешенства человека, обусловленного контактами с больными собаками к 2030 г.

3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Материалы и методы исследований

3.1.1 Материалы

Фиксированные штаммы вируса бешенства. Названия и происхождение фиксированных штаммов ВБ, используемых в работе, представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Фиксированные штаммы вируса бешенства

Название штамма	Происхождение
«CVS-11»	AFSSA Site de Nancy LERRPAS Technop le Agricole et Veterinaire BP 40 009 54220 Malzville Cedex, Франция
«SAD B19»	Федеральный научно-исследовательский центр вирусных болезней животных, Тюбинген, Германия
«ВНИИЗЖ»	ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир
«РВ-97»	ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир
«Овечий»	ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», г. Москва
«Eth_PV»	Эфиопский институт здравоохранения (Ethiopian Public Health Institute), Аддис-Абеба, Эфиопия
«ERA»	Центр контроля и предотвращения болезней (Centres for Disease Control and Prevention, CDC), Атланта, США

Фиксированные штаммы ВБ, перечисленные в таблице 3, используются для следующих целей:

- штамм «CVS» является фиксированным лабораторным штаммом ВБ, используется в качестве контрольного штамма в различных диагностических реакциях (РН, РИФ, ПЦР, ИГХМ) и при проверке протективных свойств антирабических вакцин;
- штамм «ВНИИЗЖ» используется для производства культуральной инактивированной антирабической вакцины;
- штамм «Овечий» использовался для производства мозговых антирабических вакцин (культивировался в мозге овец), в настоящее время для производства вакцин не применяется.

Для филогенетического анализа использовали нуклеотидные последовательности генов N-, G-генов и ψ-региона, полевых изолятов и

вакцинных штаммов ВБ, опубликованных в литературе, а также представленных в базе данных EMBL.

Перевиваемые культуры клеток.

- Культура клеток нейробластомы мыши (MNA) получена из Национального НИИ ветеринарии и продовольствия, г. Хельсинки, Финляндия.
- Культура клеток почки сирийского хомяка (ВНК-21) получена из Национального НИИ ветеринарии и продовольствия, г. Хельсинки, Финляндия (использовалась для постановки реакции нейтрализации).
- Культура клеток почки африканской зеленой мартышки Vero получена из Национальной полиолаборатории, Института здравоохранения, EPHI, Эфиопия (использовалась для отработки роллерного культивирования ВБ).

Лабораторные и экспериментальные животные.

- Мыши белые беспородные массой 6-8 г.
- Кролики массой 0,7-3,0 кг.
- Собаки в возрасте 4-5 мес., беспородные.

Иммуноглобулины.

- Поликлональный антирабический ФИТЦ-конъюгированный иммуноглобулин «Bio-Rad» (Франция).
- Поликлональный антирабический ФИТЦ-глобулин «ВНИИЗЖ» (Россия).
- Меченные флуоресцеинизотиоцианатом кроличьи антимышиные антитела (DAKO, Дания).
- Антирабический лиофилизированный стандарт МЭБ, сыворотка крови собаки, активность – 6,7 МЕ/мл (ANSES, Нанси, Франция).
- Отрицательный стандарт МЭБ, сыворотка крови собаки (ANSES, Нанси, Франция).
- Антивидовые биотинилированные антитела (клон RG-16, № B3275, Sigma), полученные против полной молекулы IgG кролика.

Моноклональные антитела. Для изучения антигенных характеристик полевых изолятов ВБ использовали панель из 5 мышиных антинуклеокапсидных МКА: W-239.17, W-187.5, W-187.11.2, MW-187.6.1 и P-41, полученной из Федерального научно-исследовательского центра вирусных болезней животных, Тюбинген, Германия.

Приборы и оборудование. В работе использовали следующее основное оборудование: термостат суховоздушный «ТС-80», pH-метр «pH-121», CO_2-инкубатор «FORMA SCIENTIFIC» и «SANYO» MCO-15AC, магнитная мешалка марки Biosan, гомогенизатор марки «QIAGEN», флуоресцентный микроскоп «LEITZ LABORLUX D» и «OLYMPUS CX41», световой инвертированный микроскоп «OPTON», бокс ламинарный «CLEAN AIR CB/C», центрифуга настольная «EPPENDORF», ультрацентрифуга «MSE SUPERSPEED 65», амплификатор «PTC-100», пипетки автоматические одно- и многоканальные «FINPIPET» и «PLASTOMED», весы аналитические «OHAUS», амплификатор «BIO-RAD C1000 THERMAL CYCLER», вортекс, спектрофотометр «BIO-RAD» SMARTSPEC PLUS», источник питания для электрофореза «БИОКОМ», камера для электрофореза «EASY-CAST», трансиллюминатор «VILBER LOURMAT», гель-документирующая система «BIO-RAD», автоматический счетчик клеток марки «INVITROGEN COUNTESS», гомогенизатор «QIAGEN TISSUE LYSER LT», многоканальный спектрофотометр «TECAN INFINITE F 50».

3.1.2 Методы исследований

Отбор проб. При отборе проб на территории Российской Федерации руководствовались «Методическими указаниями по отбору и пересылке проб головного мозга, сывороток крови и костной ткани с целью диагностики бешенства животных и оценки эффективности оральных антирабических вакцин» (Чернышова с соавт., 2009). Отстрел диких животных проводили охотники и егеря. Трупы животных доставляли в ветеринарные лаборатории, где проводили вскрытие черепной коробки и извлечение головного мозга, отбор проб крови/трупной жидкости, отделение сыворотки, а также отбор проб

костной ткани (нижняя челюсть с зубами). Пробы помещали в герметичную тару и хранили при минус 20ºС до исследования.

Пробы головного мозга больных бешенством животных получали в ходе проведения мониторинговых исследований на бешенство, а также из региональных ветеринарных лабораторий Российской Федерации. После проведения диагностических процедур в ветеринарных лабораториях пробы головного мозга доставляли в ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» в замороженном виде.

В Камбодже для проведения исследований использовали пробы головного мозга собак, поступивших в отдел вирусологии филиала Института Пастера (Institut Pasteur du Cambodge) в 1998-2011 гг. В общей сложности было получено 149 положительных на бешенство проб головного мозга из 20 административных районов Королевства Камбоджа.

Выделение и очистка РНП вируса бешенства. Выделение и очистку вирусной РНП из суспензии инфицированной культуры клеток ВНК-21 проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по выделению и очистке рибонуклеопротеина из культуры клеток ВНК-21, инфицированной культуральным вирусом бешенства» (Сухарьков с соавт., 2015).

Выделение и очистку вирусного РНП из культурального вируса бешенства, очищенного и концентрированного, проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по выделению и очистке гликопротеина и рибонуклеопротеина из очищенного и концентрированного культурального вируса бешенства» (Сухарьков с соавт., 2015).

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ). Постановку прямого варианта РИФ осуществляли в соответствии с ГОСТ 26075-2013. Мазки-отпечатки готовили из кусочков коры больших полушарий, мозжечка, аммонового рога и продолговатого мозга. Препараты высушивали и фиксировали в охлажденном ацетоне при минус 20ºС в течение 1-8 часов. Фиксированные препараты высушивали и окрашивали с использованием диагностического ФИТЦ-

иммуноглобулина. Для этого на каждый мазок наносили 0,05 мл рабочего разведения ФИТЦ-иммуноглобулина и инкубировали во влажной камере при температуре 37°С в течение 30 мин. Затем препараты промывали в ФБР pH 7,3 (Dulbecco A «OXOID») при комнатной температуре в течение 10 мин и 1 раз в течение 5 мин в дистиллированной воде. На каждый препарат наносили 0,05 мл 50% глицерина, приготовленного на ФБР, накрывали покровным стеклом и исследовали при увеличении ×400.

Интенсивность реакции учитывали общепринятым методом: «+» – заметная, но слабо выраженная специфическая флуоресценция с неотчетливо выявляемым цветом; «++» – выраженная специфическая флуоресценция с отчетливо выявляемым цветом; «+++» – яркая специфическая флуоресценция с хорошо выявляемым цветом; «++++» – сверкающая флуоресценция яркого цвета; «–» – специфическая флуоресценция отсутствует.

Непрямой вариант РИФ. Для проведения исследований с использованием МКА из каждой пробы головного мозга готовили 16 микропрепаратов, по 2 на каждое моноклональное антитело, а также на диагностические ФИТЦ-иммуноглобулины «Centocor», «Bio-Rad», «ВНИИЗЖ» и отрицательный контроль (работа с диагностическими конъюгатами проводилась в прямом варианте РИФ). Микропрепараты готовили, фиксировали и промывали как при постановке прямого варианта РИФ, наносили моноклональные антитела в разведении, рекомендованном производителем. Инкубацию и промывку препаратов осуществляли как при постановке прямого варианта РИФ. Затем на препараты наносили антивидовой ФИТЦ-иммуноглобулин, инкубировали и промывали в том же режиме. В качестве отрицательного контроля один препарат каждой пробы окрашивали только антивидовым ФИТЦ-иммуноглобулином. В качестве антивидовых антител использовали меченные флуоресцеинизотиоцианатом кроличьи антимышиные антитела (DAKO, Дания).

Прямые твердофазный и жидкофазный варианты РИФ. Консервированные формалином пробы головного мозга исследовали в прямом твердофазном варианте РИФ (ПТ РИФ) по методике, предложенной Barnard B., Voges S. 1982, с использованием ацетона для фиксации препаратов, а также в прямом жидкофазном варианте РИФ (ПЖ РИФ) по разработанной схеме:

- фрагменты коры больших полушарий, аммонова рога, мозжечка и продолговатого мозга массой 1-2 г растирали в фарфоровой ступке с добавлением 5 мл забуференного фосфатно-натриевого раствора (ЗБФР), pH 7,4, полученную взвесь центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин, супернатант удаляли;
- осадок ресуспензировали в 5,0 мл 0,25% раствора трипсина с содержанием 0,3% цитрата натрия и 0,6% хлорида натрия, pH 7,8, суспензию инкубировали при температуре 37°С в течение 30 мин, центрифугировали при 1000 g 5 мин, супернатант удаляли, к осадку добавляли 5,0 мл ЗБФР, ресуспензировали и центрифугировали в том же режиме;
- полученный осадок ресуспензировали в 0,5 мл ЗБФР и 0,1 мл суспензии переносили в другую центрифужную пробирку, добавляли 0,1 мл ФИТЦ-глобулина, тщательно перемешивали и инкубировали 10 мин при температуре 37°С;
- добавляли в пробирку 3,0 мл ЗБФР, суспензии давали отстояться в течение 5 минут, центрифугировали при 1000 g 5 мин, удаляли супернатант и повторяли такую отмывку еще один раз, осадок однократно отмывали дистиллированной водой и центрифугировали при 1000g 5 мин;
- полученный отмытый осадок ресуспензировали в 0,1 мл дистиллированной воды, наносили на предметное стекло, равномерно распределяя на 1/3 его поверхности, и после высушивания исследовали с использованием флуоресцентного микроскопа, при увеличении ×500. Специфическую флуоресценцию регистрировали в виде зеленоватых включений в нейронах, их отростках, а также за пределами нейронов.

Реакция агглютинации латекса. Для приготовления диагностических латексных препаратов использовали следующие растворы:

1. Для сенсибилизации латексных частиц готовили 0,1 М глицин-солевой буферный раствор с 0,15 М NaCl, pH 8,0. Для приготовления раствора 3,75 г глицина и 4,38 г NaCl растворяли в 400,0 мл бидистиллированной воды, устанавливали pH до 8,0 с помощью 1 н NaOH и доводили конечный объем до 500,0 мл. Раствор фильтровали через фильтр DURAPORE (Millipore), с диаметром пор 0,22 мкм, хранили при температуре от 2ºС до 8ºС. Для приготовления 1 н NaOH 2 г щелочи растворяли в 50,0 мл бидистиллированной воды.

2. Для блокирования незанятых сайтов связывания на поверхности латексных частиц готовили глицин-белковый буферный раствор. Для этого к глицин-солевому буферному раствору добавляли 0,5% не иммунной сыворотки лошади, которую предварительно центрифугировали при 6000 g или фильтровали через фильтр DURAPORE (Millipore) с диаметром пор 0,22 мкм. Раствор хранили при температуре от 2ºС до 8ºС не более трех дней.

3. Для хранения приготовленных латексных препаратов использовали глицин-белковый буферный раствор с добавлением азида натрия (NaN_3) до конечной концентрации 0,01%.

Для оценки специфической активности антител кролика против РНП ВБ в ИФА и определения степени связывания антител с латексом использовали следующие растворы:

1. Для сенсибилизации иммунологического планшета использовали карбонатно-бикарбонатный буфер, pH 9,6 (Sigma), приготовленный в соответствии с инструкцией к препарату.

2. Для промывки лунок иммунологических планшетов и разведения тестируемых антител использовали 0,01 М трис-HCl буферный раствор с 0,15 М NaCl, pH 7,4±0,2 с добавлением 0,1% твина-20. Буферный раствор готовили растворением в 800,0 мл бидистиллированной воды 1,21 г триса-

(гидроксиметиламинометана) и 8,76 г NaCl, устанавливали pH концентрированной соляной кислотой, доводили объем до 1000,0 мл бидистиллированной водой, полученный раствор фильтровали через фильтр DURAPORE (Millipore) с диаметром пор 0,45 мкм. В приготовленном растворе растворяли 1,0 мл твина-20. Раствор хранению не подлежит.

3. Конъюгат антивидовых антител с пероксидазой разводили до рабочей концентрации в промывочном трис-HCl буферном растворе, в который добавляли 5% не иммунной сыворотки лошади.

4. В качестве субстрата для пероксидазы использовали раствор ортофенилендиамина (ОФД). Для его приготовления растворяют таблетку ОФД (5 мг) в 10,0 мл 0,1 М цитратного буферного раствора, pH 5,0, и добавляли 0,25 мл 1% водного раствора перекиси водорода. Готовый раствор ОФД использовали немедленно.

5. 0,1 М цитратный буферный раствор, pH 5,0 готовили растворением 3,57 г натрия лимоннокислого ($Na_3C_6H_5O_7 \times 5,5H_2O$) в 80 мл бидистиллированной воды, устанавливали pH концентрированной соляной кислотой и доводили объем до 100,0 мл бидистиллированной водой. Полученный раствор фильтровали через фильтр DURAPORE (Millipore), с диаметром пор 0,45 мкм, фасовали по 10,0 мл и хранили при минус 20°C.

6. В качестве стоп-раствора использовали 3 н водный раствор серной кислоты. Раствор готовили добавлением 8,34 мл кислоты к 100,0 мл бидистиллированной воды.

7. Для восстановления сухих положительного и отрицательного контрольных препаратов содержимое ампулы растворяли в 0,5 мл бидистиллированной воды. Для подготовки проб патологического материала к исследованию использовали трис-солевой буферный раствор, который готовили растворением в 400,0 мл дистиллированной воды 9,08 г триса-(гидроксиметиламинометана) и 4,38 г NaCl, устанавливали pH 7,6 концентрированной соляной кислотой, доводили объем до 500,0 мл

бидистиллированной водой, фильтровали через фильтр DURAPORE (Millipore) с диаметром пор 0,45 мкм. Раствор хранили при 4°С.

Для сенсибилизации латексных частиц антителами против РНП ВБ исходные латексные препараты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин. Готовили 3% латексную суспензию (по сухому веществу), для этого необходимое количество латексной суспензии (в зависимости от запланированного объема диагностикума) после перемешивания переносили в центрифужную пробирку и разводили ее пятикратным объемом глицин-солевого буферного раствора. Центрифугировали при 5000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадок ресуспендировали в глицин-солевом буферном растворе в конечном объеме, чтобы получить 3% суспензию.

Сенсибилизацию латекса специфическими антителами проводили в соотношении 1:1 по объему. Готовили раствор специфических антител в глицин-солевом буферном растворе с концентрацией 0,5 мг/мл в объеме, равном объему 3% латексной суспензии, фильтровали через фильтр DURAPORE (Millipore) с диаметром пор 0,22 мкм. Далее препарат латекса добавляли по каплям к раствору антител при осторожном перемешивании на магнитной мешалке и инкубировали 2 ч при 37°С с перемешиванием. По окончании инкубации полученную смесь выдерживали 18-20 ч при 4°С в статическом состоянии.

Сенсибилизированные латексные частицы отмывали от оставшихся свободных антител и блокировали незанятые сайты связывания на поверхности карбоксилированных полистирольных сфер следующим образом: сенсибилизированный латекс центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин; надосадочную жидкость использовали для определения остаточных количества белка и активности специфических антител в иммуноферментном анализе; к осадку приливали 5-кратный объем глицин-белкового буферного раствора и инкубировали в течение 15 мин при перемешивании или встряхивании в условиях комнатной температуры. После этого смесь центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин. Эту процедуру повторяли дважды. Конечный осадок

ресуспендировали в глицин-белковом буферном растворе в объеме исходной смеси с добавлением 0,01% азида натрия. Концентрация латексных частиц в приготовленном препарате составляла 1,5%. Полученный диагностикум хранили при 4°С в течение одного года, периодически перемешивая. Степень сорбции антител к поверхности латексных частиц определяли двумя методами.

Спектрофотометрический метод. В надосадочной жидкости после сенсибилизации и центрифугирования латексных препаратов определяли концентрацию остаточного белка при длине волны 280 нм, умножали полученный результат на коэффициент разведения и подставляли в формулу:

(1 - концентрация антител после сорбции / концентрация антител до сорбции) × 100%.

Метод иммуноферментного анализа. Лунки иммунологического планшета сенсибилизировали раствором РНП ВБ в карбонатно-бикарбонатном буферном растворе, pH 9,6 с концентрацией 5 мкг/мл в течение 18 ч при 4°С. После сенсибилизации планшет отмывали 5 раз трис-HCl буферным раствором с добавлением 0,1% твина-20.

В лунки первого горизонтального ряда вносили в двух или трех повторностях по 200 мкл препаратов антител (исходный раствор антител и надосадочный раствор антител после сенсибилизации латексных препаратов) в разведении 1:1000 в трис-HCl буферном растворе с добавлением 0,1% твина-20 и титровали их в вертикальных рядах с шагом 2. Инкубировали 2 часа при 37°С.

После трехкратной отмывки в лунки планшета вносили по 100 мкл антивидового пероксидазного конъюгата в рабочем разведении в трис-HCl буферном растворе с добавлением 5% не иммунной сыворотки лошади и 0,1% твина-20. Инкубировали 1 час при 37°С. После пятикратной отмывки вносили раствор ОФД по 100 мкл на лунку. Инкубировали 20 мин при комнатной температуре без доступа света. Реакцию останавливали добавлением 3 н раствора серной кислоты по 50 мкл на лунку. Результаты учитывали на многоканальном спектрофотометре при длине волны 492 нм.

Концентрацию антител в пробах определяли с помощью уравнения

линейной регрессии, рассчитанному по результатам титрования раствора антител до и после сенсибилизации латексных частиц.

Подготовка материала к исследованию. Готовили 30% (масса/объем) суспензию ткани из разных отделов головного мозга животных (продолговатый мозг, мозжечок, аммонов рог, кора), взятых в равных долях, в трис-солевом буферном растворе. Гомогенизировали, замораживали при минус 18-20ºС в течение не менее 30 мин. После оттаивания (во время оттаивания суспензию интенсивно встряхивали) часть материала переносили в центрифужные пробирки объемом 1,5-2,0 мл и прогревали при 56ºС для его инактивации. Затем центрифугировали при 1300 g в течение 30 мин. Для постановки реакции использовали надосадочную жидкость.

Постановка реакции агглютинации латекса. Препарат латексного диагностикума выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин. и перед использованием тщательно перемешивали. Для постановки реакции использовали стекла размером 24×11 см с ровной поверхностью, обезжиренной 96%-м этиловым спиртом. На стекла перманентным маркером наносили круги диаметром 2,5 см в количестве, равном количеству проб, включая контрольные препараты. Круги маркировали номерами проб. В центр кругов вначале вносили по 50 мкл суспензии испытуемых проб и контрольных препаратов (рис. 22), затем по 10 мкл латексного диагностикума.

После добавления к каждой пробе латексного препарата перемешивали, распределяя смесь равномерно на поверхности 80-90% от площади круга. В качестве положительного и отрицательного контрольных препаратов использовали 30%-ю суспензию ткани головного мозга кролика или мыши, инфицированных вирусом бешенства штамма «CVS» и неинфицированных. Специфическая активность положительного контрольного препарата в РИФ должна составлять не менее +++.

Для контроля спонтанной агглютинации использовали трис-солевой буферный раствор. Реакцию проводили в течение 10 мин при комнатной

температуре, непрерывно перемешивая реакционную смесь покачиванием стекла.

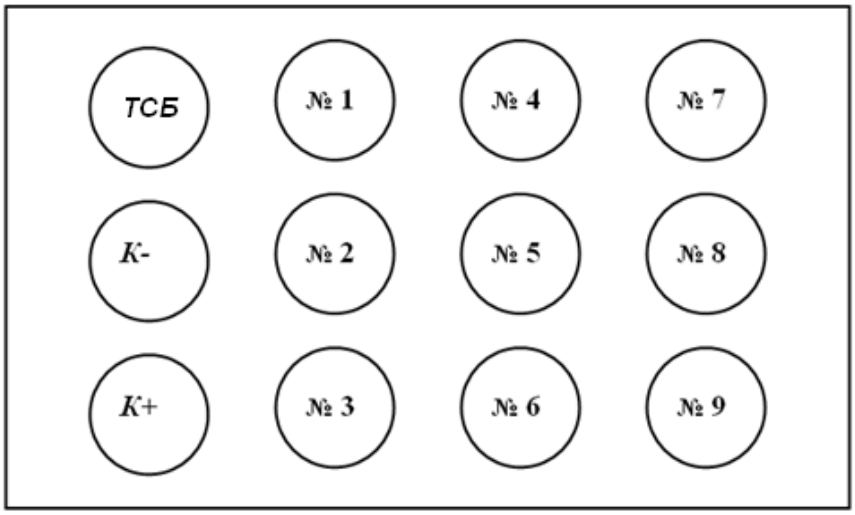


Рисунок 22 – Схема расположения на стекле контрольных препаратов и исследуемых проб при проведении реакции агглютинации латекса. «К+» и «К-» - положительный и отрицательный контрольные препараты, ТСБ – трис-солевой буферный раствор. Цифрами обозначены номера исследуемых проб.

Учет и интерпретация результатов реакции. Реакцию учитывали в течение первых 10 мин. Результаты оценивали визуально по системе 4 крестов:

++++ - крупнозернистая агглютинация на фоне прозрачной жидкости;

+++ - мелкозернистая агглютинация на полупрозрачном фоне;

++ - мелкозернистая агглютинация на мутном фоне;

+ - слабозаметная агглютинация на мутном фоне;

- - агглютинация отсутствует, фон равномерно мутный.

Результаты учитывали с помощью бинокулярной лупы при интенсивном освещении, поместив стекло на черный фон.

Положительным результатом считали агглютинацию на ++-++++ креста. Агглютинацию, оцененную на один крест, считали сомнительным результатом. В этом случае исследование с данной пробой, подготовленной заново, повторяли. При этом для реакции брали 60 мкл осветленной суспензии ткани головного мозга и результаты учитывали через 15 мин. В случае получения

аналогичного результата, пробу исследовали другими методами. Отсутствие агглютинации в пределах установленного времени считали отрицательным результатом.

Валидация теста с помощью контрольных препаратов. Реакцию считали правильной и подлежащей учету, если: с положительным контрольным препаратом наблюдали агглютинацию на 3-4 креста (рис. 23 А); с отрицательным контрольным препаратом агглютинация отсутствовала (рис. 23 В); с трис-солевым буферным раствором агглютинация отсутствовала (рис. 23 С).

A. B. C.

Рисунок 23 – Микрофотографии результатов реакции агглютинации латекса. А – агглютинация с положительным контролем; отрицательный контроль, агглютинация отсутствует; тест на спонтанную агглютинацию, агглютинация отсутствует. Увеличение × 40.

В случае невыполнения одного из пунктов, тест повторяли, строго соблюдая все условия проведения реакции.

Выявление антигена вируса бешенства в ткани головного мозга животных иммуногистохимическим методом.

Обезвоживание образцов ткани и заливка их парафином. Для обезвоживания тканей использовали этанол и хлороформ. Фиксированные формалином пробы головного мозга разрезали на фрагменты толщиной 4-5 мм и помещали в гистологические кассеты для последующего обезвоживания и пропитывания парафином. Мозг мелких грызунов брали целиком и разрезали поперек. При поступлении проб головного мозга от крупных животных в работе использовали фрагменты стволовой части, аммонова рога, мозжечка и коры больших полушарий.

Процесс обезвоживания и пропитывания парафином проводили по по схеме, представленной в таблице 4. Работу проводили с использованием тканевого процессора модели ТРС-15 (Medite, Германия).

Таблица 4 – Процедура обезвоживания и пропитывание парафином с воском образцов ткани головного мозга

Вещества, используемые для обработки	**№ этапа**	**Температура (°С)**	**t^1, (часы)**
этанол 70%	I	20-25	2
	II	20-25	3
этанол 90%	I	20-25	6
	II	20-25	6
этанол 100%	I	20-25	3
	II	20-25	3
	III	20-25	6
хлороформ	I	20-25	6
	II	20-25	6
	III	20-25	10
парафин	I	62	8
смесь 95% парафина и 5% воска	II	60	8 в вакууме

t^1 – время проведения операции

Заливка образцов ткани в парафиновые блоки. Работу проводили с использованием тканевого процессора модели TBS-88 производства фирмы (Medite, Германия). Блок ткани головного мозга после пропитывания парафином извлекали из кассеты и помещали в емкость для заливки. На подготавливаемый образец помещали стенку гистологической кассеты, которая на этапе получения срезов используется для закрепления блока ткани в микротоме и заливали смесью 95% парафина с 5% воска при температуре 65°С. После заливки гистологический блок охлаждали, не допуская кристаллизации парафина. Полученный гистологический блок очищали от избытка застывшего парафина и хранили при комнатной температуре до исследования.

Подготовка срезов для иммуногистохимического окрашивания. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм получали с использованием ротационного микротома модели Microm HM 335E. Полученные срезы расправляли на поверхности воды при температуре 40-45°С и перемещали на предметные стекла, предварительно обработанные 0,1% водным раствором

поли-L-лизина или раствором аминоалкилтриэтоксисилана (Silane-prep slides, Sigma, P-0425). Полученные микропрепараты инкубировали в термостате при температуре 37°С в течение 16-18 ч. Затем проводили депарафинизацию микропрепаратов в соответствии с процедурой, представленной в таблице 5 с использованием процессора DRS-601.

Таблица 5 – Процедура депарафинизации микропрепаратов

Стадия	**Обработка**	**t^1, минут**
I	ксилол	2×3
II	абсолютный этанол	2×2
III	70% этанол	1
IV	вода	2

t^1 – время проведения операции

Иммуногистохимическое окрашивание исследуемых микропрепаратов проводили с одновременной обработкой положительного и отрицательного контрольных препаратов ткани мозга животных.

Определение оптимального разведения диагностического иммуноглобулина. Оптимальное разведение иммуноглобулина определяли путем окрашивания срезов головного мозга здоровых и больных бешенством животных с использованием серии десятикратных разведений испытуемого иммуноглобулина в интервале от 1:200 до 1:2000. Пригодными для дальнейшего применения (определения антигенов ВБ в ткани мозга иммуногистохимическим методом) считали только те иммуноглобулины, которые в разведении не менее 1:500 обеспечивали интенсивное окрашивание скоплений вирусного РНП в нейронах, их отростках или между глиальными клетками при условии, что заметное фоновое окрашивание в отрицательных контрольных препаратах определяется в разведении, не превышающем 1:200. Рабочим разведением иммуноглобулина считали разведение, которое обеспечивает высокую интенсивность окрашивания антигенов ВБ в положительных контрольных препаратах и отсутствие фона в отрицательных контрольных препаратах. Рабочие разведения иммуноглобулинов, как правило, составляли от 1:500 до 1:2000.

Обработка препаратов протеиназой К и перекисью водорода. Обработку препаратов протеиназой К выполняли с целью демаскирования скоплений РНП ВБ в нейронах и ткани мозга, а перекисью водорода – с целью удаления эндогенных пероксидаз. Фиксированные на предметных стеклах препараты отмывали от парафина и помещали в раствор, состоящий из 0,1 М NaCl и 0,02 М Na-фосфатного буферного раствора (ФБР), pH 7,4, на 3-5 мин. Затем препараты обрабатывали раствором протеолитического фермента, добавляя по 0,25 мл 0,01% раствора протеиназы К (Sigma, США) приготовленной на ФБР, инкубировали при температуре 37ºС в течении 15-20 мин с последующей промывкой ФБР дважды по 5 мин.

Затем гистологические срезы обрабатывали 3%-м раствором перекиси водорода, нанося его на микропрепараты в объеме 0,25 мл. Микропрепараты инкубировали при комнатной температуре 5 мин с помощью фильтровальной бумаги удаляли раствор перекиси водорода и промывали препараты ФБР дважды по 5 мин.

Реакция с антирабическим иммуноглобулином. Неспецифически связывающие участки ткани мозга блокировали 5% раствором БСА или 10% нормальной сывороткой крови лошади, приготовленными на ФБР. Блокирующий раствор наносили на препараты в объеме 0,25 мл и инкубировали во влажной камере при температуре 37ºС в течение 1 ч. Затем препараты промывали дважды по 5 мин ФБР. Остатки промывающего раствора удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Раствор антирабического иммуноглобулина, приготовленный на ФБР в рабочем разведении, наносили на микропрепараты и инкубировали во влажной камере при температуре 37ºС в течении 2 ч или при температуре 4ºС - 12-18 ч. После инкубации препараты промывали ФБР трижды по 5 мин.

Реакция с антивидовыми биотинилированными антителами. Раствор, содержащий биотинилированные антитела, полученные против полной молекулы IgG кролика (Sigma, США) разбавляли ФБР в соответствии с

рекомендациями производителя и наносили на микропрепараты в объеме 0,25 мл, затем инкубировали во влажной камере 1 ч при температуре 37ºС. После инкубации препараты промывали ФБР трижды по 5 мин.

Реакция с конъюгатом экстравидин-пероксидаза. Конъюгат экстравидин-пероксидаза (Sigma, США) разбавляли ФБР согласно рекомендации производителя и наносили на микропрепараты в объеме 0,25 мл, помещали их во влажную камеру и инкубировали в течение 30-40 мин при температуре 37ºС. После инкубации препараты промывали ФБР трижды по 5 мин.

Окрашивание диаминобензидином. Непосредственно перед использованием готовили раствор следующего состава: 0,04% диаминобензидина (Sigma, США) и 0,012% перекиси водорода на 0,1 М Na-ацетатном буферном растворе, pH 5,6. Раствор наносили на препараты в объеме 0,25 мл и инкубировали при температуре 20-22ºС в течение 5–20 мин. При проведении реакции в местах локализации антигена ВБ и связанных с ним комплексов из антирабических антител, антивидовых биотинилированных антител и конъюгата экстравидин-пероксидаза образуется нерастворимый продукт окисления диаминобензидина, имеющий при микроскопическом исследовании с использованием светового микроскопа коричневую окраску. Реакцию останавливали трехкратным промыванием дистиллированной водой. Затем препараты помещали в дистиллированную воду на 2-3 мин.

Окрашивание клеточных структур гематоксилином. Для визуализации клеточных структур при микроскопическом исследовании проводили их окраску гематоксилином с применением автоматического окрашивающего процессора модели DRS-601. С этой целью использовали водный раствор гематоксилина по Мейеру. Предметные стекла с микропрепаратами погружали в раствор гематоксилина и инкубировали в течение 1-2 мин. Затем микропрепараты промывали водой 2-3 раза по 2 мин.

Оценка препаратов методом оптической микроскопии и интерпретация результатов. После промывания на микропрепараты наносили 40-50 мкл смеси

90% глицерина с 10% ФБР и накрывали покровным стеклом. Препараты исследовали с использованием оптического светового микроскопа при увеличении ×40-400. В результате иммуногистохимического окрашивания по вышеприведенной методике структуры мозга исследуемых животных, не содержащие антигены ВБ, окрашивались в сине-лиловый цвет различной интенсивности (ядра клеток окрашиваются интенсивно, цитоплазма менее интенсивно), а скопления белка ВБ – в интенсивный золотисто-коричневый или темно-коричневый цвет, в зависимости от их концентрации (рис. 24).

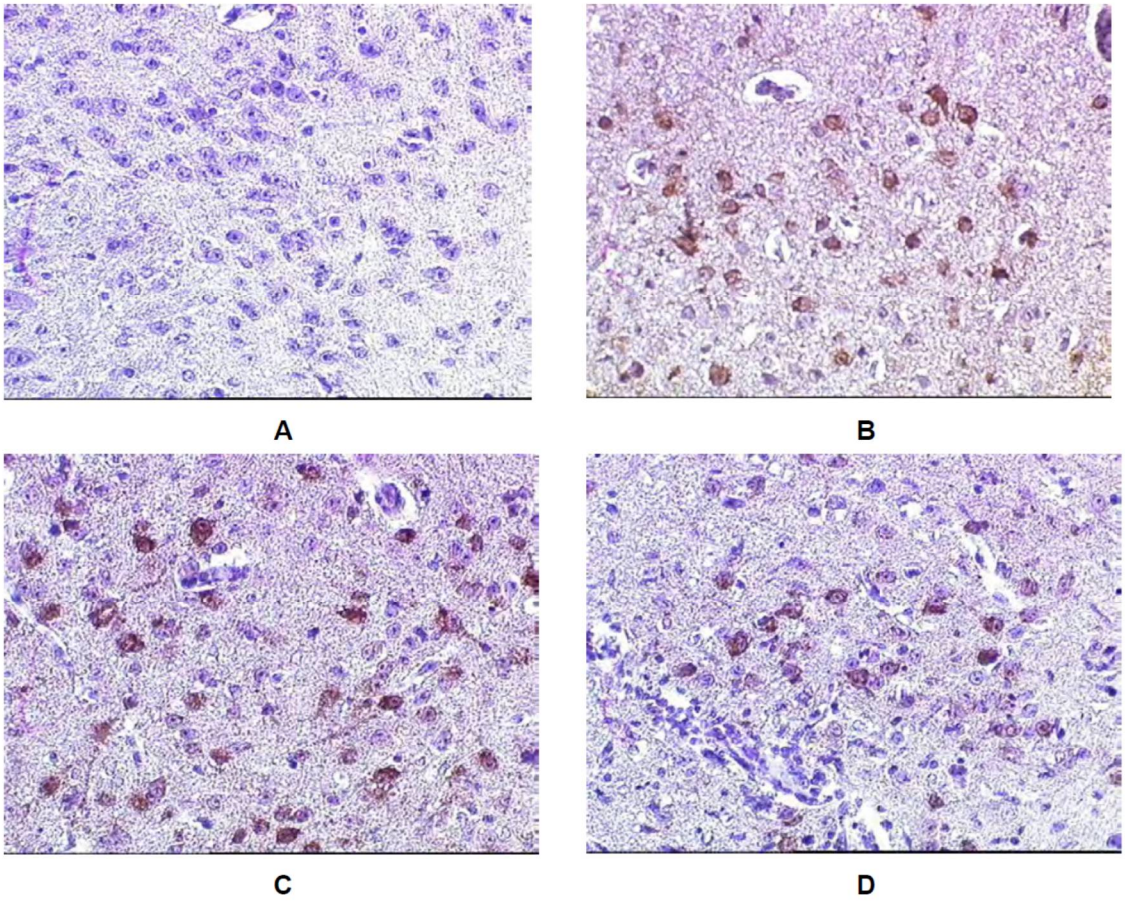


Рисунок 24 – Антиген вируса бешенства в ткани мозга мыши, интрацеребрально инфицированной вирусом бешенства. Штамм «CVS» ВБ, локализованный в перикарионах и отростках нейронов, окрашен продуктом окисления диаминобензидина в коричневый цвет, прочие клеточные структуры окрашены гематоксилином в синий цвет. A – препарат мозга неинфицированной мыши, разведение RIgG 401 в 200 раз, видны только нормальные клеточные структуры, фон отсутствует; B – препарат мозга мыши, инфицированной ВБ, разведение RIgG 401 в 500 раз; C – то же, разведение RIgG 401 в 1000 раз; D – то же, разведение RIgG 401 в 2000 раз.

В препаратах мозга животных, больных бешенством, наблюдали скопления антигенов ВБ в перикарионах и отростках нейронов, а также в ткани мозга вблизи инфицированных нейронов. В разных частях мозга наблюдали поражение отдельных нейронов или их большинства. При иммуногистохимическом анализе препаратов мозга неинфицированных бешенством животных в перикарионах и отростках нейронов отсутствовали структуры, специфично окрашенные в коричневый цвет. На снимках B, C и D рисунка 24 видны характерно окрашенные в коричневый цвет перикарионы и отростки нейронов, инфицированных вирусом бешенства.

Биопроба на мышах. Постановку биопробы на мышах проводили в соответствии с ГОСТ 26075-2013 «Методы лабораторной диагностики бешенства». Для этого готовили 20%-ю суспензию головного мозга на среде Игла, проводили 1 цикл замораживания и оттаивания, после чего центрифугировали при 1000 g в течение 5 мин. Полученный супернатант использовали для заражения мышей. Для исследования каждой пробы использовали по 10 мышей. Мышей заражали интрацеребрально в объеме 0,03 мл и подкожно в область верхней губы в объеме 0,3 мл. За зараженными мышами наблюдали в течение 30 сут. Гибель мышей в первые 48 ч после заражения считали не специфической. Специфичность гибели животных в более поздние сроки подтверждали путем исследования проб головного мозга в РИФ.

Выделение ВБ в культуре клеток. В работе использовали методы выделения ВБ в культуре клеток, опубликованные ранее Kulonen et al., 1991 и в OIE Manual, 2017 с некоторыми изменениями, заключающимися в фильтровании через одноразовый фильтр Schleicher&Schuel FP 30/0,45 CA-S супернатанта, полученного после центрифугирования 10% суспензии головного мозга при 1000 g. Выделение вируса проводили в культуре клеток нейробластомы мыши (MNA, Denmark) с добавлением DEAE-декстрана (Sigma, молекулярная масса 500 000).

Планшеты и матрасы инкубировали при 37ºС в атмосфере 5% CO_2

в течение 4 сут, ежедневно контролируя образование монослоя и наличие контаминации с помощью инвертированного светового микроскопа. При необходимости проводили повторные пассажи. Суспензии, приготовленные из головного мозга здоровой собаки, использовали в качестве отрицательного контроля.

Определение уровня антирабических вируснейтрализующих антител. Уровень антирабических ВНА в сыворотках крови определяли в реакции подавления иммунофлуоресценции в культуре клеток ВНК-21 в соответствии с «Методическими указаниями по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (FAVN)» (Чернышова с соавт., 2011) и «Методическими рекомендациями по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови диких плотоядных животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (RFFIT)» (Чернышова с соавт., 2016).

Обратно-транскиптазная ПЦР (ОТ-ПЦР) при проведении исследований в России и Финляндии. Суммарную вирусную РНК выделяли из 10%-й суспензии головного мозга с использованием набора для выделения РНК RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Великобритания) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученный раствор суммарной РНК хранили в присутствии ингибитора РНКазы (Applied Biosystems) при минус 70ºС. Синтез кДНК проводили с использованием 5 мкл очищенной суммарной РНК при 37ºС в течение 90 мин. Для этого к 5 мкл раствора, содержащего РНК, добавляли 150 ед. обратной транскриптазы MuLV (Applied Biosystems), 5 пмоль универсального праймера (Random Hexamers, Applied Biosystems), 1 мкл 10 мМ смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP, Finnzymes), 2,8 мкл 25 мМ раствора хлорида магния (Sigma), 20 ед. ингибитора РНКазы (Applied Biosystems), 2 мкл 10-кратного буфера для обратной транскриптазы MuLV и добавляли воду до конечного объема 15 мкл. Остаточную активность обратной транскриптазы

инактивировали при температуре 98ºС в течение 5 мин. Полученные кДНК хранили при температуре минус 70ºС до проведения дальнейших исследований. В работе использовали несколько систем праймеров для идентификации генома (на консервативный фрагмент N-гена, на вариабельный фрагмент G-гена и ψ-региона) и для амплификации G-гена, а также для проведения нуклеотидного секвенирования полного генома вакцинных штаммов вируса бешенства «РВ-97» и «Eth_PV» (табл. 6).

Таблица 6 – Характеристика праймеров, применяемых для амплификации фрагментов полного генома

Называние праймера	**Последовательность праймеров в направлении 5'-3'**	**Длина**	**Локализация[1]**
1R	AAC CCA GTA AAC GAT ACC A	19	804-786
G0341	ACT CTA ATG ACA ACT CAC AA**R**[2] ATG TG	26	626-651
G0342	AGT GAA TGA GAT TGA ATA CAT GAC C	25	1008-986
2F	CCT AGG CTT GAG TGG GAA G	19	943-961
2R	TCT CTC TGA GAA GGA GTG	18	2008-1991
14F	GAG ATT ATA TCC TAT GTC ACT G	22	1883-1904
14R2	ACT AAC CCA ATC ATC CTA TG	20	2773-2754
13F	ATC GCT ATA CAT CTT GCT AAC	21	2388-2408
13R	CAG GTT GGT GCA TCC TTC G	19	3487-3469
6F2[#]	GTG CCA TTA AAC CGC TGC AT	20	3210-3229
6R[#]	ACT TGG AGA TAT GAT AAC G	19	3790-3772
3F	CAG ATA TGA AGA GTC TCT A	19	3694-3711
3R	CGT TGC GTA GAT TCT GGT C	19	4791-4773
G0326	ATG AAA GCA CCG TTG GTC ACT G	22	4665-4687
G0327	GGG AAG GTC ATA TCT TCA TGG G	22	5543-5520
4F	TGC ATC TCA GCG AAG TAT G	19	5300-5318
4R	GAA AGT CTC CCA AGG AAT G	19	6403-6385
7F	TCG CTG GGG ATC AAG TCT TG	20	6265-6285
7R	TCC AGG TGA AAT GCA TAT GTG	21	7277-7256
8F	CAT GAC AGA CAA YCT GAA C	19	7175-7194
8R	TTC TAG AAG GCG AGT GAA G	19	8310-8291
15F	CTC CTG CAT CTC CAA CGA TC	20	7859-7878
15R	CTC AGT GAG CTC TTC AGC T	19	8505-8524
9F	AGT CCT GGA TTC ACG CGT TG	20	8225-8245
9R2	GCA TAA AGC ATC AAT GGC TG	20	9288-9269
10F	AGT CAC TAA TGT TCA TGT GG	20	8971-8991
10R	ATT CTC TGG AGA CGC CGT GA	20	9994-9974
11F	ATG AAA GAA GGC AAC AGA T	19	9908-9927
11R	ARA GTG GTC CAT CTA TAG AC	20	10899-10879
12F	GAA GTT ACT GAC ATT GCA TC	20	10821-10841
END_Oligo	5'-CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT **ACG CTT AAC AA**-3'*	35	---

*F – прямой праймер, R – обратный праймер; [1]Локализация обозначена в соответствии с последовательностью штамма «SAD B19» (#EF2016709). [2]**R** – нуклеотиды A и G.

Расчет праймеров проводили на основании нуклеотидных последовательностей геномов ВБ, опубликованных в базах данных GeneBank и полученных в рамках данного исследования. В ряде случаев использовали праймеры, опубликованные в научной литературе. С использованием полученных праймеров были амплифицированы фрагменты N- гена (праймеры G0341 и G0342), G-Ψ-L-региона (праймеры G0326 и G0327 длиной 360 и 260 нуклеотидов соответственно).

Все ПЦР-смеси включали 5 мкл 10-кратного буфера для ДНК-полимеразы, 5 пмоль каждого праймера, 1 ед. Dynazyme II ДНК полимеразы (Finnzymes) и 1 мкл 10 мМ dNTP. К полученной смеси добавляли воду до конечного объема 50 мкл. Проводили 35 циклов амплификации на программируемом амплификаторе PTC-100. Каждый цикл амплификации включал денатурацию кДНК при 94ºС в течение 1 мин, отжиг праймеров при 55ºС в течение 1 мин. и полимеризацию при 72ºС в течение 1 мин. Для амплификации протяженных фрагментов генома (при секвенировании полного генома штаммов ВБ) время полимеризации увеличивали до 1,5 мин.

Анализ продуктов ПЦР проводили в 2% агарозном геле (Nu Sieve®) в присутствии этидиум бромида с применением горизонтального гель-электрофореза при напряжении 100V в течение 60 мин. В качестве ДНК-маркера при анализе ПЦР-продуктов на агарозном геле использовали DNA Ladder (Invitrogen).

Для контроля возможной контаминации компонентов реакции фрагментами вирусной РНК или кДНК, начиная с этапа выделения суммарной РНК, использовали отрицательный контрольный препарат. В качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду и суспензию головного мозга здоровой собаки. Контрольные и тестируемые пробы подвергались аналогичной обработке.

Очистку ПЦР-продуктов, подлежащих нуклеотидному секвенированию, проводили с использованием набора MicroSpin S-400HR (Amersham Pharmacia

Biotech, США). Очищенные ПЦР-продукты секвенировали в двух направлениях с применением соответствующих праймеров, используемых для постановки ПЦР. Автоматическое секвенирование проводили в лаборатории синтеза и секвенирования ДНК Института биотехнологии хельсинского университета (г. Хельсинки, Финляндия) с использованием 16-капиллярного автоматического секвенатора ABI 3100 и набора BigDye Terminator Cycle Sequencing в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (Applied Biosystems, Foster City, CA, США), а также в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Диагностическая ПЦР и нуклеотидное секвенирование фрагментов генома изолятов вируса бешенства в Камбодже. Диагностический метод на основе полугнездовой ПЦР для первоначальной детекции фрагментов генома консервативного региона L-гена при подтверждении результатов исследования в РИФ использовался в соответствии с ранее опубликованным протоколом (Dacheux et al., 2008).

С целью получения ампликонов для последующего нуклеотидного секвенирования проводили ПЦР с использованием двух пар праймеров к гену нуклеопротеина ВБ (табл. 7), используя ранее опубликованный протокол (Dacheux et al., 2008).

Таблица 7 – Праймеры, используемые для ПЦР и нуклеотидного секвенирования гена нуклеопротеина вируса бешенства

Название праймера	**Последовательность праймера 5’ - 3’**	**Происхождение**
Диагностическая ПЦР		
PV 05m	ATG ACA GAC AA**Y*** **Y**TG AAC AA	Dacheux L. et al., 2008
PV 09	TGA CCA TTC CA**R** CA**R** GT**N** G	
PV 08	GGT CTG ATC T**R**T C**W**G A**R**Y AAT A	
β -Taq1	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	
β -Taq2	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	
Нуклеотидное секвенирование гена нуклеопротеина		
RVN-71F	ATGGATGCCGACAAGATTGTATTC	Yang et al., 2011
RVN-1118R	GAATTCCTCTCCCAGATAGCC	
RVN-1091F	CTAGGGGGCTATCTGGGAGA	
RVN-1562R	CGGCCAGACCGGCTCTAACAC	

***Y** – нуклеотиды T и C; **R** – нуклеотиды G и A; **W** – нуклеотиды A и T; **N** – нуклеотиды A, T, C, G.

Целевой размер ПЦР-продукта после второго раунда ПЦР составлял 250 н.о. Положительные и отрицательные контроли (дистиллированная вода и заведомо положительная на бешенство проба головного мозга собаки) использовались на всех этапах исследования.

ПЦР с использованием праймеров RVN-71F и RVN-1118R позволяла получить ампликон размером 1048 н.о., а использование второй пары праймеров (RVN-1091F и RVN-1562R) позволило получить ампликон размером 472 н.о. Для проведения нуклеотидного секвенирования методом Сангера прибегали к услугам коммерческой фирмы (Macrogen, Сеул, Южная Корея). Длина нуклеотидных последовательностей, получаемых после обработки с использованием пакета программ CLC Genomics Workbench 3.6.1, составляла 1492 н.о.

Филогенетический и эволюционный анализ. Выравнивание и обработка нуклеотидных последовательностей проводилась с использованием онлайн сервиса Clustal Omega и пакетов программ Jalview 2.8. (Waterhouse et al., 2009), BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999) и GeneDoc 2.6.002 (Nicholas et al., 1997). Филогенетический и эволюционный анализы проводились с использованием пакетов программ MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) и BEAST (Drummond, Rambaut, 2007).

Использовались частичные (позиция 56-454 в соответствии с референтной последовательностью штамма «ERA», GenBank #EF206707) и полные последовательности N-гена изолятов, выделенных в Камбодже, Вьетнаме, Лаосе, Мьянме и Китае, нуклеотидная последовательность вакцинного штамма «PV» использовалась в качестве аут-группы. Наиболее подходящую модель изучения филогенеза выбирали с использованием соответствующей функции пакета программ MEGA 6.0 (Nei, Kumar, 2000; Tamura et al., 2013).

С целью изучения относительной эволюционной динамики ВБ, выделенных в Камбодже и других странах Юго-Восточной Азии, использовался пакет программ BEAST (Drummond, Rambaut, 2007). Для оценки уровня

нуклеотидных замен на сайт определяли время существования ближайшего общего предка (Time to Most Recent Common Ancestor, TMRCA) и строили дерево с использованием модели Maximum Clade Credibility (MCC) на основе полных кодирующих нуклеотидных последовательностей гена нуклеопротеина, используя информацию о годе выделения каждого изолята ВБ.

Тестирование по методу Tajima (Tajima, 1993) для определения равенства уровней эволюции проводилось с помощью пакета программ MEGA 6 для нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. Значение P менее 0,05 использовалось для отвержения нулевой гипотезы одинаковой скорости эволюции между филогенетическими линиями.

Рестрикция ПЦР-продуктов для дифференциации штаммов. Подбор ферментов рестрикции (FERMENTAS) проводился *in silico* с использованием пакета программ NEBcutter V2.0 (Vincze et al., 2003) в соответствии с их структурой рестрикции и предсказанной способностью расщеплять ПЦР-продукты фрагментов генома в позициях 626-1010 (N-ген) и 4835-5115 (G-ген и псевдоген) (табл. 8).

Таблица 8 – Основные характеристики ферментов рестрикции, выбранных для проведения исследований

Название	Целевой участок	Целевая последовательность	t (^{o}C) инкубации	Температура/время инактивации
CfrI	G-Ψ-L*	5'-Py^G G C C Pu-3' 3'-Pu C C G G^Py-5'	37°C	65°C/20 мин
Bsh1236I	G-Ψ-L	5'-C G^C G-3' 3'-G C^G C-5'	37°C	65°C/20 мин
SmuI	G-Ψ-L	5'-C C C G C $(N)_4$-3' 3'-G G G C G $(N)_6$-5'	37°C	65°C/20 мин
SduI	G-Ψ-L	T T A A 5'-G G G C C^C-3' 3'-C^C C G G G-5' T T A A	37°C	65°C/20 мин
Eco31I	N**	5'-G G T C T $C(N)_1$^-3' 3'-C C A G A $G(N)_5$^-5'	37°C	65°C/20 мин
BstXI	G-Ψ-L	5'-C C A N N N N N^N T G G-3' 3'-G G T N^N N N N N A C C-5'	55°C	65°C/20 мин
Bc1I	N	5'-T^G A T C A-3' 3'-A C T A G^T-5'	55°C	80°C/20 мин

G-Ψ-L * - фрагмент гена гликопротеина и псевдогена (не кодирующий участок генома); N** - ген нуклеопротеина.

Для получения ПЦР-продуктов проводили ОТ-ПЦР. Постановку реакции рестрикции проводили с использованием безнуклеазных стерильных пробирок объемом 0,25 мкл, для этого готовили реакционные смеси в соответствии с протоколом, изложенным в таблицах 9 и 10.

Таблица 9 – Состав реакционной смеси для постановки реакции рестрикции для рестриктаз CrfI, Bsh1236I, SmuI, SduI, Eco31I

Компонент	**SAD B19 (G-Ψ-L*)**	**PB-97 (G-Ψ-L)**	**PB-97 (G-Ψ-L)**	**RABV 12_2005 (G-Ψ-L)**	**RABV 12_2005 (N**)**
ПЦР-продукты	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
10×Буфер***	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
Рестриктаза	CrfI 1µl	Bsh1236I 1 µl	SmuI 1 µl	SduI 1 µl	Eco31I 2 µl
Безнуклеазная вода	16 µl	16 µl	16 µl	16 µl	15 µl
Объем	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl

G-Ψ-L * - фрагмент гена гликопротеина и псевдогена (не кодирующий участок генома); N** - ген нуклеопротеина; ***Буферные растворы десятикратной концентрации Tango™/R/SduI/G в соответствии с рекомендациями производителя. Реакция рестрикции проводилась при температуре 37°С в течении 2 ч., инактивация остаточной активности ферментов проводилась при 65°С в течении 20 мин.

Таблица 10 – Состав реакционной смеси для постановки реакции рестрикции для рестриктаз BstXI и Bs1I

Компонент	**SAD B19 (G-Ψ-L*)**	**PB-97 (N**)**
ПЦР-продукты	10 µl	10 µl
10×Буфер***	3 µl	3 µl
Рестриктаза	BstXI 1µl	Bs1I 1 µl
Безнуклеазная вода	16 µl	16 µl
Объем	30 µl	30 µl

G-Ψ-L * - фрагмент гена гликопротеина и псевдогена (не кодирующий участок генома); N** - ген нуклеопротеина; ***Буферные растворы десятикратной концентрации O/G в соответствии с рекомендациями производителя. Реакция рестрикции проводилась при температуре 55°С в течении 1 ч., инактивация остаточной активности ферментов проводилась при 80°С в течении 20 мин.

Реакция рестрикции проводилась с использованием амплификатора ПЦР. Для визуализации результатов проводился горизонтальный гель-электрофорез.

Инактивация культуральной суспензии вируса бешенства. После оттаивания вирусную суспензию центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин для удаления клеточного дебриса. Инактивацию вируса проводили с использованием формалина в концентрации 1:5000 объем/объем и экспозиции 48 ч при 37°С и периодическом встряхивании.

Определение полноты инактивации вакцины. Испытания проводили на белых мышах массой тела 8-16 г. Для определения полноты инактивации формировали три группы мышей по 8 голов в каждой. Мышей заражали сериями разведений инактивированной вирусной суспензии в объеме 0,03 мл и наблюдали 21 сут. Специфичность гибели животных подтверждали в РИФ. Стерильность вакцины тестировалась путем посева на тиогликолевую среду (срок наблюдения – 48 ч).

Клиническое исследование иммуногенности вакцины на собаках. Двенадцать беспородных собак, после дегельминтизации и карантина в течение 6 мес., были разделены на 3 группы. В первой группе животные были вакцинированы испытуемыми вакцинными препаратами на основе штаммов «ERA» и «Eth_PV» (1,0 мл подкожно). Вторая группа являлась контрольной (без вакцинации). У всех животных отбирали пробы крови до вакцинации, а также на 7, 15, 21, 30, 60, 90 и 120 сут после вакцинации. Полученные сыворотки крови исследовали в РН в культуре клеток ВНК-21 в соответствии с рекомендациями OIE Manual, 2017. Животные, показавшие уровень антирабических ВНА $\geq$ 0,5 МЕ/мл, признавались серопозитивными.

3.2 Результаты собственных исследований

В соответствии с международно-признанной концепцией, мероприятия по борьбе с бешенством животных включают три основных направления: образовательную деятельность, вакцинацию и искоренение заболевания. Данная диссертационная работа описывает три компонента, являющихся основой мероприятий по борьбе с бешенством:

- разработку и внедрение комплекса средств и методов диагностики и мониторинга бешенства;
- молекулярно-биологические исследования полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ;
- разработку мероприятий по борьбе с бешенством на национальном и международном уровне.

3.2.1 Разработка и внедрение мероприятий по диагностике, мониторингу бешенства и оценке эффективности антирабической вакцинации

На первом этапе предстояло разработать требования к системе диагностики и мониторинга бешенства животных. Чтобы быть эффективной, такая система должна охватывать весь спектр лабораторно-диагностической деятельности, начиная с отбора и транспортировки проб, подлежащих лабораторному исследованию, и заканчивая мероприятиями по контролю качества проводимой диагностической работы. В связи с этим работа проводилась в следующих направлениях:

- разработка адаптация и совершенствование инструментов реализации диагностики бешенства: методов и схемы лабораторной диагностики;
- разработка и внедрение программы мониторинга бешенства в регионах Российской Федерации;
- разработка и внедрение системы контроля качества проводимой лабораторной диагностической работы по бешенству в лабораториях федерального и регионального уровней.

3.2.1.1 Разработка схемы лабораторной диагностики бешенства

Схема лабораторной диагностики бешенства направлена на упорядочивание практики применения используемых методов путем их категоризации на уровни, а также унификации условий их применения. Предлагаемая схема предполагает градацию методов на 3 уровня (рис. 25).

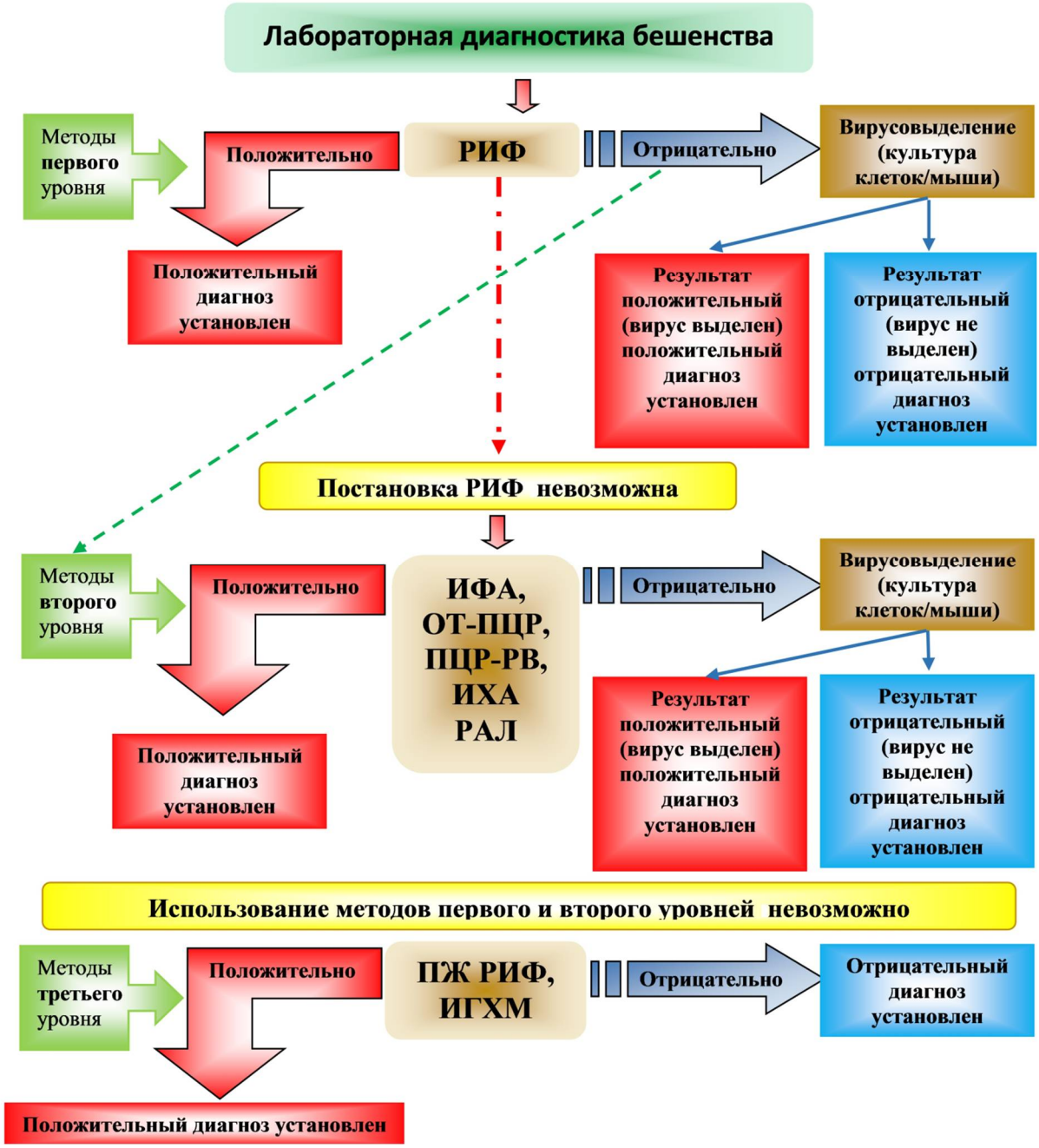


Рис. 25. Схема лабораторной диагностики бешенства с учетом градации на уровни. *РИФ – реакция иммунофлуоресценции, ИФА – иммуноферментный анализ; ОТ-ПЦР – обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени; РАЛ – реакция агглютинации латекса; ПЖ РИФ – прямой жидкофазный вариант РИФ; ИГХМ – иммуногистохимический метод; ИХА – иммунохроматографический анализ.

Первый уровень включает методы лабораторной диагностики, которые в подавляющем большинстве случаев позволяют поставить окончательный диагноз на бешенство: РИФ и выделение вируса в одной из биологических систем (лабораторные животные, культура клеток).

Второй уровень включает методы, позволяющие исследовать большое количество проб при проведении мониторинга бешенства (ИФА, РАЛ), а также проводить подтверждение диагноза на бешенство в случаях, когда применение методов первого уровня не представляется возможным (ИФА, ПЦР, ПЦР-РВ).

Методы лабораторной диагностики третьего уровня рассчитаны на исследование проб головного мозга, консервированных формалином. Применение таких методов в практике региональных диагностических лабораторий не предполагалось, а сами методы разрабатывались в целях дифференциации бешенства и губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота (ГЭ КРС), а также в перспективе для проведения научно-исследовательских работ в области патогенеза данных заболеваний.

3.2.1.2 Разработка и адаптация методов лабораторной диагностики бешенства первого уровня

Отбор и транспортировка проб. С целью унификации отбора и транспортировки патологического материала был проведен комплекс научно-исследовательских работ, результаты которых были суммированы в «Методических указаниях по отбору и пересылке проб головного мозга, сывороток крови и костной ткани с целью диагностики бешенства животных и оценки эффективности оральных антирабических вакцин» (прил. 1). В этих методических указаниях представлены классический метод отбора проб головного мозга путем вскрытия черепной коробки и более безопасный метод отбора через затылочное отверстие с использованием одноразовых пластиковых трубок с пошаговой инструкцией отбора всех видов биоматериала, необходимых для проведения лабораторной диагностики бешенства (пробы головного мозга), серологического мониторинга (пробы крови или трупной жидкости) и оценки

поедаемости оральных антирабических вакцин (пробы тканей костей и зубов).

В целях скорейшей постановки диагноза при поступлении патологического материала для диагностики бешенства используются методы первого уровня.

РИФ. В 2006 г. было получено свидетельство № ПВР-1-2.5/01672 о государственной регистрации Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору разработанного нами ранее «Набора для диагностики бешенства методом иммунофлуоресценции» с правом коммерческой реализации основного компонента набора «Антирабического лиофилизированного иммуноглобулина, меченного флуоресцеинизотиоцианатом» (прил. 2).

Иммуноглобулин получали с использованием кроликов, его высокая активность и специфичность были ранее подтверждены в процессе межведомственных и международных сличительных испытаний (Метлин, 2004). В связи с тем, что учет результатов РИФ зависит от опыта и квалификации ветеринарного врача-диагноста, были разработаны и утверждены «Методические рекомендации для диагностики бешенства животных методом иммунофлуоресценции» (прил. 3).

Анализ основных трудностей, возникающих при постановке РИФ для диагностики бешенства, встречающихся независимо от применяемого диагностического набора (включая неспецифическую флуоресценцию, которая в ряде случаев является причиной постановки ложноположительных результатов), и рекомендуемые пути решения этих проблем представлены в таблице 11.

Следует отметить, что во всех сомнительных случаях следует провести повторные исследования патологического материала (пробы) тем же методом с привлечением других специалистов, либо провести исследование с использованием других методов лабораторной диагностики. При невозможности постановки окончательного диагноза необходимо направить пробу для проведения исследований в ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Таблица 11 – Причины и пути решения проблем, возникающих при постановке РИФ

Проблема	Причины	Пути решения
Ложно-отрицательные или сомнительные результаты	снижение активности ФИТЦ-конъюгата	заменить ФИТЦ-конъюгата
	неправильное разведение ФИТЦ-конъюгата	заново приготовить разведение ФИТЦ-конъюгата
	неисправный микроскоп или неправильно выставленное увеличение	проверить и исправить микроскоп, проверить и скорректировать его увеличение
	высокая степень автолиза патматериала	использовать другой метод диагностики
	недостаточная квалификация	направить специалиста на обучение
Ложно-положительные или сомнительные результаты	неквалифицированный персонал	проверить квалификацию, направить на обучение
	интенсивное неспецифическое свечение	провести: - очистку конъюгата центрифугированием после каждой разморозки - фиксацию ацетоном в течение ночи - промывку дважды по 15 мин фосфатным буфером и однократно 5 мин дистиллированной водой - контрастирование с помощью эванса синего - приготовление «тонких» отпечатков, высушивание пат. материала с помощью салфетки

Выделение вируса. Положительный результат, полученный при постановке РИФ, считается окончательным и дальнейшему подтверждению не подлежит. Отрицательный результат в РИФ должен быть подтвержден одним из существующих методов выделения вируса: на лабораторных мышах (в соответствии с ГОСТ 26075-2013) либо в культуре клеток, для постановки которого были адаптированы и внедрены в диагностическую практику

«Методические рекомендации по выделению вируса бешенства в культуре клеток нейробластомы мыши» (прил. 4).

Данный метод существенно ускоряет и стандартизирует постановку диагноза на бешенство, он более воспроизводим и менее затратен. Результаты вирусовыделения (как положительные, так и отрицательные) считаются окончательными. Он применяется ФГБУ «ВНИИЗЖ» с 2008 г., с целью проведения предварительных его испытаний было проведено исследование ряда проб патологического материала от животных из различных регионов России, а также с использованием аттенуированных и вакцинных штаммов ВБ в сравнении с РИФ и методом биологической пробы на белых мышах.

Результаты выделения ВБ в культуре клеток и на мышах полностью совпали. При использовании культуры клеток в качестве биологической модели установить диагноз удавалось в более короткие сроки. Аналитическая чувствительность разработанного метода составила 1,358 lg $TCID_{50}$/мл, при этом аналогичный показатель для биопробы на мышах составил в 2,358 lg $TCID_{50}$/мл (Чернышова, 2018).

3.2.1.3 Разработка и адаптация методов лабораторной диагностики бешенства второго уровня

Методы второго уровня диагностики могут применяться в случае получения отрицательного результата в РИФ параллельно с постановкой вирусовыделения (с целью ускорения постановки диагноза, так как выделение вируса занимает от 3 до 30 сут), а также в случае невозможности постановки РИФ ввиду плохого качества поступившего на исследование материала.

ИФА. Метод детекции антигенов ВБ в ИФА разрабатывался в качестве замены устаревшей РДП. Он позволяет исследовать патологический материал любого качества, а также проводить одновременное исследование большого количества проб и предполагает инструментальный учет результатов. В итоге проделанной работы были подготовлены и утверждены «Методические рекомендации по выявлению антигенов вируса бешенства в головном мозге

животных в твердофазном прямом сэндвич-варианте иммуноферментного анализа» (прил. 5). Аналитическая чувствительность разработанного метода составила 11,7-23,4 нг/мл при коэффициенте вариации 5,3%, диагностическая чувствительность в сравнении с РИФ составила 97,14%, специфичность – 100% (Сухарьков А.Ю., 2014).

ОТ-ПЦР. Для диагностики бешенства и получения ПЦР-продуктов с целью последующего их использования для нуклеотидного секвенирования была разработана обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) на основе детекции двух фрагментов генома вируса: консервативного (фрагмент гена нуклеопротеина) и вариабельного (фрагмент псевдогена и гена гликопротеина). Установлено, что аналитическая чувствительность метода при использовании праймеров к N-гену составила log $10^{0,197}$ $TCID_{50}$/мл, G-гену – log $10^{2,197}$ $TCID_{50}$/мл, а диагностическая чувствительность близка к 100%.

Результаты проделанной работы были реализованы в подготовке и утверждении «Методических рекомендаций по выявлению фрагментов генома вируса бешенства в обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)» (прил. 6).

ПЦР-РВ. Для детекции накопления амплифицированных фрагментов ДНК в разработанном совместно с Иовлевой А. Ю. варианте ПЦР-РВ служат два зонда типа TaqMan, один из которых специфичен для полевых изолятов, другой – для штамма «РВ-97». Зонды мечены флуорофорами с различной длиной волны, что позволяет по характеру сигнала судить о наличии в исследуемом материале генома полевого изолята или вакцинного штамма. Разработанная методика обладала 100% диагностической чувствительностью в сравнении с РИФ, а также позволяла достоверно дифференцировать полевые изоляты ВБ от вакцинного штамма «РВ-97». Значение аналитической чувствительности метода при этом составило 0,03 $TCID_{50}$/мл. Результаты проделанной работы были реализованы в подготовке и утверждении «Методических указаний по выявлению генома вируса бешенства и дифференциации вакцинного штамма «РВ-97» от полевых

изолятов с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени» (прил. 7).

РАЛ. Разработка реакции агглютинации латекса проводилась совместно с Назаровым Н. А. В работе использовали латексные препараты производства ООО «Диафарм» (г. Санкт-Петербург) серий 411 и 428. Основные характеристики данных препаратов представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Характеристика латексных препаратов

№ серии	Химическая природа	Активные группы	Концентрация сухого вещества, %	Диаметр частиц, мкм	Концентрация активных групп, мкг-экв/м^2
411	Полистирольный латекс	COOH-	10	0,7	1,91
428	Полистирольный латекс	COOH-	10	0,83	1,82

Процедура подготовки латексных препаратов представлена в разделе «Материалы и методы» диссертации. Для сенсибилизации латексных частиц использовали поликлональные антитела кролика класса G, полученные против рибонуклеопротеина ВБ, характеристики которых представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Характеристика поликлональных антител к РНП вируса бешенства, использованных для сенсибилизации латексных частиц

№ п/п	Происхождение антигена	Активность исходных сывороток в ИФА	Концентрация очищенных антител, мг/мл
1.	РНП, очищенный из клеток ВНК-21, инфицированных ВБ «ВНИИЗЖ»	от 1:243000 до 1:2187000	63,1
2.	РНП, выделенный из очищенного ВБ штамма «ВНИИЗЖ»	1:729000	59,3

Подготовка латексных частиц. Латексные препараты выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем готовили 3% латексную суспензию. Исходные латексные частицы двукратно отмывали от раствора, в котором они хранились. Для этого 0,3 мл суспензии латексных частиц переносили в центрифужную пробирку объемом 2,0 мл, конечный объем доводили до 1,5 мл глицин-солевым буферным раствором и центрифугировали

при 5000 g в течение 15 мин. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в 1,5 мл глицин-солевого буферного раствора, процедуру центрифугирования повторяли. Полученный осадок ресуспендировали в 1,0 мл глицин-солевого буферного раствора.

Сенсибилизация латексных частиц. Раствор специфических антител в глицин-солевом буферном растворе с концентрацией 0,5 мг/мл в объеме 3,5 мл, пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. К 1,0 мл каждого латексного препарата быстро добавляли по 1,0 мл раствора антител, перемешивали и инкубировали для сенсибилизации латексных частиц в течение 2 ч при температуре 37ºС, перемешивая каждые 10 мин. По окончании инкубации смесь выдерживали в течение 18 ч при температуре 4ºС.

Сенсибилизированные латексные частицы отмывали от оставшихся свободных антител и блокировали незанятые сайты связывания на поверхности карбоксилированных полистирольных сфер. Для этого сенсибилизированные латексные частицы центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин. Супернатант сохраняли для определения остаточного количества антител. К осадку добавляли пятикратный объем глицин-белкового буферного раствора и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая смесь. Затем смесь центрифугировали при 5000 g в течение 20 мин. Эту процедуру повторяли дважды. Конечный осадок ресуспендировали в глицин-белковом буферном растворе с добавлением 0,01% азида натрия в объеме 2,0 мл. Полученный препарат хранили при температуре 4ºС.

В супернатанте после сенсибилизации и центрифугирования латексных препаратов определяли концентрацию остаточного белка при длине волны 280 нм, умножали полученный результат на коэффициент разведения, равный 6 для данного опыта. Как видно из таблицы 14, процент сорбции антител к карбоксилированной поверхности полистирольных латексных частиц разных серий колебался в пределах от 54 до 64%. Максимальный процент сорбции, 60 и 64%, наблюдался при использовании препаратов серии 411.

Таблица 14 – Процент сорбции антител к РНП ВБ на поверхности латексных сфер, рассчитанный методом спектрофотометрии

№ диагностикума	Раствор антител против РНП ВБ		
	Концентрация антител до реакции, мг/мл	Концентрация антител после реакции, мг/мл	Процент сорбции, %
*411/1	0,5	0,2	60
411/2	0,5	0,18	64
428/1	0,5	0,27	46
428/2	0,5	0,23	54

*№411/1 и № 428/1 – латексные частицы, сенсибилизированные антителами к РНП ВБ, очищенному из суспензии культуры клеток, № 411/2 и № 428/2 – латексные частицы, сенсибилизированные антителами к РНП ВБ, очищенному из вирионов.

Также степень сорбции антител к поверхности латексных частиц определяли методом ИФА. Твердую фазу иммунологического планшета сенсибилизировали раствором РНП ВБ штамма «ВНИИЗЖ», приготовленного на карбонатно-бикарбонатном буферном растворе, pH 9,6, с концентрацией 5 мкг/мл в течение 18 ч при 4ºС. Образцы для титрования вносили в цельном виде (n=2). Результаты учитывали с использованием многоканального спектрофотометра Tecan INFINITE F 50 при длине волны 492 нм. Концентрацию антител в пробах определяли с помощью компьютерной программы Magellan for F50 v7.0. Результаты исследований представлены в таблице 15, при этом серии №411/1 и № 428/1 представляют собой латексные частицы, сенсибилизированные антителами к РНП ВБ, очищенному из суспензии культуры клеток, а серии № 411/2 и № 428/2 – латексные частицы, сенсибилизированные антителами к РНП ВБ, очищенному из вирионов.

Таблица 15 – Процент сорбции антител к РНП ВБ на поверхности латексных сфер, рассчитанный методом ИФА

№ серии	Раствор антител против РНП ВБ		
	Концентрация до реакции, мг/мл	Концентрация после реакции, мг/мл	Сорбция, %
411/1	0,5	0,115	77
411/2	0,5	0,085	83
428/1	0,5	0,176	64,8
428/2	0,5	0,167	66,6

Из данных, представленных в таблице 15, следует, что процент сорбции антител составил от 66,6% до 83%. Наибольшее количество антител присоединилось к латексным частицам серии 411/2 – 83%, наименьшее – к латексным частицам серии 428/1 – 64,8%.

Валидация латексных диагностикумов. Валидация полученного диагностического препарата требует соблюдения следующих условий: агглютинация сенсибилизированных латексных частиц не должна происходить при добавлении трис-солевого буферного раствора (тест на спонтанную агглютинацию) и отрицательного контрольного препарата (суспензия головного мозга кролика, не содержащего специфического вирусного антигена); при добавлении латексных препаратов к положительному контрольному препарату (суспензия головного мозга кролика, содержащего специфический антиген ВБ) должна наблюдаться агглютинация интенсивностью не менее чем 3 креста в течение 10 мин с момента начала постановки реакции агглютинации латекса.

Как видно из таблицы 16, препараты серии 411, характеризующиеся латексными частицами меньшего размера, давали более интенсивную агглютинацию, чем при использовании препаратов серии 428, имеющих более крупные частицы, при этом самоагглютинация и агглютинация с отрицательным контрольным препаратом отсутствовала.

Таблица 16 – Результаты валидации латексных диагностикумов

№ серии	**Буферный раствор**	**Отриц. контроль**	**Положительный контроль**	
			Степень агглютинации	**Время начала агглютинации, мин.**
411/1	-	-	++++	10
411/2	-	-	++++	10
428/1	-	-	+++	3
428/2	-	-	+++	5

Сравнительное изучение аналитической чувствительности приготовленных латексных препаратов. Для определения аналитической (количественной) чувствительности в качестве антигена использовали очищенный препарат рибонуклеопротеина ВБ, очищенный из суспензии инфицированной культуры клеток. Для этого готовили серию двукратных

разведений этого препарата в глицин-белковом буферном растворе, начиная с концентрации 4 мкг/мл. Для определения оптимального времени постановки реакции ее учет проводили через 10 и 30 мин.

Как видно из таблицы 17, визуальный достоверный предел обнаружения антигена на два креста для препаратов серии 411 составил 0,125 мкг/мл, для серии 428 – 0,25 мкг/мл при учете реакции через 10 мин. Аналогичные результаты были получены через 30 мин, за исключением препарата № 428/2, предел обнаружения которого оказался несколько выше первоначального и составил 0,125 мкг/мл.

Таблица 17 – Результаты сравнительного изучения количественной чувствительности латексных диагностикумов разных серий

№ серии	Концентрация РНП ВБ, мкг/мл							
	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,063	0,031
результаты реакции через 10 мин								
411/1	++++	++++	++++	+++	++	++	+	-
411/2	++++	++++	++++	+++	++	++	+	-
428/1	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
428/2	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-
результаты реакции через 30 мин								
411/1	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-
411/2	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	
428/1	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
428/2	++++	++++	++++	4+	+++	++	-	-

Таким образом, установлено, что для проведения реакции достаточно 10 мин, при этом количественная чувствительность диагностикумов, приготовленных на основе латексных частиц серии 411 была выше, чем для латексов серии 428.

Исследование проб ткани головного мозга животных, инфицированной и не инфицированной полевым вирусом бешенства. Для испытания приготовленных латексных диагностикумов использовали пробы ткани головного мозга животных, положительных и отрицательных по бешенству в РИФ. Пробы исследовали с помощью латексных препаратов № 411/1 и № 411/2. Результаты учитывали визуально через 10 мин после начала реакции. Положительными считали пробы, дающие агглютинацию на 2 креста и выше.

Параллельно пробы исследовали в РИФ и в количественном непрямом сэндвич-варианте ИФА (табл. 18-20, рис. 26).

Таблица 18 – Результаты исследования в реакции агглютинации латекса проб головного мозга животных, отрицательных в РИФ по бешенству

№ пробы/год получения	Вид животного	Результаты исследований			
		РИФ	ИФА	РАЛ	
				411/1	411/2
1297/12	собака	-	-	-	-
1321/12	собака	-	-	-	-
1323/12	чилийская белка	-	-	-	-
1324/12	кошка	-	-	-	-
1359/12	кот	-	-	-	-
1363/12	волк	-	-	-	-
1364/12	волк	-	-	-	-
1388/12	котенок	-	-	-	-
1405/12	собака	-	-	- (-*)	+(-)
1407/12	собака	-	-	-	-
1411/12	собака	-	-	-	-
1412/12	собака	-	-	-	-
1413/12	собака	-	-	-	-
1414/12	собака	-	-	-(-)	+(-)
1415/12	собака	-	-	-	-

«-» отрицательный результат; «+» положительный результат; * - отрицательный результат при повторном исследовании.

Из данных, представленных в таблице 18, следует, что из 15 отрицательных в РИФ проб в РАЛ с препаратом 411/1 все пробы также показали отрицательный результат. С препаратом 411/2 две пробы (№ 1405/12 и 1414/12) показали при первом исследовании сомнительный результат (агглютинация на +), при втором исследовании – отрицательный результат. Таким образом, с учетом того, что положительным результатом считается агглютинация не ниже ++, в данном исследовании диагностическая специфичность обоих латексных препаратов составила 100%.

Результаты испытания латексных диагностикумов с использованием проб головного мозга, полученных от больных бешенством животных, в сравнении с результатами РИФ и ИФА представлены в таблице 19. Из 22 положительных в ИФА проб в РАЛ 14 проб были определены как положительные, 7 как сомнительные и 1 как отрицательная.

Таблица 19 – Результаты исследования в реакции агглютинации латекса проб головного мозга животных положительных в РИФ по бешенству

№ пробы/год получения	Вид животного	Результаты исследований			
		РИФ	ИФА	РАЛ, 411/1	РАЛ, 411/2
8/10	кот	+	+ (0,151)	++	+++
71/10	енотовидная собака	+	+ (0,274)	++++	++++
72/10	лисица	+	+ (0,186)	++++	++++
83/10	лисица	+	+ (0,173)	++	+++
211/10	корова	+	+ (0,128)	++	+++
244/10	корова	+	+ (0,438)	++++	++++
335/10	собака	+	+ (0,235)	+++	++++
341/10	енотовидная собака	+	+ (0,215)	+++	+++
551/10	лисица	+	+ (0,100)	++	++
552/10	лисица	+	+ (0,377)	+(++++*)	++(+++)
1/11	корова	+	+ (0,186)	+++	++++
213/11	рысь	+	+ (0,171)	+++	+++
1246/12	собака	+	+ (0,110)	++	++
1379/12	лисица	+	+ (0,171)	++++	++++
333/10	лисица	+	+ (0,124)	+(+)	++(-)
334/10	лисица	+	+ (0,034)	-(-)	+(-)
340/10	лисица	+	+ (0,094)	-(+)	++(-)
343/10	собака	+	+ (0,061)	-	+
433/10	лисица	+	+ (0,042)	+(-)	++(-)
212/11	кошка	+	+(0,090)	+	++
1385/12	лисица	+	+ (0,076)	+(-)	+++(-)
376/10	лисица	+	+ (0,086)	-	-

«-» отрицательный результат; «+» положительный результат; * - результат при повторном исследовании; концентрация РНП ВБ, мкг/мл

В таблице 20 приведен анализ данных, указанных в предыдущей таблице.

Таблица 20 – Распределение проб головного мозга животных по диагностическому критерию по результатам исследования в РАЛ, РИФ и ИФА

Группы проб	Результаты исследований			
	РИФ/ИФА	РАЛ	Оптическая плотность в ИФА	концентрация РНП ВБ мкг/мл
положительные в РАЛ (n=14)	+/+	от ++ до ++++	1,30 – 2,28 $(1,81 \pm 0,007)^2$	0,100 – 0,438 $(0,208 \pm 0,025)^3$
сомнительные[1] в РАЛ (n=7)	+/+	+	0,78 – 1,59 $(1,17 \pm 0,11)^2$	0,034 – 0,124 $(0,074 \pm 0,011)^3$
отрицательные в РАЛ (n=1), 411/2	+/+	-	1,29	0,086
отрицательные в РАЛ (n=3), 411/1	-/-	-	0,047 – 0,051 $(0,049 \pm 0,001)^2$	РНП не выявлен

«-» отрицательный результат; «+» положительный результат; [1] - сомнительные, хотя бы по одному исследованию; [2] – в скобках указано среднее значение оптической плотности, [3] – в скобках указано среднее значение концентрации РНП.

Как видно из таблицы 20, концентрация РНП вируса бешенства у положительных в РАЛ проб составила от 0,1 до 0,438 мкг/мл, у сомнительных в РАЛ проб – от 0,034 до 0,124 мкг/мл, у отрицательных – от 0,086 мкг/мл и ниже. На рисунке 26 условно указаны три зоны: положительная, отрицательная и сомнительная.

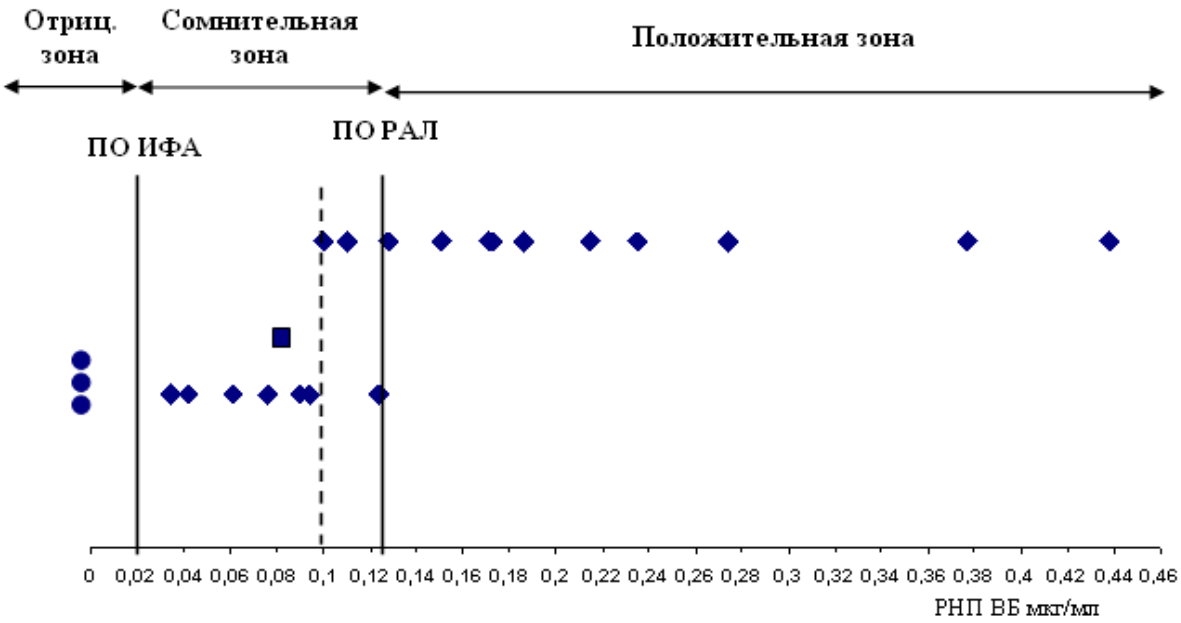


Рисунок 26 – Распределение проб головного мозга, положительных по бешенству в непрямом сэндвич-варианте ИФА (♦) на положительные (верхний горизонтальный ряд) и сомнительные (нижний горизонтальный ряд) в РАЛ. Сплошная вертикальная линия «ПО ИФА» – предел определения ИФА (0,015-0,030 мкг/мл). Сплошная вертикальная линия «ПО РАЛ» – предел определения РАЛ (0,125 мкг/мл). ■ – проба, положительная в ИФА, но отрицательная в РАЛ. ● – пробы, отрицательные в ИФА и РАЛ. Пунктирная линия – см. пояснения по тексту к рисунку.

Положительная зона ограничена установленным пределом количественной чувствительности испытуемых диагностикумов (0,125 мкг/мл), отрицательная зона ограничена пределом количественной чувствительности ИФА (0,015-0,030 мкг/мл). Сомнительная зона расположена соответственно между положительной и отрицательной. В сомнительную зону попали результаты исследования двух проб, оцененные в РАЛ как положительные на ++ (№ 551/10 – 0,1 мкг/мл и № 1246/12 – 0,11 мкг/мл), а также одна проба, оцененная в РАЛ как отрицательная (№ 376/10 – 0,086 мкг/мл). Проба № 333/10 – 124 мкг/мл оказалась в сомнительной зоне на самой границе с положительной зоной

≥0,125 мкг/мл. Концентрация РНП ВБ в остальных сомнительных в РАЛ пробах была ниже 0,1 мкг/мл. Следовательно, можно предположить, что предел чувствительности приготовленных латексных диагностикумов серии 411 может составлять 0,1 мкг/мл по РНП ВБ (пунктирная линия на рисунке 28).

Попадание в сомнительную зону одной отрицательной и двух положительных в РАЛ проб определяется индивидуальными свойствами этих проб: вязкость, степень разложения мозговой ткани, контаминация и т.п. При исследовании проб головного мозга, которые хранились при минус 20°С около 2 лет и имели разную степень разложения, подвергались неоднократному замораживанию и размораживанию, степень выявления положительных проб составила 62,5%.

При анализе проб, поступивших в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2010 г., методом количественного непрямого сэндвич-варианта ИФА в 2011 и 2012 гг., концентрация РНП составила соответственно: проба № 334/10 – 0,828 мкг/мл и 0,034 мкг/мл; проба № 343/10 – 0,305 мкг/мл и 0,061 мкг/мл; проба № 433/10 – 0,228 мкг/мл и 0,042 мкг/мл. Таким образом, если бы эти пробы были исследованы в РАЛ не в 2012, а в 2011 г., то они были бы определены как положительные. Пробы № 335/10 и 1/11 в исследовании 2011 г. имели концентрацию РНП 2,125 и 0,801 мкг/мл, соответственно. В исследовании 2012 г. количество РНП в этих пробах было определено как 0,235 и 0,186 мкг/мл, что находилось в пределах аналитической чувствительности приготовленных диагностикумов, и эти пробы были определены в РАЛ как положительные.

Таким образом, в схему учета результатов РАЛ для разработанных диагностикумов предлагается ввести три группы: положительную (агглютинация на два–четыре креста), сомнительную (агглютинация на один крест) и отрицательную (отсутствие агглютинации). Аналитическая чувствительность диагностикума составила 0,1 – 0,125 мкг/мл. Результаты по исследованию в РАЛ проб головного мозга животных, поступивших в ФГБУ «ВНИИЗЖ» из Нижегородской обл. в 2012 г., представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Результаты исследования в РИФ и РАЛ на бешенство проб головного мозга животных, отобранных в Нижегородской обл. в 2012 г.

№ п/п	№ экспертизы/год	Вид животного	Результаты исследования	
			РИФ	РАЛ
1	1462/12	лисица	+	+
2	1463/12	лисица	+	+
3	1464/12	собака	+	+
4	1465/12	кошка	+	+
5	1466/12	лисица	+	+
6	1467/12	лисица	+	+
7	1468/12	лисица	+	+
8	1469/12	лисица	+	+
9	1470/12	лисица	+	+
10	1471/12	лисица	+	+
11	1472/12	кошка	+	+

«+» - положительный результат

Как видно из таблицы 21, все пробы, оцененные в РИФ как положительные, в РАЛ также показали положительный результат. Таким образом, в данной работе из 17 положительных в РИФ проб, отобранных в 2011 и 2012 гг., в РАЛ положительными оказались 15 (82,2%).

Для определения диагностической чувствительности приготовленных латексных препаратов необходимо исследование с использованием большего количества проб патологического материала, пригодного для исследования в РАЛ (без явных признаков гниения и разложения).

Комиссионные испытания метода. Для испытания использовали диагностикум, полученный из латексного препарата серии № 550 производства ТОО «Диафарм» с диаметром полистирольных латексных частиц 0,43 мкм и концентрацией активных -СООН групп 1,91 мкг-экв/м^2. Испытания проводили с использованием 30% суспензии проб ткани головного мозга животных с разным статусом по бешенству в РИФ, приготовленных на трис-солевом буферном растворе. В качестве положительного и отрицательного контрольных препаратов использовали сухую суспензию ткани головного мозга кролика, инфицированного ВБ штамма «CVS» и неинфицированного. Также в качестве положительного контроля использовали очищенный РНП в концентрации 3 мкг/мл. Для контроля спонтанной агглютинации латексных частиц

использовали трис-солевой буферный раствор. Перед исследованием в РАЛ пробы ткани головного мозга животных были зашифрованы. Исследование проводили согласно разработанным методическим указаниям, полученные результаты представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Результаты исследования проб ткани головного мозга животных в РАЛ

№ п/п	№ экспертизы	Результаты		Совпадение, %
		РИФ	РАЛ (n=2)	
1	1300/12	-	-	100%
2	1321/12	-	-	100%
3	1324/12	-	-	100%
4	1359/12	-	-	100%
5	1417/12	-	-	100%
6	1418/12	-	-	100%
7	1419/12	-	-	100%
8	244/10	+	+	100%
9	1463/12	+	+	100%
10	1466/12	+	+	100%
11	1468/12	+	+	100%
12	1470/12	+	+	100%
Контроль самоагглютинации		*н/п	-	н/п
Положительный контроль		+	+	100%
Отрицательный контроль		-	-	100%
РНП ВБ		н/п	+	н/п

«-» отрицательный результат; «+» положительный результат; *н/п – неприменимо

Как видно из таблицы 22, результаты, полученные в РАЛ, полностью совпали с результатами, полученными в реакции иммунофлуоресценции.

На основе полученных результатов разработаны и утверждены «Методические указания по разработке метода диагностики бешенства животных в реакции агглютинации латекса» (прил. 8).

3.2.1.4 Разработка методов лабораторной диагностики бешенства третьего уровня

Методы лабораторной диагностики третьего уровня предлагается применять в случаях, когда невозможно применить методики первого и второго уровней из-за низкого качества патологического материала либо применения способов консервирования материала, не позволяющих выделить живой вирус

бешенства (формалин). С этой целью и с целью дифференциальной диагностики бешенства и губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота (ГЭ КРС), в рамках проведения мониторинга последней на территории Российской Федерации, который на начальном этапе проводился с применением консервированных формалином проб головного мозга, необходимо было провести комплекс научно-исследовательских работ по разработке соответствующих методов лабораторной диагностики.

Клиническое проявление ГЭ КРС и бешенства обусловливается тропизмом возбудителя и местом проявления его основного патогенного действия. Бешенство может иметь различные клинические проявления в зависимости от вида животного, а также штамма и места локализации возбудителя в тканях центральной нервной системы. Наиболее характерными симптомами бешенства у животных являются: агрессивность, изменение голоса, буйство, слюнотечение, светобоязнь, нарушение координации движений, выпадение третьего века. Животные могут нападать на объекты неживой природы, при термометрии может выявляться повышенная температура тела. ГЭ КРС характеризуется сходными симптомами, такими как гиперчувствительность на прикосновение, звук и свет, гиперсаливацией, нарушение координации движений, снижением упитанности. Для проведения мониторинга этих заболеваний в России появилась необходимость разработки лабораторных методов их дифференциации. Для этого на основании литературных данных была изучена возможность дифференциации бешенства и ГЭ КРС на основе клинического проявления этих заболеваний.

Из данных, представленных в таблице 23 видно, что большинство клинических признаков, выявляемых при ГЭ КРС и бешенстве, совпадают. В связи с этим главное место в дифференциальной диагностике данных заболеваний должно занимать лабораторное исследование патологического материала. В качестве базовых методов рассмотрены адаптированный вариант РИФ и ИГХМ.

Таблица 23 – Сравнение основных клинических признаков бешенства и ГЭ КРС

Наименование	Наличие или отсутствие	
	Бешенство	**ГЭ КРС**
Инкубационный период	5 дней – несколько лет	2-8 лет
Возраст, в котором регистрируется заболевание	в любом возрасте	старше 4 лет
Продолжительность клинического течения болезни	3-6 дней	7-420 дней
Отставание от стада	+	+
Исчезновение жвачки	+	–
Отсутствие аппетита	+	–
Гипотония преджелудков	+	+
Затрудненное глотание	+	–
Гиперсаливация	+	+
Хриплое мычание	+	–
Нарушение координации движений	+	+
Беспокойство	+	+
Нервозность	+	+
Агрессивность	+	+
Пугливость	+	+
Скрежет зубами	+	+
Облизывание носа	–	+
Прижимание ушей	–	+
Запрокидывание головы	+	+
Дрожание мышц	+	+
Гиперчувствительность на прикосновение	+	+
Гиперчувствительность на звук	+	+
Светобоязнь	+	+
Снижение веса	+	+
Снижение удоев	+	+
Атаксия	+	+
Параличи задних конечностей	+	+
Трудности при вставании	+	+
Высокое поднимание ног при ходьбе	–	+

«+» - да, «–» - нет; - клинические признаки совпадают; - клинические признаки не совпадают.

