

*На правах рукописи*

**ГУЛЮКИН Алексей Михайлович**

**БЕШЕНСТВО. СОВРЕМЕННАЯ СИСТЕМА АНАЛИЗА  
И КОНТРОЛЯ ЭПИЗОТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА  
НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора ветеринарных наук

Москва, 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»

Научный консультант: **Макаров Владимир Владимирович**, доктор биологических наук, профессор Департамента ветеринарной медицины Аграрно – технологического института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов»

Официальные оппоненты:

**Сочнев Василий Васильевич**, доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой эпизоотологии, паразитологии и ветсанэкспертизы ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»;

**Кузьмин Владимир Александрович**, доктор ветеринарных наук, профессор кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»;

**Недосеков Виталий Владимирович**, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой эпизоотологии и организации ветеринарного дела Национального университета биоресурсов и природопользования Украины.

Ведущая организация: ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробихотехнологий Российской академии наук».

Защита диссертации состоится 21 декабря 2018 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета Д.220.042.06 при ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, по адресу: 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23, тел.: 8(495)377-93-83; факс: 8(495)377-49-39.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина и на сайте <http://www.mgavm.ru/science/dissertation>.

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_ 2018 г. и размещен на сайтах <http://www.mgavm.ru/science/dissertation> и <http://www.vak.ed.gov.ru>.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор биологических наук

Грязнева Татьяна Николаевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Распространение бешенства среди животных является одним из важнейших международных критериев оценки биологической и экологической безопасности среды обитания человека. В мире от бешенства ежегодно погибают от 55 до 70 тыс. человек, половина из которых приходится на детей, и до 6,5 млн. человек подвергаются постэкспозиционным антирабическим обработкам (Smith A. et al., 2005; Arai Y. et al., 2005; Макаров В.В. и др., 2015), а в России ежегодно вакцинируется от бешенства 250-450 тыс. человек (Онищенко Г.Г., 2012).

Бешенство относится к числу наиболее опасных вирусных болезней, регистрируется на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды и, по оценке ВОЗ, входит в пятерку инфекций, общих для человека и животных, наносящих наибольший социальный и экономический ущерб. С учетом исключительности бешенства с присущими ему характеристиками многих классических инфекционных болезней – мировой нозоареал, природная очаговость, чрезвычайная контагиозность, векторная трансмиссия плотоядными, восприимчивость большинства видов животных, социальная и экономическая значимость, оно включено в список особо опасных инфекционных болезней МЭБ (World Organization for Animal Health, 2015), а в России – в Перечень заразных, в том числе особо опасных, болезней животных, по которым могут устанавливаться ограничительные мероприятия (карантин) (приказ МСХ РФ от 19.12.2011 г., № 476).

По классификации Международного Комитета по таксономии вирусов, вирус бешенства относится к отряду *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus*. На сегодняшний день род *Lyssavirus* насчитывает 14 видов. Отметим, что большинство видов было обнаружено у летучих мышей, и считают, что общий предок рода *Lyssavirus* также вызывал инфекцию у этих животных.

Во многих странах Западной Европы бешенство в последние годы не регистрируется (Rabies Bulletin Europe). Россия среди стран, где регистрируется бешенство, занимает доминирующее положение, как по числу неблагополучных пунктов (очагов), так и по заболеваемости животных. За последние 20 лет в России регистрируется самая высокая смертность населения от заболевания бешенством среди развитых стран (Грибенча С.В., Львов Д.К., 2008).

Несмотря на проводимые мероприятия, на территории России в последний период

активизировались природные очаги бешенства, увеличилась заболеваемость диких плотоядных, в эпизоотический процесс интенсивно вовлекаются домашние животные, создавая угрозу населению (Апалькин В.А. и др., 2004; Ведерников В.А. и др., 2005; Черкасский Б.Л. и др., 2005; Herwijnen R. и др., 2015; Авилов В.М. и др., 2016), что предопределяет современные особенности течения эпизоотии и видовой состав заболевших животных.

Таким образом, современная система анализа и контроля эпизоотического процесса на территории Российской Федерации является актуальной и отражает все особенности течения этой инфекционной болезни, широту распространения, социальные риски и антропологические факторы. А также требует постоянной, скоординированной работы от медицинских и ветеринарных работников, направленной на совершенствование анализа и контроля современными средствами эпизоотического процесса бешенства, средств диагностики и профилактики данного заболевания.

**Степень разработанности проблемы.** Бешенство требует постоянного широкомасштабного мониторинга – неотъемлемой части системы противоэпизоотических и противоэпидемиологических мероприятий (Макаров В.В. и др., 2015). Результаты мониторинговых исследований бешенства регулярно отражаются в международных специализированных изданиях *Rabies bulletin Europe* и *World survey of rabies*.

Эпизоотологический мониторинг бешенства во взаимосвязи с эпидемиологическими показателями регулярно проводится по территории России (Черкасский Б.Л., Селимов М.А., Груздев К.Н., Апалькин В.А., Авилов В.М., Ведерников В.А., Сидоров Г.Н., Макаров В.В., Полещук Е.М. и др.), а результаты публикуются в информационно-аналитических бюллетенях и размещаются на сайтах Роспотребнадзора, Россельхознадзора, ФГБУ ВНИИЗЖ, Минздрава России, Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко, Центральной научно-методической ветеринарной лаборатории, Омского НИИ природно-очаговых инфекций.

Исходя из анализа научной литературы, результаты мониторинга бешенства проведены в пространственно-временном диапазоне в основном в количественных и относительных показателях, не в полной мере раскрывающих скрытые особенности эпизоотического процесса. Мощным инструментом в эпизоотологическом мониторинге является использование географических информационных систем (ГИС), позволяющих автоматизировать обработку и анализ данных, ее визуализацию на элек-

тронных картах, выявить причинно-следственные связи развития динамики распространения инфекций и провести прогнозирование.

Разработаны методы лабораторной диагностики бешенства, основанные на обнаружении цитоплазматических включений (телец Негри) или специфического антигена (световая и люминесцентная микроскопия, реакция диффузионной преципитации, иммуноферментный анализ), выделении вируса в биопробе на лабораторных животных или в культуре клеток, а также обнаружении генома возбудителя с помощью ПЦР (ГОСТ 26075-84; Хисматуллина Н.А. и др., 2001). Однако многие тесты недостаточно чувствительны, трудоемки, нетехнологичны и требуют дополнительных дифференциальных исследований, в связи с чем необходимо совершенствование существующих и разработка новых диагностических экспресс-тестов, в том числе для контроля уровня поствакцинальных антирабических антител.

Для оральной иммунизации диких плотоядных разработаны отечественные вакцины из штаммов РВ-97(Синраб, Оралбивак), ТС-80 и генномодифицированного ERA G333 (Рабивак), но они обладают остаточной вирулентностью и экологически небезопасны, а сами приманки недостаточно специфичны, стабильны и привлекательны, поэтому необходима разработка новых вакцин, отвечающих выдвигаемым требованиям (Макаров В.В., 2004; Евсеева С.Д., 2005).

**Цель и задачи исследований.** Целью исследований являлось совершенствование диагностики и специфической профилактики бешенства, создание системы анализа и контроля эпизоотического процесса на территории Российской Федерации. В задачи исследований входило:

1. Разработать геоинформационную систему (ГИС), провести эпизоотологический мониторинг и изучить особенности эпизоотического процесса бешенства на территории Российской Федерации.
2. Изучить факторы, влияющие на региональные особенности эпизоотического процесса бешенства.
3. Провести анализ особенностей эпизоотического процесса бешенства разных видов животных.
4. Разработать и усовершенствовать методы контроля специфической профилактики бешенства, испытать тесты на различных видах животных.
5. Усовершенствовать методы лабораторной диагностики бешенства.

6. Изучить гематологический профиль и иммунный статус плотоядных животных, иммунизированных против бешенства разными вакцинами.

7. Усовершенствовать средства специфической профилактики бешенства.

**Научная новизна.** Впервые в Российской Федерации на основе программного обеспечения ArcGIS разработана геоинформационная система (ГИС) эпизоотологического мониторинга бешенства животных, которая включает пространственную модель исследуемой территории в виде набора цифровых административно-географических карт, банк данных первичных эпизоотологических и эпидемиологических показателей и программное приложение для хранения, обработки и визуализации данных.

Создан электронный кадастр случаев заболевания животных бешенством, построенный на платформе реляционной базы данных Microsoft Office Access®. Данные кадастра привязаны к атрибутивной таблице цифровой карты РФ, что позволяет визуализировать эпизоотическую обстановку через построение нозологических карт.

С использованием ГИС осуществлен эпизоотологический мониторинг современного состояния бешенства животных на территории РФ и отдельных регионов, синтезированы особенности эпизоотического процесса в пространственно-временном диапазоне. Масштабно раскрыто экономическое значение бешенства животных в РФ. На основе нормативов профилактических и вынужденных обработок, зоотехнической структуры стада и потерь биопрепаратов при транспортировке и в процессе обработок разработана методика нормирования расхода вакцин на иммунизацию против бешенства животных разных видов.

Для контроля эффективности вакцинации животных против бешенства разработаны иммуноферментные тест-системы:

- на основе гликопротеина вируса бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ) методом непрямого ИФА;
- методом блок-ИФА;
- в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1);
- выявления РНК лиссавируса в обратнo-транскриптазной гнездовой ПЦР (ОТ-ПЦР) с помощью специфических праймеров.
- Определены оригинальные нуклеотидные последовательности олигонуклеотидных наружных и внутренних праймеров для детекции РНК вируса бешенства ме-

тодом гнездовой ОТ-ПЦР.

Изучен иммунный статус организма плотоядных животных, вакцинированных против бешенства различными вакцинами, в том числе с иммуномодуляторами. Проведен серологический контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства крупного рогатого скота, собак и лисиц в неблагополучных хозяйствах и лесных угодьях ряда регионов РФ.

Определена нуклеотидная последовательность фрагментов генов G и N полевых изолятов вируса бешенства и их филогенетический анализ, на основе чего построены филогенетические дендрограммы, раскрывающие геномные территориальные особенности лиссавирусов. Новосеквенированные последовательности геномов изолятов вируса бешенства [Rabies virus isolate VIEV\_RV\_W-1/16 nucleoprotein (G) gene, partial cds и Rabies virus isolate VIEV\_RV\_W-1/16 nucleoprotein (N) gene, partial cds] включены в Международную базу данных (*GenBank*) Национального центра биотехнологической информации (*NCBI*).

Сконструирован препарат против бешенства на основе эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens* и Гемодеза-Н для местной обработки ран при укусах человека плотоядными животными, обладающий выраженным антирабическим действием. Разработан способ приготовления и сконструирована вакцина для оральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства на основе авирулентного штамма вируса РВ-97. Вакцина механически и влагоустойчива, стабильна по активности вируса, безвредна, привлекательна для поедания и обладает высокой иммуногенной эффективностью.

Научная новизна исследований подтверждена патентами РФ на изобретения:

Набор синтетических олигонуклеотидных праймеров для выявления РНК вируса бешенства и способ выявления вируса бешенства с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), № 2575088. Препарат против бешенства, № 2420309. Вакцина против бешенства для оральной иммунизации диких плотоядных животных, № 2440139.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Установленные особенности современного эпизоотического состояния по бешенству дополняют и расширяют имеющиеся теоретические данные эпизоотического процесса особо опасных и карантинных инфекций на территории Российской Федерации.

Регулярно осуществляемые на основе эпизоотологического мониторинга с использованием ГИС и направляемые в различные ведомства и регионы «Обзоры и прогнозы эпизоотической ситуации по бешенству животных в Российской Федерации» используются в масштабе страны в качестве информационной поддержки мероприятий по профилактике и борьбе с бешенством животных и человека и публикуются в ежеквартальных информационных Бюллетенях Европейского центра ВОЗ «WHO Rabies Bulletin Europe».

По результатам проведенных исследований разработаны и предложены для практического применения:

- методические рекомендации по расчету годовой потребности в биопрепаратах для проведения профилактических и противоэпизоотических мероприятий в хозяйствах всех форм собственности, утвержденные Отделением ветеринарной медицины РАСХН, позволяющие научно-обоснованно планировать потребность вакцин на иммунизацию разных видов животных против бешенства.

- тест-системы для определения уровня антирабических антител в сыворотках крови животных, вакцинированных против бешенства, методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) и методом блок иммуноферментного анализа (блок-ИФА), утвержденные директором ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», которые по чувствительности и экспрессности значительно превосходят традиционную реакцию нейтрализации, что определяет их практическую значимость в лабораторной диагностике.

- метод и разработаны методические рекомендации по индикации возбудителя бешенства из патологического материала в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1), позволяющие, при полном совпадении с результатами биопробы на белых мышах, выявить уличный вирус в биоматериале животных через 1-3 суток. Метод включен в «ГОСТ 26075-2013 (Межгосударственный стандарт). Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства».

- способ и методические указания по выявлению РНК лиссавируса в гнездовой обратно-транскриптазной ПЦР (ОТ-ПЦР), утвержденные директором ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», с возможностью установления диагноза бешенства в течение 6 часов (в классической биопробе на белых мышах – до 34 суток).

- рекомендации по купированию первичных очагов и профилактике бешенства», утвержденные директором ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».



- «Учебно-методическое пособие в иллюстрациях – «Бешенство: этиология, эпизоотология, диагностика».