Разработка метода выявления антигена ВБ в ткани головного мозга животных ИГХМ

Получение и оценка антирабического иммуноглобулина. Антирабический иммуноглобулин получали с использованием культурального ВБ, штамм «ВНИИЗЖ». Вирусную суспензию предварительно концентрировали осаждением ПЭГ-6000 и очищали методами центрифугирования сквозь 20% сахарозу в градиенте плотности сахарозы 40% в течение 10 ч и градиенте

плотности CsCl в течении 1,12 ч. Чистоту полученного вирусного препарата проверяли методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле, при этом он должен был соответствовать препарату, представленному на рисунке 27, треки 2 или 3.

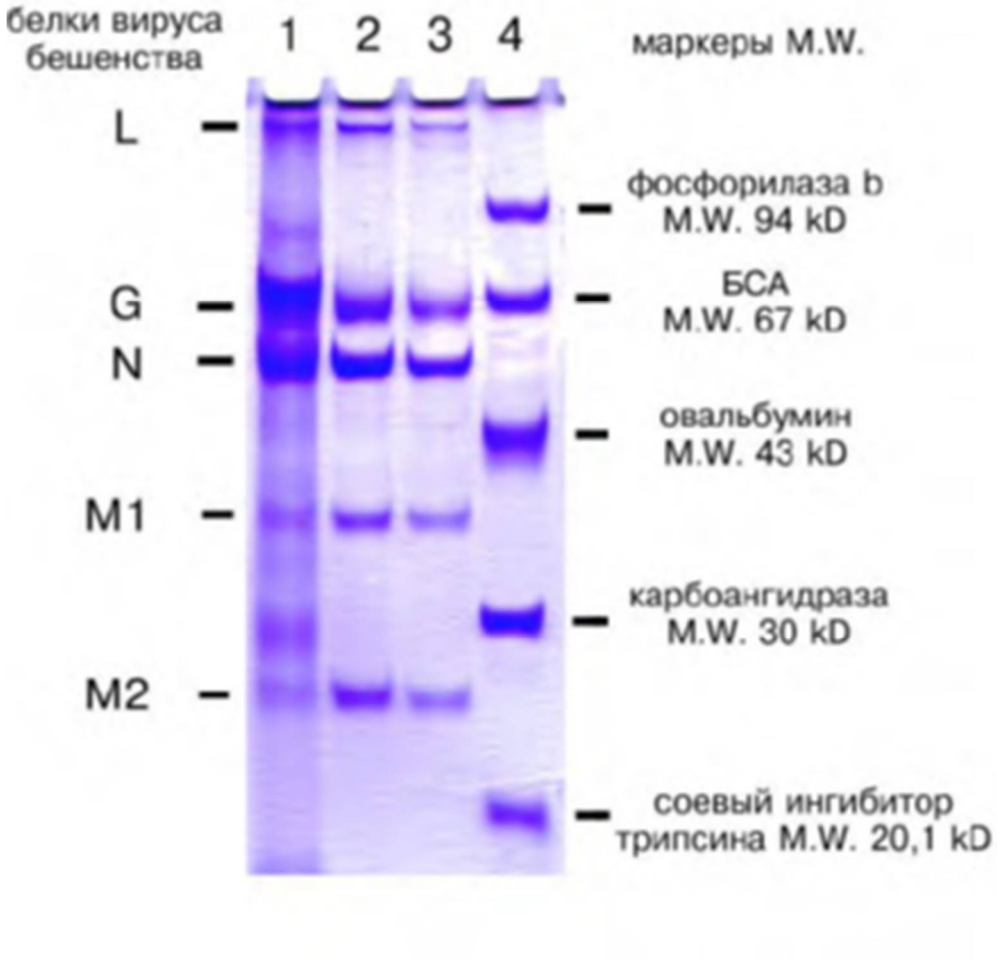


Рисунок 27 – Оценка чистоты препаратов вируса бешенства методом электрофореза в полиакриламидном геле:

трек 1 – вирус бешенства после концентрирования ПЭГ-6000 и осаждения сквозь 20%-ю сахарозу;

трек 2 – вирус бешенства после очистки методом центрифугирования в градиенте плотности сахарозы 10-40%;

трек 3 – вирус бешенства после очистки в градиенте плотности CsCl, d = 1,12-1,30;

трек 4 – маркеры молекулярной массы.

Гипериммунные сыворотки кроликов получали методом двукратной иммунизации внутримышечно высокоочищенным инактивированным ВБ в составе эмульсии с неполным адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1 в дозе по

300-500 мкг вирусного белка с интервалом 4-6 нед. Иммуноглобулин из сыворотки получали методом трехкратного переосаждения раствором сульфата аммония или аффинной хроматографии на белок-А сефарозе.

Активность и специфичность антирабического иммуноглобулина проверяли методом ИФА. На планшет в параллельные вертикальные ряды ячеек наносили гомогенаты головного мозга, неинфицированного ВБ и больного бешенством животного: серию двукратных разведений в интервале от 1000 до 8000 – 16 000 раз, и после блокирования 1%-м раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) вдоль вертикальных рядов ячеек наносили серию 4-кратных разведений в интервале от 1000 до 1 000 000 исследуемого антирабического иммуноглобулина. Затем проводили окрашивание ортофенилендиамином. За рабочее разведение иммуноглобулина принимали показатель не менее 20 000, сигнал – не менее 1,5 A_{492}, а фон не превосходил 0,1 A_{492}. Препараты, не отвечающие указанным характеристикам, в работе не использовались.

Лучшие результаты с активностью в ИФА от 20 000 и выше показали сыворотки, полученные на полный вирион – RS401, RS540, RS597; на рибонуклеопротеин – RS675 и на гликопротеин – RS672.

Были проведены исследования активности и специфичности нескольких сывороток, полученных на полный инактивированный ВБ, штамм «ВНИИЗЖ» – RS401, RS540 и RS597, его РНП – RS675 и гликопротеин – RS672 методом ИФА относительно соответствующих антигенов вируса бешенства. Предельное разведение в ИФА для RS401 составило 300-600 тыс., у остальных – не более 100 тыс.

RS401 в дальнейшем была использована в исследованиях проб мозга с целью определения наличия и локализации антигенов ВБ.

Предварительные испытания ИГХМ. С целью предварительных испытаний метода проводили исследование локализации антигенов ВБ в ткани мозга животных в ИГХМ. Для этого использовали препараты ткани мозга здорового КРС (материал был получен с Лакинского мясокомбината –

отрицательный стандартный препарат, фиксированный формалином) и препарат ткани мозга КРС (продолговатый и средний мозг, фиксированные формалином, из Чувашской республиканской ветеринарной лаборатории, г. Чебоксары), полученный 23.08.1999, анализируемый материал положительный в РИФ.

В задачи эксперимента входило проведение иммуногистохимического окрашивания вышеназванных срезов при разведении сыворотки RS401 в 100, 200 и 500 раз. С использованием стандартной гистологической процедуры готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм, позитивные и негативные на наличие антигена ВБ в количестве по 3 шт. Затем проводили депарафинизацию срезов путем последовательного их выдерживания в ксилоле дважды по 3 мин, затем 3 мин в 96%-м растворе этилового спирта, 3 мин в 70%-м растворе этилового спирта и 5 мин в дистиллированной воде.

После дополнительной промывки полученных микропрепаратов в растворе фосфатного буфера проводили процедуру удаления эндогенных пероксидаз обработкой 3%-м раствором перекиси водорода на ФБС при 20-25ºС в течение 5 мин и блокирование путем нанесения 20%-го раствора лошадиной сыворотки на промывочном растворе с 0,05%-м Tween-20 в объеме 250 мкл на препарат и инкубирования 30 мин при комнатной температуре. Кассеты с микропрепаратами промывали в фосфатно-буферном солевом растворе с 0,05% Tween-20 на магнитной мешалке в ванночках 1 раз в течение 10 мин. После промывки остатки раствора удаляли фильтровальной бумагой.

На каждый препарат наносили по 250 мкл сыворотки соответствующего разведения и инкубировали во влажной камере при 37ºС 2 ч, затем остатки раствора удаляли фильтровальной бумагой, кассеты с микропрепаратами промывали фосфатно-буферным солевым раствором с 0,05%-м Tween-20 на магнитной мешалке в ванночках 2 раза по 10 мин. После промывки остатки промывочного раствора удаляли фильтровальной бумагой.

Антивидовые биотинилированные антитела, полученные против полной молекулы IgG кролика, наносили по 250 мкл на препарат и помещали во

влажную камеру на 60 мин при температуре 37ºС. Затем кассеты с микропрепаратами промывали фосфатно-буферным солевым раствором с 0,05%-м Tween-20 на магнитной мешалке в ванночках 2 раза по 10 мин. После промывки остатки промывочного раствора удаляли с использованием фильтровальной бумаги.

Для инкубации с экстравидин-пероксидазой (E2886, Sigma) готовили рабочий раствор в объеме 2 мл на промывочном растворе, экстравидин-пероксидазу использовали в разведении в 100 раз. Рабочий раствор экстравидин-пероксидазы наносили по 250 мкл на препарат и помещали во влажную камеру на 30 мин при температуре 37ºС.

Кассеты с микропрепаратами вновь промывали фосфатно-буферным солевым раствором с 0,05%-м Tween-20 на магнитной мешалке в ванночках 2 раза по 10 мин, как описано выше.

Окрашивание микропрепаратов проводили с использованием аминоэтилкарбазола. Для этого готовили раствор аминоэтилкарбазола на DMF в концентрации 4% в объеме 1,0 мл. Раствор хранили при температуре минус 20ºС. Перед использованием раствор аминоэтилкарбазола центрифугировали в течении 10 мин.

Непосредственно перед использованием готовили раствор из 0,04% аминоэтилкарбазола и 0,012% перекиси водорода на 0,1 М Na-ацетатном буферном растворе, pH 4,8-5,0. Полученный раствор центрифугировали 10 мин и осторожно отбирали осветленную фазу, не допуская суспензирования осадка. Наносили 250 мкл полученного раствора на препарат и инкубировали при 37ºС 30 мин. Реакцию останавливали промыванием дистиллированной водой на магнитной мешалке.

Для окрашивания клеточных структур гематоксилином применяли только водный раствор гематоксилина (гематоксилин Мейера). Окрашивание проводили по следующей программе:

- гематоксилин Мейера - 5 мин;

- вода - 2 мин;

- вода - 2 мин.

Микропрепараты монтировали в 90%-м глицерином на ФБР, который перед применением дегазировали в вакууме.

В ходе проведенных экспериментов было установлено, что рабочая концентрация RS401 в интервале разведений от 100 до 500 слишком высока, поэтому существует неспецифический фон в отрицательных по наличию ВБ препаратах. В дальнейшем, с целью снижения неспецифического фона в иммунологических реакциях, из перечисленных сывороток крови были получены IgG методом аффинной хроматографии на белок-А сефарозе. Оптимальное рабочее разведение IgG-401: 1000-2000 раз.

Испытание метода в условиях диагностической лаборатории. Для исследования в ИГХМ были взяты препараты ткани головного мозга животных, подозреваемых в заболевании бешенством. Исследование проводили с использованием отрицательного и положительного контрольных препаратов ткани головного мозга мышей, незараженных и экспериментально зараженных вирусом бешенства. Для получения положительных контрольных препаратов мышей заражали интрацеребрально суспензией, содержащей штамм «CVS» ВБ в дозе 25 $МЛД_{50}$/0,03 мл. Пробы головного мозга, полученные от мышей, погибших с клиническими признаками бешенства, проверяли в РИФ и, при получении положительных результатов, использовали в дальнейшей работе.

В результате окрашивания структуры мозга исследуемых животных, не содержащие антигены ВБ, окрашивались в сине-лиловый цвет различной интенсивности (ядра клеток окрашиваются интенсивно, цитоплазма менее интенсивно), скопления вирусного белка окрашивались в интенсивный золотисто-коричневый или темно-коричневый цвет (рис. 28).

На снимке коры головного мозга мыши представлен участок, содержащий отдельные инфицированные нейроны, видны окрашенные в красный цвет перикарионы и их отростки (в виде цепочек окрашенных пятен). На снимке

мозжечка видно генерализованное поражение нейронов – окрашенные в коричневый цвет нейроны и их отростки.

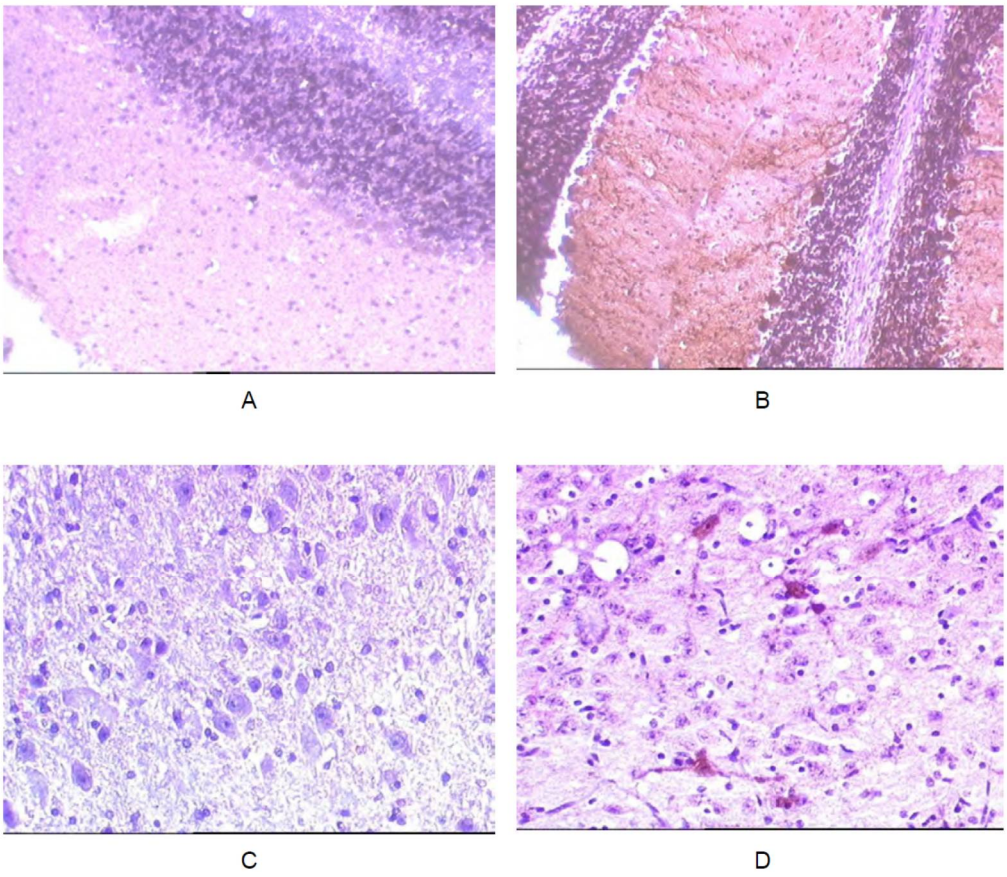


Рисунок 28 – Препараты коры головного мозга и мозжечка мыши, неинфицированной и инфицированной ВБ, окрашенные ИГХМ, иммуноглобулин RigG 401 в разведении в 1000 раз. Увеличение: мозжечка × 300, коры больших полушарий – ×1250. A – препарат мозжечка неинфицированной мыши; B – препарат мозжечка мыши, инфицированной интрацеребрально ВБ; C – препарат коры головного мозга неинфицированной мыши; D – препарат коры головного мозга мыши, инфицированной интрацеребрально ВБ (окрашивание в красный цвет аминоэтилкарбазолом).

Результаты окрашивания микропрепаратов, полученных из тканей мозжечка мыши, имеющего генерализованное поражение нейронов, и больших полушарий головного мозга, в которых поражены отдельные нейроны, представлен на рисунке 29 D и E. При иммуногистохимическом исследовании препаратов головного мозга неинфицированных бешенством животных в перикарионах и отростках нейронов структуры, специфично окрашенные в коричневый цвет, не выявлялись (рис. 29 A, B, C).

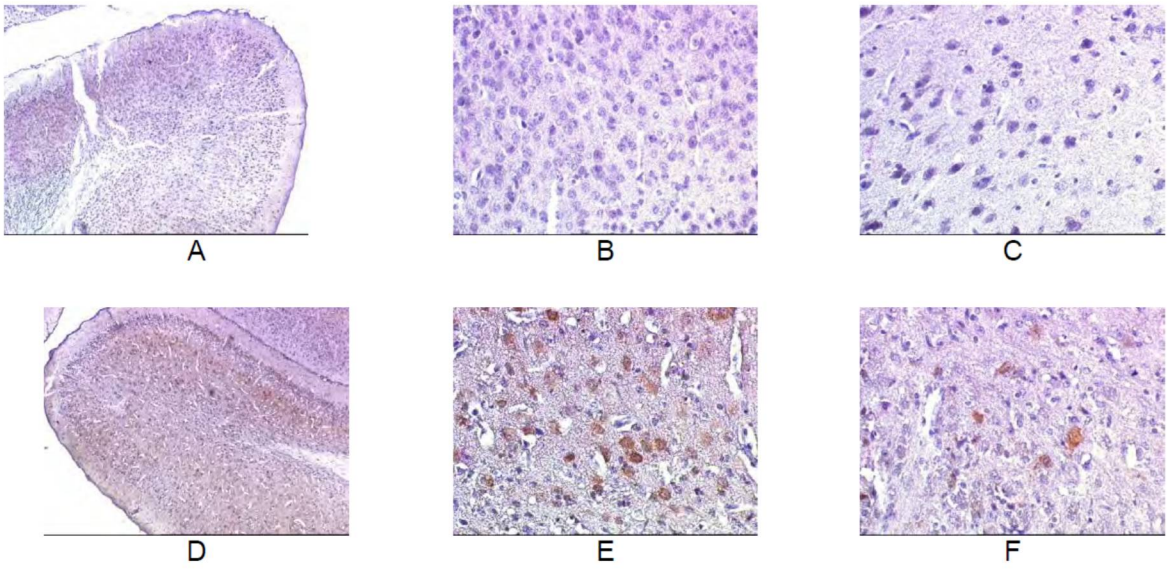


Рисунок 29 – Иммуногистохимически окрашенные препараты ткани мозга мышей. (A, B, C) – препараты неинфицированной мыши, (D, E, F) – инфицированной вирусом бешенства. A и D – фрагменты мозжечка, D – генерализованное поражение нейронов, увеличение ×85; B и E: – фрагменты коры больших полушарий, E – инфицированы большинство нейронов, увеличение ×425; C и F – фрагменты стволовой части мозга, F – инфицированы отдельные нейроны, увеличение ×425.

В препаратах, содержащих ВБ, его максимальное накопление наблюдалось в перикарионах нейронов. Интенсивность окрашивания отростков нейронов была значительно ниже. У инфицированных мышей вирус был обнаружен во всех отделах мозга, однако 100%-е поражение нейронов выявлено только в мозжечке. В большинстве исследованных фрагментов больших полушарий степень инфицированности нейронов составляет 20-70%. В стволовой части мозга обнаруживались лишь единичные инфицированные нейроны или их компактные скопления.

Сравнение результатов исследования в РИФ и в ИГХМ представлены в таблице 24. Установлено, что при использовании разработанного ИГХМ, в сравнении с РИФ ложноположительных результатов выявлено не было. Следует отметить, что для исследования в РИФ использовались замороженные пробы головного мозга, в то время как для исследования в ИГХМ пробы предварительно консервировали формалином.

Таблица 24 – Результаты исследования проб головного мозга в РИФ и ИГХМ

Вид животных	№ экспертизы	Результаты	
		РИФ	ИГХМ
лисица	50	-	-
коза	201	+	-
лисица	207	-	-
лисица	269	+	+
лисица	273	+	-
кошка	278	-	-
собака	307	+	+
теленок	311	+	+
собака	314	-	-
кошка	323	-	-

В связи с тем, что препараты головного мозга животных, использованные в данном исследовании, подвергались однократному или многократному замораживанию и размораживанию, структура ткани головного мозга имеет некоторые повреждения – появление сетки разрывов. Тем не менее установлено, что на интенсивность иммуногистохимического окрашивания белков вируса бешенства предшествующее замораживание заметного влияния не оказывает.

Результаты исследования иммуногистохимическим методом проб головного мозга, перечисленных в таблице 24 представлены на рисунках 30-39. В результате проведенных исследований подтверждена пригодность разработанного ИГХМ для применения в составе общей схемы лабораторной диагностики бешенства в качестве диагностического метода третьего уровня.

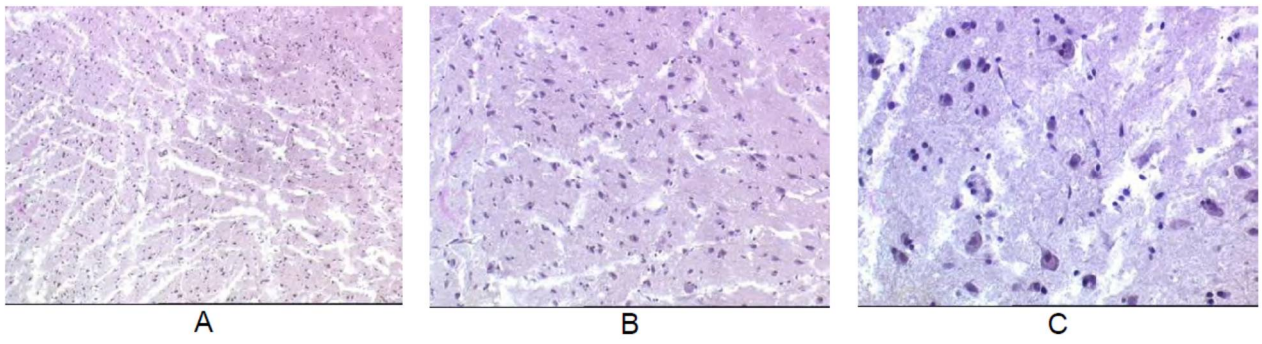


Рисунок 30 – Препарат ткани головного мозга лисицы № 50, окрашенный иммуногистохимическим методом. Препарат не содержит специфично окрашенных антигенов вируса бешенства. A: увеличение ×85, B: ×212, C: ×425.

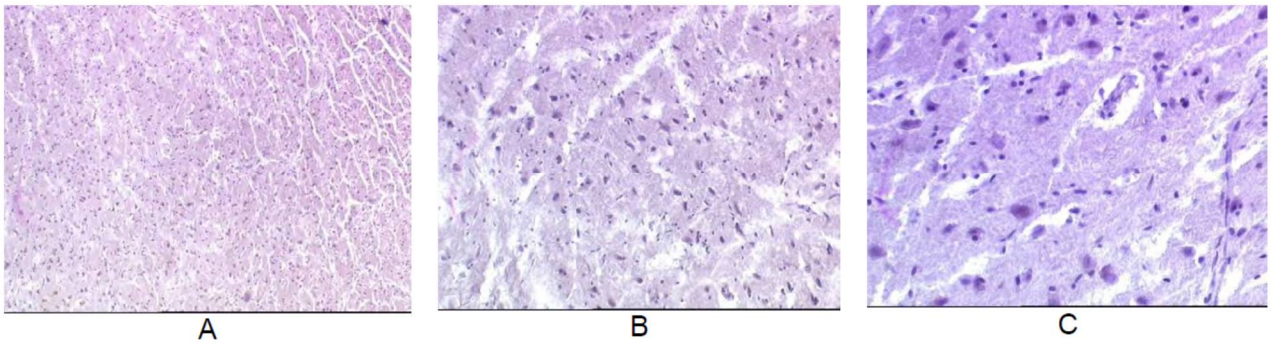


Рисунок 31 – Препарат ткани головного мозга козы № 201, окрашенный иммуногистохимическим методом. Препарат не содержит специфично окрашенных антигенов вируса бешенства. A: увеличение ×85, B: ×212, C: ×425.

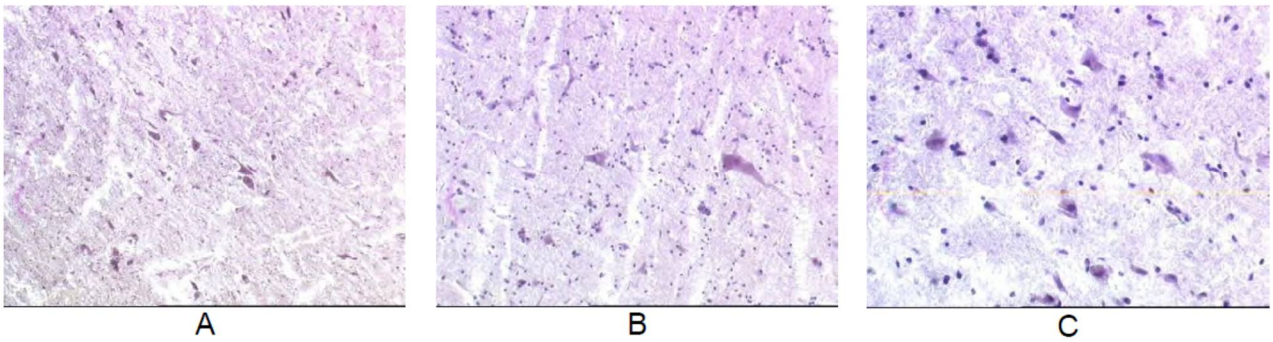


Рисунок 32 – Препарат ткани головного мозга лисицы № 207, окрашенный иммуногистохимическим методом. Препарат не содержит специфично окрашенных антигенов вируса бешенства. A: увеличение ×85, B: ×212, C: ×425.

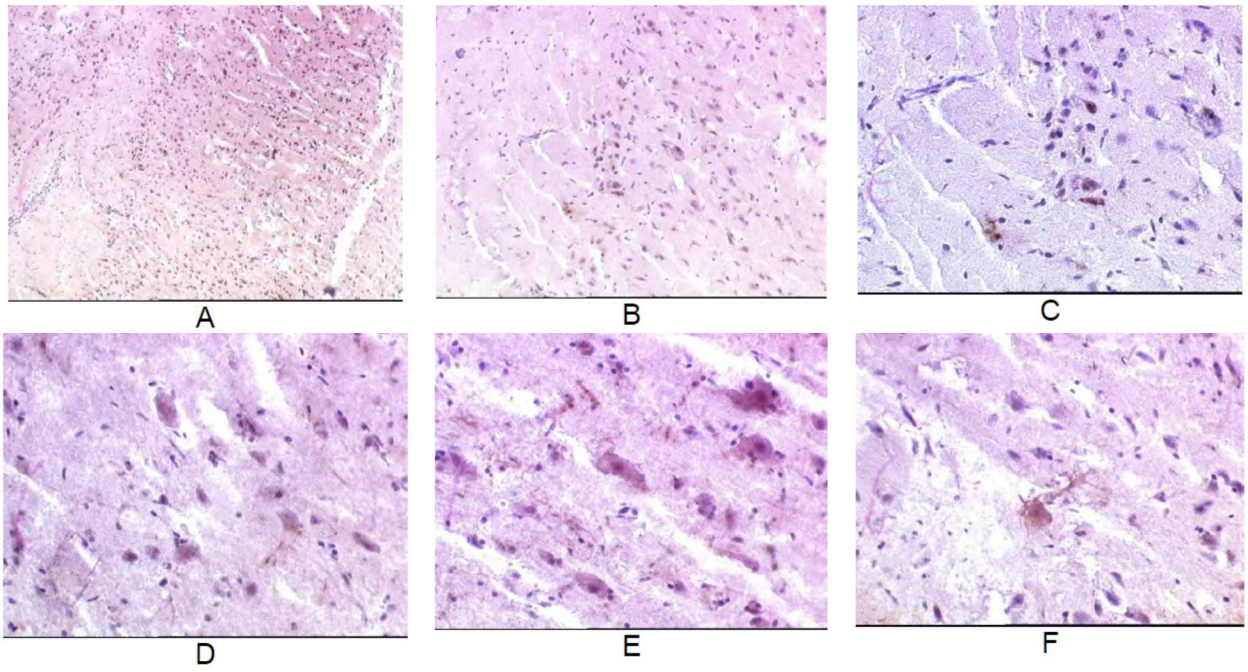


Рисунок 33 – Препарат ткани головного мозга лисицы № 269, окрашенный иммуногистохимическим методом. Препарат содержит специфично окрашенные антигены вируса бешенства. A: увеличение ×85, B: ×212, C-F: ×425.

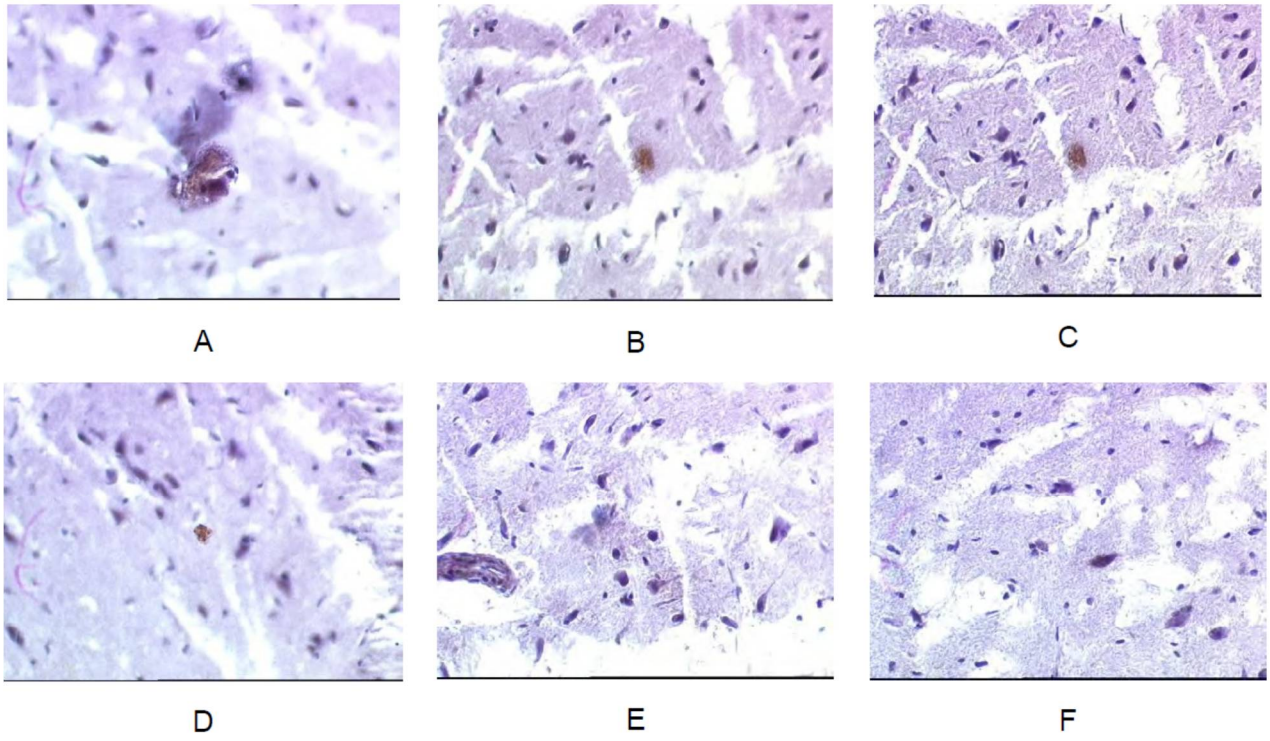


Рисунок 34 – Препарат ткани головного мозга лисицы № 273, окрашенный иммуногистохимическим методом. А - артефакт, В – фокусировка микроскопа на артефакт, С – фокусировка микроскопа на ткань. Препарат не содержит специфично окрашенных антигенов вируса бешенства, увеличение ×625.

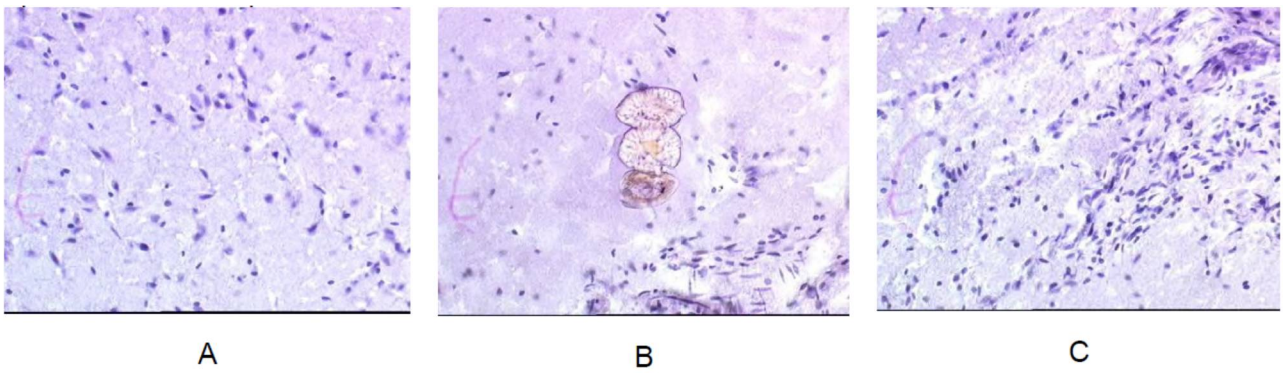


Рисунок 35 – Препарат ткани головного мозга кошки № 278, окрашенный иммуногистохимическим методом. Препарат не содержит специфически окрашенных нейронов и их отростков. На снимке В видно скопление клеток, окрашенное в золотистый цвет, не являющееся частью ткани мозга, увеличение ×425.

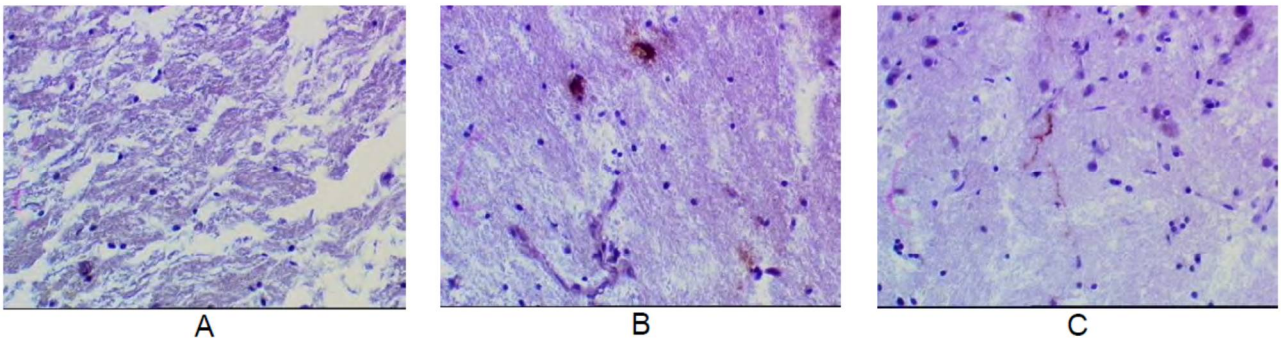


Рисунок 36 – Препарат ткани головного мозга собаки № 307, окрашенный иммуногистохимическим методом. Препарат содержит специфично окрашенные перикарионы, их отростки и скопления антигенов вируса вблизи нейронов. На снимке С видны фрагменты инфицированного перикариона и длинный отросток, лежащий в плоскости среза, увеличение ×425.

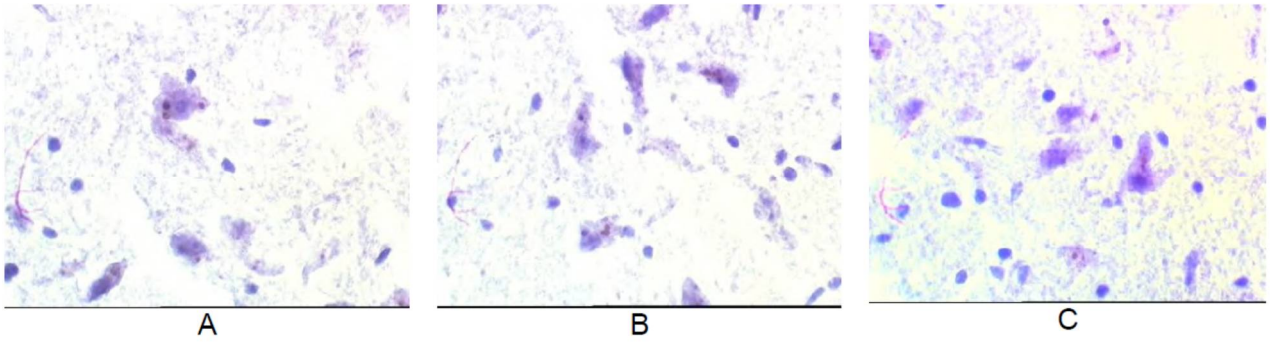


Рисунок 37 – Препарат ткани головного мозга теленка № 311, окрашенный иммуногистохимическим методом. На снимках видны специфично окрашенные коричнево-красные крупные включения в перикарионы нейронов, увеличение ×850.

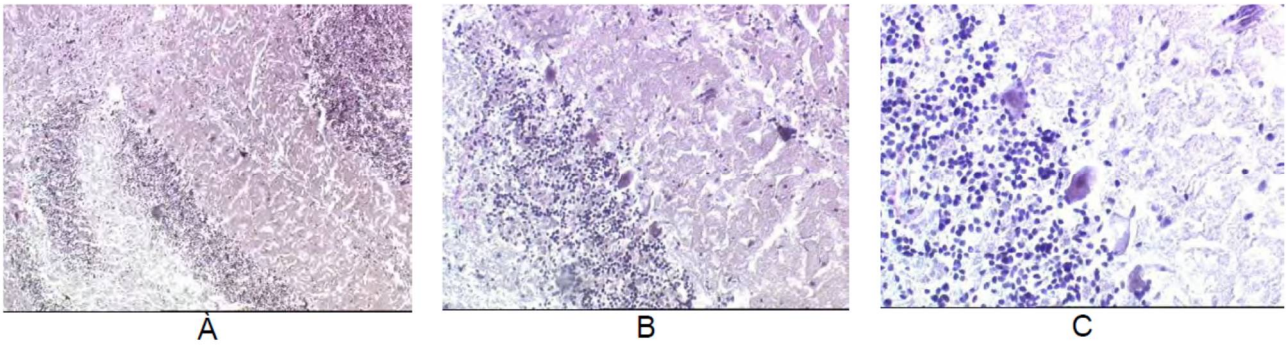


Рисунок 38 – Препарат ткани головного мозга собаки № 314, окрашенный иммуногистохимическим методом. Препарат не содержит специфично окрашенных антигенов вируса бешенства. А: увеличение ×85, В: ×212, С: ×425.

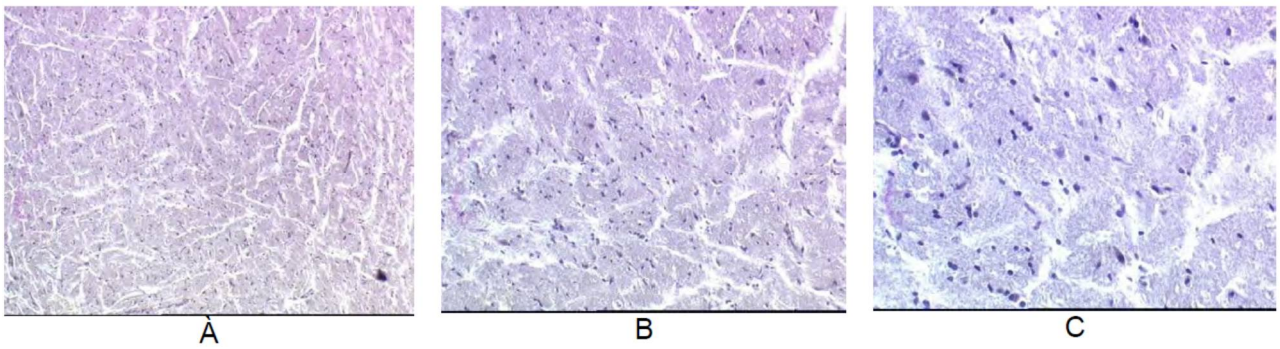


Рисунок 39 – Препарат ткани головного мозга кошки № 323, окрашенный иммуногистохимическим методом. Препарат не содержит специфично окрашенных антигенов вируса бешенства. А: увеличение ×85, В: ×212, С: ×425.

Работа проводилась совместно с Егоровым А.А., полученные результаты были использованы при разработке «Методических указаний по выявлению антигена вируса бешенства в ткани головного мозга животных иммуногистохимическим методом» (прил. 9).

Разработка и испытание прямого жидкофазного варианта реакции иммунофлуоресценции для диагностики бешенства с использованием консервированных формалином проб

Основной проблемой лабораторной диагностики бешенства при поступлении консервированных формалином проб головного мозга является то, что стандартный вариант РИФ и биопроба на мышах либо вирусовыделение в культуре клеток, неприменимы. Анализ литературных данных также показал, что существующий прямой твердофазный вариант РИФ (ПТ РИФ) для исследования консервированных формалином проб головного мозга, предложенный в работе Barnard B., Voges S., опубликованной в 1982 г., не обладает достаточной чувствительностью при длительной консервации проб формалином. В связи с этим был разработан и испытан в лабораторных условиях прямой жидкофазный вариант РИФ (ПЖ РИФ), в котором исключалась стадия фиксации препаратов в ацетоне, исследуемый материал обрабатывался трипсином, а контакт «антиген-антитело» проходил в жидкой фазе. Данный метод также предполагается использовать в качестве метода 3 уровня в схеме лабораторной диагностики бешенства.

На начальном этапе, для проведения сравнительных испытаний двух методов, в качестве исследуемого материала использовали пробы головного мозга белых лабораторных мышей. Мышей заражали путем интрацеребрального введения вируссодержащей суспензии (штамм «CVS») в объеме 0,03 мл с титром 25 $ЛД_{50}$/мл. У погибших спустя не менее 48 ч мышей извлекали головной мозг и исследовали их в РИФ для исключения неспецифической гибели. Положительные пробы головного мозга консервировали 10%-м забуференным раствором формалина и по окончании определенных протоколом опыта сроков консервирования исследовали в ПТ РИФ и ПЖ РИФ. Для проведения опыта использовали пробы головного мозга мышей, показавших в РИФ с нативным материалом максимальную интенсивность флуоресценции («++++»).

В работе использовали ФИТЦ-иммуноглобулин, приготовленный общепринятым методом (Dean et al., 1996), адаптированным согласно ранее опубликованному протоколу (Метлин, 2004).

Результаты, представленные в таблице 25, показали, что длительный срок консервирования проб патологического материала в растворе формалина существенно ограничивает возможность применения предложенного ранее ПТ РИФ. Так, после 10 сут консервирования проб интенсивность флуоресценции при их микроскопическом исследовании значительно снижалась. В дальнейшем, с увеличением срока консервирования до 30-60 сут, интенсивность флуоресценции снизилась еще больше, а ряд проб вообще оказался отрицательным. Исследование заведомо положительных проб в ПТ РИФ спустя 90 сут консервирования в растворе формалина показало отрицательный результат во всех случаях.

При использовании разработанного нами ПЖ РИФ флуоресценцию высокой интенсивности удавалось регистрировать при сроке консервирования проб патологического материала до 60 сут. Спустя 90 сут консервирования интенсивность флуоресценции существенно снизилась, а одна из заведомо положительных проб показала отрицательный результат.

Таблица 25 – Сравнение двух вариантов РИФ для выявления антигена ВБ в консервированных формалином пробах головного мозга мышей

№ пробы	Нативный материал	Срок консервирования (сут)	Консервированный материал	
			ПТ РИФ	ПЖ РИФ
1	+++	5	++++	++++
2	+++		+++	++++
3	++++		++	++++
4	++++		+++	++++
5	++++		++	++++
6	+++	10	++	+++
7	++++		+	+++
8	+++		++	++++
9	+++		+++	++++
10	+++		++	++++
11	+++	30	-	++++
12	++++		++	++++
13	++++		-	+++
14	+++		-	+++
15	+++		-	++++
16	++++	60	-	++++
17	++++		-	++++
18	++++		+	++++
19	++++		+	++++
20	++++		-	++++
21	+++	90	-	-
22	+++		-	+
23	++++		-	++
24	+++		-	++
25	+++		-	++

«-» отрицательный результат; «+» положительный результат.

В дальнейшем проводились исследования проб, полученных от животных, инфицированных бешенством в естественных условиях (табл. 25). Установлено, что в большинстве случаев с применением ПТ РИФ диагноз на бешенство при исследовании консервированных головного мозга животных, заразившихся бешенством в естественных условиях, удавалось установить на пятые и десятые, реже на тридцатые и шестидесятые сутки после начала консервирования. С использованием указанного варианта РИФ при исследовании проб патологического материала спустя 90 сут после начала консервирования специфическую флуоресценцию выявить не удалось ни в одном случае.

Таблица 25 – Исследование патологического материала от животных, инфицированных бешенством в естественных условиях

Вид животного	РИФ*	Консервированный материал		
		Срок консервирования (сут)	ПТ РИФ	ПЖ РИФ
КРС	++++	5	++	+++
		10	++	+++
		30	+	+++
		60	-	+++
		90	-	++
лисица	+++	5	+++	+++
		10	+++	+++
		30	++	+++
		60	-	+++
		90	-	++
барсук	++++	5	+++	++++
		10	+++	+++
		30	-	+++
		60	-	+++
		90	-	++
собака	+++	5	+++	+++
		10	+++	+++
		30	+	+++
		60	-	+++
		90	-	++
собака	+++	5	+++	+++
		10	++	+++
		30	++	+++
		60	++	+++
		90	-	+++
лисица	++++	5	+++	++++
		10	++	+++
		30	-	+++
		60	-	+++
		90	-	++

«-» отрицательный результат; «+» положительный результат. * нативный материал. Светло-зеленым цветом выделены результаты, позволяющие поставить окончательный диагноз; серым цветом – отрицательные результаты/результаты, не позволяющие поставить окончательный диагноз на бешенство

Следует отметить, что при диагностике бешенства с использованием различных вариантов РИФ интенсивность флуоресценции в один крест («+»), как правило, считается недостаточной для постановки окончательного диагноза на это заболевание. При использовании ПЖ РИФ флуоресценция высокой интенсивности выявлялась при исследовании консервированных формалином проб вне зависимости от сроков консервирования, выбранных для проведения

данного исследования (5-90 сут).

Таким образом, на основании полученных результатов можно провести сравнение диагностической чувствительности ПТ РИФ и ПЖ РИФ в зависимости от сроков консервирования в растворе формалина (табл. 26).

Таблица 26 – Чувствительность ПТ и ПЖ РИФ при исследовании проб, полученных от животных, зараженных бешенством в естественных условиях

Срок консервирования (сут.)	**Чувствительность метода (%)***	
	ПТ РИФ	**ПЖ РИФ**
5	100	100
10	100	100
30	67	100
60	17	100
90	0	100

*Диагностическая чувствительность относительно результатов исследования в РИФ нативных проб головного мозга

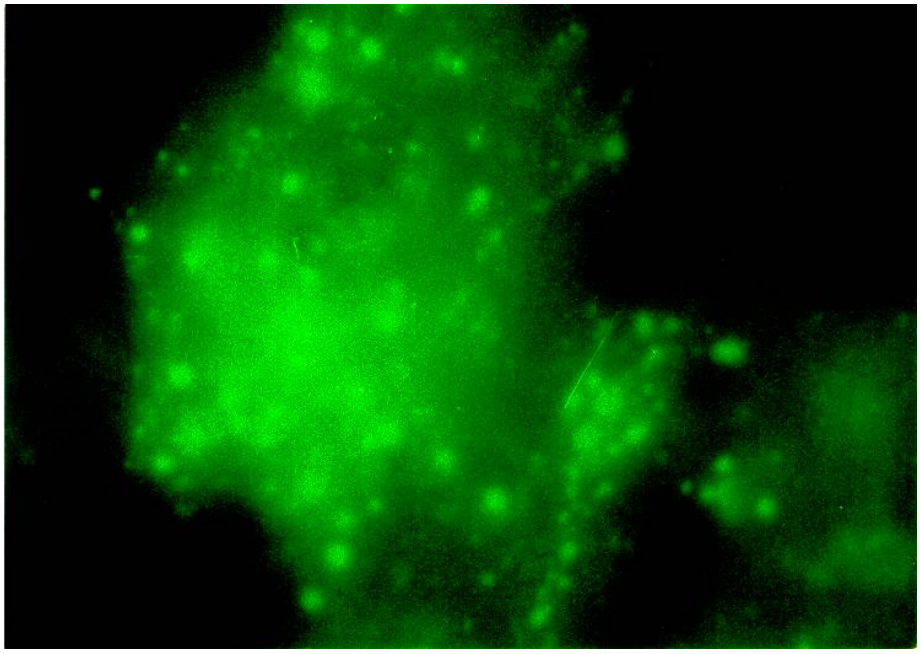
Проведенный анализ показал, что чувствительность двух сравниваемых методов была одинакова на пятые и десятые сутки после начала консервирования проб мозга в растворе формалина. Однако в дальнейшем чувствительность ПТ РИФ резко снижалась, тогда как чувствительность ПЖ РИФ сохранялась на прежнем уровне.

Оценка результатов проводилась как по интенсивности флуоресценции, так и по числу и локализации флуоресцирующих объектов. При этом специфическая флуоресценция регистрировалась в виде ярко светящихся изумрудно-зеленых включений в нейронах, а также за пределами клеток. Число флуоресцирующих включений в одном нейроне составляло от 1-2 до 15-20.

При использовании предложенного нами ПЖ РИФ в ряде случаев удавалось выявить не только тела, но и отростки нейронов, в которых также наблюдали флуоресцирующие включения, но в меньшем количестве (обычно 2-4 в одном отростке). За отрицательный результат принимали равномерно слабо светящийся зеленоватый фон без ярких включений (рис. 40).

Экспериментальным путем было установлено, что при увеличении срока инкубации материала с флуоресцирующим глобулином до 15-30 мин и более или

уменьшении кратности и продолжительности отмывок появляется сильное фоновое свечение, мешающее проведению исследований.



А.

В.

Рисунок 40 – Микрофотографии результатов постановки прямой жидкофазной реакции иммунофлуоресценции при диагностике бешенства с использованием консервированных формалином проб головного мозга. А – положительная реакция при использовании ПЖ РИФ, В – отрицательная реакция.

Расчет затрат времени на исследование одной пробы консервированного

формалином головного мозга в ПТ РИФ и ПЖ РИФ представлен в таблице 27.

Таблица 27 – Затраты времени на исследование одной пробы консервированного формалином патматериала в ПТ РИФ и ПЖ РИФ

ПТ РИФ		***ПЖ РИФ***	
Наименование этапа	**t^1 мин**	**Наименование этапа**	**t^1 мин**
Подготовка суспензии			
Приготовление суспензии	10	Приготовление суспензии	10
Трипсинизация	30	Трипсинизация, центрифугирование	35
Промывка	10	Промывка, центрифугирование	15
Постановка РИФ			
Нанесение осадка на предметное стекло	1	Ресуспендирование осадка	1
Высушивание	10	-----	-----
Фиксация в ацетоне	60	-----	-----
Высушивание	10	-----	-----
Окраска ФИТЦ-глобулином	30	Окраска с ФИТЦ-глобулином	10
Промывка	25	Центрифугирование и промывка, нанесение осадка на предметное стекло	26
Высушивание	10	Высушивание	10
Учет результатов			
Исследование препаратов с использованием люминесцентного микроскопа	5	Исследование препаратов с использованием люминесцентного микроскопа	5
Всего:	**201**	**Всего:**	**112**

t^1 – время проведения операции.

Установлено, что на реализацию ПЖ РИФ необходимо времени приблизительно на 56% меньше, чем при использовании ПТ РИФ. Кроме того, в ПТ РИФ фиксация препаратов в ацетоне в течение 60 мин в ряде случаев оказывалась недостаточной и приводила к их отслаиванию от предметного стекла во время промывки. Поэтому фиксацию приходилось проводить в течение 6-8 ч, что значительно увеличивало затраты времени.

Сравнение основных характеристик ПТ РИФ и разработанного ПЖ РИФ представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Характеристики ПТ РИФ и ПЖ РИФ

Показатели	Метод	
	ПТ РИФ	ПЖ РИФ
Срок выполнения	3,3-10 ч	1,5-2 ч
Применение токсичных химических веществ	для фиксации препаратов используется ацетон	ацетон не используется
Возможность потери материала во время фиксации и отмывки	возможна	исключена
Интенсивность флуоресценции	менее интенсивна	более интенсивна
Зависимость интенсивности флуоресценции от продолжительности консервирования в формалине	интенсивность флуоресценции снижается начиная с 10 сут после начала консервирования	интенсивность флуоресценции не снижается до 60 сут

По результатам проделанной работы получен Патент на изобретение Российской Федерации №2266755 «Способ выявления антигена вируса бешенства в формалинизированных пробах головного мозга», представленный в приложении 10.

3.2.1.5 Система эпизоотологического мониторинга бешенства в Российской Федерации

Разработка технического задания. Техническое задание разрабатывалось на основе анализа данных об эпизоотологической ситуации по бешенству в России, сложившейся в предыдущие годы. Установлено, что за анализируемый период (1999-2010 гг.) число случаев бешенства животных (инцидентная диагностика) варьировало в пределах от 1406 (2000 г.) до 5503 случаев (2007 г.). Наибольшее число случаев бешенства в 2010 г. регистрировалось в центральных, западных и южных регионах России, граничащих с Республикой Беларусь, Украиной и Казахстаном.

Разработанное техническое задание (на примере 2013 г.) на проведение мониторинговых исследований представлено в приложении 11. Оно содержит информацию о целях и задачах проведения исследований, целевой популяции, способах отбора и доставки проб и методах лабораторной диагностики, рекомендуемых для проведения исследований. В техническом задании также

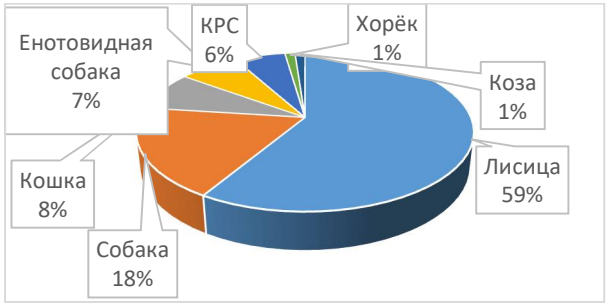
описаны меры безопасности и форма отчетности по завершении исследований.

Анализ результатов мониторинговых исследований. В 2011 г. силами 13 межобластных ветеринарных лабораторий (МВЛ) и референтных центров Россельхознадзора был впервые проведен мониторинг бешенства собак в 16 регионах Российской Федерации: Брянской, Тверской, Орловской, Тульской, Московской, Новосибирской, Магаданской, Саратовской, Ленинградской, Калининградской, Омской и Кемеровской обл., Республике Адыгея, Краснодарском, Ставропольском и Камчатском крае.

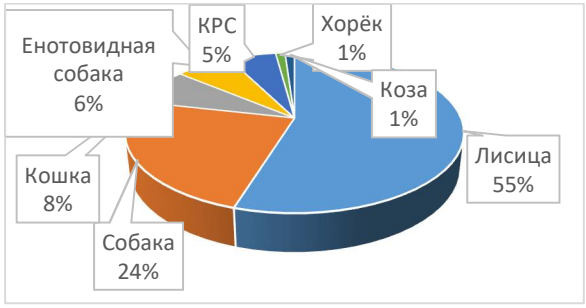
Ниже представлены ретроспективные данные и отчеты о проведении эпизоотологического мониторинга, которые были проанализированы в сравнительном аспекте по отношению к данным инцидентной диагностики на примере Брянской и Тверской обл.

В 2011 г. на территории Брянской обл. вне плана эпизоотологического мониторинга на бешенство была исследована 451 проба головного мозга различных видов животных (лисица, собака, кошка, енотовидная собака, КРС, лошадь, кролик, хомяк, куница, волк, хорек, шиншилла, выдра, крыса, МРС). В 87 случаях был получен положительный результат на бешенство, процент положительных проб при этом составил 19,3%.

Для проведения эпизоотологического мониторинга бешенства в этом регионе в 27 районах Брянской обл. и на территории г. Брянска были отобраны и исследованы 305 проб головного мозга бездомных собак разных половозрастных групп, старше 1 месяца. Положительные результаты лабораторных исследований были получены в 6 пробах патологического материала, процент положительных проб от общего числа исследованного патматериала составил 1,97%. Из данных, представленных на рисунке 41, следует, что суммирование показателей инцидентной диагностики и эпизоотологического мониторинга позволяет уточнить число случаев бешенства среди целевого вида животных (собаки). В данном случае расхождения составили 6%.



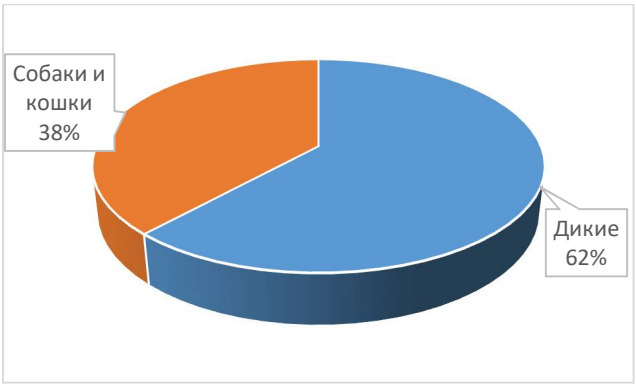
А.



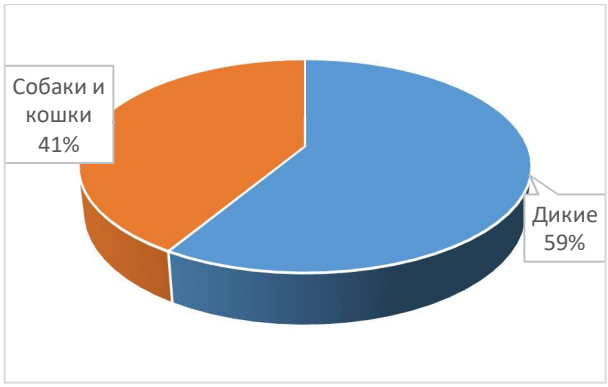
В.

Рисунок 41 – Сопоставление данных рутинной лабораторной диагностики и суммарных данных диагностики и мониторинга в Брянской обл. в 2011 г. А - лабораторная диагностика; В - лабораторная диагностика + эпизоотологический мониторинг.

В Тверской обл. в 2011 г. было выявлено 55 случаев бешенства животных в 3 городах и 14 районах, в том числе 34 у диких животных (лисица, енотовидная собака, хорек, рысь, кабан) и 21 – у домашних животных (собака, кошка). В рамках реализации эпизоотологического мониторинга было проведено 126 исследований в РИФ и обнаружено 3 положительные пробы, поступившие из Конаковского и Бежецкого районов, а также села Лесное. Результаты сопоставления данных инцидентной диагностики и эпизоотологического мониторинга представлены на рисунке 42.



А.



В.

Рисунок 42 – Сопоставление данных рутинной лабораторной диагностики и суммарных данных диагностики и мониторинга в Тверской области в 2011 г. А - лабораторная диагностика; В - лабораторная диагностика + эпизоотологический мониторинг.

Всего в рамках эпизоотологического мониторинга в 2011 г. было проведено 4188 исследований с использованием следующих методов

лабораторной диагностики: световая микроскопия, гистология, РИФ, ИФА, биопроба на мышах. В соответствии с отчетами лабораторий и данными автоматической системы сбора отчетности «Ассоль» всего для исследований поступило 2607 проб, 2587 из них от собак и 20 – от лисиц (Камчатский край). Были выявлены в общей сложности 23 положительные пробы, что составляет 0,89%. В ходе мониторинга бешенства в ранее благополучных по заболеванию регионах выявлено не было.

В 2012 г. мониторинг проводился как специалистами ФГБУ «ВНИИЗЖ», так и в региональных лабораториях Россельхознадзора. В соответствии с техническим заданием исследованию подлежали пробы головного мозга бездомных собак и кошек (не менее 30% от общего числа проб, собираемых в регионе) старше 1 мес., диких плотоядных животных (лисицы, енотовидные собаки, шакалы, песцы, волки, барсуки). Для проведения исследований в зоне ответственности ФГБУ «ВНИИЗЖ» исследованию подлежали пробы головного мозга животных, отобранных на территории Республики Карелия, Ставропольского края, Владимирской, Калужской, Ивановской и Псковской обл. Детализация исследований на бешенство проб головного мозга животных из субъектов РФ представлена в таблице 29.

Таблица 29 – Детализация плана в части исследований на бешенство

Регион	**Число проб**	**Методы исследования**		
		РИФ	**ИФА**	**Вирусовыделение в культуре клеток**
Республика Карелия	25	25	25	25
Владимирская обл.	25	25	25	25
Калужская обл.	25	25	25	25
Ивановская обл.	17	17	16	17
Псковская обл.	25	25	25	25
Ставропольский Край	17	17	16	17
Всего	**134**	**134**	**132**	**134**

Результаты исследований всех проб головного мозга указанными методами оказались отрицательными. Полученные данные не отражают общую

ситуацию по бешенству животных в выбранных регионах, так как по результатам инцидентной диагностики в 2012 г. большинство из них являлись неблагополучными по данному заболеванию (табл. 30). Исключение составила Республика Карелия, которая подтвердила статус региона, свободного от бешенства животных, что свидетельствует об эффективности антирабических мероприятий, проводимых в республике.

Таблица 30 – Количество животных, павших от бешенства в 1-3 кварталах 2012 г. в анализируемых субъектах РФ

Регионы РФ	**Количество животных, павших от бешенства**						**Всего**
	1 квартал		**2 квартал**		**3 квартал**		
	[1]Дом.	**[2]Дик.**	**Дом.**	**Дик.**	**Дом.**	**Дик.**	
Владимирская обл.	7	1	2	4	4	3	21
Калужская обл.	9	24	5	8	3	4	53
Ивановская обл.	2	2	3	2	1	5	15
Псковская обл.	1	1	2	10	0	6	20
Ставропольский край	10	2	3	3	7	0	25

[1]Домашние животные; [2]Дикие животные.

Что касается других видов животных, то наибольшее число проб по отношению к общему количеству из всех регионов поступило от волков – 14,9%, лисиц – 8,2%, медведей – 3,7%. Количество проб, отобранных от остальных видов животных, не превышало 1-3 шт.

В 2012 г. силами межобластных ветеринарных лабораторий был проведен мониторинг бешенства собак в 22 регионах Российской Федерации, в том числе в Брянской, Смоленской, Владимирской, Калужской, Псковской, Ивановской, Тверской, Орловской, Тульской, Московской, Новосибирской, Магаданской, Саратовской, Калининградской, Омской, Томской, Тюменской, Челябинской обл., Краснодарском, Приморском, Ставропольском краях и Республики Карелия. Всего было проведено 3521 исследований с использованием световой микроскопии, РИФ, ИФА, биопробы на мышах, в 173 исследованиях был получен положительный результат.

В 2013 г. в было проведено исследование на бешенство 195 проб головного мозга из Владимирской, Ивановской, Костромской, Ленинградской,

Новгородской, Рязанской, Самарской обл. и Республики Карелия (табл. 31).

Таблица 31 – Информация о происхождении проб патологического материала, поступившего для проведения исследований в 2013 г.

Субъект РФ	Вид животных	Количество проб	Положительных проб
Владимирская обл.	лисица	23	0
	кошка	1	0
Ивановская обл.	собака	4	0
	кошка	19	**1**
	хорек	1	0
Республика Карелия	волк	22	0
	рысь	2	0
	лисица	2	0
	собака	1	0
Костромская обл.	собака	14	0
	кошка	10	0
Ленинградская обл.	енотовидная собака	24	0
Новгородская обл.	кошка	19	0
	собака	5	0
Рязанская обл.	собака	12	0
	лисица	5	0
	кошка	7	**2**
Самарская обл.	собака	15	**1**
	кошка	8	0
	лисица	1	**1**
Всего		**195**	**5**

Таким образом, в рамках проведения мониторинга бешенства в 2013 г. в результате проведенных исследований было выявлено 5 изолятов вируса бешенства: 1 изолят от кошки из Ивановской обл., 2 изолята от кошек из Рязанской обл., 2 изолята из Самарской обл. (один от собаки и один от лисицы).

Разработанная и внедренная в 2011-2013 гг. система мониторинга бешенства в РФ используется по настоящее время (2018 г.).

3.2.1.6 Схема и методы оценки эффективности антирабической вакцинации животных

Оценка поствакцинального антирабического иммунитета у домашних и диких животных основана на определении уровней антирабических ВНА в биологическом материале (сыворотка крови, кровь, трупная жидкость из брюшной и грудной полостей). Для оценки эффективности проводимых

профилактических мероприятий также проводится изучение поедаемости оральных антирабических вакцин путем детекции биомаркера (антибиотики тетрациклинового ряда) (рис. 43).

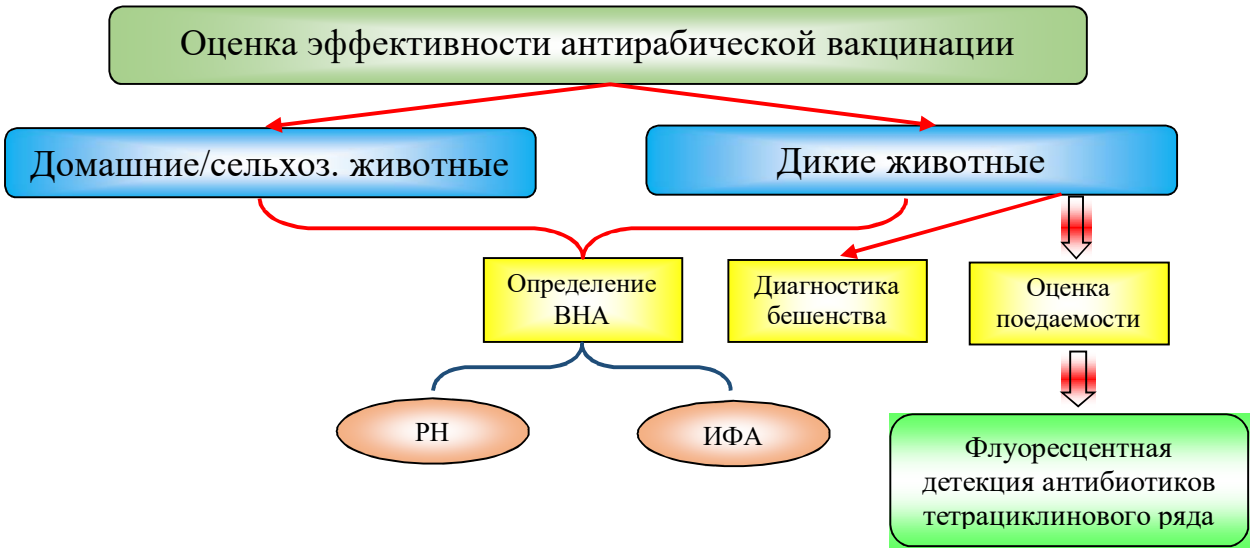


Рисунок 43 – Схема оценки эффективности антирабической вакцинации домашних/сельскохозяйственных и диких животных.

Для оценки эффективности проводимых мероприятий по борьбе с бешенством необходимо было разработать и адаптировать к применению методы лабораторной диагностики, позволяющие оценить уровни антирабических антител у вакцинированных животных, методы дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ, а также внедрить систему мониторинга эффективности антирабической вакцинации в России.

Для определения уровней антирабических ВНА при поступлении сывороток крови от домашних/сельскохозяйственных животных совместно с Чернышовой Е.В. адаптированы и внедрены в практику работы референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ» 3 варианта реакции нейтрализации: FAVN, RFFIT и микронейтрализация, имеющие разное назначение.

Реакция нейтрализации в культуре клеток для определения уровней антирабических вируснейтрализующих антител (модификация FAVN). FAVN предназначен для исследования проб сывороток крови хорошего качества, полученных, как правило, от домашних животных. Данный метод

предполагает учет результатов реакции по принципу «все или ничего», то есть при обнаружении в лунке планшета при микроскопировании даже одной инфицированной клетки реакция всей лунки учитывается как положительная. Разработаны «Методические указания по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (FAVN)» (прил. 12). Данный вариант РН в настоящее время широко используется для исследования проб сывороток крови, полученных от собак и кошек, предполагаемых к вывозу за рубеж, а также для прохождения международных сличительных испытаний.

Реакция нейтрализации в культуре клеток для определения уровней антирабических ВНА (модификация RFFIT). Для исследования сывороток крови плохого качества, а также трупной жидкости, которые поступают при проведении мониторинга эффективности антирабической вакцинации диких животных, разработан вариант РН в культуре клеток в модификации RFFIT. Данный вариант реакции отличается невысокими требованиями к качеству исследуемых проб и предполагает с целью снижения токсичности исследуемого биоматериала, предварительное его десятикратное разведение с последующей коррекцией в расчетах. Учет реакции осуществляется по 50% поражению монослоя культуры клеток. Результаты данной работы внедрены в практику в виде «Методических рекомендаций по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови диких плотоядных животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (RFFIT)» (прил. 13).

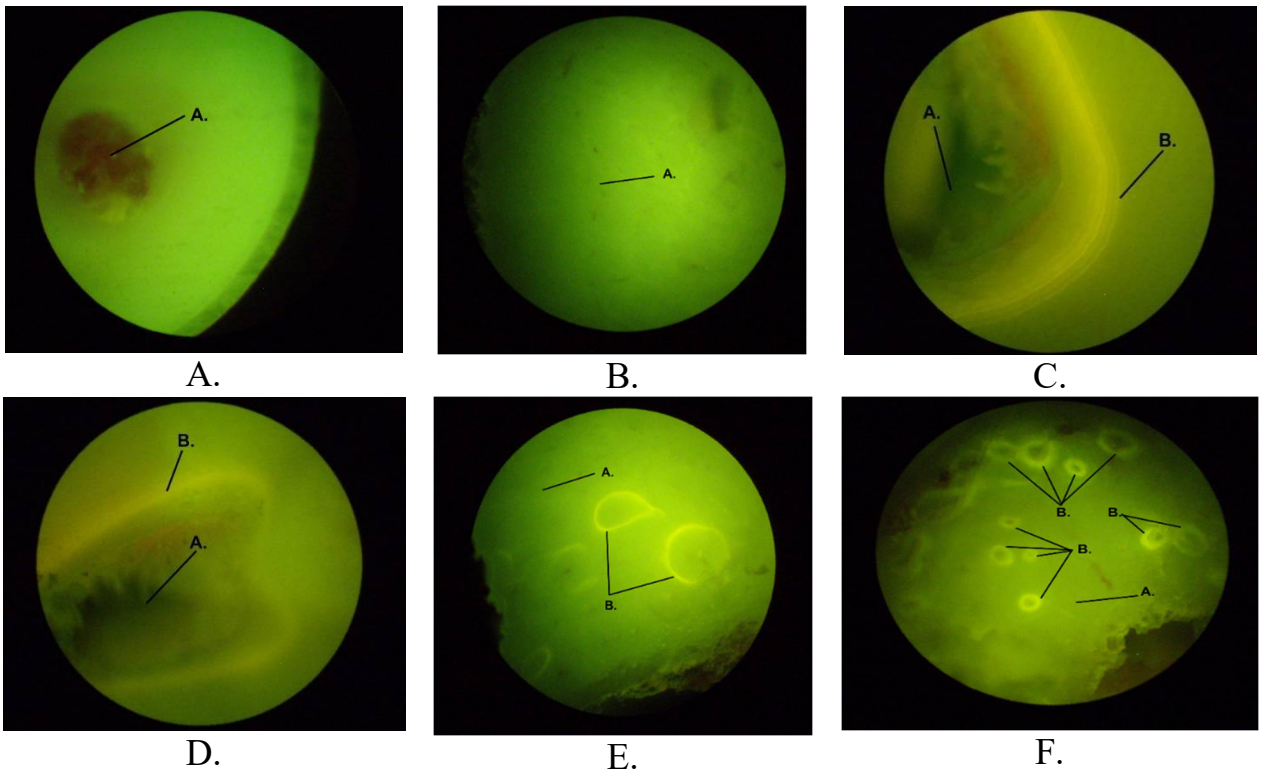
Реакция нейтрализации в культуре клеток для определения уровней антирабических ВНА (модификация RFFIT – микрометод). Разработан более экономичный вариант РН в культуре клеток, представляющий собой ускоренный микрометод, при использовании которого сокращается не только рабочее время, но и количество необходимых расходных материалов. Данный метод внедрен в лабораторную практику в виде «Методических указаний по ускоренному определению антирабических вируснейтрализующих антител в сыворотках

крови диких плотоядных животных в реакции микронейтрализации» (прил. 14).

ИФА для определения антител к ВБ. В качестве альтернативного метода разработан ИФА для определения IgG к гликопротеину ВБ. Данный метод позволяет исследовать пробы сывороток крови/трупной жидкости любого качества. Чувствительность метода, по сравнению с реакцией нейтрализации составляет 90,6%, специфичность – 80%. Результаты разработки и указания по применению данного метода представлены как «Методические указания по определению антител к гликопротеину вируса бешенства в сыворотках крови животных в иммуноферментном анализе» (прил. 15).

Определение содержания скоплений тетрациклина в тканях костей и зубов флуоресцентным методом. Для определения содержания скоплений тетрациклина в тканях костей и зубов флуоресцентным методом (оценка поедаемости оральных антирабических вакцин) разработаны и внедрены в лабораторную практику ФГБУ «ВНИИЗЖ», а также ряда ветеринарных лабораторий России «Методические рекомендации по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в тканях зубов и костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин» (прил. 16).

Для постановки метода используют срезы костной ткани или зубов животных, которые без какой-либо дополнительной обработки исследуют с использованием флуоресцентного микроскопа, при этом у животных, поедавших вакцинные приманки, содержащие в своем составе антибиотики тетрациклинового ряда, удается обнаружить светящиеся зеленовато-желтым цветом скопления тетрациклина в виде полос либо кругов различного размера, в зависимости от направления среза (рис. 44). При проведении исследований, в ряде случаев удается также установить кратность поедания вакцинных приманок по количеству флуоресцирующих линий благодаря свойству зубной ткани к постоянному росту и образованию новых слоев ткани, в которой при повторном поедании вакцинных приманок вновь скапливается тетрациклин.



A. B. C.

D. E. F.

Рисунок 44 – Микрофотографии срезов тканей костей и зубов, исследованных в прямом отраженном свете флуоресцентного микроскопа на предмет содержания тетрациклинов. Срезы тканей зуба (A) и кости нижней челюсти (B), не содержащие тетрациклин; срезы тканей зуба (C, D) и кости нижней челюсти (E, F), содержащие тетрациклин. На микрофотографиях: A – пульпальная полость зуба; B – скопления тетрациклина.

Разработанные, адаптированные и объединенные в единый комплекс методы лабораторной диагностики бешенства, а также необходимые для этого протоколы получения и очистки ВБ, методы оценки качества полученного очищенного вирусного антигена, методы оценки антирабического иммунитета вошли в основу методологии, примененной в ходе проведения совместной научно-исследовательской работе с ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации по получению моноклональных антирабических антител.

В рамках данного сотрудничества был получен Патент на изобретение Российской Федерации № 2533802 «Тримеризованное однодоменное антитело, специфически связывающееся с гликопротеином G вируса бешенства, нейтрализующее вирус бешенства» (прил. 17).

3.2.1.7 Результаты мониторинга эффективности антирабической вакцинации домашних животных в РФ

Система мониторинга эффективности иммунизации против бешенства домашних (включая сельскохозяйственных) животных основывается на следующих мероприятиях:

- изучение отчета о проведенной вакцинации (основные показатели: тип и наименование вакцины, доля вакцинированных животных в популяции);
- изучение соответствия применяемого антирабического препарата российским и международным требованиям (подтверждение факта действующей на момент применения препарата регистрации с использованием модуля «Ирена» Государственной информационной системы в области ветеринарии ВетИС);
- отбор биологического материала (кровь) у вакцинированных против бешенства животных, получение сыворотки крови, составление описи проб, составление сопроводительного документа, отправка проб в сертифицированную лабораторию для проведения исследований;
- исследование проб сывороток крови в условиях сертифицированной и прошедшей международные либо национальные межлабораторные сличительные испытания лаборатории;
- анализ полученных результатов.

При антирабической вакцинации собак, кошек и КРС использовались отечественные и импортные инактивированные антирабические вакцины, зарегистрированные на момент проведения исследования на территории РФ:

- вакцина антирабическая инактивированная сухая культуральная из штамма «Щелково-51» для собак и кошек «Рабикан» (ФКП «Щелковский биокомбинат», Щелковский район, Московская обл., Россия);
- вакцина антирабическая из штамма «Щелково-51» инактивированная жидкая культуральная «Рабиков» (ФКП «Щелковский биокомбинат», Щелковский

район, Московская обл., Россия);

- вакцина антирабическая культуральная концентрированная инактивированная жидкая – «Рабивак» (ООО «Агровет», Москва, Россия);
- вакцина против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного, коронавирусного энтеритов, лептоспироза и бешенства собак «Мультикан-8» (ООО «Ветбиохим», Москва, Россия);
- вакцина против бешенства, чумы плотоядных, парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита, аденовироза и лептоспироза собак – «Дипентавак» (ООО фирма НПВиЗЦ «Ветзвероцентр», Москва, Россия);
- вакцина против бешенства животных инактивированная «Nobivac Rabies» («Intervet International B.V.», Нидерланды);
- вакцина против чумы, аденовирозов, парвовироза, парагриппа-2, лептоспироза и бешенства собак «Эурикан DHPPI2-LR» (Merial, Франция);
- вакцина против чумы, аденовирозов, парвовироза, лептоспироза и бешенства собак «Гексадог» (Merial, Франция);
- вакцина для профилактики бешенства у животных «Рабизин» (Merial, Франция).

Пробы сывороток крови животных, иммунизированных против бешенства, отбирались сотрудниками ветеринарных служб регионов и доставлялись в замороженном виде в ФГБУ «ВНИИЗЖ» для определения уровней антирабических ВНА.

Результаты определения уровня антирабических вируснейтрализующих антител в пробах сывороток крови КРС. Пробы от животных, иммунизированных антирабической вакциной «Рабиков» приготовленной из штамма «Щелково-51», поступивших из различных регионов России, представлены в таблице 32. Пробы крови отбирались от животных, вакцинированных в соответствии с инструкцией к препарату спустя 1-4 месяца после вакцинации. При оценке иммуногенной активности инактивированной антирабической вакцины «Рабиков» из штамма «Щелково-51» в полевых

условиях, по результатам исследования 129 проб сывороток крови, полученных от КРС из Нижегородской, Тверской обл. и Алтайского края, уровень сероконверсии у КРС составил порядка 90,3%. Четкой зависимости уровней антирабических ВНА от возраста животных не прослеживается.

Таблица 32 – Иммунный статус КРС после вакцинации

Хозяйство/область	кол-во голов	Средний уровень ВНА в МЕ/мл	% защищенных животных
Нижегородская обл.	70	11,58±1,26	93
Алтайский край	20	2,71±0,54	90
Тверская обл.	39	1,83±0,37	88
Итого/среднее значение	129	5,4+0,72	90,3

*по международным стандартам животные считаются защищенными от бешенства, если у них в сыворотке крови уровень антирабических антител не менее 0,5 МЕ/мл.

Результаты сравнительного испытания иммуногенной активности антирабических вакцин на собаках и кошках. Для сравнительного испытания иммуногенной активности антирабических вакцин «Рабикан» и «Nobivac Rabies» в полевых условиях были сформированы 2 группы собак в возрасте 1-6 лет. Вакцину «Рабикан» применяли на собаках в Нижегородской обл., вакцину «Nobivac Rabies» - в г. Санкт-Петербурге. Результаты сравнения иммуногенной активности этих вакцин представлены в таблице 33.

При использовании вакцины «Рабикан» достаточный для защиты от бешенства уровень антирабических ВНА установлен у 84,9% животных, а при использовании вакцины «Nobivac Rabies» – у 87,9%. При этом средний уровень антител при использовании вакцины «Рабикан» составил 6,68±1,43 МЕ/мл, у вакцины «Nobivac Rabies» – 4,53±0,79 МЕ/мл.

Аналогичные исследования проводили среди собак в различных регионах РФ. Так, исследования, проведенные в г. Москве и г. Зеленограде Московской обл., где применяли инактивированные антирабические вакцины либо вакцины, содержащие антирабический компонент, показали, что из 75 исследованных проб в 58 (77,3%) удалось выявить достаточный для защиты от заражения бешенством уровень антирабических ВНА (0,5 МЕ/мл и более).

Таблица 33 – Результаты сравнительного испытания иммуногенных свойств вакцин «Рабикан» и «Nobivac Rabies» на собаках

№ экс.	«Рабикан»		№ экс.	«Nobivac Rabies»	
	Возраст, лет	РН, МЕ/мл		Возраст, лет	РН, МЕ/мл
1	2	3	4	5	6
424	2	**0,5**	948	3	**16,0**
425	3	0	949	4	**>16,0**
426	3	**16,0**	950	3,3	**4,0**
434	1	**2,0**	951	2,9	**1,0**
437	3,5	**2,0**	952	3,5	**4,0**
438	2	**2,0**	953	3,4	**1,0**
439	3	**2,0**	954	2,5	**4,0**
443	3	**4,0**	955	3	**0,5**
445	2	**4,0**	956	3,3	**8,0**
447	3	**>16,0**	957	4	**4,0**
448	6	**>16,0**	958	2	**0,5**
449	4	**>16,0**	959	4	**1,0**
452	3	**1,0**	960	2,5	**4,0**
457	4	**2,0**	961	3	**8,0**
471	3	**16,0**	962	3	**0,5**
472	3	**16,0**	963	2,7	**1,0**
475	4	**4,0**	964	3,7	**8,0**
476	3	**0,5**	965	2	**8,0**
477	4	**2,0**	966	3,5	**2,0**
480	4	**4,0**	967	3,7	0
483	2	**4,0**	968	3,5	**4,0**
486	2	**4,0**	969	2	**2,0**
487	4	**8,0**	970	3	0,25
488	5	**4,0**	971	3	**8,0**
496	4	**4,0**	972	3	**4,0**
497	2	**4,0**	973	2,7	**4,0**
394	1	0,25	974	3	**0,5**
395	1	**0,5**	975	2	**8,0**
399	3	**0,5**	976	3	**8,0**
400	1	0,25	977	3,9	**1,0**
401	2	0,25	978	1,4	0,25
402	1	0,25	979	2	0,25
459	2	**>32,0**	980	2	**0,5**

В г. Саратове и ряде близлежащих городов Саратовской обл. было собрано 25 проб сывороток крови собак, иммунизированных инактивированными антирабическими вакцинами. В 23 пробах (92%) удалось выявить достаточный для защиты от заражения бешенством уровень антирабических ВНА.

Применение вакцины «Рабикан» для антирабической иммунизации собак и кошек на территории г. Ставрополя, а также городов Ставропольского края:

Кисловодск, Невинномысск, Лермонтов, Ессентуки – показало, что из 28 проб сывороток крови животных (23 от собак и 5 от кошек) в 20 (71,4%) удалось выявить протективный уровень антирабических ВНА.

Применение этой же вакцины в популяции собак и кошек на территории г. Владимира и некоторых городов Владимирской обл. показало, что из 77 исследованных сывороток крови (72 от собак и 5 от кошек), в 60 (77,9%) удалось выявить протективный уровень антирабических ВНА.

На территории г. Нижний Новгород было собрано 62 пробы сывороток крови собак, иммунизированных инактивированными антирабическими вакцинами «Рабикан», «Nobivac Rabies», «Мультикан-8», в г. Дзержинске Нижегородской обл. – 39 проб сывороток крови собак. В 52 пробах, поступивших из г. Нижний Новгород (83,9%) удалось выявить достаточный для защиты от заражения бешенством уровень антител, в г. Дзержинске этот показатель составил 37 животных (94,9%). При использовании вакцины «Рабикан» в г. Нижний Новгород отсутствие антирабических ВНА было отмечено у 5 животных, т.е. у 12,2% от общего числа иммунизированных этой вакциной животных. При использовании вакцины «Nobivac Rabies» этот показатель составил 3 (18,8%), а при использовании вакцины Мультикан-8 – 1 (20%). Однако следует отметить, что выборка по вакцинам «Nobivac Rabies» и «Мультикан- 8» в сравнении с вакциной «Рабикан» была небольшой, что могло отразиться на достоверности статистических данных.

3.2.1.8 Мониторинг наличия антирабических антител у диких животных

Предстояло определить наличие и уровень антирабических ВНА у больных бешенством животных в природных условиях, сравнить их с таковыми у вакцинированных животных с целью исключения искажающего влияния данного фактора при оценке вакцинации. В зонах оральной антирабической вакцинации у отстрелянных диких плотоядных животных (лисиц и енотовидных собак) отбирали пробы головного мозга для диагностики бешенства и пробы

крови/трупной жидкости (табл. 34). Исследование проводилось на территории Владимирской и Ярославской обл. Пробы отбирали в зоне вакцинации не ранее чем через 30 сут после раскладки оральной антирабической вакцины.

Таблица 34 – Результаты исследования уровней антирабических ВНА в сыворотках крови больных бешенством диких животных

№ экспертизы	Вид животного	Уровни ВНА, МЕ/мл	Регион
26	лисица	4,0	Владимирская обл.
28	лисица	4,0	
2214	лисица	0,5	
2216	лисица	2,0	
2344	лисица	2,0	
2345	лисица	1,0	
2347	лисица	8,0	
2354	лисица	1,0	
2368	лисица	0,5	
2987	лисица	0,5	
2988	лисица	1,0	
15	лисица	4,0	
186	рысь	4,0	
538	лисица	4,0	Ярославская обл.
623	лисица	0,5	
638	енотовидная собака	2,0	
661	лисица	0,5	
673	лисица	0,5	
685	лисица	2,0	
686	лисица	0,5	
691	лисица	4,0	
2232	лисица	2,0	

Результаты исследования проб крови, полученных от больных бешенством лисиц, отобранных в ходе мониторинга бешенства и эффективности оральной антирабической вакцинации диких животных во Владимирской и Ярославской обл., показали содержание антирабических ВНА от 0,5 до 8,0 МЕ/мл.

В таблице 35 представлены уровни сероконверсии у животных, не больных бешенством, пробы от которых были отобраны в зоне оральной вакцинации Владимирской и Ярославской обл. Установлено, что вакцинированные в природных условиях, но не больные бешенством животные (по результатам лабораторной диагностики) показывали уровни антирабических ВНА 0,5-32 МЕ/мл, чаще в диапазоне 1,0-8,0 МЕ/мл. Исключение таких проб из выборки при оценке эффективности оральной антирабической иммунизации возможно на

основании исследования пробы головного мозга от каждого животного, включенного в мониторинг.

Таблица 35 – Результаты исследования уровней антирабических ВНА в сыворотках крови не больных бешенством диких животных

№ экспертизы	Вид животного	Уровни ВНА, МЕ/мл	Регион
19	лисица	8,0	Владимирская обл.
20	лисица	8,0	
21	лисица	8,0	
22	лисица	4,0	
23	лисица	4,0	
24	лисица	16,0	
25	лисица	2,0	
27	лисица	32,0	
2346	лисица	0,5	
2369	лисица	0,5	
2510	лисица	4,0	
2515	лисица	4,0	
2343	лисица	1,0	
627	лисица	0,5	Ярославская обл.
640	лисица	0,5	
648	лисица	1,0	
649	лисица	0,5	
653	енотовидная собака	0,5	
655	енотовидная собака	1,0	
668	лисица	2,0	
669	лисица	0,5	
674	лисица	1,0	
678	енотовидная собака	1,0	
680	енотовидная собака	1,0	

Полноценная же система мониторинга должна включать также исследование пробы костной ткани для оценки содержания тетрациклина (оценка поедаемости).

3.2.1.9 Система межлабораторных сличительных испытаний как мероприятие по контролю качества проводимой диагностической работы

Система межлабораторных сличительных испытаний (МСИ) разрабатывалась с целью повышения качества и достоверности проводимой лабораторной диагностики бешенства.

Обеспечение национальных МСИ. С целью проведения МСИ была

разработана проверочная панель. В состав панели вошли десять замороженных проб головного мозга различных видов животных, поступивших ранее для диагностики бешенства, диагноз по которым был установлен и не вызывал сомнений. Пробы головного мозга были расфасованы в стеклянные флаконы с обозначением индивидуального номера и номера проверочной панели. Флаконы помещали в пластиковую блистерную упаковку и хранили при температуре минус 20°С до проведения МСИ.

Для учета результатов был разработан бланк, в котором проходящий проверку специалист указывает результаты исследования (прил. 18). Ключ к шифру при этом находился в запечатанном конверте, который распечатывали после окончания проведения исследований с целью проверки их правильности в присутствии членов комиссии. На первом этапе было изготовлено 4 панели.

Каждый проходящий проверку специалист, проводивший исследование проб, включенных в панель, в течение 2 ч с момента начала исследований обязан был дать ответ о статусе проб и заполнить анкету, в которой, кроме результатов исследований, сообщал комиссии свои персональные данные и информировал о стаже работы.

Затем в присутствии всех членов комиссии, а также проходящего проверку специалиста конверт с шифром распечатывали и проводили расшифровку проб. По результатам каждой проверки составляли акт, в котором отражалось техническое состояние диагностических отделов, уровень обеспечения квалифицированными кадрами, правильность ведения документации, а также, собственно, результаты проверки. С 2010 г. МСИ в России начали проводить ежегодно в рамках приказов Россельхознадзора при провайдорстве ФГБУ «ВНИИЗЖ» и обязательном участии всех межобластных ветеринарных лабораторий и референтных центров Россельхознадзора. В 2010, 2012, 2014, 2015, 2016 и 2017 гг. при проведении МСИ выявлялись ошибки при постановке диагноза на бешенство. Так, только в 2012 г. при проведении МСИ было выявлено 10 ложноположительных и один ложноотрицательный результат.

Корректирующие мероприятия при этом включали обучение специалистов в формате индивидуальной стажировки на базе ФГБУ «ВНИИЗЖ» (табл. 36).

Таблица 36 – Результаты МСИ в 2005-2017 гг.

Год	Кол-во лабора-торий	Регионы/лаборатории	Кол-во соответ-ствий	Кол-во проб в панели	Кол-во ложно-положи-тельных	Кол-во ложно-отрица-тельных
2005	4	Московская обл.	4	10	0	0
2010	8	Ярославская ОВЛ, Орловский РЦ, Тульская МВЛ, Смоленская ОВЛ, Владимирская ОВЛ, Калужская ОВЛ, Тверская МВЛ, Нижегородская ОВЛ	1	10	1	7
2011	3	Брянская МВЛ, Смоленская ОВЛ, зональная ВЛ, г. Светлограда	3	10	0	0
2012	13	все лаборатории РСХН	7	10	10	1
2013	13	все лаборатории РСХН	10	10	4	0
2014	13	все лаборатории РСХН	7	10	5	10
2015	13	все лаборатории РСХН	12	10	2	0
	3	Курская ОВЛ, Липецкая ОВЛ, Рязанская ОВЛ	2	10	1	2
2016	13	все лаборатории РСХН	13	10	0	0
	2	Лаборатории РСХН	1	6	1	0
	5	Приморская МВЛ, Камчатская МВЛ, Ленинградская МВЛ, Костромская ОВЛ, Рязанская ОВЛ	4	10	0	4
2017	14	все лаборатории РСХН	13	4	0	1
	2	Лаборатории РСХН	2	5	0	0
	3	Новозыбковская ЗВЛ Брянской обл., Камчатская МВЛ, Коми, РВЛ	2	10	1	0

Прохождение международных МСИ. С 2009 г. по настоящее время ФГБУ «ВНИИЗЖ» успешно проходит ежегодный международный квалификационный тест по определению антирабических ВНА в сыворотках крови животных, а с 2015 г. – по диагностике бешенства животных и определению содержания скоплений тетрациклина в тканях костей и зубов флуоресцентным методом для оценки поедаемости оральных антирабических вакцин. Разработанная и внедренная схема МСИ представлена на рисунке 45.

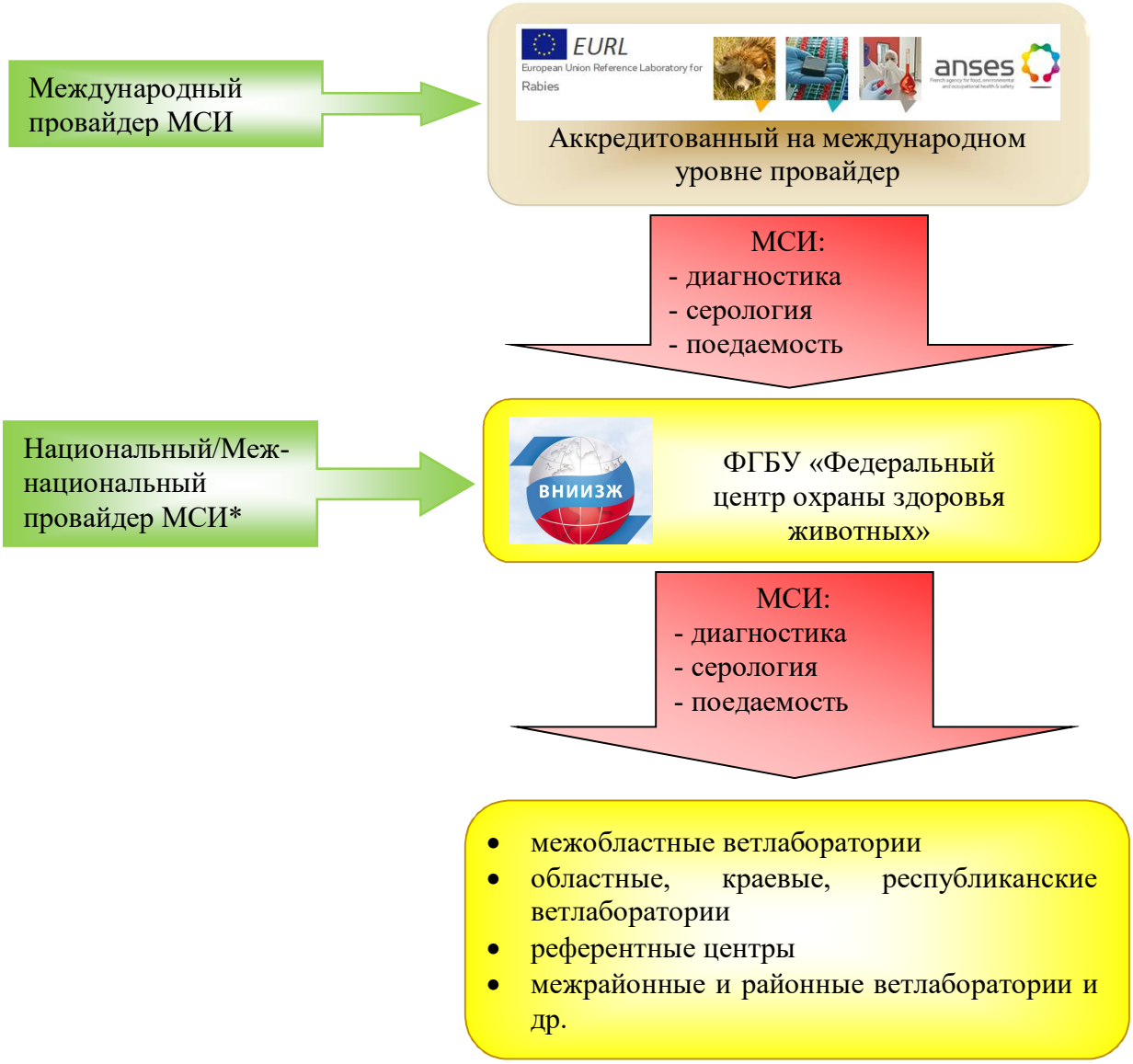


Рисунок 45 – Система международных и национальных межлабораторных сличительных испытаний. *Национальный провайдер в рамках исполнения функций диагностического центра по исследованию на бешенство, межнациональный – в рамках исполнения функций координатора СНГ по реализации Комплекса совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.