Результаты исследований использованы при разработке нормативно-технических, информационных и методических документов, регламентирующих противоэпизоотические мероприятия при бешенстве животных, используются при чтении лекций на курсах повышения квалификации ветеринарных врачей по дисциплинам «Эпизоотология и инфекционные болезни животных» и «Вирусология».

**Методология и методы исследований.** Объектом исследований явились восприимчивые к бешенству дикие плотоядные животные в ареалах их распространения, сельскохозяйственные животные разных видов в структуре животноводства РФ и мелкие домашние животные (собаки, кошки). Предмет исследований – эпизоотологический мониторинг бешенства на территории РФ, разработка и усовершенствование средств специфической профилактики и методов контроля эффективности вакцинации против бешенства животных.

В работе использовали аналитический, статистический, эпизоотологический, биологический, клинический, иммунологический, гематологический, экономический и расчетно-конструктивный методы исследований.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность результатов обусловлена большим объемом статистического и экспериментального материала, использованием современных методов и методик исследований, производственным испытанием и статистической обработкой данных.

Материалы диссертации доложены и обсуждены на международных, региональных и отраслевых научно-практических конференциях «Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных» (Покров, 1998); «Биотехнология: экология крупных городов» (Москва, 2010); «Совершенствование иммунологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней» (Москва, 2010); «Актуальные вопросы инфектологии» (Казань, 2010); «Биотехнология: Реальность и перспективы» (Казань, 2014); «Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных», посвященная 55-летию ВНИИВВМ (Москва, 2014); «Биотехнология и качество жизни» (Казань, 2014); V и VII Международном ветеринарном конгрессе (Москва, 2015, 2017), «Научные перспективы XXI века» (Новосибирск, 2015); 7-й Международной конференции по медицинской геоло-

гии - MEDGEO 2017 (Москва, 2017); X Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 2018).

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

- мониторинг эпизоотической ситуации и особенности эпизоотического процесса бешенства на территории РФ;
- иммуноферментные тест-системы контроля эффективности вакцинации животных против бешенства;
- иммунологические методы ускоренной диагностики бешенства;
- новые средства специфической профилактики бешенства.

**Публикация материалов исследований.** По теме диссертации опубликовано 41 научная работа, в том числе 22 – в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, изданы 1 монография и 1 учебно-методическое пособие, 3 патента.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 379 страницах, иллюстрирована 44 таблицами, 61 рисунком и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, заключения, списка использованной литературы (468 источников, из них 131 зарубежных авторов) и 15 приложений.

## **СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Материалы и методы исследований**

Работа выполнена в 1998-2018 гг. в ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» в соответствии с тематическими планами НИР «Мониторинг изменений эпизоотической обстановки по инфекционным болезням животных» (№ 0578-2014-0025), «Получить новые знания о генетической структуре вируса классического бешенства, распространенного на территории России» (№ 0578-2015-0003), по проекту ФЦП «Государственная поддержка интеграции высшего образования и фундаментальной науки» (грант № E0096-2001 «Эволюционно-экологические особенности эпидемиологии бешенства на современном этапе»). Отдельные исследования выполнены в ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» по тематическому плану НИР «Биологическая безопасность».

Эпизоотологический мониторинг бешенства на территории РФ проводили с использованием геоинформационной системы (ГИС), созданной на платформе ArcGIS®

for Desktop (ESRI, США), для чего был создан электронный кадастр случаев заболевания животных бешенством, построенный на основе реляционной базы данных MS Access®. Данные кадастра привязаны к атрибутивной таблице цифровой карты Российской Федерации масштаба 1:1000000.

Для эпизоотологического мониторинга использовали статистические сведения и оперативную информацию, полученную в ФГУ «Центр ветеринарии» и управлениях ветеринарии субъектов РФ. Эпизоотическую ситуацию изучали по интенсивным и экстенсивным показателям эпизоотического процесса бешенства (уровень неблагополучия, распространенность, заболеваемость, очаговость, напряженность, прогноз эпизоотической ситуации) в линейно-графическом и пространственно-временном диапазоне (Таршис М.Г., Бакулов И.А. и др., 2002; Дудников С.А., 2005; Джупина С.И., Ведерников В.А., 1991; Макаров В.В., 1999; Макаров В.В., Воробьев А.А., 2004).