3.2.2 Изучение молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства

Данные исследования включают:

- разработку методов изучения молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ;
- изучение молекулярно-биологических характеристик российских и зарубежных полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ;

- изучение антигенных характеристик вакцинных штаммов ВБ.

3.2.2.1 Методы изучения молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства и их дифференциации

С целью получения нуклеотидных последовательностей для проведения последующего нуклеотидного секвенирования был разработан (Метлин А.Е., 2004), позднее усовершенствован метод (Чернышова, 2018) ОТ-ПЦР, основанный на применении 2 пар праймеров. Секвенирование полученных продуктов ПЦР проводилось с использованием автоматического секвенатора ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, США).

Дифференциация на основе разделения ПЦР-продуктов в агарозном геле путем горизонтального электрофореза. В процессе проведенных исследований по получению полного генома вакцинного штамма «РВ-97» установлено, что в пределах G-Ψ-L-региона генома вакцинных штаммов ВБ «РВ-97» и «ВНИИЗЖ» в позиции 4942-4950 имеется вставка размером 9 н.о. (рис. 46), которая отсутствовала у изучаемых полевых изолятов. Была изучена возможность применения горизонтального гель-электрофореза высокого разрешения для дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ.

```
                4921        4931        4941        4951        4961
                 ↓           ↓           ↓           ↓           ↓
PB-97           CCGAAGATCA  CCTCCCCTTT  AAGTTTGCTT  TATTGGGGGG  AATCTCCGGG
18/2005         CTGAAGTTCG  CCTCCCCTCG  G.........  GGTTGGGGGG  AATCTCCGGG
12/2005         CTGAAGTTCG  CCTCCCCTCG  G.........  GGTTGGGGGG  AATCTCCGGG
188/2002        TTGAAGATCA  CCTCCCCCTG  G.........  GGTTGGGGGG  AATCTCTGGG
RV1511/1988     CTGAAGGTCA  CCTCCCCTTG  G.........  GGTTGAGAGG  AATCTCTGGG
```

Рисунок 46 – Выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагментов генома вакцинного штамма «РВ-97» и полевых изолятов ВБ. Красным цветом обозначена вставка из 9 нуклеотидных оснований у вакцинного штамма «РВ-97». Точками обозначена делеция 9 нуклеотидных оснований у полевых изолятов.

Результаты проведения горизонтального гель-электрофореза, полученные с применением агарозного геля различной концентрации и в различных условиях, представлены на рисунках 47-50.

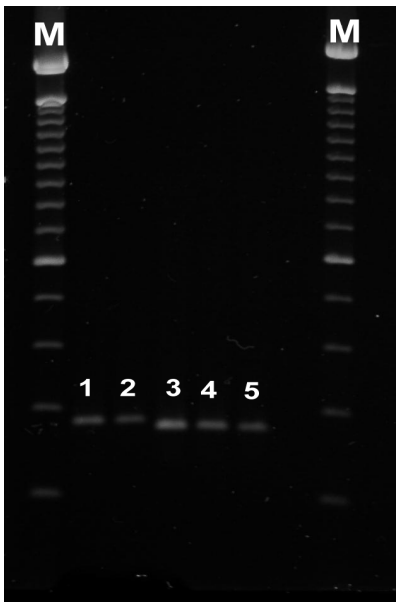


Рисунок 47 – Электрофореграмма гель-электрофореза высокого разрешения (1% MetaPhore® агарозный гель). Время проведения анализа – 3,5 ч, напряжение – 100 V, размер геля – 15×15 см. Дорожки *1* и *2* – вакцинные штаммы «РВ-97» и «ВНИИЗЖ» соответственно. Дорожки *3*, *4* и *5* – полевые изоляты ВБ «RV1511», «18» и «188».

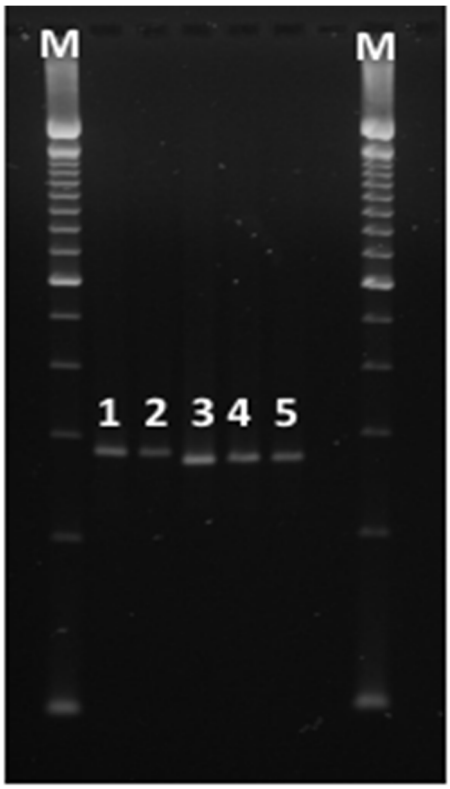


Рисунок 48 – Электрофореграмма гель-электрофореза высокого разрешения (2% MetaPhore® агарозный гель). Время проведения анализа – 2,5 часа, напряжение – 100 V, размер геля – 15×15 см. Дорожки *1* и *2* – вакцинные штаммы «РВ-97» и «ВНИИЗЖ» соответственно. Дорожки *3, 4* и *5* – полевые изоляты ВБ «RV1511», «18» и «188».

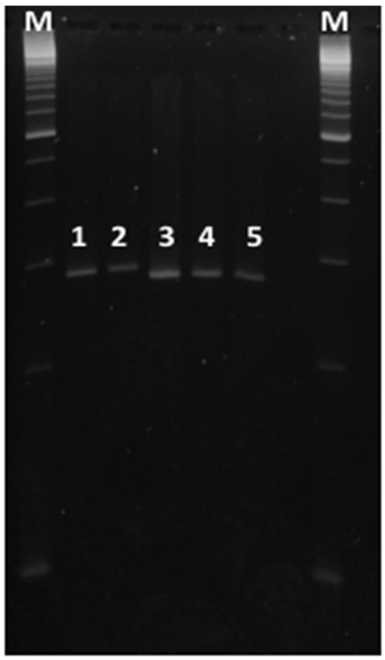


Рисунок 49 – Электрофореграмма гель-электрофореза высокого разрешения (3% MetaPhore® агарозный гель). Время проведения анализа – 3,5 часа, напряжение – 100 V, размер геля 15×15 см. Дорожки *1* и *2* – вакцинные штаммы «РВ-97» и «ВНИИЗЖ» соответственно. Дорожки *3*, *4* и *5* – полевые изоляты ВБ «RV1511», «18» и «188».

Рисунок 50 – Электрофореграмма гель-электрофореза высокого разрешения (3% MetaPhore® агарозный гель). Время проведения анализа – 4,5 часа, напряжение – 100 V, размер геля – 15×15 см. Дорожки *1* и *2* – вакцинные штаммы «РВ-97» и «ВНИИЗЖ» соответственно. Дорожки *3*, *4* и *5* – полевые изоляты ВБ «RV1511», «18» и «188».

Как видно из представленных электрофореграмм, несмотря на применение различных концентраций электрофорезного агарозного геля (при одинаковом размере гелевой пластинки), достоверно отличить ПЦР-продукты вакцинных штаммов от ПЦР-продуктов полевых изолятов не представляется возможным. Разница в размере ПЦР-продуктов в ряде случаев очевидна, однако не поддается контролю с использованием существующих маркеров (стандартов размера ПЦР-продуктов). В связи с этим было принято решение о проведении работ по применению ферментов рестрикции для дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ.

Дифференциация на основе применения ферментов рестрикции

Для дифференциации с использованием ферментов рестрикции были выбраны ПЦР-продукты фрагментов генома полевых изолятов и вакцинных штаммов «РВ-97» и «SAD B19» (рис. 51, 52).

```
                                                                CfrI
                                                                 ↓
[1]SAD B19          AATCACACAA GAGTGGGGGT GAGACCAGAC TGTAAGGACT GGCCGTCCTT
[2]RV_97            AATCATATAA AAGTGGGGAT GAAGCTAGAC TGTGAAGGCT GGTCATCCTT
[3]12_2005          AGTCATATAA GAGTGGGGGT GAGACTAGAC TGTGAAGGTT GGTCATCCTC

SAD B19             TCAACGATCC AAGTCCTGAA GATCACCTCC CCTTGGGGGG TTCTTTTT..
RV_97               TCGACACTTC GAGTTCCGAA GATCACCTCC CCTTTAAGTT TGCTTTATTG
12_2005             TGGACGCTTC AAGTCCTGAA GTTCGCCTCC CCTCGGG... ......GTTG
                           SduI                          BstXI
                            ↓                             ↓
SAD B19             ...GAAAAAC CTGGGTTCAA TAGTCCTCCT TGAACTCCAT GCAACTGGGT
RV_97               GGGGGAATCT CCGGGTTCAA GAGTCCTCCT TGAACTCCAT GCGACAGAGT
12_2005             GGGGGAATCT CCGGGCTCAA TAGTCCTCCT TGAACTCCAT GCAACAGGGT

SAD B19             AGATTCAAGA GTCATGAGAT TTTCATTAAT CCTCTCAGTT GATCAAGCAA
RV_97               AGATTCAAGA GTCATGAGAC TCTCATTAAT CCTCTCAGTT GATCAAATCA
12_2005             AGATTCAAGA GTCATGAGAC TTTCATTAAT CATCTCAGTT GATCAAACAA
                                 Bsh1236I;SmuI
                                      ↓
SAD B19             GATCATGTCG ATTCTCATAA TAGGGGAGAT CTTCTAGCAG TTT
RV_97               AGTCATGTAG ATTCTCATAA CGCGGGAGAT CTTCTAGCAG TTT
12_2005             GGTCATGTAG ATTCTCAAAA CACGGGAAAT CTTCTAGCAG TTT
```

Рисунок 51 – Выравнивание фрагментов G-Ψ-L-региона генома испытуемых штаммов вируса бешенства и специфическая карта рестрикции. Регистрационные номера в базе данных GeneBank: [1]«SAD B19» – EF206709.1; [2]«РВ-97» – EF542830.1; [3]«12_2005» – DQ468328.1.

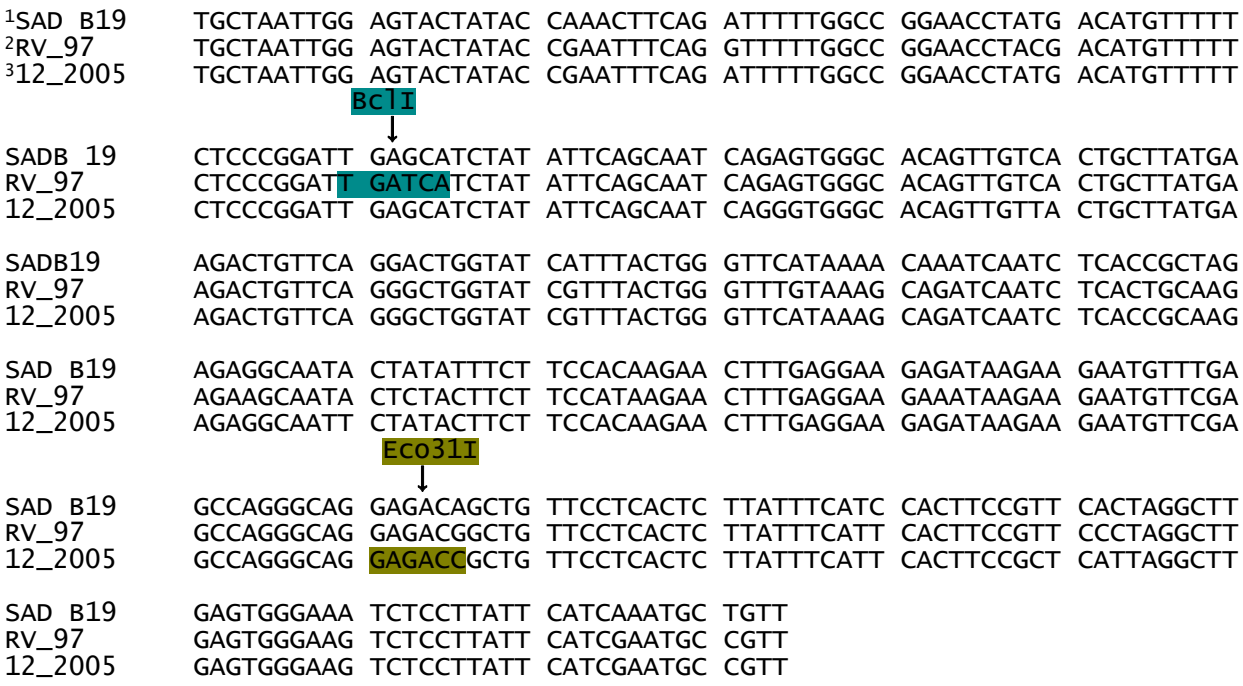


Рисунок 52 – Выравнивание фрагментов N-региона генома испытуемых штаммов ВБ и специфическая карта рестрикции. Регистрационные номера в базе данных GeneBank: [1]«SAD B19» – EF206709.1; [2] «PB-97» – AY705430.1; [3]«12_2005» – DQ462423.1.

При проведении подбора рестриктаз *in silico*, кроме специфического расщепления заданной нуклеотидной последовательности на фрагменты, разделяемые в процессе горизонтального электрофореза в агарозном геле, одним из критериев отбора служила оптимальная температура инкубации. Она должна была совпадать с температурой инкубации для других ферментов, позволяя проводить исследования одновременно.

Выбранные ферменты показали способность к расщеплению ПЦР-продуктов в соответствии с предсказанной структурой расщепления. Полученные продукты рестрикции имели размеры, соответствующие расчетным (рис. 53, 54). Размер ПЦР-продуктов определялся с использованием контрольных маркеров для гель-электрофореза разрешающей способностью на 100 н. о. и 10 н. о. (Invitrogen).

Полученные результаты позволили дифференцировать изучаемые вакцинные штаммы от используемого в опыте полевого изолята ВБ и друг от друга.

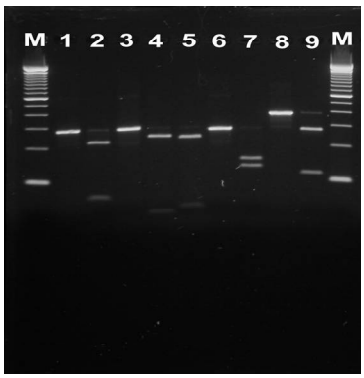


Рисунок 53 – Электрофореграмма применения ферментов рестрикции к ПЦР-продуктам для дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ. Дорожки: *1* – не ферментированный ПЦР-продукт штамма «SAD B19» (G-Ψ-L-регион); *2* – ПЦР-продукт G-Ψ-L-регион «SAD B19», обработанный рестриктазой CfrI; *3* – не ферментированный ПЦР-продукт штамма «РВ-97» (G-Ψ-L-регион); *4* – ПЦР-продукт G-Ψ-L-регион штамма «РВ-97», обработанный рестриктазой Bsh1236I; *5* – ПЦР-продукт G-Ψ-L-регион штамма «РВ-97», обработанный рестриктазой SmuI; *6* – не ферментированный ПЦР-продукт изолята ВБ «12_2005» (G-Ψ-L-регион); *7* – ПЦР-продукт G-Ψ-L-регион изолята ВБ «12_2005», обработанный рестриктазой SduI; *8* – не ферментированный ПЦР-продукт изолята ВБ «12_2005» (N-регион); *9* – ПЦР-продукт изолята ВБ «12_2005» (N-регион), обработанный рестриктазой Eco31I. М – маркер размеров ПЦР-продуктов.

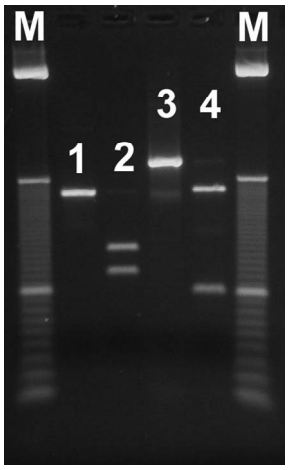


Рисунок 54 – Электрофореграмма применения ферментов рестрикции к ПЦР-продуктам для дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ. Дорожки: *1* – не ферментированный ПЦР-продукт штамма «SAD B19» (G-Ψ-L-регион); *2* – ПЦР-продукт G-Ψ-L-регион штамма «SAD B19», обработанный рестриктазой BstXI; *3* – не ферментированный ПЦР-продукт штамма «РВ-97» (N- регион); *4* – ПЦР-продукт (N- регион) штамма «РВ-97», обработанный рестриктазой Bc1I. М – маркер размеров ПЦР-продуктов.

Воспроизводимость данного эксперимента была в дальнейшем подтверждена с использованием ряда полевых изолятов ВБ, в том числе «RV1511» (EF095206.1, DQ269940.1), «1904» (AY702676.1, AY705415.1), «78» (AY702686.1, AY705425.1) «48» (DQ468338.1, DQ462433.1), «96» (AY738335.1, AY705431.1), «188» (AY702673.1, EF095203.1), (DQ468331.1, DQ462426.1), принадлежащих к различным филогенетическим линиям.

Тем не менее, в связи с низкой информативностью получаемых результатов, было решено для дифференциации штаммов в дальнейшем применять ОТ-ПЦР с последующим нуклеотидным секвенированием ПЦР-продуктов и их анализом на молекулярном уровне (филогенетические исследования), а также посредством ПЦР-РВ.

3.2.2.2 Изучение молекулярно-биологических свойств вируса бешенства в России и сопредельных странах

Антигенное разнообразие и молекулярная эпизоотология бешенства в РФ и ряде сопредельных государств изучалась с использованием тюбингенской панели моноклональных антител, а также посредством проведения филогенетических исследований фрагментов нуклеотидных последовательностей геномов полевых изолятов ВБ, выделенных в различных регионах РФ, в сравнении с опубликованными в базе данных GeneBank фрагментами нуклеотидных последовательностей геномов изолятов ВБ.

Применение моноклональных антител для изучения антигенного разнообразия полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства

Проведенные с использованием панели МКА исследования позволили установить наличие пяти антигенных вариантов среди 233 исследованных изолятов ВБ, циркулировавших на территории России, Финляндии и Эстонии (табл. 37).

Для проведения данного исследования использовался непрямой вариант РИФ в адаптированном варианте.

Таблица 37 – Структура реакции и антигенные варианты вируса бешенства при проведении исследований с использованием панели МКА

Антигенный вариант/Регион	Генотип	Структура реакции с МКА				
		W-239.17	W-187.5	W-187.11.2	MW-187.6.1	P-41
Результаты собственных исследований						
I. Брянская, Курская, Псковская, Тверская области, Эстония, Финляндия	1	+	+	+	+	+
II. Эстония		+	-	+	+	+
III. Республики Башкирия, Мордовия, Краснодарский край Белгородская, Брянская, Курская, Новосибирская, Нижегородская, Орловская, Пензенская, Тверская, Владимирская, Воронежская обл.		+	+	+	+	-
IV. Республики Башкирия, Мордовия, Краснодарский край, Московская, Нижегородская, Рязанская, Тверская, Тульская, Владимирская обл.		+	-	+	+	-
V. Тверская, Московская обл.		+	-	+	-	-
Литературные данные						
Arctic[1]	1	+	+	+	+	+
European fox[2]	1	+	+	+	+	-
West-European[2]	1	+	-	+	+	-
LBV[3, 4]	2	+	-	-	+	-
MOKV[3, 4]	3	+	-	-	+	-
DUVV[3, 4]	4	+	-	-	+	-
EBLV-1[2]	5	+	-	-	-	-
EBLV-2[1]	6	+	-	-	+	-

[1] Schneider et al., 1985; [2] Cox et al., 1992; [3] Umoh et al., 1990; [4] Mebatsion et al., 1992. Совпадающие структуры реакции обозначены одинаковым цветом.

Антигенный вариант 1 соответствует классифицированному ранее «Арктическому» антигенному варианту. Антигенные варианты 3 и 4 соответствуют ранее установленным антигенным вариантам «Европейский лисий» («European fox») и «Западноевропейский» («West-European») соответственно (Cox et al., 1992).

Антигенные варианты 2 и 5 не соответствовали ни одному из ранее определенных антигенных вариантов и имеют уникальную структуру реакции с

данной панелью МКА. В соответствии с полученными результатами установлено, что изоляты, принадлежащие к антигенному варианту 1, циркулируют главным образом в северо-западных регионах России, а также ранее циркулировали на территории Финляндии, Эстонии, Норвегии (Шпицберген), Гренландии и на Аляске (США).

Антигенный вариант 2, впервые выделенный и изученный Kulonen et al. имеет уникальную структуру реакции (Kulonen et al., 1993), также как и изоляты, принадлежащие к антигенной группе 5, выделенные в рамках выполнения данной работы в Тверской и Московской областях. Антигенные варианты 3 и 4, соответствующие антигенным вариантам, циркулирующим ранее в восточной Европе, обнаруживаются в России в центральных и юго-западных регионах.

Молекулярно-биологическое исследование вируса бешенства выделенного от лошади, импортированной в Финляндию. Для проведения эпизоотологического расследования и установления происхождения изолята вируса, вызвавшего бешенство у лошади, импортированной из Эстонии в Финляндию в 2003 г., были проведены молекулярно-биологические исследования, в частности, нуклеотидное секвенирование фрагмента N-гена.

Для построения дерева использовался алгоритм Neighbor-joining, в анализ были включены нуклеотидные последовательности выделенных в Финляндии изолятов «RV1904» и «RV1511», а также 23 ранее опубликованных последовательностей полевых изолятов, выделенных ранее. в Германии – «9212ALL», «9202ALL» (U22475, U427701); Франции – «9223FRA» (U42607, U43433); Югославии – «86111YOU», «8653YOU» (U42706, U42704); Эстонии – «9339EST», «9342EST», «9142EST» (U42707, U43432, U22476); России – «3678c», «RV1590», «RV245», «RV1596», «RV234», «248c», «483a», (AY352468, AY352472, AY352475, AY352474, AY352476, AY352460, AY352487); Венгрии – «9215HON» (U43025); Японии – «Komatsugawa» (AY352494); США – «1421» (AY352500); Канаде – «1991» (U11734); Пакистане – «196p», «277p» (AY352495, AY352496) и Индии «RV61» (AY352493) – и аттенуированных штаммов «CVS»

и «SAD B19» (Kuzmin et al. 2004, Bourhy et al. 1999, Kissi et al. 1995, Tordo et al. 1986, Conzelmann et al. 1990) (рис. 55).

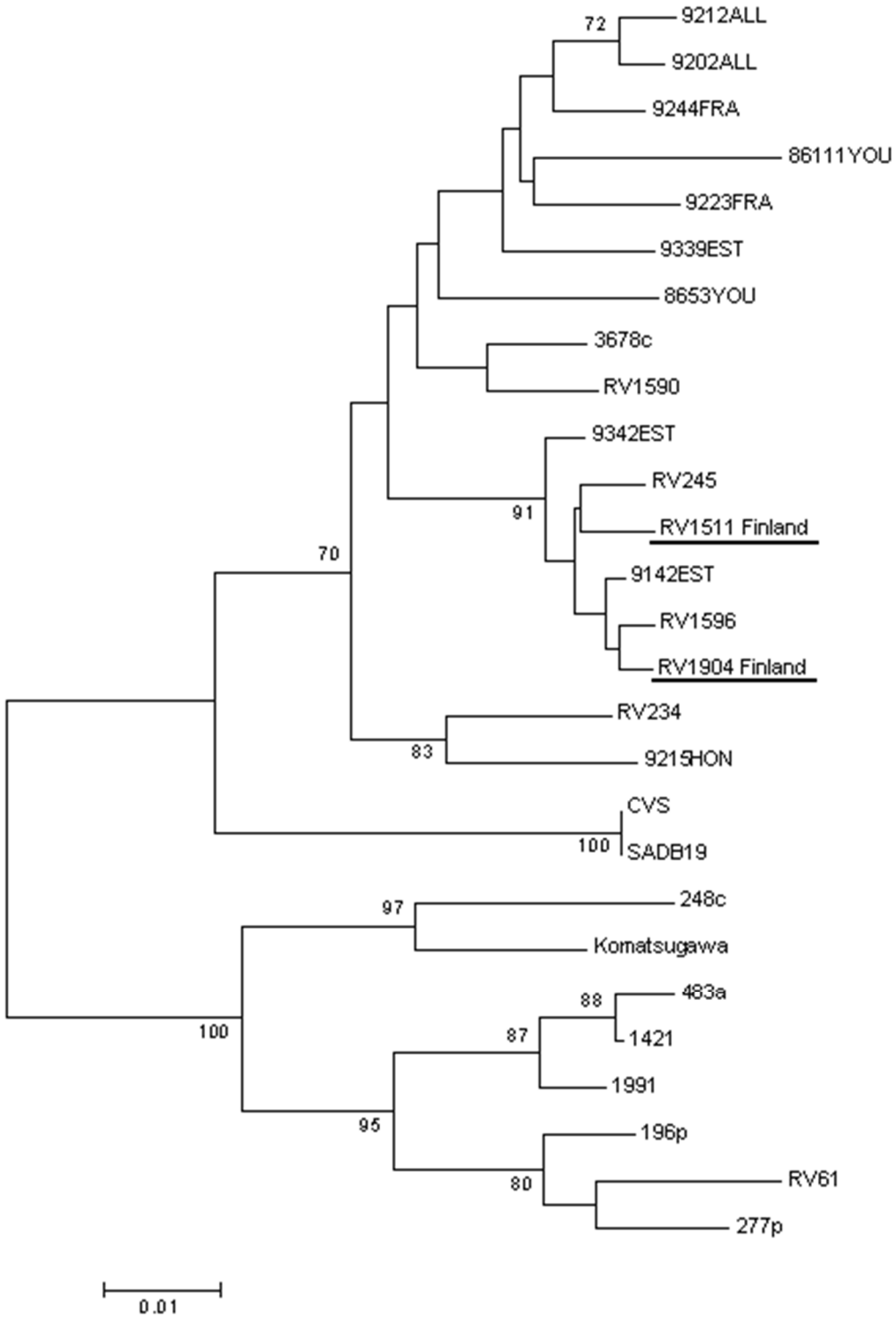


Рисунок 55 – Филогенетическое дерево, построенное на основе алгоритма Neighbor-joining с использованием нуклеотидных последовательностей фрагментов геномов длиной 384 н.о. Бутстрап-значения ниже 70 скрыты (при построении дерева использовался бутстрап-тест из 1000 повторений).

Штамм «RV1511», выделенный в Финляндии от КРС во время вспышки бешенства в 1988-1989 гг., был включен в данное исследование для сравнения в качестве одного из последних изолятов, ранее выделенных на территории этой страны. Установлено, что выделенный от импортированной лошади штамм «RV1904» близкородственен штаммам, выделенным ранее в Тульской обл. и Эстонии.

Положительная реакция изучаемого изолята с моноклональным антителом Р-41 указывает на его принадлежность к «Арктическому» антигенному варианту.

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена нуклеопротеина данного штамма оказалась на 99,4% идентичной последовательностям аналогичного фрагмента генома штаммов вируса бешенства «RV1596» и «9142EST», выделенных соответственно в Псковской обл. и Эстонии.

Штамм «RV1511», выделенный в Финляндии во время последней вспышки бешенства, оказался на 98,8% идентичен штамму «RV1904» по изучаемому фрагменту нуклеотидной последовательности.

Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов гена нуклеопротеина штаммов «RV1904» и «RV1511» были депонированы в базу данных GeneBank под номерами AY705415 и DQ269940.

Молекулярная эпизоотология бешенства на территории России. С целью изучения филогенетических связей изолятов ВБ и их распространения на территории Российской Федерации было собрано 35 изолятов вируса в 14 субъектах России. Четыре изолята были ранее получены Kulonen и Boldina в Финляндии во время вспышки бешенства в 1988-1989 гг. (Kulonen, Boldina, 1993) и хранились при минус 70°С до исследования отделе вирусологии Национальный ветеринарный институт Финляндии (National Veterinary Research Institute, EELA, ныне Финское агентство по безопасности продуктов питания, Finnish Food Safety Authority, Evira). Также в исследование были включены вакцинные штаммы «РВ-97» и «Овечий» (табл. 38).

Таблица 38 – Информация о референтных нуклеотидных последовательностях ВБ, используемых для филогенетического анализа

No	Код штамма	Страна	Год	Вид	Код в базе данных GeneBank	Авторы
1.	9916CBG	Камбоджа	1999	собака	EU086171	Bourhy et al., 2008
2.	02006CBG		1998		EU086172	
3.	9912CBG		1998		EU086169	
4.	9911CBG		1998		EU086168	
5.	9908CBG		1998		EU086167	
6.	9914CBG		1997		EU086170	
7.	01017VNM	Вьетнам	2001	собака	EU086210	
8.	01016VNM		2001		EU086209	
9.	VN3		---		AB116579	Minoura, Nishizono, GeneBank
10.	VN52		---		AB116580	
11.	D 150		2006		AB614373	Nguyen et al., 2011
12.	H130108		2008	человек	AB614386	
13.	H210608		2008		AB614391	
14.	H200608		2008		AB614390	
15.	H010607		2007		AB614379	
16.	H150308		2008		AB614388	
17.	H060907		2007		AB628212	
18.	H111007		2007		AB614385	
19.	H091007		2007		AB614384	
20.	HCM2		---	собака	AB299033	Nishizono, GeneBank
21.	HCM1		---		AB299032	
22.	HCM7		---		AB299036	
23.	8764THA	Таиланд	1983	собака	GU992307	Vandekerkhove, GeneBank
24.	UA341		2009	человек	GQ303555	Shantavasinkul, et al., 2010
25.	D9/52		2009	собака	GQ303556	
26.	QS-05		---		JN786877	Virojanapirom et al., 2012
27.	8743THA		1983		EU086207	Bourhy et al., 2008
28.	8734THA		1983		EU086206	
29.	9915BIR	Мьянма	1999	собака	EU086166	
30.	9909BIR		1999		EU086164	
31.	9913BIR		1999		EU086165	
32.	05008CHI	Китай	2004	собака	EU086189	
33.	05009CHI		2005		EU086190	
34.	02045CHI		1989		EU086181	
35.	02044CHI		1989		EU086180	
36.	02042CHI		1969		EU086178	
37.	05007CHI		2004		EU086188	
38.	05005CHI		2005		EU086186	
39.	02037CHI		1997		EU086175	
40.	02002LAO	Лаос	2002	собака	EU086195	
41.	9910LAO		1999		EU086193	
42.	02001LAO		2002		EU086194	
43.	Lao1	Лаос	2011	собака	AB981665	Ahmed et al., 2015
44.	Lao2		2011		AB981663	
45.	Lao3		2011		AB981666	
46.	Lao4		2011		AB981664	
47.	Lao5		2011		AB981667	
48.	Lao7		2011		AB981668	
49.	Lao8		2011		AB981669	
50.	Lao10		2011		AB981670	
51.	Lao11		2012		AB981671	
52.	Lao12		2012		AB981672	

таблица 38 - продолжение

53.	Lao13	Лаос	2012	собака	AB981673	Ahmed et al., 2015
54.	Lao17		2012		AB981674	
55.	Lao21		2012		AB981675	
56.	Lao22		2012		AB981676	
57.	Lao23		2012		AB981677	
58.	9212ALL	Германия	1991	лисица	U22475	Kissi et al., 1995
59.	9202ALL				U42701	Bourhy et al., 1999
60.	9244FRA	Франция	1992	лисица	U42607	Bourhy et al., 1999
61.	9223FRA		1974	лисица	U43433	
62.	86111YOU	Босния и Герцеговина	1986	лисица	U42706	
63.	8653YOU		1986	волк	U42704	
64.	9339EST	Эстония	1991	енотовидная собака	U42707	
65.	9342EST		1991		U43432	
66.	9142EST		1985		U22476	Kissi et al., 1995
67.	3678c	Россия, Омская обл.	---	степная лиса	AY352468	Kuzmin et al., 2004
68.	RV1590	Россия, Оренбург	---	человек	AY352472	
69.	RV245	Россия, Псковская обл.	---	человек	AY352475	
70.	RV1596		---	лисица	AY352474	
71.	RV234	Россия, Тульская обл.	---	собака	AY352476	
72.	248c	Россия, Читинская обл.	---	степная лиса	AY352460	
73.	483a	Россия, Якутия	---	песец	AY352487	
74.	9215HON	Венгрия	1991	человек	U43025	Bourhy et al., 1999
75.	Komatsugava	Япония, Токио	---	собака	AY352494	
76.	1421	США, Аляска	---	песец	AY352500	
77.	1991 лисица 6199	Канада, Онтарио	1991	лисица	U11734	Nadin-Davis et al., 1994
78.	196p	Пакистан	---	КРС	AY352495	Bourhy et al., 1999
79.	277p		---	коза	AY352496	
80.	RV61	Индия	---	человек	AY352493	
81.	9337SWI	Швейцария	1993	летучая мышь	GU992316	Vandekerkhove et al., GeneBank
82.	PV	Франция, вакцинный штамм			M13215	Tordo et al., 1986

Результаты филогенетического анализа с использованием фрагмента гена нуклеопротеина исследуемых изолятов ВБ представлены на рисунке 56. Филогенетическое дерево было построено с помощью модели «Minimum Evolution» с использованием нуклеотидных последовательностей фрагмента гена нуклеопротеина 69 полевых изолятов и 6 вакцинных штаммов ВБ.

В ходе проведения филогенетических исследований установлено существование двух основных филогенетических групп – Пан-Евразийской и Кавказской, а также ряда филогенетических подгрупп.

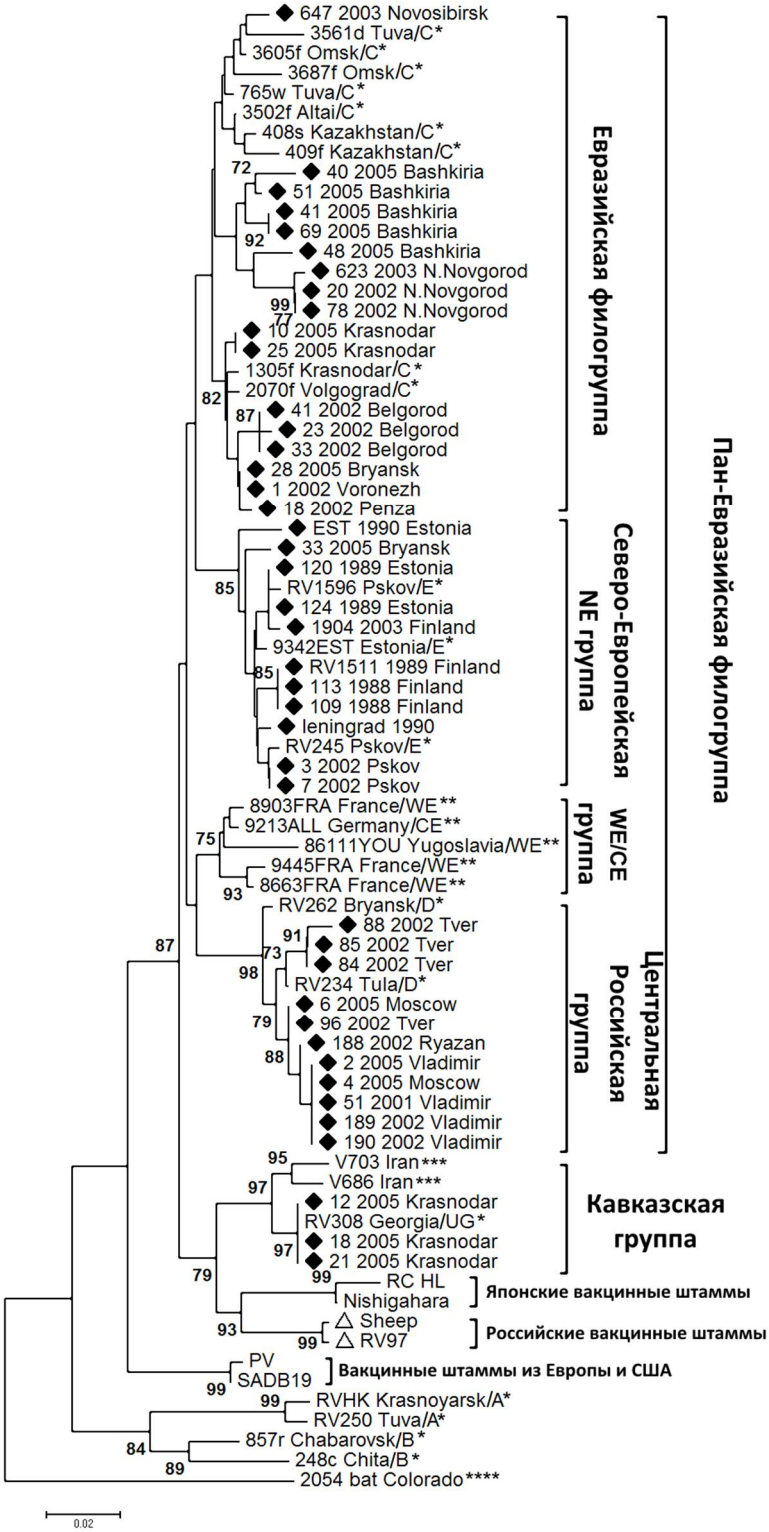


Рисунок 56 – Филогенетическое родство 69 полевых изолятов и 6 вакцинных штаммов, построенное по алгоритму «Minimum Evolution» с использованием нуклеотидных последовательностей фрагмента гена нуклеопротеина. Вакцинные штаммы российского происхождения обозначены значком Δ. Полевые изоляты из России, Финляндии и Эстонии, полученные в ходе выполнения данной научно-исследовательской работы, обозначены ♦. Референтные последовательности: *Kuzmin et al., 2004; **Bourhy et al., 1999; ***Nadin-Davis et al., 2003; ****Smith et al., 2002.

Распространение изолятов ВБ, принадлежащих к выявленным филогенетическим группам и подгруппам, представлено на карте (рис. 57).

Рисунок 57 – Распространение изолятов – представителей филогенетических групп, выявленных на территории РФ. N-E – Северо-Европейская группа (включая архивные изоляты, выделенные в Финляндии, Эстонии и Ленинградской области), C-R – Центральная российская группа, Cau – Кавказская группа. Arm – Армения, Azr – Азербайджан, Czh – Чехия, Est – Эстония, Geo – Грузия, Lth – Литва, Lva – Латвия, Mld – Молдова, Rom – Румыния, Svk – Словакия, Uzb – Узбекистан.

Из данных, представленных на рисунках 56 и 57 следует, что Пан-Евразийская филогенетическая группа включает 4 подгруппы: Евразийскую, Северо-Европейскую, Центральную-российскую, а также четвертую группу, включающую некоторые штаммы ВБ, выделенные ранее в Европе и

классифицированные Bourhy et al. в качестве представителей филогенетических групп «Западная Европа» («Western Europe», WE) и «Центральная Европа» («Central Europe», CE) (Bourhy et al., 1999). В пределах групп различия изучаемых последовательностей составляли максимум 2%, между групп – 4-7%.

Евразийская филогенетическая группа включает изоляты из европейской (Белгородская, Воронежская, Пензенская обл. и Краснодарский край), центральной (Нижегородская обл.), азиатской (Республика Башкирия) и Сибирской (Новосибирская обл.) частей России. Некоторые штаммы, охарактеризованные ранее Кузьминым с соавт. («1305f» – Краснодарский край; «2070» – Волгоградская обл.; «3502f» – Алтайский край; «3687f» и «3605f» – Омская обл.; «765w» и «3561d» – Республика Тува; «408s» и «409f» – Казахстан, Kuzmin et al., 2004), также попали в эту филогенетическую группу.

Северо-европейская группа включает изоляты из Финляндии и Эстонии, а также из Псковской, Брянской и Ленинградской обл. РФ.

Изоляты, полученные из Московской, Владимирской, Тверской и Рязанской областей, входят в Центрально-российскую филогенетическую группу. Установлено, что штамм «RV262», выделенный ранее в Брянской обл., также входит в эту группу. Нуклеотидные последовательности штамма из Твери «96_2002» и штамма «SAD B19», имевшие идентичную структуру реакции с панелью МКА, отличались по секвенированному фрагменту гена нуклеопротеина на 7,2 %, по фрагменту гена гликопротеина и псевдогена – на 14%.

Изоляты, выделенные в южной части Краснодарского края вблизи границы с Республикой Абхазия, («12_2005», «18_2005», «21_2005»), составляют отдельную, Кавказскую филогенетическую группу. Они оказались близкородственны ранее не классифицированному штамму «RV308», выделенному до этого в Грузии. Штаммы «RV703» и «RV686», выделенные в Иране, и филогенетические подгруппы 1 и 1a, (Nadin-Davis et al., 2003) также совпадают с данной филогенетической группой. Последовательности штаммов,

отнесенных к Кавказской филогенетической группе, отличаются от изолятов из Пан-Евразийской по изучаемому фрагменту гена нуклеопротеина на 6-7%, по фрагменту гена гликопротеина и псевдогена на 9%.

Установлено, что все включенные в исследование вакцинные штаммы формировали отдельную филогенетическую группу и достоверно отличались от изучаемых полевых изолятов ВБ.

Полученные результаты легли в основу дальнейших работ по изучению филогенетических связей циркулирующих на территории РФ полевых изолятов вируса бешенства, опубликованных в работах Чернышовой Е.В. в 2018 г., Зайковой О.Н. в 2016 г., Чупина С.А. в 2013 г.

3.2.2.3 Молекулярная эпизоотология бешенства собак на территории Королевства Камбоджа и Юго-Восточной Азии

Молекулярная биология бешенства детально изучена в Китае (Jiao et al., 2011; Zhang et al., 2017), Казахстане (Kuzmin et al., 2004), Монголии (Botvinkin et al., 2008) и Корее (Yang et al., 2011; Oem et al., 2013). Однако филогенетические исследования изолятов, циркулирующих в Юго-Восточной Азии, носили разрозненный и ограниченный характер.

Следует отметить, что туристические связи и товарооборот, включая торговлю пищевыми продуктами и продовольственным/животноводческим сырьем, между Россией и странами Азии постоянно развиваются. Так, в 2016 г. товарооборот России с Камбоджей составил порядка 144 млн долларов США, увеличившись на 30,23% по сравнению с 2015 г. Экспорт России в Камбоджу в 2016 г. составил порядка 7,8 млн долларов США, увеличившись на 73,04% по сравнению с 2015 г. Импорт в Россию из Камбоджи в 2016 г. составил 136 млн долларов США, увеличившись на 28,41% по сравнению с 2015 г.

В связи с этим была проведена работа по изучению молекулярной эпидемиологии бешенства в Камбодже, а также ряде сопредельных государств.

География отбора проб. Происхождение камбоджийских изолятов ВБ представлено на карте (рис. 58). В связи с тем, что в большинстве случаев точная

географическая информация о местах отбора проб отсутствовала, для обозначения на карте использовались координаты ближайшей районной больницы. В Камбодже районные больницы расположены обычно не далее, чем в 5 км от самой удаленной точки района.

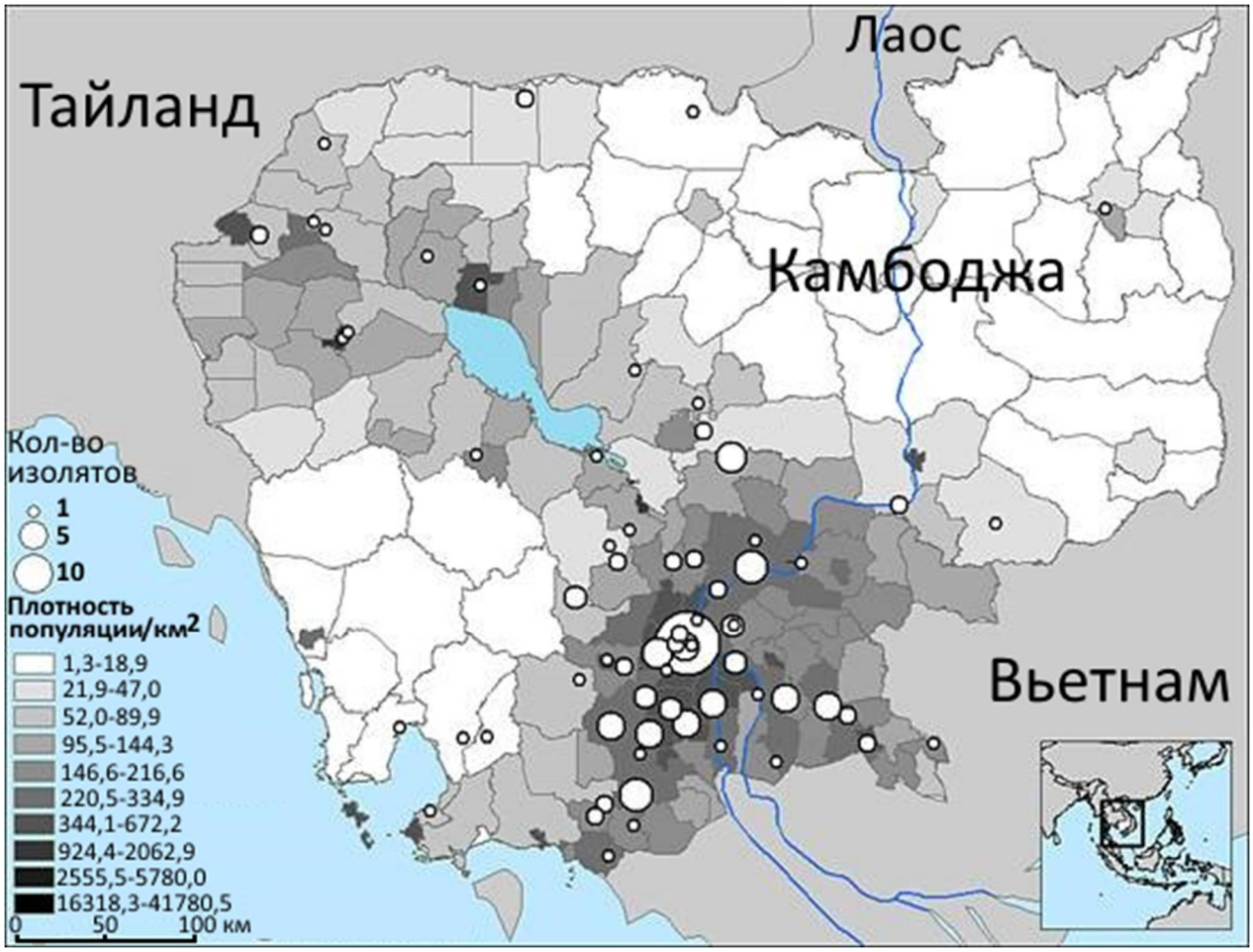


Рисунок 58 – Географическое происхождение полевых изолятов вируса бешенства, выделенных от собак в Камбодже. Карта построена с использованием пакета программ ArcMap 10 package (ESRI, Redlands, CA, США).

Филогенетический анализ. В ходе выполнения данной работы были получены нуклеотидные последовательности гена нуклеопротеина 149 изолятов ВБ, выделенных в 20 провинциях Королевства Камбоджа. Все полученные нуклеотидные последовательности были опубликованы в международной базе данных GeneBank и находятся в открытом доступе (табл. 39).

С помощью пакета программ MEGA 6.0 была выбрана филогенетическая модель для анализа используемой в работе базы данных нуклеотидных последовательностей.

Таблица 39 – Информация по полевым изолятам ВБ, выделенным от собак на территории Камбоджи

Код пробы	Возраст (мес.)	Дата отбора пробы	Провинция*	Код в базе данных GeneBank
1	2	3	4	5
I0119310	6	19-01-98	PHP	KM366330
I0209267	12	07-02-98	KCHA	KM366285
I0515204	30	15-05-98	KAN	KM366251
I0715237	24	15-07-98	KAN	KM366307
I0828199	12	28-08-98	KAN	KM366329
I0918204	12	18-09-98	PHP	KM366252
I1020180	12	20-10-98	KAN	KM366332
I1026327	36	26-10-98	KSP	KM366306
I1203073	120	03-12-98	KCHN	KM366213
I1209219	12	09-12-98	KCHA	KM366287
J0104103	18	04-01-99	KAN	KM366234
J0122226	18	22-01-99	KMP	KM366269
J0126058	12	25-01-99	KCHA	KM366309
J0127108	36	27-01-99	PVG	KM366241
J0129141	10	29-01-99	PHP	KM366328
J0609146	24	09-06-99	TAK	KM366327
J0701083	18	01-07-99	PHP	KM366239
J0708136	24	08-07-99	KSP	KM366295
J0806177	60	06-08-99	KMP	KM366334
K0208220	4	08-02-00	TAK	KM366224
K0329084	18	29-03-00	KCHA	KM366326
K0424232	24	24-04-00	KSP	KM366245
K0608309	7	08-06-00	KSP	KM366210
K0609224	7	09-06-00	PVG	KM366275
K0802312	7	02-08-00	PHP	KM366265
K0816099	24	16-08-00	KAN	KM366335
K0830060	24	30-08-00	KCHA	KM366282
K1222058	5	22-12-00	TAK	KM366224
L0116088	3	16-01-01	KMP	KM366325
L0324078	5	24-03-01	PHP	KM366226
L0411161	36	11-04-01	PVG	KM366264
L0524176	7	24-05-01	KSP	KM366278
L0705247	3	05-07-01	KAN	KM366304
L0920218	24	20-09-01	KTH	KM366242
L0925517	24	25-09-01	OMC	KM366271
L1025187	48	25-10-01	TAK	KM366321
L1213232	24	13-12-01	KCHN	KM366240
L1226153	5	26-12-01	KCHA	KM366290
M0218288	36	18-02-02	KRA	KM366256
M0316063	72	16-03-02	BMC	KM366298
M0506147	36	06-05-02	KMP	KM366260
M0516129	6	16-05-02	OMC	KM366209
M0805218	12	05-08-02	PVG	KM366305
M0830377	36	30-08-02	KAN	KM366233
M0906103	24	06-09-02	KSP	KM366300
M1002140	18	02-10-02	TAK	KM366215
M1102092	12	04-11-02	KTH	KM366247
M1213229	96	13-12-02	PHP	KM366227
N0120098	24	20-01-03	TAK	KM366317

таблица 39 – продолжение

1	2	3	4	5
N0212228	12	12-02-03	KCHA	KM366232
N0728149	48	28-07-03	KSP	KM366218
N0516416	12	16-05-03	PVG	KM366308
N0616208	36	16-06-03	KAN	KM366250
N0711309	12	11-07-03	PHP	KM366214
N0915299	24	15-09-03	KTH	KM366324
N1011101	24	11-10-03	KMP	KM366270
N1222113	12	22-12-03	BMC	KM366291
N1229390	3	29-12-03	KCHN	KM366272
O0109375	24	09-01-04	SRP	KM366204
O0128528	24	28-01-04	SVR	KM366302
O0403503	36	02-04-04	PHP	KM366339
O0422539	2	22-04-04	PHP	KM366340
O0527523	36	27-05-04	PHP	KM366341
O0727536	48	27-07-04	PHP	KM366342
O0906554	36	06-09-04	PHP	KM366343
O1104507	36	04-11-04	PHP	KM366344
O1106516	5	06-11-04	PHP	KM366345
O1216508	36	16-12-04	PHP	KM366349
O0730514	24	30-07-04	PHP	KM366350
O0217545	12	17-02-04	KCHA	KM366313
O0405536	24	05-04-04	KCHN	KM366206
O0518537	9	18-05-04	PVG	KM366208
O0625524	5	25-06-04	KAN	KM366297
O0716535	5	16-07-04	KSP	KM366219
O0831550	12	31-08-04	KMP	KM366273
O1025556	2	25-10-04	PHP	KM366259
P0324529	7	24-03-05	PHP	KM366346
P0622512	12	22-06-05	PHP	KM366347
P0407547	3	07-04-05	SRP	KM366249
P0416516	3	16-04-05	KCHN	KM366316
P0709509	2	09-07-05	PHP	KM366268
P1110521	96	10-11-05	KRA	KM366261
P1114533	4	14-11-05	KTH	KM366312
Q0105521	24	05-01-06	KTH	KM366292
Q1023563	9	23-10-06	PHP	KM366348
Q0201551	3	01-02-06	BBG	KM366203
Q0320591	5	20-03-06	KCHA	KM366258
Q0420515	36	20-04-06	TAK	KM366315
Q0428502	12	27-04-06	KAN	KM366248
Q0810538	36	10-08-06	PVG	KM366257
Q0914536	12	14-09-06	KMP	KM366276
Q1028515	3	28-10-06	KSP	KM366323
Q1129522	3	29-11-06	KKG	KM366246
Q1225533	24	25-12-06	PHP	KM366294
R0110558	60	10-01-07	KSP	KM366296
R0222564	24	22-02-07	BMC	KM366293
R0326539	12	26-03-07	TAK	KM366243
R0418567	2	18-04-07	KMP	KM366311
R0528536	5	28-05-07	PVG	KM366253
R0802504	12	02-08-07	PHP	KM366289
R0919544	36	19-09-07	KAN	KM366207
R1105511	24	05-11-07	KTH	KM366320
R1211946	60	11-12-07	SVR	KM366303
S0407603	12	07-04-08	PHP	KM366228
S0529625	24	29-05-08	KCHN	KM366310

таблица 39 – продолжение

1	2	3	4	5
S0614621	12	14-06-08	KAN	KM366212
S0717637	72	17-07-08	KAN	KM366236
S0717641	24	17-07-08	KAN	KM366281
S0804664	18	04-08-08	PVG	KM366274
S0821644	48	21-08-08	KSP	KM366231
S1014618	24	14-10-08	SVR	KM366319
S1030654	36	30-10-08	TAK	KM366202
S1103646	24	03-11-08	KKG	KM366237
S1201660	84	01-12-08	PUR	KM366280
S1222692	24	22-12-08	TAK	KM366279
T0126697	2	26-01-09	PRV	KM366299
T0216672	72	16-02-09	KTH	KM366288
T0223715	3	23-02-09	KCHA	KM366238
T0325655	36	25-03-09	KKG	KM366217
T0509634	24	09-05-09	KSP	KM366337
T0602630	24	02-06-09	TAK	KM366235
T0617644	72	17-06-09	KSO	KM366331
T0622656	6	22-06-09	BBG	KM366283
T0716615	48	16-07-09	PHP	KM366254
T0819633	24	19-08-09	KCHN	KM366301
T0905602	24	05-09-09	BMC	KM366314
T1002618	12	02-10-09	KAN	KM366262
T1221671	48	21-12-09	KMP	KM366333
U0116621	12	16-01-10	KAN	KM366338
U0224649	6	24-02-10	KCHA	KM366223
U0309717	3	09-03-10	KCHN	KM366211
U0419635	24	19-04-10	KMP	KM366336
U0520629	12	20-05-10	KSP	KM366216
U0628690	120	28-06-10	KTH	KM366318
U0717622	12	17-07-10	PVG	KM366205
U0726692	36	26-07-10	SVR	KM366227
U0821622	24	21-08-10	PHP	KM366267
U1230640	7	30-12-10	RAT	KM366266
V0208630	5	08-02-11	BMC	KM366230
V0408641	24	08-04-11	KAN	KM366322
V0411671	36	11-04-11	KCHA	KM366220
V0520617	3	20-05-11	PHP	KM366229
V0627625	36	27-06-11	KTH	KM366222
V0726646	12	26-07-11	KMP	KM366284
V0808656	36	08-08-11	KRA	KM366221
V0926624	24	26-09-11	KAN	KM366255
V1018638	24	18-10-11	PVG	KM366225
V1114631	72	14-11-11	KSP	KM366286
V1223621	12	23-12-11	TAK	KM366263

*Код провинции: BBG – Battambang; BMC – BanteayMeanchey; KAN – Kandal; KCHA – Kampong Cham; KCHN – Kampong Chnang; KKG – Koh Kong; KMP –Kampot; KRA – Kratie; KSO – Kampong Som; KSP – Kampong Speu; KTH – Kampong Thom; OMC –Oudor Meanchey; PHP – Phnom Penh; PRV – PreahVihear; PUR – Pursat; PVG –Prey Veng; RAT – Ratanakiri; SRP – Siem Reap; SVR – Svay Rieng; TAK – Takeo.

Установлено, что применение модели на основе параметра Tamura 3 с дискретным гамма-распределением (+G) показывает наименьшее значение байесовского информационного критерия (Bayesian Information Criterion) 22 395,836 для полных последовательностей гена нуклеопротеина ВБ и может

рассматриваться в качестве наиболее подходящей модели для проведения филогенетического анализа данного набора нуклеотидных последовательностей.

Эволюционная история N-гена была восстановлена с использованием метода максимальной вероятности (Maximum Likelihood method) с использованием параметра Tamura 3 (Tamura, 1992). Процент деревьев, в которых ассоциированные таксоны группировались вместе, указан на ветвях дерева. Исходное дерево для эвристического поиска было получено путем применения метода Neighbor-Joining к матрице попарных расстояний, рассчитанных с использованием подхода Maximum Composite Likelihood (MCL). Дискретное гамма-распределение использовалось для моделирования уровней эволюционных различий среди сайтов, (5 категорий (+*G*, параметр = 0.3114)).

Дерево нарисовано в масштабе с длиной ветвей, выражающей количество замен на сайт. Применялся филогенетический бутстрап-тест в 1000 повторений. В анализ были включены 192 нуклеотидные последовательности, полученные в ходе выполнения данного исследования, и последовательности из базы данных GeneBank.

Полные нуклеотидные последовательности N-гена длиной 1492 н.о., позиция 71-1562, отредактированные с помощью программы GeneDoc до длины 1346 н.о. (с целью соответствия с длиной последовательностей референтных штаммов, доступных в базе данных GeneBank, табл. 39) использовались для постройки филогенетического дерева (рис. 59). Установлено, что филогенетическую группу «SEA1» составляют изоляты, выделенные в Камбодже, Таиланде, Вьетнаме и Лаосе. В пределах этой филогенетической группы выявлено существование трех сублиний (подгрупп). Данная филогенетическая группа была впервые опубликована как таковая Yamagata et al. в 2007 и, по нашим данным, соответствует группе «1», подгруппе «1a» предложенной ранее Nguyen et al., 2011, в то время как обозначенные нами филогенетические группы «SEA2» и «SEA3» отличаются от ранее обозначенных групп «1a» и «1b», но все же входят в группу «1».

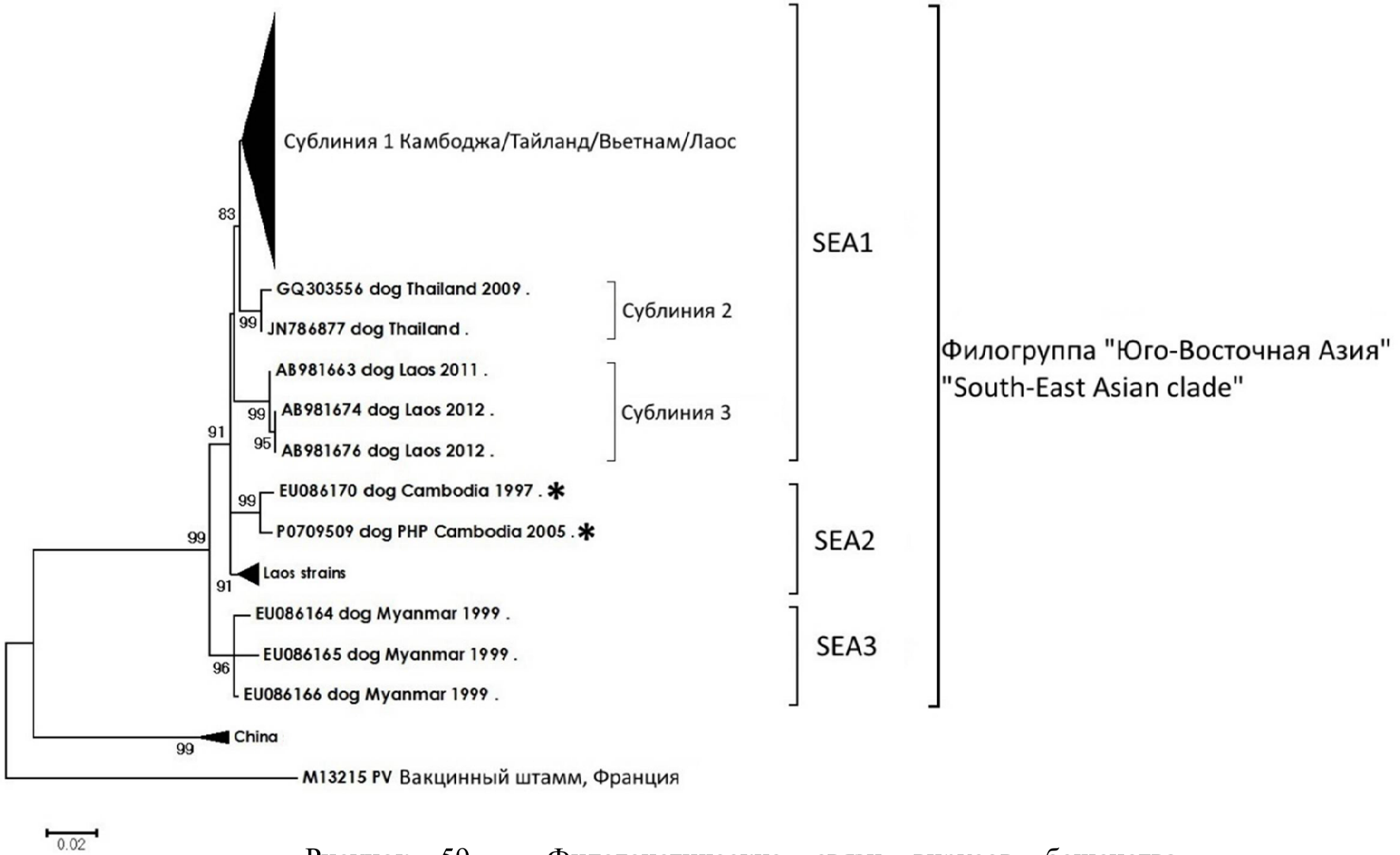


Рисунок 59 – Филогенетические связи вирусов бешенства, выделенных в Юго-Восточной Азии.

Филогенетическую группу «SEA2» составляют два изолята вируса бешенства, выделенных в Камбодже, и группа изолятов, выделенных в Лаосе. Один из камбоджийских изолятов был выделен от собаки в Пномпене в 2005 г., второй – выделил доктор Bourhy в 1997 г. в камбоджийском населенном пункте Банлунг (Banlung), районном центре провинции Ратанакири (Ratanakiri) на северо-западе Камбоджи, также от собаки. Данная провинция граничит с Лаосом и Вьетнамом. Эти изоляты группируются с изолятами, выделенными ранее в Лаосе в 1999-2002 гг. (Bourhy et al., 2008) и в 2011-2012 гг. (Ahmed et al., 2015).

Изоляты ВБ, выделенные в Мьянме, формируют отдельную филогенетическую группу, обозначенную как «SEA3».

Для более широкого сравнения с изолятами ВБ, выделенными на территории других стран, дальнейшие филогенетические исследования проводились с использованием 194 частичных нуклеотидных последовательностей N-гена. Изолят «9337SWI», выделенный от летучей мыши в 1993 г. (EBLV-2), использовался в качестве аутгруппы. Эволюционная история изучалась с использованием метода «Minimum Evolution» (Rzhetsky, Nei, 1992). Показано оптимальное дерево с суммарной длиной ветвей 304.71612549. Процент повторяющихся деревьев, в которых ассоциированные таксоны группировались вместе при проведении бутстрап-теста (1000 повторений), показан около ветвей (Felsenstein, 1985). Эволюционные дистанции рассчитаны с применением метода количества различий (Nei, Kumar, 2000), выражены в единицах числа различий н.о. на последовательность. Дерево исследовано с использованием алгоритма Close-Neighbor-Interchange (CNI) (Nei, Kumar, 2000), Для постройки исходного дерева использовался алгоритм Neighbor-Joining (Saitou, Nei, 1987) (рис. 60).

Использование более коротких нуклеотидных последовательностей позволило провести сравнение полученных результатов с данными, опубликованными ранее Nguyen et al., 2011 г.

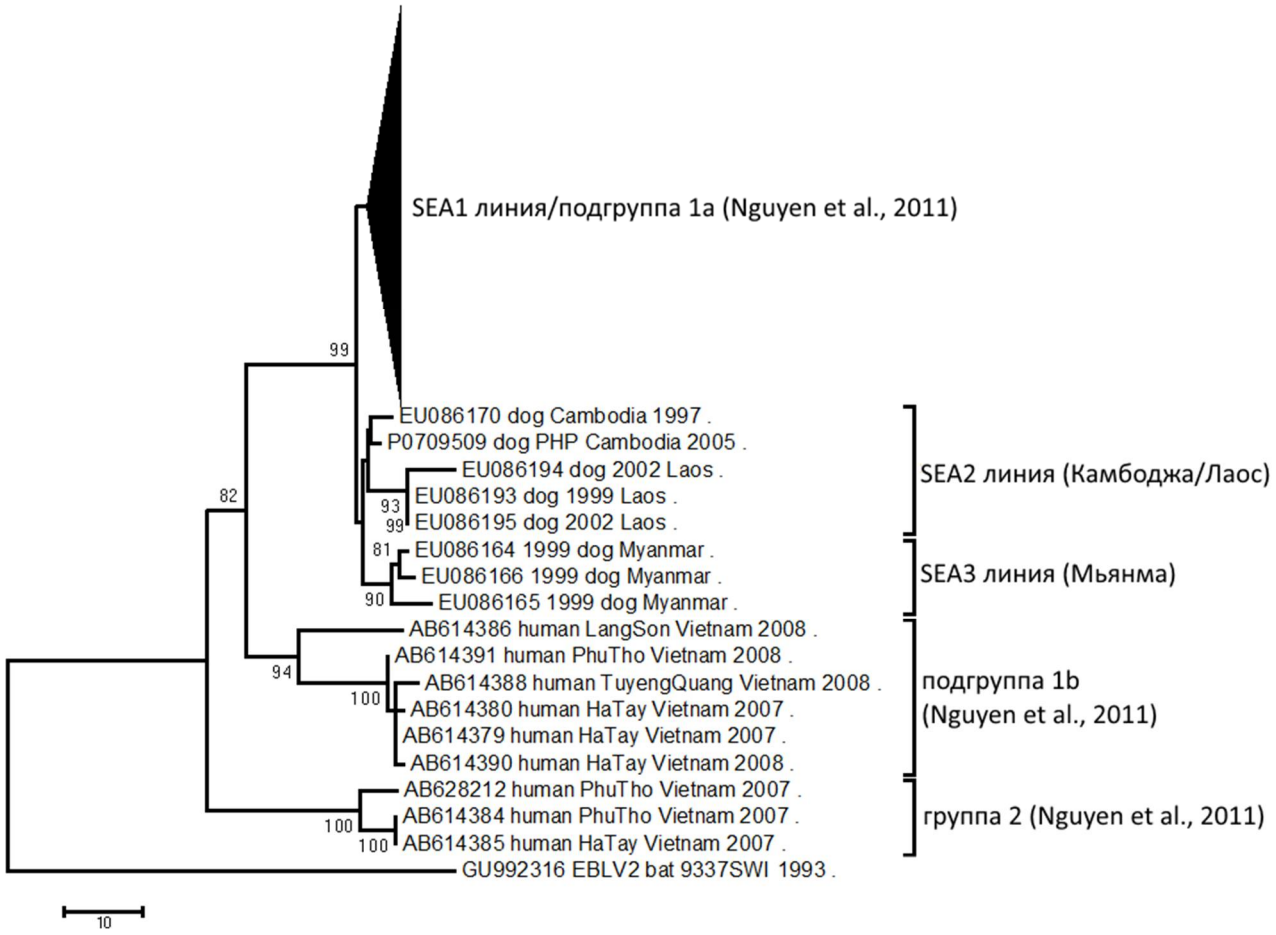


Рисунок 60 – Филогенетическое родство изолятов ВБ, выделенных в Юго-Восточной Азии на основе частичных последовательностей гена нуклеопротеина. Бутстрап-значения менее 70 скрыты. При проведении анализа последовательности имели длину 381 н.о.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей изолятов ВБ, выделенных на территории Вьетнама в 2006-2009 гг., позволил дополнить и подтвердить полученные ранее результаты о делении изолятов ВБ, выделенных в Юго-Восточной Азии, на филогенетические группы, а также изучить молекулярную эпидемиологию бешенства в регионе.

Эволюционный анализ. Данный анализ включал использование GTR модели нуклеотидных замен и различный уровень замен для каждой кодонной позиции. Для проведения исследования использовался байесовский «Skyline Plot» (BSP), что позволяло получить фрагментарно-графическое изображение изменений относительной генетической дивергентности во времени ($N_e\tau$), где N_e – эффективный размер популяции, а τ – время генерации при передаче вируса от

хозяина к хозяину. Также использовали строгие и расслабленные (не коррелирующие логнормально) молекулярные часы.

Проведенные ранее исследования эволюции ВБ показали, что не коррелирующие логнормально расслабленные молекулярные часы и модель постоянного размера популяции лучше подходят для анализа таких баз данных (Bourhy et al., 2008). Это было подтверждено при проведении предварительного анализа полученных данных (рис. 61).

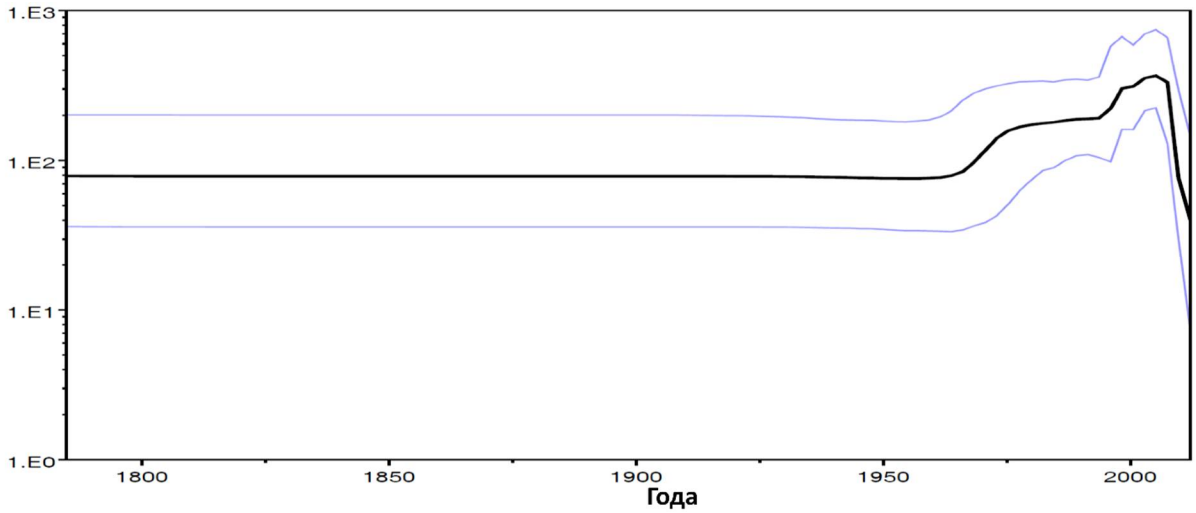


Рисунок 61 – Популяционная динамика ВБ выделенных в Юго-Восточной Азии (полный кодирующий фрагмент гена нуклеопротеина). Байесовский «skyline plot» показывает изменения относительной генетической дивергентности (ось X) и времени (ось Y) в виде количества лет, прошедших с момента выделения последнего (по времени) ВБ. Линия черного цвета представляет среднее значение Neτ, две другие линии представляют 95%-е HPD интервалы.

Степень неопределенности для оценки каждого параметра представлена 95% значениями самой высокой апостериорной плотностью (HPD), в то время как значения апостериорной вероятности обеспечивают оценку степени поддержки каждого «колена» дерева. Все Markov Monte Carlo цепи выполнялись при 200 млн шагов для обеспечения статистической достоверности с 10% удалением по причине «выгорания». Используя BSP в качестве инструмента для формулирования заключения, структура относительной генетической дивергентности среди изолятов, выделенных в Камбодже увеличилась до максимума в 2005 г., с последующим уменьшением (рис. 62).

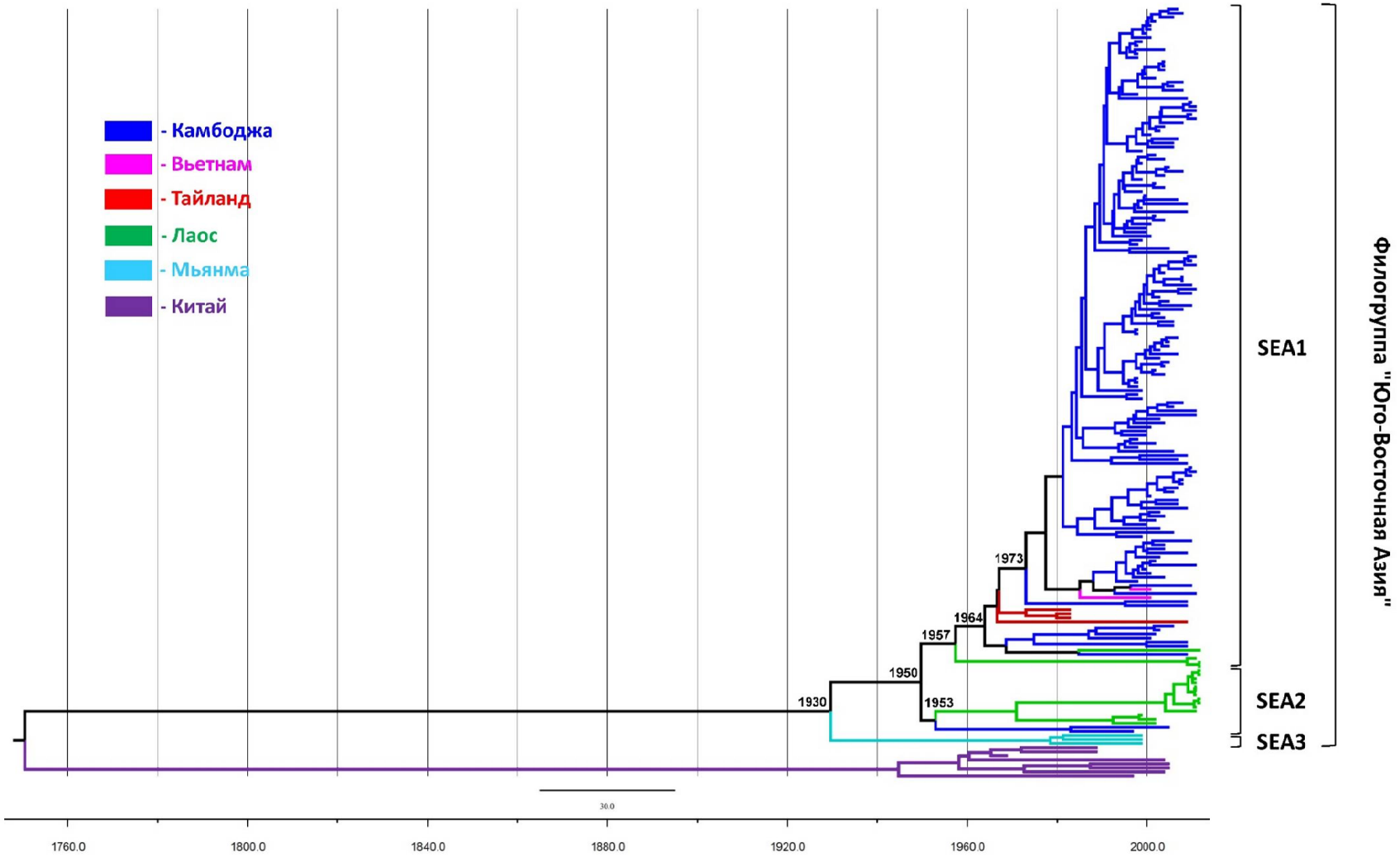


Рисунок 62 – Эволюционное дерево, построенное по модели Maximum Clade Credibility на основе 190 последовательностей гена нуклеопротеина ВБ из Юго-Восточной Азии. Ориентировочное значение TMRCA указано в узловых точках. Горизонтальная шкала указывает количество лет от даты получения самого последнего изолята.

Анализ посредством Байесовских молекулярных часов с использованием полных последовательностей гена нуклеопротеина установил, что TMRCA всех используемых в анализе 155 камбоджийских изолятов вируса бешенства датируется 1950 г. (95% HPDs: с 1935 до 1961 г.;). TMRCA группы «SEA1» определен около 1964 г. (95% HPDs: с 1955 до 1971 г.), а для «SEA2» – около 1953 г. (95% HPDs: с 1938 до 1969 г.). Уровень нуклеотидных замен составил 3,13 $\times 10^{-4}$ замен/сайт/год (з/с/г; 95% HPD: 2,46 $\times$ 10^{-4} – 3,79 $\times$ 10^{-4}).

Эволюционная дивергентность в пределах групп. Эволюционная дивергентность в пределах филогенетических групп изучалась с использованием нуклеотидных последовательностей N-гена 191 изолята ВБ. На рисунке 63 показано число замен на каждый сайт из усреднения по всем парам последовательностей.

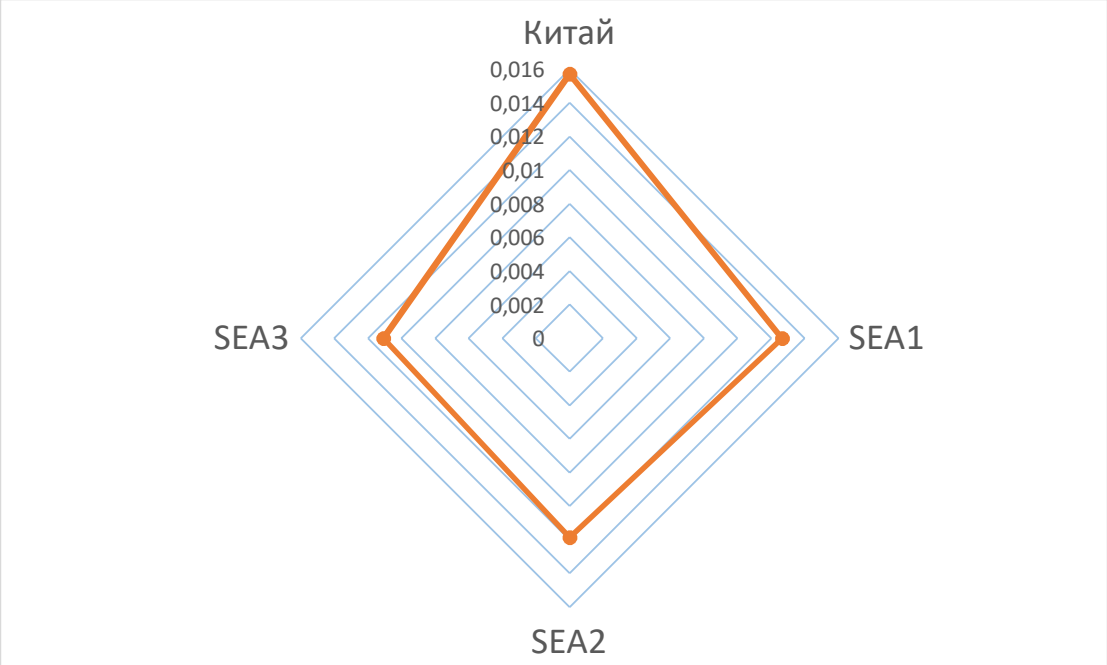


Рисунок 63 – Оценка средней эволюционной дивергентности на основе пар последовательностей в пределах филогенетических групп.

Стандартная ошибка была рассчитана с помощью бутстрап-процедуры (1000 повторений) и составила для Китайской филогенетической линии 0,002; «SEA1» – 0,0014; «SEA2» – 0,0016; «SEA3» – 0,0023. Анализ проводился с использованием параметра Tamura 3 (Tamura, 1992). Уровень вариаций среди сайтов был смоделирован с использованием гамма распределения (gamma

distribution, shape parameter = 1). В анализ были включены следующие позиции кодонов: 1+2+3+некодирующий, исключая все позиции, содержащие пропуски или недостающие данные. В окончательный анализ было включено 1346 позиций. Из данных, представленных на рисунке 62 следует, что наибольшая эволюционная дивергентность присуща изолятам, выделенным в Китае. Среди изолятов, выделенных в Юго-Восточной Азии, наибольшая эволюционная дивергентность отмечена среди вирусов, отнесенных на основе филогенетического анализа к группе «SEA1».

Эволюционная дивергентность между группами. В таблице 40 представлены данные по оценке эволюционной дивергентности изолятов, выделенных в Юго-Восточной Азии в сравнении между филогенетическими группами на основе числа замен на каждый сайт из усредненного значения всех пар последовательностей между группами и стандартной ошибки.

Таблица 40 – Эволюционная дивергентность между группами

*P** / *Дивергентность*		Филогенетические группы			
		«Китай»	«SEA1»	«SEA2»	«SEA3»
Филогенетические группы	«Китай»	-----	0,012	0,012	0,012
	«SEA1»	0,135	-----	0,004	0,005
	«SEA2»	0,134	0,03	-----	0,004
	«SEA3»	0,137	0,04	0,034	-----

*Числитель – стандартная ошибка, знаменатель – расчетные значения эволюционной дивергентности.

Из данных, представленных в таблице 40, следует, что изоляты вируса бешенства, принадлежащие к филогенетическим группам «SEA1», «SEA2» и «SEA3», эволюционно приблизительно равно удалены от филогенетической группы, включающей изоляты ВБ из Китая, а также приблизительно равно удалены друг от друга.

3.2.2.4 Молекулярно-биологические и антигенные характеристики российских и зарубежных вакцинных штаммов вируса бешенства

Филогенетический анализ вакцинных штаммов ВБ. Изучение молекулярно-биологических характеристик вакцинных штаммов в первую

очередь включало получение нуклеотидных последовательностей генома российского вакцинного штамма «РВ-97» и вакцинного штамма «Eth_PV», применяемого в Эфиопии для производства тканевой инактивированной антирабической фенолвакцины. Основной целью данного исследования являлось изучение филогенетического родства различных вакцинных штаммов ВБ, применяемых для производства живых и инактивированных антирабических вакцин по всему миру, а также происхождения применяемых в России и за рубежом вакцинных штаммов ВБ. Длина нуклеотидной последовательности генома штамма «РВ-97» составила 11 932 н.о., штамма «Eth_PV» – 11 927 н.о. Обе последовательности содержали 5 открытых рамок считывания, кодирующих 5 вирусных белков N, P, M, G и L – длиной 450, 297, 202, 524 и 2127 аминокислотных остатков соответственно. Подробная информация о происхождении указанных штаммов изложена в таблице 41.

Таблица 41 – Информация о нуклеотидных последовательностях аттенуированных штаммов, используемых для филогенетического анализа в ряде разделов диссертации

Код штамма	**Страна происхождения**	**Код GeneBank**	**Авторы**
«РВ-97» (RV-97*)	Россия/Франция	EF542830	Metlin et al., 2008
«Eth_PV»	Эфиопия	JQ944709	Чупин с соавт.**
«PM1503»	США	DQ099525	Stallkamp et al.**
«LEP-Flury»	США	GU565703	Tao et al., 2010
«HEP-Flury»	США	GU565704	Tao et al., 2010
«CTN-1»	Китай	FJ959397	Zhu et al., 2014
«CTNCEC25»	Китай	KJ466147	Guo et al., 2014
«aG»	Китай	GQ412744	Tang et al.**
«SRV9»	США/Китай	AF499686	Wei et al., 2010
«PV»	Франция	M13215	Tordo et al., 1986
«CVS-11»	Франция	GQ918139	Wang et al.**
«ERA»	Германия/США	EF206707	Geue et al., 2008
«SAD B19»	Германия/США	EF206709	Geue et al., 2008
«SAD Berne»	Германия/США	EF206720	Geue et al., 2008
«SAD P5/88»	Германия/США	EF206715	Geue et al., 2008
«Nishigahara»	Япония	AB044824	Ito et al., 2001
«RC-HL»	Япония	AB009663	Ito et al., 2001
«Ni-CE»	Япония	AB128149	Shimizu et al., 2007
«SHBRV-18»***	США	AY705373	Faber et al., 2004

*Международное обозначение штамма. **Опубликованы в базе данных GeneBank на прямую, без публикации в виде научной статьи. ***Лиссавирус, выделенный от летучей мыши в США (аутгруппа).

На рисунке 64 показано филогенетическое дерево с наиболее высоким log вероятности (-32184.3657).

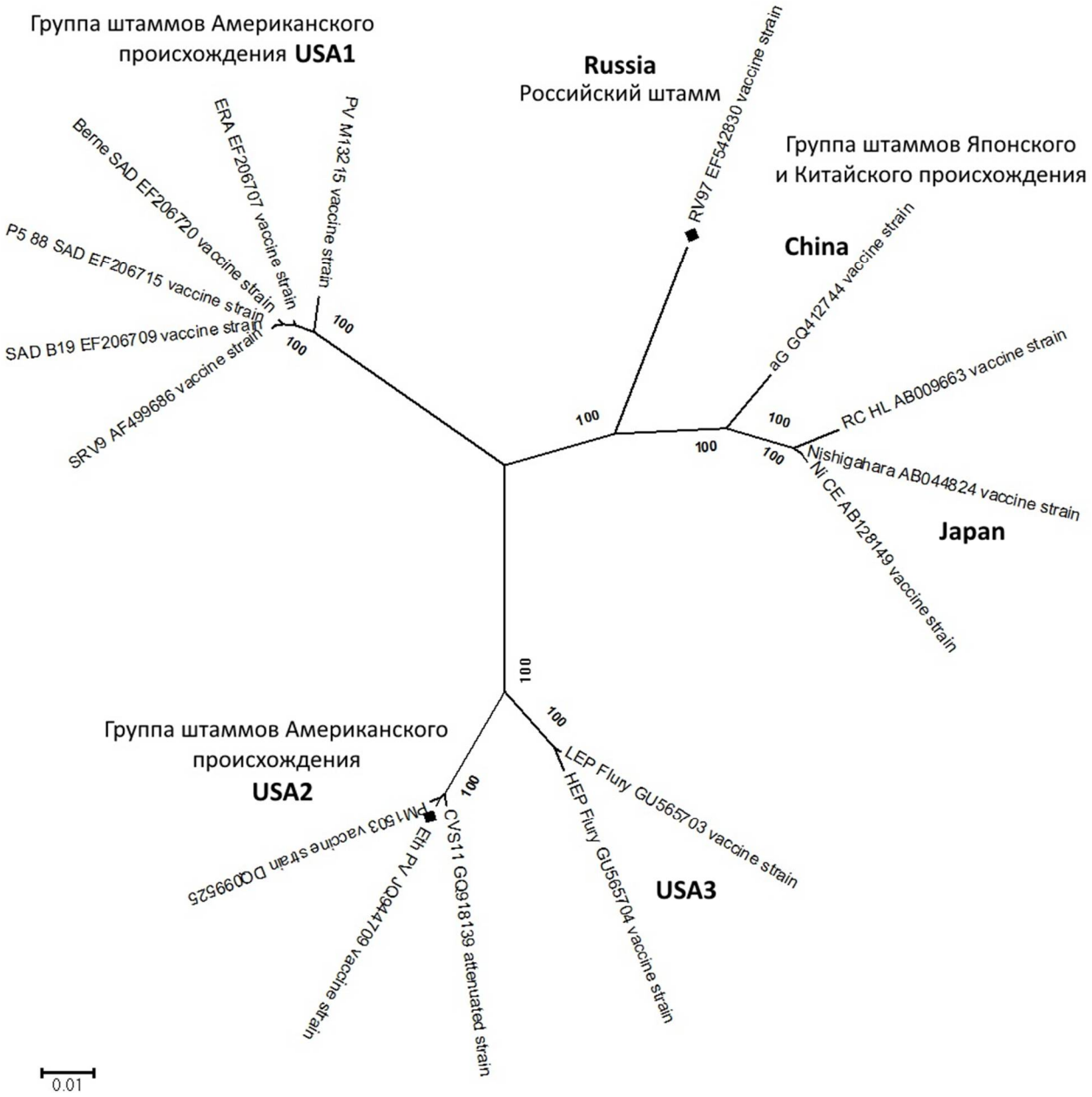


Рисунок 64 – Филогенетическое дерево, отражающее родство наиболее распространенных вакцинных штаммов вируса бешенства. Вновь секвенированные нуклеотидные последовательности геномов штаммов «РВ-97» и «Eth_PV» отмечены значком ■.

Всего в филогенетический анализ было включено 15 вакцинных штаммов вируса бешенства и один лабораторный аттенуированный штамм «CVS-11».

Предварительный анализ созданной нами базы нуклеотидных последовательностей штаммов ВБ был выполнен с целью выбора оптимальной

модели для проведения последующего филогенетического анализа с использованием алгоритма Maximum Likelihood (пакет программ MEGA 6.0) на основе модели General Time Reversible (Nei, Kumar, 2000).

Результаты проведенного исследования показали, что самое низкое значение байесовского информационного критерия – 64763.234 – было получено при использовании модели GTR+G, которая использовалась нами для проведения филогенетического анализа.

Первичное дерево для эвристического поиска было получено автоматически с применением алгоритмов Neighbor-Joining и BioNJ к матриксу попарных дистанций, предсказанных с использованием подхода Maximum Composite Likelihood и выбором топологии с самым высоким значением log вероятности.

Проведенный филогенетический анализ позволил установить существование шести филогенетических групп вакцинных/аттенуированных штаммов ВБ, три из которых («USA1», «USA2» и «USA3») имеют Американское (США), а две («China» и «Japan») – Азиатское происхождение (Китай и Япония, соответственно). Штамм «PV» при этом попадает в группу «USA1».

Установлено, что вакцинный штамм «Eth_PV», полученный из Эфиопии формирует отдельную филогенетическую группу со штаммами «PM1503» и «CVS-11», которые, в свою очередь, принадлежат к филогенетической группе «USA2».

Российский вакцинный штамм «РВ-97» формирует отдельную филогенетическую ветвь и, по-видимому, филогенетически более близок к «Азиатским» группам вакцинных штаммов «China» и «Japan».

На рисунке 65 представлена обновленная и скорректированная на основе полученных данных филогенетического исследования и анализа российских и зарубежных литературных источников история происхождения наиболее распространенных вакцинных штаммов ВБ.

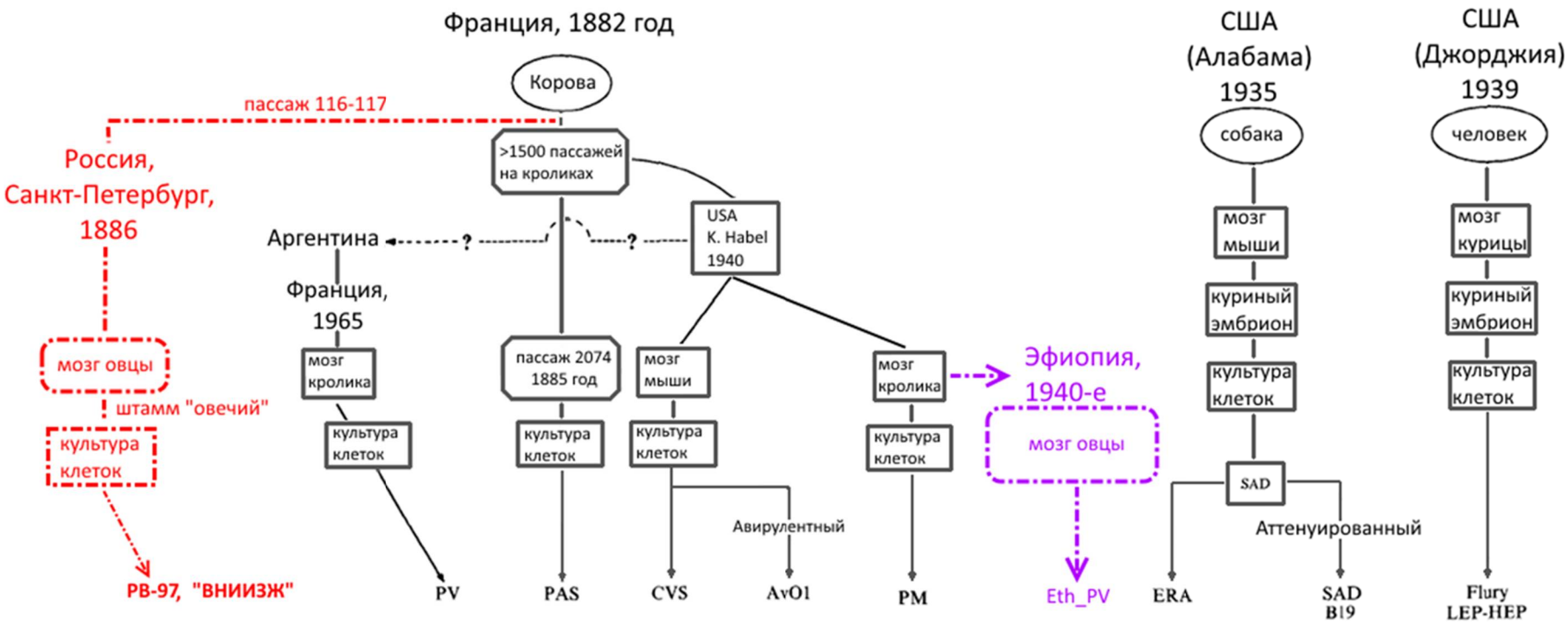


Рисунок 65 – Современная история происхождения наиболее распространенных вакцинных штаммов вируса бешенства.

Эволюционные расстояния и эволюционное разнообразие вакцинных штаммов ВБ. Среднее значение эволюционного разнообразия изучаемой популяции и эволюционные расстояния внутри филогенетических групп и между группами определяли с использованием параметра Tamura 3 (Tamura, 1992). Результаты данного исследования по всем установленным филогенетическим группам вакцинных штаммов ВБ представлены в таблице 42.

Таблица 42 – Оценка эволюционной дивергентности пар нуклеотидных последовательностей между филогенетическими группами

*P** / Дивергентность		Филогенетические группы					
		Russia	**China**	**Japan**	**USA1**	**USA2**	**USA3**
Филогенетические группы	Russia	0	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
	China	0,072	0	0,002	0,004	0,003	0,003
	Japan	0,078	0,031	0	0,003	0,003	0,003
	USA1	0,109	0,105	0,111	0	0,003	0,003
	USA2	0,121	0,121	0,127	0,116	0	0,002
	USA3	0,117	0,114	0,119	0,107	0,042	0

*Числитель – стандартная ошибка, знаменатель – расчетные значения эволюционной дивергентности.

Уровень вариаций среди сайтов моделировался с использованием гамма-распределения. Стандартная ошибка (*P*) подсчитывалась с использованием бутстрап-процедуры (1000 повторений). Значение среднего эволюционного разнообразия составило 0,088 при $P = 0{,}002$.

Среднее эволюционное расстояние в пределах филогенетической групп при $P = 0{,}001$) составило: «Japan» – 0,009, «USA1» – 0,007, «USA2» – 0,005, «USA3» – 0,006.

Филогенетические группы «Russia» и «China» в данном исследовании включали по одному вакцинному штамму, в связи с чем оценить эволюционные расстояния в пределах этих групп не представлялось возможным.

Результаты изучения равенств уровней эволюции по методу Тайямы с использованием нуклеотидных последовательностей геномов вакцинных/аттенуированных штаммов проводилось с помощью тестирования по

методу Тайяма (Tajima's test, Tajima et al., 1993). Данный метод позволил изучить равенство скорости эволюции для вакцинных штаммов «РВ-97», «Eth_PV» и «SAD B 19» (последний использовался в качестве аутгруппы). Результаты этого исследования представлены в таблице 43.

Таблица 43 – Результаты тестирования по методу Тайяма для трех выбранных нуклеотидных последовательностей вакцинных штаммов ВБ

Показатели	Значения
Идентичных сайтов для трех последовательностей	10058
Дивергентных сайтов в трех последовательностях	44
Уникальных замен в последовательности штамма «РВ-97»	535
Уникальных замен в последовательности штамма «Eth_PV»	585
Уникальных замен в последовательности штамма «SAD B 19»	497

Из данных, представленных в таблице 43 следует, что разница уровней эволюции двух изучаемых вакцинных штаммов «РВ-97» и «Eth_PV» (статистический показатель χ^2 теста) составила 2,23 (P = 0,13517 при 1 уровне свободы).

При проведении анализа в пределах филогенетической группы «USA1» (штаммы «PV» и «ERA», аутгруппа – штамм «SAD B19») статистический показатель χ^2 теста составил 93,08 (при P=0). Эти результаты свидетельствует об отсутствии достоверной разницы в скорости уровней эволюции изучаемых штаммов.

Анализ аминокислотных последовательностей нуклеопротеина. При анализе выравнивания аминокислотных последовательностей нуклеопротеина изучаемых вакцинных/аттенуированных штаммов ВБ установлены протяженные вариабельные участки, содержащие как значимые, так и не значимые аминокислотные замены. Проведенный анализ выравнивания аминокислотных последовательностей показал, что в большинстве случаев аминокислотные замены соответствуют филогенетической группировке изучаемых штаммов. В

аминокислотной последовательности нуклеопротеина штамма «РВ-97» обнаружено 6 уникальных замен (по сравнению с 15 другими последовательностями, выбранными для анализа): в том числе одна значимая в позиции 3 A→T (табл. 44); в позиции 172 замена I→V, в позиции 179 замена V→I, в позиции 218 замена E→D, в позиции 246 замена I→V, в позиции 364 замена K→R (малозначимые замены в таблице не представлены). В последовательности вакцинного штамма «Eth_PV» из Эфиопии уникальных аминокислотных замен обнаружено не было.

Таблица 44 – Выравнивание вариабельных участков нуклеопротеина вакцинных/аттенуированных штаммов ВБ

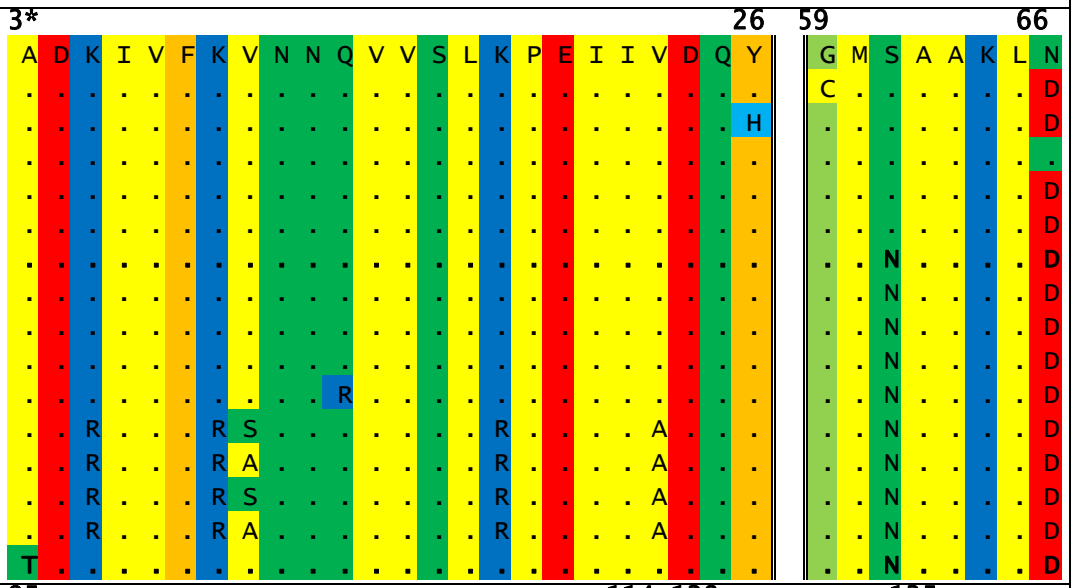
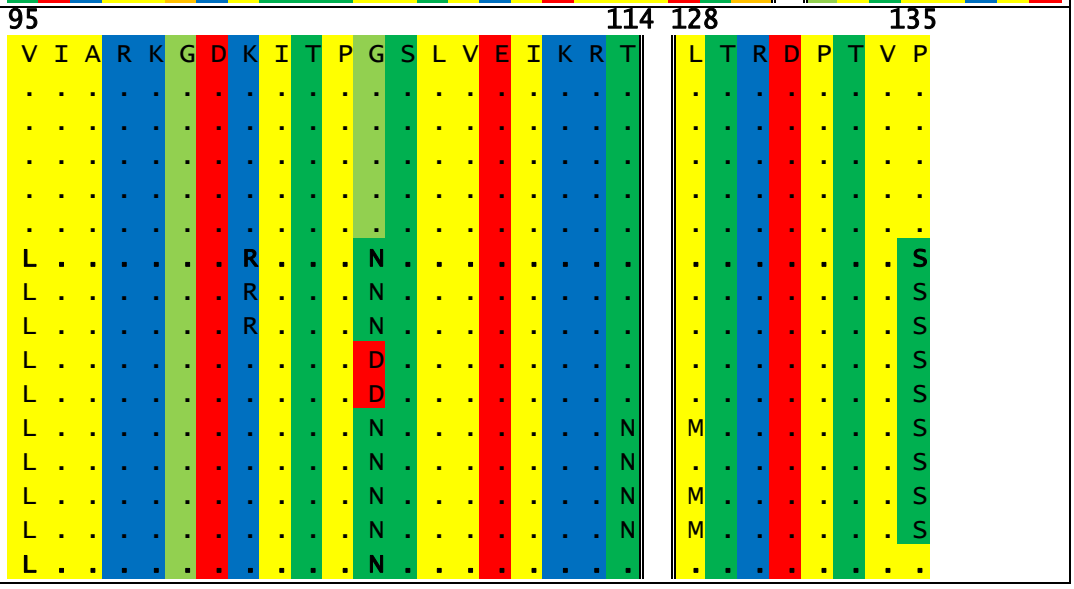
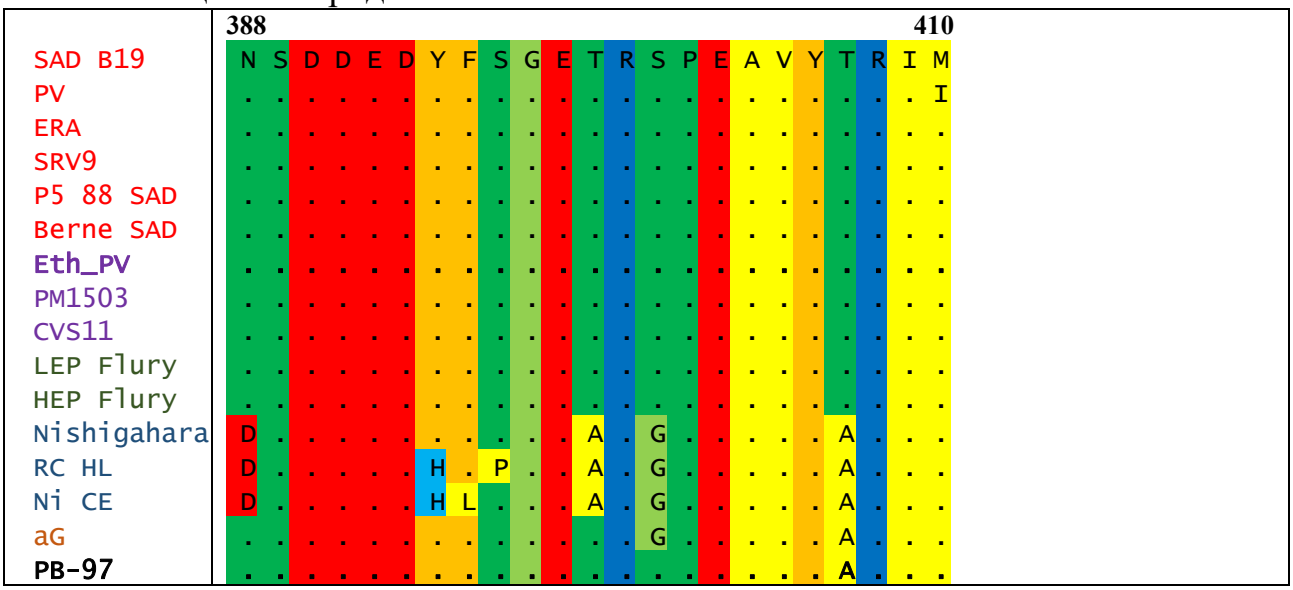
Штамм	Выравнивание
	
	

таблица 44 – продолжение



ароматические, гидрофобные боковые цепи: Y, F, W; гидрофобные боковые цепи: L, I, V, P, A, C, M; G; гидрофильные незаряженные боковые цепи: S, T, N, Q; H; положительно заряженные боковые цепи: K, R; отрицательно заряженные боковые цепи: D, E. Цветовые обозначения филогенетических групп: «USA1»; «USA2»; «USA3»; «Japan»; «China»; «Russia». Последовательности штаммов «**PB-97**» и «**Eth_PV**», полученные в рамках выполнения данной работы, выделены жирным шрифтом. Цветовые обозначения характеристик аминокислотных остатков и филогенетических групп использовались далее в таблицах и по тексту без изменений. *Цифрами показана позиция фрагмента в последовательности данного белка. Однобуквенные обозначения аминокислот приведены согласно международным обозначениям.

Антигенный сайт I и частично перекрывающаяся с ним антигенный сайт IV нуклеопротеина, расположенные в позициях аминокислот 358-367 и 359-366, содержали одну незначимую замену K→R (малозначимая замена, в таблице не представлена) в позиции 364 российского вакцинного штамма «РВ-97».

Вторая часть антигенного сайта IV, картированная в позиции аминокислот 375-383, содержала одну замену T→S в позиции 377 лабораторного штамма «CVS-11», которая также не привела к изменению антигенных свойств этого штамма ввиду сходства свойств этих аминокислот. В позиции 322 (антигенный сайт III) групп вакцинных штаммов «Japan» и «China» обнаружена замена V→I (малозначимые, в таблице не представлены). В последовательностях аминокислот иммунодоминантного эпитопа нуклеопротеина, расположенного в позиции 404-418, обнаружены следующие замены: T→A в позиции 407 у штаммов филогенетических групп «Japan», «China», «Russia», а также замена M→I в позиции 410 у штамма «PV» (табл. 44).

Анализ аминокислотных последовательностей фосфопротеина. При анализе выравнивания последовательностей фосфопротеина изучаемых вакцинных/аттенуированных штаммов установлены протяженные вариабельные участки изучаемых аминокислотных последовательностей. Выявлено соответствие аминокислотных замен филогенетической группировке изучаемых штаммов, а также ряд значимых и незначимых замен. Результаты проведенного исследования представлены в таблице 45.

Таблица 45 – Выравнивание вариабельных участков фосфопротеина вакцинных/аттенуированных штаммов ВБ

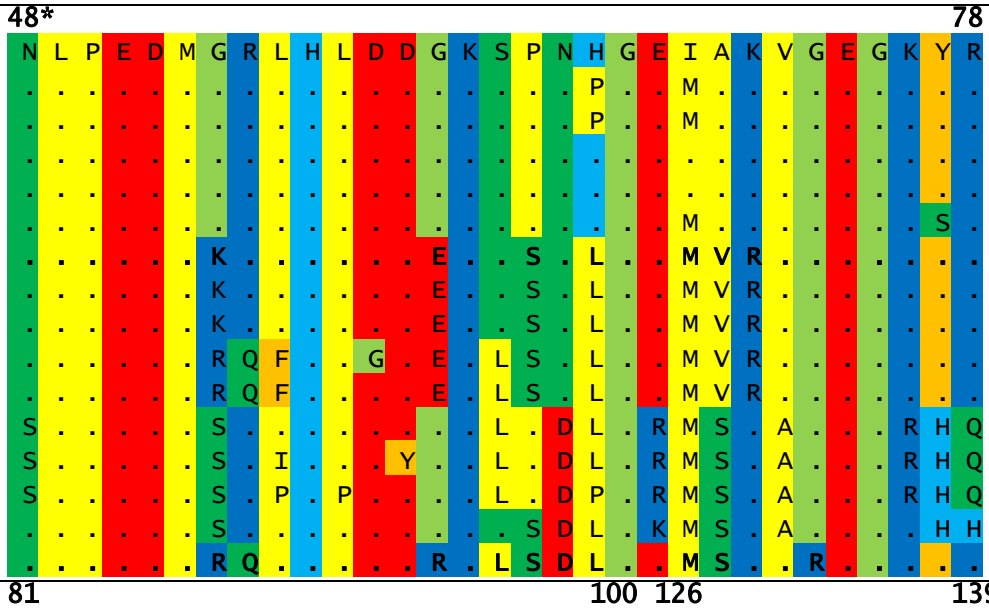
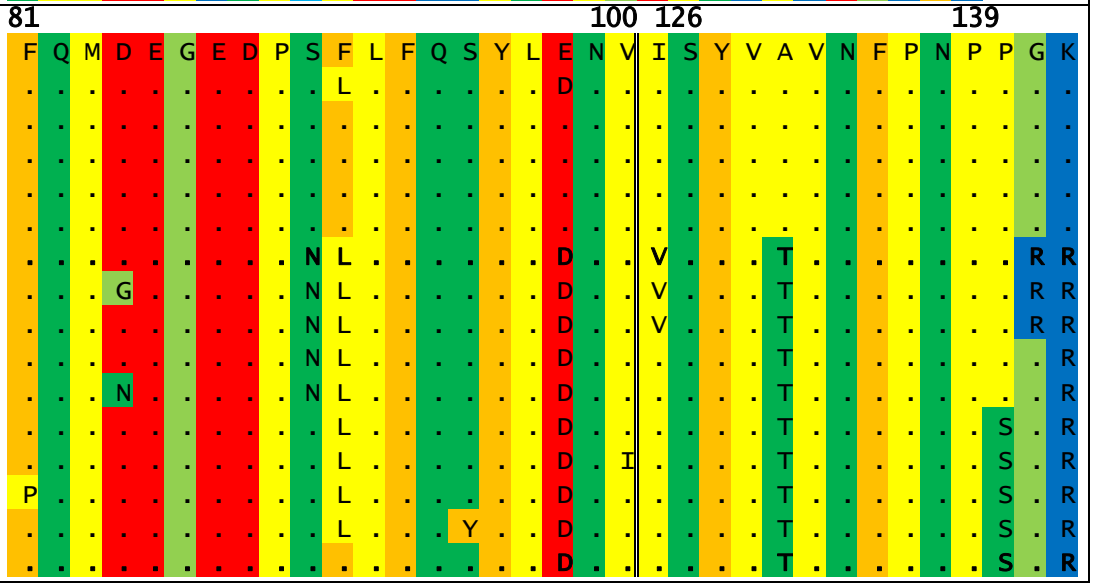
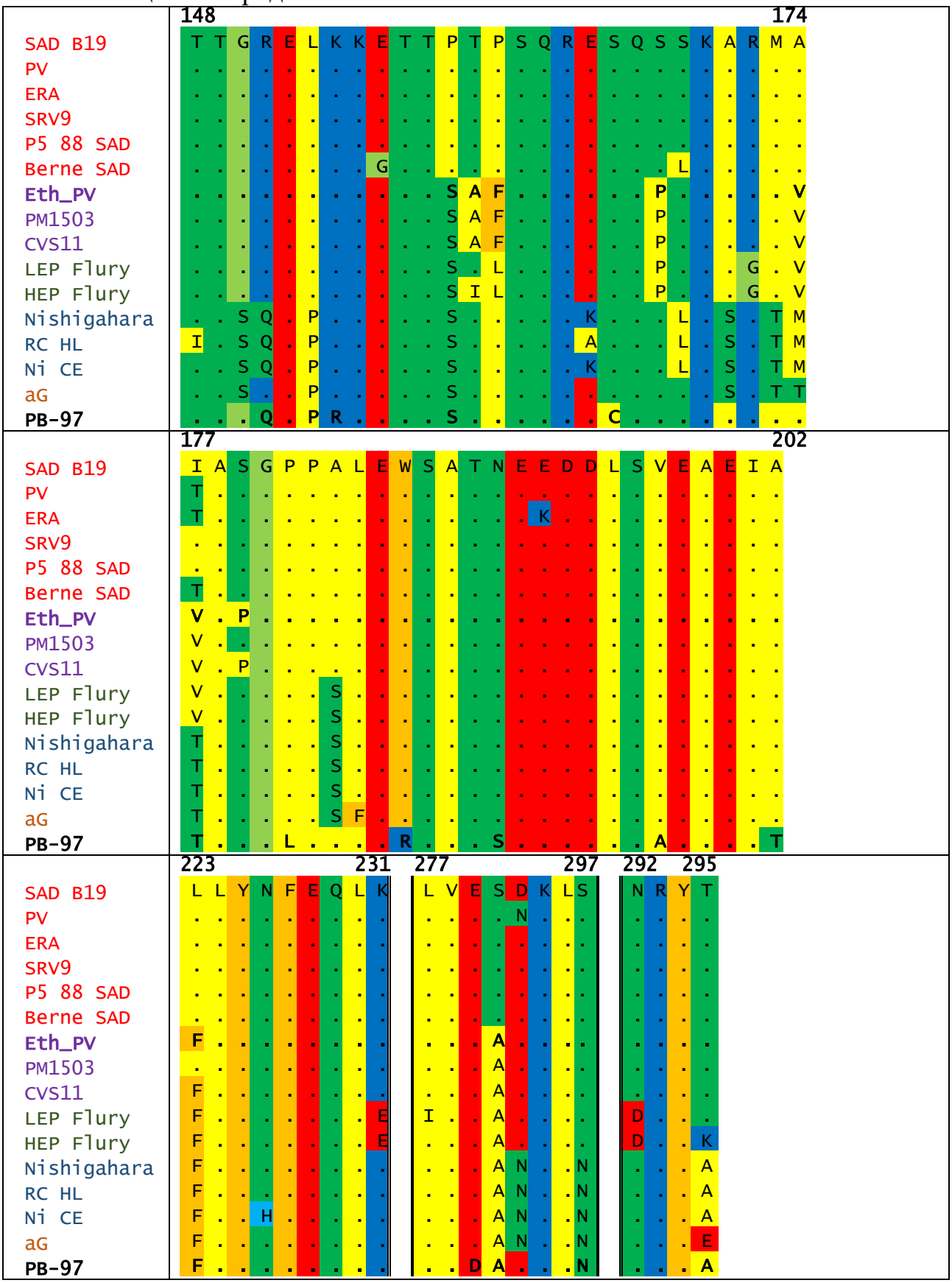
Штамм	Выравнивание
SAD B19 PV ERA SRV9 P5 88 SAD Berne SAD Eth_PV PM1503 CVS11 LEP Flury HEP Flury Nishigahar RC HL Ni CE aG PB-97	
SAD B19 PV ERA SRV9 P5 88 SAD Berne SAD Eth_PV PM1503 CVS11 LEP Flury HEP Flury Nishigahar RC HL Ni CE aG PB-97	

таблица 45 – продолжение



*Цифрами показана позиция фрагмента в последовательности данного белка. Однобуквенные обозначения аминокислот приведены согласно международным обозначениям.

В аминокислотной последовательности фосфопротеина штамма «РВ-97» обнаружено 15 уникальных замен (по сравнению с 15 другими последовательностями, выбранными для анализа): V→I в позиции 6 (малозначимая, в таблице не представлена), G(E)→R в позиции 61, G→R в позиции 73 (табл. 45), R→K в позиции 109 (малозначимая, в таблице не представлена), K→R в позиции 154, S→C в позиции 166, P→L в позиции 181, W→R в позиции 186, N→S в позиции 190, V→A в позиции 197, A→T в позиции 202 (табл. 45), N→S в позиции 243 (малозначимая, в таблице не представлена), H(R)→C в позиции 252, A→T в позиции 269 (низковариабельная область, в таблице не представлена), E→D в позиции 279 (табл. 45, заменяемый аминокислотный остаток указан из последовательности штамма в аут-группе, аминокислотный остаток в скобках – вариант у других штаммов, который также характеризуется как замена).

Вариабельность фрагмента фосфопротеина, содержащего два антигенных сайта в позиции 75-90, представлена в таблице 46.

Таблица 46 – Выравнивание аминокислотных последовательностей антигенных сайтов фосфопротеина вакцинных/аттенуированных штаммов ВБ

Штамм	**Выравнивание**
	75* 90
SAD B19	G K Y R E D F Q M D E G E D P S
PV	. . . .
ERA	. . . .
SRV9	. . . .
P5 88 SAD	. . . .
Berne SAD	. . S . . . .
Eth_PV	. . . . N
PM1503	. . . . G . . . . . N
CVS11	. . . . N
LEP Flury	. . . . N
HEP Flury	. . . . N . . . . . N
Nishigahara	. R H Q . . . .
RC HL	. R H Q . . . .
Ni CE	. R H Q . . P . . . .
aG	. . H H . . . .
PB-97	. . . .

*Цифрами показана позиция фрагмента в последовательности данного белка. Однобуквенные обозначения аминокислот приведены согласно международным обозначениям.

Из данных, представленных в таблице 46, следует, что штаммы «РВ-97» и «Eth_PV» уникальных аминокислотных замен в последовательности данного

сайта не содержат, однако штамм «Eth_PV» имеет замену S→N в позиции 90. Данная замена также характерна для других штаммов групп «USA2» и «USA3». Штаммы группы Japan показывают замену сразу трех аминокислотных остатков подряд в позиции 76-78 KY(S)R→RHQ. Штамм «aG» (China) показывает замену Y(S)R →HH в позиции 77-78. Штаммы «HEP Flury» и «PM1503» показывают соответственно замену D→N и D→G позиции 84. Домен, содержащий главные антигенные детерминанты в позиции 83-172, содержит ряд вариабельных участков, проанализированных нами ранее (табл. 46).

Структура иммунодоминантного сайта фосфопротеина в позиции 191-206 проанализирована в таблице 47.

Таблица 47 – Выравнивание аминокислотных последовательностей иммунодоминантного сайта фосфопротеина вакцинных/аттенуированных штаммов ВБ

Штамм	Выравнивание
	191* E E D D L S V E A E I A H Q I A 206
SAD B19	. . . .
PV	. . . .
ERA	. K . . . .
SRV9	. . . .
P5 88 SAD	. . . .
Berne SAD	. . . .
Eth_PV	. . . .
PM1503	. . . .
CVS11	. . . .
LEP Flury	. . . .
HEP Flury	. . . .
Nishigahara	. . . .
RC HL	. . . .
Ni CE	. . . .
aG	. . . .
PB-97	. . . . . A . . . T . . .

*Цифрами показана позиция фрагмента в последовательности данного белка. Однобуквенные обозначения аминокислот приведены согласно международным обозначениям.

Из представленного в таблице 47 выравнивания аминокислотных последовательностей изучаемых вакцинных штаммов следует, что только замена E→K у штамма «ERA» и A→T у штамма «PB-97» потенциально могли бы изменить иммуногенную активность данного белка ввиду отличия свойств данных аминокислот.

У штамма «PB-97» в данном иммунодоминантном сайте присутствует

замена V→A, данные аминокислоты имеют сходные свойства.

Анализ аминокислотных последовательностей матриксного протеина. При анализе выравнивания последовательностей матриксного протеина изучаемых вакцинных/аттенуированных штаммов установлены протяженные вариабельные участки, а также ряд значимых и незначимых замен аминокислот. Не выявлено соответствия аминокислотных замен филогенетической группировке изучаемых штаммов (табл. 48).

Таблица 48 – Выравнивание вариабельных участков матриксного протеина вакцинных/аттенуированных штаммов ВБ

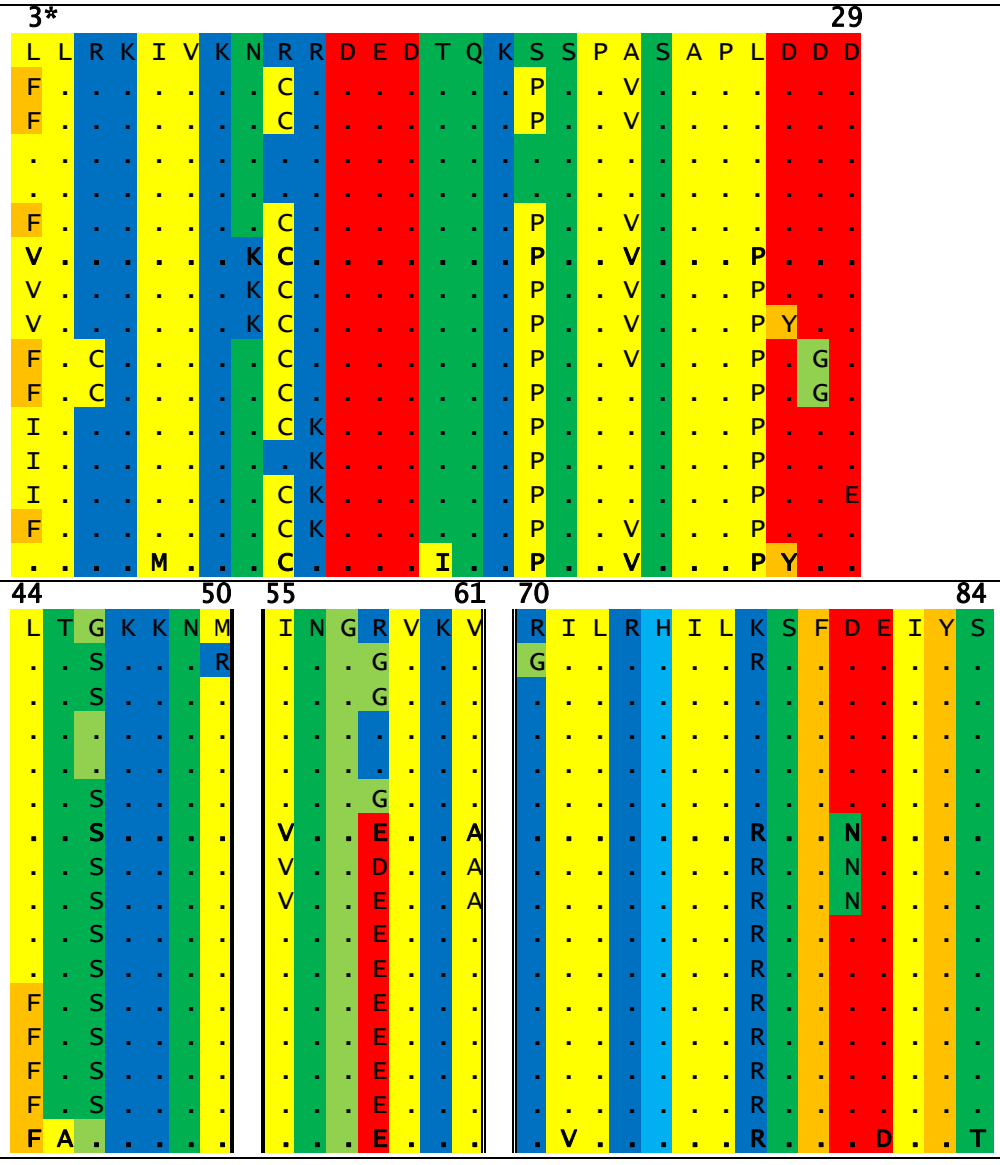
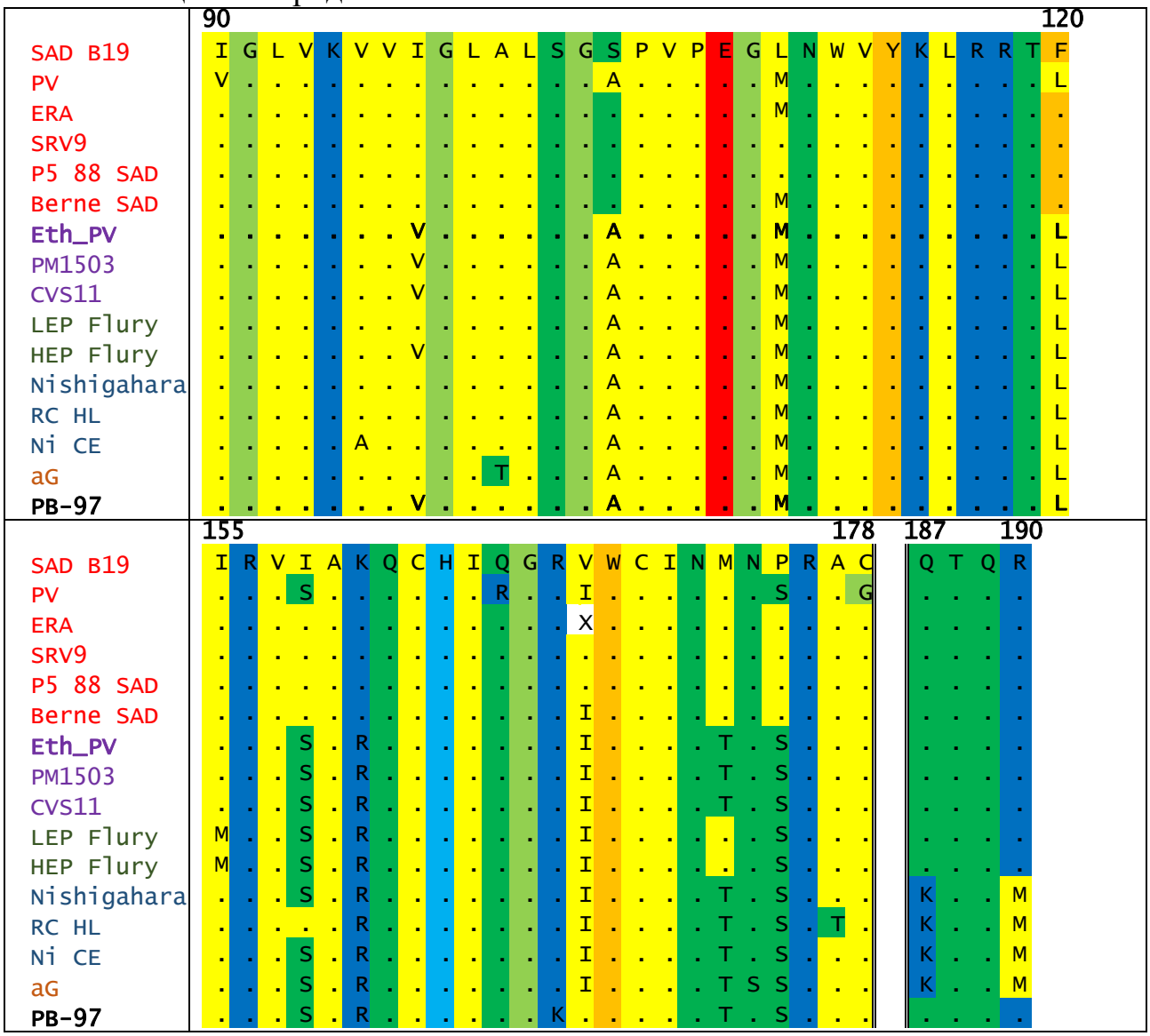
Штамм	Выравнивание
SAD B19	
PV	
ERA	
SRV9	
P5 88 SAD	
Berne SAD	
Eth_PV	
PM1503	
CVS11	
LEP Flury	
HEP Flury	
Nishigahara	
RC HL	
Ni CE	
aG	
PB-97	

таблица 48 – продолжение



*Цифрами показана позиция фрагмента в последовательности данного белка. Однобуквенные обозначения аминокислот приведены согласно международным обозначениям.

В аминокислотной последовательности матриксного протеина штамма «PB-97» обнаружено 7 уникальных замен: I→M в позиции 7, T→I в позиции 16, T→A в позиции 45, I→V в позиции 71, E→D в позиции 81, S→T в позиции 84, R→K в позиции 167 (табл. 48). Также замена D→Y не встречается у других вакцинных штаммов, но присутствует у штамма «CVS-11». В аминокислотной последовательности матриксного протеина штамма «Eth_PV» уникальных аминокислотных замен обнаружено не было.

Сайт, содержащий антигенные детерминанты в позиции 1-72, отличается от сайта в позиции 50-171 более широкой вариабельностью.

Анализ аминокислотных последовательностей гликопротеина. При анализе выравнивания последовательностей незрелого гликопротеина изучаемых вакцинных/аттенуированных штаммов ВБ установлены протяженные вариабельные участки. Также выявлено частичное соответствие аминокислотных замен филогенетической группировке изучаемых штаммов (табл. 49).

Таблица 49 – Выравнивание вариабельных участков гликопротеина вакцинных/аттенуированных штаммов ВБ

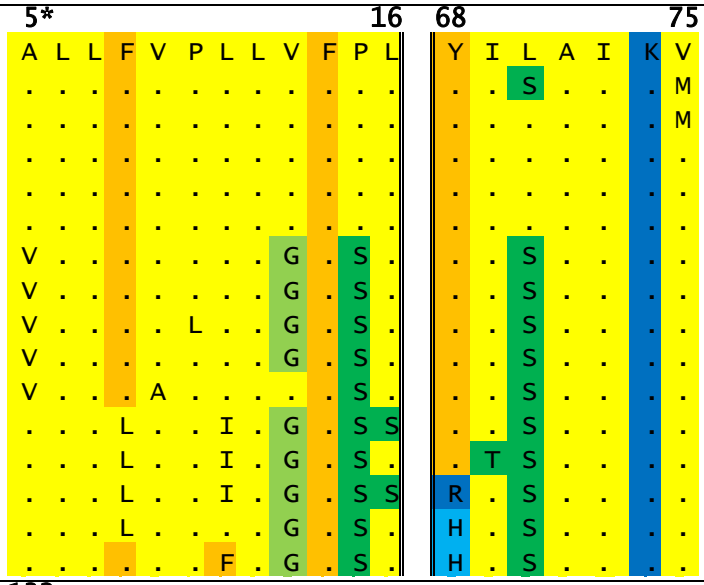
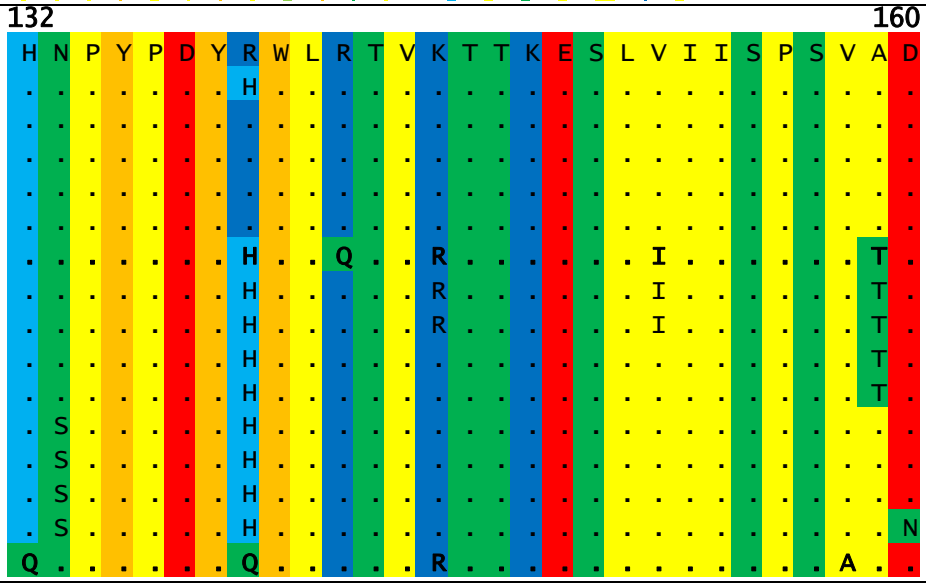
Штамм	Выравнивание
	
	

таблица 49 – продолжение

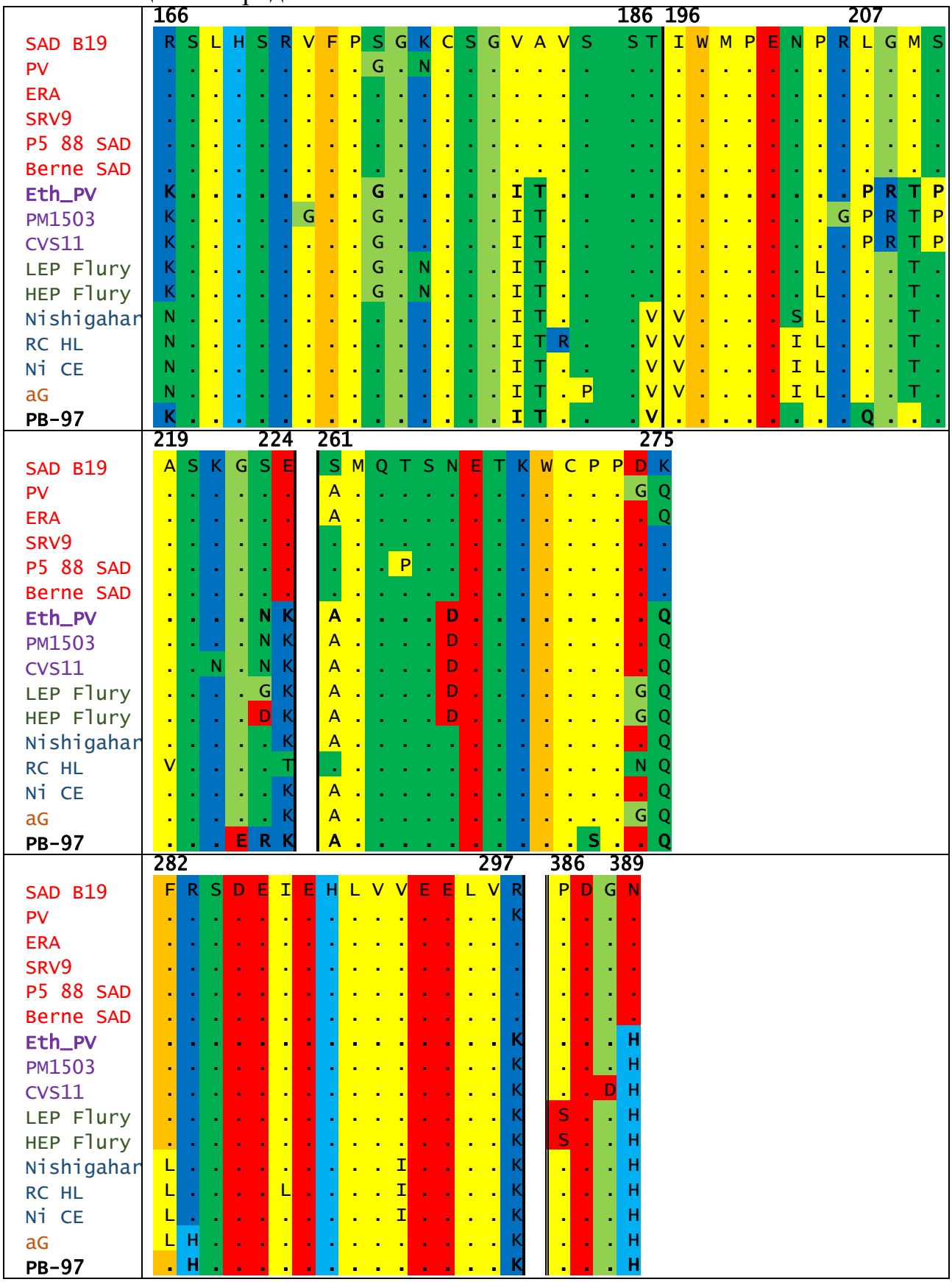
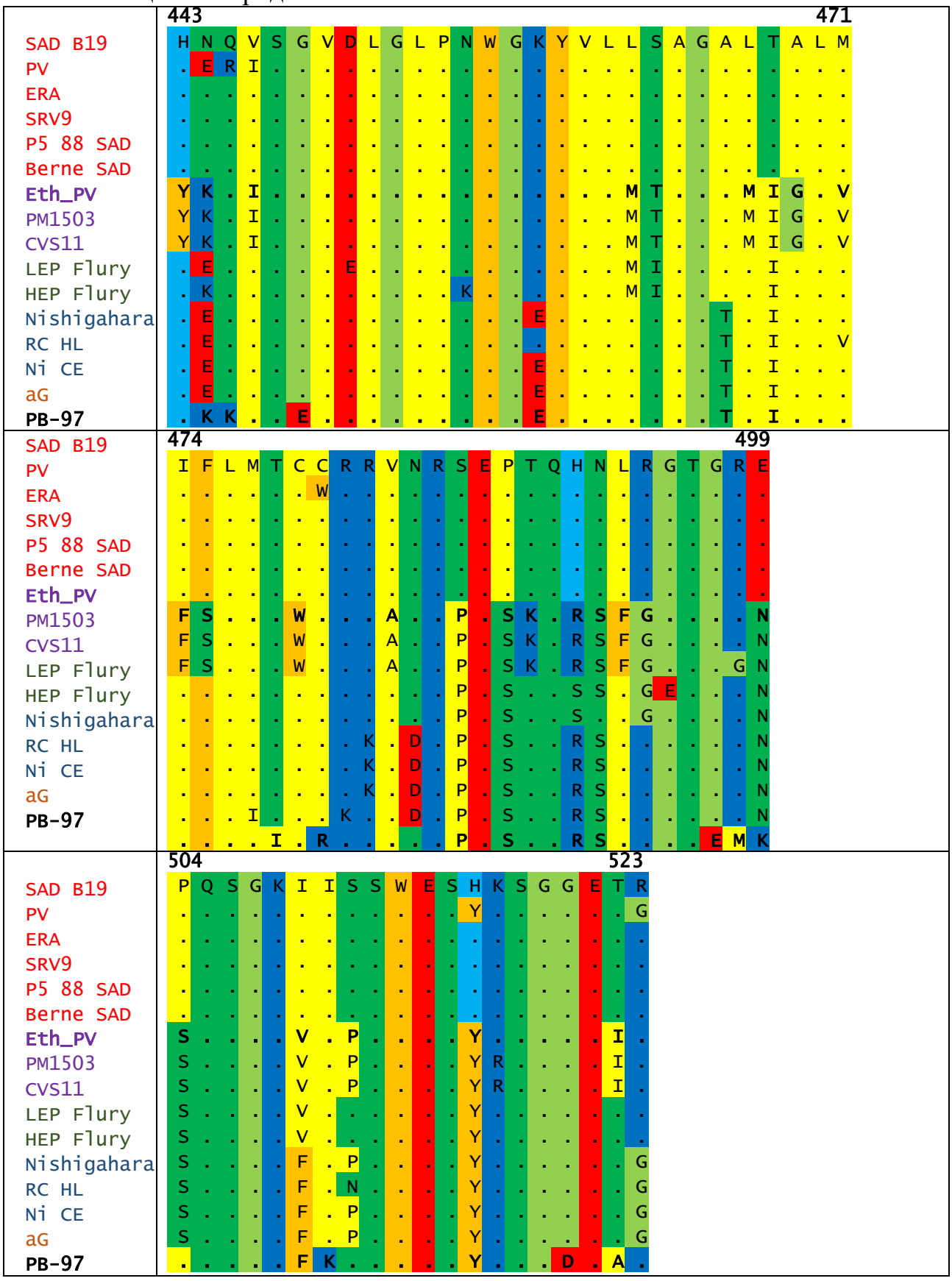


таблица 49 – продолжение



*Цифрами показана позиция фрагмента в последовательности данного белка. Однобуквенные обозначения аминокислот приведены согласно международным обозначениям.

В аминокислотной последовательности гликопротеина штамма «РВ-97» обнаружено 26 уникальных замен (по сравнению с 15 другими последовательностями, выбранными для анализа): L(I)→F в позиции 11 (табл. 49), M→L в позиции 63 (малозначимая замена, в таблице не представлена), M→T в позиции 121 (низковариабельный участок, в таблице не представлен), H→Q в позиции 132, R(H)→Q в позиции 139, V→A в позиции 158, L(P)→Q в позиции 204, G→E в позиции 222, S(N,G,D)→R в позиции 223 (табл. 49), K→R в позиции 239 (малозначимая замена, в таблице не представлена), A→S в позиции 241 (низковариабельный участок, в таблице не представлен), P→S в позиции 272 (табл. 49), F→I в позиции 337, L(I) →V в позиции 358, G→E в позиции 367, L→F в позиции 439 (низковариабельный участок, в таблице не представлен), Q(R)→K в позиции 445, G→E в позиции 448, T→I в позиции 478, C(W)→R в позиции 480, G→E в позиции 497, R(G)→M в позиции 498, E→K в позиции 499, I→K в позиции 510, G→D 520, T(I)→A в позиции 522 (табл. 49). В позиции 231 зрелого гликопротеина (антигенный эпитоп I) все штаммы содержат аминокислотный остаток L, за исключением «aG» («China») у которого в этой позиции произошла замена L→P. Структура конформационно-зависимого антигенного сайта II в (позиции 34-42, 198-200, 147 и 184) представлена в таблице 50.

Таблица 50 – Первичная структура антигенного сайта II вакцинных/аттенуированных штаммов ВБ

Штамм	**Выравнивание**
	34* 42 147 184 198 200
SAD B19	G C T N L S G F S R R K R A
PV	. . . .
ERA	. . . .
SRV9	E . . . .
P5 88 SAD	. . . .
Berne SAD	. . . .
Eth_PV	. . . . . E . . K . . . .
PM1503	. . . . . E . . K G . . .
CVS11	. . . . . E . . K . . . .
LEP Flury	. . . . . E . . K . . . .
HEP Flury	. . . . K . . . .
Nishigahara	. . . . N . . . .
RC HL	. . . . N . . . V
Ni CE	. . . . N . . . .
aG	. . . . N . . . .
PB-97	. . . . K . . . .

*Цифрами показана позиция фрагмента в последовательности данного белка.

При сравнении аминокислотных последовательностей установлено, что антигенный сайт II имеет как консервативные, так и вариабельные эпитопы. Особой вариабельностью отличаются эпитопы в позициях 39 и 147. Кроме того, значимые замены выявляются в позициях 34 и 184. Уникальных аминокислотных замен у штаммов «PB-97» и «Eth_PV» в рамках данного антигенного сайта не обнаружено, однако присутствуют уникальные замены: G→E в позиции 34 у штамма «SRV9», R→G в позиции 184 у штамма «PM1503» и A→V в позиции 200 у штамма «RC_HL». Структура линейного антигенного сайта III (позиции 330-338) представлена в таблице 51.

Таблица 51 – Первичная структура антигенного сайта III вакцинных/аттенуированных штаммов ВБ

Штамм	**Выравнивание**
	330* 338
SAD B19	K S V R T W N E I
PV	. . . .
ERA	. . . .
SRV9	. . . S V
P5 88 SAD	. . . .
Berne SAD	. . . .
Eth_PV	. . . .
PM1503	. . . .
CVS11	. . . .
LEP Flury	. . . .
HEP Flury	. . . Q . . . . .
Nishigahara	. . . .
RC HL	. . . .
Ni CE	. . . .
aG	. . . .
PB-97	. . . .

*Цифрами показана позиция фрагмента в последовательности данного белка. Однобуквенные обозначения аминокислот приведены согласно международным обозначениям.

В структуре антигенного сайта III гликопротеина вакцинных/аттенуированных штаммов вируса бешенства наиболее вариабельным оказался эпитоп в позиции 333, в котором имеют место замены R→S у штамма «SRV9» и R→Q у штамма «HEP Flury», штамм «SRV9», кроме того, показывает замену I→V в позиции 338.

Анализ аминокислотных последовательностей полимеразы. При анализе выравнивания последовательностей полимеразы изучаемых штаммов установлены следующие вариабельные участки (табл. 52).

Таблица 52 – Выравнивание вариабельных участков полимеразы вакцинных/аттенуированных штаммов вируса бешенства

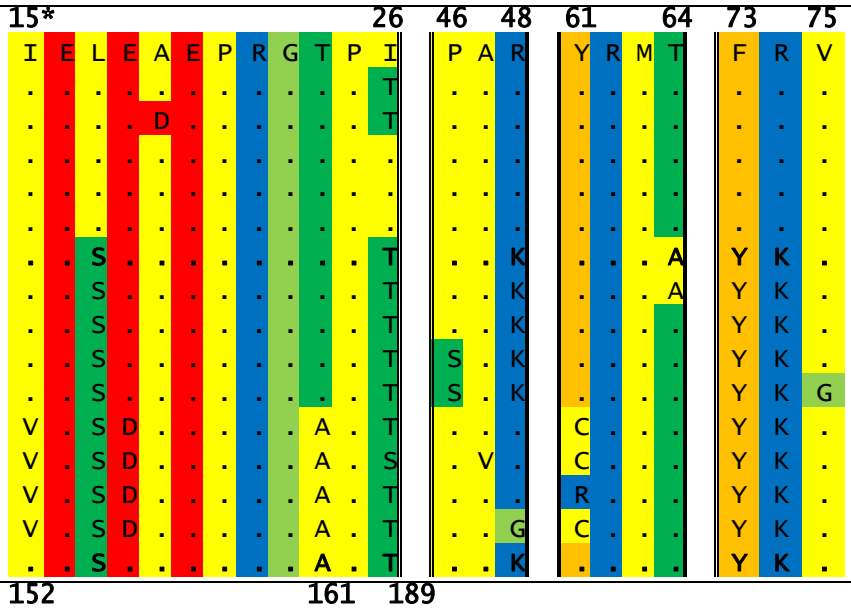
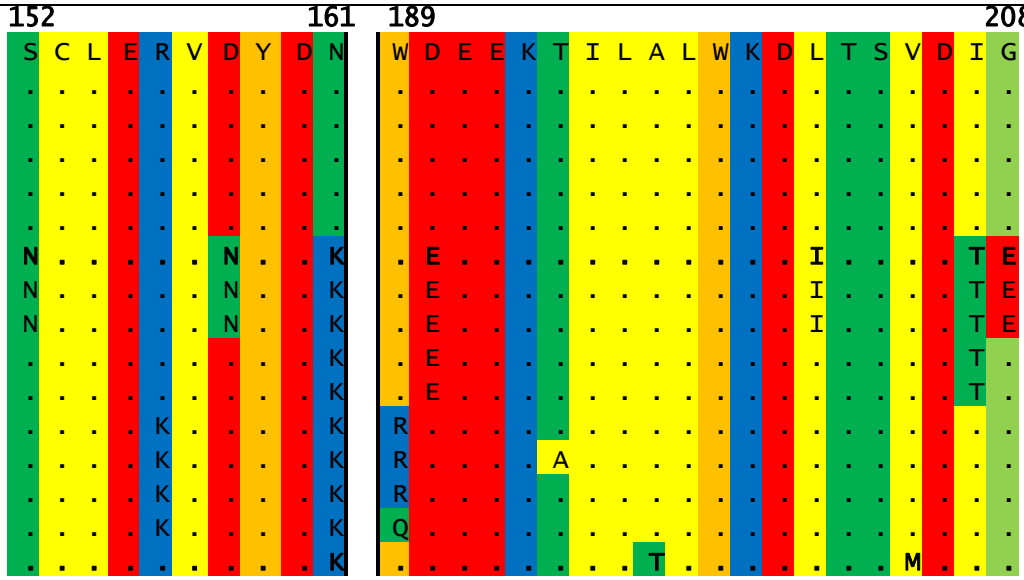
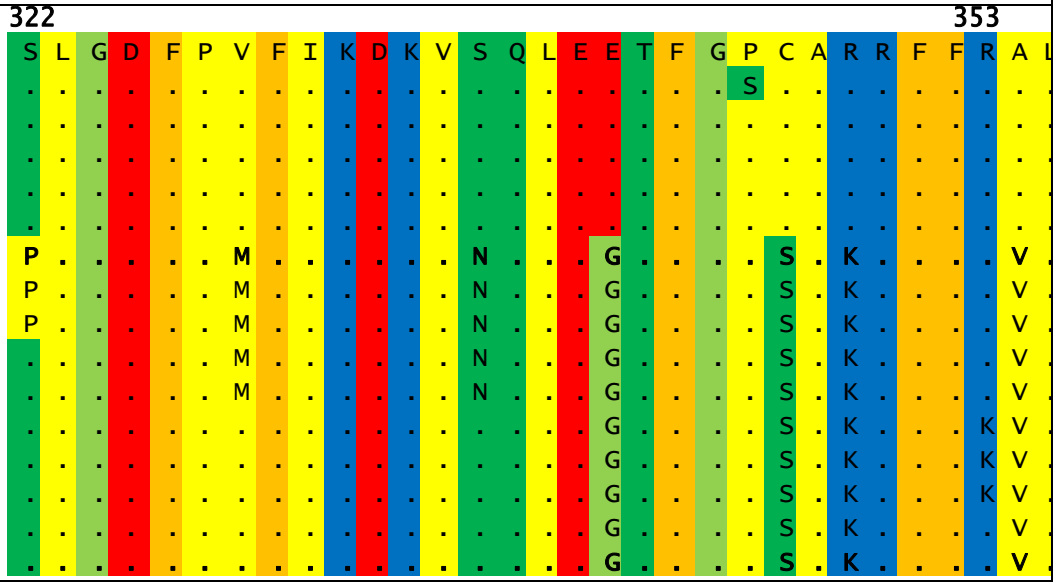
Штамм	Выравнивание
SAD B19 PV ERA SRV9 P5 88 SAD Berne SAD Eth_PV PM1503 CVS11 LEP Flury HEP Flury Nishigahara RC HL Ni CE aG PB-97	
SAD B19 PV ERA SRV9 P5 88 SAD Berne SAD Eth_PV PM1503 CVS11 LEP Flury HEP Flury Nishigahara RC HL Ni CE aG PB-97	
SAD B19 PV ERA SRV9 P5 88 SAD Berne SAD Eth_PV PM1503 CVS11 LEP Flury HEP Flury Nishigahara RC HL Ni CE aG PB-97	

таблица 52 – продолжение

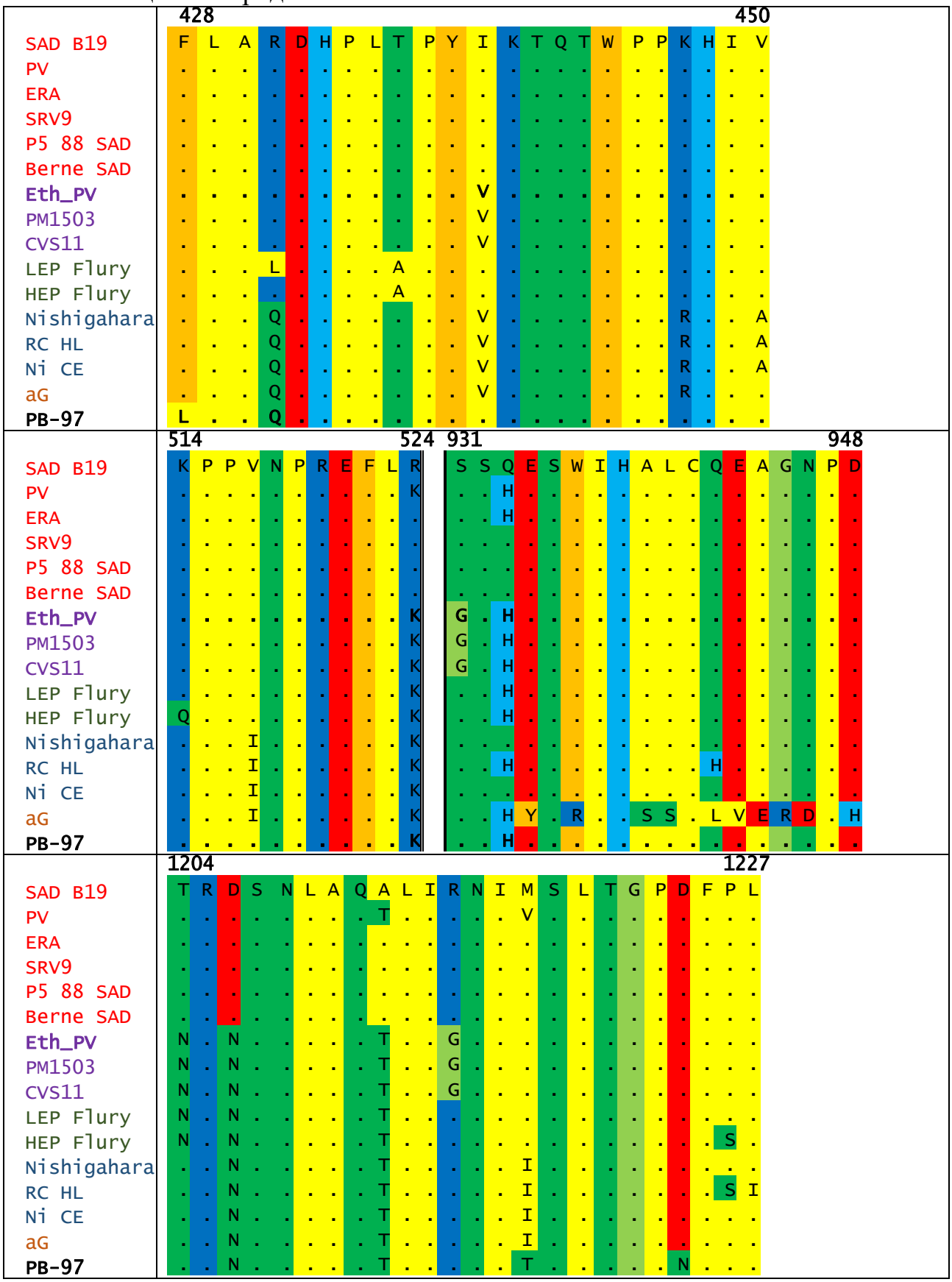


таблица 52 – продолжение

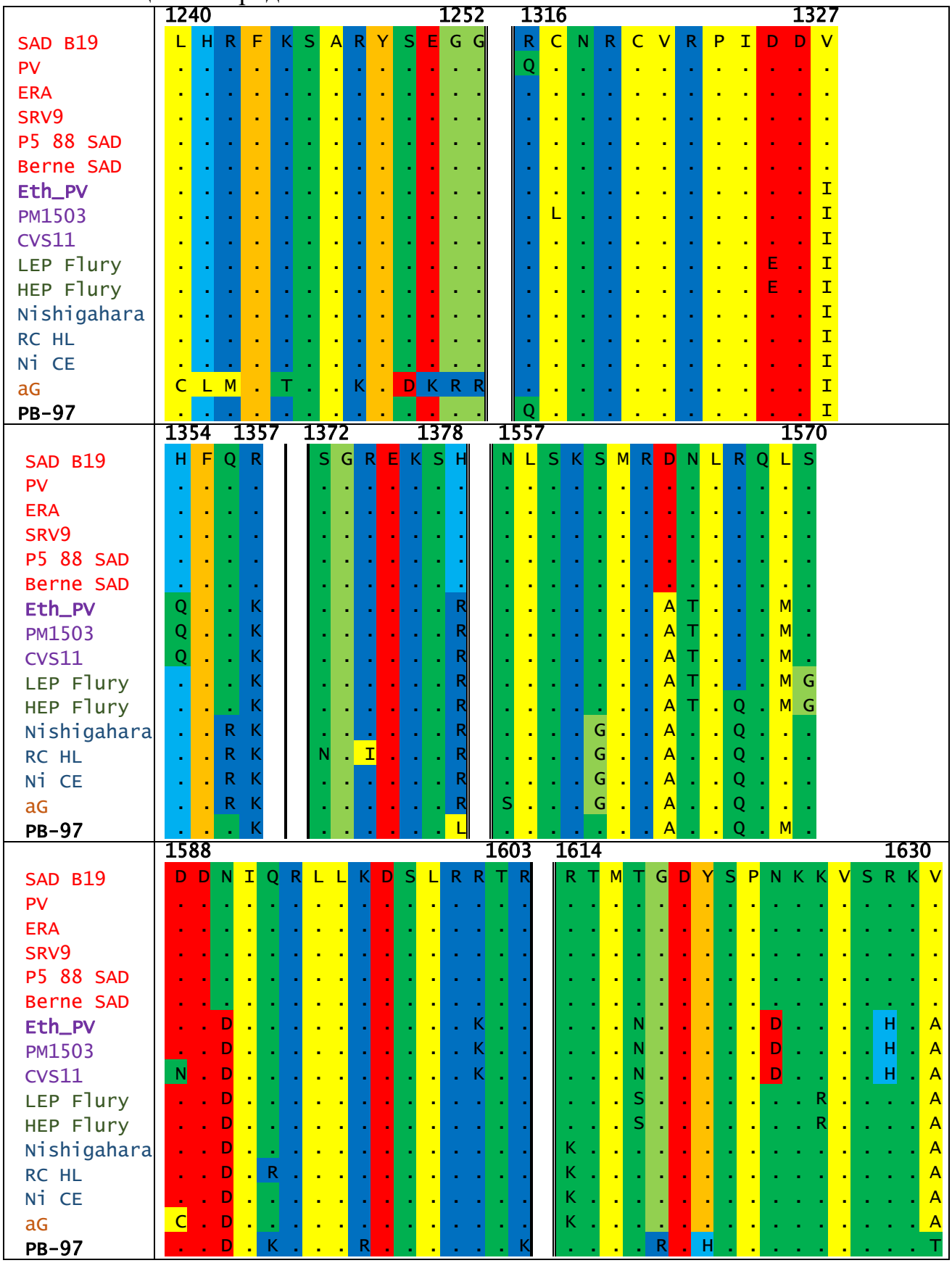
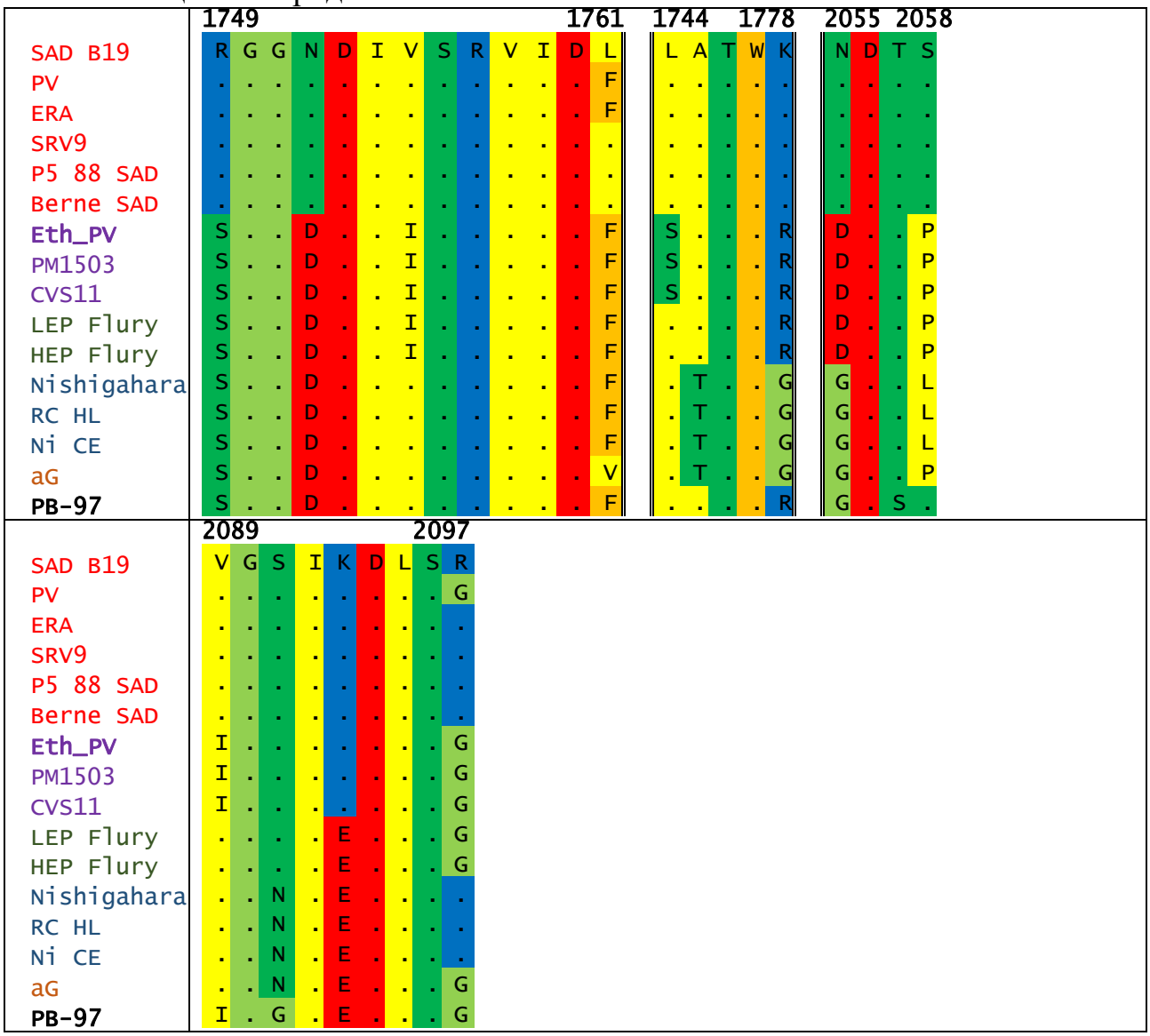


таблица 52 – продолжение



*Цифрами показана позиция фрагмента в последовательности данного белка.

Проведенный анализ выравнивания аминокислотных последовательностей полимеразы позволил установить частичное соответствие выявленных аминокислотных замен филогенетической группировке изучаемых вакцинных штаммов.

В аминокислотной последовательности гликопротеина российского вакцинного штамма «РВ-97» обнаружено 36 уникальных замен: L(R)→Y в позиции 136; F→L в позициях 176 и 428 (низковариабельные участки, в таблице не представлены); A→T в позиции 197; V→M в позиции 205 (табл. 52); I→L в позициях 300 и 1443; I→V в позициях 376, 826, 1704 и 1334, G→R в позициях 1138 (малозначимые замены/низковариабельные участки, в таблице не

представлены); 1618 (табл. 52), 1960 и 2045; Q(L)→R в позиции 745 (низковариабельный участок, в таблице не представлены); D→N в позиции 1224 (табл. 52); T→A в позиции 1304 (низковариабельный участок, в таблице не представлены); H(R)→L в позиции 1378 (табл. 52); S→P в позиции 1397; G→S в позиции 1411 (низковариабельный участок, в таблице не представлен) Q(R)→K в позиции 1592; в позициях K→R 1596 (табл. 52), 1785 и 1786 (низковариабельный участок, в таблице не представлены); R→K в позиции 1603, Y→H в позиции 1620; V(A)→T в позиции 1630 (табл. 52); I(L)→V в позиции 1658; N(K)→E в позиции 1694; A→E в позиции 1804; Y→C в позиции 1825, A→V в позиции 1849; D→E в позиции 1942 (низковариабельные участки, в таблице не представлены); T→S в позиции 2057; S(N)→G в позиции 2091 (табл. 52).

У происходящего из Эфиопии вакцинного штамма «Eth_PV» обнаружено две замены аминокислотных остатков: D→N в позиции 387 и G→R в позиции 1478 (низковариабельные участки, в таблице не представлены).

Изучение равенств уровней эволюции по методу Тайямы с использованием аминокислотных последовательностей вирусных белков вакцинных/аттенуированных штаммов. Результаты тестирования по методу Тайяма (равенство уровней эволюции) для трех предсказанных аминокислотных последовательностей пяти вирусных белков вакцинных штаммов «PB-97» и «Eth_PV», а также вакцинного штамма «SAD B19», выбранного в качестве аутгруппы представлены в таблице 53.

Из полученных данных следует, что разница уровней эволюции двух изучаемых вакцинных штаммов «PB-97» и «Eth_PV» существенно варьирует при определении этого показателя для аминокислотных последовательностей вирусных белков по отдельности. Установлено, что наибольшая разница уровней эволюции ($\chi 2$) между этими штаммами у фосфопротеина и полимеразы, а наименьшая – у матриксного протеина и гликопротеина.

Таблица 53 – Результаты тестирования по методу Тайяма для трех выбранных нуклеотидных последовательностей

Показатели	**Значения / %**				
	N (450)	**P (297)**	**M (202)**	**G (524)**	**L (2127)**
Идентичных сайтов во всех трех последовательностях	436/96,9	250/84,18	171/84,65	441/84,16	2096 (98,5)
Дивергентных сайтов в трех последовательностях	0/0	4/1,35	0/0	7/1,34	0/0
Количество уникальных замен в последовательности штамма «PB-97»	7/1,56	22/7,41	10/4,95	26/4,96	10/0,47
Количество уникальных замен в последовательности штамма «Eth_PV»	3/0,67	12/4,04	7/3,47	29/5,54	17/0,8
Количество уникальных замен в последовательности штамма «SAD B 19»	4/0,89	9/3,03	14/6,93	21/4,01	4/0,19
$\chi 2$ / *P*	1,6/0,206	**2,94**/0,086	0,53/0,4668	0,16/0,6858	**1,81**/0,1779

N – нуклеопротеин, P – фосфопротеин, M – матриксный протеин, G – гликопротеин, L – полимераза. В скобках указана длина аминокислотной последовательности белка.

3.2.3 Разработка и внедрение мероприятий по борьбе и профилактике бешенства в РФ и за рубежом

3.2.3.1 Результаты российско-финского сотрудничества по профилактике бешенства в граничащих с Финляндией регионах России

Российско-финская программа стартовала в 2000 г. (прил. 19) и имела целью внедрение мероприятий по профилактике бешенства диких животных в граничащих с Финляндией регионах РФ.

Для оральной вакцинации диких плотоядных животных против бешенства на территории Российской Федерации в 2003 г. однократно использовали вакцину «FUCHSORAL» (Германия), а в последующие годы – оральную антирабическую вакцину «СИНРАБ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ, г. Владимир) на основе

штамма «РВ-97» (получившего обозначение в международной базе данных GeneBank «RV-97») и ее аналог – вакцину «ОРАЛРАБИВАК» производства ОАО «ПЗБ» (г. Покров). На территории Финляндии применялась оральная антирабическая вакцина «FUCHSORAL» (Германия), произведенная на основе штамма «SAD B19».

Оральная вакцинация диких животных впервые была проведена в мае 2003 г. в Ленинградской обл. и Республике Карелия. Всего было применено 78 925 доз вакцины «FUCHSORAL»: Выборгский район – 23 325 и Приозерский район – 10 400 доз (Ленинградская обл.); районы– Питкярантский – 5 600, Суоярвский – 9 600, Сортовальский – 15 200, Лахденпохский – 15 200 доз (Республика Карелия). Расположение зоны оральной антирабической вакцинации на территории Ленинградской обл., Республика Карелия и Финляндии представлено на рисунке 66.

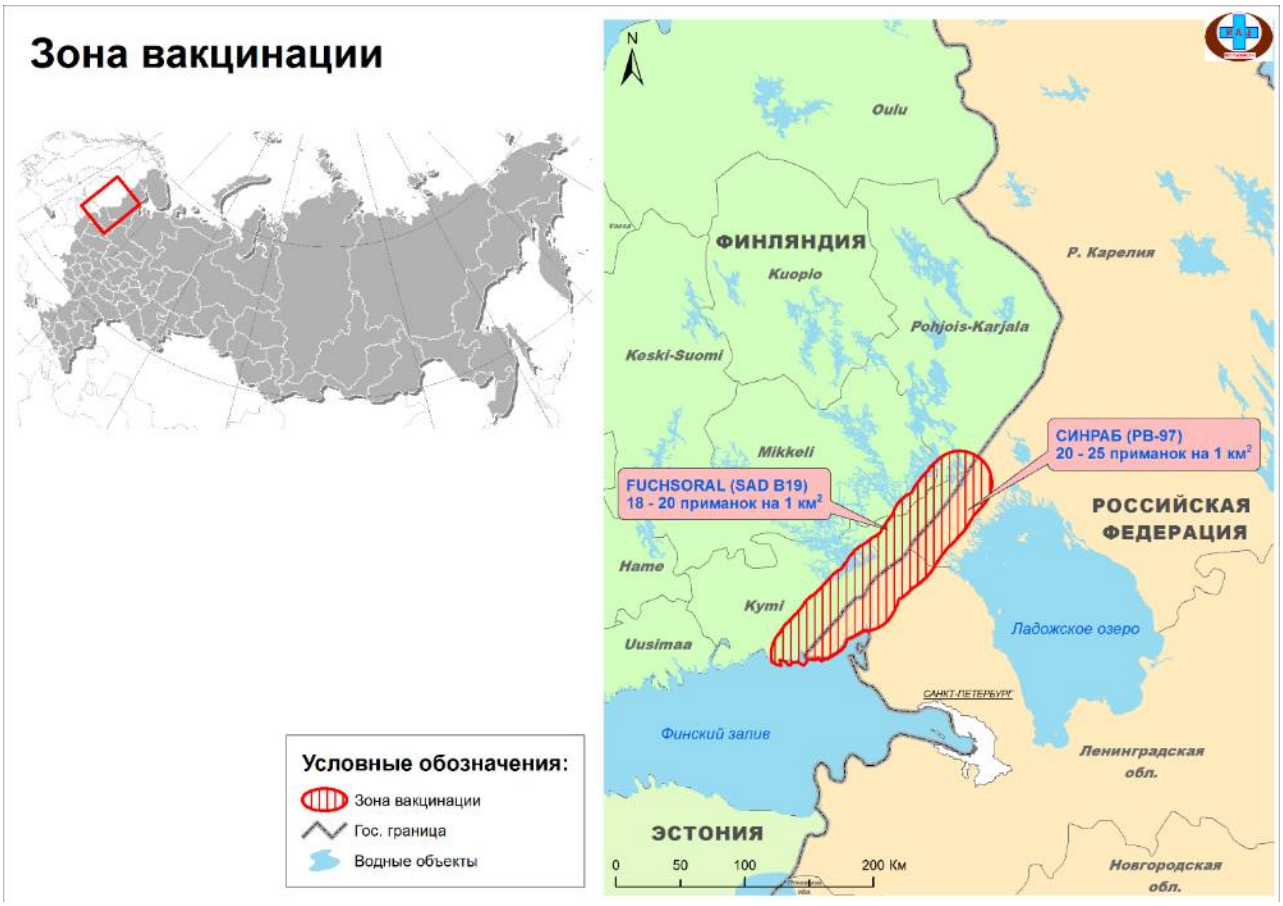


Рисунок 66 – Расположение зоны оральной вакцинации диких животных против бешенства на российско-финской границе.

Для оценки иммунного статуса диких животных и мониторинга бешенства в зоне вакцинации был проведен отбор проб крови/трупной жидкости с целью определения уровня антирабических антител и головного мозга для диагностики бешенства. Контрольные пробы собирали на территории Мурманской обл.

Для унификации методик отбора и пересылки проб головного мозга и сывороток крови/трупной жидкости ветеринарными службами регионов РФ, принимавшими участие в реализации Российско-финской программы, были разработаны «Методические указания по отбору проб мозга для диагностики бешенства и сывороток крови с целью определения титра антител», утвержденные руководителем Департамента ветеринарии Минсельхоза России 03.04.2001 (Метлин, 2004).

Районные лаборатории Ленинградской обл., областная лаборатория Мурманской области и Карельская республиканская лаборатория направляли отобранные и предварительно подготовленные в соответствии с данными методическими указаниями пробы в Ленинградскую областную ветеринарную лабораторию, где их хранили при минус 20ºС. Затем каждую пробу головного мозга и крови/трупной жидкости делили на две равные части и отправляли в ФГБУ «ВНИИЗЖ» и EELA (ныне Evira) для проведения параллельных исследований.

Отбор проб проводился ежегодно от диких плотоядных, таких как лисицы, енотовидные собаки и некоторые другие виды животных. Пробы головного мозга исследовали в РИФ с использованием метода вирусовыделения в культуре клеток и биопробы на мышах, пробы сывороток крови исследовали в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21.

Трупы животных, отстрелянных в зоне предполагаемой вакцинации и контрольной зоне, поступали в региональные лаборатории, где их вскрывали, извлекали головной мозг и отбирали пробы крови/трупной жидкости из полостей сердца либо грудной/брюшной полостей. Затем отделяли сыворотку крови, наносили соответствующую маркировку на упаковку. До исследования пробы хранили при минус 20ºС (табл. 54).

Таблица 54 – Происхождение отобранных проб сывороток крови и головного мозга по видам животных и регионам

Страна или регион	Вид животного	Количество проб	
		Головной мозг	Сыворотка крови
Ленинградская обл.	волк	1	1
	енотовидная собака	2	2
	лисица	27	26
	норка	1	1
Итого по региону	4 вида	31	30
Р. Карелия	волк	3	2
	лисица	25	18
	норка	16	16
	собака бродячая	10	8
Итого по региону	4 вида	54	44
Мурманская обл.	куница	6	6
	лисица	18	18
	норка	13	13
	песец	6	6
	росомаха	2	2
	хорь	5	4
Итого по региону	6 видов	50	49
Всего	**9 видов**	**135**	**123**

Пробы головного мозга исследовали в прямом варианте РИФ, биопробе на мышах и вирусовыделении в культуре клеток MNA. Все исследованные на бешенство пробы показали отрицательный результат. Сыворотки крови исследовали в РН в культуре клеток ВНК-21. В ходе исследований было выявлено 6 положительных проб сывороток крови, в которых уровень ВНА антирабических антител составил 0,5-1,0 МЕ/мл, в остальных 129 пробах уровень антител составил <0,5 МЕ/мл, что свидетельствует об отрицательном результате.

Всего в период с 2001 по 2006 г. было собрано и исследовано 156 проб головного мозга и 129 проб крови/трупной жидкости. При исследовании данных проб установлен отрицательный диагноз, что подтверждает благополучие данных регионов по бешенству и отсутствие реверсии используемых живых аттенуированных вакцинных штаммов «РВ-97» и «SAD B19».

В 6 из 129 собранных и исследованных проб сывороток крови были обнаружены антирабические вируснейтрализующие антитела с уровнем ≥0,5 МЕ/мл.

Географическое происхождение проб сывороток крови, содержащих антирабические ВНА, представлено на рисунке 67.

Рисунок 67 – Происхождение проб сывороток крови, содержащих антирабические ВНА. Карта подготовлена с использованием пакета программ ArcGIS.

В 2008 г. работы по мониторингу иммуногенности оральных антирабических вакцин были продолжены. В результате лабораторного исследования сывороток крови от диких плотоядных животных, отстрелянных в период с ноября по декабрь 2007 г. и в феврале 2008 г. в районах Ленинградской обл., животных с защитным уровнем антител выявлено не было. Из 6 образцов сывороток, полученных из Республики Карелия, в двух были выявлены защитные уровни ВНА, что составило 33,33% от исследованных.

Для проведения вакцинации в 2009 г. использовалась вакцина «ОРАЛРАБИВАК» ОАО «ПЗБ» (г. Покров). Результаты мониторинга, проведенного в зоне вакцинации в 2009 г. (пробы отобраны в осенний период 2008 г. и в зимний период 2009 г.), представлены в таблице 55.

Таблица 55 – Результаты исследования в РИФ проб головного мозга, отобранных в зоне вакцинации в 2009 г.

Регион	**Вид животного**	**Всего проб**	**Результаты исследования**	
			+	-
Ленинградская обл.	волк	12	0	12
	лисица	12	0	12
	енотовидная собака	13	5	8
Итого		37	5	32
Республика Карелия	волк	12	0	12
	лисица	5	0	5
	рысь	1	0	1
	барсук	2	0	2
	собака	1	0	1
	кошка	1	0	1
Итого		22	0	22
Всего		**59**	**5**	**54**

В 2009 г. в ходе проведения мониторинга по бешенству было выявлено 5 случаев заболевания енотовидных собак в Ленинградской обл. (рис. 68).

Рисунок 68 – Географическая локализация выявленных случаев бешенства среди диких животных в Ленинградской области в 2009 г.

Четыре случая в Лужском районе и 1 случай в Бокситогорском районе. Выявленные случаи регистрировались в районах, граничащих с неблагополучной по бешенству Новгородской обл. В связи с этим одной из предполагаемых причин заноса бешенства на территорию ранее благополучной по этому заболеванию Ленинградской обл. можно считать миграцию животных из соседнего региона.

Оценка эффективности оральной вакцинации в Ленинградской обл. и Республике Карелия в 2009 г. проводилась на основе определения уровней антирабических ВНА в реакции нейтрализации в культуре клеток (модификация RFFIT). Установлено, что Республике Карелия количество положительных проб (≥0,5 МЕ/мл) составило 80%, в Ленинградской обл. – 48,8%.

Результаты оценки эффективности проведения оральной вакцинации диких животных (лисиц и енотовидных собак) против бешенства в Республике Карелия в 2010 г. путем исследования трех видов проб (головной мозг, костная ткань, кровь/трупная жидкость) представлены в таблице 56. Среди отстрелянных животных больных бешенством в Республике Карелия выявлено не было. При этом количество серопозитивных животных в разные сезоны колебалось в районе 50-60%.

Таблица 56 – Результаты оценки эффективности антирабической иммунизации диких животных и поедаемости оральной вакцины в Республике Карелия в 2010 г.

Дата отстрела	**Вид исследований**	**Пробы**	
		количество	**из них положительных (%)**
ноябрь 2009 г. – март 2010 г.	диагностика бешенства	29	0 (0%)
	тетрациклин (поедаемость)	24	7 (29,2%)
	уровень антител	34	21 (61,8%)
апрель – октябрь 2010 г.	диагностика бешенства	8	0 (0%)
	тетрациклин (поедаемость)	6	0 (0%)
	уровень антител	6	3 (50%)

Результаты исследований проб из Республики Карелия и Ленинградской обл. в 2011 г. представлены в таблице 57.

Таблица 57 – Результаты мониторинга бешенства и эффективности антирабической вакцинации в Ленинградской обл. и Республика Карелия в 2011 г.

Регион	Вид исследований	Вид животных	Количество проб	Из них положительных	% положительных проб
Республика Карелия	Диагностика бешенства	лисица	1	0	0
		волк	16	0	0
		хорек	1	0	0
		#собака	2	0	0
		Всего	**20**	**0**	**0**
	Тетрациклин (поедаемость)	лисица	1	0	0
		волк	16	6	37,5
		хорек	1	0	0
		Всего	**18**	**6**	**33,3**
	Уровень антител	лисица	1	0	0
		волк	18	12	66,7
		хорек	1	1	100
		Всего	**20**	**13**	**65**
Ленинградская обл.	Диагностика бешенства	лисица	28	0	0
		волк	11	0	0
		енотовидная собака	10	0	0
		#собака	6	0	0
		куница	1	0	0
		Всего	**56**	**0**	**0**
	Тетрациклин (поедаемость)	лисица	26	8	30,8
		волк	11	3	27,3
		енотовидная собака	9	2	22,2
		#собака	6	0	0
		куница	1	0	0
		Всего	**53**	**14**	**26,4**
	Уровень антител	лисица	25	4	16
		волк	1	1	100
		енотовидная собака	8	0	0
		Всего	**34**	**5**	**14,7**

#Пробы от бродячих/бездомных собак.

Пробы для проведения мониторинга отбирались от различных видов диких животных, приоритет при этом отдавался основным потенциальным переносчикам бешенства: лисицам, енотовидным собакам, волкам. В ряде

случаев отбирали пробы от хорьков и куниц, главным образом с целью мониторинга бешенства среди этих видов животных.

Положительных по бешенству проб выявлено не было ни в Республике Карелия, ни в Ленинградской обл. Процент проб ткани зубов, содержащих скопления тетрациклина, составил соответственно 33,3% и 26,4%. Процент проб сывороток крови, содержащих защитный уровень антирабических ВНА (≥0,5 МЕ/мл), составил соответственно 65% и 14,7%.

Результаты исследований проб из зоны оральной антирабической вакцинации в 2012 г. представлены в таблице 58.

Таблица 58 – Результаты мониторинга бешенства и эффективности антирабической вакцинации животных в Ленинградской обл. и Республике Карелия

Регион	Вид исследования	Количество проб	Из них положительных (%)
Республика Карелия	диагностика бешенства	54	0 (0%)
	тетрациклин (поедаемость)	30	4 (13,3%)
	уровень антител	28	19 (67,9%)
Ленинградская обл.	диагностика бешенства	94	0 (0%)
	тетрациклин (поедаемость)	94	17 (18,1%)

Как видно из таблицы 58, среди проб, поступивших из Республики Карелия и Ленинградской обл., положительных по бешенству выявлено не было. Процент проб крови с уровнем антирабических вируснейтрализующих антител ≥0,5 МЕ/мл из Республика Карелия, составил 67,9%. В 2013 г. было проведено исследование 27 проб головного мозга, поступивших из Республики Карелия и 24 пробы – из Ленинградской обл. Положительных по бешенству проб выявлено не было.

В результате сотрудничества между Россией и Финляндией, при участии двух референтных лабораторий МЭБ по бешенству из Франции (Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'Alimentation, de l'Environnement et du Travail (Anses) Laboratoire de la faune sauvage de Nancy Domaine de Pixérécourt) и

Германии (Institute of Molecular Virology and Cell Biology, Friedrich-Loeffler Institut, Federal Research Institute for Animal Health Südufer), были адаптированы и внедрены в практику лабораторной и научно-исследовательской работы ФГБУ «ВНИИЗЖ» современные методы лабораторной диагностики бешенства и оценки иммуногенности и поедаемости оральных антирабических вакцин, в том числе:

- ОТ-ПЦР для диагностики бешенства с последующим секвенированием ПЦР-продуктов, пригодных для проведения филогенетического анализа и изучения антигенных характеристик по предсказанным нуклеотидным последовательностям;
- ПЦР-РВ для диагностики бешенства и дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов;
- выделение ВБ в культуре клеток MNA/N2a для диагностики бешенства, освежения коллекционных изолятов и подготовки их к длительному хранению;
- три варианта РН в культуре клеток для оценки уровня поствакцинального иммунитета;
- методика выявления скоплений антибиотиков тетрациклинового ряда в тканях костей и зубов флуоресцентным методом для оценки поедаемости оральных антирабических вакцин.

Данные методы включены в схему лабораторной диагностики бешенства, разработанной в рамках данной работы.

В ходе российско-финского сотрудничества с целью изучения молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов, было проведено исследование в общей сложности 220 проб головного мозга, полученных от больных бешенством животных из 17 регионах РФ, а также 6 архивных изолятов, полученных входе эпизоотии бешенства в Финляндии в 1988-1989 гг. и в 2003 г. (импортированный случай), 5 архивных изолятов из Эстонии, полученных в этой стране в 1991 г., а также лабораторных и вакцинных аттенуированных штаммов «CVS», «SAD B19», «РВ-97», «ВНИИЗЖ» и «Овечий».

Проведенные филогенетические исследования показали существование двух основных филогенетических групп изолятов ВБ, циркулирующих на территории России. Также было проведено предварительное изучение филогенетического родства полевых изолятов и вакцинных штаммов (рис. 69).

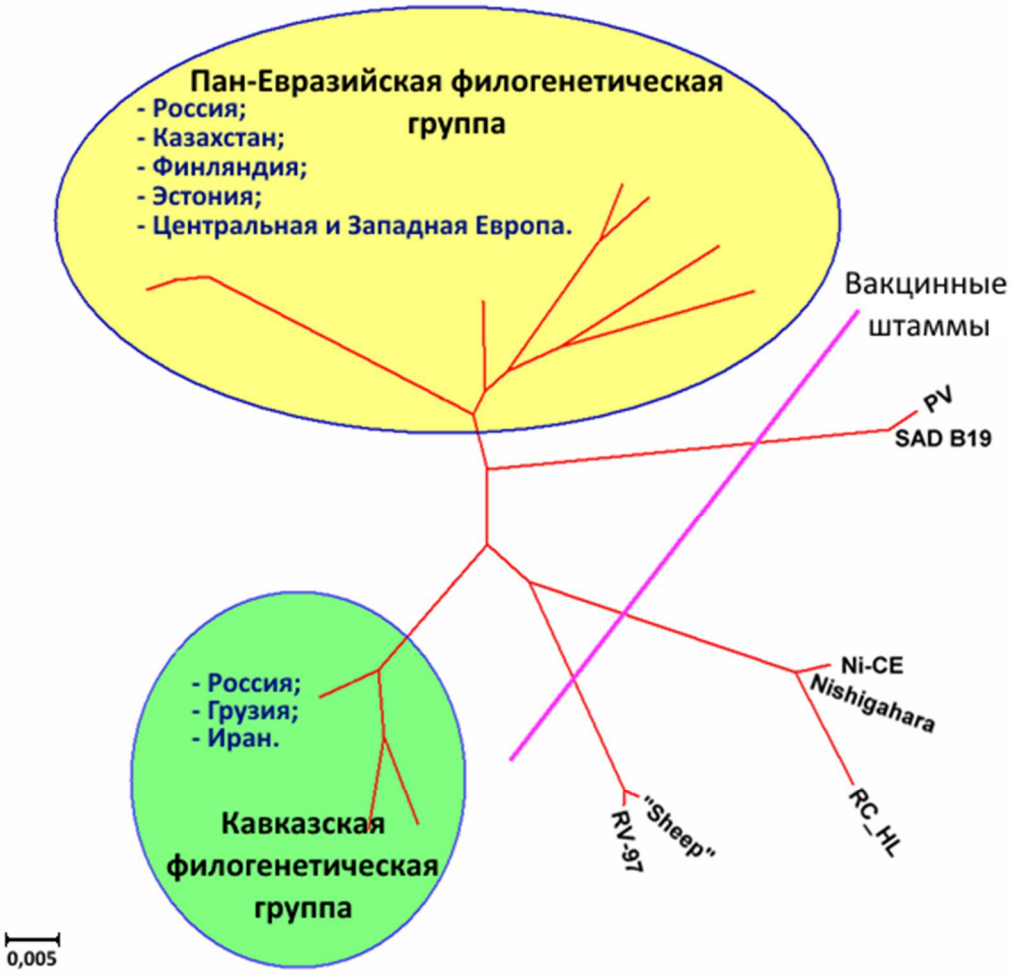


Рисунок 69 – Филогенетическое родство полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ на основе анализа фрагментов нуклеотидных последовательностей гена нуклеопротеина. Референтные последовательности взяты из Kuzmin et al., 2004; Bourhy et al., 1999; Nadin-Davis et al., 2003; Ito et al., 2001; Tordo et al., 1986; Conzelmann et al., 1990.

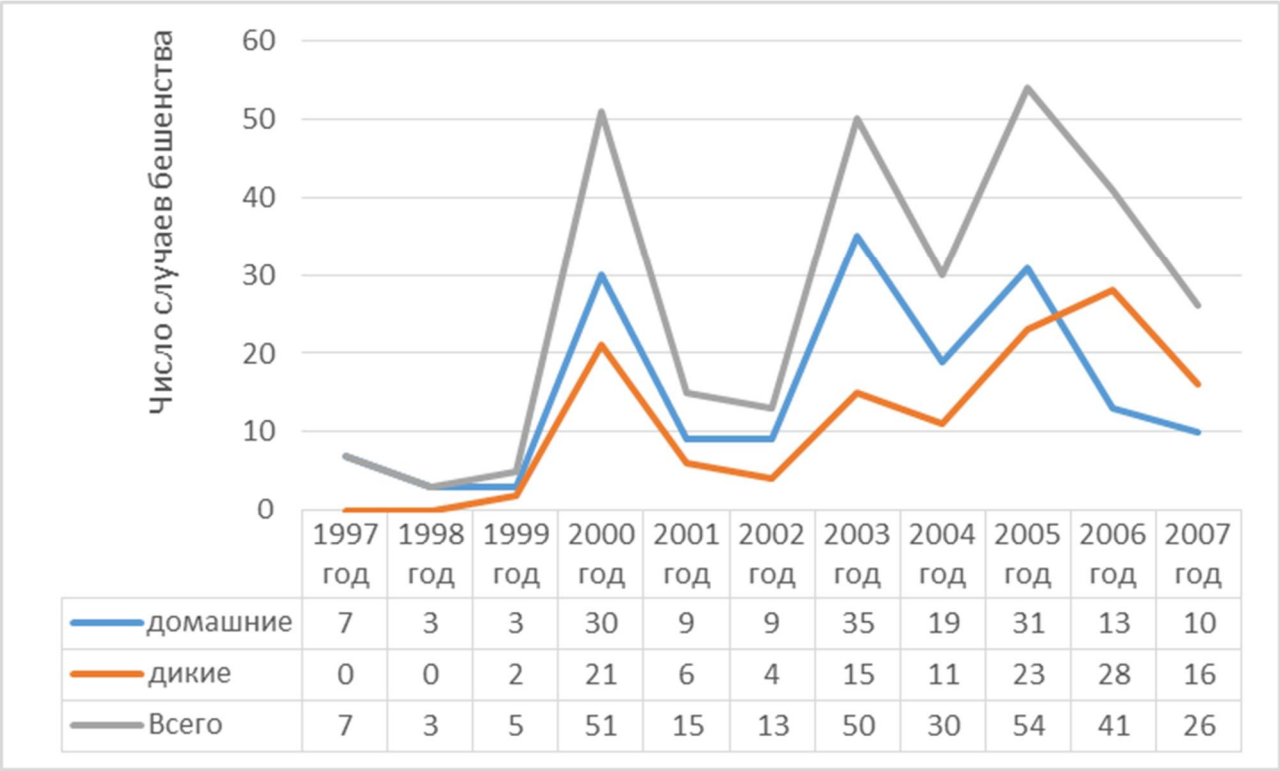
Результаты изучения антигенных и генетических характеристик полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства, полученные в ходе данной работы (в расширенном варианте) представлены в разделе 3.2.2, при этом случае заболевания животных, вызванных вакцинными штаммами ВБ выявлено не было.