Общая архитектура исследований представлена на рисунке 1

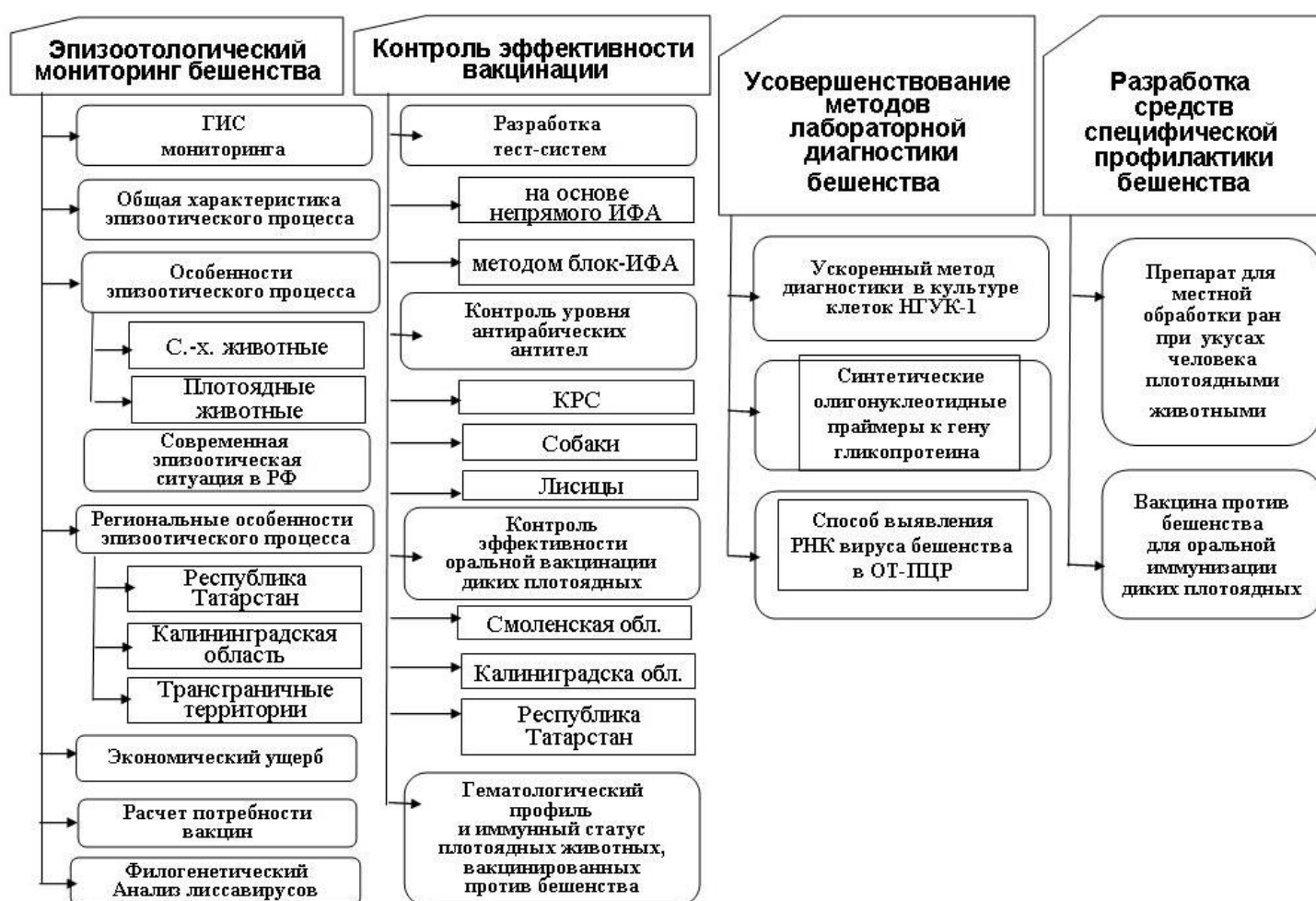


Рис. 1 – Общая архитектура исследований

Экономический ущерб, причиняемый бешенством сельскохозяйственных животных, определяли с использованием «Методики определения экономической эффек-

тивности ветеринарных мероприятий» (1997).

Потребность биопрепаратов для специфической профилактики бешенства животных определяли с учетом половозрастной структуры стада животных разных видов и количества обработок, которые необходимо провести в течение календарного года в соответствии с нормативно-технической документацией.

Опыты ставили на лабораторных и плотоядных животных, для чего использовано 12210 беспородных белые мышей и мышей-сосунков (ГОСТ 26075-84), 20 кроликов, 19 собак, 6 лисиц клеточного содержания, 2 домашние кошки. Для контроля эффективности вакцинации против бешенства использовали 515 проб сыворотки крови разных видов животных.

При испытании ускоренного метода диагностики бешенства в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1) использовано 554 пробы головного мозга от диких плотоядных, сельскохозяйственных животных и людей (постмортально), поступивших из различных учреждений страны.

В работе использовали производственный фиксированный штамм «Овечий» ГНКИ, стандартный штамм CVS, эпизоотический штамм «Соб-2580»; авирулентные вакцинные штаммы PB-97 и ERA G333 и 554 полевых изолята.

В анализе использовали метод гнездовой ПЦР, совмещенный с обратной транскрипцией ПЦР (ОТ-ПЦР), которую проводили с помощью реагентов ThermoFisher, США. Специфичность ОТ-ПЦР с праймерами к гену гликопротеина вируса бешенства определяли с нуклеиновыми кислотами, выделенными из культур *E. coli*, *M. bovis*, *M. avium*, *Br. abortus*, *B. anthracis*, *St. aureus*, вируса болезни Ауески.

В исследованиях использовали метод иммунофлуоресценции в прямом варианте (ГОСТ 26075-84) с флуоресцирующим антирабическим глобулином (ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»). ИФА проводили в прямом сэндвич-варианте на 96-луночных микротитрационных планшетах «Пл-Б-М». Прямой сэндвич-вариант ИФА для определения антигенов ставили с использованием «Набора препаратов для диагностики бешенства животных методом ИФА (ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)». В непрямом ИФА использовали производственный штамм «Овечий» (ГНКИ) вируса бешенства.

Реакцию нейтрализации ставили по Atanasiu P. (1975) на белых мышях с использованием вируса бешенства штамма CVS в дозах от 30 до 300 LD<sub>50</sub>/0,03 мл.

Для получения и очистки антигена использовали метод накопления вирусного ма-

териала при интрацеребральном введении 10% вируссодержащей суспензии белым мышам. Культуральный вирус бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ) получали путем заражения культуры клеток НГУК-1 и внесением вируссодержащей суспензии мозга мышей в суспензию клеточной культуры. Вирусный материал освобождали от клеточного дебриса по методу Хисматуллиной Н.А., Юсупова Р.Х. (1988), с последующей очисткой в линейном градиенте плотности сахарозы по Dietzschold В. (1996).

Степень очистки рабического вируса и его белковых фракций изучали методом диск-электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия по Dietzschold В. (1996). Специфичность белковых фракций определяли в иммуноблоттинге по Towbin Н., et al. (1979) с использованием поликлональной мышинной антирабической сыворотки.

Гематологические и морфологические показатели крови изучали общепринятыми методами при окраске мазков по Романовскому-Гимзе и Селлерсу.

Иммунный статус собак и лисиц изучали в сравнительном аспекте при использовании отечественных (Рабикан, Мультикан, Дипентавак) и зарубежных (Дефенсор, Нобивак Рабиес) вакцин по показателям содержания Т- и В-лимфоцитов в крови (Julius M. et. al., 1973), Т-лимфоцитов – методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Jondal M. et. al., 1972), Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток – в реакции розеткообразования с теофиллином (Keane R. et. al., 1982), фагоцитарную активность нейтрофилов – по методу Кост Е.А., Стенко М.И. (1981) с использованием тест-культуры *Staph. aureus*.

Эффективность оральной вакцинации против бешенства изучали исследованием 2065 проб биоматериала от диких плотоядных животных (головной мозг, глазная жидкость, костная ткань), отстрелянных на территориях Смоленской, Калининградской областей и Республики Татарстан в РИФ, ИФА, реакции нейтрализации, в биопробе на белых мышах и в культуре клеток НГУК-1 поедаемость вакцин – согласно «Методическим указаниям по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в ткани зубов и костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин» (ВНИИЗЖ, г. Владимир).

Антирабический препарат для обработки ран при укусах человека животными конструировали на основе эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens* и Гемодеза-Н.

Экспериментальную вакцину для оральной иммунизации плотоядных конструи-

ровали на основе культуральной жидкости при культивировании авирулентных штаммов вируса бешенства PB-97 и ERA G333 в перевиваемой культуре клеток (перевиваемые монослойно-суспензионные сублинии клеток почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21/13-02 и почки сайги).