3.2.3.2 Результаты сотрудничества России со странами ЕС по искоренению бешенства в Калининградской области

На основании решения Европейской Комиссии 2006/875/ЕС начиная с 2007 г. в рамках сотрудничества Россия – страны ЕС осуществлялась международная программа по оздоровлению Калининградской обл. от бешенства. Основной упор при выполнении этой программы делался на оральную вакцинацию диких плотоядных животных с использованием отечественных оральных вакцин.

Целью работы было планирование мероприятий, обучение сотрудников ветеринарной службы региона правилам проведения вакцинации и отбора проб для оценки ее эффективности, а также проведение мониторинга эффективности профилактических антирабических мероприятий среди диких животных на территории Калининградской обл.

Анализ эпизоотологических данных по случаям бешенства в Калининградской обл. указывал на длительное неблагополучие данного региона по бешенству (рис. 70).

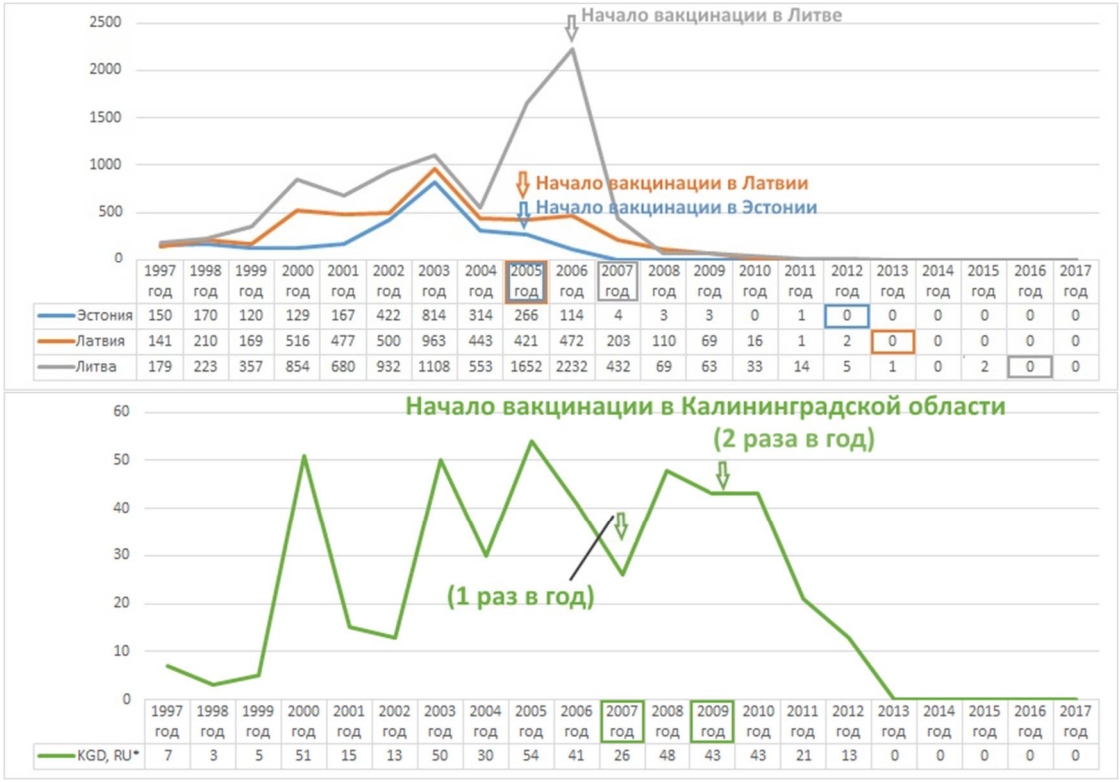


	1997 год	1998 год	1999 год	2000 год	2001 год	2002 год	2003 год	2004 год	2005 год	2006 год	2007 год
домашние	7	3	3	30	9	9	35	19	31	13	10
дикие	0	0	2	21	6	4	15	11	23	28	16
Всего	7	3	5	51	15	13	50	30	54	41	26

Рисунок 70 – Динамика изменения числа случаев бешенства животных в Калиниградской обл. за период с 1997 по 2007 г.

При анализе эпизоотологических данных установлено, что в период с 1997 по 2004 г. число случаев бешенства у домашних животных превышало таковое у диких животных, однако ситуация изменилась в 2005 г. Начиная с 2005 г. и по 2007 г. в регионе отмечалось больше число случаев бешенства среди диких животных. Ранее проводилась оценка поедаемости и иммуногенности используемой в этой области оральной антирабической вакцины (Сухарьков, 2014; Чернышова, 2018).

Несмотря на то, что изучение поедаемости оральных антирабических вакцин, оценка уровней антирабических ВНА и мониторинг бешенства в зоне вакцинации являются весьма информативными методами оценки эффективности проводимых мероприятий, наиболее важным показателем является снижение числа случаев бешенства в регионе в целом. Для проведения сравнительного анализа нами были собраны данные об эпизоотологической обстановке по бешенству в Калининградской обл., Эстонии, Латвии и Литве за последние 20 лет (рис. 71).



	1997 год	1998 год	1999 год	2000 год	2001 год	2002 год	2003 год	2004 год	2005 год	2006 год	2007 год	2008 год	2009 год	2010 год	2011 год	2012 год	2013 год	2014 год	2015 год	2016 год	2017 год
Эстония	150	170	120	129	167	422	814	314	266	114	4	3	3	0	1	0	0	0	0	0	0
Латвия	141	210	169	516	477	500	963	443	421	472	203	110	69	16	1	2	0	0	0	0	0
Литва	179	223	357	854	680	932	1108	553	1652	2232	432	69	63	33	14	5	1	0	2	0	0

	1997 год	1998 год	1999 год	2000 год	2001 год	2002 год	2003 год	2004 год	2005 год	2006 год	2007 год	2008 год	2009 год	2010 год	2011 год	2012 год	2013 год	2014 год	2015 год	2016 год	2017 год
KGD, RU*	7	3	5	51	15	13	50	30	54	41	26	48	43	43	21	13	0	0	0	0	0

Рисунок 71 – Динамика изменения числа случаев бешенства в 1997-2017 гг. в Эстонии, Латвии, Литве и Калининградской обл. под влиянием проведения оральной вакцинации диких животных. *KGD, RU – Калининградская обл., Россия.

Из данных, представленных на рисунке 71, следует, что применение оральной антирабической вакцины на территории Калининградской обл. после некоторого роста, связанного с проведением активного мониторинга и выявлением реального количества больных животных, привело к снижению числа случаев бешенства в регионе. При этом двукратное применение вакцины имело более очевидный эффект. Полученные результаты согласуются с результатами, достигнутыми в Эстонии, Латвии и Литве, которые, как и Калининградская обл., в настоящее время благополучны по бешенству.

В результате выполнения программы Россия – страны ЕС впервые в РФ был освоен метод авиационного распространения вакцинных приманок с применением GIS-технологий для контроля их распространения, освоены методы мониторинга эффективности антирабических мероприятий и достигнуто стойкое благополучие по бешенству в Калининградской обл.

3.2.3.3 Результаты сотрудничества с Эфиопией по внедрению метода культивирования вируса бешенства в культуре клеток для производства антирабической вакцины

Большинство стран Африканского континента имеют стойкое неблагополучие по бешенству. Эфиопия не является исключением. В связи с обращением этой страны с просьбой о содействии в борьбе с бешенством, Эфиопии была оказана научно-техническая помощь. Работа проводилась под руководством Минздрава РФ в рамках Братиславских соглашений президентов РФ и США (прил. 20 и 21).

В Эфиопии производством антирабической вакцины для медицинских и ветеринарных целей занимается Эфиопский институт здравоохранение (EPHI). На момент проведения научно-исследовательской работы производимая в этой организации вакцина представляла собой тканевой препарат (процеженную через марлю суспензию), приготовленный из головного мозга овец, зараженных аттенуированным штаммом ВБ «Eth_PV». Молекулярно-биологические и

антигенные свойства, а также филогенетические связи данного штамма были также изучены нами и представлены в разделе 3.2.2.4.

Определение остаточной вирулентности инактивированной антирабической тканевой фенолвакцины. Остаточная вирулентность тканевой фенолвакцины исследовалась в ФГБУ «ВНИИЗЖ» путем ее интрацеребрального введения белым мышам без предварительного разведения. Опыт проводили с использованием 2 групп животных: опытной и контрольной, по 5 голов в каждой. Животным опытной группы вводили интрацеребрально вакцину в объеме 0,03 мл, животным контрольной группы – культуральную среду Игла в том же объеме. Установлена гибель мышей от бешенства на 5-7 сут после интрацеребральной инокуляции, при этом животные контрольной группы оставались здоровы. Перед гибелью у мышей опытной группы отмечали признаки параличей и нарушение координации движений. Специфичность гибели также была подтверждена посредством исследования проб головного мозга погибших мышей в РИФ (рис. 72).

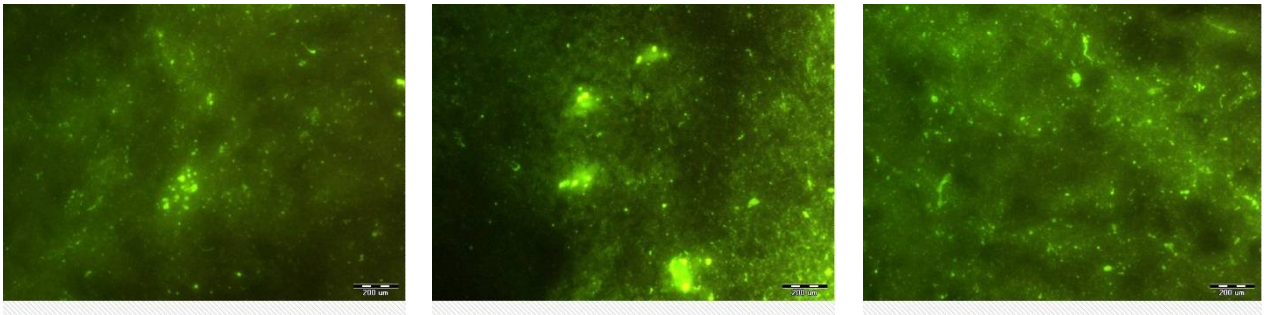


Рисунок 72 – Микрофотографии, полученные при подтверждении специфичности гибели мышей от бешенства в результате введения им интрацеребрально антирабической фенолвакцины эфиопского производства.

Предварительный подбор параметров культивирования вируса в культуре клеток. Культуры клеток Vero и BHK-21 и штаммы «ERA» и «Eth_PV» использовались для отработки экспериментального производства инактивированной антирабической вакцины.

Для получения экспериментальной вакцины использовали рабочую расплодку вируса, которую, в свою очередь, получали из матровой расплодки.

Титр вируса определяли в монослое культуры клеток Vero с использованием 96-луночных микропланшетов (OIE Manual, 2017). Для

определения оптимальной дозы заражения и времени культивирования, культуру клеток заражали соответствующим разведением вируса и инкубировали при 37°С в атмосфере 5%-го CO_2 в течение 48, 72 и 96 ч. Затем монослой фиксировали 80% охлажденным ацетоном, отмывали фосфатно-буферным раствором. Результаты реакции визуализировались путем нанесения ФИТЦ-иммуноглобулина производства ФГБУ «ВНИИЗЖ» с экспозицией в течении 1 ч при 37°С и учитывались с использованием флуоресцентного микроскопа. $TCID_{50}$ вируса подсчитывали с использованием формулы Спермана-Кербера:

$$\log_{10}(epd) = -\left(x0 - \frac{d}{2} + d\sum\frac{ri}{ni}\right),$$

где *epd* – конечная точка разведения; *x0* – $\log_{10}$ самого низкого разведения, показавшего положительный результат во всех лунках; *d* – $\log_{10}$ шага разведения; *ni* – число повторностей; *ri* – число лунок, в которых отмечена специфическая флуоресценция.

Получение вирусной суспензии проводили с использованием роллерной технологии и одноразовых роллерных бутылей (Costar) объемом 3 литра, которые размещали в роллерных установках климатической камеры и инкубировали при 37°С, затем замораживали.

С целью подбора оптимальных параметров заражения культуры клеток Vero была проведена серия экспериментов с использованием штаммов «ERA» и «Eth_PV» для выявления наиболее предпочтительной множественности заражения и периода инкубации. Результаты данного эксперимента представлены в таблице 59.

Таблица 59 – Результаты титрования вирусной суспензии, при использовании различной множественности заражения и периодов инкубации

Множественность заражения (TCID/клетка)	Период инкубации (ч.)					
	48		72		96	
	ERA	Eth_PV	ERA	Eth_PV	ERA	Eth_PV
0,1	$10^{6,75}$	$10^{6,50}$	$10^{5,75}$	$10^{7,50}$	$10^{6,75}$	$10^{7,00}$
0,01	$10^{6,50}$	$10^{7,25}$	$10^{5,50}$	$10^{7,50}$	$10^{6,25}$	$10^{6,00}$
0,001	$10^{4,50}$	$10^{5,75}$	$10^{5,50}$	$10^{6,00}$	$10^{7,25}$	$10^{5,00}$

Из данных, представленных в таблице 59, следует, что наиболее высокие титры вируса были получены при множественности заражения 0,001 вирусных частиц на клетку с использованием штамма «ERA» при инкубации в течение 96 ч, с использованием штамма «Eth_PV» – при множественности заражения 0,01 и периоде инкубации 72 ч.

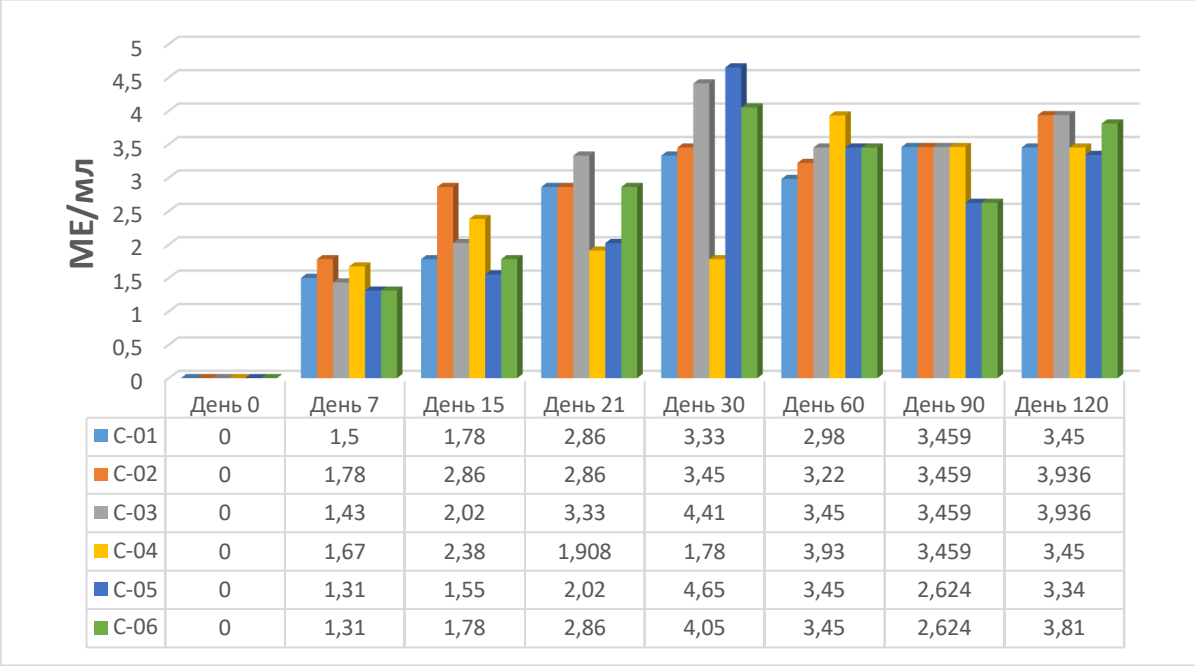
Оценка стерильности, безвредности и иммуногенности прототипа вакцины. Испытуемые препараты представляли собой очищенную фильтрацией и инактивированную формалином культуральную суспензию ВБ, полученную путем культивирования ВБ в культуре клеток Vero роллерным способом.

При проведении теста на стерильность с использованием тиогликолевой среды рост бактерий выявлен не был, что свидетельствует о стерильности тестируемой вирусной суспензии.

Оценку полноты инактивации и иммуногенности полученных препаратов проводили на лабораторных мышах. При оценке безопасности вирусного сырья все мыши выжили после интрацеребрального заражения с использованием трех различных разведений тестируемого вакцинного сырья после наблюдения в течение 21 сут.

Клиническое исследование прототипов вакцины проводилось на собаках. Все собаки, используемые в опыте, оказались серонегативными до вакцинации по результатам исследований, отобранных у них сывороток крови в РН в культуре клеток. На рисунках 73-75 представлена динамика изменения титров антител собак, вакцинированных испытуемыми прототипами вакцин.

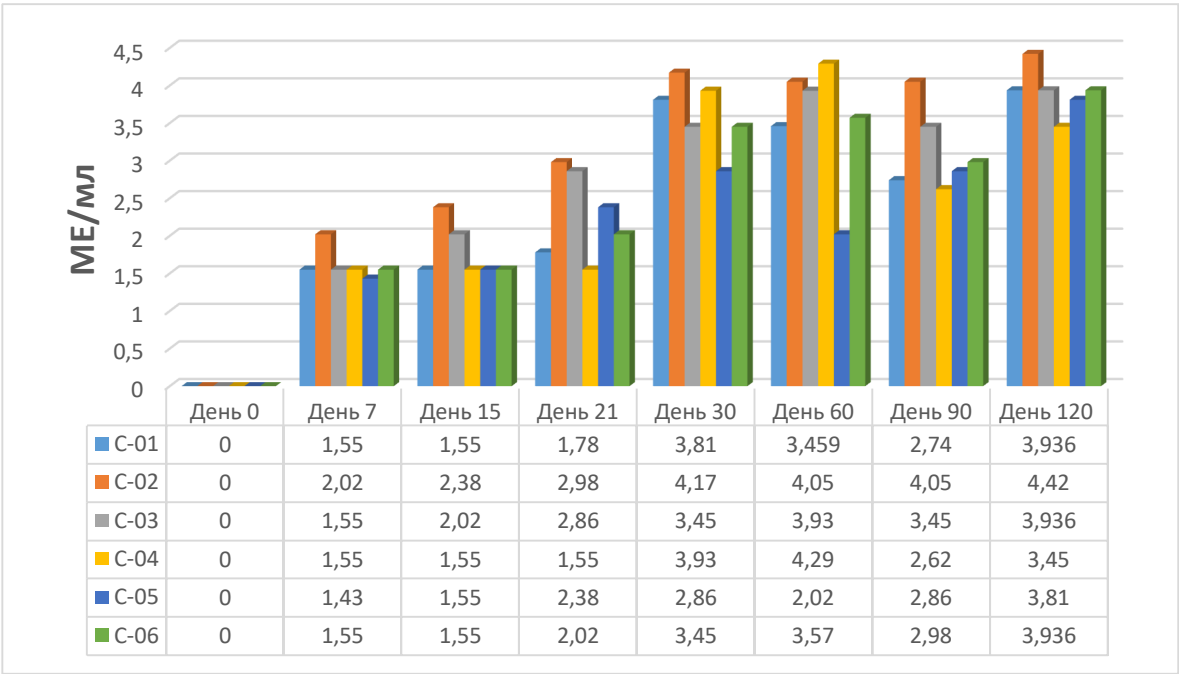
Из данных, представленных на рисунке 73, следует, что при иммунизации животных прототипами вакцины из штамма «ERA» на седьмые сут после иммунизации выработались достаточные для защиты от бешенства уровни антирабических антител, ≥0,5 МЕ/мл. На 30-е сут после иммунизации отмечались наиболее высокие уровни ВНА у большинства животных. Затем, на 60 сут после иммунизации, уровни ВНА несколько снизились и практически не менялись до 120-го дня после иммунизации (срок наблюдения).



	День 0	День 7	День 15	День 21	День 30	День 60	День 90	День 120
С-01	0	1,5	1,78	2,86	3,33	2,98	3,459	3,45
С-02	0	1,78	2,86	2,86	3,45	3,22	3,459	3,936
С-03	0	1,43	2,02	3,33	4,41	3,45	3,459	3,936
С-04	0	1,67	2,38	1,908	1,78	3,93	3,459	3,45
С-05	0	1,31	1,55	2,02	4,65	3,45	2,624	3,34
С-06	0	1,31	1,78	2,86	4,05	3,45	2,624	3,81

Рисунок 73 – Уровни антирабических ВНА в крови собак, иммунизированных прототипом вакцины на основе штамма «ERA».

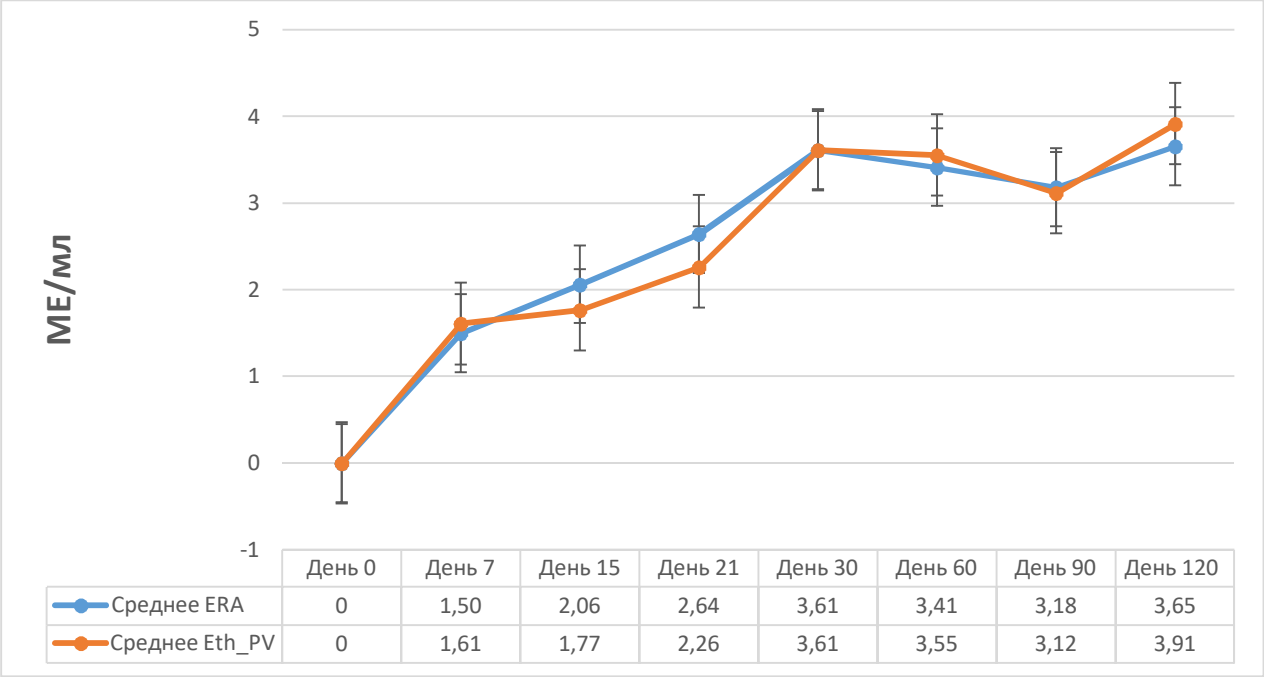
При иммунизации животных прототипами вакцины из штамма «Eth_PV» (рис. 74) на седьмые сут после иммунизации выработались достаточные для защиты от бешенства уровни антирабических антител, ≥0,5 МЕ/мл. При этом на 30-е сут после иммунизации эти показатели фактически вышли на плато, то есть существенно не менялись на всем протяжении эксперимента.



	День 0	День 7	День 15	День 21	День 30	День 60	День 90	День 120
С-01	0	1,55	1,55	1,78	3,81	3,459	2,74	3,936
С-02	0	2,02	2,38	2,98	4,17	4,05	4,05	4,42
С-03	0	1,55	2,02	2,86	3,45	3,93	3,45	3,936
С-04	0	1,55	1,55	1,55	3,93	4,29	2,62	3,45
С-05	0	1,43	1,55	2,38	2,86	2,02	2,86	3,81
С-06	0	1,55	1,55	2,02	3,45	3,57	2,98	3,936

Рисунок 74 – Уровни антирабических ВНА в крови собак, иммунизированных прототипом вакцины на основе штамма «Eth_PV».

Динамика изменения уровней антител при этом оказалась сходной и лучше прослеживается при анализе средних уровней (рис. 75).



	День 0	День 7	День 15	День 21	День 30	День 60	День 90	День 120
Среднее ERA	0	1,50	2,06	2,64	3,61	3,41	3,18	3,65
Среднее Eth_PV	0	1,61	1,77	2,26	3,61	3,55	3,12	3,91

Рисунок 75 – Динамика изменения средних уровней антирабических ВНА в крови собак, иммунизированных прототипами вакцин на основе штаммов «ERA» и «Eth_PV» с указанием стандартной погрешности данных.

Динамика изменения средних значений уровней антител оказалась практически идентичной при испытании обоих прототипов вакцин, так как различия значений средних уровней антител двух испытуемых препаратов находятся в пределах стандартной погрешности данных.

В результате реализации данного международного проекта в Эфиопии была внедрена технология культивирования аттенуированных штаммов ВБ в культуре клеток Vero роллерным способом и получен прототип культуральной антирабической инактивированной вакцины. Данный прототип вакцины в настоящее время проходит клинические испытания на животных.

Кроме того, в рамках данного сотрудничества подготовлен проект законодательной базы по бешенству, а также проекты стандартов операционных процедур, регулирующих основные процессы производства культуральной антирабической вакцины.

3.2.3.4 Подходы к разработке программ по борьбе и профилактике бешенства

С целью разработки методических рекомендаций по борьбе с бешенством животных проведен анализ нормативно-правовой базы по диагностике, профилактике и карантинным мероприятиям при заболевании животных бешенством за период с 1997 по 2009 г. по странам: Великобритания, Франция, Германия, Италия, Финляндия, США, Эфиопия, а также ее соответствия рекомендациям МЭБ. В результате были сформированы основные критерии для подготовки программы по борьбе с бешенством.

Программы по борьбе и профилактике бешенства должны быть научно обоснованы и включать следующие основные компоненты:

- нотификация заболевания на всей территории действия программы;
- постановка диагноза на бешенство только путем проведения лабораторных исследований в аттестованных для проведения таких исследований ветеринарных лабораториях с применением утвержденных в установленном порядке методов лабораторной диагностики;
- вакцинация и мониторинг бешенства и эффективности антирабической вакцинации в популяции диких и домашних животных;
- проведение информационно-разъяснительной работы с населением;
- определение источников финансирования;
- определение ответственных исполнителей, форм отчетности и пути контроля эффективности реализации программных мероприятий.

Для определения статуса территории по бешенству минимальной единицей должен признаваться административный район. При этом территория признается:

- **неблагополучной** по бешенству при возникновении случаев бешенства у животных, независимо от вида животного, а также у человека, если не удается подтвердить, что данный случай является импортированным;
- **благополучной** по бешенству, если последние два года на данной

территории не регистрировались случаи бешенства животных, независимо от вида животного, а также у человека, проводится мониторинг бешенства среди диких животных и бездомных собак и кошек (если таковые имеются), а также выполняются остальные положения разработанных методических рекомендаций, применимые для данной территории.

Мониторинг бешенства является неотъемлемой частью мероприятий по борьбе с данным заболеванием. Он должен проводиться на постоянной основе, независимо от статуса территории по бешенству и реализации на территории региона программ по «гуманному» обращению с животными. С целью проведения мониторинга отбирают пробы головного мозга бездомных собак и кошек, отловленных и подлежащих уничтожению, а также пробы головного мозга животных, погибших в карантине, проявивших признаки бешенства при клиническом осмотре или немотивированную агрессию в отношении человека и умерщвленные по этой причине.

Обязательному исследованию на бешенство подлежат пробы головного мозга, полученные от диких плотоядных животных любых видов, отловленных и умерщвленных в установленном порядке, независимо от проявления клинических признаков и статуса территории по бешенству, а также от рукокрылых, обнаруженных в жилых и нежилых помещениях или в непосредственной близости от них погибшими, больными (ослабленные, не способные летать животные) или рукокрылых, контактировавших с человеком, независимо от наличия покусов, и мелких мышевидных млекопитающих (в том числе грызунов) любых видов, нанесших покусы человеку или домашним животным.

Мониторинг бешенства в природной среде также должен проводиться на постоянной основе, независимо от статуса региона по бешенству, а также реализации на данной территории любых программ по охране природы.

Для проведения мониторинга определяют 1-2 индикаторных вида животных семейства собачьих, имеющих относительно высокую плотность популяции (более 0,5 голов на 1 км^2) на территории, подлежащей мониторингу,

имеющих наибольшую инцидентность бешенства (если территория неблагополучна по бешенству) по результатам предыдущего мониторинга или ранее полученных статистических данных. При включении в мониторинг более одного индикаторного вида в дальнейших подсчетах допускается использовать совокупную плотность популяции животных. В большинстве регионов России индикаторными видами являются лисицы и енотовидные собаки. В некоторых регионах в качестве индикаторных видов могут рассматриваться шакалы, корсаки, песцы, реже волки и другие виды животных.

Для мониторинга необходимо ежегодно проводить отстрел и исследовать пробы, отобранные не менее чем от 4 голов диких животных на 100 км^2 среды обитания. В этот норматив можно включать также пробы, полученные от диких животных любых других видов, относящихся к семейству собачьих, при следующих условиях:

- животные добыты охотниками;
- животные обнаружены мертвыми (в том числе погибшими на дорогах);
- животные контактировали с человеком или домашними животными;
- животные проявили агрессию и умерщвленные по этой причине.

Пробы головного мозга подлежат исследованию на бешенство, а результаты включают в общую статистику лабораторных исследований по региону.

Мероприятия по профилактике бешенства животных в хозяйствах различной формы собственности. В животноводческих хозяйствах закрытого типа (животноводческие комплексы различного профиля, не практикующие пастбищное содержание животных) животные не подлежат антирабической вакцинации, независимо от вида, пола, возраста и направления продуктивности или использования. На территории хозяйства не допускается нахождение домашних или бездомных собак и кошек, а также любых других животных, не относящихся к профилю деятельности предприятия или ему не принадлежащих. Ограждение территории хозяйства должно обеспечивать невозможность

проникновения на его территорию диких или домашних животных любых видов, а также посторонних лиц.

Иммунизация против бешенства животных в хозяйстве, практикующем пастбищное содержание животных, не производится в случае, если в 50- километровой зоне вокруг района, на территории которого располагаются хозяйство и пастбище:

- последние 2 года не регистрировались случаи бешенства животных (независимо от вида животных);
- проводится ежегодная плановая антирабическая иммунизация собак;
- применяются меры по изъятию из среды обитания бездомных собак и кошек;
- служебные собаки хозяйства и домашние собаки, принадлежащие пастухам, привиты против бешенства;
- ежегодно проводится мониторинг бешенства среди диких и бездомных животных.

Необходимо проводить мониторинг эффективности антирабической вакцинации животных хозяйства не менее чем для 5% поголовья в год, а в случае выявления среди исследованного поголовья более 20% серонегативных животных необходимо сообщать территориальному управлению Россельхознадзора и руководителю государственной ветеринарной службы региона для проведения расследования.

Все служебные и охотничьи собаки, а также все собаки, содержащиеся в питомниках, подлежат обязательной антирабической вакцинации в установленном порядке, вне зависимости от породы, профиля и интенсивности их использования. Служебные собаки допускаются к работе только при наличии свидетельства о регистрации собаки, паспорта профилактической вакцинации животного с обязательным соблюдением календаря вакцинации против бешенства в соответствии с инструкцией по применению антирабической вакцины. Рекомендуется также иметь сертификат о содержании в крови животного достаточного уровня антирабических ВНА. Собаки, используемые для травления диких животных (по причине непосредственного контакта,

сопряженного с повышенным риском нанесения покусов), подлежат ежегодной антирабической вакцинации. Первая вакцинация должна быть проведена как минимум за месяц до начала использования собаки в охотничьих целях.

Животные, содержащиеся в зверохозяйствах, антирабической иммунизации не подлежат. Ограждение зверохозяйства должно исключать проникновение его на территорию любых видов диких и домашних животных, а также посторонних лиц. На территории зверохозяйства не допускается содержание домашних собак и кошек, кроме случаев их содержания и использования в служебных целях.

Мероприятия в популяции бездомных плотоядных животных. Бездомными следует признавать животных, находящихся на улице без присмотра хозяина вне зависимости от наличия ошейника и других признаков наличия у животного хозяина. Обнаруженные бездомные животные подлежат немедленному отлову и отправке на пункт временной передержки для осмотра и идентификации. В случае наличия на ошейнике идентификационного номера или вживленного микрочипа о поступлении животного на пункт передержки сообщают хозяину животного, который должен забрать его в течение 24 ч, оплатить стоимость отлова, транспортировки и содержания животного. В случае невозможности идентификации животного, а также при невозможности связаться с хозяином идентифицированного животного, его направляют на карантин сроком не менее 14 сут. По окончании карантина животных, не проявивших клинических признаков бешенства, после профилактической иммунизации, направляют в питомники для бездомных животных или умерщвляют гуманным способом.

В случае установления при первичном осмотре или проявления клинических признаков бешенства на карантине животное подлежит немедленному умерщвлению. Пробы головного мозга от таких животных в обязательном порядке направляют в соответствующую лабораторию для проведения исследований на бешенство.

Освобождать ранее отловленных бездомных животных, независимо от

результатов клинического обследования, карантина, вакцинации и действия различных региональных программ по гуманному обращению с животными запрещается. Разрешается передавать отловленных бездомных животных, в питомники или новым хозяевам после проведения антирабической иммунизации и карантинирования в течение 6 месяцев.

Мероприятия в цирках, зоопарках, зоосадах. Иммунизации против бешенства в обязательном порядке подлежат все виды животных семейства собачьих, поступающие в зоопарки, цирки, зоосады и другие аналогичные учреждения. Иммунизация проводится регулярно. Вновь поступающие животные семейств собачьи, кошачьи, вивверовые, куньи, а также летучие мыши перед высвобождением в общий вольер подлежат карантинированию в изолированном помещении не менее 45 сут.

Все остальные виды животных, поступающие в учреждения, обязательной антирабической иммунизации не подлежат. Их иммунизация может проводиться по желанию собственника.

Мероприятия по профилактике бешенства животных в городской среде. Сельскохозяйственные животные всех видов, содержащиеся в городских условиях и принадлежащие частным владельцам, подлежат обязательной антирабической иммунизации только в случае регистрации в городе бешенства.

Сельскохозяйственные животные всех видов, содержащиеся в городских условиях, принадлежащие предприятиям различных форм собственности и различного профиля, не практикующих пастбищное содержание животных, антирабической вакцинации не подлежат.

Мероприятия по профилактике бешенства животных в природной среде. Проведению любых мероприятий по профилактике бешенства в природной среде должны предшествовать мероприятия по мониторингу бешенства на данной территории.

Для профилактики бешенства в природной среде традиционно применяются два метода: ограничение численности популяции основных видов – переносчиков бешенства, их оральная антирабическая вакцинация, а также

различные варианты комбинированного применения этих методов. Под ограничением численности популяции традиционно понимают отлов, отстрел, травлению животных – переносчиков бешенства, главным образом представителей семейства собачьих различных видов, имеющих высокую (более 0,7 голов на км^2) плотность популяции на данной территории. Тем не менее традиционные взгляды по данному вопросу подлежат пересмотру в связи с появлением антифертильных препаратов, влияющих на интенсивность размножения целевой группы видов животных. Любое искусственное ограничение численности животных приводит к интенсификации их миграции с других территорий. Кроме того, целевая популяция быстро компенсирует численность путем увеличения рождаемости.

Оральная антирабическая вакцинация диких плотоядных животных показала свою высокую эффективность во многих европейских странах, большинство из которых полностью искоренили бешенство только благодаря применению оральных антирабических вакцин (Швейцария, Финляндия, Франция, Германия и др.). Добиться успеха в борьбе и профилактике бешенства диких животных можно только при четком выполнении базовых принципов оральной антирабической иммунизации.

- *Широкомасштабность* – чем больше площадь территории, на которой проводится оральная иммунизация, тем быстрее будет достигнут желаемый эффект. Минимальная площадь зоны оральной антирабической иммунизации должна составлять не менее 5000 км^2, ширина (при создании буферных зон) не менее 50 км.
- *Долговременность* – минимальная продолжительность реализации кампании по оральной вакцинации (не менее двух раз в год, весной и осенью) составляет 6 лет + 2 года после регистрации последнего случая бешенства на территории зоны проведения оральной иммунизации.
- *Научно-обоснованное планирование* – планирование оральной иммунизации должно проводиться совместно представителями ветеринарной службы региона, территориального подразделения Россельхознадзора, егерей,

охотников и научно-исследовательских учреждений соответствующего профиля. Представители перечисленных служб совместно уточняют сроки проведения оральной иммунизации, пути надзора и мониторинга эффективности проводимых мероприятий, определяют конкретных исполнителей и источники финансирования.

При комбинировании методов регулирования численности целевой группы животных и их оральной вакцинации следует определиться с очередностью мероприятий. Нельзя проводить масштабный отстрел после проведения оральной иммунизации, так как это приведет к истреблению иммунных животных, миграции на территорию не иммунных животных с соседних регионов, которые, возможно, инфицированы бешенством. Такая ситуация приводит к снижению эффективности оральной иммунизации и несправедливой дискредитации данного мероприятия.

В регионах, на территории которых последние 2 года не регистрировались случаи бешенства (вне зависимости от вида животного), исключая импортированные случаи, и не граничащих с регионами, неблагополучными по бешенству (при условии проведения в этих регионах мониторинга бешенства на постоянной основе), оральная антирабическая вакцинация не проводится.

В регионах, граничащих с неблагополучными по бешенству регионами (на основании данных мониторинга бешенства в природной среде), необходимо организовывать буферную зону оральной антирабической иммунизации. Ширина буферной зоны должна составлять не менее 50 км, длина – на всем протяжении границы с неблагополучным регионом. Срок функционирования данной зоны устанавливается в зависимости от сроков достижения благополучия по бешенству граничащего региона.

Допускается регулирование численности диких плотоядных животных семейства собачьих при превышении плотности их популяции более 0,7 животных на 1 км^2. Мероприятия по регулированию численности диких животных проводятся до начала кампаний по оральной антирабической иммунизации.

Компоненты программы по борьбе и профилактике бешенства.

Программа по борьбе и профилактике бешенства должна включать:

- описание эпидемиологической ситуации по бешенству в регионе действия программы и граничащих регионах/странах;
- анализ действующих программ по борьбе и профилактике бешенства и других нормативно-правовых актов по бешенству, действующих в граничащих регионах;
- анализ оценочной стоимости, пользы и преимуществ осуществления программы;
- вероятную продолжительность осуществления программы и цели, которые должны быть достигнуты по завершении реализации программы;
- обозначение основной организации, ответственной за надзор и координацию, а также отделы, ответственные за выполнение программы;
- описание и определение географических и административных районов, на территории которых будет выполняться программа;
- система оповещения обо всех случаях, вызывающих подозрения о возникновении вспышек заболевания на определенной территории;
- процедуру контроля и в особенности правила передвижения животных, в том числе подозрительных или заболевших, а также процедуру инспектирования владений на данной территории;
- детальную информацию о районе, в котором будет выполняться программа, о его естественных границах, этот регион или регионы должны иметь площадь как минимум 5000 км^2 или охватывать полностью площадь государства включая приграничные территории;
- детальную информацию о вакцинах, которые предполагается использовать, описание системы распространения вакцины и дозировки;
- детальную информацию о стоимости и путях реализации схем по охране флоры и фауны, реализованных на территории, в которой выполняется программа по борьбе с бешенством;
- права и обязанности соответствующих организаций по контролю и

мониторингу эффективности реализации программы.

Мероприятия при выявлении заболевания животных бешенством в хозяйствах различной формы собственности. В животноводческих хозяйствах закрытого типа (животноводческие комплексы различного профиля, не практикующие пастбищное содержание животных) при возникновении подозрения на бешенство среди не вакцинированных животных, больных особей немедленно умерщвляют, исключая повреждение черепной коробки. Основными критериями для применения данного требования являются:

- недавний (не более 2 мес.) ввоз животных на территорию хозяйства из хозяйств, расположенных на территории, неблагополучной по бешенству;
- животные ранее не были вакцинированы против бешенства;
- неизвестно происхождение животного;
- имели место грубые нарушения ветеринарно-санитарного режима, в том числе появление на территории хозяйства животных, не принадлежащих хозяйству, независимо от вида, пола или возраста животного, а также посторонних лиц;
- имело место проникновение на территорию хозяйства (подозрение на проникновение) диких млекопитающих любых видов или бездомных собак или кошек;
- обнаружение в помещениях хозяйства летучих мышей любых видов;
- наличие следов покусов на теле животного;
- наличие характерных клинических признаков бешенства (слюнотечение, светобоязнь, симптомы поражения центральной нервной системы и др.);
- заболевание одного животного, небольшой группы животных или неодновременное заболевание нескольких животных.

Необходимо проводить дифференциальную диагностику бешенства от ГЭ КРС, листериоза, других острых инфекционных заболеваний, сопровождающихся признаками поражения центральной нервной системы и отравлений различной этиологии. Дифференциацию проводят путем изучения эпизоотологических данных, анамнеза, клинических проявлений болезни,

данных патологоанатомических изменений. Большинство острых инфекционных заболеваний, а также отравления, в отличие от бешенства, чаще всего проявляются сразу на большой группе животных.

После подтверждения диагноза на бешенство лабораторным путем всех животных, контактировавших с больным животным, изолируют в отдельное помещение на срок до 60 сут, либо немедленно направляют на убой, продукты убоя, кроме головы и позвоночника, используют без ограничений, голову и позвоночный столб животного уничтожают путем сжигания. Изолированные животные подлежат антирабической иммунизации. Молоко от этих животных используют после пастеризации или кипячения без ограничений.

На предприятие, в котором выявлены случаи бешенства, накладывается карантин. Во время карантина запрещается вывоз на продажу живых животных. Разрешается вывоз клинически здоровых животных на убой, продукты убоя могут использоваться без ограничений. Молоко используется после пастеризации или кипячения без ограничений.

Карантин с предприятия снимают через 2 мес. после регистрации последнего случая бешенства.

Ветеринарная служба предприятия обязана провести расследование для выявления путей заноса заболевания на территорию предприятия, путем изучения анамнестических данных, транспортной и другой документации, опроса персонала предприятия. В ряде случаев путь заноса заболевания может быть определен посредством изучения генетических характеристик изолятов ВБ, выделенных на территории предприятия, и сравнительного анализа этих характеристик с использованием международных баз данных EMBL/GeneBank. Указанные исследования проводят научно-исследовательские учреждения ветеринарного/биологического профиля или оснащенные соответствующим образом ветеринарные лаборатории.

При возникновении бешенства на территории предприятия все служебные собаки подлежат ревакцинации против бешенства, независимо от срока последней антирабической иммунизации. В случае возникновения бешенства

среди служебных собак предприятия, больные животные подлежат немедленному умерщвлению, пробы головного мозга направляют на диагностику бешенства. В случае подтверждения диагноза на бешенство все животные, контактировавшие с больным животным, подлежат немедленной ревакцинации против бешенства, независимо от сроков последней антирабической иммунизации, и карантинированию в течение не менее 30 сут, к работе такие животные не допускаются.

При возникновении бешенства в животноводческих хозяйствах, практикующих пастбищное содержание животных, проводят все мероприятия, описанные выше. Кроме того, все животные подлежат поголовной антирабической иммунизации. В случае возникновения подозрения о заражении животных бешенством посредством контакта с дикими животными необходимо провести оральную иммунизацию диких животных или проверить правильность проведения оральной иммунизации, если таковая проводится уже более 2 лет.

В случае возникновения бешенства среди собак, содержащихся в питомнике, больные животные подлежат немедленному умерщвлению, пробы головного мозга направляют на диагностику бешенства. В случае подтверждения диагноза все животные, контактировавшие с больными, подлежат немедленной ревакцинации против бешенства, независимо от сроков последней антирабической иммунизации, и карантинированию в течение не менее 45 сут. К работе такие животные не допускаются.

Бездомные животные, содержащиеся в питомнике (приюте), покусанные больным бешенством животным, подлежат немедленному умерщвлению. Животные, содержащиеся в питомниках с целью разведения, в случае покуса больным бешенством животным подлежат немедленному умерщвлению или полной изоляции в карантинном помещении в течение 6 мес. Животное освобождается из карантина по истечении установленного срока при отсутствии клинических признаков бешенства и после ревакцинации против бешенства.

При возникновении бешенства в зверохозяйстве больные животные, а также животные соседних клеток подлежат немедленному умерщвлению, пробы

головного мозга направляют на диагностику бешенства, тушки уничтожают путем сжигания. В случае подтверждения диагноза на бешенство на зверохозяйство накладывается карантин, запрещается вывоз животных за пределы зверохозяйства, ввоз новых животных на территорию зверохозяйства, а также любое перемещение животных внутри зверохозяйства и убой с целью получения шкурок. При возникновении бешенства на территории зверохозяйства все служебные собаки подлежат ревакцинации против бешенства, независимо от срока последней антирабической иммунизации. Карантин со зверохозяйства снимают через 2 мес. после регистрации последнего случая бешенства.

В случае выявления нескольких случаев бешенства животных в разных шедах, по согласованию с руководством хозяйства допускается убой всего поголовья зверохозяйства. Новые животные при этом завозятся только после проведения дезинфекции клеток и установления причины возникновения заболевания.

В случае возникновения бешенства у животных, принадлежащих частным владельцам, на населенный пункт накладывают карантин. Запрещается ввоз, вывоз, перегон животных, проведение выставок, ярмарок, соревнований среди животных. Собаки, кошки и хорьки, а также сельскохозяйственные животные, находящиеся в зоне карантина, подлежат обязательной антирабической иммунизации, независимо от пола, возраста и сроков последней антирабической иммунизации. Карантин с населенного пункта или местности снимают через 2 мес. после регистрации последнего случая бешенства. Животные, покусанные больным бешенством животным, подлежат немедленному умерщвлению или, по желанию хозяина, полной изоляции в карантинном помещении в течение 6 мес. Животное освобождается из карантина по истечении установленного срока при отсутствии клинических признаков бешенства и после ревакцинации против бешенства.

В случае возникновения бешенства в зоопарках, цирках, зоосадах больные животные подлежат немедленному умерщвлению. Пробы головного мозга от

таких животных отправляют для подтверждения диагноза лабораторным путем. После лабораторного подтверждения диагноза все животные, контактировавшие с заболевшим, подлежат немедленной антирабической вакцинации. К работе такие животные не допускаются. Кроме того, на зоопарк, цирк, зоосад накладывают карантин, который снимают через 2 мес. после регистрации последнего случая бешенства. Во время карантина посещение организации посетителями запрещается, животные к выступлениям и репетициям не допускаются.

В случае выявления на территории зоосада бешенства среди диких свободно живущих плотоядных проводится оральная вакцинация против бешенства.

Мероприятия при выявлении заболевания животных бешенством в городской среде. В случае возникновения подозрения на бешенство среди любых видов животных, содержащихся в городских условиях, в т.ч. принадлежащих частным владельцам, подозреваемых животных немедленно изолируют и проводят дополнительное клиническое обследование с целью дифференциации бешенства от других инфекционных и незаразных заболеваний. Животных с установленным клиническим диагнозом «бешенство» немедленно умерщвляют, отделяют голову и направляют ее для проведения лабораторных исследований. Труп животного уничтожают путем сжигания. При подтверждении диагноза на бешенство все животные, контактировавшие с больным, подлежат карантинированию в течение 45 сут и внеочередной антирабической иммунизации, независимо от сроков предыдущей вакцинации, вида, пола или возраста животного. Молоко от продуктивных животных, находящихся на карантине, может использоваться в пищу после пастеризации или кипячения. Допускается немедленно направлять на убой клинически здоровых животных. Продукты убоя, кроме головы и позвоночного столба, используют без ограничений, голову и позвоночный столб уничтожают путем сжигания.

На район или местность, в которой обнаружено бешенство

сельскохозяйственных животных, накладывают карантин, который снимают через 2 мес. после регистрации последнего случая бешенства. В зоне карантина проводят поголовную антирабическую иммунизацию сельскохозяйственных животных, собак и кошек. Допускается иммунизировать млекопитающих других видов по желанию хозяев.

Все бездомные животные в зоне карантина подлежат немедленному отлову. В случае невозможности идентификации животного, а также при невозможности связаться с хозяином, животных направляют на карантин сроком не менее 14 сут. По окончании карантина животных, не проявивших клинических признаков бешенства, после профилактической иммунизации направляют в питомники для бездомных животных или умерщвлению гуманным способом. В случае установления при первичном осмотре или проявлении на карантине клинических признаков бешенства, животное подлежит немедленному умерщвлению. Пробы патматериала в обязательном порядке направляют в соответствующую лабораторию для проведения лабораторных исследований на бешенство.

Мероприятия при выявлении заболевания животных бешенством в природной среде. При выявлении больных бешенством животных в природной среде местность объявляют неблагополучной по бешенству. Проводят внеочередную антирабическую иммунизацию сельскохозяйственных животных, находящихся в данной местности на выпасе, а также собак и кошек в близлежащих населенных пунктах. Проводят оральную антирабическую иммунизацию диких плотоядных животных. Информируют население о выявлении бешенства в природной среде, проводят подворный обход с целью выявления и предотвращения содержания диких животных в домашних условиях. Местность объявляется благополучной по бешенству, если в течение 2 лет случаев бешенства среди диких животных зарегистрировано не было и при условии проведения мониторинга бешенства в природной среде.

Используя сформулированные в данном разделе требования, а также результаты анализа законодательных баз ряда стран, требований

международного законодательства по бешенству, результаты исследований по иммуногенности антирабических вакцин и эффективности антирабических мероприятий, изложенные данной работе, а также в работах А.Ю. Сухарькова в 2014 г. и Е.В. Чернышовой в 2018 г., нами был разработан ряд документов рекомендательного характера, касающихся мероприятий по борьбе и профилактике бешенства:

- подготовлен проект «Методических рекомендаций по борьбе с бешенством» с приложениями: «Порядок содержания подозрительного животного, отбора, консервирования и пересылки патматериала для лабораторной диагностики заболевания животных бешенством», «Схема документального оформления карантинных мероприятий при бешенстве животных», «Методы лабораторной диагностики бешенства», «Клиническое обследование собак с целью диагностики бешенства», «Отчет по оральной вакцинации диких животных против бешенства» (прил. 22). Данный проект был передан в Министерство сельского хозяйства РФ для дальнейшего утверждения и использования в работе.
- Подготовлен и утвержден «Комплекс совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.», являющийся программой согласованных действий государств – участников СНГ по борьбе с этим заболеванием и содержит Дорожную карту по разработке и реализации национальной программы по борьбе с бешенством на период до 2025 г. Данный документ рассмотрен и одобрен на заседаниях Совета 6 июля 2017 г. и экспертной группы 24–25 октября 2017 г., согласован правительствами государств–участников СНГ и одобрен на заседании комиссии по экономическому взаимодействию 17 января 2018 г. и утвержден на заседании Совета глав правительств стран – участников СНГ 1 июня 2018 г. (прил. 23).

3.3 Обсуждение

3.3.1 Схема и методы лабораторной диагностики и мониторинга бешенства и оценки эффективности антирабической иммунизации животных

В рамках глобальной инициативы ФАО, ВОЗ и МЭБ об элиминации переносимого собаками бешенства среди людей к 2030 г., принятой на глобальной конференции по бешенству в 2015 г., России, как члену этих международных организаций, предстоит предпринять определенные шаги в научно-исследовательском, информационно-методическом, законодательном и практическом направлениях. В связи с этим разработка и совершенствование диагностических методов, а также совершенствование системы мероприятий по борьбе и профилактике бешенства, контролю их эффективности имеют большое значение.

Предлагаемая схема лабораторной диагностики бешенства характеризуется следующими основными показателями:

- регламентирует методы отбора, транспортировки и хранения проб для диагностики бешенства;
- определяет перечень и показания к применению тех или иных методов лабораторной диагностики бешенства;
- вводит градацию методов лабораторной диагностики бешенства на уровни;
- разъясняет условия, которые должны быть соблюдены при принятии решения о постановке положительного или отрицательного диагноза на бешенство.

Внедрение такой схемы позволит повысить качество проводимой диагностической работы, получить более точную информацию о количестве случаев бешенства в стране, своевременно принять меры по ликвидации очагов бешенства и проведению профилактических мероприятий. В конечном итоге это приведет к улучшению эпизоотологической ситуации по бешенству, снижению риска заболевания животных и людей, уменьшению экономического ущерба.

В связи с тем, что правильность отбора и транспортировки проб, которые предшествуют работам по диагностике бешенства, оказывают существенное

влияние на качество проводимой диагностической работы, предстояло разработать соответствующие методические указания. Наряду с классическим методом отбора проб головного мозга путем вскрытия черепной коробки, в методических указаниях представлен способ отбора проб с использованием пластиковых трубок через затылочное отверстие. Также описаны способы отбора проб крови/трупной жидкости для оценки поствакцинального иммунитета и отбора проб костной ткани/зубов для оценки поедаемости оральных антирабических вакцин.

Методы лабораторной диагностики бешенства и принципы их применения описаны в ряде российских и зарубежных публикаций (Webster, Casey, 1988; Meslin et al., 1996; Груздев, Недосеков, 2001; Barrat et al., 2006; Околелов с соавт., 2008; Mani, Madhusudana, 2013). Иванов с соавт. (2006, 2007) предложили схему иммунологического мониторинга бешенства, которая включает в себя лабораторную диагностику и серомониторинг, а также типирование эпизоотических изолятов с использованием МКА. Однако эта схема предполагает использование ограниченного числа методов лабораторной диагностики: РИФ, ИФА, РН и вирусовыделение в культуре клеток.

Предлагаемая в данной работе схема лабораторной диагностики представляет собой наглядную пошаговую инструкцию по принятию решения о применении методов лабораторной диагностики бешенства в тех или иных случаях. Ранее была разработана схема, которая наряду с РИФ предполагала использование более современных методов лабораторной диагностики, таких как ИФА, вирусовыделение в культуре клеток (Назаров с соавт., 2003). Однако она требовала серьезной доработки, так как не включала в себя другие доступные диагностические методы, а также не предполагала их ранжирования на уровни.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ), благодаря своей высокой чувствительности, специфичности и быстроте постановки, остается одним из самых востребованных методов лабораторной диагностики бешенства. Международным сообществом данный метод признан золотым стандартом (OIE Manual, 2017), в связи с чем он был включен в качестве основного метода

диагностики бешенства первого уровня. Однако предстояло разработать диагностический набор и сравнить его характеристики с лучшими зарубежными аналогами, такими как поликлональный антирабический ФИТЦ-конъюгированный иммуноглобулин производства Bio-Rad (Франция) и моноклональный диагностический антирабический ФИТЦ-конъюгированный иммуноглобулин производства Centocor (США). Сравнительная оценка показала, что разработанный ФИТЦ-иммуноглобулин для визуализации результатов при проведении вирусовыделения в культуре клеток MNA и при постановке РН в культуре клеток ВНК-21 не уступает существующим коммерческим диагностическим препаратам, а при исследовании проб головного мозга в РИФ превосходит импортные аналоги по интенсивности флуоресценции (Метлин, 2004).

Разработанный диагностический набор был отмечен золотой медалью и дипломом I степени на 12-й российской агропромышленной выставке «Золотая осень – 2010» (прил. 24).

Выделение ВБ в культуре клеток также является методом лабораторной диагностики первого уровня. Метод биологической пробы на мышах изложен в ГОСТ 26075-2013. Хотя данный метод применяется уже длительное время во многих ветеринарных лабораториях РФ, занимающихся диагностикой бешенства, в соответствии с международными требованиями, выдвигаемыми в частности МЭБ, более предпочтительны методы лабораторной диагностики, исключающие использование лабораторных животных (OIE Manual, 2017). Метод выделения ВБ в культуре клеток применяется во многих зарубежных странах и отличается более высокой чувствительностью, экспрессностью и более низкими материальными затратами на его постановку (Rudd, Trimarchi, 1989).

Выбор культуры клеток мышиной нейробластомы (MNA, N2a) обусловлен тем, что именно эти клетки оказались наиболее чувствительны к ВБ (Nogueira, 2004; Smith et al., 1978; Tollis et al., 1988). Исследования, проведенные Хисматуллиной с соавт. показали высокую чувствительность отечественной

перевиваемой культуры клеток невронального происхождения НГУК-1 (невринома гассерова узла крысы) к репликации уличного ВБ (Хисматуллина с соавт., 2014).

Полученные экспериментальные данные показали, что разработанный метод выделения вируса в культуре клеток на основе применения клеток MNA/N2a может служить равноценной заменой метода биологической пробы на мышах при проведении диагностических исследований на бешенство, а по ряду показателей его превосходит (Чернышова, 2018). В настоящее время данный метод используется в лабораторно-диагностической деятельности ФГБУ «ВНИИЗЖ» при выполнении мониторинговых исследований в рамках ежегодных государственных заданий, а также для прохождения международных квалификационных тестов, организуемых Референтной лабораторией Евросоюза по бешенству.

Иммуноферментный анализ (ИФА) широко применяется для диагностики бешенства как в России, так и за рубежом (Perrin et al., 1986; Bourhy, Perrin, 1996; Katayama et al., 1999). Основными его преимуществами по сравнению с РИФ являются возможности как визуального, так и инструментального учета результатов реакции и отсутствие ограничений, связанных с качеством поступающих проб, таких как наличие признаков разложения. Кроме того, ИФА позволяет проводить одновременно исследование большого числа проб, что особенно важно при проведении мониторинга.

На первом этапе нами была разработана иммуноферментная тест-система индикации и количественного определения нуклеопротеина ВБ в головном мозге животных. Сущность метода состоит в связывании вирусного нуклеопротеина со специфическими антителами, иммобилизированными на твердой фазе. Далее следует поэтапное присоединение вторых антивирусных антител, антивидового иммуноглобулина, меченного пероксидазой, и визуализация образовавшегося в результате ферментативной реакции комплекса после добавления хромогенного субстрата. Для изучения возможности использования разработанного сэндвич-варианта ИФА для диагностики бешенства в мозговой ткани, подвергшейся частичному разложению, часть испытуемых положительных и отрицательных в

РИФ проб выдерживали в течение 7 сут при 25ºС (Назаров с соавт., 2003). Позднее данная работа привела к разработке метода выявления антигенов ВБ в головном мозге животных в твердофазном прямом сэндвич-варианте ИФА. Данный метод обладает высокой чувствительностью (11,7-23,4 нг/мл) и специфичностью, позволяет одновременно исследовать 29 проб на одном планшете (Сухарьков, 2014).

В ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань) разработан «Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства методом иммуноферментного анализа (ИФА)», обладающий порогом чувствительности 3,3 lg LD_{50}/мл и требующий для проведения анализа 5-6 ч (Иванов с соавт., 2007). Дяченко с сотрудниками в 2015 г. сообщили о разработке сэндвич-варианта ИФА для выявления ВБ в головном мозге животных с применением моноклональных антител. Метод характеризуется высокой аналитической чувствительностью (10-20 нг/мл) и диагностической чувствительностью в (100%). Мукаптаев в 2006 г. сообщил о разработке сэндвич-варианта ИФА также с применением моноклональных антител для выявления ВБ в пробах патологического материала. Сравнительный анализ результатов исследований методами ИФА, ПЦР и биопробы показал высокую корреляцию между ними. Более высокая чувствительность и специфичность разработанных таких вариантов ИФА по-видимому, связаны с применением моноклональных антител, что, несомненно, положительно отражается на характеристиках диагностического набора, однако отрицательно сказывается на его стоимости.

Обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) широко применяется для диагностики бешенства (Dacheux et al., 2010). Особенно это касается прижизненной диагностики бешенства у людей и исследования проб, подвергшихся разложению (David et al., 2002; Rimhanen-Finne et al., 2007). Разработка диагностической ОТ-ПЦР была начата в рамках выполнения совместной российско-финской программы по профилактике бешенства в граничащих с Финляндией регионах России и завершена совместно с Чернышовой Е.В. (Чернышова., 2018). Разработанный метод применяется как в

России, так и в Финляндии для диагностики бешенства и получения ПЦР-продуктов с целью их последующего секвенирования и проведения филогенетических исследований (Mattila et al., 2010; Метлин, 2004; Чупин с соавт., 2013), а также для прохождения МСИ (Fischer et al., 2013).

Основным преимуществом предложенного варианта ОТ-ПЦР является применение двух пар праймеров, что фактически исключает ложно-отрицательные результаты, а также позволяет проводить филогенетический анализ по консервативному фрагменту гена нуклеопротеина и по вариабельному фрагменту гена гликопротеина и псевдогена.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) представляет собой перспективный экспресс-метод диагностики бешенства и штаммовой дифференциации возбудителя этого заболевания. Black et al. сообщили о разработке ПЦР-РВ на основе TaqMan зондов, позволяющего проводить диагностику бешенства и дифференцировать 6 генотипов семейства *Lyssavirus* (Black et al., 2002). Аналогичный метод разработали Wakeley et al. для детекции и дифференциации штаммов ВБ генотипов 1 (RABV, классический вирус бешенства), 5 (EBLV-1) и 6 (EBLV-2) (Wakeley et al., 2005).

Вариант обратно-транскриптазной ПЦР-РВ разрабатывался в качестве одного из дополнительных методов, позволяющих проводить быструю и достоверную постановку диагноза, а также дифференцировать полевые изоляты ВБ, циркулирующие на территории РФ, от вакцинного штамма «РВ-97», используемого для проведения оральной вакцинации диких животных в составе антирабических вакцин. Данная работа была начата в рамках выполнения совместной российско-финской программы по профилактике бешенства в граничащих с Финляндией регионах России и завершена совместно с Иовлевой А.Ю. В результате была разработана тест-система для обнаружения генома ВБ и дифференциации полевых изолятов вируса от вакцинного штамма «РВ-97» на основе ПЦР-РВ. К преимуществам метода относятся быстрота получения результата, высокая чувствительность и специфичность, а также возможность одновременного исследования большого количества образцов, что

особенно важно при проведении мониторинговых исследований (Иовлева, с соавт., 2012). Данные характеристики делают разработанную тест-систему эффективной в качестве скринингового метода при осуществлении масштабных мониторинговых исследований при проведении кампаний по оральной антирабической вакцинации диких животных.

Позднее и другие научные группы в РФ сообщили о разработке ПЦР в реальном времени для диагностики бешенства. Так Дедкову с сотр. удалось разработать систему, аналитические характеристики которой позволяют успешно проводить детекцию РНК штаммов RABV, циркулирующих на территории РФ (Дедков с сотр., 2016). Faye et al. в 2017 г. сообщили о разработке количественной ПЦР-РВ, направленной на детекцию широкого спектра изолятов ВБ при высокой специфичности реакции и аналитической чувствительности в 10-100 копий РНК.

Реакция агглютинации латекса (РАЛ) является одним из экспресс-методом диагностики. Kasempimolporn et al. сообщили об успешной разработке РАЛ, предназначенной для детекции антигена ВБ в пробах слюны собак, обладающей более высокой (99%) специфичностью и чувствительностью (95%) по сравнению с РИФ (Kasempimolporn et al., 2000).

В рамках данной работы необходимо было адаптировать данный метод для диагностики бешенства с использованием проб головного мозга и применением латексных частиц отечественного производства. Основной положительной характеристикой РАЛ является его простота и отсутствие необходимости инструментального учета результатов реакции. Однако оказалось, что для исследования в РАЛ предпочтительно использовать пробы головного мозга без признаков разложения мозговой ткани, а также пробы, не подвергавшиеся длительному хранению, что в условиях эксперимента приводило к снижению концентрации антигена в пробе и получению ложноотрицательных результатов.

Чувствительность разработанной РАЛ для диагностики бешенства составила приблизительно 0,09 мкг/мл. Основываясь на полученных результатах можно предположить, что при наличии высокочувствительных и специфичных

антирабических антител чувствительность латексного диагностикума можно повысить за счет изменения физико-химических показателей латексных частиц – уменьшения диаметра сфер, повышения концентрации функциональных активных групп, улучшения пространственной доступности сайтов связывания антител на поверхности сфер (при использовании мостиков для функциональных групп). Использование моноклональных антител также может дать увеличение не только чувствительности, но и специфичности метода.

При проведении комиссионной проверки разработанного метода РАЛ в качестве испытуемых препаратов использовали пробы головного мозга, поступившие в лабораторию для диагностики бешенства. Разработанный метод успешно прошел комиссионные испытания.

Иммуногистохимический метод (ИГХМ) успешно применяется для проведения научно-исследовательских работ, в частности для изучения скорости и направления распространения ВБ после интраназальной инокуляции животным (Lafay et al., 1991). С применением этого метода Stein et al. показали, что наилучшим сайтом для детекции ВБ у собак и кошек является аммонов рог, у КРС – стволовая часть головного мозга и мозжечок, у лошадей – шейная часть спинного мозга (Stein et al., 2010).

Работы, направленные на получение средств диагностики бешенства в ИГХМ, позволяющим изучать локализацию антигенов вируса в клетках нервной ткани, были начаты в 2000 г. с получения высокоочищенного культурального ВБ для иммунизации лабораторных животных, а также получения диагностической гипериммунной сыворотки и иммуноглобулина.

Были проведены исследования активности и специфичности нескольких иммуноглобулинов, полученных на полный инактивированный ВБ (штамм «ВНИИЗЖ») – IgG 401, IgG 540 и IgG 597, его рибонуклеопротеин – IgG 675 и гликопротеин – IgG 672. Лучшие результаты были получены с IgG 401. Этот иммуноглобулин был использован в исследованиях различных проб мозга для определения наличия и локализации антигенов ВБ.

Разработанный ИГХМ позволяет идентифицировать антигены ВБ, в том

числе их локализацию в клетках ткани головного мозга инфицированных животных. Данный метод может быть использован в качестве дополнительного метода диагностики бешенства, а также при проведении исследований по определению локализации участков накопления ВБ у инфицированных животных.

Основные проблемы внедрения метода в диагностическую практику ветеринарных лабораторий – высокая трудоемкость и длительность его постановки (6-7 сут). В связи с этим данный метод предлагается использовать в качестве дополнительного метода при исследовании проб головного мозга, консервированных формалином, когда применение других методов лабораторной диагностики невозможно, а также в научных целях.

Прямой жидкофазный вариант реакции иммунофлуоресценции (ПЖ РИФ) предназначен для диагностики бешенства с использованием консервированных формалином проб. Известно, что исследование консервированных формалином материалов можно проводить с помощью гистологического метода, а также методов иммуногистохимии и адаптированных вариантов реакции иммунофлуоресценции (Palmer et al., 1985; Sinchaisri et al., 1992; Zimmer et al., 1990). Реализация этих методов предполагает использование стандартной гистологической процедуры, включающей пропитку блоков тканей парафином, приготовление гистосрезов и их дальнейшую обработку. Однако указанные выше методы трудоемки, требуют использования специального оборудования, дорогостоящих материалов и реактивов, некоторые из которых (эфир, ксилол, хлороформ, ацетон и др.) довольно токсичны, их выполнение занимает много времени, что затрудняет их применение.

Постановка прямого твердофазного варианта РИФ с гомогенизированными и трипсинизированными пробами является более простым и менее трудоемким методом выявления антигена ВБ в консервированных формалином тканях головного мозга (Barnard, Voges 1982). Так как реакция антиген-антитело и учет результатов происходят на твердой фазе (на стекле), при этом антивидовые антитела не используются, его можно

отнести к прямому твердофазному варианту РИФ (ПТ РИФ). По литературным данным, на чувствительность ПТ РИФ большое влияние оказывает концентрация формалина в консервирующем растворе и срок консервирования. При использовании 0,125-0,25% раствора формалина чувствительность метода не снижается в течение 7 нед. (Umoh, Blenden, 1981), в то время как при консервировании проб в 10%-м растворе формалина 100%-ю чувствительность отмечали на вторые сутки после начала консервирования, далее она постепенно снижалась и к 20 суткам достигла 91% (Meslin et al., 1996). Barnard и Voges, 1982 установили, что консервирование проб в 10%-м формалине в пределах от 5 до 15 сут не влияет на чувствительность ПТ РИФ. При постановке ПТ РИФ после фиксации в ацетоне при минус 20°С в течение 45-60 мин часть препаратов отслаивалась во время промывания, а интенсивность флуоресценции с увеличением срока консервирования снижалась, что затрудняло проведение исследований. Для устранения этих недостатков нами был разработан жидкофазный вариант РИФ (ПЖ РИФ).

При анализе консервированных формалином проб головного мозга мышей результаты ПЖ РИФ полностью совпали с результатами исследования свежего материала и материала, консервированного в течение 60 сут, и на 80% – для консервированного 90 сут. Предложенная ранее ПТ РИФ уже на 30 сут консервирования формалином проб мозга показывала 80% ложно-отрицательных результатов в связи с недостаточной ее чувствительностью.

При исследовании консервированных проб, полученных от зараженных бешенством в естественных условиях животных, было установлено, что при использовании ПТ РИФ на 60-е сут после консервирования чувствительность метода составила лишь 17%, а к 90-м сут не удалось выявить ни одной положительной пробы. ПЖ РИФ показал 100%-ю чувствительность на протяжении всего эксперимента. В ПЖ РИФ исключается стадия фиксации препаратов в ацетоне. Кроме того, контакт антигена ВБ с ФИТЦ-глобулином в жидкой фазе является более эффективным. Внесенные изменения привели к повышению чувствительности реакции, сокращению времени ее постановки, а

также позволили отказаться от применения ацетона.

Мониторинг эпизоотологической ситуации по бешенству в различных регионах РФ проводился на протяжении многих лет (Фоменко, 2004; Тутов, Фоменко, 2007; Донник с соавт., 2009; Подопригора, 2010; Соловых, 2011; Мясников с соавт., 2012; Дресвянникова, 2010; Емельянова, 2012; Дмитриев, Мицаев, 2012; Елаков с соавт., 2015). Более целостный анализ эпизоотологических данных по стране был проведен Гулюкиным А.М. (Гулюкин, 2011, 2017). Им проведен эпизоотологический мониторинг распространения бешенства на территории Смоленской обл. за 1996-2009 гг., картографирование неблагополучных районов и усовершенствованы меры борьбы с этой инфекцией. Большую работу в направлении изучения эпизоотологической ситуации по бешенству в Республике Татарстан и в целом в РФ провел Чернов А.Н. Им проведен анализ распространения заболевания на территории Республики Татарстан за 1970-2012 гг., установлен уровень заболеваемости сельскохозяйственных, диких и домашних животных в разрезе муниципальных районов, разработаны карты эпизоотологического районирования территории, изучена периодичность и сезонность проявления рабической инфекции, изучены некоторые биологические свойства изолятов ВБ, выделенных на территории республики, и установлено их антигенное сходство с вакцинным штаммом (Чернов, 2013).

Начиная с 2011 г. Россельхознадзор РФ ежегодно издает приказы «О лабораторных исследованиях в рамках реализации мероприятий Россельхознадзора для обеспечения выполнения требований Соглашения ВТО по СФС при вступлении России в ВТО» с целью организации и проведения эпизоотологического мониторинга некоторых инфекционных болезней животных, в том числе и на бешенство. В связи с этим предстояло разработать и внедрить в ряде субъектов РФ систему активного эпизоотологического мониторинга бешенства. До этого времени действовал исключительно пассивный мониторинг, т.е. пробы на бешенство целенаправленно не собирались, исследования проводились только при подозрении на бешенство

(инцидентная диагностика).

Разработанное в рамках данной работы техническое задание для проведения мониторинга бешенства включало исчерпывающую информацию о проводимом мероприятии, а также способы отбора, консервирования и доставки проб для проведения исследований.

Благодаря проведенному в 2011 г. мониторингу был подтвержден статус Ленинградской, Магаданской обл. и Камчатского края как благополучных по бешенству регионов, а также уточнена эпизоотологическая обстановка по бешенству собак в 8 регионах Российской Федерации (Брянская, Тверская, Орловская, Калининградская, Кемеровская, Саратовская обл., Краснодарский и Ставропольский края).

В 2012 г. сфера ответственности по проведению мониторинга была разделена между ФГБУ «ВНИИЗЖ» и региональными межобластными ветеринарными лабораториями Россельхознадзора. После проведения исследований и анализа результатов установлено, что данных, полученных только в ФГБУ «ВНИИЗЖ», недостаточно для объективной характеристики эпизоотологической ситуации по бешенству на исследованных территориях. Во всех случаях были получены отрицательные результаты, даже при исследовании проб из регионов, неблагополучных по данному заболеванию. Результаты подтверждают, что в регионах проводился отстрел клинически здоровых животных. Поэтому мониторинг на бешенство, проведенный по такому принципу, является малоинформативным и, по-видимому, не оправдывает затраченных на него финансовых и трудовых ресурсов. Однако отстрел (отлов) клинически здоровых как диких, так и домашних животных является важным и необходимым мероприятием при мониторинге эффективности антирабической оральной вакцинации в местах ее проведения.

Для получения объективной и полной картины по эпизоотологической ситуации по бешенству необходимо анализировать в сравнительном аспекте результаты мониторинговых исследований с результатами инцидентной (текущей) диагностики в регионах.

Несмотря на то, что статистический анализ полученных данных показал, что нулевая гипотеза выполнима и при проведении мониторинга, достоверного уточнения данных не произошло. Полученные результаты позволили приступить к поиску путей по усовершенствованию данной системы. В связи с тем, что бешенство является смертельным зоонозным заболеванием, дополнительное выявление даже нескольких случаев бешенства у животных потенциально влечет за собой сохранение человеческих жизней и таким образом обеспечивает достижение глобальной цели по элиминации бешенства человека, обусловленного контактами с больными бешенством собаками.

Схема и методы оценки эффективности антирабической вакцинации диких и домашних животных. В основе мероприятий по борьбе с бешенством лежит вакцинопрофилактика. В Российской Федерации для вакцинации домашних и сельскохозяйственных животных применяют инактивированные антирабические вакцины. Также проводится оральная вакцинация диких животных с использованием живых аттенуированных оральных антирабических вакцин. Немаловажным компонентом антирабических программ является мониторинг эффективности вакцинации, требующий применения комплексного подхода. Для оценки качества проводимых мероприятий по борьбе с бешенством необходимо было разработать и адаптировать к применению комплекс методов, позволяющих оценить уровни антирабических антител у вакцинированных животных, методы дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ, а также внедрить систему мониторинга эффективности антирабической вакцинации в РФ.

Разработке средств и методов оценки эффективности вакцинации диких животных посвящен целый ряд научных работ. Так, коллектив авторов из ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», (г. Казань) занимался разработкой ИФА для определения уровней антирабических антител в пробах крови животных, а также других мероприятий по контролю эффективности антирабической вакцинации (Хисматуллина с соавт., 2000, 2001, 2004, 2012, 2013, 2014; Иванов с соавт., 2007, 2010). Этим же вопросом занималась группа ученых из ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН

(г. Москва). Им удалось разработать тест-системы для определения уровня антирабических антител в сыворотках крови животных, вакцинированных против бешенства, методами непрямого иммуноферментного анализа и блок-иммуноферментного анализа (блок-ИФА), по чувствительности и экспрессности значительно превосходящими традиционную РН. С помощью этих методов установлена высокая степень активизации неспецифических, клеточных и гуморальных факторов иммунитета после вакцинации лисиц и собак различными антирабическими вакцинами (Гулюкин, 2011, 2014). Во ФГБНУ «ВНИИТИБП» (г. Щелково) разработана тест-система на основе непрямого ИФА, позволяющая определять эффективность профилактической вакцинации собак против бешенства (Клюкина с соавт., 2012; Анисина, 2016).

На территории Российской Федерации зарегистрированы и применяются оральные и парентеральные ветеринарные антирабические вакцины. Оральные антирабические вакцины предназначены для иммунизации против бешенства диких плотоядных животных, главным образом представителей семейства собачьих (лисицы, енотовидные собаки). Практически все современные оральные антирабические вакцины имеют сходную компоновку: блистер с вакциной, помещенный внутрь вкусовой приманки, с небольшими вариациями в размерах и составах. В России в разные годы применялись вакцины «LISVULPEN» (BIOVETA Ivanovice, Чешская Республика) из штамма «SAD Bern», «FUCHSORAL» (IDT Biologika GmbH, Германия) из штамма «SAD B19», «СИНРАБ» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир) и «ОРАЛРАБИВАК» (ОАО «ПЗБ», г. Покров) из штамма «РВ-97». В некоторых регионах России применялась оральная вакцина на основе штамма «Внуково-32» и сухая оральная антирабическая вакцина из штамма «ТС-80», производства ВНИИВВиМ, г. Покров.

Для профилактики бешенства среди домашних животных применяются инактивированные антирабические вакцины отечественного и зарубежного производства. Такие вакцины вводятся только парентеральным путем. Широко применяются вакцины: «Рабикан» (ФКП «Щелковский биокомбинат»),

предназначенная для антирабической иммунизации собак, «Рабиков» (ФКП «Щелковский биокомбинат»), для иммунизации КРС, а также «Nobivac Rabies» (Intervet International B.V., Голландия), «Мультикан-8» (НПО «НАРВАК», Москва), «Эурикан» (Merial, Франция) и некоторые другие.

Парентеральные инактивированные и живые оральные антирабические вакцины имеют различное назначение и, как правило, не применяются на одних и тех же видах животных. В связи с этим системы мониторинга иммуногенности живых и инактивированных вакцин будут существенно различаться.

Производители антирабических вакцин самостоятельно разрабатывают и рекомендуют схемы применения предлагаемых ими препаратов, ориентируясь на требования, изложенные в главе 2.1.17 «Бешенство» Руководства по диагностическим тестам и вакцинам для наземных животных МЭБ (OIE Manual, 2017).

Кампании по оральной иммунизации против бешенства рекомендуется проводить не реже 2 раз в год на протяжении не менее 6 лет с дозировкой 25-30 приманок на 1 км^2 зоны вакцинации. Также необходим серологический мониторинг. Производители парентеральных вакцин устанавливают различную кратность иммунизации. В связи с тем, что различные коммерческие вакцины могут содержать разное количество антигена ВБ, а реакция на введение таких вакцин различным животным всегда индивидуальна, о защищенности животного против бешенства можно судить только на основании результатов определения уровней антирабических ВНА.

Ранее предлагалась схема оценки сероконверсии на основе использования РН и ИФА и диагностики бешенства на основе РИФ, ИФА и вирусовыделения в культуре клеток (Иванов с соавт., 2007). Предлагаемая схема мониторинга охватывает как диких, так и домашних животных. Она предполагает применение различных вариантов РН в зависимости от качества поступившего материала для проведения исследований, и ИФА, а также оценку поедаемости оральных антирабических вакцин. Разработанные и адаптированные методы диагностики составляют комплекс лабораторных методов, позволяющий оценить

эффективность применения тех или иных антирабических вакцин вне зависимости от вида вакцины и производителя биопрепарата, а также проводить оценку эффективности ветеринарных мероприятий, направленных на профилактику и элиминацию бешенства среди домашних и сельскохозяйственных животных.

Мониторинг эффективности антирабической вакцинации домашних животных в РФ. Макаров с соавт. установили в целом низкий иммунный фон в городской популяции животных, при этом от 44 до 77% животных не имели поствакцинальных антител (Макаров с соавт., 2002). По данным, опубликованным Хисматуллиной Н.А. при проведении серологических исследований КРС, вакцинированного против бешенства в Республике Татарстан, у всех вакцинированных животных (n=239) был обнаружен достаточный для защиты от заражения бешенством уровень антирабических антител (Хисматуллина, 2014). Проведенные в популяции бездомных собак Московской обл. исследования свидетельствуют о том, что 83,6% обследованных безнадзорных уличных собак не защищены от заражения бешенством (Анисина, 2016).

С использованием разработанных и адаптированных методов определения уровней антирабических ВНА в 2009 г. в интересах Министерства сельского хозяйства Российской Федерации были разработаны «Методические рекомендаций по борьбе с бешенством животных». В рамках выполнения данной работы впервые был проведен масштабный мониторинг иммуногенности применяемых в ряде регионов России инактивированных антирабических вакцин.

Для вакцинации домашних и сельскохозяйственных животных в России, широко применяется инактивированные вакцины из штамма «Щелково-51», производства Щелковского биокомбината: вакцина антирабическая инактивированная сухая культуральная из штамма «Щелково-51» («Рабикан») и вакцина антирабическая из штамма «Щелково-51» инактивированная жидкая культуральная («Рабиков»). Все эти препараты содержат инактивированный β-

пропиолактоном ВБ и предназначены для профилактической и вынужденной иммунизации домашних животных: «Рабикан» – для собак и кошек, «Рабиков» – для крупного, мелкого рогатого скота и лошадей (Елаков, 2013).

При проведении исследования сывороток крови, полученных от КРС, иммунизированных вакциной «Рабикан» установлено, что уровень сероконверсии в изученной популяции КРС превышает 90%. При этом выявляемые уровни антирабических ВНА варьировали в широких пределах, что, вероятно, связано с индивидуальными особенностями животных, состоянием их здоровья, различными условиями кормления и содержания. В соответствии с требованиями Европейской фармакопеи при проверке инактивированной антирабической вакцины парентерального применения допускается наличие не более 10% серонеготивных сельскохозяйственных животных. В связи с этим можно заключить, что применяемая в РФ для вакцинации КРС антирабическая вакцина защищает животных в исследуемой популяции от бешенства и соответствует международным требованиям.

При проверке иммуногенности вакцин «Рабикан» и «Nobivac Rabies» на собаках установлена их высокая иммуногенность. Учитывая, что их испытания проводились в полевых (г. Санкт-Петербург) условиях на животных разных половозрастных групп и пород, возможно оценить лишь популяционный уровень иммунитета. Применение обеих вакцин привело к образованию антирабических антител с разницей в пределах установленных отклонений: «Рабикан» – 6,68±1,43 МЕ/мл, «Nobivac Rabies» – 4,53±0,79 МЕ/мл. При этом, достигающая протективного уровня сероконверсия была выявлена у 84,9% животных при использовании вакцины «Рабикан» и у 87,9% животных при использовании вакцины «Nobivac Rabies».

При проведении аналогичных исследований в г. Москве и г. Зеленограде, где применялся широкий ряд вакцин различных производителей («Nobivac Rabies», «Рабикан», «Эурикан», «Дипентовак», «Гексадог»), установлен протективный уровень антител в 77,3%. В г. Саратове и Саратовской обл., где применялись вакцины «Рабикан» и «Рабивак», этот показатель составил 92%, в

Ставропольском крае (вакцина «Рабикан») – 71,4%, во Владимирской обл. – 77,9%, в г. Нижний Новгород – 83,9%, в г. Дзержинске – 90,4%.

По последним литературным данным, у собак и кошек проявляется прямая зависимость титра ВНА к ВБ от кратности антирабической вакцинации. При этом породные особенности собак влияют на уровень антирабических антител. У подавляющего большинства кошек (98,4%, включая животных моложе 1 года) в отличие от собак даже после однократной иммунизации содержание антирабических антител в сыворотке крови превышало протективный уровень (Непоклонова с соавт., 2017). Известно, что для борьбы и профилактики бешенства в популяции собак как минимум 70% животных должны иметь протективный уровень антирабических антител (Coleman, Dye, 1996; Cleaveland et al., 2003). Применение испытуемых в рамках данной работы вакцин приводило к гораздо лучшему результату.

Недосеков В.В. с сотр. изучали влияние неблагоприятных условий содержания на формирование антирабического иммунитета у морских свинок. После вакцинации против бешенства различные группы животных подвергались воздействию высокой и пониженной температуры, а также алиментарного стресса. Исследованиями установлено отрицательное влияние алиментарного стресса на формирование антирабического иммунитета (Недосеков с соавт., 2013). В связи с этим очевидно, что популяционный иммунитет у бездомных животных будет снижен. При проведении отлова таких животных необходима (до проведения антирабической иммунизации) передержка с дегельминтизацией и соблюдением режима кормления.

Мониторинг эффективности антирабической вакцинации диких животных в РФ. Для мониторинга эффективности оральной антирабической вакцинации и всесторонней оценки ситуации необходимо исследовать комплексные пробы: пробы крови/трупной жидкости для определения уровней антирабических антител, головного мозга для диагностики бешенства, ткани костей/зубов для оценки поедаемости вакцинных приманок. Определение уровня антирабических ВНА и наличия скоплений тетрациклина позволяют

судить об эффективности применения вакцины и качестве проведенных профилактических мероприятий. Согласно литературным данным (Грибенча с соавт., 1975, 1989; Хисматуллина с соавт., 2015) и проведенным исследованиям, у больных бешенством животных выявляются высокие уровни антирабических ВНА. В связи с этим, исследование проб головного мозга на бешенство от этих же животных необходимо для исключения больных бешенством животных из серопозитивной выборки, т.к. наличие ВНА у них связано не с проведенными мероприятиями по оральной вакцинации, а непосредственно с заболеванием бешенством.

В ранее проведенных исследованиях (Сухарьков, 2014; Чернышова, 2018) установлено, что наличие антирабических ВНА и скоплений тетрациклина в тканях костей и зубов не всегда совпадает для одного и того же животного. Одна из причин – у животного выработались антирабические антитела в следствии заболевания бешенством. Другая причина – животное могло употребить субстанцию, содержащую тетрациклин, не имеющий отношение к вакцине (боенские отходы и т.д.), или съесть содержащую тетрациклин приманку, выплюнув при этом капсулу с вакциной. Все это приводит к необходимости при проведении мониторинговых исследований отбирать пробы крови, головного мозга и костной ткани от каждого животного, т.е. исследовать так называемую комплексную пробу, что дает возможность всесторонне оценить складывающуюся в зоне вакцинации ситуацию.

Межлабораторные сличительные испытания при бешенстве. Практика проведения межлабораторных сличительных испытаний по бешенству широко распространена по всему миру и осуществляется для повышения достоверности и воспроизводимости лабораторной диагностики бешенства (Servat et al., 2008; Clavijo et al., 2017).

В связи с тем, что бешенство является зоонозом, имеющим большое социальное значение, контроль качества диагностической работы, проводимой региональными ветеринарными лабораториями, а также референтной лабораторией по бешенству (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), имеет особенно важное

значение. В мировой лабораторной практике существует система межлабораторных (в том числе международных) сличительных испытаний, позволяющих путем рассылки и тестирования наборов (панелей) референтных шифрованных образцов проверять качество проводимой диагностики, а при выявлении отклонений вовремя принимать меры по выяснению причин и недопущению сбоев диагностической работы в будущем. В качестве международного провайдера МСИ, как по серологическим исследованиям, так и по диагностике бешенства и оценке поедаемости антирабических вакцин, может выступать одна из международных референтных лабораторий по бешенству. Одним из основных международных провайдеров таких испытаний является Референтная лаборатория Европейского Союза по бешенству, входящая в состав Французского агентства по пищевой безопасности (ANSES).

Благодаря разработке и внедрению в практику современных методов лабораторной диагностики, ФГБУ «ВНИИЗЖ» с 2009 г. и по настоящее время успешно проходит ежегодный международный квалификационный тест (решение Европейской комиссии 2010/591/EU).

Впервые ФГБУ «ВНИИЗЖ» выступил в качестве провайдера МСИ на национальном уровне в 2005 г., когда, в соответствии с распоряжением начальника Управления ветеринарии федерального агентства по сельскому хозяйству Минсельхоза России от 25.04.05, сотрудниками Управления ветеринарии Минсельхозпрода Московской обл., Центральной научно-методической лаборатории и ФГБУ «ВНИИЗЖ» была проверена правильность проводимых исследований на бешенство в лабораторно-диагностических отделах ГУВ МО Истринской, Егорьевской, Сергиево-Посадской и Рузской станций по борьбе с болезнями животных. В целом, несмотря на некоторые проблемы с оборудованием, проверяемые специалисты практически безупречно прошли проверку. Однако была установлена необходимость организации постоянно действующих курсов по бешенству, а также систематического проведения подобных проверок с выдачей соответствующих сертификатов. Данные мероприятия были организованы и регулярно проводятся в ФГБУ

«ВНИИЗЖ».

Регулярное проведение МСИ, в том числе в рамках выполнения приказов Россельхознадзора, позволило существенно повысить качество диагностической работы, проводимой в регионах.

Таким образом, разработанная и внедренная система МСИ позволила на протяжении 7 лет регулярно подтверждать компетентность проверяемых лабораторий, выявлять ошибки специалистов и повышать их квалификацию.

3.3.2 Изучение молекулярно-биологических характеристик, филогенетический анализ полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства

Разработка экспресс-методов дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ. Дифференциация полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ имеет важное значение при проведении кампаний по оральной вакцинации диких животных с использованием антирабических вакцин на основе живых аттенуированных штаммов.

Несмотря на имеющиеся доказательства безопасности оральных вакцин и высокую их эффективность (Vos et al., 1999, 2000), сообщалось о наличии остаточной патогенности аттенуированных вакцинных штаммов ВБ (Иванов и др., 2000; Pastoret, Brochier, 1999; Wandeler, 2000). Так, при проведении испытаний аттенуированных оральных антирабических вакцин в полевых условиях было выявлено не менее 3 случаев бешенства, вызванных одним из производных штамма «SAD-Bern» в Швейцарии, и не менее 8 случаев, вызванных штаммом «ERA» в Канаде. Кроме того, некоторые штаммы группы SAD могут стать причиной возникновения бешенства у енотов и могут оказаться патогенными для людей (Pastoret, Brochier, 1999).

Выбор объектов исследования (аттенуированные вакцинные штаммы «РВ-97» и «SAD B19») был связан с тем, что при выполнении российско-финской программы по профилактике бешенства диких животных в приграничных регионах России и Финляндии применялись оральные антирабические вакцины «FUCHSORAL», «СИНРАБ» и «ОРАЛРАБИВАК»,

изготовленные на основе этих штаммов.

Дифференциация штаммов на основе разности длины ПЦР-продуктов оказалась практически невыполнимой, т.к. разница длины продукта в 9 н.о. недостаточна для достоверного разделения при постановке агарозного гель-электрофореза. Применение в данном случае полиакриламидного геля могло бы привести к получению более четких результатов, однако данный метод менее пригоден для применения в условиях региональных лабораторий. В связи с этим было решено сфокусировать дальнейшие исследования на изучении возможности применения ферментов рестрикции.

Известно, что изучение полиморфизма длины фрагментов генома после обработки их рестриктазами позволяет дифференцировать различные варианты ВБ (Loza-Rubio et al., 1999; Nadin-Davis et al., 1993). Такой метод был успешно разработан Ito et al., для штаммо-специфической дифференциации изолятов вируса бешенства в Бразилии (Ito et al., 2003).

Целью исследований, представленных в данной работе, был поиск подходящих ферментов рестрикции для быстрой дифференциации вакцинных штаммов «РВ-97» и «SAD B19» между собой, а также для их дифференциации от полевых изолятов ВБ, циркулирующих на территории России. В ходе проведения экспериментов с использованием рестриктаз CfrI, Bsh1236I, SmuI, SduI, Eco31I, BstXI и BclI была подтверждена возможность их использования для экспресс-дифференциации изученных полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ.

Аналогичная работа была проведена с использованием вакцинных штаммов «ТС-80», «Внуково-32», «Щелково-51» и «РБ-71» Цыбановым Я.С. с соавт., которые установили уникальные сайты рестрикции для арктического и классического типов ВБ (Цыбанов с соавт., 2002). Тем не менее, в связи широкой доступностью и большей информативностью, для дифференциации штаммов в дальнейшем применялось нуклеотидное секвенирование фрагментов генома ВБ.

Изучение антигенного разнообразия и молекулярной эпизоотологии бешенства в России и сопредельных странах. Изучение молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ имеет важное научно-практическое значение для разработки средств и методов диагностики и профилактики данного заболевания, что необходимо для достижения цели глобальной инициативы ФАО, ВОЗ и МЭБ об элиминации переносимого собаками бешенства среди людей к 2030 г.

Для изучения антигенных и молекулярно-биологических характеристик ВБ, а также предсказания антигенных свойств изучаемых штаммов могут использоваться два основных метода: применение моноклональных антител (МКА) и проведение нуклеотидного секвенирования с последующим анализом нуклеотидной и предсказанной аминокислотной последовательностей. Эпизоотологические данные свидетельствуют о стойком благополучии материковой части Норвегии, а также Финляндии, Эстонии, Латвии и Литвы по бешенству наземных млекопитающих. Тем не менее на норвежском острове Шпицберген с 1980 по 2012 г. регистрировались спорадические вспышки бешенства среди песцов и ряда других видов животных. Территория Польши остается эндемичной по бешенству на протяжении многих лет. Проведенные молекулярно-биологические исследования подтвердили, что выделенные изоляты ВБ принадлежат к так называемым арктическим штаммам. Первоначально это было установлено с помощью антинуклеокапсидных МКА, в частности по положительной реакции с МКА Р-41. Моноклональное антитело Р-41 положительно реагировало с изолятами, выделенными от животных во время вспышки бешенства в 1980 г. на острове Шпицберген, а также с изолятами, выделенными от песцов в СССР, Гренландии, Финляндии, на Аляске (Schneider et al., 1985; Nyberg et al., 1992) и в северо-западной части России (Ботвинкин с соавт., 2004).

Изоляты ВБ, выделенные в Эстонии, по структуре реакции с МКА также были отнесены к арктическому варианту и имели сходные характеристики с изолятами, выделенными в Финляндии в 1988-1989 гг. (Selimov et al., 1969).

Однако изоляты, выделенные на территории западных островов Saaremaa и Hiiumaa, отличались от изолятов, выделенных на материковой части Эстонии по отрицательной реакции с моноклональным антителом W 187.5 (Nyberg et al., 1992).

Установлено, что антигенный вариант I циркулировал преимущественно на северо-западе России, в Финляндии и в Эстонии. Антигенный вариант II был выделен только на островах в Эстонии (Kulonen и др., 1993), а антигенные варианты III и IV – в центральных и юго-западных регионах России. Антигенный вариант V был выявлен в Тверской и Московской обл. Полученные данные позволили провести отбор изолятов для дальнейшего молекулярно-биологического исследования. В работе Ботвинкина А.Д. с сотр., 2004 подвели итоги изучения антигенных вариантов ВБ с использованием МКА, в том числе учитывая опубликованные нами ранее данные (Metlin et al., 2004). Тем не менее представленные в настоящей работе исследования позволили получить новые данные о распространении антигенных вариантов ВБ на территории РФ.

В 2003 г. из неблагополучной в то время по бешенству Эстонии на территорию Финляндии была завезена лошадь, у которой впоследствии проявилось заболевание с характерными клиническими признаками бешенства. После лабораторного подтверждения диагноза, изолят получил обозначение «RV1904». Перемещение лошадей между Эстонией и Финляндией, а также Финляндией и Россией всегда носило довольно активный характер, но импортированных в Финляндию случаев бешенства при этом не выявлялось.

Изучение изолята «RV1904» с использованием МКА показало его принадлежность к группе арктических штаммов. Установлено, что выделенный изолят имеет характеристики, сходные с характеристиками для изолятов ВБ, циркулировали на тот момент на территории Эстонии и ряда Западных регионов России. Выделенный в Финляндии во время эпизоотии бешенства 1988-1989 гг. штамм «RV1511» также отнесен к Арктическим.

Штаммы вируса бешенства Европейского происхождения были разделены на 4 филогенетические подгруппы: «Северо-Восточная Европа» (North-East

Europe, «NEE»), «Центральная Европа» (Central Europe, «CE»), «Восточная Европа» (East Europe, «EE») и «Западная Европа» (Western Europe, «WE») (Bourhy et al., 1999). На территории бывшего СССР идентифицированы 5 филогенетических подгрупп (A–E) (Kuzmin et al., 2004). Проведенные исследования показали, что подгруппа «NEE» совпадает с подгруппой «E», включающей вирусы, циркулирующие на территории западной части России и в странах Прибалтики (Kuzmin et al., 2004, Vanaga et al., 2003). Установлено, что штаммы «RV1904» и «RV1511» также входят в эту подгруппу, что указывает на наличие молекулярно-эпидемиологической связи между ними.

На основании полученных результатов Министерство сельского и лесного хозяйства Финляндии выпустило рекомендации о необходимости вакцинации против бешенства животных, ввозимых в страну из неблагополучных по этому заболеванию государств. Таким образом, методы молекулярной биологии были успешно применены для расследования путей заноса бешенства на территорию Финляндии.

Другим хорошим примером является работа Адельшина Р.В. с соавт., 2015 о расследовании вспышки бешенства в Республике Бурятия. С помощью филогенетического и эпизоотологического анализа было установлено, что ВБ на территорию Бурятии в 2011-2012 гг. был занесен с территории соседней Монголии (Adelshin et al., 2015). Ветеринарные мероприятия, скорректированные в соответствии с полученными данными, не позволили заболеванию распространиться на территории республики (Молонтоев с соавт., 2013).

В ходе изучения молекулярно-биологических характеристик изолятов ВБ, циркулирующих на территории РФ, было установлено существование 2 основных филогенетических групп: «Пан-Евразийской» и «Кавказской». «Пан-Евразийская» филогенетическая группа при этом включает 3 подгруппы: «Евразийскую», «Северо-Европейскую» и «Центральную российскую», которые соответствуют ранее определенным филогенетическим группам «C», «D» и «E» (Kuzmin et al., 2004) и группам «WE» и «CE» (Bourhy et al., 1999). Следует

отметить, что предложенная ранее для использования на территории РФ классификация с использованием латинских букв (Kuzmin et al., 2004) не отражает географического происхождения изучаемых изолятов. При этом полученные результаты свидетельствуют о совпадении географического происхождения и принадлежности к определенной филогенетической группе. Поэтому обозначение филогенетических групп и подгрупп по географическому признаку, использованное ранее в Европе (Bourhy et al., 1999) и предложенное в рамках данной работы, предпочтительно.

Изоляты ВБ, принадлежащие к «Евразийской» филогенетической подгруппе, географически распространены с востока (Новосибирская обл.) до западных границ РФ (Белгородская обл.), а также на юг (Краснодарский край). Проведенные филогенетические исследования позволили включить в данную подгруппу ранее охарактеризованные Кузьминым с соавт., изоляты ВБ из Омской обл., Алтайского края и Казахстана, отнесенные ранее к группе «С» (Kuzmin et al., 2004).

Изоляты, включенные в «Северо-Европейскую» подгруппу показали положительную реакцию с МКА Р-41, что указывает на их принадлежность к арктическому антигенному варианту. Установлено, что изоляты, формирующие данную филогенетическую подгруппу были выделены ранее в Эстонии, Финляндии, а также ряде регионов РФ, таких как Псковская, Брянская и Ленинградская обл. Филогенетические исследования показали близкородственность изолятов ВБ, выделенных в Псковской обл. и Эстонии. Единственным дивергентным оказался изолят «EST_1990», выделенный в Эстонии на острове Muhu (Kulonen, Boldina, 1993), который также имел уникальную структуру реакции с панелью МКА и, по-видимому, претерпел определенные эволюционные изменения ввиду географической изолированности территории, на которой он был выделен.

Проведенные ранее антигенные и филогенетические исследования подтвердили, что изоляты ВБ, вызвавшие вспышку заболевания в Финляндии в 1988-1989 гг., родственны изолятам, циркулировавшим на территории

Прибалтики (Kulonen, Boldina, 1993; Bourhy et al., 1999; Johnson, Fooks, 2005). В результате исследований, проведенных в рамках данной работы, установлено, что изучаемые изоляты хотя и близкородственны, но не идентичны по молекулярно-биологическим характеристикам. Это позволяет предположить, что вспышка бешенства на территории Финляндии в 1988-1989 гг. возникла не внезапно. Бешенство, вероятно, распространялось постепенно на территорию Финляндии с территории Эстонии и России (Ленинградская обл.) и только после того, как заболевание стало выявляться и среди сельскохозяйственных животных, вспышка бешенства была установлена. Изученные в рамках данной работы штаммы «113_1988», «109_1988» и «RV1511», выделенные во время этой вспышки, принадлежат к «Северо-Европейской» филогенетической подгруппе, которая соответствует определенной ранее группе «E» (Kuzmin et al., 2004) и «NEE» (Bourhy et al., 1999). Выдвигались разные версии о причинах возникновения бешенства на территории Финляндии. Это и миграция животных по льдам замерзшего Балтийского залива, и провоз инфицированных животных железнодорожным транспортом (Johnson, Fooks, 2005). Однако, в связи с выявленными близкородственными филогенетическими связями изолятов ВБ, выделенных в Финляндии в 1988-1989 гг. и 2003 г., в Эстонии в 1989-1990 гг., в Ленинградской обл. в 1990 г. и в Псковской обл. в 2002 г., обосновано предположение ко-циркуляции изученных изолятов на данной территории в 1988-1990 гг.

В связи с этим возможны два варианта заноса: распространение бешенства животными из Ленинградской обл. либо миграция зараженных животных по льдам Балтийского залива с территории Эстонии. Последний вариант, по данным Nyberg et al. выглядит наиболее вероятным в связи с тем, что большинство случаев бешенства были выявлены на западном берегу реки Kymi и один случай был зарегистрирован на острове, расположенном у южного края береговых льдов (Nyberg et al., 1992). Также возможно попадание на территорию Финляндии ВБ обоими путями одновременно либо с небольшим промежутком времени.

Филогенетическая подгруппа «Центральная Россия» включает изоляты

ВБ, выделенные в центральной части РФ (Московская, Тверская, Рязанская, Владимирская обл.). Эта подгруппа, по-видимому, совпадает с подгруппой «D», установленной ранее (Kuzmin et al., 2004). Изоляты, происходящие из этих регионов достоверно отличались от изолятов, выделенных в других регионах РФ, в том числе и близко расположенных географически (Нижегородская обл.). Причиной этого может быть наличие в регионе крупных рек, таких как Ока, Клязьма и Волга, которые, по-видимому, сыграли роль барьеров, ограничивая передвижение диких животных – хозяев ВБ (лисицы, енотовидные собаки) и, таким образом, ограничивая ко-циркуляцию изолятов вируса между регионами. Известно, что в прошлом веке, когда бешенство распространялось с востока на территорию западной и южной Европы, естественные барьеры, такие как река Висла в Польше, ограничивали распространение инфекции (Bourhy et al., 1999). Таким образом, роль рек в качестве естественных барьеров для распространения бешенства необходимо принимать во внимание при разработке программ по борьбе с этим заболеванием.

Кроме рек горные гряды существенно ограничивают циркуляцию вируса бешенства. Проведенные в рамках данной работы исследования показали, что изоляты ВБ, происходящие из северо-западной части Краснодарского края («10_2005» и «25_2005») достоверно филогенетически отличаются от изолятов вируса («12_2005», «18_2005» и «21_2005»), выделенных на другой стороне Кавказской гряды вблизи границы с Абхазией. Изоляты вируса бешенства «V703» и «V686» выделенные в Иране (Nadin-Davis et al., 2003) и «RV308» из Грузии (Kuzmin et al., 2004), также принадлежат к этой филогенетической группе.

Все полевые изоляты, включенные в данное филогенетическое исследование, достоверно отличались от вакцинных штаммов, используемых для производства антирабических вакцин, что подтверждает отсутствие реверсии. Эти данные согласуются с данными, полученными Зайковой с сотр. при проведении исследований на территории Кировской обл. (Зайкова с сотр. 2016).

Молекулярная эпизоотология бешенства собак на территории Королевства Камбоджа и Юго-Восточной Азии. Бешенство домашних и бездомных собак все еще широко распространено по всему миру, регистрируется более чем в 80 странах, главным образом, в развивающихся, что является причиной более 99% случаев бешенства человека (WHO, 2013). В связи с постоянно растущим товарооборотом, включая перемещение животных между РФ и странами данного региона, а также интенсивно развивающимися туристическими связями, целью проведенных исследований было прояснение молекулярной эпидемиологии бешенства собак в Юго-Восточной Азии.

В процессе исследований наибольшее внимание уделялось Камбодже, так как бешенство в этой стране широко распространено и, наряду с Мьянмой, наименее изучено в плане молекулярной эпизоотологии. В Камбодже отсутствует активная система надзора за бешенством. Доступные данные по этому заболеванию поступают только благодаря работе центра антирабической вакцинации и вирусологического отдела Института Пастера в Камбодже. В связи с этим невозможно провести точный анализ динамики изменения числа случаев бешенства собак в этой стране по годам. Тем не менее доступные данные подтверждают, что Камбоджа неблагополучна по бешенству и заболевание в этой стране широко распространено (Institut Pasteur du Cambodge Annual report, 2012, 2013).

Проведенные ранее исследования изолятов ВБ, циркулирующих в Юго-Восточной Азии, выявили первые доказательства существования «Азиатской» филогенетической группы, включающей изоляты, происходящие из Мьянмы, Таиланда, Вьетнама, Лаоса, Камбоджи и некоторых других стран, но их кластирование по филогенетическим линиям проведено не было (Bourhy et al., 2008). Ito et al. провели одно из первых исследований молекулярной эпидемиологии бешенства в Таиланде и идентифицировали 6 филогенетических линий. По крайней мере 4 из них являются эндемичными для центральной («T1C»), южной («T2S») и северной («T1N1» и «T1N2») территорий Таиланда, в то время как две другие линии («T1CS» и «T2NC») выявлялись на различных

территориях (Ito et al., 1999). Yamagata et al. предположили, что филогенетическая линия «SEA1» включает изоляты из Таиланда и Вьетнама (Yamagata et al., 2007). Позднее Nguyen et al. установили существование двух основных филогенетических групп ВБ во Вьетнаме, обозначенные как «группа 1» и «группа 2», первая из которых была разделена на две подгруппы («1a» и «1b») (Nguyen et al., 2011). Подгруппа «1a» по характеристикам совпадает с филогенетической группой «SEA1», описанной в 2007 г. Yamagata et al. Подгруппа «1b» включала вирусы бешенства, выделенные во Вьетнаме, Китае и на Филиппинах. Вторая филогенетическая группа включала вирусы, выделенные в Китае и Вьетнаме. Ahmed et al. пришли к заключению, что изоляты ВБ, выделенные в Таиланде, Малайзии, Камбодже, Вьетнаме и Лаосе происходят от общего предка, вирусы, циркулирующие в Лаосе, являются близкородственными друг другу, но отличаются в генетическом плане от выделенных в других странах Юго-Восточной Азии (Ahmed et al., 2015).

Таким образом, проведенное в рамках данной работы исследование представляет собой первую широкомасштабную научную работу по изучению молекулярной эпизоотологии бешенства в Королевстве Камбоджа.

Большой объем данных о структуре нуклеотидных последовательностей гена нуклеопротеина был получен при изучении изолятов ВБ, выделенных в 20 провинциях Камбоджи в 1998-2011 гг. Большинство изолятов вируса были выделены в столице страны г. Пномпень и ближайших провинциях. Это произошло потому, что единственный центр по диагностике бешенства в Камбодже – Национальный референтный центр по бешенству – и самый крупный Центр по профилактике бешенства Института Пастера в Камбодже расположены в г. Пномпень. В результате, из-за логистических проблем, пробы, полученные от подозреваемых на бешенство собак, собранные в отдаленных районах Камбоджи, направлялись на исследование довольно редко. Тем не менее именно в центральной части Камбоджи, откуда поступило большинство проб, сосредоточено до 70% всего населения страны и до 70% популяции собак.

Изоляты ВБ, выделенные в Камбодже, исследовались в сравнении с

опубликованными в открытых базах данных нуклеотидными последовательностями геномов ВБ, выделенных в Китае, Лаосе, Мьянме, Таиланде и Вьетнаме. В связи с тем, что именно собаки являются основным переносчиком бешенства в Азиатских странах (Dodet et al., 2001), изоляты ВБ, выделенные от этих животных, были предпочтительными для включения в данное исследование.

В ряде случаев изучали также изоляты, выделенные от людей во Вьетнаме, по причине отсутствия в открытых базах данных достаточно репрезентативного количества нуклеотидных последовательностей гена нуклеопротеина изолятов ВБ, выделенных от собак из этой страны. Тем не менее, поскольку собаки являются главным резервуаром бешенства в Азии (Dodet et al., 2001), и подавляющее большинство случаев бешенства человека обусловлено покусами, нанесенными собаками (Nguyen et al., 2011), это не приводит к каким-либо искажениям результатов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что главная филогенетическая группа «Юго-Восточная Азия» («SEA») распространена на территории как минимум 5 стран Юго-Восточной Азии, включая Камбоджу, Вьетнам, Таиланд, Лаос и Мьянму (рис. 76).

Рисунок 76 – Распространение филогенетических линий ВБ в странах Юго-Восточной Азии. *MMR – Мьянма, LAO – Лаос, THA – Таиланд, KHM – Камбоджа, VNM – Вьетнам.

Полученные данные согласуются с данными, полученными Bourhy et al. (Bourhy et al., 2008), и существенно расширяют их, установлено существование трех филогенетических групп в пределах филогруппы «Юго-Восточная Азия». Большинство филогенетических подгрупп в пределах этой филогенетической группы имеют географическую привязанность. Все изоляты ВБ, выделенные в Камбодже, за исключением двух (EU086170 и P0709509), группируются вместе с изолятами, выделенными ранее в Таиланде, Вьетнаме и Лаосе в пределах филогенетической группы «SEA1», по-видимому, самой распространенной в Юго-Восточной Азии. В пределах этой филогенетической группы установлено как минимум 3 подгруппы.

Подгруппа «1» включает изоляты вируса бешенства из Камбоджи, Вьетнама, Таиланда и Лаоса.

Подгруппу «2» формируют два изолята, выделенные от собак в Таиланде (GQ303556 и JN786877). Эти изоляты имеют уникальные биологические характеристики. Так, в случае GQ303556 постэкспозиционная профилактика, назначенная пациенту, оказалась неэффективной, а клинически заболевание имело необычное проявление (Shantavasinkul et al., 2010). Второй изолят, JN786877, после серии пассажей в культуре клеток ВНК-21 приводил к ускоренной гибели мышей при внутримышечном заражении (Virojanapirom et al., 2012). Несмотря на то, что данную подгруппу формируют всего два изолята, повышенная их вирулентность в качестве уникальной биологической характеристики должна быть изучена в дальнейшем.

Подгруппа «3» включает изоляты ВБ, выделенные в Лаосе в 2011-2012 гг. (Ahmed et al., 2015). Группа «SEA1» совпадает с группой 1/ подгруппой 1a, описанной ранее Nguyen et al. (2011) и линией «Юго-Восточная Азия 1», которую идентифицировали Yamagata et al. в 2007.

Филогенетическая группа «SEA2» распространена в Камбодже и Лаосе, в то время как распространение филогенетической линии «SEA3» ограничено территорией Мьянмы. Впервые идентифицированная линия «SEA2» включает несколько изолятов, выделенных в Лаосе, и два изолята из Камбоджи: один

штамм был выделен в городе Пномпень и один – в Банлунге (Banlung), расположенном на северо-востоке Камбоджи, рядом с государственной границей с Лаосом. Принимая во внимание тот факт, что изоляты из Лаоса, включенные в эту филогенетическую группу, были выделены либо в столице страны г. Вьентьян (Vientiane), либо в провинции Чампасак (Champasak), граничащей с Камбоджей, можно считать подтвержденной циркуляцию изолятов этой филогенетической группы в Северной Камбодже и Южном Лаосе со спорадическим их заносом в столицы этих двух стран.

Филогенетическая группа «SEA1» была ранее идентифицирована Yamagata et al., однако бутстрап-значения в опубликованном ими исследовании были очень низкими (32-40) (Yamagata et al., 2007). «SEA1» включает изоляты из Таиланда и Вьетнама, и авторы предположили, что поскольку Камбоджа и Лаос расположены между Таиландом и Вьетнамом, есть вероятность того, что изоляты, циркулирующие в этих странах, близкородственны. Эта гипотеза нашла подтверждение в проведенных в рамках данной работы исследованиях. Столь широкое распространение предполагает наличие условий, способствующих интенсивной циркуляции изолятов ВБ, принадлежащих к этой филогенетической линии в популяциях собак Таиланда, Камбоджи, Лаоса и Вьетнама. Нелегальная торговля бездомными собаками между этими странами, главным образом для употребления их мяса в пищу, могла стать одной из основных причин широкого распространения изолятов – представителей филогенетической линии «SEA1» в Юго-Восточной Азии.

Эволюционный анализ позволил изучить в сравнительном аспекте динамику эволюции изолятов ВБ, выделенных в Камбодже. Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что изоляты, принадлежащие к филогенетической группе «SEA1», имеют общего предка с изолятами группы «SEA2». Эти две филогенетические группы разделились примерно в 1950 г. Следует отметить, что камбоджийские изоляты – представители этой филогенетической группы имели общего предка с изолятами из Лаоса, приблизительно в 1953 г. Возможно, изоляты этой филогенетической группы

были занесены в Лаос из Камбоджи и затем практически вытеснены изолятами – представителями филогенетической группы «SEA1», либо спорадический занос изолятов филогенетической группы «SEA2» имел место из Лаоса в Камбоджу в 60-х годах прошлого века. Вероятнее всего, изоляты – представители этой филогенетической группы более широко распространены на территории Камбоджи, но для подтверждения этой гипотезы необходимо провести более масштабные исследования. В период режима «красных кхмеров» с 1975 по 1979 г., домашние собаки в Камбодже практически полностью исчезли, по причине голода и употребления их мяса в пищу. Это серьезно повлияло на интенсивность циркуляции ВБ.

Основываясь на ограниченном количестве доступных нуклеотидных последовательностей изолятов ВБ из Мьянмы, сделан вывод, что изоляты, принадлежащие к филогенетической группе «SEA3» (Мьянма), отделились от других изолятов приблизительно в 1942 г.

Таким образом, в рамках проведенного исследования установлено существование главной филогенетической группы «Юго-Восточная Азия», включающей как минимум три филогенетических подгруппы. Изоляты ВБ, отнесенные к данной филогенетической группе, широко распространены на территории пяти стран, включенных в данное исследование.

Поскольку филогенетическая подгруппа «SEA1» оказалась наиболее распространенной на территории Камбоджи, выявление филогенетической подгруппы «SEA2» в этой стране могло быть результатом заноса изолятов ВБ этой филогенетической подгруппы из-за границы (например из Лаоса) либо является результатом идентификации менее превалентной группы изолятов, циркулирующей на территории этой страны.

Широкое распространение филогенетической подгруппы «SEA1» в Юго-Восточной Азии предполагает относительно частое перемещение и «смешивание» популяций собак на территории региона. Этот факт может использоваться представителями местных ветеринарных служб и органов здравоохранения при разработке программ борьбы с бешенством, в частности,

путем внедрения мер по ограничению перемещения собак.

Стратегия по искоренению бешенства в Азии (ASEAN, 2015) имеет амбициозную цель искоренить бешенство в Юго-Восточной Азии до 2020 г. Однако, без проведения дальнейших исследований по данному вопросу, достижение этой цели будет невозможно.

Молекулярно-биологические характеристики российских и зарубежных вакцинных штаммов ВБ. В ходе выполнения данной работы были впервые получены полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов «РВ-97» и «Eth_PV». Официальная история происхождения этих штаммов свидетельствует о том, что и «РВ-97», и «Eth_PV» являются дериватами оригинального Пастеровского штамма «PV», выделенного от больной бешенством коровы во Франции в 1882 году и впервые примененного для вакцинации людей против бешенства (Pasteur, 1885). Известно, что штамм «PV» после порядка 1500 пассажей на кроликах был передан в США и Аргентину, откуда он вновь попал во Францию в 1965 г. (по-видимому, ввиду утери штамма во Франции), и адаптирован к росту в культурах клеток. В США из штамма «PV», после пассажей на кроликах и мышах, и адаптации к культивированию в культурах клеток были получены штаммы «PM» и «CVS» (Sacromento et al., 1992). Однако высокий уровень филогенетического родства современного штамма «PV» с представителями филогенетической группы «USA1» ставит под сомнение официальную версию. Штаммы филогенетической группы «USA1» исторически происходят от полевого изолята ВБ, выделенного от собаки в американском штате Алабама, и, очевидно, должны иметь весьма существенные филогенетические отличия от штамма «PV», который изначально был выделен от коровы в г. Париже в 1882 г.

Известно, что в 1886 г., менее чем через год после первого применения Пастеровской вакцины, первые Пастеровские станции были открыты в Одессе и Санкт-Петербурге. Луи Пастер передал российскому врачу Л.И. Войнову, привезшему для прохождения антирабического лечения во Франции 7 человек, двух кроликов, инфицированных Пастеровским штаммом на уровне пассажей

116-117, которые были доставлены в Пастеровскую станцию в г. Санкт-Петербурге. Эта станция начала свою деятельность 13 июля 1886 г., а материал от привезенных кроликов использовался для дальнейшего культивирования и производства антирабической вакцины.

Немногим ранее Пастеровские станции открылись в г. Одессе, Варшаве и Самаре, несколько позднее – в Москве (Гуреева, 1960; Шерстнева, 2012). В дальнейшем этот штамм, по-видимому использовался для производства тканевых антирабических вакцин из мозга овец, в результате чего был получен штамм «овечий» (ВГНКИ). Адаптация штамма «овечий» к культивированию в культурах клеток привела к появлению штаммов «РВ-97» и «ВНИИЗЖ».

Штамм «Eth_PV» попал в Эфиопию в 40-х годах прошлого века. По информации Национального института здравоохранения этой страны, он был завезен из Франции для производства антирабической вакцины ветеринарного и медицинского назначения. Однако ввиду высокого филогенетического родства данного штамма со штаммами, входящими в филогенетическую группу «USA2», данная информация, очевидно, не верна. По-видимому, в Эфиопию был ввезен штамм «РМ». Кроме того, во Францию из Аргентины в 1965 г. попал, вероятнее всего, не оригинальный пастеровский штамм, а один из штаммов группы «USA1». Они оказались филогенетически близкородственны, а изучение равенства уровней эволюции показало отсутствие достоверных различий.

Очевидно, именно штамм «РВ-97» является прямым потомком оригинального Пастеровского штамма, однако ответ на этот вопрос может быть получен только путем секвенирования остатков вируса из знаменитой «Пастеровской склянки» с высушенным спинным мозгом кролика из музея Института Пастера.

Выявленные несоответствия в истории происхождения вакцинных штаммов, тем не менее, не оказывают влияния на качество производимых из них антирабических препаратов при условии соблюдения технологии их приготовления.

Анализ аминокислотных последовательностей пяти вирусных белков

показал, что, как правило, наличие аминокислотных замен соответствует филогенетической группировке.

Нуклеопротеин оказался довольно консервативным, с небольшим количеством уникальных замен. По-видимому, лишь замена A→T в позиции 3 и T→A в позиции 407 (иммунодоминантный сайт нуклеопротеина) может привести к некоторым изменениям антигенных свойств нуклеопротеина, так как в остальных случаях свойства аминокислот в заменах оказались сходными.

Фосфопротеин оказался более вариабельным белком, с большим количеством уникальных замен аминокислот. Исходя из свойств аминокислот, 7 уникальных замен могут оказаться значимыми в антигенном плане в виду разницы их свойств. В последовательности вакцинного штамма из Эфиопии («Eth_PV») обнаружена одна уникальная аминокислотная замена в позиции 9 S→R. Фрагмент фосфопротеина, содержащего два антигенных сайта в позиции 75-90, оказался довольно вариабельным и характерно отличался у групп штаммов «Japan» и «China».

Матриксный протеин довольно консервативен и не содержал большого количества замен. Известно, что замены аминокислот в позиции 58 оказывают влияние на регуляцию синтеза вирусной РНК и некоторые другие процессы (Finke, Conzelmann, 2003). У изучаемых штаммов в данной позиции наблюдается высокая вариабельность. Так, штаммы «SAD B19», «SAD P5/88» и «SRV9» содержат в этой позиции аргинин (R), а штаммы «PV», «ERA» и «SAD Berne», относящиеся к этой же филогенетической группе, глицин (G). Все остальные штаммы содержат в данной позиции глутаминовую кислоту (E), кроме штамма «PM1503», у которого в этой позиции находится аспарагиновая кислота (D).

Анализ аминокислотных последовательностей гликопротеина показал высокую вариабельность этого вирусного белка. Так как именно гликопротеин играет ведущую роль в патогенезе бешенства, в том числе адгезии вирионов к мембране клетки и связывании с ВНА (Tordo et al., 1988), его вариабельность напрямую отражается на иммуногенных свойствах вакцинных штаммов. Проведенные исследования позволили установить наличие аминокислотных

замен в структуре антигенных сайтов гликопротеина, а также их значимость для изменения биологических характеристик штаммов. По-видимому, группа штаммов «USA1» по иммуногенности и динамике развития иммунитета будет отличаться от других групп, в то время как данные характеристики для групп «USA2», «USA3», «Russia», «China», «Japan» могут оказаться сходными.

В последовательностях самого большого вирусного белка – полимеразы – был выявлен ряд аминокислотных замен, однако в связи с тем, что данный белок не содержит иммунодоминантных сайтов, вероятно, эти замены не будут играть значительной роли и оказывать существенное влияние на изменение биологических характеристик штаммов. Это предположение было частично подтверждено при изучении связи молекулярно-биологических различий и иммуногенной активности штаммов «РВ-97» и «SAD B19». Экспериментальная оценка иммуногенности вакцинных штаммов ВБ «РВ-97» и «SAD B19» была проведена ранее (Метлин, 2004), что позволило сопоставить данные, полученные в ходе эксперимента на животных, с результатами анализа аминокислотных последовательностей *in silico*. Иммуногенность указанных вакцинных штаммов изучали путем однократной вакцинации животных с последующим отбором проб крови для определения уровней антирабических ВНА.

При изучении возможности экскреции вакцинного вируса со слюной и накопления его в головном мозге, в течение всего эксперимента проводили отбор проб слюны и головного мозга животных. Анализ полученных данных показал, что при иммунизации животных вакцинным штаммом «РВ-97» наиболее высокий уровень антител наблюдали на 30-е сут после иммунизации. На 15-е сут после иммунизации средний уровень ВНА составил 1,4 МЕ/мл, затем на 30 сут он вырос до 4,5 МЕ/мл и сохранялся на таком уровне на протяжении всего опыта. При использовании вакцинного штамма «SAD B 19» нарастание уровня антител у иммунизированных животных продолжалось до 60-х сут после иммунизации. Средний уровень антител на 15-е сут после иммунизации не превышал 8 МЕ/мл, на 30-е сут находился на отметке 8,7 МЕ/мл, на 60 сут превысил отметку 15,5 МЕ/мл и на 90-е сут снизился до 14,5 МЕ/мл (Метлин, 2004).

Использование лабораторного штамма «CVS» для постановки РН с целью определения уровня антирабических ВНА, образовавшихся в ответ на введение вакцинных штаммов «РВ-97» и «SAD B 19», может вызвать некоторые расхождения результатов. Причиной тому может явиться тот факт, что штамм «CVS» генетически более близок к штамму «SAD B19», чем к «РВ-97» и, следовательно, антитела, образовавшиеся в ответ на применение вакцины на основе «SAD B19», будут более активно нейтрализовать штамма «CVS».

Применение вакцинного штамма «РВ-97» привело к образованию достаточного для защиты уровня антител у 91% животных на 30-е сут после иммунизации. К 90 сут этот показатель снизился до 79%, что, тем не менее считается приемлемым в случае однократной иммунизации.

Применение вакцинного штамма «SAD B 19» вызвало образование достаточного для защиты от заражения бешенством уровня антирабических вируснейтрализующих антител у 100% животных на 30-е сут после иммунизации. Этот показатель в данной группе животных не изменялся на протяжении всего опыта (90 сут).

Принимая во внимание тот факт, что нуклеотидные последовательности гена гликопротеина штаммов «РВ-97» и «SAD B19» отличаются на 9,3%, а аминокислотные последовательности приблизительно на 10%, можно сделать вывод, что выявленные различия оказывают влияние на иммуногенность этих двух штаммов. Это предположение было подтверждено нами экспериментальным путем. Установлено, что при иммунизации животных вакциной на основе штамма «РВ-97» наиболее высокий уровень ВНА антител отмечался на 30-е сут после иммунизации, тогда как при использовании вакцины, приготовленной из штамма «SAD B19» - на 60 сут после иммунизации (Метлин, 2004).

При проведении испытаний установлены различия в сроках образования ВНА антител и иммуногенности, однако обе вакцины являются эффективными средствами профилактики бешенства.

3.3.3 Разработка и внедрение мероприятий по борьбе и профилактике бешенства в РФ и за рубежом

Достижение благополучия по бешенству в мире требует широкомасштабного международного сотрудничества по данному вопросу. Оно должно включать обмен знаниями, опытом и внедрение современных технологий, что особенно актуально для развивающихся стран. Данная концепция предполагает передачу знаний странами, успешно искоренившими бешенство либо находящимися на более высоком технологическом уровне, государствам, в которых ситуация по бешенству не взята под должный контроль, где проводятся неэффективные ветеринарные мероприятия, применяются устаревшие антирабические вакцины.

В рамках данной работы реализовывались программы российско-финского сотрудничества по профилактике бешенства в граничащих с Финляндией регионах РФ, а также сотрудничества Россия-ЕС по искоренению бешенства в Калининградской области, оказывалась помощь Эфиопии в освоении технологии производства культуральных инактивированных антирабических вакцин, в Камбодже проводилось изучение молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов ВБ. Для достижения благополучия по бешенству в РФ разрабатывались методические рекомендации по борьбе с бешенством, а также Комплекс мер по профилактике и борьбе с бешенством в государствах – участниках СНГ до 2025 г.

Результаты российско-финского сотрудничества по профилактике бешенства в граничащих с Финляндией регионах России. Российско-финская программа по профилактике бешенства в граничащих с Финляндией регионах РФ стартовала в 2000 г. с подписания протокола от 28 марта 2000 г. между ФГУ «ВНИИЗЖ» и финским институтом EELA «О сотрудничестве по профилактике бешенства животных». Позднее, 7 сентября 2000 г., в финском городе Лаппенранта была утверждена программа профилактической оральной антирабической вакцинации (прил. 19). Целью реализации данной программы было недопущение заноса бешенства с территории России на территорию

благополучной по этому заболеванию Финляндии. Основные программные мероприятия включали проведение оральной вакцинации диких животных в приграничных районах Финляндии и России – граница с Ленинградской обл. и часть границы с Республикой Карелия: мониторинг бешенства; мониторинг иммунного статуса диких плотоядных и изучение молекулярно-биологических и антигенных характеристик полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ. Программа включала регулярный обмен информацией об эпизоотологической ситуации в России и Финляндии, а также сотрудничество по совершенствованию средств и методов диагностики бешенства.

В Финляндии антирабическая иммунизация диких хищников была начата в 1988 г. в связи с возникновением эпизоотии лесного бешенства. В ходе этой эпизоотии было подтверждено 66 случаев бешенства животных (48 енотовидных собак, 12 рыжих лисиц, 2 барсука, 2 кошки, 1 собака и 1 бык). Всего за период с 8 апреля 1988 г. по 16 февраля 1989 г. было исследовано на бешенство 2195 проб патматериала от диких и 820 от домашних животных (Nyberg M. et al., 1992).

С целью подавления вспышки лесного бешенства для иммунизации диких животных использовалась живая аттенуированная вакцина «FUCHSORAL» на основе штамма «SAD B 19». С 1982 г. данный штамм применяется для вакцинации диких животных во многих европейских странах, таких как Чехия (Matouch et al., 2000), Швейцария (Steck et al., 1982), Финляндия (Westerling., 1989; Nyberg et al., 1992), а также Италия, Бельгия, Люксембург, Словения, Словакия, Венгрия и др. За период с 1983 по 1988 г. было применено более 70 млн вакцинных приманок.

Общие принципы отбора проб головного мозга для диагностики бешенства были разработаны и опубликованы ранее (ГОСТ 26075-84; Meslin et al., 1996).

В ходе проведения мониторинговых исследований до оральной вакцинации, положительных на бешенство проб головного мозга выявлено не было. Однако было выявлено несколько серопозитивных животных. Обнаружение антирабических антител в сыворотках крови, полученных от лисиц в Ленинградской обл., до проведения вакцинации можно объяснить близким

расположением зоны вакцинации с финской стороны. Вакцинация против бешенства, на момент проведения исследований, проводилась в этой стране уже более 10 лет, и не исключена миграция лисиц с территории Финляндии в Ленинградскую обл. Труднее объяснить обнаружение положительного результата в пробах, отобранных у диких животных в Мурманской обл. Аналогичные трудности возникали у ветеринарных специалистов EELA при обнаружении положительных сывороток крови, поступивших из Лапландии. Возможным объяснением может служить низкое качество некоторых проб сывороток крови, многие из которых оказывались токсичными для культуры клеток ВНК-21, что существенно затрудняло проведение диагностических исследований.

Результаты мониторинга, проведенного в последующие годы, свидетельствуют о положительном эффекте проводимых в этом регионе антирабических мероприятий в дикой среде. Небольшое количество серопозитивных животных в зоне вакцинации объясняется недостаточным количеством проб, собранных в период до 2008 г. в зоне вакцинации, что было связано с техническими и финансовыми проблемами. В 2008-2009 гг. работа была скорректирована и интенсифицирована, а показатели серопозитивности животных выросли. Так, в 2009 г. количество проб, содержащих достаточный для защиты от бешенства уровень антирабических ВНА в Республике Карелия составило 80%, а в Ленинградской обл. приблизилось к 50%, при этом полностью решить вопрос репрезентативности выборки, в силу ряда технических причин, не удалось, и процент серопозитивных животных, выявляемых в зоне вакцинации, редко приближался к 70%. Тем не менее за всю историю проведения мониторинга случаев бешенства в зоне вакцинации выявлено не было, что свидетельствует об эффективности реализации предусмотренных Программой мероприятий. Опыт финских коллег показывает, что уровень сероконверсии в зоне вакцинации может варьировать от 13% (у барсуков) до 67% у лисиц и 72% у енотовидных собак (Nyberg et al., 1992).

Российско-финское сотрудничество при участии референтных лабораторий

МЭБ позволило ФГБУ «ВНИИЗЖ» в кратчайшие сроки разработать, адаптировать и внедрить в лабораторную практику 7 методов лабораторной диагностики, а также успешно подтвердить свою квалификацию в области диагностики бешенства и определения уровней антирабических ВНА при прохождении МСИ.

Сотрудничество Россия-ЕС по искоренению бешенства в Калининградской области. Калининградская обл. являлась стационарно неблагополучным по бешенству регионом. Широкомасштабная оральная вакцинация против бешенства диких плотоядных животных с применением GIS-технологий и привлечением средств малой авиации в регионе стартовала в 2007 г. Однако в первые годы, вопреки международным рекомендациям вакцинация, по техническим причинам, проводилась один раз в год, двукратная вакцинация стартовала лишь в 2009 г. Результаты оценки поедаемости и иммуногенности используемой в этой области оральной антирабической вакцины представлены в диссертационных работах А.Ю. Сухарькова, 2014 г. и Е.В. Чернышовой, 2018 г., а также детально проанализированы Хисматуллиной с сотр. установлено снижение заболеваемости бешенством в Калининградской обл. к 2011 г. по сравнению с 2006 г. в 2,2 раза, при этом поедаемость приманок лисицами составила 67,2%, уровень сероконверсии – 67,1%; поедаемость приманок енотовидными собаками составила 58,8%, уровень сероконверсии – 44,0% (Хисматуллина с соавт., 2012).

Все основные мероприятия, включая распространение вакцинных приманок авиационным способом и сбор проб головного мозга, крови/трупной жидкости и костной ткани для оценки эффективности вакцинации, осуществлялись специалистами ветеринарной службы Калининградской обл. В рамках выполнения данной научной работы проводилась корректировка плана мониторинга эффективности антирабических мероприятий на основе полученных результатов мониторинга.

Проведение широкомасштабной оральной вакцинации диких плотоядных животных имело незамедлительный эффект как в странах Балтии, так и в

Калининградской обл. Однако скорость снижения числа случаев бешенства отличалась, как и период времени с начала вакцинации до достижения стойкого благополучия по бешенству. Так, в Эстонии на это ушло 7 лет, в Латвии – 8, в Литве – 9. В Калининградской обл. стойкого благополучия по бешенству удалось добиться уже через 6 лет после начала мероприятий по искоренению бешенства. При этом показано, что применение оральной антирабической вакцины 2 раза в год (весной и осенью) гарантированно приводило к резкому снижению числа случаев бешенства и в конечном итоге к полному искоренению заболевания.

Сотрудничество с Эфиопией по внедрению роллерного метода культивирования ВБ с целью получения прототипа культуральной антирабической вакцины. Данная работа проводилась в рамках реализации программы по расширению содействия в борьбе с инфекционными болезнями в развивающихся странах и по укреплению лабораторного потенциала в соответствии с Братиславскими соглашениями президентов России и США, подписанными в 2005 г.

На момент проведения работы в Эфиопии изготавливали тканевую антирабическую фенолвакцину из мозга овец. Производство такой вакцины для медицинских и ветеринарных целей не рекомендуется международными организациями, занимающимися обеспечением здоровья животных и людей, такими как ВОЗ и МЭБ (OIE Terrestrial Manual 2017). Причиной тому является остаточная вирулентность вакцинного ВБ, а также большое количество миелина, который может вызвать при введении в организм человека или животного демиелинизирующий энцефалит. Кроме того, в мозге овец нередко обнаруживают паразитов (рис. 77), могут содержаться возбудители прионных болезней, например скрепи овец, мониторинг которой в Эфиопии не проводится.

В наших исследованиях была подтверждена остаточная вирулентность производимого тканевого вакцинного препарата, что свидетельствует о необходимости внедрения в производство культуральной антирабической вакцины.

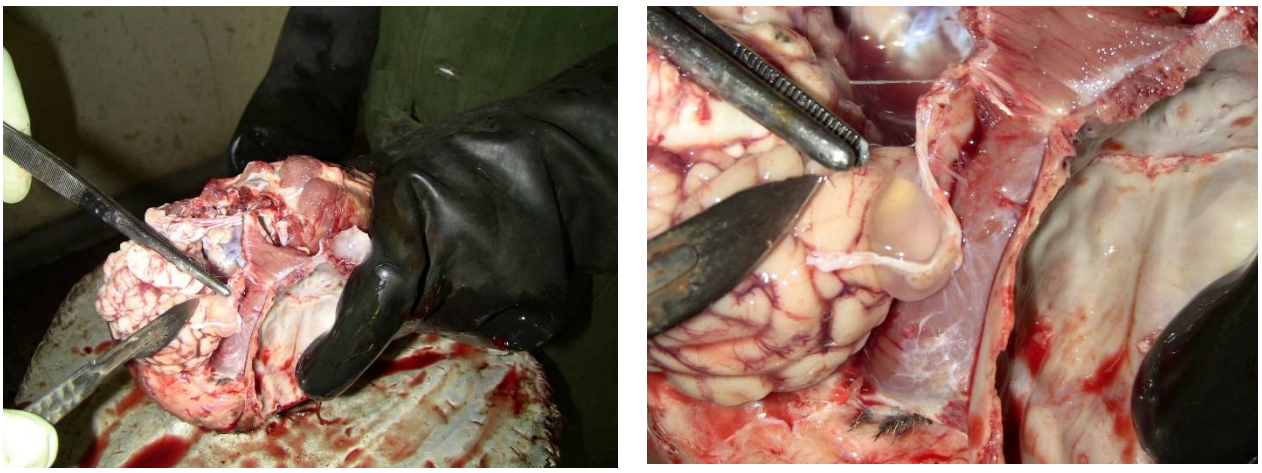


Рисунок 77 – Локализация эхинококковых цист в головном мозге овец. *Цисты обнаружены при извлечении головного мозга с целью получения материала для производства антирабической вакцины.

Культивирование ВБ в биореакторах является производительным и эффективным методом. Однако в условиях развивающейся страны, такой как Эфиопия, и с учетом имеющегося оборудования было принято решение о внедрении роллерного метода культивирования ВБ.

В связи с тем, что разрабатываемый прототип вакцины предполагалось применять как в ветеринарных, так и в медицинских целях, в качестве системы для культивирования была выбрана культура клеток Vero, которую широко используют для производства инактивированных антирабических вакцин (Волкова, 1997; Якин с соавт., 2010; Генералов с соавт., 2014).

Роллерный метод культивирования был успешно адаптирован к местным условиям и позволил получить прототип антирабической вакцины с приемлемыми характеристиками. В соответствии с рекомендациями МЭБ вакцина должна содержать как минимум 2,5 МЕ в одной дозе. Полученные результаты показали, что прототип вакцины оказался более иммуногенным и пригодным для дальнейших испытаний. Позднее Генералов с соавт. также сообщили об успешном культивировании вакцинного штамма «Москва 3253» с использованием технологии роллерного культивирования в культуре клеток Vero (Генералов с соавт., 2014).

Подходы к разработке программ по борьбе и профилактике бешенства. Одной из эффективных мер предупреждения заболеваемости

бешенством человека является элиминация вируса среди собак. Для этого необходимы современные эффективные программы, включающие массовую вакцинацию животных и ряд других мероприятий (Анисина с соавт., 2015). В связи с тем, что установлена тенденция к расширению территориальных границ эпизоотического проявления рабической инфекции на территории РФ, необходимость усовершенствования профилактических и противоэпизоотических мероприятий на региональном и федеральном уровнях не вызывает сомнений (Пашкина, Сочнев, 2005). Отсутствие национальной программы борьбы с данным зооантропонозом не позволяет добиться существенных успехов в сокращении количества больных бешенством животных (Сливко с соавт., 2013).

Одной из основ антирабических мероприятий является наличие законодательной базы, учитывающей современные достижения науки, а также опыт, полученный международным сообществом в борьбе и профилактике бешенства. Реализация масштабных международных научных проектов, а также комплекс научно-исследовательских работ, проведенных в рамках подготовки данной работы, позволили сформулировать основные критерии, которые необходимо учитывать при подготовке межнациональных, национальных, региональных, областных и других программ по борьбе и профилактике бешенства.

Сравнительный анализ зарубежной нормативно-правовой базы по диагностике, профилактике и карантинным мероприятиям при заболевании животных бешенством был проведен по следующим странам: Великобритания, Франция, Германия, Италия, Финляндия, США, Эфиопия. В связи с членством всех перечисленных стран в международных организациях, таких как МЭБ и ВОЗ, проанализированная нормативно-правовая база отвечает требованиям этих организаций. Во всех случаях применимы требования по продолжительности инфекционного периода в 15 сут и инкубационного периода в 6 мес., а также основные правила определения статуса страны по бешенству, а именно:

- бешенство на территории страны подлежит обязательной нотификации;

- реализуется эффективная система надзора и мониторинга бешенства;
- применяются эффективные меры, направленные на профилактику и борьбу с бешенством, включая контроль импорта;
- в течение последних 2 лет не выявлялось случаев бешенства среди людей или любых видов животных (за исключением лиссавирусов летучих мышей);
- за последние 6 мес. не выявлялось случаев бешенства среди импортированных животных за пределами карантинных помещений.

В связи с членством в ВОЗ на территории указанных стран действует ряд нормативных документов, в том числе рекомендательного характера. При проведении лабораторных работ, для обеспечения биобезопасности, применяются положения практического руководства по биологической безопасности в лабораторных условиях (Laboratory Biosafety Manual, 3rd Edition, WHO, 2004). При перевозке инфицированных материалов применяются положения руководства по перевозке инфекционных материалов (Guidelines on Regulations for the Transport of Infectious Substances, WHO, 2007). Выпущены рекомендации по производству и контролю качества инактивированных антирабических вакцин, а также по оральной вакцинации животных против бешенства. Заключение экспертов ВОЗ (WHO, 2013) по бешенству содержит рекомендации в отношении основных мероприятий по борьбе с бешенством животных и человека.

Такие страны, как Великобритания, Франция, Германия, Италия, Финляндия, входят в состав Европейского союза, который также принял ряд нормативных документов, обязательных к применению на территории ЕС. Перемещение, экспорт и импорт животных, семени, яйцеклеток и эмбрионов регулируется директивой 92/65/EEC от 13 июля 1992 г., распоряжением Европарламента 2001/C 531 E/08 от 19 сентября 2000 г. и решением Еврокомиссии 2007/275/EC от 17 апреля 2007 г. Применение генно-модифицированных препаратов, в том числе генно-инженерных антирабических вакцин, регулируется Решением Еврокомиссии 93/572/EEC.

В рамках членства в международных организациях Великобритания,

Франция, Германия, Италия, Финляндия, США привели свои нормативно-правовые акты в соответствие международным требованиям. Однако этого не произошло в Эфиопии, где на момент проведения исследования (2009-2011 гг.) отсутствовала полноценная законодательная база по диагностике, профилактике и борьбе с бешенством.

Законодательство Российской Федерации, безусловно, нуждается в доработке с целью приведения его в соответствие международным требованиям. В частности, в скорейшем обновлении и дополнении нуждается законодательство в области диагностики бешенства. В связи с появлением новых методов лабораторной диагностики этой инфекции необходимо ужесточение правил содержания домашних плотоядных животных и их идентификации.

В Великобритании, Франции, Германии, Италии, Финляндии и США для диагностики бешенства используют современные общепринятые методы: реакция иммунофлуоресценции, вирусовыделение в культуре клеток мышиной нейробластомы, полимеразная цепная реакция. Биопроба на мышах не используется. Исследование проб сывороток крови домашних животных на предмет наличия антирабических ВНА проводится на платной основе в реакции подавления иммунофлуоресценции в культуре клеток ВНК-21. Для изучения молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов и вакцинных штаммов ВБ используется нуклеотидное секвенирование и филогенетический анализ. Все перечисленные методы стандартизированы на международном уровне и утверждены МЭБ и ВОЗ.

В Эфиопии, из-за отсутствия соответствующего оборудования и финансирования, диагностика бешенства ограничена применением реакции иммунофлуоресценции и биопробы на мышах.

В России в большинстве лабораторий для диагностики бешенства применяют реакцию иммунофлуоресценции, а также устаревшую, и более не используемую в развитых странах, биопробу на мышах.

В Великобритании, Франции, Германии, Италии, Финляндии, США законодательно закреплена обязательная антирабическая вакцинация собак.

Кроме того, все антирабические мероприятия прописаны для трех основных видов животных, наиболее часто содержащихся в домашних условиях и при заражении бешенством представляющих наибольшую опасность для людей: собаки, кошки и хорьки. В российском законодательстве внимание сконцентрировано больше на собаках и кошках, в то время как хорьки все чаще содержатся в качестве домашних животных. Для проведения антирабической вакцинации в этих странах утверждается список рекомендованных вакцин. Кроме того, независимо от рекомендаций производителей может устанавливаться минимальный интервал для антирабической вакцинации в 2 года, а для некоторых категорий собак – ежегодно.

В странах ЕС основные критерии программы борьбы с бешенством путем оральной иммунизации диких животных приняты в соответствии с директивой 92/65/EEC от 13 июля 1992 г. и Решением 90/638/EEC от 27 ноября 1990 г.

В России отсутствует единая стратегия по борьбе с бешенством животных, оральная вакцинация проводится нерегулярно, что существенно снижает ее эффективность.

В Великобритании, Франции, Германии, Италии, Финляндии, США, в соответствии с международным и внутренним законодательством, разрешается ввоз только вакцинированных против бешенства собак, кошек и хорьков. В ряде случаев также требуется антирабическая иммунизация лошадей. Карантин подозрительных на бешенство животных составляет не менее 14 сут (в России – 10 сут); животных, покусанных больными бешенством животными, умерщвляют или карантинируют в течение 45 сут – 6 мес., в зависимости от статуса покусанного животного по антирабической иммунизации (сроки, наличие в крови антирабических ВНА). Не вакцинированные против бешенства собаки, кошки или хорьки, ввезенные на территорию Великобритании, Франции, Германии, Италии, Финляндии или США, подлежат уничтожению или карантинированию в течение 6 мес. При этом все расходы, связанные с содержанием животного на карантине, оплачивает хозяин животного.

В странах ЕС действует упрощенный режим перемещения животных в

пределах границ ЕС – при этом достаточно иметь справку, подтверждающую наличие в крови животного достаточного уровня антирабических ВНА. При ввозе животных из третьих стран требуется международный сертификат, а также справка о состоянии здоровья животного, выданная ветеринарным врачом за 24 ч. до поездки. США требуют извещать соответствующие службы за 72 ч. до предполагаемой перевозки животного. Такие же требования, но рекомендательного характера, содержатся в законодательстве Финляндии.

При ввозе-вывозе животных особое значение уделяется их идентификации с помощью татуировок или микрочипов, вживленных под кожу. Данная система оказывает неоценимую помощь в борьбе с бешенством домашних животных, так как позволяет точно их идентифицировать, установить происхождение, наличие хозяев, а также статус по антирабической вакцинации. Запрещается содержать диких животных в домашних условиях ввиду отсутствия сертифицированных парентеральных антирабических вакцин.

Разработанные в интересах Минсельхоза РФ методические рекомендации регламентируют и стандартизируют методы борьбы и профилактики бешенства всех видов диких, сельскохозяйственных и домашних животных.

Одним из главных направлений в мировых программах борьбы с бешенством является специфическая профилактика (Саввин с соавт., 2005). В связи с этим в методических рекомендациях детально регламентированы правила профилактики и борьбы с бешенством в хозяйствах различных форм собственности, а также в природной и городской среде, изложена концепция проведения оральной антирабической вакцинации диких животных, составленная в соответствии с международными рекомендациями. На протяжении многих лет в РФ проводится специфическая профилактика бешенства путем вынужденной вакцинации крупного рогатого скота, а с конца 70-х годов прошлого столетия и профилактическая, в районах, стационарно неблагополучных по бешенству, в основном вынужденно, непосредственно при возникновении очагов рабической инфекции. Сложившаяся система специфической профилактики бешенства требует серьезной корректировки

(Саввин с соавт., 2005; Сочнев с соавт., 2015). В связи с этим и с учетом мнения ряда авторов по данному вопросу (Лосич с соавт., 2012) нами сделан акцент на вакцинацию основных переносчиков бешенства – диких и домашних (в том числе бездомных) плотоядных.

Известно, что важным элементом антирабических мероприятий является планирование реально возможных мер по сокращению экологической емкости среды обитания, при осуществлении которых постепенное уменьшение плотности популяции не нарушает ее структуры (Алиев с соавт., 2005). При этом в рамках данных рекомендаций обозначены мероприятия по повышению ответственности владельцев животных, а также местных администраций – по ограничению доступа животных к контейнерам с бытовыми и пищевыми отходами.

В перспективе в методические указания могут быть включены разрабатываемые в настоящее время методы контроля численности популяции бездомных собак на основе иммуноконтрацепции (Романенко с соавт., 2014).

Предложенные подходы легли в основу разработанного и утвержденного Советом глав правительств государств – участников СНГ «Комплекса совместных действий государство – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года», который был отмечен золотой медалью российской агропромышленной выставки «Золотая осень – 2018» (прил. 25).

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении обобщены результаты проведенных исследований, которые позволили сделать следующие выводы:

1. В мировой практике используется ряд методов лабораторной диагностики бешенства, оценки антирабического иммунитета, оценки поедаемости оральных антирабических вакцин, многие из которых на момент проведения исследований по теме данной диссертации в РФ не применялись либо требовали адаптации и усовершенствования. Опыт проведения межлабораторных сличительных испытаний, используемых в мировой практике для контроля качества лабораторной диагностической деятельности, ранее не был реализован в РФ.

2. Схема диагностики бешенства разработана на основе 10 лабораторных методов, позволяющих проводить выявление антигена, генома, а также выделение живого вируса. Методы разделены на 3 уровня в зависимости от показаний по их применению, а также условий, которые должны быть соблюдены при принятии решения о постановке диагноза. Предложенная схема и методы лабораторной диагностики позволяют поставить окончательный диагноз на бешенство вне зависимости от качества поступившего патологического материала и способа его консервирования.

3. Экспресс-метод диагностики бешенства в РАЛ, разработанный в рамках данной диссертационной работы, обладает чувствительностью 0,1-0,125 мкг/мл и позволяет проводить исследования на бешенство без применения специального оборудования. Это выгодно отличает данный метод от других лабораторных методов и делает его перспективным в плане применения в ветеринарных лабораториях с низкой обеспеченностью оборудованием.

4. Разработанные иммуногистохимический метод исследования и прямой жидкофазный вариант реакции иммунофлуоресценции позволяют проводить исследования проб головного мозга, консервированных формалином, что отличает их от других методов лабораторной диагностики и позволяет применять эти методы для постановки диагноза на бешенство с использованием

проб головного мозга, поступающих в консервированном формалином виде в рамках мониторинга ГЭ КРС, а также проведения научно-исследовательских работ.

5. Разработана и внедрена в РФ система эпизоотологического мониторинга бешенства. В период с 2011 по 2013 г. количество регионов РФ, участвующих в мониторинге, возросло с 22 до 55. Это позволило уточнить эпизоотологическую ситуацию по бешенству в РФ, выявив большее количество случаев заболевания, а также своевременно провести антирабические ветеринарные мероприятия.

6. Разработан и внедрен комплекс из 4 методов определения антирабических антител у домашних, сельскохозяйственных и диких животных и схема применения этих методов. Проведен мониторинг эффективности парентеральной антирабической иммунизации животных по городам: Москва, Санкт-Петербург, Саратов, Волгоград, Ставрополь, Владимир, Нижний Новгород, а также некоторым другим городам, имеющим статус районных центров. Было установлено, что в большинстве случаев мероприятия по иммунизации эффективны, а уровень сероконверсии превышает 70%.

7. Разработаны и внедрены в ветеринарную практику РФ межлабораторные сличительные испытания по диагностике бешенства. Внедренные межлабораторные сличительные испытания проводятся в стране с 2010 г. по настоящее время. Они позволили подтверждать компетентность проверяемых лабораторий, выявлять ошибки специалистов и впоследствии проводить корректирующие мероприятия.

8. Разработаны методы дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства с применением ферментов рестрикции, а также ПЦР-РВ и нуклеотидного секвенирования. Применение данных методов позволило подтвердить отсутствие реверсии аттенуированного вакцинного штамма «РВ-97», используемого для оральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства.

9. С помощью моноклональных антител изучены антигенные

характеристики 233 полевых изолятов вируса бешенства, выделенных в России, Финляндии и Эстонии, установлено существование пяти антигенных вариантов, четыре из которых выявлялись на территории РФ, а один ранее не выявлялся. Эти результаты существенно расширяют научные знания в области антигенной вариабельности полевых изолятов вируса бешенства.

10. Получены 35 полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории 14 регионов РФ, изучены их молекулярно-биологические характеристики, установлены филогенетические и эволюционные связи. Выявлено существование двух филогенетических групп (Пан-Евразийской и Кавказской, разделенных Кавказской горной грядой), а также ряда подгрупп, имеющих строгую географическую приуроченность. С помощью методов молекулярной эпизоотологии проведено расследование причин возникновения бешенства в Финляндии в 1988-1989 гг., а также случая ввоза животного, инфицированного бешенством, в эту страну в 2003 г.

11. На основе изучения 149 полевых изолятов вируса бешенства из 20 провинций Королевства Камбоджа детально изучена молекулярная эпизоотология бешенства в этой стране, подтверждено существование двух филогенетических подгрупп. Изучены филогенетические и эволюционные связи изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территориях Камбоджи, Лаоса, Вьетнама, Мьянмы и Китая. Наиболее репрезентативная филогенетическая группа «SEA1» сформировалась в 1970-х годах прошлого века, в нее входят изоляты вируса из Камбоджи, Вьетнама, Таиланда и Лаоса, что связано с глобальными социальными потрясениями (война, голод) в данном регионе, а также с активным перемещением собак в более поздние годы. Установлена связь филогенетической группировки вирусов, входящих в сублинию 2-й филогруппы «SEA1» с их уникальными биологическими характеристиками, такими как ускоренная гибель зараженных лабораторных животных и необычное клиническое проявление заболевания.

12. Получены последовательности полных геномов вакцинных штаммов «РВ-97» (Россия) и «Eth_PV» (Эфиопия), изучены их филогенетические связи и

антигенные характеристики в сравнении с наиболее распространенными вакцинными штаммами вируса бешенства. Восстановлена история происхождения ряда вакцинных штаммов, в том числе «PB-97» и «Eth_PV». Показано, что штамм «PB-97» является прямым потомком оригинального Пастеровского штамма.

13. Успешно реализованы международные программы по организации буферной зоны с целью профилактики бешенства между Россией и Финляндией. В рамках сотрудничества России и стран ЕС достигнуто стойкое благополучие по бешенству территории Калининградской обл. В рамках Братиславских соглашений президентов России и США оказана научно-техническая помощь Эфиопии, внедрена технология роллерного культивирования клеток и вируса бешенства, получен прототип вакцины, отвечающий требованиям МЭБ/ВОЗ, предназначенный для замены тканевого антирабического препарата, применяемого в этой стране.

14. Разработаны критерии планирования, проведения и оценки антирабических мероприятий в хозяйствах различных форм собственности. В интересах Минсельхоза РФ подготовлен проект «Методических рекомендаций по борьбе с бешенством». Подготовлен, утвержден главами правительств и введен в действие «Комплекс совместных действий государств - участников СНГ на период до 2025 г.». Принятие этих документов позволит улучшить эпизоотологическую ситуацию по бешенству, снизить экономический ущерб, наносимый заболеванием, и обезопасить население от заражения бешенством в РФ и других странах.

5 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдрахманов, С.К. Эпидемиологическая ситуация бешенства в Республике Казахстан / С.К. Абдрахманов, К.К. Есенбаев, С.Т. Дюсембаев // Молодой ученый. - 2017. - №6.1. - С. 1-4. - URL https://moluch.ru/archive/140/39363/ (дата обращения: 26.03.2018).
2. Абортивное и возвратное бешенство у собак, зараженных в мозг уличным вирусом бешенства / С.В. Грибенча, Л.Я. Грибанова, Г.Б. Мальков, И.Ф. Баринский // Вопр. вирусологии. - 1989. - № 2. - С. 217-221.
3. Амичба, М.Ф. Ветеринарная служба Республики Абхазия на страже здоровья животных и человека / М.Ф. Амичба, О.В. Теремков, Э.А. Аншба // Ветеринария Кубани. - 2013. - № 3. - С. 11-12.
4. Анисина, О.В. Контроль и профилактика бешенства собак / О.В. Анисина // Достижения молодых ученых в ветеринарную практику: материалы IV Междунар. науч. конф., посвящ. 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2016. - С. 56-60.
5. Анисина, О.В. Оценка методов контроля и профилактики бешенства собак / О.В. Анисина, В.И. Клюкина, М.Н. Романенко // Вопр. нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2015. - № 2. - С. 21-23.
6. Антигенная активность концентрированной и очищенной культуральной антирабической вакцины из штамма Внуково-32-107 / М.А. Селимов, Л.Б. Эльберт, Т.А. Аксенова [и др.] // Вопр. вирусологии. - 1977. - № 5. - С. 581-585.
7. Баньковский, Д.О. Иммунобиологические свойства штамма ERA G333 вируса бешенства для изготовления оральной антирабической вакцины: дис. канд. вет. наук: 06.02.02 / Баньковский Денис Олегович. - Щелково, 2010. - 123 с.
8. Бешенство животных разных видов в современных условиях – эпизоотологический образец и клиническая характеристика // В.В. Макаров, С.И. Джупина, В.А. Ведерников [и др.] // Ветеринарная патология. - 2002. - № 1. - С. 65-71.

9. Ботвинкин, А.Д. Бешенство на сопредельных территориях России и Монголии (исторический обзор) / А.Д. Ботвинкин, Д. Отгонбаатар // Сибирский мед. журн. - 2006. - №7. - С. 8-9.
10. Ботвинкин, А.Д. Зоонозные инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (научный обзор) / А.Д. Ботвинкин // Профилактическая и клиническая медицина. - 2017. - № 2 (63). - С. 28-35.
11. Ботвинкин, А.Д. Итоги изучения антигенного разнообразия вируса бешенства на территории бывшего СССР / А.Д. Ботвинкин, И.В. Кузьмин, Н.А. Хисматуллина // Ветеринарная патология. - 2004. - № 3. - С. 117-127.
12. Вакцина против бешенства с новым иммуностимулирующим комплексом / И.Н. Матвеева, А.Я. Самуйленко, С.А. Грин [и др.] // Актуальные пробл. общества, науки и образования: современное состояние и перспективы развития: материалы III междунар. научно-практ. конф. / под ред. Ю.В. Фурмана, Т.Б. Белозеровой, Е.П. Непочатых. - М., 2016. - С. 475-480.
13. Ветеринарные Правила 13.3.1103-96 "Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. Бешенство»: утв. Госкомсанэпиднадзором РФ 31.05.1996, N 11, Минсельхозпродом РФ 18.06.1996, N 23.
14. Видеоцифровой анализ для лабораторной диагностики: комплекс «эксперт-лаб» на основе сканера для документирования, объективизации и регистрации результатов латекс-агглютинационных, гемагглютинационных тестов, изосерологических и иммуноферментных исследований / Т.А. Старовойтова, В.В. Зайко, Н.А. Стериополо [и др.] / Лаборатория. - 2006. - № 1. - С. 19-22.
15. Вишняков, И.Ф. Перспективы использования иммуногистохимического теста для диагностики бешенства / И.Ф. Вишняков, В.В. Недосеков, К.Н. Груздев // Пробл. инфекционной патологии с. - х. животных: тез. докл. конф., посвящ. 100-летию открытия вируса ящура. - Владимир,1997. - С. 185-186.

16. Возможные причины неудачи оральной антирабической иммунизации диких плотоядных животных в российской федерации / И.А. Сливко, Г.А. Сафонов, Е.М. Хрипунов [и др.] // Ветеринария. - 2013. - № 10. - С. 27-31.
17. Волкова, А.В. Культивирование вируса бешенства штамма Внуково-32 в культуре перевиваемых клеток для производства антирабической вакцины: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.06 / Волкова Аэлита Витальевна. - М., 1997. - 19 с.
18. Выращивание вируса бешенства в культурах клеток различного происхождения / В.А. Балабанов, Т.В. Сологуб, И.В. Никишин [и др.] // Вопр. веет. вирусологии микробиологии и эпизоотологии: тез. докл. науч. конф. - Покров, 1990. - С. 70-71.
19. Гамалея, Н.Ф. Пастер / Н.Ф. Гамалея, И.И. Мечников, К.А. Тимирязев. - М.: Л.: Изд-во АН СССР, 1946. - 52 с.
20. Горбачева, П. Рекомбинантная антирабическая вакцина для оральной иммунизации лисиц / П. Горбачева, В.В. Макаров // Ветеринарная патология. - 2010. - № 2. - С. 16-18.
21. ГОСТ 26075-2013 Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства. Межгосударственный стандарт. - М.: Стандартинформ, 2014. – 10 с.
22. Грибенча, Л.Ф. Биологическая и серологическая характеристика аттенуированного варианта штамма Внуково-32 / Л.Ф. Грибенча, М.А. Селимов, Т.А. Аксенова // Вопр. мед. вирусологии. - М., 1975. С. 483-484.
23. Грибенча, С.В. Абортивное бешенство в эксперименте / С.В. Грибенча, Г.Л. Зубр, А.П. Савинов // Вопр. мед. вирусологии. - М., 1975. - С. 484-485.
24. Груздев, К.Н. Бешенство животных / К.Н. Груздев, В.В. Недосеков. - М.: Аквариум, 2001. - 303 с.
25. Гулюкин, М.И. Развитие эпизоотической волны бешенства в 2013 – 2015 гг. на территории европейской части Российской Федерации / М.И. Гулюкин, А.А. Шабейкин // Противоэпизоотические и противоэпидемические

мероприятия по профилактике заболевания бешенством людей и животных в Московской области: тез. докл. научно-практ. конф. Московской обл. / отв. ред.: канд. вет. наук Ю.И. Барсуков; Главное управление ветеринарии Московской области. - М., 2016. - С. 85-95.

26. Гулюкин, А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза / А.М. Гулюкин // Вопр. вирусологии. - 2014. - № 3. - С. 5-10.
27. Гулюкин, А.М. Эпизоотологические аспекты бешенства на территории Российской Федерации / А.М. Гулюкин, О.Н. Зайкова, А.В. Паршикова // Единый мир - единое здоровье: материалы конгр. - Уфа, 2017. - С. 259-264.
28. Гулюкин, А.М. Эпизоотологический мониторинг и совершенствование серологического контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.02.02 / Гулюкин Алексей Михайлович. - Казань, 2011. - 21 с.
29. Гуреева, Н.М. Пастера с Русскими учеными в связи с созданием в Петербурге пастеровской (антирабической) станции / Н.М. Гуреева, Л. Переписка // Вестн. акад. мед. наук СССР. - 1960. - № 9. - С. 87-90.
30. Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: прижизненная и постмортальная лабораторная диагностика / Н.А. Хисматуллина А.М. Гулюкин, М.И. Гулюкин [и др.] // Вопр. вирусологии. - 2015. - Т.60, № 2. - С. 18-24.
31. Диагностика бешенства (клинический случай) / В.Х. Фазылов, Г.Х. Муртазина, Ю.Р. Урманчеева, Р.И. Мингажева // Практ. медицина. - Т. 83, № 7. - 2014. - С.121-123.
32. Диагностика бешенства животных / А.В. Иванов, Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов, А.Н. Чернов. - М.: ФГНУ Росинформагротех, 2007. - 60 с.
33. Диагностика бешенства методом твердофазного непрямого сэндвич-варианта иммуноферментного анализа / Н.А. Назаров, А.В. Чепуркин, С.С. Рыбаков [и др.] //Актуальные пробл. инфекционной патологии животных:

материалы междунар. науч. конф., посвящ.45-летию ВНИИЗЖ. - Владимир, 2003. - С. 218-222.

34. Дмитриев, А.Ф. Эпизоотоглогический мониторинг инфекционных зоонозов в Чеченской и Ингушской республиках / А.Ф. Дмитриев, М.И. Мицаев // Ветеринарная патология. - 2012. - №1(39). - С.41-45.
35. Донник, И.М. Мониторинг бешенства в Уральском регионе / И.М. Донник, Е.Н. Шилова, В.А. Красноперов // Ветеринария Кубани. - 2009. - № 4. - С. 8-10.
36. Дресвянникова, С.Г. Эпизоотологический мониторинг и меры борьбы с бешенством в Кировской области: дис. канд. вет. наук: 06.02.02 / Дресвянникова Светлана Георгиевна. - Щелково, 2012. - 132 с.
37. Елаков, А.Л. Антирабические вакцины для животных применяемые в России / А.Л. Елаков //Vetpharma. - 2013. - № 4. - С. 32-34.
38. Емельянова, Т.А. Эпизоотологический мониторинг бешенства животных по Свердловской области / Т.А. Емельянова // Молодежь и наука. - Екатеринбург, 2012. - № 1. - С. 43-45.
39. Жолшоринов, А.Ж. Эпидемиологический надзор за бешенством в условиях доминирования очагов природного типа: метод. рекомендации / А.Ж. Жолшоринов, Е.Б. Сансызбаев. - Астана, 2004. - 16 с.
40. Иванов, А.В. Эпизоотологический и иммунологический надзор за бешенством /А.В. Иванов, Н.А. Хисматуллина, А.М. Гулюкин // Ветеринарный врач. - 2010. - № 4 (17). - С. 3-6.
41. Иванов, В.С. Состояние и перспективы борьбы с бешенством животных и человека / В.С. Иванов, П.П. Кузнецов, Е.Э. Школьников // Вестн. РАСХН. - 2000. - №2. - С. 63-65.
42. Изучение динамики накопления антигена вируса бешенства (штамм внуково-32) на различных клеточных культурах и оценка эффективности гель-хроматографического метода его очистки / О.Г. Якин, А.Н. Сергеев, Л.Г. Хафизова [и др.] // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2010. - № 3 (39). - С. 35-36.

43. Иммунобиологические свойства новой вакцины Рабикс / М.А. Лосич, И.В. Непоклонова, О.А Верховский [и др.] // Ветеринария. - 2011. - № 12. - С. 17-20.
44. Иммуноконтрацепция, как новый метод контроля популяции бродячих собак / М.Н. Романенко, В.И. Клюкина, Ю.Н. Федоров, О.А. Богомолова // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК: материалы Междунар. научно-практ. конф., посвящ. 45-летию института. -Шелково, 2014. - С. 64-67.
45. Иммунологический мониторинг бешенства / Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов, С.Р. Янбарисова, Т.А. Савицкая // Ветеринарный врач. - 2004. - № 1 (17). - С. 45-53.
46. Инактивированная культуральная вакцина против бешенства животных / И.Ф. Вишняков, И.В. Никишин, В.В. Недосеков [и др.] // Ветеринария. - 1998. - № 6. - С.76-80.
47. Иовлева, А.Ю. Разработка метода ПЦР в реальном времени для обнаружения вируса бешенства и дифференциации полевых изолятов вируса от вакцинного штамма / А.Ю. Иовлева, С.А. Чупин, А.Е. Метлин //Аграрная наука Евро-Северо-Востока. - 2012. - № 5 (30). - С. 62-65.
48. Истомина, М.А. Эффективность метода контрастной иммунофлуоресценции при индикации антигена вируса бешенства в отпечатках роговицы глаза / М.А. Истомина, В.И. Клюкина Ветеринарна медицина. - 2011. - № 95. - С. 32-33.
49. ИФА для оценки эффективности вакцинации собак против бешенства / В.И. Клюкина, О.В. Анисина, Н.А. Бондарев, О.А. Богомолова // Ветеринария и кормление. - 2012. - № 6. - С. 28-29.
50. Клюкина, В.И. Выявление антигена вируса бешенства с использованием иммунохроматографического экспресс-теста / В.И. Клюкина, О.В. Анисина // Ветеринария и кормление. - 2012. - № 6. -С. 23-24.

51. Контроль эффективности вакинопрофилатики бешенства дикой фауны на территории Калининградской области / Н.А. Хисматуллина, Т.П. Петрова, А.М. Гулюкин [и др.] // Ветеринарный врач. - 2012. - № 6. - С. 8-11.
52. Контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства дикой фауны на территории Смоленской области РФ / Н.А. Хисматуллина, А.М. Гулюкин, В.В. Сабирова [и др.] // Тр. ВИЭВ. - Т.77. - Материалы. Междунар. научно-практ. конф. «Состояние и перспективы развития ветеринарной науки России», посвящ. 115-летию со дня основания института. - М., 2013. - С. 197-200.
53. Макаров, В.В. Актуальные проблемы бешенства: природная очаговость, методология исследования и контроля в центре России // В.В. Макаров, А.А. Воробьев // Ветеринарная патология. - 2004. - № 3. - С. 102-116.
54. Макаров, В.В. Бешенство рукокрылых и человек / В.В. Макаров Д.А, Лозовой, Н.И. Брико // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопр. - 2015. - № 6. - С. 46-53.
55. Макаров, В.В. Бешенство. Естественная история на рубеже столетий: монография / В.В. Макаров, А.М. Гулюкин, М.И. Гулюкин. - М.: ЗооВетКнига, 2015. - 121 с.
56. Макаров, В.В. Бешенство: очерк мирового нозоареала и общие элементы контроля / В.В. Макаров // Ветеринарная патология. - 2002. - № 1. - С. 12-20.
57. Макаров, В.В. Вирусы рукокрылых (лисса-и филовирусы) / В.В. Макаров, Д.А. Лозовой // Ветеринария. - 2016. - № 6. - С. 3-8.
58. Макаров, В.В. Оральная вакцинация лисиц против бешенства безальтернативна // В.В. Макаров // Вестн. РАСХН. - 2010. - № 2. - С. 57-58.
59. Макаров, В.В. Бешенство / В.В. Макаров, Д.А. Лозовой // Рос. вет. журн. - 2017. - № 1. - С. 28-34.
60. Метлин, А.Е. Молекулярно-биологические характеристики полевых изолятов и аттенуированных штаммов вируса бешенства: дис. канд. вет. наук: 16.00.03 / Метлин Артем Евгеньевич. - Владимир, 2004. - 151 с.

61. Методические рекомендации для ветеринарных специалистов и органов местного самоуправления Омской области по профилактике бешенства / В.И. Околелов, Е.М. Полищук, Г.Н. Сидоров [и др.]. -Омск, 2008. - С. 157.
62. Методические рекомендации для диагностики бешенства животных методом иммунофлуоресценции: методический материал / А.Ю Сухарьков, А.Г. Еремина, Н.А Назаров [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - Владимир,2016. – 14 с.
63. Методические рекомендации по выделению и очистке и рибонуклеопротеина из культуры клеток ВНК-21, инфицированной культуральным вирусом бешенства / А.Ю. Сухарьков, Н.А. Назаров, А.В. Борисов, М.И. Шульпин; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2015. - 26 с.
64. Методические рекомендации по выявлению фрагментов генома вируса бешенства в обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) / Е.В. Чернышова, С.А. Чупин, А.Е. Метлин [и др.]; ФГУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2010. - 16 с.
65. Методические рекомендации по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в тканях зубов и костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин: методический материал / А.Ю. Сухарьков, Е.В. Чернышова, А.Е. Метлин [и др.]; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2016. - 11 с.
66. Методические рекомендации по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови диких плотоядных животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (RFFIT / Е.В. Чернышова, А.Ю. Иовлева, Н.А. Назаров, А.Е. Метлин; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2016. - 21 с.
67. Методические указания по выявлению генома вируса бешенства и дифференциации вакцинного штамма РВ-97 от полевых изолятов с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени / А.Ю. Иовлева, С.А. Чупин, Е.В. Чернышова, А.Е. Метлин; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2011. - 12 с.

68. Методические указания по определению антител к гликопротеину вируса бешенства в сыворотках крови животных в иммуноферментном анализе / А.Ю. Сухарьков, А.Ю. Иовлева, Е.В. Чернышова [и др.]; ФГУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2011. - 26 с.
69. Методические указания по отбору и пересылке проб головного мозга, сывороток крови и костной ткани с целью диагностики бешенства животных и оценки эффективности оральных антирабических вакцин / Е.В. Чернышова, А.Ю. Сухарьков, А.Е. Метлин [и др.]; ФГУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2009. - 24 с.
70. Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории кировской области / О.Н. Зайкова, Т.В. Гребенникова, А.Л. Елаков [и др.] // Вопр. вирусологии. - 2016. - Т. 61, № 4. - С. 186-192.
71. Мониторинг бешенства у диких животных в Брянской области / А.Л. Елаков, О.Н. Зайкова, К.С. Кочергин-Никитский [и др.] // Ветеринария. - 2015. - № 1. - С. 11-14.
72. Мукаптаев, К.Н. Испытание экспресс-метода на основе моноклональных антител для обнаружения вируса бешенства в образцах биологического материала / К.Н. Мукаптаев // Биотехнология. Теория и практика. - Астана, 2006. - № 4. - С. 102-107.
73. Недосеков, В.В. Влияние неблагоприятных условий содержания животных на формирование антирабического иммунитета / В.В. Недосеков, А.П. Никитова, И.Н. Полупан // Біологія тварин. - 2013. - Т. 15, № 4. - С. 80-84.
74. Недосеков, В.В. Сравнительная оценка методов лабораторной диагностики бешенства / В.В. Недосеков // Ветеринарная патология. - 2002. - № 1. - С. 41-47.
75. Новый подход к решению проблемы бешенства в удмуртской республике / Г.Н. Бурдов, С.Г. Явкин, А.А. Чернов, Е.И. Марасинская // Ученые зап. Казанской гос. акад. вет. медицины им. Н.Э. Баумана. 2016. - Т. 227, № 3. - С. 12-18.

76. Нуклеотидная последовательность и филогенетический анализ G гликопротеина российского фиксированного штамма «Москва 3253» вируса бешенства / И.В. Тучков, Я.М. Краснов, А.А. Горяев [и др.] // Пробл. особо опасных инфекции. - 2013. - № 4. - С. 73-75.
77. Обнаружение антител к вирусу бешенства методом иммунопероксидазного монослоя / В.В. Недосеков, И.Ф. Вишняков, В.И. Жестерев [и др.] // Пробл. инфекц. патологии с.- х. животных: конф., посвящ. 100-летию открытия вируса ящура. - Владимир, 1997. - С. 181-182.
78. Общая характеристика современной эпизоотологии бешенства. Статистический анализ обстановки // В.В. Макаров, С.И. Джупина, В.А. Ведерников [и др.] // Ветеринарная патология. - 2002. - № 1. - С. 59-64.
79. Оптимизация условий масштабированного культивирования фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в культуре клеток Vero / С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, Ж.В. Матвеева [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. - 2014. - № 2. - С. 101-103.
80. Опыт серологического мониторинга городских популяций собак при бешенстве / В.В. Макаров, В.В. Недосеков, А.Д. Середа, Л.П. Сошенко // Ветеринарная патология. - 2002. - № 1. - С. 140-143.
81. Оральная иммунизация песцов живой тканево-культуральной антирабической вакциной из штамма Внуково-32 / М.А. Селимов М.А. Каратаева, Т.А. Аксенова [и др.] // Вопр. вирусологии. - 1987. № 5. - С. 622-623.
82. Основные принципы специфической профилактики бешенства, обеспечивающие эффективность антирабических мероприятий / А.В. Саввин, Ю.В. Пашкина, К.Н. Груздев, В.В. Сочнев // Ветеринарная патология. - 2005. - № 4. - С. 102-106.
83. Особенности проявления и диагностики бешенства в Бурятии / В.Е. Молонтоев, П.И. Евдокимов, А.С. Хангажинов [и др.] // Вестн. Бурятской ГСХА им. В.Р. Филиппова. - 2013. - № 1 (30). - С. 143-146.

84. Пашкина, Ю.В. Рабическая инфекция: зоны риска и территориальные границы в условиях РФ в целом и в отдельных регионах / Ю.В. Пашкина, В.В. Сочнев // Ветеринарная патология. - 2005. - № 4. - С. 68-72.
85. Перспективы использования индукторов интерферона для повышения эффективности специфических средств экстренной профилактики бешенства / В.С. Иванов, А.Я. Самуйленко, П.П. Кузнецов, И.В. Иванов //Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных: междунар. науч.-практ. конф. - Покров, 2000. - С. 121-123.
86. Подопригора, А.А. Мониторинг современной эпизоотической ситуации и совершенствование мер борьбы с бешенством животных в Ростовской области: дис. канд. вет. наук: 06.02.02 / Подопригора Андрей Александрович. - п. Персиановский, 2010. - 173 с.
87. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства / С.В. Грибенча, А.Ю. Козлов, Л.В. Костина [и др.] // Вопр. вирусологии. - 2013. - №5. - С. 38-43.
88. Прижизненная клинико-лабораторная диагностика гидрофобии / Д.К. Баширова, Н.А. Хисматуллина, М.Ш. Шафеев [и др.] // Казанский мед. журн. - 2007. - Т. 88, № 5. - С. 449-452.
89. Применение метода флуоресцирующих антител для индикации вируса бешенства на культуре клеток / М.А. Селимов, Е.В. Клюева, Е.В. Семенова [и др.] // Вопр. борьбы с бешенством. - М.: Медицина,1963.
90. Проблема смертности людей от бешенства в российской федерации в 2010 – 2011 годах /А.А. Мовсесян, А.Н. Миронов, В.А. Ведерников [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств мед. применения. - 2012. - № 3. - С. 48-51.
91. Противоэпизоотическая и противоэпидемическая эффективность и надежность проводимых в г. Санкт-Петербурге антирабических мероприятий / А.А. Алиев, Ю.В. Пашкина, Д.А. Мамлеева [и др.] // Ветеринарная патология. - 2005. - № 4. - С. 80-84.

92. Пухова, Н.М. Использование достижений биотехнологии в разработке антирабических вакцин / Н.М. Пухова, А.Я. Самуйленко, Н.К. Еремец // Актуальная биотехнология. - 2015. - № 3 (14). - С. 91-92.
93. Разработка и апробация набора реагентов для определения РНК классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени / В.Г. Дедков, А.А. Девяткин, Е.М. Полещук [и др.] // Вопр. вирусологии. - 2016. - №5). - С. 235-240.
94. Разработка и иммунобиологические свойства новой антирабической вакцины «Рабифел» / М.А. Лосич, И.В. Непоклонова, А.Н. Мухин [и др.] // Рос. вет. журн. Мелкие домашние и дикие животные. - 2012. - № 2. - С. 10-14.
95. Разработка схемы лабораторной диагностики бешенства / Н.А. Назаров, А.В. Чепуркин, С.С. Рыбаков [и др.] // Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов: тр. Междунар. научно-практ. конф., посвящ. 45-летию института. - Покров, 2003. - С. 153-157.
96. Разработка экспресс-методов иммунологического мониторинга при бешенстве / Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов, М.А. Селимов, С.Р. Янбарисова // Вопр. вирусологии. - 2001. - №5. - С.45-48.
97. Результаты исследований по разработке и производственным испытаниям культуральной лиофилизированной вирусвакцины из штамма ТС-80: отчет о НИР / ВНИИВВиМ; Г.А. Сафонов, С.Ф. Чевелев, Т.А. Калинина, А.П. Башмакова. - Покров, 1991. - 43 с.
98. Роллерное культивирование вируса бешенства «Москва 3253» в культуре клеток Vero / С.В. Генералов, Е.Г. Абрамова, Ж.В. Матвеева, И.М. Жулидов // Биотехнология. Взгляд в будущее: материалы III Междунар. науч. Интернет-конф.: в 2 т. / сост. Д.Н. Синяев. - Казань, 2014. - С. 42-43.
99. Селимов, М.А. Идентификация штаммов сильватического и арктического бешенства с помощью моноклональных антител / М.А Селимов, А.Д. Ботвинкин, А.Г. Татаров // Вопр. вирусологии. - 1983. - № 2.- С. 243-244.

100. Скуркис, Ю.О. Формирование поверхностной структуры монодисперсных микросфер на основе полистирола и сополимеров стирола с акролеином: автореф. дис. канд. хим. наук / Скуркис Юлия Олеговна. - СПб., 2005. - 23 с.

101. Совершенствование цельновирионных вакцин против бешенства животных / Н.М. Пухова, А.Я. Самуйленко, Н.И. Зенов [и др.] // Ветеринарный врач. - 2012. - № 5. - С. 5-7.

102. Соловых, В.В. Мониторинг бешенства в Оренбургской области с 1997 по 2009 гг. / В.В. Соловых // Вестн. Оренбургского гос. ун - та. 2011. - № 16 (135). - С. 354-356.

103. Сочнев, В.В. Закономерности функционирования инфекционной паразитарной системы рабической инфекции в нижегородской и волгоградской областях / В.В. Сочнев главные эпизоотологические параметры популяции животных Сборник научных трудов ФГБОУ ВПО НГСХА, представленных на 2-й сессии Междунар. научно-практ. конф. / под ред. В.В. Сочнева. - Н. Новгород, 2015. - С. 15-43.

104. Способ изготовления антирабической инактивированной вакцины для сельскохозяйственных животных: пат. 2244557 Российская Федерация, МПК А 61К39/ 205 / В.И. Жестерев, Т.Ф. Горшкова, О.Г. Лаптева [и др.]; ВНИИВВиМ. - Заявл. 21.01.03; опубл. 20.01.05.

105. Способы борьбы с бешенством плотоядных животных / Н.М. Пухова, А.Я. Самуйленко, Н.К. Еремец [и др.] // Ветеринария и кормление. - 2014. - № 6. - С. 48-50.

106. Сравнительная характеристика антител, полученных на разные антигены вируса бешенства / Н.А. Назаров, А.Е. Метлин, С.С. Рыбаков [и др.] // Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей: материалы междунар. научно - практ. конф. - Покров, 2002. - С.168-170.

107. Сравнительный анализ факторов формирования антирабического иммунитета у мелких домашних животных / И.В. Непоклонова, М.А. Лосич, О.Н. Зайкова [и др.] // Ветеринария. - 2017. - № 4. - С. 26-34.

108. Степень эпизоотического риска доминирующих паразитарных систем в конкретных территориальных условиях / В.В. Сочнев, В.М. Авилов, В.Н. Скира [и др.] // Вопр. нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2017. - № 1. - С. 30-35.

109. Сухарьков, А. Ю. Разработка методов оценки оральной антирабической вакцинации животных: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.02.02 / Сухарьков Андрей Юрьевич. - Владимир, 2014. - 25 с.

110. Сухарьков, А.Ю. Методические рекомендации по выделению и очистке гликопротеина и рибонуклеопротеина из очищенного и концентрированного культурального вируса бешенства / А.Ю. Сухарьков, Н.А. Назаров, М.И. Шульпин; ФГБУ «ВНИИЗЖ». – Владимир, 2015. - 28 с.

111. Сухарьков, А.Ю. Методические рекомендации по выявлению антигенов вируса бешенства в головном мозге животных в твердофазном прямом сэндвич-варианте иммуноферментного анализа: методический материал / А.Ю. Сухарьков, Н.А. Назаров А.Е. Метлин; ФГБУ «ВНИИЗЖ. - Владимир, 2016. - 15 с.

112. Сэндвич вариант ИФА для выявления вируса бешенства в головном мозге животных и птицы / С.А. Дяченко, И.Н. Матвеева, В.М. Попова [и др.] // Вестн. Курской ГСХА. - 2015. - № 8. - С. 201-202.

113. Тутов, И.К. Мониторинг эпизоотической ситуации по бешенству в ЮФО РФ / И.К. Тутов, М.В. Фоменко // Вестн. ветеринарии. - 2007. - № 1-2. - С. 99-105.

114. Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток невриномы гассерова узла крысы (НГУК-1) / Н.А. Хисматуллина А.М. Гулюкин, Э.А. Шуралев [и др.] // Гены и клетки. - 2014. - Т.9, № 3. - С. 276-280.

115. Фоменко, М.В. Мониторинг эпизоотической ситуации по бешенству животных в Ставропольском крае: дис. канд. вет. наук: 16.00.03 / Фоменко Михаил Васильевич. - Ставрополь, 2004. - 148 с.

116. Функционирование паразитарной системы бешенства в субъектах федерации поволжского экономического района / В.М. Авилов, В.В. Сочнев, А.В. Саввин [и др.] // Ветеринарная патология. - 2004. - № 3. - С. 127-134.

117. Хисматуллина, Н.А. Разработка средств и методов иммунологического мониторинга и мер борьбы при бешенстве и лихорадке Ку животных: автореф. дис. докт. биол. наук: 03.00.07, 16.00.03/ Хисматуллина Наиля Анваровна. - Казань, 2000. - 45 с.

118. Цыбанов, Я.С. Дифференциация вирусов арктического и классического бешенства методом полимеразной цепной реакции / Я.С. Цыбанов, В.В. Недосеков, И.А. Сливко // Актуальные пробл. патологии свиней, крупного и мелкого рогатого скота. - Владимир, 2002. - С. 133-137.

119. Чернов, А.Н. Эпизоотологический мониторинг и разработка средств диагностики бешенства, болезни Ауески и бруцеллеза: дис. докт. биол. наук: 06.02.02 / Чернов Альберт Николаевич. - Казань, 2013. - 318 с.

120. Чернышова, Е. В. Разработка и совершенствование методов диагностики бешенства и молекулярно-биологическая характеристика полевых изолятов вируса: автореф. дис. канд. вет. наук: 06.02.02 / Чернышова Елена Владимировна. - Владимир, 2018. - 22 с.

121. Чернышова, Е.В. Методические рекомендации по выделению вируса бешенства в культуре клеток нейробластомы мыши / Е.В. Чернышова, Н.А. Назаров, А.Е. Метлин; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2016. - 20 с.

122. Чернышова, Е.В. Методические указания по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (FAVN) / Е.В. Чернышова, Н.А. Назаров, А.Е. Метлин; ФГБУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2011. - 29 с.

123. Чернышова, Е.В. Методические указания по ускоренному определению антирабических вируснейтрализующих антител в сыворотках крови диких плотоядных животных в реакции микронейтрализации / Е.В. Чернышова, А.Ю. Иовлева, А.Е. Метлин ФГБУ «ВНИИЗЖ». - Владимир, 2012. - 24 с.

124. Численность лисицы как фактор риска эмерджентности бешенства / В.В. Макаров, С.И. Джупина, В.А. Ведерников [и др.] // Ветеринарная патология. - 2002. - № 1. - С. 123-126.

125. Чувствительность перевиваемых линий клеток к вирусу бешенства, шт. 71-БелНИИЭВ-ВГНКИ / И.А. Сливко, Т.Ф. Горшкова, Е.М. Хрипунов [и др.] // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и зооантропонозными болезнями животных: материалы междунар. науч.-практ. конф. - Покров, 2000. - С. 196-199.

126. Чупин, С.А. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Российской Федерации в период 2008-2011 гг. / С.А. Чупин, Е.В. Чернышова, А.Е. Метлин // Вопр. вирусологии. - 2013. - Т. 58, № 4. - С. 44-49.

127. Шерстнева, Е.В. Первые Пастеровские станции в России / Е.В. Шерстнева // Пробл. социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины. - М.: Медицина, 2012. - № 2. - С. 56-59.

128. Экспертная оценка мониторинговых показателей доминирующих нозоформ в заразной патологии животных в конкретных территориальных границах / В.В. Сочнев, В.М. Авилов, Ю.В. Пашкина [и др.] // Вопр. нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2017. - № 1. - С. 36-40.

129. Эпизоотическая обстановка в Республике Абхазия по сибирской язве, бешенству, ящуру и африканской чуме свиней / Э.А. Аншба, О.В. Теремков, В.Н. Герасимов [и др.] // Ветеринария Кубани. - 2010. - № 1. - С. 20-22.

130. Эпизоотическая ситуация и контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства животных в Республике Татарстан / Н.А. Хисматуллина, А.Г. Хисамутдинов, И.И. Самерханов [и др.] //Актуальные вопр. контроля инфекционных болезней животных: материалы Междунар. научно - практ. конф., посвящ. 55-летию ВНИИВВиМ. - Покров, 2014. - С. 331-336.

131. Эпизоотологический контроль рабической инфекции в условиях Нижнего Новгорода / В.В. Сочнев, Е.А. Помазов, Н.В. Жезлова. Е.А. Колобов // Главные эпизоотологические параметры популяции животных: сб. науч. тр. ФГБОУ ВПО НГСХА, представленных на 2-й сессии Междунар. научно - практ. конф. / под ред. В.В. Сочнева. – Н. Новгород, 2015. - С. 512-520.

132. Эпизоотологический мониторинг бешенства в Саратовской области / А.П. Мясников, В.А. Агольцов, Н.А. Дружаева, И.Г. Козлов // Ученые зап. Казанской ГАВМ. - Казань, 2012. - Т. 209. - С. 235-240.

133. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных / А.А. Конопаткин, И.А. Бакулов, Я.В. Нуйкин [и др.]. – М.: Колос, 1984. - 544 с.

134. Эпизоотолого-эпидемиологический надзор за бешенством: методическое руководство / А.В Иванов, Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов [и др.]. - Казань, 2006. - 95 с.

135. A comparison of complete genome sequences of the attenuated RC-HL strain of rabies virus used for production of animal vaccine in Japan, and the parental Nishigahara strain / N. Ito, M. Kakemizu, K.A. Ito [et al.] // Microbiol. Immunol. - 2001. - Vol. 45, N 1. - P. 51-58.

136. A dog rabies vaccination campaign in rural Africa: impact on the incidence of dog rabies and human dog-bite injuries // S. Cleaveland, M. Kaare, P.Tiringa [et al.] // Vaccine. - 2003. - Vol. 21, N 17-18. - P. 1965-1673.

137. A dynein light chain 1 binding motif in rabies virus polymerase L protein plays a role in microtubule reorganization and viral primary transcription / A.Bauer, T. Nolden, S. Nemitz [et al.] // J. Virol. - 2015. - Vol. 89, N 18. - P. 9591-9600.

138. A new outbreak of fox rabies at the Russian-Mongolian border / R.V. Adelshin, O.V. Melnikova, Y.N. Trushina [et al.] // Virol. Sin. -2015. - Vol. 30, N 4. - P. 313-315.

139. A new quantitive method for rabies virus by detection of nucleoprotein in virion using ELISA / S. Katayama , M. Yamanaka, S. Ota, Y. Shimizu // J. Vet. Med. Sci. - 1999. - Vol. 61, N 4. - P. 411-416.

140. A panel of monoclonal antibodies targeting the rabies virus phosphoprotein identifies a highly variable epitope of value for sensitive strain discrimination / S.A. Nadin-Davis, M. Sheen, M, J. Abdel-Malik [et al.] // J. Clin. Microbiol. - 2000. - Vol. 38. - P.1397-1403.

141. A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding / R.N. Harty, J. Paragas, M. Sudol, P. Palese // J .Virol. - 1999. - Vol. 73, N 4. - P. 2921-2929.

142. A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology // E.M. Black J.P. Lowings, J. Smith [et al.] // J. Virol. Methods. 2002. - Vol.105, N 1. - P.25-35. Erratum in: J. Virol. Methods. - 2003. - Vol.111, N 2. - P.163.