Олигонуклеотидные праймеры для детекции РНК вируса бешенства в гнездовой ОТ-ПЦР конструировали на основе сравнительного анализа гликопротеина из 604 штаммов лиссавирусов, депонированных в международной базе данных GeneBank с помощью пакета программного обеспечения «Vector NTI 9.1» (Invitrogen, Carlsbad, USA). Праймеры синтезировали в ЗАО «Синтол» (РФ). Для постановки ПЦР РНК вируса бешенства выделяли из слюны, спинномозговой жидкости инфицированных животных, биоптатов слюнной железы, глазной жидкости и проб головного мозга. Амплификацию фрагмента гемагглютинаина вируса бешенства проводили в соответствии с методом, описанном в патенте РФ на изобретение № 2575088. Определение нуклеотидной последовательности проводили по методу Сэнгера в ЗАО «Синтол» (Россия).

Филогенетический анализ выполняли с помощью алгоритмов ближайшего соседа и максимального сходства, встроенных в программу MEGA (Kumar S. et al., 2008). Достоверность топологии филогенетического дерева подтверждали с помощью 1000-кратного бутстреп тестирования. Анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета программ BioEdit version 7.0.5.2. (Ibis Biosciences, США).

Цифровой материал обрабатывали в среде программных приложений «Microsoft Excel» и «StatSoft Statistica 6» по показателям средних значений ( $M \pm m$ ), достоверности статистической разницы опытных и контрольных показателей ( $P$ ) и коэффициентов корреляции ( $r$ ).

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

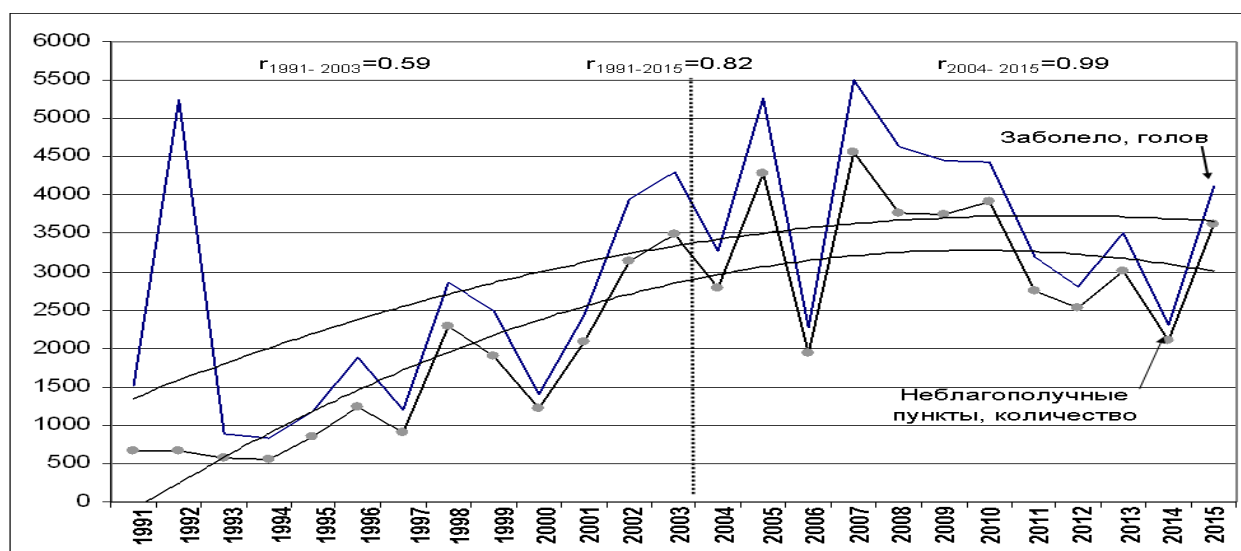
### **Эпизоотологический мониторинг бешенства**

*Геоинформационная система (ГИС) эпизоотологического мониторинга бешенства.* В качестве платформы построения ГИС использовано программное обеспечение ArcGIS (ESRI, США), обладающее широкими возможностями визуализации картографической информации и обширным набором инструментов пространственного и временного анализа.

Для анализа пространственно-временных характеристик эпизоотического процес-

са бешенства создан электронный кадастр случаев заболевания животных, построенный на платформе базы данных Microsoft Office Access®. Данные кадастра привязаны к атрибутивной таблице цифровой карты РФ масштаба 1:1000000, что позволило реализовать проект ГИС на платформе ArcGIS® for Desktop и проводить визуализацию эпизоотологических данных через построение нозологических карт. ГИС автоматически выявляет зоны наибольшего риска развития эпизоотического процесса бешенства, с определением объема и характера противоэпизоотических и противоэпидемических мероприятий.

**Общая характеристика эпизоотического процесса бешенства на территории Российской Федерации в динамике за 1991-2015 гг.** Ретроспективный анализ основных показателей эпизоотического процесса на территории РФ за 1991-2015 гг. свидетельствует, что бешенство регистрируется на стабильно высоком уровне и охватывает значительную часть территории страны. В многолетней динамике эпизоотического процесса с эвентуальными скачкообразными периодами просматривается неуклонное повышение, как числа неблагополучных пунктов, так и заболевших животных (тренды графика) и только с 2010 г. отмечается относительная стабилизация показателей на сравнительно высоком уровне (рис. 2).



**Рис. 2 – Динамика неблагополучных пунктов и заболевших бешенством животных на территории Российской Федерации**

В общей сложности за 1991-2015 гг. в эпизоотическом процессе бешенства всех видов животных на территории РФ участвовало свыше 28,5 тыс. неблагополучных пунктов при среднегодовом показателе 2339 пунктов (таблица 1), в которых заболело 75,9 тыс. голов (3036 голов в год) при очаговости 1,3 гол.

Таблица 1 – Основные показатели эпизоотического процесса бешенства разных видов животных на территории РФ (1991-2015 гг.)

Вид животного	Неблагополучные пункты		Заболело, гол.			Очаговость, гол.
	всего	в год	всего	в год	на 10000 гол.	
<i>Сельскохозяйственные животные</i>						
Крупный рогатый скот	10104	404,2	14209	568,4	0,21	1,7
Мелкий рогатый скот	918	36,7	2605	104,2	0,02	2,8
Свиньи	133	5,3	193	7,7	0,002	1,5
Лошади	672	26,9	802	32,1	0,02	1,2
Олени	87	3,5	5507	220,3	1,7	63,3
Верблюды	17	0,7	35	1,4	1,9	2,1
Всего	11931	477,3	23351	934,0	0,67	2,0
<i>Плотоядные животные</i>						
Собаки	11131	445,2	13579	543,2	н/д	1,2
Кошки	7534	301,4	8329	333,2	н/д	1,1
Дикие звери	27658	1106,3	30641	1225,6	н/д	1,1
Всего	46323	1852,9	52549	2102,0	н/д	1,1
Итого по всем видам	58254	2330,2	75900	3036,1	–	1,3

По количеству неблагополучных пунктов и заболевших бешенством животных преобладают плотоядные животные (собаки, кошки и дикие звери).

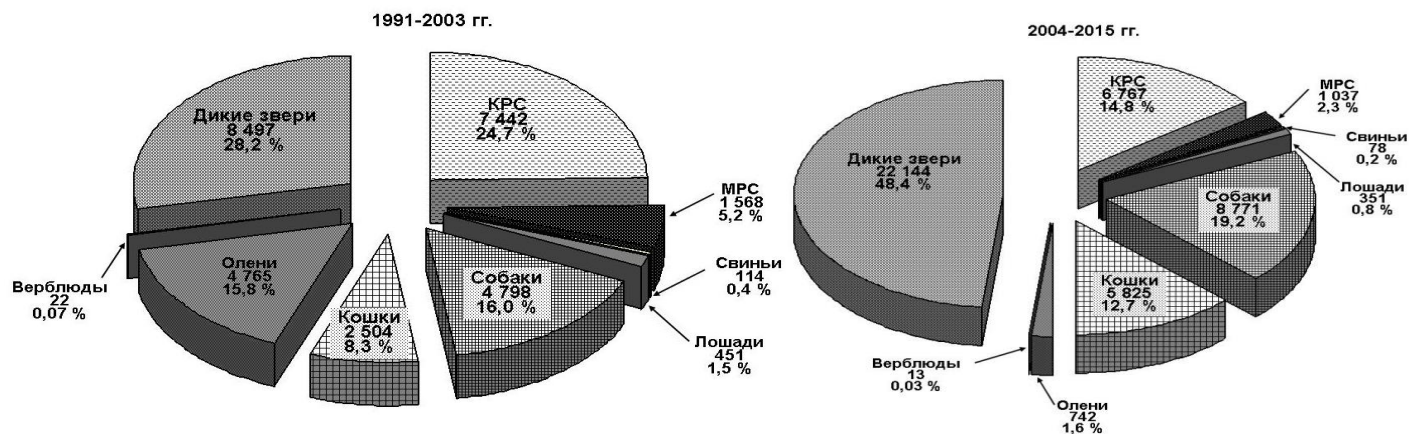


Рис. 3 – Изменение структуры заболеваемости животных бешенством на территории Российской Федерации за периоды 1991-2003 и 2004-2015 гг.

Условное разделение всего учетного периода на два равнозначных временных промежутка (1991-2003 и 2004-2015 гг.) для сравнительного анализа динамических изменений (рис. 3) показало усиливающуюся корреляционную зависимость количества неблагополучных пунктов и числа заболевших животных. Так, если в первом периоде эта связь характеризовалась как средняя ( $r=0,59$ ), то в последующем она стала почти абсолютной ( $r=0,99$ ).

В динамике эпизоотического процесса бешенства животных на территории РФ



изменилась структура заболеваемости – увеличилась доля случаев болезни среди диких зверей. Так, если в период 1991-2003 гг. показатель по этой группе животных составил 28,2% в структуре общей заболеваемости, то в последующий период увеличился до 48,4%, что свидетельствует об относительном увеличении роли природной очаговости бешенства.

На фоне повышения заболеваемости диких зверей увеличилось количество случаев заболевания бешенством собак и кошек, что связано с издержками специфической профилактики и регулирования численности бездомных животных.

**Особенности эпизоотического процесса бешенства разных видов животных.**  
**Сельскохозяйственные животные.** В современных условиях бешенство сельскохозяйственных животных не является самостоятельным вектором, но служит достоверным индикатором проявления эпизоотического процесса в дикой природе. В сравнении с мониторинговыми исследованиями в дикой природе случаи бешенства сельскохозяйственных животных учитываются более стабильно, редко игнорируются, и их учет дает наиболее реалистичную картину территориального распространения болезни. В эпизоотический процесс бешенства на территории России в настоящее время вовлечены сельскохозяйственные животные шести основных видов – крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, свиньи, лошади, олени и верблюды, относящиеся (кроме свиней) к травоядным, пастбищным животным.

Крупный рогатый скот. В структуре сельскохозяйственных животных всех видов по показателю неблагополучия и заболеваемости первое место принадлежит крупному рогатому скоту (85%), как наиболее массовому, пастбищному в животноводстве страны. Неблагополучные пункты перманентно в относительно равном количестве в динамике по годам регистрируются почти во всех регионах РФ с некоторым общим повышением в период 2000-2008 гг.

Среди крупного рогатого скота отмечено также наибольшее количество заболевших бешенством животных (60,8% от числа заболевших с.-х. животных). В динамике периода анализа выражены 3 пика заболеваемости: 2002 г. (1127 гол.), 2005 г. (1033 гол.) и 2007 г. (1092 гол.), что в 2,6-2,8 раза выше среднегодового показателя. Рост количества неблагополучных пунктов и заболевших животных отчетливо проявлялся до 2004 г. с дальнейшей динамикой снижения, связанной с общим уменьшением поголовья.

Заболеваемость крупного рогатого скота является индикатором природного бешенства только в теплое время года и наиболее интенсивно вовлекается в эпизоотический процесс в пик осеннего подъема эпизоотии, провоцируемого миграцией лисят. В зимний период животные находятся преимущественно в помещениях, и сезонный всплеск эпизоотии, фиксируемый в период гона лисиц, их почти не затрагивает.

Установлена тесная корреляционная прямая взаимосвязь в динамике количества заболевшего бешенством крупного рогатого скота и диких зверей ( $r=0,74$ ).

Мелкий рогатый скот. Динамика неблагополучных пунктов характеризуется тенденцией роста на протяжении всего периода и нарастающим повышением числа заболевших животных с 2007 г. Всплески заболевшего бешенством мелкого рогатого скота, превышающие среднегодовой показатель, регистрировали в 1991 г. – 486 гол. и в 2007 г. – 226 гол. В первом учетном периоде корреляционная связь заболеваемости с дикими зверями характеризуется как слабая ( $r=0,29$ ), но во втором она приобрела выраженную сильную связь ( $r=0,86$ ).

Свины. Несмотря на общую большую численность свиней в структуре животноводства РФ, эпизоотическая ситуация по бешенству не напряжённая. Общая тенденция динамики эпизоотического процесса носит дугообразный трендовый характер с повышением уровня неблагополучных пунктов и заболевших животных в период 1991-2004 гг. и снижением в последующий учетный период в связи с сокращением личных подсобных хозяйств.

Установлено, что если в 1991-2004 гг. проявлялась тесная коррелятивная взаимосвязь заболевших бешенством свиней и диких плотоядных ( $r = 0,89$ ), то в последующий период она выражена слабее и характеризовалась как средняя ( $r = 0,59$ ). Данное обстоятельство объясняется снижением поголовья свиней в подворьях владельцев. Заражение свиней вирусом бешенства в основном происходит в сельской местности в крестьянско-фермерских хозяйствах и личных подворий граждан, где контакт с больными бешенством плотоядными животными наиболее вероятен.