143. A reliable diagnosis of human rabies based on analysis of skin biopsy specimens / L. Dacheux, J.M. Reynes, P. Buchy [et al.] // Clin. Infect. Dis. - 2008. – Vol.47, N11. - P. 1410-1417.

144. A step forward in molecular diagnostics of lyssaviruses–results of a ring trial among European laboratories / M. Fischer, K.Wernike C.M. Freuling [et al.] // PloS One. - 2013. - Vol.8, N 3: e58372.

145. A thermostable messenger RNA based vaccine against rabies / L. Stitz, A.Vogel, M. Schnee [et al.] // PloS Negl. Trop. Dis. - 2017. - Vol..11, N 12: e0006108.

146. Abbasi, J. First Phase 1 Trial of a prophylactic mRNA vaccine reported / J. Abbasi // JAMA. - 2017. - Vol. 318, N22. - P. 2173.

147. Abelseth, M.K. Propagation of rabies virus in pig kidney cell culture / M.K Abelseth // Can. Vet. J. - 1964. - N 5. - P.4.

148. Abusch, I.T. Mesopotamian Magic: Textual, Historical, and Interpretative Perspectives / I.T.Abusch, K.V.D Toorn . - BRILL,1999. - 328 p.

149. Adult dogs receiving a rabies booster dose with a recombinant adenovirus expressing rabies virus glycoprotein develop high titers of neutralizing antibodies

/ T. Tims, D.J. Briggs, R.D. Davis [et al.] Vaccine. - 2000. - Vol. 18 . - P. 2804-2807.

150. Affinity of rabies virus for the cells of kidney origin cultivated in vitro / J. Vieuchange, R. Bequignon, J. Gruest, C. Vialat // Bull. Acad. Natl. Med . - 1956. - Vol. 140, N 5-6. - P. 77-79.

151. Albertini, A.V. Rabies virus transcription and replication / A.V. Albertini, W.H. Ruigrok, D. Blondel // Advances in Virus Res. - 2011. – Vol. 79. - P. 1-22.

152. An attenuated oral vaccine for wild carnivorous animals in the USSR / N.A. Kovalev, V.A. Sedov, A.S. Shashenko [et al.] // Wildlife Rabies Control – Proc. Intern. WHO Symp. - Geneva, 1990. - P. 112-114.

153. An epidemic of sylvatic rabies in Finland – descriptive epidemiology and results of oral vaccination / M. Nyberg, K.Kulonen, E. Neuvonen [et al.] // Acta Vet. Scand. - 1992. - Vol. 33. - P. 43-57.

154. An inter- laboratory proficiency testing exercise for rabies diagnosis in Latin America and the Caribbean / A. Clavijo, M.H. Freire de Carvalho L.A. Orciari // PloS Negl. Trop. Dis. - 017. - Vol.11, N 4 : e0005427.

155. An update on safety studies of SAD B19 rabies virus vaccine in target and non-target species / A. Vos, A. Neubert, O. Aylan [et al.] // Epidemiol Infect. - 1999. - Vol. 123, N 1. - P. 165-175.

156. Andersons, Z. Specific features of epizootiology and main directions of rabies control measures in Latvia: DVM thesis / Z. Andersons. - The University of Moscow, Russia. - Jelgav, 1992. – 22.

157. Anonymous, (1921-1939) Zemkopibas ministrijas veterinarrais departments Veterinarsanitarais parskats (Yearbooks for the years 1921-1939, Riga).

158. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: Comparison of real time and conventional RT-PCR techniques / T. Nagaraj, J. Vasanth, A. Desai [et al.] // J. Clin. Virol. - 2006. - Vol. 36. - P. 17-23.

159. Antigenic and functional analyses of glycoprotein of rabies virus using monoclonal antibodies / T.R. Luo, N. Minamoto, M. Hishida[et al.] // Microbiol. Immunol. - 1998. - Vol. 42, N 3. - P. 187-193.

160. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir / F. Bernardi, S.A. Nadin-Davis, A.I. Wandeler [et al.] // J. Gen. Virol. - 2005. - Vol. 86. - P. 3153-3162.

161. Antigenic and genetic divergence of rabies viruses from bat species indigenous to Canada / S.A. Nadin-Davis, W. Huang, J. Armstrong // Virus Res. - 2001. - Vol. 74. - P.139-156.

162. Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence / C. Préhaud, P.Coulon, F. LaFay [et al.] // J. Virol. - 1988.- Vol.62. - P. 1-7.

163. Antigenic structure of rabies virus glycoprotein: ordering and immunological characterization of the large CNBr cleavage fragments / B. Dietzschold, T.J. Wiktor, R. Macfarlan, A.Varrichio // J. Virol. - 1982. - Vol. 44, N 2. - P. 595-602.

164. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000 m / S.R. Favoretto, M.L. Carrier, E.M.S. Cunha [et al.] // Rev. Inst. Med. Trop. - 2002. - Vol. 44. - 91-95.

165. Antigenicity of rabies virus glycoprotein /A. Benmansour, H. Leblois, P. Coulon [et al.] // J. Virol. - 1991. - Vol. 65. - P. 4198-4203.

166. Application and comparative evaluation of fluorescent antibody, immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction tests for the detection of rabies virus antigen or nucleic acid in brain samples of animals suspected of rabies in India / K.N. Prabhu, S. Isloor, B.H. Veeresh [et al.] // Vet. Sci. - 2018. - Vol. 5, N 1. - pii: E24.

167. Application of antirabies gammaglobulin for patients hardly wounded by wolves and other animals / M. Selimov, L. Boltutziy, E. Semenova [et al.] / J. Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology. - 1969. - Vol. 3, N 2. - P. 136-147.

168. Application of monoclonal antibodies for epidemiological investigations and oral vaccination studies / L. Schneider, O. Odegaard, J. Mueller, M. Selimov //

Rabies in the Tropics / ed. E. Kuwert, C. Mérieux, H. Koprowski, K. Bögel. - Berlin: Springer-Verlag, 1985. - P. 47-59.

169. Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice / C. Tuffereau, M. Leblois, J. Benejean [et al.] // Virology. - 1989. - Vol. 172. - P. 206-212.

170. ASEAN Rabies Elimination Strategy. Accessed on 3rd November 2015. - URL: http://vncdc.gov.vn/files/article_attachment/2015/3/endorsed-ares-final.pdf), дата обращения – 01.06.2018.

171. Atanasiu, P. Nouveau vaccin antirabique humain de culture cellulaire primaire / P. Atanasiu, H. Tsiang, A. Gamet [et al.] //Annales de Microbiologie de l' Institut Pasteur. - 1974. - Vol.12511. - P. 419-432.

172. Attenuated rabies virus activates, while pathogenic rabies virus evades, the host innate immune responses in the central nervous system / Z.W. Wang, L. Sarmento, Y. Wang [et al.] // J. Virol. - 2005. - Vol. 79. - P. 12554–12565.

173. Aubert, M. Control of rabies in foxes: what are the appropriate measures? / M. Aubert // Vet. Rec. - 1994. - Vol. 134. - P. 55-59.

174. Bacon, P.J. To control rabies: vaccinate foxes / P.J. Bacon, D.W. Macdonald // New Scientist. - 1980. - Vol. 87, N 1216. - P. 640-645.

175. Badrane, H. Host Switching in *Lyssavirus* History from the Chiroptera to the Carnivora Orders / H. Badrane, N. Tordo // J. Virol. - 2001. - Vol. 75. - P. 8096–8104.

176. Baer, G.M. Oral vaccination of foxes against rabies / G.M. Baer, M.K. Abelseth, J.G. Debbie // Am. J. Epidemiol. - 1975. - Vol. 93. - P. 487-490.

177. Bankovskiy, D. Immunogenicity of ERA G 333 strain in foxes and raccoon dogs / D. Bankovskiy, G. Safonov, Y. Kurilchuk // Towards the Elimination of Rabies in Eurasia. Joint OIE/WHO/EU Intern. Conf. - Paris, 2007. - P. 69.

178. Bankovskiy, D. Immunogenicity of the ERA G 333 rabies virus strain in foxes and raccoon dogs / D. Bankovskiy, G. Safonov, Y. Kurilchuk // Developments in Biologicals. - 2008. - Vol. 131. - P. 461-466.

179. Barnard, B.J. A simple technique for the rapid diagnosis of rabies in formalin-

preserved brain / B.J. Barnard., S.F. Voges // Onderstepoort J. Vet Res. - 1982 . - Vol. 49, N 4. - P. 193-194.

180. Barrat, J. Rabies diagnosis / J. Barrat, E. Picard-Meyer, F. Cliquet // Developments in Biologicals. - 2006. - Vol. 125. - P. 71-77.

181. Bat Lyssavirus infections / K.A. McColl, N, Tordo, A. Aguilar Setien [et al.] // Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. - 2000. - Vol. 19. - P. 177-196.

182. Bazin, H. L. Histoire des Vaccinations / H.L. Bazin. - Paris: John Libbey Eurotext, 2008.

183. Bazin, H. Pasteur and the birth of vaccines made in the laboratory // History of Vaccine Development / ed. S.A. Plotkin. - Springer Science+Business Media, LLC, 2011. - P. 33-45.

184. Beauregard, M. The use of fluorescent antibody staining in the diagnosis of rabies / M. Beauregard, P. Boulanger, W.A. Webster // Can. J. Comp. Med. and Vet. Sci. - 1965. - Vol. 29, N 6. - P. 141-147.

185. Binding of rabies virus polymerase cofactor to recombinant circular nucleoprotein-RNA complexes / A. Jr. Ribeiro Ede, C. Leyrat, F.C. Gérard [et al.] // J. Mo.l Biol.- 2009. - Vol. 394, N 3. - P.558-575.

186. Biological and immunogenic properties of rabies virus glycoprotein expressed by canine herpesvirus vector / X. Xuan, K. Tuchiya, I. Sato ［et al.] // Vaccine. - 1998. - Vol. 16. - P. 969-976.

187. Biological function of the low-pH, fusion-inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation / Y. Gaudin, C. Tuffereau, P. Durrer [et al.] // J. Virol. - 1995. - Vol. 69, N 9. - P. 5528-5534.

188. Biological properties of the cell culture adapted RC-HL strain of rabies virus as a candidate strain for an inactivated vaccine / Y. Ishikawa, T. Samejima, T. Nunoya ［et al.] // J. Jpn. Vet. Med. Assoc. - 1989. Vol. 42. - P.637-643.

189. Bjilenga, G. Adaptation, attenuation and plaque purification of a rabies virus isolate (V-319) from a vampire bat (Desmodus rotundus) / G. Bjilenga, B.E.M. Hernander // Cornell Vet. - 1980. - Vol.70. - P. 290-302.

190. Blancou, J. Early methods for the surveillance and control of rabies in animals / J. Blancou // Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. - 1994. - Vol. 13. - P. 361-372.

191. Both viral transcription and replication are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated / X. Wu, X. Gong, H.D. Foley [et al.] // J. Virol. - 2002. - Vol. 76, N 9. - P. 4153-4161.

192. Bourhy, H. Rapid rabies enzyme immunodiagnosis (RREID) for rabies antigen detection / H. Bourhy, P. Perrin // Laboratory Techniques in Rabies / ed. F.-X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski. - Geneva, 1996. - P. 105-112.

193. Brozka, K. Identification of rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3 / K. Brozka, S. Finke, K.K. Conzelmann // J. Virol. - 2005. - Vol. 79. – P. 7673-7681.

194. Brzózka, K. Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2 / K. Brzózka ,S. Finke, K.K. Conzelmann // J. Virol. - 2006. - Vol. 80, N 6. - P. 2675-2683.

195. Bunn, T.O. Vaccines and vaccination of domestic animals / T.O Bunn // Rabies / ed. J.B. Campbell , K.M. Charlton. - Boston[ets]: Kluwer Acad.Publ,1988. - P. 323-333.

196. Cases of rabies in Germany following organ transplantation / W. Hellenbrand, C. Meyer, G. Rasch // Euro Surveill. - 2005. - Vol.10: E050224.6

197. Characterization and observation of animals responsible for rabies post-exposure treatment in Phnom Penh, Cambodia / J.M. Reynes, J.L. Soares, C. Keo [et al.] // Onderstepoort J. Vet. Res. - 1999. - Vol. 66, N 2. - P. 129-133.

198. Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein / H. Bunschoten, M. Gore, I.J. Claassen [et al.] // J. Gen. Virol. - 1989. - Vol. 70. - P. 291-298.

199. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus / B. Dietzschold, W.H. Wunner, T.J. Wiktor [et al.] / Proc. Natl Acad. Sci. USA. - 1983. - Vol. 80, N 1. - P. 70-74.

200. Characterization of human rabies virus vaccine strain in China / J. Du, Q, Zhang,

Q. Tan [et al.] // Virus Res. - 2008. - Vol.135. - P. 260-266.

201. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures / F.Iseni A. Barge F. Baudin [et al.] // J. Gen .Virol. - 1998. - Vol.79, N 12. - P. 2909-2919.

202. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97 / A. Metlin, L .Paulin, S.Suomalainen [et al.] // Virus Res. - 2008. - Vol. 132, N 1-2. - P. 242-247.

203. Charey, A.B. The ecology of rabies: evidence of co-adaptation / A.B. Charey, R.G. McLean // J. Appl. Ecol. - 1983. - Vol. 20. - P. 777-800.

204. Charlton, K.M. The pathogenesis of rabies and other lyssaviral infections: recent studies / K.M. Charlton // Lyssaviruses / eds C.E. Rupprecht, B. Dietzschold, H. Koprowski. - Berlin, Heidelberg; New York : Springer-Verlang, 1994. - P. 95-115.

205. Chenik, M. Translation initiation at alternate in-frame AUG codons in the rabies virus phosphoprotein mRNA is mediated by a ribosomal leaky scanning mechanism / M. Chenik, K. Chebli, D. Blondel // J. Virol. - 1995. - Vol. 69. - P.707-712.

206. Cifuentes, E. Rabies in a child diagnosed by a new intravitam method: The cornea test / E. Cifuentes, E. Calderon, G. Diglenga // J. Trop. Med. Hyg. - 1971. - Vol. 74. - P. 23-25.

207. Clark. H.F. Rabies serogroup viruses in neuroblastoma sells: Propagation, “Autointerference”, and apparently random back-mutation of attenuated viruses to the virulent state / H.F. Clark // Infection and Immunity. - 1980. - Vol. 27. - P.1012-1022.

208. Clinically silent rabies infection in (zoo) bats / L. Rønsholt, K.J. Sørensen, C.J. Bruschke [et al.] // Vet. Rec. - 1998. - Vol. 142, N 19. - P. - 519-520.

209. Cliquet, F. Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody / F. Cliquet, M.L. Aubert Sagné // J. Immunol. Methods. -1998. - Vol.212, N 1. - P.79-87.

210. Coleman, P.G. Immunization coverage required to prevent outbreaks of dog rabies / P.G. Coleman, C. Dye // Vaccine. - 1996. - Vol. 14. - P. 185-186.

211. Comparative analysis of mouse inoculation test and virus Isolation in cell culture for rabies diagnosis in animals of Parana, Brazil // T.F. Coron, B. Böger, T.C.D. Rocha [et al.] // Rev. Soc. Bras. Med. Trop. - 2018. - Vol.51, N 1. - P. 39-43.

212. Complete genome sequences of three rabies viruses isolated from rabid raccoon dogs and a cow in Korea // J.K. Oem, S.H. Kim, Y.H. Kim [et al.] / / Virus Genes. - 2013. - Vol. 47, N 3. - P. 563-568.

213. Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses / N. Tordo, O. Poch, A. Ermine [et al.] // Virology. - 1988 . - Vol. 165, N 2. - P. 565-576.

214. Construction and rescue of rabies virus mutant strain SRV9 / Y.R. Wei, Z. Yi, Z.H. Fu [et al.] // Bing Du Xue Bao. - 2010. - Vol. 26, N 5. - P. 345-350.

215. Cox, J.H. Eine antigenvariante der fuchstollwut in Europa // J.H. Cox, L.G. Schneider, W.W. Muller // Tierarztl. Umschau. - 1992. - Bd. 47. - S. 824-828.

216. Cox, J.H. Human rabies immunoprophylaxis using HDC (MRC-5) vaccine / H. Cox, J.W. Kleitmann, L.G. Schneider // Dev. Bol. Stand. -1978. - Vol. 40. - P.105-108.

217. Crick, J. Culture of rabies virus in vitro / J. Crick, A. King // Rabies / ed. J.B Campbell., K.M. Charlton. - Boston : Kluwer Acad. Publ., 1988. - P. 47-66.

218. Cross-neutralization of antibodies induced by vaccination with Purified Chick Embryo Cell Vaccine (PCECV) against different Lyssavirus species / C. Malerczyk, C. Freuling, D. Gniel [et al.] // Humanes Vaccines and Immunother. - 2014. - Vol.10, N 10. - P.2799-2804.

219. Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex / A.A. Albertini, A.K. Wernimont, T.Muziol [et al.] // Science. – 2006. - Vol. 313, N 5785. - P. 360-363.

220. Current status of rabies and prospects for elimination / A.R. Fooks, A.C. Banyard, D.L. Horton [et al.] // Lancet. - 2014. - Vol. 384, N 9951. - P.1389-99.

221. Davis, P.L. The evolutionary history and dynamics of bat rabies virus / P.L.

Davis, H. Bourhy, E.C. Holmes // Infection, Genetics and Evolution. - 2006. - Vol. 6. - 464-473.

222. Dean, D.J. The fluorescent antibody test / D.J. Dean, M.K. Abelseth, P. Atanasiu // Laboratory techniques in rabies / ed. F.-X Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski. - Geneva: WHO, 1996. - P. 88-93.

223. Demonstration during life of rabies antigen in humans / A.D Bryceson, B.M. Greenwood, D.A. Warrell [et al.] // J. Infect. Dis. - 1975. - Vol. 131. - P. 71-74.

224. Demonstration of rabies viral antigen in paraffin tissue sections: Comparison of immunofluorescence technique with the unlabeled antibody enzyme method // D. G. Palmer, P. Ossent, M. M., Suter, E. Ferrari // Am. J. Vet. Res. - 1985. - Vol. 46, N 1. - P. 283-286.

225. Detection of virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test / S. Kasempimolporn, W. Saengseesom, B. Lumlerrtdacha, V. Sitprija // J. Clin.Microbiol. - 2000. - Vol. 38, N 8. - P. 3098-3099.

226. Determination of efficacy of rabies vaccine in the Saratov Region / A.V. Borisov, A.V. Savvin, V.V. Mikhalishin [et al.] // Developments in Biologicals. - 2006. - Vol. 125. - P. 217-220.

227. Development and evaluation of a RT-qPCR assay for fast and sensitive rabies diagnosis / V.G. Dedkov, A.A. Deviatkin, E.M. Poleshchuk // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. - 2018. - Vol. 90, N 1. - P. 18-25.

228. Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for broad detection of rabies virus / M. Faye, L. Dacheux, M.J. Weidmann [et al.] // J. Virol. Methods. - 2017. - Vol. 243. - P.120-130.

229. Development of a real-time, TaqMan reverse transcription-PCR assay for detection and differentiation of lyssavirus genotypes 1, 5, and 6. / P.R. Wakeley, N. Johnson, L.M. McElhinney [et al.] // J. Clin. Microbiol. - 2005. -Vol. 43, N 6 . - P. 2786-2792.

230. Dietzschold, B. Pathogenesis of rabies / B. Dietzschold, M. Schnell, H, Koprowski // Curr. Top. Microbiol. Immunol. - 2005. - Vol.292. - P. 45-56.

231. Discrimination between dog-related and vampire bat-related rabies viruses in Brazil by strain-specific reverse transcriptase-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis / M. Ito T. Itou, Y. Shoji [et al.] // J. Clin. Virol. - 2003. - Vol.26, N 3.- 317-330.

232. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in Mexico / E. Loza-Rubio, A. Aguilar-Setién, C. Bahloul [et al.] // Arch. Med. Res. - 1999. - Vol. 30, N2. - P.144-149.

233. Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly // S. Finke, K.K. Conzelmann // J. Virol. - 2003. - Vol.77, N 22. - P.12074-12082.

234. Dodet, B. Executive summary / B. Dodet, F.-X. Meslin, M. Aubert // Proc. 4th Int. Symp. on Rabies Control in Asia. - Hanoi, 2001. - P. 191-201.

235. Dog bites in humans and estimating human rabies mortality in rabies endemic areas of Bhutan / Tenzin, N.K. Dhand, T. Gyeltshen [et al.] // PLoS Negl. Trop. Dis. - 2011. - Vol. 5, N 11: e1391.

236. Domestic microwave processing for rapid immunohistochemical diagnosis of bovine rabies / C.C. Abreu, P.A. Nakayama, C.I. Nogueira [et al.] // Histol Histopathol. - 2012. - Vol.27, N 9. - P. 1227-1230.

237. Drummond, A.J. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees / A.J .Drummond, A. Rambaut // BMC Evol. Biol. - 2007. - Vol. 8. - P. 207-214.

238. Ecology and evolution of rabies virus in Europe / H. Bourhy, B. Kissi, L. Audry // J. Gen. Virol. - 1999. - Vol. 80. - P. 2545-2557.

239. Efficacy of SAD (Berne) rabies vaccine given by the oral route in two species of jackal (Canis mesomelas and Canis adustus / J. Bingham, A. Kappeler, F.W. Hill [et al.] // J. Wildl. Dis. - 1995. - Vol. 31, N 3. - P. 416-419.

240. Eliminating rabies in Estonia / F. Cliquet, E. Robardet, K. Must [et al.] // PloS Negl. Trop. Dis. - 2012. - Vol. 6, N 2: e1535.

241. Elimination of rabies in the Czech Republic / O. Matouch, J. Vitase, Z. Semerad, M. Malena // Developments in Biology. - 2006. - Vol. 125. - P. 141-143.

242. Emerging tropical diseases in Australia. Part 3. Australian bat lyssavirus / P.R. Moore, C.C. Jansen, G.C. Graham [et al.] // Ann. Trop. Med. Parasitol. - 2010. - Vol. 104, N 8. - P. 613-621.

243. Epidemiologic and historical relationships among 87 rabies virus isolates as determined by limited sequence analysis / J.S. Smith, L.A. Orciari, P.A. Yager [et al.] // J. Infect. Dis. - 1992. - Vol. 166. - P. 296–307.

244. Epidemiological and genetic characteristics of rabies virus transmitted Through organ transplantation / J. Chen, G. Liu, T. Jin [et al.] // Front Cell Infect. Microbiol. - 2018. - N 8. - P. 86.

245. Epidemiological characteristics of human and animal rabies in Azerbaijan / S. Zeynalova, M. Shikhiyev, T. Aliyeva [et al.] // Zoonoses Public Health. - 2015. - Vol. 62, N 2. - P. 111-118.

246. Essay with culture of common rabies viru / J. Vieuchange, C. Vialat, J. Gruest, R. Bequignon //Ann. Inst Pasteur. - 1956. - Vol. 90, N 3. - P. 361-363.

247. Estimating human rabies mortality in the United Republic of Tanzania from dog bite injuries / S. Cleaveland, E.M. Fèvre, M. Kaare, P.G. Coleman [et al.] // Bull. WHO. - 2002. - Vol.80,N 4. - P. 304-310.

248. Evaluation and significance of tetracycline stability in rabies vaccine baits / J.J. Johnston, T.M. Primus, T. Buettgenbach [et al.] // J. Wildl. Dis. - 2005. - Vol. 41, N 3. - P. 549-558.

249. Evaluation of a monoclonal antibody-based rapid immunochromatographic test for direct detection of rabies virus in the brain of humans and animals / K. Ahmed, O. Wimalaratne, N. Dahal [et al.] // Am. J. Trop. Med. Hyg. - 2012. - Vol.86, N 4. - P. 736-740.

250. Evaluation of a rabies ELISA as an alternative method to seroneutralisation tests in the context of international trade of domestic carnivores / M. Wasniewski, A. Labbe, L. Tribout [et al.] // J. Virol. Methods. - 2014. - Vol.195. - P. 211-220.

251. Evaluation of a Rapid Immunochromatographic Diagnostic Test for the detection of rabies from brain material of European mammals / A. Servat, E. Picard-Meyer, E. Robardet [et al.] // Biologicals. - 2012. - Vol. 40, N 1. - P. 61-66.

252. Evaluation of a rapid immunochromatographic test strip for detection of Rabies virus in dog saliva samples / S. Kasempimolporn, W. Saengseesom, S. Huadsakul [et al.] // J.Vet. Diagn. Invest. - 2011. - Vol. 23, N 6. - 1197-1201.

253. Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies / K. Zimmer, D. Wiegand, D. Manz [et al.] // Zentralbl. Veterinarmed. B. - 1990. - Vol. 37, N 5. - P. 392-400.

254. Evaluation of monoclonal antibody-based direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis // Y. Feng, M. Wang, T. Liu [et al.] // J. Virol. Methods. - 2018. - Vol.256. - P. 12-16.

255. Evaluation of six commercially available rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of rabies in brain material / E. Eggerbauer, P.de Benedictis, B. Hoffmann [et al.] // PloS Negl. Trop. Dis. - 2016. - Vol.10, N 6 : e0004776

256. Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity / H. Badrane, C. Bahloul, P. Perrin, N. J. Tordo // J. Virol. - 2001. - Vol. 75. - P. 3268-3276.

257. Evolutionary trends of European bat lyssavirus type 2 including genetic characterization of Finnish strains of human and bat origin 24 years apart / M Jakava-Viljanen, T, Nokireki T. Sironen ［et al.] // Arch Virol. - 2015. - Vol.160, N 6. - P.1489-1498.

258. Expression of rabies virus glicoprotein from a recombinant vaccina virus // M.P. Kieny, R. Lathe, R. Drillien Smith [et al.] // Nature. - 1984. - Vol. 312. - P.163-166.

259. Failure of rabies postexposure prophylaxis in patients presenting with unusual manifestations / P. Shantavasinkul, T. Tantawichien, S. Wacharapluesadee [et al.] // Clin. Infect. Dis. - 2010. - Vol. 50, N 1. - P. 77-79.

260. Fatal encephalitis caused by a bat-borne rabies-related virus / R.O. Roine, M. Hillbom, M. Valle [et al.] // Clinical Findings. Brain. - 1988. - Vol.111, N 6. - P. 1505-1516.

261. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. - 1985. - Vol. 39. - P. 783-791.

262. Fenje, P. Propagation of rabies virus in cultures of hamster kidney cells // P. Fenje // Can. J. Microbiol. - 1960. - Vol.6. - P. 479.

263. Fenje, P. The problem of rabies in Canada / P. Fenje, C.R. Amies // Can. Med. Assoc. J. - 1960. - Vol. 30, N 82. - P. 243-245.

264. Field evaluation of two bait delivery systems for the oral immunization of dogs against rabies in Tunisia / H.C. Matter, C.L. Schumacher, H. Kharmachi [et al.] // Vaccine. - 1998. - Vol. 16. - P. 657-665.

265. Field use of a vaccina-rabies recombinant vaccine for the control of sylvatic rabies in Europe and North America / B. Brochier, M.F.A. Aubert, P.-P. Pastoret [et al.] // Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. - 1996. - Vol.15, N 3. - P. 947-970.

266. Finke, S. Intergenotypic replacement of lyssavirus matrix proteins demonstrates the role of lyssavirus M proteins in intracellular virus accumulation / S. Finke, H.Granzow, J. Hurst // J. Virol. - 2010. - Vol. 84, N 4. - P.1816-1827.

267. Finke, S. Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication // S. Finke, R. Mueller-Waldeck, K.K. Conzelmann // J. Gen. Virol. - 2003. - Vol.84, N 6. - P.1613-1621.

268. First detection of European bat lyssavirus type 2 (EBLV-2) in Norway / T. Moldal, T. Vikøren, F. Cliquet [et al.] // BMC Vet. Res. -2017. - Vol. 13, N 1. - P. 216.

269. First encounter of European bat lyssavirus type 2 (EBLV-2) in a bat in Finland / M. Jakava-Viljanen, T.Lilley, E.M. Kyheröinen, A. Huovilainen // Epidemiol Infect. - 2010. - Vol.138, N 11. - P. 1581-1585.

270. Flamand, A. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. I. The nucleocapsid protein / T. J. Wiktor, H. Koprowski // J. Gen.Virol. - 1980. - Vol. 48. - P. 97-104.

271. Flamand, A. Use of hybridoma monoclonal antibodies in the detection of antigenic differences between rabies and rabies-related virus proteins. 2. The glycoprotein // A. Flamand, T.J. Wiktor, H. Koprowski // J. Gen. Virol. - 1980. - Vol. 48. - P. 105-109.

272. Fuenzalida, E. Antirabiues antibody response in man to vaccine made from infected suckling-mouse brains // E. Fuenzalida, R. Palacios J.M. Borgono // Bull. WHO. - 1964. - Vol.30. - P.431-436.

273. Functional interaction map of lyssavirus phosphoprotein: identification of the minimal transcription domains / Y. Jacob, E. Real, N. Tordo [et al.] // J. Virol. - 2001. - Vol. 75. - P. 9613-9622.

274. Gautret, P. Rabies vaccination for international travelers / P. Gautret, P. Parola // Vaccine. - 2012. - Vol. 30, N 2. - P. 126-133.

275. Genetic characterisation of attenuated SAD rabies virus strains used for oral vaccination of wildlife / L. Geue, S. Schares, C. Schnick [et al.] // Vaccine. - 2008. - Vol.19, N 26. - P. 3227-3235.

276. Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela // C.A. De Mattos, C.C. De Mattos, S.J. Smith // J. Clin. Microbiol. - 1996. - Vol. 34. - P.1553-1558.

277. Genetic constraints and the adaptive evolution of rabies virus in nature / E.C. Holmes, C.H. Woelk, R. Kassis, H. Bourhy // Virology. - 2002. -Vol. 292. - P. 247-257.

278. Genetic typing of feline rabies virus isolated in greater Bangkok, Thailand / S. Kasempimolporn, W. Saengseesom, T.Tirawatnapong [et al.] // Microbiol. Immunol. - 2004. - Vol. 48. - P. 307-311.

279. Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a key determinant of human cell apoptosis / C. Préhaud, S. Lay, B. Dietzschold, M. Lafon // J. Virol. - 2003. - Vol. 77, N 19. - P. 10537-10547.

280. Glycoprotein of nonpathogenic rabies viruses is a major inducer of apoptosis in human jurkat T cells / S. Lay, C. Préhaud, B. Dietzschold, M. Lafon // Ann. N Y Acad. Sci. - 2003. - Vol. 1010. - P. 577-581.

281. Goldwasser, R.A. Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens / R.A. Goldwasser, R.E. Kissling // Proc. Soc. Exper. Biol. Med. - 1958. - Vol. 98. - P. 219-223.

282. Gongal, G. Human rabies in the WHO Southeast Asian Region: Forward steps for elimination / G.Gongal, E. Wright // Advances in Preventive Med. - 2011. - P. 1-5.

283. Gribencha, S.V. Abortive rabies in rabbits and white rats infected intracerebrally / S.V. Gribencha // Arch. Virol. - 1975. - Vol. 49, N 4. - P. 317-322.

284. Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT / T.A. Hall // Nucl. Acids. Symp. - 1999. - Ser.41. - P. 95-98.

285. Harrisson's Principles of Internal Medicine / D.L. Kasper, A.S. Fauci, S.L. Hauser [et al.]. - 19th ed. - McGraw-Hill, 2015. - 3985p.

286. Heaton, P.R. Detection and identification of rabies and rabies related viruses using rapid-cycle PCR // P.R. Heaton, L.M. McElhinney, J.P. Lowings // J. Virol. Methods. - 1999. -,Vol.,81. - P.63-69.

287. Histopathology and immunohistochemistry of tissues outside central nervous system in bovine rabies / C.C. Abreu, P.A .Nakayama, C.I .Nogueira [et al.] // J. Neurovirol. - 2014. - Vol.20, N 4. - P. 388-397.

288. Historical Perspectives of Rabies in Europe and the Mediterranean / ed. A.A. Basin King, A.R. Fooks, M. Aubert, A.I. Wandeler. - Paris: OIE, 2004. - 361p.

289. Holmberg, J. Die Tollwut (Rabies) in Finnland in die Jarhen 1910-1959 und deren Bekämpfung / J. Holmberg // Das 17 Intern. Symp. Über Geschichte der Veterinämedizin. - Helsinki, 5-8 June. 1981.

290. Holmberg, J. Raivotaudin esiintymisestä Suomessa sekä välähydyksiä ulkomailta / J. Holmber // Suomen Eläinlääkehti. - 1954. - Vol.60. - P. 501-512.

291. Human rabies in China, 1960-2014: A descriptive epidemiological study / H. Zhou, S. Vong, K. Liu [et al.] // PloS Negl. Trop. Dis. - 2016. - Vol. 10, N 8: e0004874.

292. Human rabies of bat origin in Europe / J. Lumio, M., Hillbom, R. Roine [et al.] // Lancet. - 1986, N 1. - P. 378.

293. Identification of an immunodominant epitope within the phosphoprotein of rabies virus that is recognized by both class I- and Class II-restricted T cells / J.K.

Larson, W.H. Wunner, L. Otvos, H. Ertl // J. Virol. - 1991. - Vol. 65. - P. 5673-5679.

294. Identification of viral genomic elements responsible for rabies virus neuroinvasiveness / M. Faber, R. Pulmanausahakul, K. Nagao [et al.] // Proc. Natl Acad. Sci. USA. - 2004. - Vol. 101, N 46. - P. 16328-163332.

295. II. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation / K.B. Nicholas, H.B. Jr. Nicholas, D.W. Deerfield // Embnew News. - 1997. -Vol. 4. - P. 14.

296. Immunogenicity of concentrated and purified rabies vaccine of tissue culture origin // T.J. Wiktor, F. Sokol, E. Kuwert, H. Koprowski // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1969. - Vol. 131. - P. 799-805.

297. Immunohistochemical and histopathological study of experimental rabies infection in mice / T.A. Sinchaisri, T. Nagata, Y. Yoshikawa [et al.] // J. Vet.Med. Sci. - 1992. - Vol. 54, N 3. - P. 409-416.

298. Immunohistochemical staining of rabies virus antigen with monoclonal and polyclonal antibodies in paraffin tissue sections / W. Feiden, E. Kaiser, L. Gerhard [et al.] // J. Vet. Med ,B. - 1988. - Vol. 35, N 4. - P. 247-255.

299. Immunohistochemical study of rabies virus within the central nervous system of domestic and wildlife species / L.T. Stein, R.R. Rech, L. Harrison, C.C. Brown // Vet. Pathol. -2010. - Vol. 47, N4. - P. 630-633.

300. Imported human rabies, the Philippines and Finland, 2007 / R. Rimhanen-Finne, A. Järvinen, M. Kuusi. [et al.] // Emerging Infect. Dis. - 2010. - 2010. - Vol. 16, N 8. - P.1318-1319.

301. In vivo interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N): existence of two N-binding sites on P protein / M. Chenik, K. Chebli, Y. Gaudin, D. Blondel // J. Gen. Virol. - 1994. - Vol. 75. - P. 2889-2896.

302. Incidence of human rabies and characterization of rabies virus nucleoprotein gene in dogs in Fujian Province, Southeast China, 2002-2012 / J.M. Zhang, Z.S. Zhang, Y.Q. Deng [et al.] // BMC Infect. Dis. -2017. - Vol. 17, N 1. - P. 599.

303. Institut Pasteur du Cambodge Annual Report, 2012. - P. 20-21.

304. Institut Pasteur du Cambodge Annual Report, 2013. - P. 21.

305. Inter-laboratory trial to evaluate the reproducibility of a new ELISA to detect rabies antibodies in vaccinated domestic and wild carnivores / A. Servat, A. Labadie, A. Hamen [et al.] // Biologicals. - 2008. - Vol. 36, N 1. - P. 19-26.

306. Involvement of nucleoprotein, phosphoprotein, and matrix protein genes of rabies virus in virulence for adult mice / K. Shimizu, N. Ito, T. Mita, K. Yamada // Virus Res. - 2007. - Vol. 123. - P. 154-160.

307. Isolation of field rabies virus strains in CER and murine neuroblastoma cell cultures / A.L. Smith, G.H. Tignor, R.W. Emmons, J.D. Woodie // Intervirology. - 1978. - Vol. 9. - P. 359-361.

308. Jackson, A.C. Biological basis of rabies virus neurovirulence in mice: comparative pathogenesis study using the immunoperoxidase technique / A.C. Jackson // J. Virol. - 1991. - Vol. 65. - P.537-550.

309. Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench / A.M. Waterhouse, J.B. Procter, D.M.A. Martin [et al.] // Bioinformatics. - 2009. - Vol. 25. - P. 1189-1191.

310. Jeffery, K. Diagnostic approaches / K. Jeffery, M. Aarons // Principles and Practice of Clinical Virology. - 6th ed. / A.J. Zuckerman, J.E Banatvala, B.D. Schoub Griffiths, P. Mortimer. - Wiley-Blackwell, UK, 2009. - P. 2-3.

311. Johnson, N. Archival study of a Finnish isolate from the 1988-89 rabies outbreak / N. Johnson, A.R. Fooks //Arch. Virol. - 2005. -Vol.150. - 1407-1414.

312. Johnson, N. Canine vaccine recipients recognize an immunodominant region of the rabies virus glycoprotein // N. Johnson, K.L. Mansfield, A.R. Fooks // J. Gen. Virol. 2002. - Vol. 83. - P.2663-2669.

313. Kaplan C. The world problem // Rabies. The Facts. - OUP, 1977. - P. 1-21.

314. Kaplan, M. M. Demonstration of rabies virus in tissue culture with fluorescent antibody technique / M. M Kaplan, Z. Forsre, H. Koprowski // Bull. WHO. - 1960. - N 22. - P. 434.

315. Kaplan, M.M. Safety precautions in handling rabies virus / M.M. Kaplan // Laboratory Techniques in Rabies. - 4th ed. // ed. F.-X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski. - Geneva: WHO, 1996. - P. 3-7.

316. King, D.A. A rapid quantitative in vitro serum neutralization test for rabies antibody / D.A. King, D.L. Croghan, E.L. Shaw // Can. Vet. J. - 1965. - Vol. 6. - P.187-193.

317. Kissi, B. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene / B. Kissi, N. Tordo, H. Bourhy // Virology. - 1995. - Vol. 209. - P. 526-537.

318. Kissling, R.E. Anti-rabies vaccine of tissue culture origin / R.E. Kissling, D.R. Reese // J. Immunol. - 1963. - Vol. 91. - P. 362-368.

319. Kissling, R.E. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture / R.E. Kissling // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1958. – Vol 98, N 2. - P. 223-225.

320. Knowledge, attitudes and practices of rabies prevention and dog bite injuries in urban and peri-urban provinces in Cambodia, 2009 / M. Lunney, S.J. Fèvre, E. Stiles [et al.] // Intern. Health. - 2012. – Vol. 4, N.1. - P. 4-9.

321. Komarov, A. Studies on the pathogenicity of an avianized street rabies virus / A. Komarov, K. Hornstein // Cornell Vet. - 1953. - Vol. 43, N 3. - P. 344-361.

322. Koporowski, H. Studies on chick embryo adapted rabies virus. 2. Pathogenicity for dogs and use of egg-adopted strains for vaccination purposes / H. Koporowski, H.R. Cox // J. Immunol. - 1950. - Vol. 64. - P. 185-196.

323. Koporowski, H. Studies on chick embryo adapted rabies virus. I. Culture characteristics and pathogenicity / H.Koporowski ,H.R. Cox // J. Immunol. - 1948. - Vol. 60. - P. 533-554.

324. Koprowski, H. After Pasteur history of new rabies vaccines / H. Koprowski // History of Vaccine Development / ed S.A. Plotkin. - Springer Sci.+Business Media, LLC, 2011. - P. 103-107.

325. Koprowski, H. Studies on chick-embryo-adapted-rabies virus. 4. Further changes in pathogenic properties following prolonged cultivation in the developing chick embryo / H. Koprowski, J. Black, D.J. Nelsen // J.Immunol. - 1954. - Vol.72, N 1. - P. 94-106.

326. Kouznetzoff, A. Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA / A. Kouznetzoff, M. Buckle, N. Tordo // J. Gen. Virol. - 1998. - Vol. 79, N 5. - P. 1005-1013.

327. Krebs, J.W. Rabies – epidemiology, prevention, and future research / J.W. Krebs, M.L. Wilson, J.E. Childs // J. Mammalogy. - 1995. - Vol.76. - P. 681-694.

328. Kulonen, K. Differentiation of two rabies strains in Estonia with reference to recent finish isolates / K. Kulonen, I. Boldina // J. Wildlife Dis. - 1993. - Vol. 29. - P. 209-213.

329. Kulonen, K. Methods for detecting arctic rabies virus in dilution series of field samples / K. Kulonen, E. Neuvonen, M. Topi // J. Virol. Methods. - 1991. - Vol. 32, N 2-3. - P. 149-155.

330. Laboratory Techniques in Rabies / F.-X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski [et al.] - Geneva: WHO, 1996. - 392p.

331. Lafon, M. Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and non-structural protein / M. Lafon, T.J. Wiktor // J. Gen. Virol. - 1985. -Vol. 66, N 10. - P. 2125-2133.

332. Lafon, M. Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies / M. Lafon, T.J. Wiktor, R.I. Macfarlan // J. Gen. Virol. - 1983. - Vol. 64. -P. 843-851.

333. Lafon, M. Investigation of the antigenic structure of rabies virus glycoprotein by monoclonal antibodies / M. Lafon, J. Ideler, H. Wunner, // Dev. Biol. Stand. - 1984. - Vol. 57. - P. 219-225.

334. Levaditi, C. Virus rabiqueet culture des cellules *in vitro* / C. Levaditi // C R S Soc. Biol. - 1913. - Vol. 75. - P. 505-509.

335. Linear and conformation-dependent antigenic sites on the nucleoprotein of rabies virus / N. Minamoto, H. Tanaka, M. Hishida [et al.] // Microbiol Immunol. - 1994. - Vol. 38, N 6. - P. 449-455.

336. Linhart, S.B. Fluorescent bone labeling of coyotes with demethylchlortetracycline / S.B. Linhart, J.J. Kennelly // J. Wildlife Management. - 1967. Vol. 31. - P. 317-321.

337. Localization and immunological characterization of antigenic domains of rabies virus internal N and NS proteins / B. Dietzschold, M. Lafon, H. Wang [et al.] // Virus Res. - 1987. -Vol.8. - P. 103-125.

338. Malerczyk, C. Imported human rabies cases in Europe, the United States, and Japan, 1990 to 2010 / C. Malerczyk, L. DeTora, D. Gniel [et al.] // J. Travel Medicine. - 2011. - Vol. 18. - P. 402-407.

339. Mani, R.S. Laboratory diagnosis of human rabies: recent advances R.S. Mani, S.N. Madhusudana // The Sci. World J. - 2013. - Vol. 5: e 569712, 10 p.

340. Mansfield, K.L. Identification of a conserved linear epitope at the N terminus of the rabies virus glycoprotein / K.L .Mansfield, N. Johnson, A.R. Fooks // J. Gen. Virol. - 2004. - Vol. 85, N 11. - P.3279-3283.

341. Manual of Standards for Diagnostic Techniques. – Geneva: OIE, 2017.

342. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus / H. Goto, N.Minamoto, H. Ito [et al.] // J. Gen Virol. - 2000. - Vol.8 1, N 1. - P. 119-127.

343. Mapping of monoclonal antibody epitopes of the rabies virus P protein / H. Raux, F. Iseni, F. Lafay, D. Blondel // J. Gen. Virol. - 1997. –Vol. 78. - P. 119-124.

344. Mapping of the antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies against the M2 protein of rabies virus / K. Hiramatsu, K. Mifune, K. Mannen // Virology. - 1992. - Vol. 187. - P. 472-479.

345. Mapping the interacting domains between the rabies virus polymerase and phosphoprotein / M. Chenik, M. Schnell, K.K. Conzelmann, D. Blondel // J. Virol. - 1998. - Vol. 72. - P. 1925-1930.

346. Measurement of rabies antibody: comparison of the mouse neutralization test (MNT) with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) / R.E. Louie, M.B. Dobkin, P. Meyer [et al.] // J. Biol. Stand. -1975. -Vol. 3, N 4. - P. 365-373.

347. Mebatsion, T. Isolation and characterization of 115 street rabies virus isolates from Ethiopia by using monoclonal antibodies: identification of 2 isolates as Mokola and Lagos bat viruses / T. Mebatsion, J.H. Cox, J.W. Frost // J. Infect. Dis. - 1992. - Vol. 166. - P. 972-977.

348. Mebatsion, T. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike

glycoprotein / T. Mebatsion, F. Weiland, K. Conzelmann // J. Virol. - 1999. – Vol. 73. - P. 5673-5679.

349. Mebatsion, T. Molecular analysis of rabies-related viruses from Ethiopia / T. Mebatsion, J.H. Cox, K.K. Conzelmann // Onderstepoort J. Vet. Res. - 1993. - Vol. 60, N 4. - P. 289-294.

350. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. // K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson [et al.] // Mol. Biol. Evol. - 2013.- Vol. 30. - P. 2725-2729.

351. Membrane and inclusion body targeting of lyssavirus matrix proteins / R. Pollin, H. Granzow, B. Köllner [et al.] // Cell Microbiol. - 2013. - Vol. 15, N 2. - P. 200-212.

352. Mol, H. The rabies situation in Poland / H. Mol // Proc. Symp. on Anthropozoonoses. - Strbské Pleso, 1971. - P. 36-40.

353. Molecular analysis of the mutational effects of Thai street rabies virus with increased virulence in mice after passages in the BHK cell line / P. Virojanapirom, P. Khawplod, A. Sawangvaree [et al.] // Arch. Virol. - 2012. - Vol. 157, N 11. - P. 2201-2205.

354. Molecular and antigenic characterization of rabies viruses from Iran identifies variants with distinct epidemiological origins / S.A. Nadin-Davis, S. Simani, J. Armstrong [et al.] // Epidemiol. Infect. - 2003. - Vol. 131. - P.777-790.

355. Molecular basis for the interaction between rabies virus phosphoprotein P and the dynein light chain LC8: dissociation of dynein-binding properties and transcriptional functionality of P / N. Poisson, E. Real,Y. Gaudin [et al.] // J. Gen. Virol. - 2001. - Vol. 2. - P. 2691-2696.

356. Molecular basis of neurovirulence of flury rabies virus vaccine strains: importance of the polymerase and the glycoprotein R333Q mutation / L. Tao, J. Ge, X. Wang H. Zhai // J. Virol. - 2010. - Vol. 84. N 17. - P. 8926-8936.

357. Molecular basis of rabies virus virulence. I. Selection of avirulent mutants of the CVS strain with anti-G monoclonal antibodies / P. Coulon, P. Rollin, M. Aubert, A. Flamand // J. Gen. Virol. - 1982. - Vol. 61. - P. 97-100.

358. Molecular characterization of China rabies virus vaccine strain / W. Jiao, X. Yin, Z. Li [et al.] // Virol. J. - 2011. - Vol. 17, N 8. - P. 521.

359. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19 / K. Conzelmann, J. Cox, L. Schneider, H. Thiel // Virology. - 1990. - Vol. 175. - P. 485-499.

360. Molecular epidemiological study of Arctic rabies virus isolates from Greenland and comparison with isolates from throughout the Arctic and Baltic regions // K.L. Mansfield, V. Racloz, L.M. McElhinney [et al.] // Virus Res. - 2006. Vol.116, N 1-2. - P. 1-10.

361. Molecular epidemiology of rabies in Thailand / N. Ito, M. Sugiyama, K. Oraveerakul [et al.] // Microbiol. Immunol. - 1999. -Vol.4 3, N 6. - P. 551-559.

362. Molecular epidemiology of rabies in Vietnam / J. Yamagata, K. Ahmed, P. Khawplod [et al.] // Microbiol. Immunol. - 2000. - Vol. 51, N 9. - P. 833-840.

363. Molecular epidemiology of rabies virus circulating in South Korea, 1998-2010 / D.K. Yang, E.K. Shin, Y.I. Oh [et al.] // J. Vet. Med. Sci. - 2011. - Vol. 73, N 8. - P. 1077-1082.

364. Molecular epidemiology of rabies Virus in France: comparison with vaccine strains / D. Sacramento, H. Badrane, H. Bourhy, N. Tordo // J. Gen. Virol. - 1992. - Vol. 73. - P. 1149-1158.

365. Molecular epidemiology of rabies virus in Vietnam (2006-2009) / A.K. Nguyen, D.V. Nguyen, G.C. Ngo [et al.] // Jpn. J. Infect. Dis. - 2011. - Vol. 64, N 5. - P. 391-396.

366. Molecular epidemiology of rabies virus isolates from Israel and other middle- and Near-Eastern countries / D. David, B. Yakobson, J.S. Smith, Y. Stram // J. Clin. Microbiol. - 2000. - Vol. 38. - P. 755-762.

367. Molecular epidemiology of rabies virus isolates from South Korea / B.H. Hyun, K.K. Lee, I.J. Kim [et al.] // Virus Res. - 2005. - Vol. 114. - P. 113-125.

368. Molecular epidemiology of rabies viruses circulating in two rabies endemic provinces of Laos, 2011-2012: regional diversity in Southeast Asia / K. Ahmed, P.

Phommachanh, P. Vorachith [et al.] // PloS Negl. Trop. Dis. - 2015. - Vol. 9, N 3: e0003645.

369. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union / I.V. Kuzmin, A.D. Botvinkin, L.M. McElhinney[et al.] // J. Wildlife Dis. - 2004. - Vol. 40. - P. 617-631.

370. Mongoose rabies in southern Africa: a re-evaluation based on molecular epidemiology / L.H. Nel, C.T. Sabeta, B. von Teichman [et al.] // Virus Res. - 2005. - Vol. 109. - P. 165-173.

371. Monoclonal antibody characterization of rabies virus strains isolated in the River Plate Basin / H.A. Delpietro, F. Gury-Dhomen, O.P. Larghi // Zentralbl. Veterinarmed. - 1997. - Bd. 44. - S.477-483.

372. Montagnon ,B.J. Polio and rabies vaccines produced in continuous cell lines: a reality for Vero cell line / B.J. Montagnon // Dev. Biol. Stand. - 1989. - Vol. 70. - P. 27-47.

373. More accurate insight into the incidence of human rabies in developing countries through validated laboratory techniques // L. Dacheux, S. Wacharapluesadee, T. Hemachudha [et al.] // PloS Negl. Trop. Dis. - 2010. - Vol. 4: e765.

374. Murray, C.J.L. The Global Burden of Disease: A comprehensive assessment of mortality and disability from disease, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020. Global Burden of Disease and Injuries Series. Vol. 1. / C.J.L. Murray, A.D. Lopez. - Cambridge: Harward University Press, 1996. – 44 p.

375. Nadin-Davis, S.A. A molecular epidemiological study of rabies virus in central Ontario and western Quebec / S.A. Nadin-Davis, G.A. Casey, A.I. Wandeler // J. Gen. Virol. - 1994. - Vol. 75, N 10. - P. 2575-2583.

376. Nadin-Davis, S.A. Polymorphism of rabies viruses within the phosphoprotein and matrix protein genes / S.A. Nadin-Davis, W. Huang, A.I. Wandeler // Arch. Virol. - 1997. - Vol. 142, N 5. – P. 979-992.

377. Nadin-Davis, S.A. Identification of regional variants of the rabies virus within the Canadian province of Ontario / S.A. Nadin-Davis, G.A. Casey, A. Wandeler // J. Gen. Virol. - 1993. - Vol. 74, N 5. - P. 829-837.

378. Negri, A. Bertrag zum stadium der Aetologic der tollwith /A. Negri // Ztschr. fur Hyg. und Infectionskr. - 1903. - Bd.14. - S.507.

379. Nei, M. Molecular Evolution and Phylogenetics / M. Nei, S. Kumar. - New York: Oxford Univ. Press, 2000.

380. Noguchi, H. Contribution to the cultivation of the parasite of rabies / H. Noguchi // J. Exp. Med. - 1913. - Vol. 18, N 3. - P. 314-316.

381. Nogueira, Y.L. Estimate of validaty of a new method for the isolation of rabies virus / Y.L. Nogueira // Rev. Saude Publica. - 2004. - Vol. 38, № 2. - P. 1-8.

382. Nonfatal rabies in dogs: experimental studies and results of a survey / J.F. Bell, M.A. Gonzalez, A.M. Diaz, G.J. Moore // Amer. J. Vet. Res. -1971. - Vol. 32, N 12. - P. 2049-2058.

383. Novel lyssavirus in bat, Spain / N. Aréchiga Ceballos, S. Vázquez Morón, J. M. Berciano [et al.] // Emerg. Infect. Dis. - 2013. - Vol. 19, N 5. - P.793-795.

384. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Vol. 1. - Paris, 2017. – URL: http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online

385. Okoh, A.E. Antigenic characterization of rabies virus isolates from vaccinated dogs in plateau state, Nigeria / A.E. Okoh // Vet. Res. Commun. - 2000. - Vol. 24. - P. 203-211.

386. Olson,C.A. Bait ingestion by free-ranging raccoons and nontarget species in an oral rabies vaccine field trial in Florida / C.A Olson, K.D. Mitchell, P.A. Werner // J. Wildlife Dis. - 2000. - Vol. 36, N. 4. - P. 734-743.

387. Oral immunization against rabies: concept and first field experiments / A.I. Wandeler, S. Capt, A. Kappeler, R. Hauser [et al.] // Rev. Infect. Dis. 1988. - Vol.10, Suppl. 4. - P.649-653.

388. Oral immunization of foxes against rabies / F. Steck, A. Wandeler, P. Bichsel [et al.] // Zbl. Vet. Med. B. - 1982. - Vol. 29. - P. 372-396.

389. Oral rabies vaccination of red foxes and golden jackals in Israel: preliminary bait evaluation / S.B. Linhart, R. King, S. Zamir [et al.] // Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. - 1997. - Vol. 16. - P. 874-880.

390. Oral vaccination of foxes against rabies with SAD B19 in Europe, 1983-1998: A review / A. Vos, T. Muller, P. Schuster [et al.] // Vet. Bull. - 2000. - Vol. 70, N 1. - P. 1-6.

391. Overexpression of the rabies virus glycoprotein results inenhancement of apoptosis and antiviral immune response / M. Fabe, R.Pulmanausahakul, S.S. Hodawadekar [et al.] // J. Virol. - 2002. - Vol.76, N 7. - P. 3374-3381.

392. Pasteur, L. Methode pour prevenir la rage morsure / L. Pasteur // CR Acad. Sci. - 1885. - Vol. 101. - P. 722-765.

393. Pastoret , P.P. Epidemiology and control of fox rabies in Europe / P.P. Pastoret, B. Brochier // Vaccine. - 1999. - Vol. 17. - P. 1750-1754.

394. Pathogenicity of rabies viruses isolated in China: two fixed strains and a street strain / Y. Huang, Q. Tang S. Rayner [et al.] // Biomed Environ. Sci. - 2013. - Vol. 26, N 7. - P. 552-561.

395. Perl, D.P. pathology of rabies in the central nervous system / D.P. Perl // Baer G.M. The Natural History of Rabies. - New York: Acad. Press,1975. - Vol. 1. - P. 235-272.

396. Perrin, P. A rapid rabies enzyme immunodiagnosis (RREID): a useful and simple technique for the diagnosis of rabies / P. Perrin, P.E. Rollin, P. Sureau // J. Biologicals. - 1986, N 14. - P. 217-222.

397. Phylogenetic comparison of rabies viruses from disease outbreaks on the Svalbard Islands / N, Johnson A, Dicker T Mork [et al.] // Vector Borne Zoonotic Dis. - 2007. - Vol.7, N 3. - P.457-460.

398. Phylogenetic comparison of the genus Lyssavirus using distal coding sequences of glycoprotein and nucleoprotein genes / N. Johnson, M. McElhinney, J.Smith [et al.] // Arch. Virol. - 2002. - Vol.147. - P. 2111-2123.

399. Phylogeographic patterns exhibited by Ontario rabies virus variants / S.A. Nadin-Davis, M.I. Sampath, G.A. Casey [et al.] // Epidemiol. Infect. - 1999. - Vol. 123. - P. 325-336.

400. Population structure of some street rabies virus strains / S.V. Gribencha, L.Y. Gribanova, G.B. Malkov, I.F. Barinsky // Arch. Virol. -1989. - Vol. 104. - P. 347-350.

401. Predicting the spatial dynamics of rabies epidemics on heterogeneous landscapes / D.L. Smith, B. Lucey, L.A. Waller [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2002. - Vol. 99. - P. 3668-3672.

402. Préhaud, C. Baculovirus-expressed rabies virus M1 protein is not phosphorylated: it forms multiple complexes with expressed rabies N protein / C. Préhaud, K. Nel, D.H. Bishop // Virology. - 1992. - Vol. 189, N 2. - P. 766-770.

403. Prevalence of rabies virus infection and rabies antibody in stray dogs: a survey in Bangkok, Thailand / S. Kasempimolporn, B. Sichanasai, W. Saengseesom [et al.] // Vet. Med. - 2007. - Vol. 78, N 3-4. - P. 325-32.

404. Rabies / L.Mattila, E. Kolho, O. Vapalahti [et al.] // Duodecim. -2010. - Vol. 126, N 4. - P.418-425.

405. Rabies diagnosis for developing countries // S. Dürr, S. Naïssengar, R. Mindekem [et al.] // PloS Negl. Trop. Dis. - 2008. - Vol. 2, N 3 : e206.

406. Rabies in Baltics / B. Westerling, Z. Anderson, J. Rimeicans // Historical Prospective of Rabies in Europe and Mediterranean Basin / ed. A. King, A. Fooks, M. Aubert, A. Wandeler. - Paris, 2004. - P. 33-46.

407. Rabies in Estonia: situation before and after the first campaigns of oral vaccination of wildlife with SAG2 vaccine bait / E. Niin, M. Laine, A.L. Guiot [et al.] // Vaccine. - 2008. - Vol. 26, N 29-30. - P. 3556-3565.

408. Rabies in the Mongolian steppes / A.D. Botvinkin, D. Otgonbaatar, S. Tsoodol, I.V. Kuzmin // Developments in Biologicals. - 2008. - Vol. 131. - P. 199-205.

409. Rabies in wildlife in Latvia / S. Vanaga, R. van der Heide, R. Joffe, W.H. van der Poel // Vector Borne Zoonot Dis. - 2003. – N 3. - P. 117-124.

410. Rabies neutralizing antibody response to different schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons // R. Atanasiu, M. Bahmanyau, M. Baltazard [et al.] // Bull. WHO. - 1956. – N 14. - P. 593.

411. Rabies situation in Cambodia / S. Ly, P. Buchy, N.Y. Heng[et al.] // PloS Negl. Trop. Dis. - 2009. - Vol. 8, N 3 (9): e511.

412. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein / I. Seif, P. Coulon, P.E. Rollin, A. Flamand // J. Virol. - 1985. - Vol. 53. - P. 926-934.

413. Rabies virus detection by RT-PCR in decomposed naturally infected brains / D. David, B. Yakobson, D. Rotenberg // Vet. Microbiol. - 2002. - Vol. 87, N 2. - P. 111-118.

414. Rabies virus glycoprotein is a trimer / Y.Gaudin, R.W Ruigrok, C. Tuffereau [et al.] // Virology. - 1992. - Vol. 187. - P. 627-632.

415. Raccoon dog rabies surveillance and post-vaccination monitoring in Lithuania 2006 to 2010 / D. Zienius, G. Pridotkas, R. Lelesius, V. Sereika // Acta Vet. Scand. - 2011. - Vol. 53. - P. 58.

416. Raccoon poxvirus live recombinant feline panleukopenia virus VP2 and rabies virus glycoprotein bivalent vaccine / L. Hu, C. Ngichabe, C.V. Trimarchi [et al.] // Vaccine. - 1997. - Vol.15. - P.1466-1472.

417. Rapid diagnosis of rabies and post-vaccinal encephalitides / M.J. Warrell, S. Looareesuwan, S. Manatsathit [et al.] // Clin. Exp. Immunol. - 1988. - Vol. 71. - P. 229-234.

418. Recombinant vaccines under development: human and canine adenovirus / A.I. Wandeler, K.M. Charlton, J.B. Campbell [et al.] // Wildlife Rabies Control: Proc. Intern.WHO Symp. - Geneva, 1990. - P. 117-118.

419. Recovery from rabies, a universally fatal disease / S. Manoj, A. Mukherjee, S. Johri, K.V. Kumar // Milit. Med. Res. - 2016. - Vol. 3. - P. 21.

420. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia / D.L. Knobel, S.Cleaveland , P.G. Coleman[et al.] // Bull WHO. - 2005. - Vol. 83, N 5. - P. 360-368.

421. Rhodes, A. J. Strains of Rabies Virus Available for Preparation of Sylvatic Rabies Vaccines with Special Reference to Vaccines Prepared in Cell Culture / A. J. Rhodes // Can. Vet. J. 1981. - Vol. 22, N 8 - P. 262-266.

422. Round table on epidemiology and control of fox rabies / V. Kihm, A. Flamand, P.P. Pastoret, E. Peterhans // Adv. Vet. Virol. - 1992. - Vol. 33. - P. 297-301.

423. Rudd, R.J. Development and evaluation of an in vitro virus isolation procedure as a replacement for the mouse inoculation test in rabies diagnosis / R.J. Rudd, C.V. Trimachi // J. Clin. Microbiol. - 1989. Vol. 7.- P. 2522- 2528.

424. Rzhetsky, A. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees / A. Rzhetsky, M. Nei // Mol. Biol. Evol. -1992. - Vol. 9. - P. 945-967.

425. SAG-2 oral rabies vaccine / C.L. Schumacher, P. Coulon, F. Lafay F [et al.] // Onderstepoort J. Ve.t Res. - 1993. - Vol. 60, N 4. - P.459-462.

426. Saitou, N. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // Molecular Biology and Evolution. - 1987. - Vol. 4. - P. 406-425.

427. Schneider, L.G. Spread of virus within central nervous system / L.G. Schneider // Baer, G.M. The Natural History of Rabies. - New York; London: Acad. Press, 1975. - Vol.1. - P. 199-301.

428. Second case of European bat lyssavirus type 2 detected in a Daubenton's bat in Finland / T. Nokireki, T. Sironen, T. Smura [et al.] / / Acta Vet. Scand. -2017. - Vol. 59, N 1. - P. 62.

429. Semple, D. On the nature of rabies and antirabic treatment / D. Semple // British Medical J. - 1919. - Vol. 2, N 3064. - P. 371-373.

430. Sensitivity of different cell lines for rabies virus isolation / M. Tollis, C. Buonavoglia, L. Trani, E. Vignolo // J. Vet. Med. B. - 1988. -Vol. 35, N 7. - P. 504-508.

431. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains / O. Poch, B.M. Blumberg, L. Bougueleret, N. Tordo // J. Gen. Virol. - 1990. - Vol. 71, N 5. - P. 1153-1162.

432. Sequencing and molecular characterization of CTNCEC25, a China fixed rabies virus vaccine strain CTN-1 adapted to primary chicken embryo cells / S. Zhu, C. Wang, P. Zhang [et al.] // Virol. J. -2014. - Vol. 11. - P. 176.

433. Serologic evidence of Lyssavirus infection in bats, Cambodia / J-M. Reynes, S. Molia, L. Audry [et al.] // Emerging Infect. Dis. - 2004. -Vol.10, N 12. - P. 2231-2234.

434. Shwiff, S. Potential economic benefits of eliminating canine rabies / S. Shwiff, K. Hampson, A. Anderson // Antiviral Res. - 2013. - Vol. 98, N 2. - P. 352-356.

435. Sihvonen, L. Documenting freedom from rabies and minimising the risk of rabies being re-introduced to Finland / L. Sihvonen // Rabies Bull Eur. - 2003. - Vol. 27. - P. 5-6.

436. Smith, J.M. Emerging viral infections in transplantation // J.M.Smith, R.A. McDonald // Pediatr Transplant. - 2006. - N 10. - P. 838-843.

437. Smith, J.S. Rabies: a new look at an old disease // J.S. Smith, H.D. Seidel // Progr. Med. Virol. - 1993. - Vol. 40. - P. 82-106.

438. Spill-over of European bat lyssavirus type 1 into a stone marten (Martes foina) in Germany // T. Müller J. Cox, W. Peter [et al.] // J. Vet. Med., B. - 2004. - Vol. 51,N 2. - P. 49-54.

439. Spooner, M.H. UK has first rabies death in a century / M.H. Spoone // Can. Med. Assoc. J. - 2003. - Vol.168. - P. 331.

440. Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AvO1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation / F. Lafay, P. Coulon, L. Astic [et al] // Virology. - 1991. - Vol. 183, N 1. - P. 320-329.

441. Studies on rabies virus RNA polymerase: 1. cDNA cloning of the catalytic subunit (L protein) of avirulent HEP-flury strain and its expression in animal cells / K. Morimoto, T. Akamine, F. Takamatsu, A. Kawai // Microbiol. Immunol. - 1998..- Vol. 42, N 7. - P..485-496.

442. Studies on the antigenicity and nucleotide sequence of the rabies virus Nishigahara strain, a current seed strain used for dog vaccine production in Japan /

S. Sakamoto, T. Ide, H. Nakatake, S. Tokiyoshi [et al.] // Virus Genes. - 1994. - Vol. 8, N 1. - P. 35-46.

443. Summary measures of population health: concepts, ethics, measurements, and applications / C.J.L. Murray, J.A. Salmon, C.D. Mathers, A.D. Lopez. - Geneva, WHO, 2002. – 29 p.

444. Tajima, F. Simple methods for testing molecular clock hypothesis / F. Tajima // Genetics. – 199. - Vo.l 135. - P. 599-607.

445. Tamura ,K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases / K. Tamura // Mol. Biol. Evol. - 1992. - Vol. 9. - P. 678-687.

446. Tentative novel lyssavirus in a bat in Finland / T. Nokireki, N. Tammiranta, U.M. Kokkonen // Transbound. Emerg. Dis. - 2018. - Feb 15.

447. Tepsumethanon, V. Six criteria for rabies diagnosis in living dogs / V. Tepsumethanon, H. Wilde, F.X. Meslin [et al.] // J. Med. Assoc. Thai. - 2005. - Vol. 88. - P. 419-422.

448. The adaptation of a CTN-1 rabies virus strain to high-titered growth in chick embryo cells for vaccine development / C. Guo, C. Wang, S. Luo [et al.] // Virol J. - 2014. - Vol. 12, N11. - P. 85.

449. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain / M.J. Schnell, J.P. McGettigan, C. Wirblich, A. Papaneri // Nat. Rev. Microbiol. - 2010. - Vol. 8, N 1. - P. 51-61.

450. The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription / G.S. Tan, M.A. Preuss, J.C. Williams, M.J. Schnell // Proc. Natl. Acad. Sci USA. - 2007 Vol. 104, N 17 . - P. 7229-7234.

451. The Global Burden of Disease Assessments—WHO Is Responsible? / C. Stein T, Kuchenmüller, S. Hendrickx [et al.] // PloS Negl. Trop. Dis. - 2007. - Vol. 1, N 3: e161.

452. The origin and phylogeography of dog rabies virus / H. Bourhy, J.M. Reynes, E.J. Dunham [et al.] // J. Gen. Virol. - 2008. - Vol.89, N 11. - P. 2673-2681.

453. Thomas, J. B. Evaluation of indirect fluorescent antibody technique for detection of rabies antibody in human sera / J. B. Thomas, R. K. Sykes, A. S. Ricker // J. Immunol. - 1963. - Vol. 91, N 6. - P. 721.

454. Thraenhart, O. Human rabies and its prevention / O. Thraenhart // Historical Prospectives of Rabies in Europe and the Mediterranean Basin / ed. A.A. King, A.R. Fooks, M. Aubert, A.I. Wandeler. - Paris: OIE, 2004. - P. 325-335.

455. Tordo, N. Characteristics and molecular biology of the rabies virus / N. Tordo // Laboratory Techniques in Rabies / ed. F.-X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski. - Geneva, 1996. - P. 28-53.

456. Tordo, N. PCR technology for *Lyssavirus* diagnosis / N. Tordo H. Bourhy, D. Sacramento // The Polymerase chain Reaction (PCR) for Human Viral Diagnosis / ed. Clewley J. [et al.]. - London, 1995. - P. 125-145.

457. Tordo, N. The polymerase chain reaction (PCR) technique for diagnosis, typing and epidemiological studies of rabies / N. Tordo, D. Sacramento, H. Bourhy // Laboratory Techniques in Rabies / ed. F.-X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski. - Geneva, 1996. - P. 157-170.

458. Touch, S. Rabies in animals in Cambodia / S. Touch // Proc. 4th Intern. Symp. on Rabies Control in Asia / ed. B. Dodet, F-X. Meslin, E. Heseltine. - Hanoi, 2001. - P. 209.

459. Touch, S. Rabies in humans in Cambodia / S. Touch // Proc. 4th Intern. Symp. on Rabies Control in Asia / ed. B. Dodet, F-X. Meslin, E. Heseltine. - Hanoi, 2001. - P. 208.

460. Two African viruses serologically and morphologically related to rabies virus / R.E. Shope, F.A. Murphy, A.K. Harrison [et al.] // J. Virol. - 1970. - Vol. 6, N 5. - P. 690-692.

461. Udow, S.J. Clinical features of dog- and bat-acquired rabies in humans / S.J. Udow, R.A. Marrie, A.C. Jackson // Clin. Infect. Dis. - 2013. - Vol. 57. - P. 689–696.

462. Umoh, J.U. Antigenic characterization of street rabies virus isolates from Nigeria using monoclonal antibodies / J.U. Umoh, J.H. Cox, L.G. Schneider // J.

Vet. Med. - 1990. - Vol. 37. - P. 222-228.

463. Umoh, J.U. Immunofluorescent staining of rabies virus antigen in formalin-fixed tissue after treatment with trypsin / J.U. Umoh, D.C. Blenden // Bul. WHO.- 1981. - Vol. 59, N 5. - P. 737-744.

464. Unifying the spatial population dynamics and molecular evolution of epidemic rabies virus / L.A Real, J.C. Henderson, R. Biek [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2005. - Vol. 102. - P. 2107-12111.

465. Use of vaccinia rabies recombinant for oral vaccination of wildlife / P. Desmettre, B. Languet, G. Chappuis [et al.] // Vet. Microbiol. - 1990. - Vol. 23. - P. 227-236.

466. Viljoen, G.J. Molecular diagnostic PCR handbook / G.J. Viljoen, L.H. Nel, J. R. Crowther. - Dordrecht, The Netherlands, 2009. - P. 5.

467. Vincze, T. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes / T.Vincze, J. Posfai, R.J. Roberts // Nucleic Acids Res. - 2003. - Vol. 31. - P. 3688-3691.

468. Wacharapluesadee, S. Ante- and post-mortem diagnosis of rabies using nucleic acid-amplification tests / S. Wacharapluesadee, T. Hemachudha // Expert Rev. Mol. Diagn. - 2010. - Vol. 10, N 2. - P. 207-218.

469. Wachendorfer, G. Gegenwartiger Stand der Vakzination von Fuchsen gegen Tollwut / G. Wachendorfer // Der praktische Tierarzt. - 1976. – Bd. 12. - S. 801-808.

470. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? / N. Tordo, O. Poch, A. Ermine [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1986. - Vol. 83, N 11. - P. 3914-3918.

471. Wandeler, A.I. Oral immunization against rabies: afterthoughts and foresight / A.I. Wandeler // Schweizer Archiv für Tierheilkunde. -2000. - Vol.142, N 8. - P. 455-462.

472. Wang, L. Rabies and rabies virus in wildlife in mainland China, 1990-2013 / L. Wang, Q. Tang, G. Liang // Intern. J. Infect. Dis. - 2014. - Vol. 25. - P. 122-129.

473. Webster, W.A. Diagnosis of rabies infection / W.A. Webster, G.A. Casey // Rabies / ed. J.B. Campbell, K.M. Charlton. - Boston: Kluwer Acad. Publ., 1988. - P. 201-222.

474. WHO Expert Consultation on Rabies. Second Report. WHO Technical Report Series 982. - Geneva, Switzerland : WHO Press, 2013. – 150 p.

475. WHO Report of the Symposium on Rabies Control in Asian Countries. WHO / Rab. Res. / 93.44. - Jakarta, Indonesia, 27-30 April, 1993. - 42 p.

476. Wiktor, T.J. Cultivation of rabies virus in human diploid cell strain WI-38 / T.J. Wiktor, M.V. Fernandez, H. Koprowski // J. Immunol. - 1964. - Vol. 93. - P. 353-366.

477. Wiktor, T.J. Human cell culture rabies vaccine / T.J. Wiktor, S.A. Plotkin, D.W. Grella // JAMA. - 1973. - Vol. 224. - P. 1170-1117.

478. Wiktor, T.J. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cells hybridization: detection of antigenic variants // T.J. Wiktor, H. Koprowski // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1978. - Vol. 75. - P. 3938-3942.

479. Winkler, W.G. Control of rabies in Wildlife // W.G. Winkler, K. Bogel // Scientific Amer. - 1992. - Vol. 266. - P. 56-62.

480. Young, C.C. Laboratory: a new method for staining Negri bodies of rabies / C.C. Young, T.F. Sellers // Amer. J. Public Health (NY). – 1927. - Vol. 17, N 10. – P. 1080–1081.

481. Yuhong, W. Rabies and rabid dogs in sumerian and akkadian literature / W. Yuhong // J. Amer. Orient. Soc. - 2001. - Vol. 121, N 1. - P. 32.

6 ПРИЛОЖЕНИЯ

Опись приложений:

Приложение 1: титульный лист «Методических указаний по отбору и пересылке проб головного мозга, сывороток крови и костной ткани с целью диагностики бешенства животных и оценки эффективности оральных антирабических вакцин», утвержденных ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Приложение 2: копия свидетельства № ПВР-1-2.5/01672 о государственной регистрации Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору «Набора для диагностики бешенства методом иммунофлуоресценции».

Приложение 3: титульный лист «Методических рекомендаций по диагностике бешенства животных методом иммунофлуоресценции», утвержденных ФГБУ «ВНИИЗЖ» и Россельхознадзором.

Приложение 4: титульный лист «Методических рекомендаций по выделению вируса бешенства в культуре клеток нейробластомы мыши», утвержденных ФГБУ «ВНИИЗЖ» и Россельхознадзором.

Приложение 5: титульный лист «Методических рекомендаций по выявлению антигенов вируса бешенства в головном мозге животных в твердофазном прямом сэндвич-варианте иммуноферментного анализа», утвержденных ФГБУ «ВНИИЗЖ» и Россельхознадзором.

Приложение 6: титульный лист «Методических рекомендаций по выявлению фрагментов генома вируса бешенства в обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)», утвержденных ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Приложение 7: титульный лист «Методических указаний по выявлению генома вируса бешенства и дифференциации вакцинного штамма РВ-97», утвержденных ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Приложение 8: титульный лист «Методических указаний по разработке метода диагностики бешенства животных в реакции агглютинации латекса», утвержденных ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Приложение 9: титульный лист «Методических указаний по выявлению антигена вируса бешенства в ткани головного мозга животных иммуногистохимическим методом», утвержденных ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Приложение 10: Патент на изобретение RU 2266755 20.04.2004, «Способ выявления антигена вируса бешенства в формалинизированных пробах головного мозга животных».

Приложение 11: Техническое задание на выполнение лабораторных диагностических исследований на бешенство в 2013 г.

Приложение 12: титульный лист «Методических указаний по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (FAVN)», утвержденных ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Приложение 13: титульный лист «Методических рекомендаций по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови диких плотоядных животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (RFFIT)», утвержденных ФГБУ «ВНИИЗЖ» и Россельхознадзором.

Приложение 14: титульный лист утвержденных «Методических указаний по ускоренному определению антирабических вируснейтрализующих антител в сыворотках крови диких плотоядных животных в реакции микронейтрализации»

Приложение 15: титульный лист «Методических указаний по определению антител к гликопротеину вируса бешенства в сыворотках крови животных в иммуноферментном анализе», утвержденных ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Приложение 16: титульный лист «Методических рекомендаций по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в тканях зубов и костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин», утвержденных ФГБУ «ВНИИЗЖ» и Россельхознадзором.

Приложение 17: Патент на изобретение Российской Федерации № 2533802 «Тримеризованное однодоменное антитело, специфически связывающееся с гликопротеином G вируса бешенства, нейтрализующее вирус бешенства».

Приложение 18: Анкета проверяемого специалиста и результаты исследования проверочной панели образцов в РИФ.

Приложение 19: Протокол о начале Российско-финской программы по

профилактике бешенства диких животных в граничащих с Финляндией регионах России.

Приложение 20: Фрагмент финального отчета «Инициатива по стратегическому партнерству в области здравоохранения 2007-2010».

Приложение 21: Фрагмент финального отчета «Инициатива по стратегическому партнерству в области здравоохранения 2010-2012».

Приложение 22: Титульный лист утвержденного научного отчета, реферат и список исполнителей по Государственному контракту №1087/13 от 21.05.2009 г. с Министерством сельского хозяйства Российской Федерации на выполнение научно-исследовательских работ по теме: «Разработка методических рекомендаций по борьбе с бешенством животных».

Приложение 23: Решение о Комплексе совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года, комплекс совместных действий (полный текст) и Решение межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии от 11.09.2018.

Приложение 24: Диплом российской агропромышленной выставки «Золотая осень - 2010» о награждении золотой медалью ФГУ «ВНИИЗЖ».

Приложение 25: Диплом российской агропромышленной выставки «Золотая осень - 2018» о награждении золотой медалью ФГУ «ВНИИЗЖ».

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»

(ФГУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО
Заместитель директора
ФГУ «ВНИИЗЖ»
_____ В.В. Борисов
«30» июня 2009 г

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГУ «ВНИИЗЖ»
_____ Е.В. Белик
«01» июля 2009 г

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по отбору и пересылке проб головного мозга, сывороток крови и костной ткани с целью диагностики бешенства животных и оценки эффективности оральных антирабических вакцин

Авторы:
Чернышова Е.В.
Сухарьков А.Ю.
Метлин А.Е.
Белик Е.В.
Назаров Н.А.
Чепуркин А.В.
Рыбаков С.С.

Рассмотрены и одобрены методкомиссией
Протокол № 6 от «19» июня 2009 г.
Утверждены ученым советом ФГУ «ВНИИЗЖ»
Протокол № 8 от «26» июня 2009 г.

Владимир 2009 г.

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ
И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ

СВИДЕТЕЛЬСТВО

О ГОСУДАРСТВЕННОЙ РЕГИСТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

Учетная серия 12-1-2.5-0782 **Регистрационный №** ПВР-1-2.5/01672

от 30 июня 2006 года (дата) **срок действия до** 30 июня 2011 года (дата)

Настоящее свидетельство выдано организации-производителю (заявитель)

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»,

г. Владимир, п. Юрьевец

о том, что в соответствии со статьей 19 Федерального закона «О лекарственных средствах»,

набор для диагностики бешенства животных методом иммунофлюоресценции
(полное название лекарственного средства для животных)

в виде набора компонентов (форма)

применяется для диагностических целей в ветеринарии

ЗАРЕГИСТРИРОВАНО В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Заместитель Руководителя

Россельхознадзора (должность) (подпись, печать) Е.А. Непоклонов (И.О. Фамилия)

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора по качеству
_____ С.К. Старов
«31» мая 2016 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА ЖИВОТНЫХ МЕТОДОМ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Авторы: Сухарьков А.Ю.
Еремина А.Г.
Назаров Н.А.
Егоров А.А.
Метлин А.Е.
Шульпин М.И.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 2
от "25" мая 20___ г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 8
от "31" мая 2016 г.

Владимир 2016

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» ФГБУ «ВНИИЗЖ»

_____ Д.А. Лозовой

«14» сентября 2017 г.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору

_____ Н.А. Власов

«15» сентября 2017 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА ЖИВОТНЫХ В РЕАКЦИИ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Владимир 2017

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора по качеству
_____ С.К. Старов
«31» мая 2016 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ВЫДЕЛЕНИЮ ВИРУСА БЕШЕНСТВА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ

Авторы: Чернышова Е.В.
Назаров Н. А.
Метлин А.Е.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 2
от "25" мая 2016 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 8
от "31" мая 2016 г.

Владимир 2016 г.

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

_____ Д.А. Лозовой
«___» _____ 2016 г.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору

_____ Н.А. Власов
«06» 11 2016 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ВЫДЕЛЕНИЮ ВИРУСА БЕШЕНСТВА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ

Владимир 2016

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора по качеству
_____ С.К. Старов
«31» мая 2016 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ВЫЯВЛЕНИЮ АНТИГЕНОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЖИВОТНЫХ В ТВЕРДОФАЗНОМ ПРЯМОМ СЭНДВИЧ-ВАРИАНТЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Авторы: Сухарьков А.Ю.
Назаров Н.А.
Метлин А.Е.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 2
от "25" мая 2016 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
Протокол № 8
от "31" мая 2016 г.

Владимир 2016

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

_____ Д.А. Лозовой
«03» 06 2016 г.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору

_____ Н.А. Власов
«06» 06 2016 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ВЫЯВЛЕНИЮ АНТИГЕНОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЖИВОТНЫХ ТВЕРДОФАЗНОМ ПРЯМОМ СЭНДВИЧ-ВАРИАНТЕ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Владимир 2016

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
Федеральное государственное учреждение»
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»)»

СОГЛАСОВАНО

Зам.директора
по научной работе
_____ В.В. Борисов
«23» ноября 2010 г.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГУ «ВНИИЗЖ»
_____ В.А. Грубый
«23» ноября 2010 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по выявлению фрагментов генома вируса бешенства
в обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

Авторы:

Чернышова Е.В.

Чупин С.А.

Метлин А.Е.

Прохватилова Л.Б.

Рыбаков С.С.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
протокол № 9
от "11" ноября 2010 г.

Рассмотрено и утверждено
ученым советом
протокол № 12
от "23" ноября 2010 г.

БИБЛИОТЕКА
ФГУ ВНИИЗЖ
Инв №

Владимир 2010 г.

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
Федеральное государственное бюджетное учреждение»
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора по качеству
ФГБУ «ВНИИЗЖ»
_____С.К. Старов
“23” 11 2011 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ВЫЯВЛЕНИЮ ГЕНОМА ВИРУСА БЕШЕНСТВА И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ВАКЦИННОГО ШТАММА РВ-97 ОТ ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Авторы: Иовлева А.Ю.
Чупин С.А.
Чернышова Е.В.
Метлин А.Е.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
протокол № 7
“18” 11 2011 г.

Рассмотрено и рекомендовано
к утверждению ученым советом
протокол № 8
“22” 11 2011 г.

Владимир 2011

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО

Зам. директора
по НИР и развитию
_____ В.В. Дрыгин
«20» ноября 2012 г.

УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора по качеству
_____ С.К. Старов
«21» ноября 2012 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО РАЗРАБОТКЕ МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА ЖИВОТНЫХ В РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ ЛАТЕКСА

Авторы: Назаров Н.А.
Рыбаков С.С.
Метлин А.Е.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
протокол № 9
от "15" ноября 2012 г.

Рассмотрено ученым советом и
рекомендовано к утверждению
протокол № 7
от "16" НОЯБРЯ 2012 г.

Владимир 2012

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное учреждение
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЗАЩИТЫ ЖИВОТНЫХ

СОГЛАСОВАНО
Зам. директора ВНИИЗЖ
по НИР
_____ Байбиков Т.З.
"____"_____ 2003 г.

УТВЕРЖДАЮ
Директор ВНИИЗЖ
_____ Гусев А.А.
"____"_____ 2003 г.

Методические указания по выявлению антигена вируса бешенства в ткани головного мозга животных иммуногистохимическим методом

Рассмотрены и одобрены:
Методической комиссией
протокол № 9
от "17" 12 2002 г.;

Ученым советом ВНИИ
защиты животных,
протокол № 1
от "10" 01 2003 г.

Владимир 2002 г.

Методические указания разработаны во Всероссийском научно-исследовательском институте защиты животных МСХ РФ
600900 г. Владимир, Юрьевец.

Разработчики:

Мл. научн. сотр. _____ Егоров А.А.
"25" 11 2002 г.

Зав. лаб., докт. биол. наук, профессор _____ Рыбаков С.С.
"____" _____ 2002 г.

Канд. вет. наук., ст. научн. сотр _____ Чепуркин А.В.
"____" _____ 2002 г.

Зед. биолог _____ Рябоконь А.А.
"____" _____ 2002 г.

Ст. технолог _____ Комаров И.М.
"____" _____ 2002 г.

Вет. врач _____ Метлин А.Е.
"____" _____ 2002 г.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 266 755** (13) **C1**

(51) МПК[7] **A 61 K 39/205, G 01 N 33/569**

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004112106/13, 20.04.2004

(24) Дата начала действия патента: 20.04.2004

(45) Опубликовано: 27.12.2005 Бюл. № 36

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: BARNARD B.J. et al., "A simple technique for the rapid diagnosis of rabies in formalin-preserved brain", Onderstepoort J Vet Res. 1982 Dec;49(4):193-4.

Адрес для переписки:
600901, г.Владимир, п. Юрьевец, ФГУ ВНИИЗЖ, К.Н. Груздеву

(72) Автор(ы):
Метлин А.Е. (RU),
Рыбаков С.С. (RU),
Чепуркин А.В. (RU),
Егоров А.А. (RU),
Груздев К.Н. (RU)

(73) Патентообладатель(ли):
Федеральное государственное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных" (ФГУ ВНИИЗЖ) (RU)

(54) СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНА ВИРУСА БЕШЕНСТВА В ФОРМАЛИНИЗИРОВАННЫХ ПРОБАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЖИВОТНЫХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарной вирусологии. Предложен способ выявления антигена вируса бешенства в формалинизированных пробах головного мозга животных. Способ основан на постановке прямого жидкофазного варианта реакции иммунофлюоресценции (ПЖ РИФ) с испытуемым антигеном. Способ включает приготовление суспензии антигенного материала из формалинизированной пробы, отмывания антигенного материала от формалина, трипсинизацию антигенного материала и отмывание антигенного материал от трипсина. Далее проводят получение препарата специфического комплекса "антиген-антитело" в жидкой фазе путем соединения суспензии антигенного материала с антителами ФИТЦ-глобулина, отмывание препарата специфического комплекса от непрореагировавших компонентов и нанесение препарата специфического комплекса на твердую подложку. Затем проводят исследование препарата специфического комплекса под люминисцентным микроскопом и учет результатов реакции. Специфическую флюоресценцию регистрируют в виде ярких зеленоватых включений в нейронах, их отростках, а также за пределами нейронов. За отрицательный результат принимают равномерно светящийся зеленоватый фон без ярких включений. Изобретение обеспечивает повышение чувствительности, уменьшение затрат времени, снижение токсичности и себестоимости анализа. Предложенный способ может быть использован в ветеринарии, вирусологии и медицине. 5 табл.

RU 2266755 C1

RU 2266755 C1

ПРИЛОЖЕНИЕ 11

Техническое задание на выполнение лабораторных диагностических исследований на бешенство в 2013 г. в соответствии с Приказом Россельхознадзора от 18.01.2013 № 18

Приказом Россельхознадзора от 30.12.2013 № 676 «О лабораторных исследованиях в рамках реализации мероприятий Россельхознадзора для обеспечения выполнения требований Соглашения ВТО по СФС при вступлении России в ВТО на 2014 г.» ФГБУ «ВНИИЗЖ» поручено проведение исследований патматериала из ряда регионов РФ, а также обобщение и подготовка сводного отчета по мониторингу бешенства в Российской Федерации.

Цель проведения мониторинговых исследований: уточнение ситуации по бешенству в ряде населенных пунктов Российской Федерации. Исследованию подлежат пробы головного мозга бездомных собак и кошек (**не менее 30% от общего числа проб, собираемых в регионе**), возрастом старше 1 месяца, диких плотоядных животных (лисицы, енотовидные собаки, шакалы, песцы, волки, барсуки), а также, по возможности, летучие мыши, на территории 26 субъектов Российской Федерации. **Пробы, полученные от сельскохозяйственных животных включению в мониторинг не подлежат**.

Задачи лабораторных диагностических исследований:

1. Провести отбор проб головного мозга в субъектах РФ, перечисленных в приложении к Приказу Россельхознадзора от 18.01.2012 № 18 в количестве, согласно указанному в том же приложении по методике, согласно **Приложению №1** настоящего технического задания. Исполнители – территориальные Управления Россельхознадзора;
2. Провести диагностические исследования на бешенство в соответствии с инструкцией к диагностическому антирабическому флуоресцирующему иммуноглобулину и ГОСТ «Методы лабораторной диагностики бешенства», исполнители – МВЛ и РЦ Россельхознадзора согласно Приказу Россельхознадзора от 18.01.2012 № 18. Рекомендуется для проведения диагностических исследований использовать диагностический антирабический флуоресцирующий иммуноглобулин производства ФГБУ «ВНИИЗЖ». Для проведения исследований могут применяться следующие методы лабораторной диагностики:

РИФ (обязательно), биопроба на мышах или вирусовыделение в культуре клеток, ИФА или ПЦР; т.е. применяется РИФ плюс один из методов вирусовыделения (для отрицательных проб), ИФА или ПЦР могут применяться при необходимости в качестве подтверждающих методов. **Применять для мониторинга гистологические исследования не следует.**

3. Доставить пробы, собранные в Республике Карелия, Владимирской, Костромской, Ивановской, Новгородской, Ленинградской, Самарской, Рязанской областях в количестве согласно таблице 1 настоящего технического задания. Исполнители – территориальные управления, МВЛ и РЦ Россельхознадзора.

Таблица 1

Детализация в части исследований, проводимых в ФГБУ «ВНИИЗЖ

Регион	**Число проб**	**Исследования в ФГБУ «ВНИИЗЖ»**				
		РИФ	**ИФА**	**Вирусовыд. в культуре клеток**	**Биопроба**	**Всего**
Р. Карелия	**26**	26	15	17	10	68
Владимирская обл.	**22**	22	15	14	10	61
Костромская обл.	**22**	22	15	14	10	61
Ивановская обл.	**22**	22	15	14	10	61
Новгородская обл.	**22**	22	15	14	10	61
Ленинградская обл.	**22**	22	15	14	10	61
Самарская обл.	**22**	22	15	14	10	61
Рязанская обл.	**22**	22	15	14	10	61
Всего	**180**	180	120	115	80	495

4. Подготовить суммарный отчет о проделанной работе согласно форме, представленной в **Приложении №2**, ежемесячно отчитываться о проделанной работе путем внесения данных в автоматизированную систему

Асоль. Полный отчет по форме (Приложение 2), представить в ФГБУ «ВНИИЗЖ» не позднее 01 февраля 2013 года. Исполнители – МВЛ и РЦ Россельхознадзора согласно Приказу Россельхознадзора от 18.01.2012 № 18.

Отчеты с анализом данных и предложениями на будущий год предоставлять на бумажном носителе по почте либо сканированный вариант в электронной форме с подписью руководителя организации и печатью организации и обязательно в электронной форме в формате Word на адреса mail@arriah.ru и metlin@arriah.ru.

5. Подготовить сводный отчет по мониторингу бешенства, исполнитель – ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Отбор проб головного мозга для диагностики бешенства

1. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ

Соблюдение мер безопасности является важным моментом вследствие возможности заражения бешенством при работе с патологическим материалом. Наиболее опасной операцией является вскрытие черепной коробки и извлечение головного мозга, когда возможно травмирование кожи рук об острые костные обломки, режущие инструменты, попадание патологического материала в глаза, рот и на кожу. Опасность инфицирования сохраняется и при отборе проб крови/трупной жидкости, а также при отборе и подготовке к отправке проб костной ткани (ветвь нижней челюсти с зубами). В связи с этим процедуру вскрытия черепной коробки и извлечения головного мозга следует проводить в специальной одежде (халат, чепчик, резиновые перчатки, перчатки, устойчивые к механическим повреждениям, полумаска/щиток из оргстекла, ватно-марлевая маска, фартук, нарукавники). Обязательно в наличии должны быть дезинфицирующие вещества: препараты, содержащие четвертичный аммоний в концентрации 1:500, 45-70% этиловый спирт, l% мыльный раствор, 5-7% йодный раствор. Указанные растворы убивают вирус бешенства в течение 1 минуты и могут также применяться для обработки ран. Для дезинфекции использованных пипеток используют растворы, содержащие четвертичный аммоний в концентрации 1:1000, любой йодный дезинфектант в концентрации как минимум 1:10 000, или 1% водный раствор мыла. Растворы следует автоклавировать и затем утилизировать после каждого использования. Горячий раствор мыла или других детергентов может использоваться для мытья полов и поверхностей лабораторной мебели.

Все сотрудники, участвующие в отборе и подготовке патологического материала, должны быть вакцинированы против бешенства в установленном порядке.

В случае получения повреждений кожного покрова, слизистых оболочек загрязненными патологическим материалом инструментами, костными осколками и т.д., а также при попадании фрагментов или брызг патологического материала на слизистые оболочки глаз, рта и др. следует немедленно провести дезинфекцию инфицированных участков с использованием препаратов, содержащих 45-70% этиловый спирт, l% водный раствор мыла, 5-7% йодный раствор, и срочно обратиться к врачу для проведения экстренной антирабической вакцинации. При проведении всех работ необходимо соблюдать требования Санитарных правил 1.2.011-94 от 04.05.1994.