Лошади. В динамике за 25 лет анализа показатели проявления эпизоотического процесса бешенства среди лошадей на территории РФ сглажены. Корреляционная взаимосвязь заболеваемости лошадей и диких плотоядных животных выражена слабо. Заражение в основном происходит при круглогодичном содержании лошадей на пастбищах (тебеневка), традиционно практикуемого в коневодстве Республики Саха

(Якутия), Республики Алтай, Республики Тыва и других регионах, что повышает вероятность контакта с больными бешенством дикими плотоядными животными во все сезоны года.

Олени. Эта группа восприимчивых к бешенству животных семейства оленьих в РФ представлена одомашненными северными оленями, разводимыми на Крайнем Севере, Заполярье, Сибири и Дальнем Востоке, а также маралами и пятнистыми оленями (Республика Алтай, Алтайский край, Дальний Восток). Данные о случаях бешенства среди диких северных оленей отсутствуют, так как эпизоотологический мониторинг практически неосуществим, хотя, по всей очевидности, эта группа животных также включена в эпизоотический процесс ввиду многочисленности и широкого ареала распространения. Эпизоотический процесс протекает по типу арктического или тундрового бешенства. Основным источником заражения является песец обыкновенный. Примечательна эмерджентная «архивспышка» бешенства среди северных оленей в 1991-1992 гг. (объявлено 15 неблагополучных пунктов, пало 4243 гол.). Крупные эмерджентные вспышки эпизоотии бешенства среди северных оленей регистрировали позднее в 2003, 2008 и 2011 гг.

Верблюды. Ввиду малочисленности поголовья, сосредоточенного в основном в Астраханской области (70%), Республике Калмыкия, Республике Татарстан, Республике Алтай и Республике Тыва, определяющих основной нозоареал инфекции, бешенство регистрируется спорадически лишь в отдельные годы, однако со сравнительно высоким показателем заболеваемости 1,9 гол. в расчете на 10 тыс. поголовья.

***Плотоядные животные.*** В эпизоотический процесс вовлечено 3 основных группы плотоядных животных, учитываемых в официальной статистике – собаки, кошки и дикие звери, обуславливающие перманентность эпизоотического процесса бешенства на территории РФ. В последние годы резко обострилась проблема безнадзорности домашних животных и, как следствие этого, возростала заболеваемость бешенством собак, и особенно кошек. Домашние плотоядные животные в условиях страны преимущественно выступают в роли жертвы природных эпизоотий, но легко встраиваются в эпизоотическую цепь и несут высокую эпидемиологическую опасность в связи с их близостью к человеку. На высоком уровне остается показатель количества людей укушенных, оцарапанных и с ослюнениями плотоядными животными (дикими и домашними), составивший в 2014 г. 366 тыс. случаев, и возросший в 2015 г. до

392,2 тыс., или на 7,2%.

Собаки. Наиболее распространенный вид восприимчивых к бешенству непродуктивных домашних животных во всех регионах РФ. Динамические изменения характеризуются постоянным нарастанием, как числа неблагополучных очагов, так и заболевших животных. Лишь в последние 3 года эти показатели сравнительно стабилизировались. Прослеживается тесная корреляция заболеваемости бешенством собак и диких зверей.

Кошки. При сравнительно низких показателях количества эпизоотических очагов и заболевших, в динамике неблагополучия просматриваются те же эпизоотические особенности, что и по собакам, в том числе высокая корреляция количества неблагополучных пунктов и заболевших животных с аналогичными показателями среди диких зверей.

Дикие звери. Являются основным резервуаром и источником распространения вируса бешенства на территории РФ. В основном это плотоядные животные семейства псовых – лисицы, волки, енотовидные собаки, песцы. Енотовидная собака, несмотря на широкое распространение в ареалах обитания, не относится к облигатно плотоядным, не является дополнительным хозяином и резервуаром природно-очагового бешенства, что подтверждено нами методами дескриптивной и количественной эпизоотологии.

Ареал обитания диких плотоядных, особенно лисиц, настолько обширен, что делает трудноосуществимой задачу проведения тотального мониторинга распространённости природного бешенства в масштабе всей территории страны.

Видовой состав животных, вовлеченных в эпизоотический процесс бешенства, постоянно расширяется. Среди плотоядных животных, кроме лисицы, волка, енотовидной собаки и песца как потенциально наиболее значимых источников вируса, бешенство зарегистрировано у барсуков, куниц, корсаков, рысей, серых крыс, шакалов, норок, бобров, ондатр, летучих мышей; среди копытных – у сибирских косуль, маралов, пятнистых оленей, лосей и кабанов.

**Автокорреляционный анализ** показал высокую идентичность эпизоотического процесса у собак, кошек и диких зверей как по показателям динамики неблагополучных пунктов, так и заболевших бешенством, что свидетельствует об одном-двух общих для этих видов животных факторов, определяющих основные механизмы и пути

передачи вируса в природных условиях.

**Современная эпизоотическая ситуация бешенства в Российской Федерации (2015 г.).** Эпизоотия бешенства в 2015 г. характеризуется распространением в 65 субъектах (76,5%) всех 9 федеральных округов РФ с превалированием количества заболевших животных всех видов в Центральном и Приволжском федеральных округах (таблица 2). В эпизоотический процесс было вовлечено свыше 4,1 тыс. животных, из которых 48% приходится на диких, 37,9% – на домашних плотоядных (собаки и кошки) и 14,1% – на сельскохозяйственных. Наибольшее число заболевших бешенством животных зарегистрировано в Московской области (399 гол.), Республике Татарстан (317 гол.), Липецкой (232 гол.), Саратовской (172 гол.), Белгородской и Ярославской областях (по 153 гол.). В 9 регионах число заболевших животных превышало 100 гол.

**Таблица 2 – Случаи заболеваемости бешенством животных по федеральным округам РФ (2015 г.)**

Федеральный округ	Случаи бешенства, всего	Плотоядные животные		Сельскохозяйственные	Субъекты РФ, всего	Распространенность	
		дикие	домашние			субъекты РФ	%
Центральный	1946	1017	776	153	18	18	100,0
Приволжский	1362	605	550	207	14	14	100,0
Уральский	244	172	48	24	6	5	83,3
Сибирский	200	87	37	76	12	8	66,7
Южный	169	45	85	39	6	5	83,3
Северо-Кавказский	97	15	47	35	7	6	86,7
Северо-Западный	82	27	7	48	11	5	45,5
Крымский	8	4	4	–	2	1	50,0
Дальневосточный	6	3	3	–	9	3	33,3
Всего	4114	1975	1557	582	85	65	76,5

В 2015 г. произошел рост заболеваемости бешенством во всех федеральных округах, составивший 1807 всех видов животных или 78,4%.