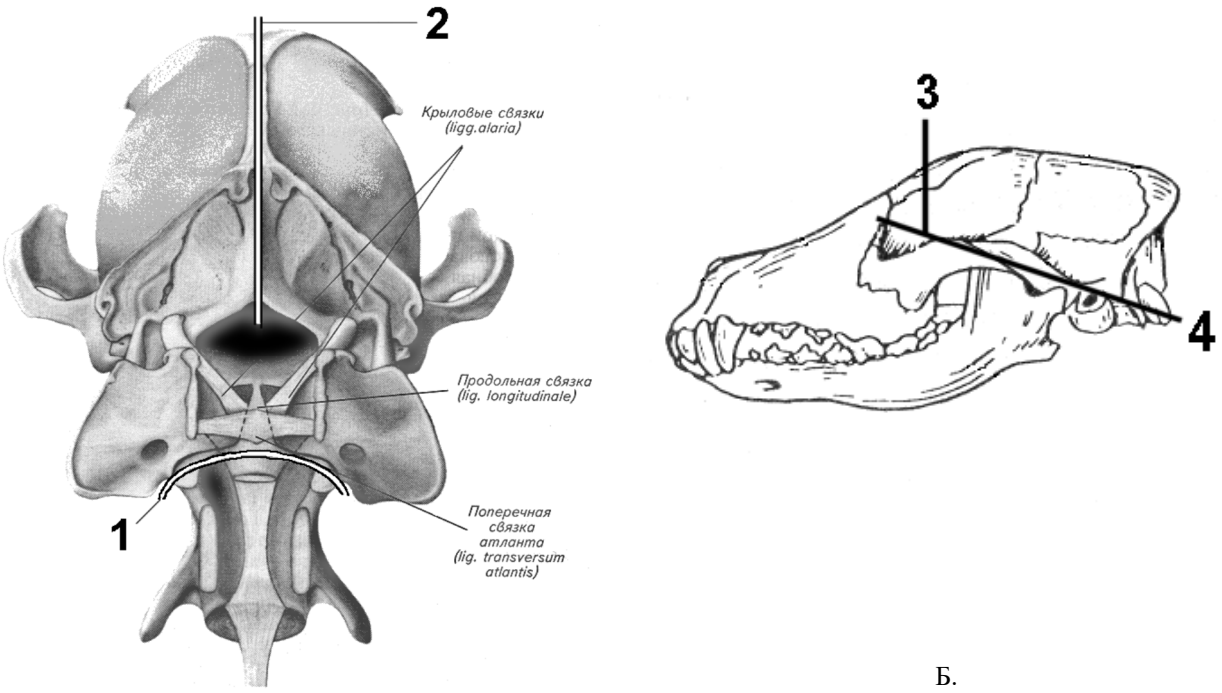
2. КЛАССИЧЕСКИЙ МЕТОД ОТБОРА ПРОБ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Оборудование и материалы

Набор анатомический большой УХЛ 3.1 или аналогичный;
Морозильник с охлаждением до -20^{0}С;
Сумка-холодильник или ее аналоги;
Перчатки анатомические;
Полумаска из оргстекла;
Кювета эмалированная;
Фартук и нарукавники с водоотталкивающей пропиткой;
Халат, чепчик, ватно-марлевая маска;
Дезинфицирующие средства

Проведение работы

Голову животного отделяют между первым и вторым шейными позвонками, как показано на рис. 1 А, и упаковывают ее в полиэтиленовый пакет, снабженный номером, который затем помещают в специальный охлаждающий контейнер и направляют для вскрытия в лабораторию, имеющую допуск к работе с микроорганизмами II группы патогенности. Можно доставлять труп мелкого животного целиком.



А. Б.

Рис. 1. Схема распиливания черепа животного семейства собачьих для извлечения головного мозга целиком. А 1. – место разреза между первым и вторым шейными позвонками при отделении головы от туловища; 2 – продольный распил от лобной кости до большого затылочного отверстия, глубина 0,3-0,5 см; Б 3 – поперечный распил за глазницами на глубину 0,5-1,5 см; 4 – косой распил от края глазниц до большого затылочного отверстия.

Работу по вскрытию головы и извлечению головного мозга проводят два сотрудника (врач и ассистент) с использованием инструментов, указанных в п. 5.1. Они должны быть обеспечены специальной одеждой и соблюдать меры безопасности в соответствии с п. 4. Вскрытие проводят в специально отведенном и оборудованном для этих целей помещении, на столе из нержавеющей стали, оборудованном центральным стоком и водопроводом. Голову помещают в эмалированную кювету, ассистент фиксирует ее за глазницы или верхнюю челюсть специальными щипцами. С помощью скальпеля и пинцета с головы удаляют кожу и мягкие ткани.

С помощью пилы делают один продольный распил лобной и затылочной костей, при этом ориентиром служат наружный сагиттальный и затылочный гребни. Затем делают поперечный распил лобной кости, отступя 0,5-1,5 см за глазницами (в зависимости от размера черепа) и глубиной 0,5-1,5 см (рис.2). Кости черепа раздвигают с помощью долота, вставленного в распил. При необходимости делают с каждой стороны дополнительные косые распилы. Косой распил проходит через теменную, височную кости и мыщелок, соединяя край поперечного распила и большое затылочное отверстие и может в ряде случаев заменять продольный распил (рис. 1 Б, 2 и 3).

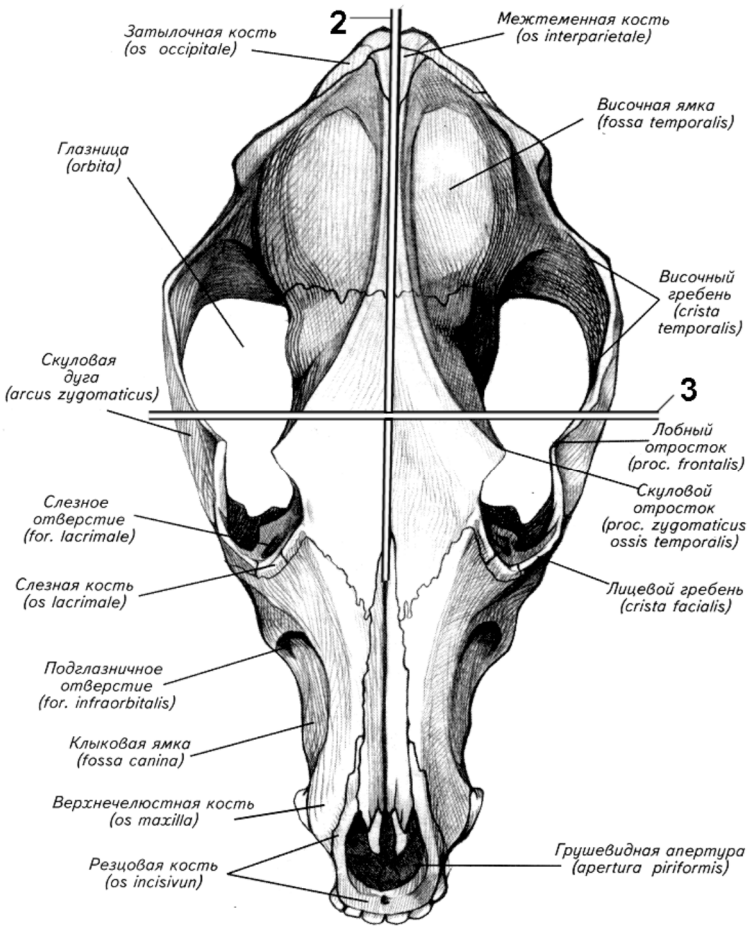
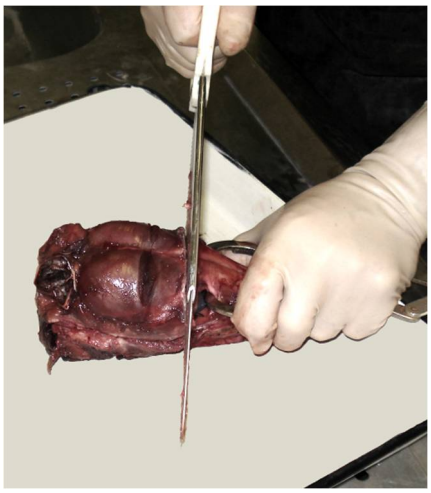


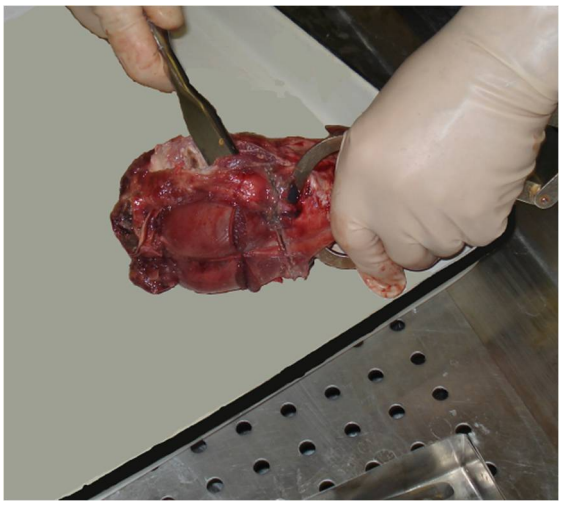
Рис. 2. Череп животного семейства собачьих (вид сверху) 2 – продольный распил от лобной кости до большого затылочного отверстия, глубина 0,3-0.5 см; 3 – поперечный распил за глазницами на глубину 0,5-1,5 см.

В распилы вставляют долото и аккуратно раздвигают кости черепа обнажая головной мозг, покрытый твердой мозговой оболочкой (рис. 3).

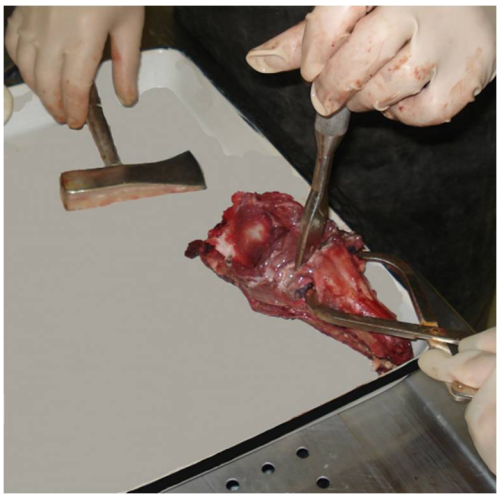


А.

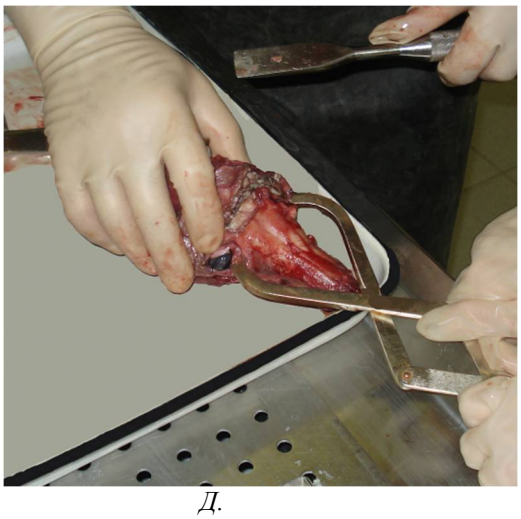
Б.



В.



Г.

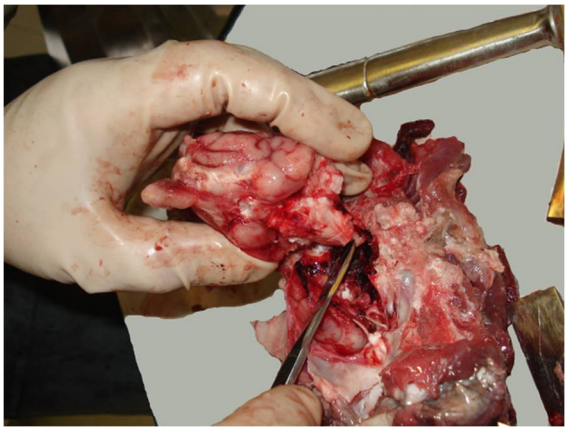


Д.

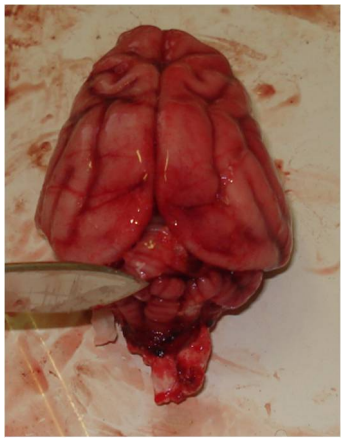
Е.

Рис. 3. *Вскрытие черепной коробки у лисицы: А – поперечный распил за глазницами; Б – косой распил; В, Г, Д – разъединение костей черепа с помощью долота; Е – кости черепа удалены.*

С помощью ножниц и пинцета удаляют твердую мозговую оболочку, затем ассистент приподнимает вскрываемую голову в положение близкое к вертикальному а врач извлекает головной мозг целиком, аккуратно подрезая черепно-мозговые нервы ножницами с длинными брашнами или скальпелем (рис. 4).



А.



Б.

Рис. 4. *А – извлечение головного мозга; Б – извлеченный головной мозг.*

Если в лаборатории, проводившей вскрытие, не проводятся диагностические исследования на бешенство, то извлеченный головной мозг помещают в стерильную стеклянную или пластиковую тару, которую герметично закрывают, пробу подвергают заморозке при -20^{0}С и затем направляют на исследование. Если в лаборатории проводятся диагностические исследования на бешенство, пробу помещают в чашку Петри или другую тару и направляют для проведения исследований.

Допускается хранение проб головного мозга при +4-+8^{0}С сроком не более 24 часов. Если необходимо более длительное хранение, патологический материал замораживают.

Перед вскрытием следующей головы инструмент необходимо прокипятить не менее 10-15 минут, затем промыть водой и вновь прокипятить в дистиллированной воде при том же режиме.

Остатки материала (голова, труп животного и т.д.) уничтожают путем сжигания в специальной печи или автоклавированием в течение одного часа при двух атмосферах.

Пересылку патологического материала для диагностики бешенства осуществляют только в сопровождении нарочного. Для этого патологический материал замораживают, помещают в герметичную стеклянную или пластиковую тару, которую, в свою очередь, помещают в металлический контейнер. В контейнер помещают сопроводительное письмо и опись проб, заверенные руководителем учреждения, направляющего материал для проведения исследований. Контейнер помещают в термоконтейнер с хладагентами или с системой принудительного охлаждения и направляют для проведения исследований.

В исключительных случаях, при невозможности консервирования патологического материала путем замораживания, допускается консервирование в 50% глицерине, приготовленном на фосфатном буферном растворе pH 7,8 или на воде.

3. ОТБОР ПРОБ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПОМОЩЬЮ ПЛАСТИКОВОЙ ТРУБКИ ЧЕРЕЗ ЗАТЫЛОЧНОЕ ОТВЕРСТИЕ

Оборудование и материалы

Кювета эмалированная;
Морозильник с охлаждением до -20^{0}С;
Сумка-холодильник или ее аналоги;
Перчатки анатомические;
Полумаска из оргстекла;
. Трубка пластиковая (для коктейля) диаметром 5 мм или гильза от троакара для КРС или МРС;
Фартук и нарукавники с водоотталкивающей пропиткой;
Халат, чепчик, ватно-марлевая маска;
Дезинфицирующие вещества.

Проведение работы

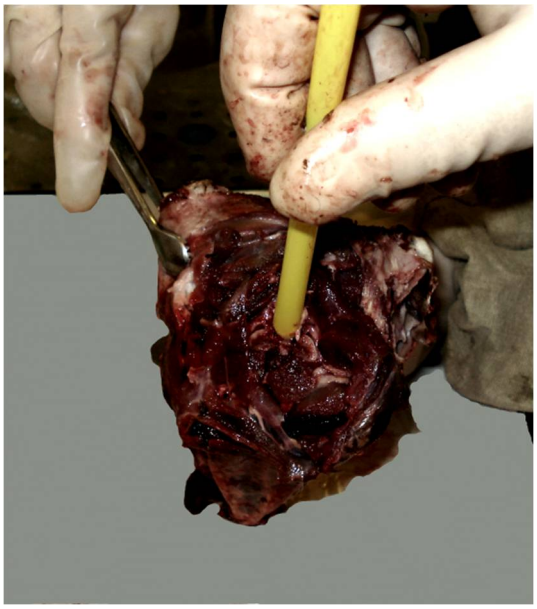
Работу проводит один специалист. Голову животного кладут на эмалированную кювету (рис. 6 А) лобной костью вниз или берут в левую руку (мелкие животные), пластиковую трубку (рис. 6 Б) берут в правую руку.

А.

Б.

Рис. 6 А *– голова лисицы в кювете;* ***Б*** *– пластиковые трубки диаметром 5 мм.*

Пластиковую трубку вводят в затылочное отверстие сначала почти вертикально (рис. 7 А), чтобы отобрать участок продолговатого мозга и мозжечка, затем трубку переводят в горизонтальное положение и продвигают диагонально в направлении одного из глаз, при этом отбирают участки аммонова рога и коры больших полушарий.



А.

Б.

В.

Г.

Рис. 7. *Отбор пробы головного мозга через затылочное отверстие.* ***А, Б*** *– введение трубки в затылочное отверстие;* ***В, Г*** *– извлечение пробы головного мозга.*

Трубку смещают в сторону в горизонтальном направлении, загибают, чтобы при извлечении трубки материал из нее не вышел, извлекают трубку и выдавливают (рис. 7. В, Г) из нее патологический материал (можно выдувать с помощью спринцовки).

При необходимости отбор пробы повторяют несколько раз.

Полученную пробу головного мозга помещают в стерильную стеклянную или пластиковую тару, которую герметично закрывают. Пробу подвергают заморозке при -20^{0}С и затем направляют на исследование.

Использованные пластиковые трубки обеззараживают кипячением, автоклавированием или сжигают.

4. ОТБОР ПРОБ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ПОМОЩЬЮ ТРОАКАРА РЕТРООРБИТАЛЬНЫМ СПОСОБОМ

Оборудование и материалы

Кювета эмалированная;
Морозильник с охлаждением до -20^{0}С;
Сумка-холодильник или ее аналоги;
Перчатки анатомические;
Полумаска из оргстекла;
Троакары для КРС или МРС;
Фартук и нарукавники с водоотталкивающей пропиткой;

Халат, чепчик, ватно-марлевая маска;
Дезинфицирующие

Проведение работы

Работу проводит один специалист. Голову животного кладут на эмалированную кювету. При поступлении трупа целиком голову можно не отделять.

Троакар вместе с гильзой вводят в глазное отверстие, отодвинув глазное яблоко вниз или в сторону. Вращая троакар и применяя умеренное усилие, делают прокол дна глазницы. В прокол вводят гильзу троакара в направлении затылочного отверстия, затем закрывают отверстие гильзы резиновой пробкой или пальцем, извлекают гильзу и с помощью стилета троакара выталкивают патологический материал.

Полученную пробу головного мозга помещают в стерильную стеклянную или пластиковую тару, которую герметично закрывают. Пробу подвергают заморозке при -20^{0}С и затем направляют на исследование.

При необходимости отбор проб можно повторить несколько раз.

Троакар после каждого использования обеззараживают кипячением или автоклавированием, тщательно промывают моющим средством и ершиком и стерилизуют.

Форма отчета
«Мониторинг бешенства»

1. Наименование исполнителя (ФГБУ Россельхознадзора) и соисполнителей.
2. Информация о лицензии на работу с микроорганизмами 2 группы патогенности (серия, номер, кем и когда выдана, срок действия).
3. Введение (описание эпизоотической ситуации по бешенству в регионе и обзор проводимых мероприятий).
4. Общая информация анамнестического характера (где, кем, когда проводился отбор проб и диагностические исследования, сроки проведения).
5. Обоснование путей проведения мониторинга (выбор населенных пунктов и распределение норм отбора проб по ним).
6. Методы лабораторной диагностики (представить информацию об используемых диагностикумах (серия, контроль, годность, производитель), нормативные документы.
7. Подробная информация об отобранных пробах и результатах исследований (оформить в виде таблицы, см. ниже).
8. После таблицы представить краткий статистический анализ проведенных исследований (процент положительных и отрицательных проб), а также краткий географический анализ (географическое распределение положительных и отрицательных проб.

Таблица.

№ п/п	Вид/порода[1]	Возраст[2]	Пол	Место отлова[3]	Дата			Результаты диагностических исследований		Примечания
					Отлова	Отбора проб	Проведе-ния диагн. исслед.	РИФ[4]	Биопроба	

[1]Указать породу, если известна, для беспородных животных поставить аббревиатуру «б.п.»; [2]Указать приблизительный возраст; [3]Указать населенный пункт (город, район, поселок), в котором отловили животное; [4]Реакция иммунофлуоресценции, указать «полож.» - для положительных результатов, указать «отриц.» для отрицательных результатов, указать номер экспертизы.

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
Федеральное государственное бюджетное учреждение»
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)»

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора по качеству
ФГБУ «ВНИИЗЖ»
_____С.К. Старов
"23" 12 2011 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ БЕШЕНСТВА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЖИВОТНЫХ В РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВНК-21 (FAVN)

Авторы: Чернышова Е.В.
Назаров Н. А.
Метлин А.Е.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
протокол № 7
"18" 11 2011 г.

Рассмотрено и рекомендовано
к утверждению ученым советом
протокол № 8
"22" 11 2011 г.

Владимир 2011 г.

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДЕНО:
Зам. директора по качеству
_____С.К. Старов
«31» мая 2016 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ БЕШЕНСТВА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ДИКИХ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ В РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВНК-21 (RFFIT)

Авторы: Чернышова Е.В.
Иовлева А.Ю.
Назаров Н.А.
Метлин А.Е.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 2
от «25» мая 2016 г.

Рассмотрено и рекомендовано
к утверждению ученым советом
Протокол № 8
от «31» мая 2016 г.

Владимир 2016

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУ «Федеральный
центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

_____ Д.А. Лозовой
«03» 06 2016 г.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
Федеральной службы по ветеринарному и
фитосанитарному надзору

_____ А.В. Власов
«06» 06 2016 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ БЕШЕНСТВА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ДИКИХ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ В РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК ВНК-21 (RFFIT)

Владимир 2016

СОГЛАСОВАНО
Зам. директора
по НИР и развитию
_____ В.В. Дрыгин
«20» ноября 2012 г.

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора по качеству
_____ С.К. Старов
«__» ноября 2012 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО УСКОРЕННОМУ ОПРЕДЕЛЕНИЮ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ДИКИХ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ В РЕАКЦИИ МИКРОНЕЙТРАЛИЗАЦИИ

Авторы: Чернышова Е.В.
Иовлева А.Ю.
Метлин А.Е.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
Протокол № 9
от "15" ноября 2012 г.

Рассмотрено ученым советом
и рекомендовано к утверждению
Протокол № 4
от "16" ноября 2012 г.

Владимир 2012

ЧЕРНА
СЕКРЕТАРЬ
ВНИИЗЖ
В.С. РУСАЛЕЕВ

ПРИЛОЖЕНИЕ 15

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
Федеральное государственное учреждение»
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»)»

УТВЕРЖДАЮ
Зам.директора по качеству
_____ С.К. Старов
«4» февраля 2011 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ АНТИТЕЛ К ГЛИКОПРОТЕИНУ ВИРУСА БЕШЕНСТВА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЖИВОТНЫХ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

Авторы: Сухарьков А.Ю.
Иовлева А.Ю.
Чернышова Е.В.
Назаров Н.А.
Метлин А.Е.
Рыбаков С.С.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
протокол № 1
от "28" января 2011г.

Рассмотрено и утверждено
ученым советом
протокол № 2
от "03" 02 2011 г.

Владимир 2011

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору
федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

УТВЕРЖДАЮ
Зам. директора по качеству
_____ С.К. Старов
«31» мая 2016 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ОБНАРУЖЕНИЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ АНТИБИОТИКОВ ТЕТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА В ТКАНЯХ ЗУБОВ И КОСТЕЙ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПОЕДАЕМОСТИ ОРАЛЬНЫХ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН

Авторы: Сухарьков А.Ю.
Чернышова Е.В.
Метлин А.Е.
Назаров Н.А.
Егоров А.А.
Шульпин М.И.

Рассмотрено и одобрено
методкомиссией
протокол № 2
от "25" мая 2016 г.

Рассмотрено и утверждено
ученым советом
протокол № 8
от "31" мая 2016 г.

Владимир 2016

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВЕТЕРИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУ «Федеральный
центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

_____ Д.А. Лозовой
«__» _____ 2016 г.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Руководителя
Федеральной службы по ветеринарному и
фитосанитарному надзору

_____ Н.А. Власов
«__» _____ 2016 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ОБНАРУЖЕНИЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ АНТИБИОТИКОВ ТЕТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА В ТКАНЯХ ЗУБОВ И КОСТЕЙ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ПОЕДАЕМОСТИ ОРАЛЬНЫХ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН

Владимир 2016

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 533 802** (13) **C1**

(51) МПК
C07K 16/10 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013140283/10, 30.08.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.08.2013

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 30.08.2013

(45) Опубликовано: 20.11.2014 Бюл. № 32

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 2013039926 A1, 14.02.2013. US 2009041777 A1, 12.02.2009. RU 2272809 C2, 27.03.2006

Адрес для переписки:
119270, Москва, Фрунзенская наб., 38/1, кв. 136, Коваленко В.В.

(72) Автор(ы):
Тиллиб Сергей Владимирович (RU),
Иванова Татьяна Ильинична (RU),
Васильев Лев Анатольевич (RU),
Метлин Артем Евгеньевич (RU),
Шмаров Максим Михайлович (RU),
Логунов Денис Юрьевич (RU),
Тутыхина Ирина Леонидовна (RU),
Алексеева Светлана Викторовна (RU),
Народицкий Борис Савельевич (RU),
Гинцбург Александр Леонидович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)

(54) ТРИМЕРИЗОВАННОЕ ОДНОДОМЕННОЕ АНТИТЕЛО, СПЕЦИФИЧЕСКИ СВЯЗЫВАЮЩЕЕСЯ С ГЛИКОПРОТЕИНОМ G ВИРУСА БЕШЕНСТВА, НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЕ ВИРУС БЕШЕНСТВА

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области иммунологии и вирусологии и предполагает использование антител, представляющих собой тримеризованные однодоменные антитела, для профилактики и терапии бешенства. Создано тримеризованное однодоменное антитело, специфически связывающееся с поверхностным (капсидным) белком - гликопротеином G, вируса бешенства, имеющее аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, аминокислотная последовательность которого кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 1, и при этом нейтрализующее инфекционную активность вируса бешенства. 2 з.п. ф-лы, 4 ил., 1 табл.

RU 2533802 C1

RU 2533802 C1

ПРИЛОЖЕНИЕ 18

Анкета проверяемого специалиста и результаты исследования проверочной панели образцов в РИФ

«___»_____200__г.

Фамилия _____ Имя_____ Отчество_____

Год рождения_____ Организация _____

_____

Образование_____ Специальность_____ Стаж работы_____

Стаж работы по диагностике бешенства в РИФ_____ Должность_____

Результаты исследования образцов и их расшифровка

Номер образца	Результат исследования (заполняется проверяемым)	Результаты расшифровки (заполняется проверяющим)	
		Номер образца по шифру	Статус образца
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			
10.			
Подпись проверяемого:		Подпись проверяющего:	

Описание результатов расшифровки и их интерпретация_____

_____

_____

_____

Результат проверки_____

Подписи членов комиссии

_____

_____

_____

_____

Rabies Bait Vaccination Programme in Russia and Finland

Based on the agreement of Programme for collaboration between the All-Russian Research Institute for Animal Health and National Veterinary and Food Research Institute on rabies bait vaccination programme between Finland and Russia, it has been agreed in our meeting in Lappeenranta on 6.-7.9.2000:

- on the exchange of information,
- delivery of vaccines from Finland to Russia,
- collection and amount of samples to be analysed,
- transport of equipment and samples between Finland and Russia,
- methods to be used for analysing the samples,
- exchange of experts between Finland and Russia,
- need to arrange a new meeting to discuss the progress of the program and necessary future actions

Lappeenranta 7. September 2000

Signed by

Vasilij V. Seliverstov
Assistant Manager
Veterinary Department
Ministry of Agriculture and Food
of the Russian Federation

Leonid S. Fogel
Head
Veterinary Section
Leningrad Region
Committee for Agriculture

Sergej S. Rybakov
Director
All Russian Institute
for Animal Health

Jaana Husu-Kallio
Director General
Veterinary and Food Department
Ministry of Agriculture and Forestry

Esko Uusi-Rauva
Director General
National Veterinary and Food
Research Institute

American International Health Alliance

Project Closeout Report

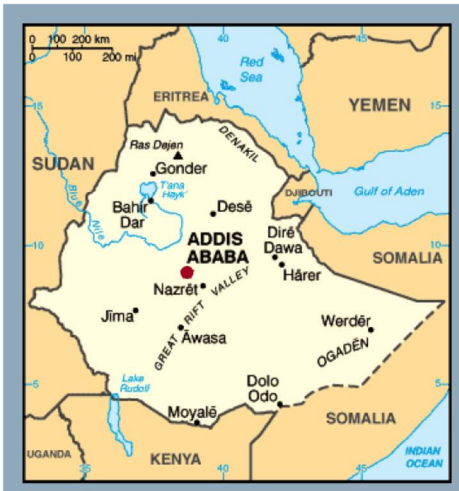
Strategic Health Partnership Initiative 2007-2010

USAID CA #118-A-00-08-00002-00

January 31, 2011

USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE

A·I·H·A



The two Russian lab mentors stationed in Ethiopia provided technical assistance to the Ethiopian Health and Nutrition Research Institute in the nation's capital of Addis Ababa.

Collectively, they contributed 191 days of professional service providing technical assistance and mentoring local lab staff.

Country Overview: Ethiopia

In Ethiopia, the Ethiopian Health and Nutrition Research Institute (EHNRI) oversees all medical laboratories in this East African nation of 74 million people. The Institute has developed the country's integrated national laboratory master plan (2009-2013) and has been mandated to coordinate efforts to strengthen the national lab systems.

The existing tiered laboratory structure has the national reference laboratories at the top, followed by regional/referral or specialized hospital laboratories, then district/zonal laboratories, and lastly health center laboratories.

Most of the laboratory technologists and technicians have been trained at state universities. Private colleges also contribute to the training of laboratory specialists. EHNRI-coordinated training programs — which include quality systems, ART monitoring, TB microscopy, laboratory management and leadership, HIV rapid testing, early infant diagnosis, SLMTA, accreditation preparedness, BED capture IgG assay, HIV-1 genotyping assay, and biosafety — occur throughout the year.

Rabies, although it is a preventable disease, represents a significant public health threat in Ethiopia for many reasons. The country has no framework for effective surveillance, data monitoring, or guidance. In addition, there is no census to ascertain canine population dynamics, nor any household survey data to determine the ratio of owned versus stray dogs in the country. Animal control is also an issue. This lack of data has long translated into rabies being relatively low on the agenda of health policymakers given their many competing priorities.

"The Ethiopian Government recognizes that rabies is a serious problem and it is one of the strategic focus areas that emerged from the recent business process reengineering undertaken by the Ministry of Health. Our goal is to build the capacity to manufacture 10 vaccines and we're starting with rabies. It is critical that we develop this vaccine ... its impact will spread beyond rabies because the process can be applied to other vaccines.

We've invested a huge amount of money and the knowledge and skills the Russian mentors have transferred to staff at the Ethiopian Health and Nutrition Research Institute rabies lab is simply invaluable."

— Dr. Medhin Zewdu Tsehaiu, Director General at the Office of the Minister of Health of Ethiopia

As a result, Ethiopia is one of just a handful of countries in the world that still use the outdated Fermi-type phenolized sheep brain tissue vaccine, which is very dangerous and, according to the World Health Organization, should not be used on humans. Known side effects include severe allergic reactions, encephalitis, partial paralysis, and even death. The treatment is also very painful — a course of 17 5-mililiter injections administered in the stomach area.

The SHPI afforded Ethiopia with a unique opportunity to develop a modern national anti-rabies program, including local production of rabies vaccine derived from cell cultures of seed rabies virus strains obtained from CDC/Atlanta. This local production of a rabies vaccine would, in turn, lay the groundwork for in-country manufacture of other much-needed vaccines as well.

In June 2009, AIHA placed a Russian rabies expert at EHNRI for a four-month technical assistance assignment. During this time, the Russian specialist put into place key elements necessary for Ethiopia to begin implementing a national rabies control program and launch production of a vaccine. This specialist returned in January 2010 for a two-month assignment. He was accompanied by a Russian rabies vaccine expert, who spent three months training and mentoring lab staff as the team developed the vaccine. Through the efforts of these two Russian rabies experts, the lab was renovated and the first batch of inactivated cell culture rabies formalin was produced. Mice trials were successfully conducted on February 15, 2010, and both Russian experts returned to Ethiopia to continue their work in January 2011.

Lab Mentor Placements and Key Outcomes: Ethiopia

Lab Mentor / Placement Details	Key Accomplishments
Artem Metlin Dates: 18 June – 14 October 2009 14 January – 14 March 2010 Site: Ethiopian Health and Nutrition Research Institute, Addis Ababa **Denis Bankovskiy** Date: 14 January – 11 April 2010 Site: Ethiopian Health and Nutrition Research Institute, Addis Ababa	• Prepared draft rabies legislation • Tested and calibrated lab equipment in preparation for vaccine production • Introduced roller bottle technique for vaccine production in cell cultures • Trained rabies lab staff in key rabies research and vaccine production techniques and procedures • Developed detailed SOPs and lab manual for vaccine production • Propagated seed rabies virus (strains ERA, PV, and CVS-11 provided by CDC/Atlanta) in cells to obtain and deposit master seeds and produce experimental batch of vaccine • Obtained and successfully tested the experimental formalin inactivated cell culture rabies vaccine • Discussed recommendations for further work and possible collaboration between Ethiopian veterinary and health services to develop a national rabies control program with directors of EHNRI and Debre Zeit Veterinary Institute

Preface

This closeout report provides a comprehensive overview of the programs and activities carried out through the Strategic Health Partnership Initiative (SHPI) between the years 2007-2010. A direct result of the 2005 Bratislava Initiatives, the SHPI was designed to harness US and Russian expertise to further bolster HIV/AIDS-related capacity in Russia, as well as in developing nations in Central Asia and Africa.

Made possible with the generous support of the American people thanks to funding from USAID through Cooperative Agreement 118-A-00-08-00002-00, the SHPI represented a unique collaboration among the Russian Ministry of Health and Social Development, leading Russian medical education institutions, USAID, and the American International Health Alliance, Inc. (AIHA). In September 2010, USAID awarded AIHA with a second cooperative agreement, which will fund SHPI follow-on activities over the course of the next five years.

This report describes the development and evolution of the SHPI, main programmatic components funded during this period, and key outcomes of these components. It also includes summary results and success stories that highlight specific activities and accomplishments, as well as a discussion of key challenges and lessons learned.

AIHA is a 501(c)(3) nonprofit corporation created by the US Agency for International Development (USAID) and leading representatives of the US healthcare sector in. AIHA's mission is to advance global health through volunteer-driven partnerships and initiatives that mobilize communities to better address healthcare priorities while improving productivity and quality of care. To date, AIHA has supported more than 150 capacity-building partnerships that link American volunteers with communities, institutions, and colleagues in 33 countries in a concerted effort to improve healthcare services and delivery.

Operating with funding from USAID; the Health Resources and Services Administration (HRSA) of the US Department of Health and Human Services; the US Library of Congress; the Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria; and other donors, AIHA's partnerships and programs represent one of the US health sector's most coordinated responses to global health concerns.

AIHA wishes to express its sincerest gratitude to the countless professionals in the Russian Federation and the United States, as well as those in recipient countries in Africa and Central Asia, who gave so generously of themselves to the SHPI. AIHA's programs have been so successful because these individuals demonstrated the courage and commitment to change; the patience, dedication, and hard work to gain new knowledge and skills; and a generous spirit of trust and collaboration. Together they made significant contributions to improving healthcare services and delivery for people not only in Russia, but also in developing nations in sub-Saharan Africa and Central Asia.

AIHA also thanks USAID and the Russian Ministry of Health and Social Development for the opportunity and privilege of working so closely with them and for their steadfast support of this unique multilateral initiative.

Finally, AIHA gratefully acknowledges the contributions of our dedicated staff in Washington, DC, as well as our regional offices in Russia, Ethiopia, South Africa, and Tanzania whose work assured the successful management and implementation of the SHPI program and preparation of this closeout report.

The contents are the responsibility of AIHA and do not necessarily reflect the views of USAID, the United States Government, the Russian Ministry of Health and Social Development, or the Government of the Russian Federation.

American International Health Alliance

Project Closeout Report

Strategic Health Partnership Initiative 2010-2012

USAID CA #118-A-00-10-00063-00

March 20, 2013

USAID
FROM THE AMERICAN PEOPLE

A·I·H·A

Preface

This closeout report provides an overview of the programs and activities carried out by the American International Health Alliance (AIHA) between the years 2010-2012 through the Strategic Health Partnership Initiative (SHPI) follow-on activities. The original SHPI program administered by AIHA from 2007 through September 2010 under USAID Cooperative Agreement 118-A-00-08-00002-00 was a direct result of the 2005 Bratislava Initiatives.

As such, SHPI was designed to harness US and Russian expertise to further bolster HIV/AIDS-related capacity in Russia, as well as in developing nations in Central Asia and Africa. SHPI programming represented a unique collaboration among the Russian Ministry of Health and Social Development, leading Russian medical education institutions, USAID, and AIHA.

The SHPI follow-on activities described in this report were made possible with the generous support of the American people through **USAID Cooperative Agreement 118-A-00-10-00063-00**. This second cooperative agreement was intended to fund SHPI activities through September 2015. Due to the Russian Government's decision to terminate all USAID-supported activities in country as of October 1, 2012, however, AIHA was unable complete many of the activities planned under the framework of this award.

This report describes the development and evolution of the SHPI, the main programmatic components funded from October 2010 through 2012, and the key outcomes of these components. It also includes summary results and brief success stories that highlight specific activities and accomplishments, as well as a discussion of key challenges and lessons learned.

AIHA is a 501(c)(3) nonprofit corporation created by the USAID and leading representatives of the US healthcare sector in 1992. AIHA's mission is to advance global health through volunteer-driven partnerships and initiatives that mobilize communities to better address healthcare priorities while improving productivity and quality of care. To date, AIHA has supported more than 170 capacity-building partnerships that link American volunteers with communities, institutions, and colleagues in 34 countries in a concerted effort to improve healthcare services and delivery.

Operating with funding from USAID; the Health Resources and Services Administration (HRSA) of the US Department of Health and Human Services; the US Library of Congress; the Global Fund to Fight AIDS, Tuberculosis and Malaria; and other donors, AIHA's partnerships and programs represent one of the US health sector's most coordinated responses to global health concerns.

AIHA wishes to express its sincerest gratitude to the countless professionals in the Russian Federation and the United States, as well as those in recipient countries in Africa and Central Asia, who gave so generously of themselves to the SHPI. AIHA's programs have been so successful because these individuals demonstrated the courage and commitment to change; the patience, dedication, and hard work to gain new knowledge and skills; and a generous spirit of trust and collaboration. Together they made significant contributions to improving healthcare services and delivery for people not only in Russia, but also in developing nations in sub-Saharan Africa and Central Asia. AIHA also thanks USAID and the Russian Ministry of Health and Social Development for the opportunity and privilege of working so closely with them and for their steadfast support of this unique multilateral initiative. Finally, AIHA gratefully acknowledges the contributions of our dedicated staff in Washington, DC, as well as our regional offices in Russia, Ethiopia, South Africa, and Tanzania whose work assured the successful management and implementation of the SHPI program and preparation of this closeout report.

The contents are the responsibility of AIHA and do not necessarily reflect the views of USAID, the United States Government, the Russian Ministry of Health and Social Development, or the Government of the Russian Federation.

At the conclusion of her assignment in Botswana, Dr. Shurpitskaya conducted a debriefing with AIHA staff and local stakeholders. Based on feedback from officials at the National Health Laboratory, the course and training-of-trainers sessions were viewed as greatly needed and highly successful. Said officials stressed the importance of continued collaboration with AIHA and the SHPI experts, particularly with regard to the proposed development of a dedicated Mycology Unit at the National Health Laboratory. They also recommended future collaboration with the University of Botswana and the Institute of Health Sciences to support strengthening of existing laboratory education and training programs.

B. Country Overview: Ethiopia

In Ethiopia, the Ethiopian Health and Nutrition Research Institute (EHNRI) oversees all medical laboratories in this East African nation of 74 million people. The Institute has developed the country's integrated national laboratory master plan (2009-2013) and has been mandated to coordinate efforts to strengthen the national lab systems.

The existing tiered laboratory structure has the national reference laboratories at the top, followed by regional/referral or specialized hospital laboratories, then district/zonal laboratories, and lastly health center laboratories.

Most of the country's laboratory technologists and technicians have been trained at state universities. Private colleges also contribute to the training of laboratory specialists. EHNRI-coordinated training programs — which include quality systems, ART monitoring, TB microscopy, laboratory management and leadership, HIV rapid testing, early infant diagnosis, SLMTA, accreditation preparedness, BED capture IgG assay, HIV-1 genotyping assay, and biosafety — occur throughout the year.

The Russian lab mentors stationed in Ethiopia provided technical assistance to the Ethiopian Health and Nutrition Research Institute in the nation's capital of Addis Ababa. The focus of their work was developing a national rabies control system and the capacity to locally produce a cell culture rabies vaccine.

Under this award, as through the previous cooperative agreement, technical assistance provided by the Russian experts focused on the development of a comprehensive rabies control program, including building in-country capacity to produce a viable vaccine in accordance with international standards and best practices.

Rabies, although it is a preventable disease, represents a significant public health threat in Ethiopia for many reasons. The country has no framework for effective surveillance, data monitoring, or guidance. In addition, there is no census to ascertain canine population dynamics, nor any household survey data to determine the ratio of owned versus stray dogs in the

"The Ethiopian Government recognizes that rabies is a serious problem and it is one of the strategic focus areas that emerged from the recent business process reengineering undertaken by the Ministry of Health. Our goal is to build the capacity to manufacture 10 vaccines and we're starting with rabies. It is critical that we develop this vaccine ... its impact will spread beyond rabies because the process can be applied to other vaccines.

We've invested a huge amount of money and the knowledge and skills the Russian mentors have transferred to staff at the Ethiopian Health and Nutrition Research Institute rabies lab is simply invaluable."

— Dr. Medhin Zewdu Tsehaiu, Director General at the Office of the Minister of Health of Ethiopia

country. Animal control is also an issue. This lack of data has long translated into rabies being relatively low on the agenda of health policymakers given their many competing priorities.

As a result, Ethiopia has long been one of just a handful of countries in the world that still use the outdated Fermi-type phenolized sheep brain tissue vaccine, which is very dangerous and, according to the World Health Organization, should not be used on humans. Known side effects include severe allergic reactions, encephalitis, partial paralysis, and even death. The treatment is also very painful — a course of 17 5-mililiter injections administered in the stomach area.

The original SHPI award afforded Ethiopia with a unique opportunity to develop a modern national anti-rabies program, including local production of rabies vaccine derived from cell cultures of seed rabies virus strains obtained from CDC/Atlanta. This local production of a rabies vaccine would, in turn, lay the groundwork for in-country manufacture of other much-needed vaccines.

Thanks to the SHPI follow-on award, Russian rabies experts Denis Bankovskiy and Artem Metlin returned to Addis Ababa for a six-week deployment in January and February of 2011.

Building upon the accomplishments they made in 2009 and 2010 through the previous cooperative agreement, they provided the technical assistance needed to:

- Install a new laboratory, as well as additional equipment for existing units;
- Resolved all problems and/or issues that occurred while local staff had been working with cell cultures in between mentor deployments;
- Introduced techniques to measure rabies neutralizing antibodies (FAVN/RFFIT) and provided both theoretical and practical trainings for lab staff;
- Introduced application of normal cattle serum for preparation of large amounts of cell culture medium;
- Developed detailed standard operation procedures (SOPs) to ensure independent work would be possible for local staff; and
- Developed a clinical trial protocol to test an experimental series of cell culture vaccine.

Between the 2010 and 2011 deployments, EHNRI staff experienced some temporary setbacks to their vaccine development efforts due to logistical problems and some technical mistakes.

"The lab staff have experience working with cells and are young and not set in their ways. They learn quickly and are eager to make changes here... there has been a lot of progress."

— Dr. Denis Bankovskiy, a vaccine expert from the JSC Pokrov Biologics Plant in Volginskiy, Russia

"At first, we didn't have the virus, the equipment, or even the knowledge how to put them to use. Now, our hopes for the future are without limit."

— Mr. Birhanu Hurisa, Assistant Researcher, Ethiopian Health and Nutrition Research Institute, Addis Ababa, Ethiopia

Despite this, however, the Russian experts reported impressive overall progress, with many of the recommendations previously provided by them, as well as technical experts from the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Specifically, suggestions on reconstruction of the laboratory building to ensure improved bio-safety levels and the relocation of the lab animal facility were fulfilled. Key outcomes of their work are highlighted in the table below.

In addition to Drs. Bankovskiy and Metlin, AIHA also deployed Russian epidemiology expert Professor Elena Simonova to Ethiopia for three weeks in December 2011. At this time, she began to collect information on the existing rabies control system with the objective of developing a set of recommendations for a national anti-rabies program. Her research findings were used to develop "Overview of Rabies in Ethiopia: Recommendations to Improve Rabies Surveillance Systems," a seminal document that was completed by Professor Simonova and submitted to EHNRI in February 2012.

Professor Simonova was redeployed to Ethiopia in March 2012 to continue her efforts to develop an integrated national rabies control and surveillance system. Some key results of her work are noted in the table on the following page.

One important outcome AIHA would like to highlight is her introduction of a national level knowledge, attitudes, and beliefs survey to ascertain the population's awareness of rabies, as well as her initial development of related recommendations, questionnaires, and tools necessary for implementing this evaluation. The lack of accurate data on rabies has long been a major obstacle for developing an effective national strategy for controlling the virus, according to all three Russian mentors placed here, as well as national stakeholders. Professor Simonova's work in this arena has gained the interest of both Ethiopian stakeholders and international organizations alike. WHO has expressed interest in moving this project forward, which would in turn enable the progress made through SHPI to have a lasting and substantial impact on the country.

286

Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору

Федеральное государственное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГУ «ВНИИЗЖ»)

УДК 619.616.98:578.824.11
№ госрегистрации 01200905318

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГУ «ВНИИЗЖ»
_____ Е.В. Белик
«12» ноября 2009г.

НАУЧНЫЙ ОТЧЕТ

по Государственному контракту № 1087/13 от 21.05.2009г.
с Министерством сельского хозяйства Российской Федерацией
на выполнение научно-исследовательских работ по теме:
«Разработка методических рекомендаций по борьбе с бешенством животных»
(Этапы 2-7)

Рассмотрен и одобрен
Ученым советом ФГУ «ВНИИЗЖ»
протокол № 10
от « 06 » ноября 2009 г.

БИБЛИОТЕКА
ФГУ ВНИИЗЖ
Инв №_____

Владимир, 2009 г.

Реферат

Ключевые слова: вирус бешенства, диагностика, профилактика, антирабические вакцины, мониторинг

Отчет представлен на 106 страницах печатного текста, содержит 31 таблицу, 10 рисунков и приложения на 56 страницах.

С целью разработки методических рекомендаций по борьбе с бешенством животных, на основе изучения зарубежной и отечественной научной литературы проведен анализ нормативной правовой базы по диагностике, профилактике и карантинным мероприятиям при заболевании животных бешенством за период с 1997 по 2009 год по странам: Великобритания, Франция, Германия, Италия, Финляндия, США, Эфиопия, а также её соответствия рекомендациям OIE Terrestrial Code, 2008.

В отчете представлены результаты анализа иммуногенности применяемых для профилактики бешенства вакцин, исходя из способа применения (оральный и парентеральный), для сельскохозяйственных и плотоядных животных (5 вакцин), мониторинга методов поддержания напряженного иммунитета у животных, находящихся в природной среде (не менее чем по 9 областям: Московская, Воронежская, Белгородская, Тульская, Новгородская, Волгоградская, Пензенская, Челябинская, Новосибирская, Калининградская, Ленинградская области и Республика Карелия), мониторинг методов поддержания напряженного иммунитета у животных, находящихся в городской среде по городам: Москва, Санкт-Петербург, Саратов, Волгоград, Ставрополь, Владимир, Нижний Новгород.

Исследования проб сывороток крови проводили в реакции подавления иммунофлуоресценции в культуре клеток ВНК-21, результаты выражали в международных единицах. Пробы головного мозга исследовали в реакции иммунофлуоресценции (РИФ). Определение содержания антибиотиков тетрациклинового ряда проводили флуоресцентным методом.

Разработаны приложения к методическим рекомендациям: «Порядок содержания подозрительного животного, отбора, консервирования и пересылки патматериала для лабораторной диагностики заболевания животных бешенством»; «Схема документального оформления карантинных мероприятий при бешенстве животных», «Методы лабораторной диагностики бешенства»; «Клиническое обследование собак с целью диагностики бешенства»; «Отчет по оральной вакцинации диких животных против бешенства».

Список исполнителей

Заведующий лабораторией бешенства и прионных болезней, кандидат ветеринарных наук, PhD	Метлин Артем Евгеньевич
Ведущий научный сотрудник лаборатории бешенства и прионных болезней, кандидат биологических наук	Назаров Николай Алексеевич
Заведующий отделом ящура, особо опасных и малоизученных болезней, доктор биологических наук, профессор	Рыбаков Сергей Сергеевич
Аспирант лаборатории бешенства и прионных болезней	Чернышова Елена Владимировна
Аспирант лаборатории бешенства и прионных болезней	Сухарьков Андрей Юрьевич
Аспирант лаборатории бешенства и прионных болезней	Иовлева Анна Юрьевна
Директор ФГУ «ВНИИЗЖ», кандидат ветеринарных наук	Белик Евгений Васильевич
Аспирант лаборатории производства противоящурных вакцин	Балашов Андрей Николаевич
Старший научный сотрудник лаборатории бешенства и прионных болезней, кандидат ветеринарных наук	Чепуркин Анатолий Васильевич

СОДРУЖЕСТВО НЕЗАВИСИМЫХ ГОСУДАРСТВ
СОВЕТ ГЛАВ ПРАВИТЕЛЬСТВ

РЕШЕНИЕ

от 1 июня 2018 года — город Душанбе

о Комплексе совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года

Совет глав правительств Содружества Независимых Государств

решил:

1. Утвердить Комплекс совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года (прилагается).

2. Правительствам государств – участников СНГ принять необходимые меры по реализации мероприятий указанного Комплекса.

3. Межправительственному совету по сотрудничеству в области ветеринарии обеспечивать координацию и контроль выполнения мероприятий Комплекса совместных действий, ежегодно рассматривать его итоги на своих заседаниях и при необходимости докладывать Экономическому совету СНГ.

От Азербайджанской Республики

От Российской Федерации

От Республики Армения

От Республики Таджикистан

От Республики Беларусь

От Туркменистана

От Республики Казахстан

От Республики Узбекистан

От Кыргызской Республики

От Украины

От Республики Молдова

Душанбе – 01.06.2018

18-0243-5-4

УТВЕРЖДЕН

Решением Совета глав
правительств Содружества
Независимых Государств
о Комплексе совместных действий
государств – участников СНГ
по профилактике и борьбе с
бешенством на период до 2025 года
от 1 июня 2018 года

КОМПЛЕКС СОВМЕСТНЫХ ДЕЙСТВИЙ ГОСУДАРСТВ – УЧАСТНИКОВ СНГ ПО ПРОФИЛАКТИКЕ И БОРЬБЕ С БЕШЕНСТВОМ НА ПЕРИОД ДО 2025 ГОДА

Душанбе – 01.06.2018

18-0244-5-4

ОГЛАВЛЕНИЕ

Паспорт Комплекса совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года 3

Пояснительная записка к Комплексу совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года 5

1. Характеристика современной эпизоотической ситуации и меры борьбы с бешенством животных в мире и государствах – участниках СНГ 6

1.1. Эпизоотическая ситуация по бешенству в мире 6

1.2. Эпизоотическая ситуация по бешенству в государствах – участниках СНГ 7

1.3. Опыт борьбы с бешенством в государствах – участниках СНГ 9

2. Основные цели и задачи Комплекса совместных действий 11

2.1. Основные цели 11

2.2. Основные задачи 11

3. Сроки реализации Комплекса совместных действий 12

3.1. Основные направления реализации Комплекса совместных действий 12

3.2. Сроки реализации Комплекса совместных действий 13

4. Перечень мероприятий по профилактике и ликвидации бешенства в государствах – участниках СНГ 13

5. Ресурсное обеспечение Комплекса совместных действий 16

6. Ожидаемые результаты 16

Приложение. Дорожная карта по разработке и реализации национальной программы по борьбе с бешенством на период до 2025 года 18

Душанбе – 01.06.2018

18-0244-5-4

ПАСПОРТ
Комплекса совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года

Наименование документа	Комплекс совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года
Дата и основание для принятия решения о разработке	Соглашение о сотрудничестве в области ветеринарии от 12 марта 1993 года; Решение Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии от 12 мая 2016 года
Заказчик	Межправительственный совет по сотрудничеству в области ветеринарии
Разработчики	ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Российская Федерация); департаменты ветеринарии государств – участников СНГ
Срок реализации	2018–2025 годы
Основные мероприятия	Создание и совершенствование в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения животных (Международное эпизоотическое бюро, МЭБ) необходимого современного нормативно-правового обеспечения для реализации мероприятий ветеринарными службами государств – участников СНГ, включая разработку и утверждение рамочных, национальных программ по профилактике и борьбе с бешенством в государствах – участниках СНГ и правил (инструкций) по борьбе с бешенством. Унификация на основе рекомендаций МЭБ диагностических средств и методов по изоляции и идентификации возбудителя. Создание международной рабочей группы. Расширение информационно-коммуникационной системы взаимодействия ветеринарных служб государств – участников СНГ. Координация совместных действий ветеринарных служб государств – участников СНГ и международных организаций (МЭБ/ФАО) по диагностике и контролю бешенства животных. Разработка и реализация планов поэтапной борьбы с бешенством для каждого государства-участника. Проведение регулярных эпизоотологических обследований, в первую очередь в зонах высокой степени риска распространения бешенства, осуществление в них профилактической иммунизации животных и слежение за иммунным статусом.

Душанбе – 01.06.2018

Наименование документа	Комплекс совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года
	Расширение систематических мониторинговых исследований в целях выявления больных бешенством животных, в том числе среди диких животных. Принятие мер по регуляции численности популяции безнадзорных животных. Информационно-разъяснительная работа. Создание и поддержание резерва вакцин, диагностикумов и дезинфицирующих средств для оперативной ликвидации возможных очагов бешенства. Организация учебы и стажировок ветеринарных специалистов государств – участников СНГ в целях повышения их квалификации
Контроль за реализацией	Государства – участники СНГ; Межправительственный совет по сотрудничеству в области ветеринарии. Координатором работ и мероприятий по Комплексу совместных действий является ФГБУ «ВНИИЗЖ»
Наиболее важные целевые показатели	Снижение риска угрозы жизни человека. Достижение эпидемического благополучия в целевых популяциях животных: с долей иммунизированных домашних животных до 90 % и у диких плотоядных не менее 70 % особей в популяциях. Снижение количества вспышек бешенства и ущерба от заболевания
Ожидаемые конечные результаты	Обеспечение благополучия по бешенству животных каждого государства – участника СНГ, минимизация экономического ущерба при возможном возникновении бешенства

ПОЯСНИТЕЛЬНАЯ ЗАПИСКА
к Комплексу совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года

Проблема профилактики бешенства животных и снижения ущерба от этого заболевания, а также снижения угрозы жизни человека актуальна для всех государств – участников СНГ.

Настоящий Комплекс совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года (далее – Комплекс совместных действий) является программой согласованных действий государств – участников СНГ по борьбе с этим заболеванием.

Комплекс совместных действий разработан с учетом предложений ветеринарных служб государств – участников СНГ, опыта реализации программ по борьбе с бешенством животных в странах Европейского союза, США и Канаде и направлен на снижение распространения на территориях государств – участников СНГ вспышек бешенства, сведение к минимуму экономического ущерба от заболевания и угрозы здоровью человека.

В Комплексе совместных действий изложен анализ эпизоотической ситуации по бешенству в государствах – участниках СНГ и других государствах мира за период с 2010 по 2015 год, определены регионы высокой степени риска распространения бешенства, намечены мероприятия по профилактике и борьбе с бешенством, предложены меры по повышению квалификации ветеринарных кадров, координации совместных действий ветеринарных служб государств – участников СНГ и международных организаций (МЭБ, Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций (ФАО)) по контролю бешенства, дана оценка ожидаемой эффективности от реализации намеченных мероприятий.

Финансирование реализации планируемых мероприятий будет осуществляться в рамках ассигнований, предусматриваемых в национальных бюджетах соответствующим министерствам и ведомствам на обеспечение их функций.

Головным разработчиком Комплекса совместных действий, координатором работ и мероприятий является ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Российская Федерация), который имеет международный статус Центра МЭБ по сотрудничеству в области диагностики и контроля болезней животных для стран Восточной Европы, Центральной Азии и Закавказья. По согласованию с заинтересованными ветеринарными службами государств – участников СНГ ФГБУ «ВНИИЗЖ» может проводить консультации, тренинги, семинары, совещания, направленные на реализацию Комплекса совместных действий.

Контроль за реализацией Комплекса совместных действий осуществляют государства – участники СНГ и Межправительственный совет по сотрудничеству в области ветеринарии.

Душанбе – 01.06.2018

1. ХАРАКТЕРИСТИКА СОВРЕМЕННОЙ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ И МЕРЫ БОРЬБЫ С БЕШЕНСТВОМ ЖИВОТНЫХ В МИРЕ И ГОСУДАРСТВАХ – УЧАСТНИКАХ СНГ

Бешенство (*Rabies*) является опасным зоонозным заболеванием, которое входит в пятерку инфекционных болезней, общих для человека и животных, наносящих наибольший экономический ущерб, складывающийся из потерь в результате падежа животных, затрат на проведение профилактических мероприятий и проведение диагностических исследований. Передается оно при укусе или при попадании слюны больного животного на поврежденную поверхность кожи или слизистых оболочек, возможен и аэрогенный путь передачи при высокой концентрации вируса бешенства в замкнутом пространстве.

Заболевание характеризуется проявлением признаков поражения центральной нервной системы и практически 100%-ной летальностью. Бешенство широко распространено в мире и является объектом постоянного повышенного внимания международных организаций медицинского и ветеринарного профиля. Для обмена международным опытом по бешенству ежегодно организуются конференции по бешенству в Евразии и в Америке. Кроме того, 28 сентября объявлен всемирным днем борьбы с бешенством.

Выделяют два вида бешенства – уличный, когда заболевание наблюдается в городах и селах, а источником инфекции являются больные бродячие собаки и кошки, и лесной, когда инфекция распространяется в природной среде, а источником заболевания являются дикие плотоядные хищники.

1.1. Эпизоотическая ситуация по бешенству в мире

По данным МЭБ, ежегодно в мире от бешенства умирают более 55 тыс. человек, преимущественно в развивающихся странах Азии и Африки. Бешенство регистрируется практически на всех континентах земного шара, кроме Австралии и Антарктиды. Свободными от бешенства считаются многие европейские страны. Тем не менее число стран и территорий, свободных от бешенства, и их размеры довольно малы по сравнению с территориями и странами, где бешенство продолжает регистрироваться.

Наибольшее число случаев бешенства у людей возникает вследствие укусов собак. Особенно сложная в этом отношении ситуация сложилась на Африканском континенте и в некоторых азиатских странах. Так, в Индии более 97 % случаев бешенства среди людей возникает по причине укусов собак. Популяция собак во всем мире насчитывает более 500 млн особей. Ни один другой вид плотоядных животных не имеет столь широкого распространения и плотности популяции. Домашние собаки присутствуют на всех континентах и практически на всех островах, освоенных людьми. Соотношение собак и

людей обычно варьирует от 1:10 до 1:6, хотя существуют территории, где численность популяции собак превышает численность популяции людей.

Для бешенства характерно циклическое течение заболевания. В природных условиях для развития эпизоотии бешенства необходим контакт между больными и восприимчивыми животными, при этом каждое больное животное должно инфицировать более чем одно восприимчивое животное. Если складывается такая ситуация, то инцидентность болезни будет увеличиваться. В реальных условиях такие изменения не остаются постоянными долгое время, так как число восприимчивых животных становится ограниченным, и, следовательно, интенсивность контактов между животными снижается ввиду того, что многие восприимчивые животные уже погибли.

Таким образом, бешенство является актуальной проблемой мирового здравоохранения животных и человека. Существование стационарных очагов заболевания создает угрозу жизни человека и наносит значительный экономический ущерб животноводству. В результате естественных эпизоотических процессов происходят колебания показателя инцидентности бешенства с небольшой амплитудой в течение года и с более значительной – в период от 3 до 5 лет.

1.2. Эпизоотическая ситуация по бешенству в государствах – участниках СНГ

По данным МЭБ и информации, полученной от представителей ветеринарных служб государств – участников СНГ, эпизоотическая ситуация по бешенству выглядит следующим образом.

Дата последней официальной регистрации бешенства на территории Республики Армения – 2011 год, был зарегистрирован 1 очаг.

В Республике Беларусь бешенство регистрируют ежегодно в Гомельской, Гродненской, Минской, Могилевской, Витебской и Брестской областях.

На территории Республики Казахстан последняя официальная регистрация бешенства среди диких животных отмечена в 2016 году.

В Кыргызской Республике бешенство регистрируют ежегодно у домашних животных: собаки, кошки, мелкий рогатый скот (МРС), крупный рогатый скот (КРС). Кроме того, официально страна ежегодно заявляет о случаях заболевания бешенством среди людей. Так, в 2011 году – 2 случая, с 2012 по 2014 год – по 1 случаю ежегодно.

В Республике Молдова ежегодно регистрируют заболевание бешенством среди домашних и диких животных.

Российская Федерация является стационарно неблагополучной по бешенству. За 2015 год было зарегистрировано 4 114 случаев бешенства. Также, по данным Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, в 2012–2015 годах зарегистрировано 18 случаев заболевания людей бешенством.

Основной вклад в заболеваемость вносят дикие плотоядные (около 50 %), немного меньше (35 %) – кошки и собаки, сельскохозяйственные животные (15 %). В качестве резервуара инфекции выступают лисы, которые участвуют и в «уличном» бешенстве, осуществляя первичный занос заболевания в популяцию неиммунных собак и кошек. Также существенный вклад в развитие эпизоотий вносят енотовидные собаки. Больше всего заболевших бешенством животных приходится на Центральный и Приволжский федеральные округа (80 % общей доли заболевших животных).

В Республике Таджикистан ежегодно регистрируют очаги бешенства. Стабильно неблагополучными районами оказались Центральный Таджикистан, Хатлонская и Согдийская области.

Ветеринарные службы Туркменистана ежегодно с 2013 по 2016 год сообщали о наличии заболевания в клинической форме.

Ветеринарные службы Республики Узбекистан предоставили данные по заболеванию бешенством за 2014–2016 годы.

В Украине ежегодно отмечается большое количество очагов бешенства. Причем увеличение числа очагов заболевания почти вдвое отмечено с 2013 года: 692 и 588 очагов в 2011 и 2012 годах соответственно и 1 293 и 898 очагов – в 2013 и 2014 годах. Кроме того, ежегодно отмечаются заболевания людей: в 2011 году – 6 случаев, в 2012 году – 16, в 2013 году – 3, в 2014 году – 4. Так, в последние годы бешенство регистрируется в Винницкой, Одесской, Запорожской, Черкасской, Днепропетровской, Харьковской, Киевской, Хмельницкой, Донецкой, Ивано-Франковской, Волынской, Тернопольской, Кировоградской, Черниговской, Николаевской, Житомирской, Херсонской, Львовской, Сумской, Полтавской, Черновецкой, Закарпатской областях.

Таким образом, на 2017 год ситуация по бешенству в государствах – участниках СНГ остается довольно напряженной. Применение вакцинации домашних и диких животных позволило снизить количество случаев бешенства в ряде стран. Тем не менее ежегодно на территориях государств – участников СНГ регистрируются тысячи случаев бешенства у животных, а также случаи гибели людей.

Сводная ситуация по заболеваемости бешенством в государствах – участниках СНГ приведена ниже.

Количество случаев бешенства в государствах – участниках СНГ*

Государства – участники СНГ	2011 год	2012 год	2013 год	2014 год	2015 год	2016 год
Республика Армения	1	0	0	0	0	0
Республика Беларусь	1 372	501	452	345	581	219**
Республика Казахстан****	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных	1
Кыргызская Республика	79	103	86	60	75	27**
Республика Молдова	55	174	111	139	162	76
Российская Федерация***	3 188	2 802	3 507	2 315	4 114	2 151
Республика Таджикистан	70	56	63	100	77	97
Туркменистан	Нет данных	Нет данных	60	12	6	3**
Республика Узбекистан	Нет данных	Нет данных	Нет данных	20	6	9**
Украина	692	588	1 293	898	1 174	465**

* Согласно данным МЭБ.
** Данные за полугодие.
*** Данные ФГБУ «Центр ветеринарии».
**** Заболевание регистрируется, нет количественных данных.

1.3. Опыт борьбы с бешенством в государствах – участниках СНГ

Мероприятия по борьбе с бешенством включают в первую очередь вакцинацию плотоядных диких животных, домашних и сельскохозяйственных животных, а также контроль численности безнадзорных животных. Эти мероприятия требуют больших материальных затрат и трудны в исполнении.

В Республике Беларусь в качестве контрольных мер используются меры профилактики на границе, мониторинг, скрининг, общий и целевой надзор. Вакцинируют КРС, МРС, мелких домашних животных, кроликов, лошадей и свиней, диких плотоядных животных. На базе ФГБУ «ВНИИЗЖ» исследуются пробы тканей костей, зубов и крови диких животных из Республики Беларусь в целях изучения поедаемости вакцины и определения титров вируснейтрализующих антител в крови диких животных.

В Республике Казахстан в качестве контрольных мер используются меры по профилактике, мониторингу, скринингу, общему и целевому надзору. Вакцинируют КРС, МРС, лошадей, верблюдов, собак, кошек. У диких животных вакцинация не проводится.

В Кыргызской Республике в качестве контрольных применяются меры профилактики на границе, мониторинг, скрининг, общий и целевой надзор, зонирование и вакцинация. У диких животных вакцинация запрещена.

В Республике Молдова в качестве контрольных мер применяют зонирование, меры профилактики на границе, мониторинг, скрининг, общий надзор, контроль перемещения внутри страны, зонирование и контроль природных резервуаров. В связи с неблагополучной эпизоотической ситуацией по бешенству проводятся обязательная вакцинация собак против бешенства, сокращение численности популяции лисиц, разъяснительная работа с населением.

В Российской Федерации для профилактики бешенства применяют инактивированные антирабические вакцины отечественного и зарубежного производства. Для профилактики бешенства диких плотоядных животных применяется оральная вакцина.

В 2013 году удалось достичь значительных успехов в борьбе с бешенством в Калининградской области. Учитывая особое географическое расположение, данный регион был включен в долгосрочную международную программу по искоренению бешенства, в рамках которой начиная с осени 2007 года проводится работа по распределению антирабической вакцины по всей территории области. С 2010 года кампания по вакцинации проводилась дважды в год. После каждого этапа вакцинации с целью определения ее эффективности осуществляли диагностический отстрел диких плотоядных животных.

В результате проводимых мероприятий достигнут положительный эффект. Произошло снижение количества случаев бешенства на территории области и увеличение доли иммунных животных. В 2013–2015 годах на территории Калининградской области случаев бешенства зарегистрировано не было.

Специализированные программы действуют в ряде регионов, таких как Ленинградская, Нижегородская области и др. Тем не менее во многих регионах Российской Федерации количество применяемой вакцины недостаточно, чтобы покрыть всю территорию.

В рамках государственного задания ФГБУ «ВНИИЗЖ» и ряд других межрегиональных ветеринарных лабораторий проводят эпизоотологический мониторинг бешенства. На территориях различных регионов Российской Федерации осуществляются исследования на бешенство, оценка поедаемости вакцины и определяется уровень вируснейтрализующих антител у диких животных. Это позволяет проводить мониторинг эффективности вакцинации для ее коррекции.

В Республике Таджикистан для профилактики бешенства иммунизируются домашние и дикие животные, сокращаются популяции безнадзорных животных, проводятся лабораторные исследования проб от животных с подозрением на заболевание.

Таким образом, учитывая неблагоприятную эпизоотическую ситуацию по бешенству в государствах – участниках СНГ и в мире, его высокую превалентность на территориях с большой плотностью населения, существует реальная и постоянная угроза жизни и благополучия сельскохозяйственных животных и человека. Это связано и с отсутствием контроля численности беспризорных животных, естественным ростом плотности популяций диких животных и их миграцией, а, следовательно, и более тесным контактом диких и домашних животных и человека, и недостаточным объемом вакцинации диких плотоядных.

Постоянная напряженная эпизоотическая ситуация в мире диктует необходимость координации мер по профилактике и борьбе с бешенством между различными государствами, в том числе и государствами – участниками СНГ. Совместные действия в государствах – участниках СНГ по вакцинопрофилактике бешенства и локализации очагов, предусмотренные Комплексом совместных действий, позволят в дальнейшем избежать заноса инфекции с сопредельных территорий.

2. ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ КОМПЛЕКСА СОВМЕСТНЫХ ДЕЙСТВИЙ

Комплекс совместных действий в целом рассчитан на расширение и углубление сотрудничества ветеринарных служб государств – участников СНГ, прежде всего на осуществление совместных действий по профилактике и ликвидации бешенства.

2.1. Основные цели

Обеспечение благополучия по бешенству в каждом государстве – участнике Содружества, минимизация риска угрозы здоровью людей и экономического ущерба, координация и оптимизация совместных действий ветеринарных служб государств – участников СНГ в борьбе и профилактике бешенства.

2.2. Основные задачи

Создание и развитие в соответствии с рекомендациями МЭБ современного нормативно-правового обеспечения мероприятий ветеринарных служб государств – участников СНГ, включая разработку и утверждение программ по профилактике и борьбе с бешенством животных, а также правил (инструкций) по борьбе с бешенством.

Проведение регулярных эпизоотологических обследований популяций диких и домашних животных, в первую очередь в зонах высокой степени риска заноса и распространения бешенства, оценка эпизоотической ситуации, осуществление профилактической иммунизации животных и мониторинг иммунного статуса, оценка эффективности действующих мероприятий.

Расширение систематических мониторинговых исследований в целях выявления больных бешенством животных, в том числе среди диких животных.

Разработка процедур контроля численности и оздоровления популяции безнадзорных животных.

Создание и поддержание резерва вакцин и диагностикумов для оперативной ликвидации возможных очагов бешенства.

Гармонизация диагностических средств и методов по выделению и идентификации возбудителя на основе рекомендаций МЭБ.

Оперативное проведение совместных работ по ликвидации очагов бешенства.

Разработка и реализация национальных планов борьбы с бешенством в целях получения каждым государством – участником СНГ статуса страны, свободной от бешенства.

Проведение мероприятий по сохранению достигнутых результатов в улучшении эпизоотической ситуации по бешенству.

Организация учебы и стажировок ветеринарных специалистов государств – участников СНГ в целях повышения их квалификации.

Проведение информационно-разъяснительной работы с населением по проблеме бешенства.

Расширение информационно-коммуникационного взаимодействия ветеринарных служб государств – участников СНГ.

3. СРОКИ РЕАЛИЗАЦИИ КОМПЛЕКСА СОВМЕСТНЫХ ДЕЙСТВИЙ

3.1. Основные направления реализации Комплекса совместных действий

Комплекс совместных действий основан на международных программах по профилактике бешенства: «Поэтапный подход к искоренению бешенства», «Оральная вакцинация лисиц против бешенства в Европе». Успех реализации Комплекса совместных действий базируется на общей заинтересованности в искоренении бешенства, высоком приоритете при выполнении задач, согласованности действий всех его участников, высоком уровне квалификации ветеринарных служб и других исполнителей.

Реализация Комплекса совместных действий охватывает следующие направления:

оценка эпизоотической ситуации по бешенству;

совершенствование нормативно-правовой базы;

организация выполнения нормативных правовых документов и взаимного информационного обеспечения в части эпизоотической ситуации по бешенству в государствах – участниках СНГ;

осуществление совместных мероприятий по мониторингу, профилактике и ликвидации бешенства в государствах – участниках СНГ;

поддержание достигнутых результатов по улучшению эпизоотической ситуации по бешенству.

3.2. Сроки реализации Комплекса совместных действий

Мероприятия Комплекса совместных действий состоят из блока первоочередных мероприятий на период до 2020 года и последующих шагов, которые будут определяться и уточняться по мере реализации ранее намеченных мероприятий после рассмотрения на заседании Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии.

4. ПЕРЕЧЕНЬ МЕРОПРИЯТИЙ ПО ПРОФИЛАКТИКЕ И ЛИКВИДАЦИИ БЕШЕНСТВА В ГОСУДАРСТВАХ – УЧАСТНИКАХ СНГ

№ п/п	Наименование мероприятий	Срок исполнения	Ответственные
1.	Оценка состояния ветеринарных служб (объем выполняемых работ по контролю бешенства, используемые ресурсы, нормативно-правовая база по бешенству)	2018–2020 гг.	Заинтересованные государства – участники СНГ, ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ, ФГБУ «ВНИИЗЖ», Межправительственный совет по сотрудничеству в области ветеринарии
2.	Анализ эпизоотических данных по бешенству (оценка заболеваемости, неблагополучия, статистики по покусам животными людей, уточнение основных резервуарных видов животных)	2018–2025 гг.	Ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ, ФГБУ «ВНИИЗЖ», Межправительственный совет по сотрудничеству в области ветеринарии
3.	Подготовка национальных прогнозов и оценок риска распространения бешенства	2018–2025 гг.	Ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ
4.	Оценка объемов проводимых профилактических мероприятий по борьбе с бешенством и их эффективности	2018–2025 гг.	Межправительственный совет по сотрудничеству в области ветеринарии, заинтересованные государства – участники СНГ, ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

№ п/п	Наименование мероприятий	Срок исполнения	Ответственные
5.	Проведение научно-исследовательских работ по молекулярной эпидемиологии бешенства, оценке эффективности и безопасности применяемых антирабических вакцин	2018–2025 гг.	Ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ, ФГБУ «ВНИИЗЖ»
6.	Создание и пополнение национальных коллекций полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территориях государств – участников СНГ	2018–2025 гг.	Заинтересованные государства – участники СНГ, ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ
7.	Организация совместного обучения (тренингов) ветеринарных специалистов государств – участников СНГ (вирусологи, серологи, эпизоотологи) по вопросам диагностики бешенства, современным методам профилактики и борьбы с заболеванием	2018–2025 гг.	Ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ, ФГБУ «ВНИИЗЖ»
8.	Проведение совместных совещаний и семинаров по вопросам диагностики и профилактики бешенства	2018–2025 гг.	Ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ, ФГБУ «ВНИИЗЖ», Межправительственный совет по сотрудничеству в области ветеринарии
9.	Оперативное проведение совместных работ сторон по ликвидации очагов бешенства на приграничных территориях	В случае необходи-мости	Заинтересованные государства – участники СНГ, ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ, ФГБУ «ВНИИЗЖ», Межправительственный совет по сотрудничеству в области ветеринарии
10.	Создание и поддержание национальных резервов диагностикумов и вакцин для оперативной ликвидации возможных очагов бешенства	2018–2025 гг.	Заинтересованные государства – участники СНГ
11.	Проведение информационно-разъяснительной работы с населением по проблеме бешенства	2018–2025 гг.	Ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ
12.	Разработка процедур оценки контроля численности и оздоровления популяции безнадзорных животных	2018–2020 гг.	Ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ

№ п/п	Наименование мероприятий	Срок исполнения	Ответственные
13.	Проведение систематических мониторинговых исследований для выявления больных бешенством животных, в том числе среди диких животных, с целью создания достоверной системы мониторинга бешенства	2018–2025 гг.	Ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ
14.	Проведение вакцинации против бешенства животных на неблагополучных территориях	2018–2025 гг.	Заинтересованные государства – участники СНГ, ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ
15.	Разработка и утверждение национальных программ/правил (инструкций) по профилактике и борьбе с бешенством в соответствии с рекомендуемой дорожной картой (приложение)	2018–2025 гг.	Заинтересованные государства – участники СНГ, ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ
16.	Гармонизация законодательных баз государств – участников СНГ по вопросам диагностики, профилактики и мерам борьбы с бешенством на основе требований МЭБ	2022–2025 гг.	Заинтересованные государства – участники СНГ, ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ, ФГБУ «ВНИИЗЖ»
17.	Определение референтных лабораторий по бешенству	2018–2020 гг.	Заинтересованные государства – участники СНГ, ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ
18.	Подготовка предложений по оснащению диагностических лабораторий необходимым оборудованием для осуществления мониторинга и диагностики бешенства	2018–2020 гг.	Ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ
19.	Проведение межлабораторных сличительных испытаний по диагностике бешенства с участием национальных референтных лабораторий для усовершенствования средств и методов диагностики бешенства животных	2018–2025 гг.	ФГБУ «ВНИИЗЖ», ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ, уполномоченные органы заинтересованных государств – участников СНГ

№ п/п	Наименование мероприятий	Срок исполнения	Ответственные
20.	Расширение информационно-коммуникационного взаимодействия ветеринарных служб государств – участников СНГ (разработать порядок обязательного взаимного информирования о случаях возникновения бешенства животных, предоставлять соответствующую информацию в штаб-квартиру МЭБ)	2018–2020 гг.	Заинтересованные государства – участники СНГ, ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ, Межправительственный совет по сотрудничеству в области ветеринарии
21.	Обеспечение соответствия статусу стран свободных от бешенства в соответствии с критериями главы Кодекса 8.13 МЭБ	К 2025 г.	Заинтересованные государства – участники СНГ, ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ, ФГБУ «ВНИИЗЖ»
22.	Проведение мероприятий по сохранению достигнутых результатов в улучшении эпизоотической ситуации по бешенству	Постоянно	Заинтересованные государства – участники СНГ, ветеринарные службы заинтересованных государств – участников СНГ, ФГБУ «ВНИИЗЖ», Межправительственный совет по сотрудничеству в области ветеринарии

5. РЕСУРСНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ КОМПЛЕКСА СОВМЕСТНЫХ ДЕЙСТВИЙ

Ресурсное обеспечение мероприятий Комплекса совместных действий осуществляется каждым заинтересованным государством – участником СНГ в рамках средств, предусматриваемых в национальных бюджетах соответствующим министерствам и ведомствам на обеспечение их функций.

6. ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Реализация Комплекса совместных действий позволит:

уточнить эпизоотическую ситуацию по бешенству в государствах – участниках СНГ;

создать достоверную систему мониторинга бешенства и оценки эффективности антирабической вакцинации;

обеспечить ветеринарные службы государств – участников СНГ обновленной нормативно-технической документацией;

оснастить диагностические лаборатории необходимым оборудованием для осуществления мониторинга и диагностики бешенства в полном объеме;

провести вакцинацию против бешенства на неблагополучных территориях;

усовершенствовать средства и методы диагностики и профилактики бешенства животных;

расширить сотрудничество государств – участников СНГ в области борьбы, профилактики бешенства животных и повысить его эффективность.

Реализация запланированных мероприятий позволит снизить ущерб от эпизоотий бешенства, поражающего животных разных видов и вызывающего чрезвычайные ситуации в животноводстве, повысить продуктивность животноводства и рентабельность агропромышленного комплекса.

Контроль реализации мероприятий и координация действий ветеринарных служб государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством будет осуществляться Межправительственным советом по сотрудничеству в области ветеринарии.

Приложение

ДОРОЖНАЯ КАРТА
по разработке и реализации национальной программы по борьбе с бешенством на период до 2025 года

Введение

Дорожная карта разработана в целях унификации подготовки и реализации национальных программ, направленных на профилактику и борьбу с бешенством.

Настоящий проект среднесрочного плана мероприятий (дорожная карта) разработан в рамках реализации Комплекса совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года.

В процессе подготовки национальной программы по борьбе с бешенством на период до 2025 года выделяются пять основных стадий, затрагивающих следующие направления:

законодательство;
сбор и анализ данных;
диагностика;
профилактика и контроль;
информационно-разъяснительная работа.

Программные мероприятия можно условно разделить на два основных направления, касающиеся борьбы с бешенством среди домашних животных (собаки и кошки) и борьбы с бешенством среди диких животных. В некоторых случаях может возникнуть необходимость рассмотрения отдельного компонента по борьбе с бешенством среди летучих мышей.

1. Структура и содержание национальной программы. Паспорт программы

Наименование субъекта бюджетного планирования (главный распорядитель средств государственного бюджета)	
Наименование программы	
Разработчики программы	

Должностное лицо, утвердившее программу (дата утверждения), или наименование и номер соответствующего нормативного акта	
Цели и задачи программы	
Сроки реализации программы	
Исполнители основных мероприятий	
Объемы и источники финансирования	
Ожидаемые конечные результаты реализации программы и показатели социально-экономической эффективности	
Конкурсная часть	

2. Цель и задачи

В качестве цели реализации программы может быть указано обеспечение благополучия либо снижение риска заражения человека, а также снижение экономического ущерба от заболевания.

Задачи, которые необходимо решить для достижения поставленной цели, должны быть четко сформулированы в зависимости от конкретных условий, сложившихся в каждой конкретной стране. В ряде стран борьба с бешенством среди собак будет выходить на передний план (и это должно быть отражено в задачах), в других странах на первый план выйдет борьба с бешенством в дикой фауне. Задачи реализации программы в общем плане следующие:

оценить состояние ветеринарной службы (объем выполняемого надзора, используемые ресурсы, законодательная база по бешенству);

провести анализ эпидемиологических данных по бешенству (оценка заболеваемости, неблагополучия, статистика по покусам людей);

подготовить прогноз и оценку риска распространения бешенства;

оценить объемы проводимых профилактических мероприятий по борьбе с бешенством и их эффективность;

провести научно-исследовательские работы по молекулярной эпидемиологии бешенства, оценке эффективности и безопасности применяемых антирабических вакцин;

создать и пополнять коллекцию полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории страны;

организовать обучение (тренинги) ветеринарных специалистов по вопросам диагностики бешенства, современным методам профилактики и борьбы с заболеванием;

провести информационно-разъяснительную работу с населением по проблеме бешенства;

разработать процедуру оценки контроля численности и оздоровления популяции безнадзорных животных;

провести мониторинговые исследования в целях выявления больных бешенством животных, в том числе среди диких животных;

разработать и утвердить актуализированные правила (инструкции) по профилактике и борьбе с бешенством;

гармонизировать законодательную базу страны по вопросам диагностики, профилактики и мерам борьбы с бешенством в соответствии с международными требованиями;

провести межлабораторные сличительные испытания по диагностике бешенства.

3. Программные мероприятия

Подробное описание программных мероприятий в соответствии с поставленными задачами по направлениям.

4. Борьба с бешенством среди безнадзорных животных

Бешенство в городских условиях может протекать изолировано от «лесного» бешенства, вовлечены в него в основном собаки, реже кошки, которые часто контактируют с человеком. Данный раздел должен включать подробное описание предполагаемых мероприятий по следующим основным направлениям:

оценка численности безнадзорных животных;

изучение экологических и популяционных особенностей безнадзорных животных применительно к конкретной стране;

мониторинг бешенства в популяции безнадзорных животных;

программа контроля численности безнадзорных животных, имеющая окончательной целью достижение полного отсутствия бездомных/бродячих животных в населенных пунктах и включающая следующие мероприятия:

ограничение доступа к кормовой базе (контейнерам с пищевыми отходами и т. д.);

информационно-разъяснительная работа с населением;

совершенствование законодательства в части усиления контроля соблюдения правил содержания домашних животных, повышения ответственности владельцев животных, введения и соблюдения обязательной регистрации и идентификации на основе чипирования и т. д.;

отлов, стерилизация/эвтаназия, организация питомников для бездомных животных;

массовая вакцинация безнадзорных животных (не менее 70 % популяции безнадзорных животных должны быть «эффективно» вакцинированы), включающая:

оценку количества необходимых доз вакцины на основе данных о численности безнадзорных животных;

определение стратегии вакцинации (отлов и парентеральная вакцинация либо применение «летающих» шприцев) и оценки ее эффективности (мониторинг уровней антирабических антител в популяции вакцинированных безнадзорных животных);

информационно-разъяснительная работа с населением.

Мониторинг бешенства в популяции бездомных животных необходим для контроля ситуации по бешенству и своевременному принятию мер по недопущению распространения этой болезни. Исследовать на бешенство всех отловленных бездомных животных, подлежащих уничтожению. Проводить мониторинг необходимо на постоянной основе.

Ликвидация кормовой базы – основная мера по ограничению численности бездомных животных, которая является дорогостоящей, но эффективной в долгосрочной перспективе. Основные пути ликвидации кормовой базы включают:

ограничение доступа животных к контейнерам бытовых отходов;

своевременную дератизацию;

информационно-разъяснительную работу с населением.

Отлов и уничтожение – негуманная мера, эффективная только в краткосрочной перспективе. Однако в настоящее время в большинстве случаев данная мера является единственно доступной. Более перспективной мерой считается создание питомников для бездомных животных и ужесточение законодательной базы в целях упорядочения содержания животных и надзора за ними на протяжении всей жизни.

5. Меры борьбы с бешенством в дикой природе

Мировой опыт убедительно показывает, что современные меры борьбы с бешенством позволяют взять под контроль заболевание, а в ряде случаев полностью ликвидировать его у наземных млекопитающих. Основной концепцией борьбы с бешенством является оральная вакцинация диких плотоядных животных. Однако 100%-ный успех может быть достигнут только при применении комплекса мер, включающего научно обоснованное планирование оральной вакцинации и мониторинг ее эффективности.

Применение оральных антирабических вакцин должно проводиться при постоянном взаимодействии представителей ветеринарной науки и практических ветеринарных специалистов. При применении оральных вакцин необходимо оценивать эффективность вакцинации, которая, в свою очередь, будет зависеть от снижения числа случаев бешенства.

Одним из основных индексов оценки эффективности оральной вакцинации является число случаев бешенства животных, регистрируемое в вакцинируемой зоне. Эффективной вакцинацию можно назвать тогда, когда после 2–3 кампаний по вакцинации число случаев бешенства существенно снизилось. Если же складывается обратная ситуация или число случаев бешенства снижается незначительно, то вакцинация проводится не

эффективно, вне зависимости от суммы затрат на нее. В этом случае необходимо выяснить причины низкой эффективности, а также принять меры по корректировке программы оральной вакцинации.

Перед началом оральной вакцинации необходимо определить:

размер района, подлежащего многократной вакцинации;

время и кратность проведения вакцинации;

способ распространения и количество доз вакцины на квадратный километр;

продолжительность проведения вакцинации;

пути проведения надзора и мониторинга эпизоотической ситуации по бешенству и эффективности вакцинации.

6. Размер района, подлежащего многократной вакцинации

При определении размера зоны вакцинации необходимо помнить, что чем она больше, тем эффективнее будет вакцинация. Минимальная площадь вакцинации, позволяющая относительно эффективно бороться с бешенством, должна быть не менее 5 тыс. кв. км, при этом иметь диаметр или ширину не менее 50 км.

7. Время проведения вакцинации

Время проведения вакцинации зависит от целевой популяции и климатической зоны и в разных странах будет различным.

Так, в Российской Федерации весеннюю вакцинацию необходимо проводить в конце марта – начале мая (в зависимости от климатической зоны и погодных условий). Вторая вакцинация проводится обычно осенью, в сентябре–октябре.

В связи с тем, что после оральной вакцинации весной у народившихся щенят имеется колостральный иммунитет, который снижает эффективность действия вакцины в течение не менее 8 недель, рекомендуется проводить третью вакцинацию, направленную на иммунизацию молодых животных, – в июне или начале июля.

При выборе времени для проведения оральной вакцинации необходимо учитывать температуру окружающей среды. Идеальные условия – температура 4–10 ^{0}C выше нуля и отсутствие резких перепадов температуры, в том числе ночных заморозков.

8. Способ распространения и количество доз вакцины на кв. км

Существуют два способа распространения вакцинных приманок: воздушный – с помощью средств авиации (вертолеты, небольшие самолеты) и вручную. Авиационный способ предпочтителен по всем показателям. Этот способ распространения вакцинных приманок используется в большинстве европейских стран. Следует отметить, что использование для этих целей вертолетов обходится дороже, чем использование самолетов. Качество

разбрасывания приманок при использовании авиации контролируется компьютером и спутниковой навигационной системой (GPS или аналог), которая позволяет точно документировать координаты и частоту сброса приманок.

9. Дозировка

Количество вакцинных приманок на 1 кв. км может быть различным и обычно составляет 25–30 приманок. Данная дозировка, рассчитанная с учетом поедания приманок лисицами и конкурирующими видами животных, прежде всего кабанами, считается оптимальной. В ряде случаев эта величина может возрастать в зависимости от численности конкурирующих видов животных. Кроме того, при использовании ручного способа распространения вакцины нет необходимости раскладывать ее равномерно по всей площади вакцинации. В этом случае вакцину следует раскладывать в местах скопления или наиболее вероятного появления животных (по краям лесов и полей, вдоль дорог, тропинок, ручьев и рек, возле свалок и т. д.).

10. Продолжительность проведения вакцинации

Минимальная продолжительность вакцинации на конкретной территории должна составлять не менее 6 лет и 2 года после регистрации последнего случая бешенства.

11. Пути проведения надзора и мониторинга

Мониторинг является важной составляющей программы оральной вакцинации и позволяет оценить не только эпизоотическую обстановку по бешенству в зоне вакцинации, но также эффективность и безопасность вакцинации. При этом оцениваются поедаемость вакцины и уровень сероконверсии (определение уровня антирабических антител в крови вакцинированных животных). Для проведения полноценного мониторинга необходимо отстреливать не менее 4 животных на 100 кв. км зоны вакцинации в год, исключая площадь населенных пунктов и водоемов. Кроме того, патматериал отбирают от всех плотоядных животных, обнаруженных мертвыми (в том числе погибших на дорогах), напавших на человека, и, по возможности, от животных, добытых охотниками.

В качестве индикаторного вида для мониторинга бешенства и эффективности вакцинации предпочтительно использовать лисиц или других представителей семейства собачьих, превалирующих в зоне вакцинации (енотовидные собаки, корсаки, песцы, шакалы и др.). В целях мониторинга безопасности вакцины и оценки ее поедаемости нецелевыми видами животных по возможности следует отбирать пробы и от других видов, в том числе от мелких мышевидных млекопитающих (лесные мыши, полевки, землеройки, крысы и т. д.). Для диагностики бешенства и дифференциации штаммов отбирают пробы головного мозга. С целью определения содержания антибиотиков тетрациклинового ряда (оценка поедаемости вакцины) отбирают

пробы тканей костей и зубов в соответствии с разработанными ФГБУ «ВНИИЗЖ» Методическими указаниями по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в тканях зубов и костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин. Для оценки уровней антирабических антител (оценка эффективности вакцинации) в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 отбирают пробы крови (3–5 мл). Получаемые при этом данные позволяют не только оценить эпизоотическую ситуацию по бешенству в регионе, но и определить эффективность и безопасность применяемой оральной антирабической вакцины.

Большое значение имеет гомогенность (однородность) сбора проб на территории проведения оральной вакцинации, так как при кластерном (неравномерном) отборе проб происходит существенное искажение результатов.

12. Профилактика бешенства домашних и сельскохозяйственных животных

12.1. Профилактика бешенства домашних плотоядных животных

В неблагополучных по бешенству регионах подлежат антирабической иммунизации:

собаки всех видов и любого назначения, вне зависимости от режима их содержания;

кошки всех видов, вне зависимости от режима их содержания.

Необходимо проводить выборочный контроль эффективности вакцинации путем определения уровней антирабических вируснейтрализующих антител в пробах сывороток крови. Для этого рекомендуется исследовать не менее 5 % общей популяции вакцинированных животных в регионе.

В благополучных по бешенству регионах подлежат антирабической иммунизации:

собаки, используемые в служебных целях (охрана, розыск, охота, обслуживание людей с ограничением зрения и т. д.);

собаки и кошки уличного содержания.

Необходимо проводить выборочный контроль эффективности вакцинации путем определения уровней антирабических вируснейтрализующих антител в пробах сывороток крови. Для этого рекомендуется исследовать не менее 1 % общей популяции вакцинированных животных в регионе.

12.2. Профилактика бешенства среди сельскохозяйственных животных

В неблагополучных по бешенству регионах подлежат антирабической иммунизации:

сельскохозяйственные животные всех видов, находящиеся на выпасе или при выгульном содержании;

КРС, МРС и лошади, находящиеся в частных подворьях.

Необходимо проводить выборочный контроль эффективности вакцинации путем определения уровней антирабических вируснейтрализующих антител в пробах сывороток крови. Для этого необходимо исследовать не менее 5 % общей популяции вакцинированных животных в регионе.

В благополучных по бешенству регионах антирабическая иммунизация сельскохозяйственных животных не проводится при условии постоянно действующего мониторинга бешенства в популяции диких плотоядных, а также бездомных животных. В случае отсутствия эффективной системы мониторинга проводятся мероприятия так же, как и в неблагополучных регионах.

Необходимо проводить выборочный контроль эффективности вакцинации путем определения уровней антирабических вируснейтрализующих антител в пробах сывороток крови. Для этого необходимо исследовать не менее 5 % общей популяции вакцинированных животных в регионе.

13. Мониторинг бешенства среди рукокрылых

В связи с тем, что рукокрылые большинства видов находятся под охраной государства, все исследования проводятся при обязательном согласовании с природоохранными организациями. Исследованию подлежат только больные, ослабленные, не способные летать или погибшие животные, обнаруженные в местах их проживания, а также животные, вне зависимости от состояния здоровья, контактировавшие с человеком. Мониторинг следует проводить ежегодно по мере поступления материала, для исследований направлять пробы головного мозга и крови.

Содружество Независимых Государств

МЕЖПРАВИТЕЛЬСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СОТРУДНИЧЕСТВУ В ОБЛАСТИ ВЕТЕРИНАРИИ

Пункт 4 повестки дня

РЕШЕНИЕ

от 11 сентября 2018 года, г. Кишинев

О Решении Совета глав правительств СНГ о Комплексе совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года, принятое на заседании 1 июня 2018 года в г. Душанбе

Межправительственный совет по сотрудничеству в области ветеринарии

решил:

1. Принять к сведению информацию заместителя директора ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» по научно-исследовательской работе и развитию А.Е.Метлина о Решении Совета глав правительств СНГ от 1 июня 2018 года о Комплексе совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года.

2. Членам совета, руководителям ветеринарных служб государств – участников СНГ принять необходимые меры по обеспечению программных мероприятий по реализации Комплекса совместных действий.

Председатель
Межправительственного совета
по сотрудничеству в области ветеринарии,
генеральный директор Национального агентства
по безопасности пищевых продуктов
Республики Молдова **Г.С. Габерь**

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК ОАО «ГАО «ВСЕРОССИЙСКИЙ ВЫСТАВОЧНЫЙ ЦЕНТР»

РОССИЙСКАЯ АГРОПРОМЫШЛЕННАЯ НЕДЕЛЯ

ЗОЛОТАЯ ОСЕНЬ

ДИПЛОМ

НАГРАЖДАЕТСЯ ЗОЛОТОЙ МЕДАЛЬЮ:

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир

«За разработку и производство набора для диагностики бешенства животных методом иммунофлуоресценции и вакцины ассоциированной против парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота эмульсионной инактивированной»

МИНИСТР СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Е.СКРЫННИК

1-11 ОКТЯБРЯ 2010
МОСКВА, ВСЕРОССИЙСКИЙ ВЫСТАВОЧНЫЙ ЦЕНТР

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ЗОЛОТАЯ ОСЕНЬ
РОССИЙСКАЯ АГРОПРОМЫШЛЕННАЯ ВЫСТАВКА

GOLDEN AUTUMN
RUSSIAN AGRICULTURAL EXHIBITION

ДИПЛОМ

награждается золотой медалью

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир

«За разработку и реализацию комплекса совместных действий государств участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года»

10–13 октября 2018

МИНИСТР СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Д.Н. ПАТРУШЕВ

Москва
ВДНХ