Таким образом, эпизоотическая ситуация по бешенству в России характеризуется как стабильно напряженная. Учитывая ареал распространения болезни, охватывающего большую часть территории страны, можно констатировать отсутствие реальной возможности полного искоренения эпизоотии в ближайшей и средне отдаленной перспективе.

В сложившихся условиях оптимальным направлением противоэпизоотических мероприятий является проведение ежегодной антирабической вакцинации домашних плотоядных животных при одновременной жесткой регуляции численности безнадзорных животных. В программе оральной вакцинации диких плотоядных против бешенства более рациональным будет переход к созданию зональной иммунной защиты вокруг крупных населенных пунктов для уменьшения эпидемиологического риска. В дальнейшем эти зоны можно будет расширить, переходя к стратегии постепенного «выдавливания».

**Экономический ущерб, причиняемый бешенством сельскохозяйственных животных в Российской Федерации.** Расчеты показали, что экономический ущерб, причиняемый бешенством, как один из показателей проявления эпизоотического процесса, за 1991-2015 гг. составил в РФ в современных ценах 657 млн. руб. (таблица 3) с превалированием потерь от падежа крупного рогатого скота (86,7%).

**Таблица 3 – Экономический ущерб, причиненный бешенством сельскохозяйственных животных в РФ, млн. руб. (1991-2015 гг.)**

Вид животных	Пало и уничтожено, гол.	Сумма ущерба, млн. руб.			
		потеря мяса	утилизация трупов	всего	на 1 павшее животное, руб.
Крупный рогатый скот	14209	432,83	136,41	569,24	40062
Мелкий рогатый скот	2605	3,43	1,41	4,84	1858
Свиньи	192	1,58	0,50	2,08	10777
Лошади	802	18,76	8,30	27,06	33740
Олени	5507	38,35	11,23	49,58	9003
Верблюды	35	2,98	0,60	3,58	102286
Всего	23351	497,93	158,85	656,78	28126

Установленные коэффициенты ущерба в расчете на одно заболевшее животное позволяют проводить расчеты по любой неблагополучной по бешенству административной территории.

***Региональные особенности эпизоотического процесса бешенства.***

***Республика Татарстан.*** В настоящий период (и ранее) регион является наиболее неблагополучным по количеству случаев бешенства среди животных (второе место после Московской области). Инфекция распространена повсеместно с вовлечением в эпизоотический процесс в последние годы (2013-2014) всех сорока административ-

ных сельских районов. В общей структуре отмечается высокая заболеваемость диких плотоядных – 60% (в РФ – 48%).

Мониторинг с использованием ГИС выявил сезонные изменения вектора распространения эпизоотии бешенства на территории региона. Так, в первом квартале 2013 г. вспышки, главным образом, регистрировали в юго-восточной и северной частях республики. В дальнейшем наблюдали распределение вспышек бешенства по всей территории с постепенным угасанием, а к 1-2 кварталу 2014 г. заметное снижение количества неблагополучных пунктов. Однако уже в 3-м квартале 2014 г. вновь регистрировали рост вспышек эпизоотии. При этом в направлении с Северо-Запада волна заболевания охватила большинство районов. В 1 квартале 2015 г. волна эпизоотии бешенства сместилась на юг. Такие подъёмы и спады, по-видимому, связаны с цикличностью эпизоотического процесса бешенства и вымиранием части популяции диких плотоядных.

Калининградская область. В регионе, ранее стационарно неблагополучном, в результате планомерной и целенаправленной работы бешенство среди животных и населения с 2013 г. не регистрируется.

Так, был разработан и реализован при нашем участии совместный «Межведомственный план мероприятий по профилактике бешенства людей и животных в Калининградской области на 2006-2010 гг.», предусматривающий проведение противоэпизоотических и противоэпидемических мероприятий по ликвидации очагов бешенства. В соответствии с этим планом Территориальные управления Роспотребнадзора и Россельхознадзора по Калининградской области, а также ветеринарная служба региона проводят ежегодные совещания по профилактике бешенства среди животных и предупреждению заболевания у людей, эпидемиологическое расследование случаев укусов людей животными. Налажена лабораторная диагностика бешенства.

На территориях неблагополучия по бешенству организована профилактическая вакцинация поголовья всех видов сельскохозяйственных животных, охотничьих, служебных и хозяйственных собак, а также оральная иммунизация диких плотоядных. В городах и других населенных пунктах региона специализированными бригадами проводится отлов бродячих собак и кошек.

Агентство по охране и воспроизводству животного мира по Калининградской области постоянно регулирует численность диких плотоядных. Так, в 2008-2010 гг. в

лесных угодьях было отстреляно 3685 лисиц, 630 енотовидных собак, 1540 куниц и 283 барсука. Ветеринарная служба региона и приграничных городов осуществляет взаимодействие с сопредельными государствами (Польша, Литва) по гармонизации профилактики бешенства среди животных.

*Трансграничные территории.* В эпизоотологическом плане интерес представляет эпизоотологический мониторинг бешенства на трансграничных с РФ территориях, имеющих сходные природно-климатические условия и фауну, в том числе по диким плотоядным животным, как основных источников вируса бешенства в природе. Классическим примером в этом отношении является Западно-Казахстанская область Республики Казахстан, граничащая с Оренбургской, Астраханской, Волгоградской, Саратовской и Самарской областями с общей протяженностью границ 2423 км.

В эпизоотологическом мониторинге бешенства с 2000 г. на исследуемой территории, при общей высокой напряженности и повсеместном распространении, установлен высокий уровень заболеваемости сельскохозяйственных животных – 56%, особенно крупного рогатого скота (49%), превышающий показатели сопредельных территорий РФ в 2-3 раза. Доля диких плотоядных (лисицы, волки, корсаки) в общей структуре заболеваемости составляет 20% (в РФ – 48%). Указанные особенности, по всей видимости, связаны с недостаточным мониторингом заболеваемости диких животных.

В течение периода анализа (с 2000 г.) наблюдается расширение ареала бешенства, сохраняющего выраженный природный характер. Бешенство животных ежегодно регистрируется во всех сельских районах и городах региона.

*Случаи гидрофобии в эпизоотологии и эпидемиологии бешенства.* Два уникальных случая гидрофобии у человека, зарегистрированных в Республике Татарстан, классическим образом раскрывают тесную взаимосвязь инфекционного процесса с эпизоотологическими и эпидемиологическими показателями бешенства. В первом случае больная Б. пострадала от множественных ран и укусов волка, во втором больной, находясь на о. Гоа (Индия), был укушен бродячей собакой. Оба случая закончились летальным исходом.

В комплексе диагностических тестов, в том числе разработанных нами (световая микроскопия мазков при окраске по Селлерсу, прямой метод флюоресцирующих антител, сэндвич-вариант ИФА и непрямой метод ИФА) в биоматериале, предоставлен-

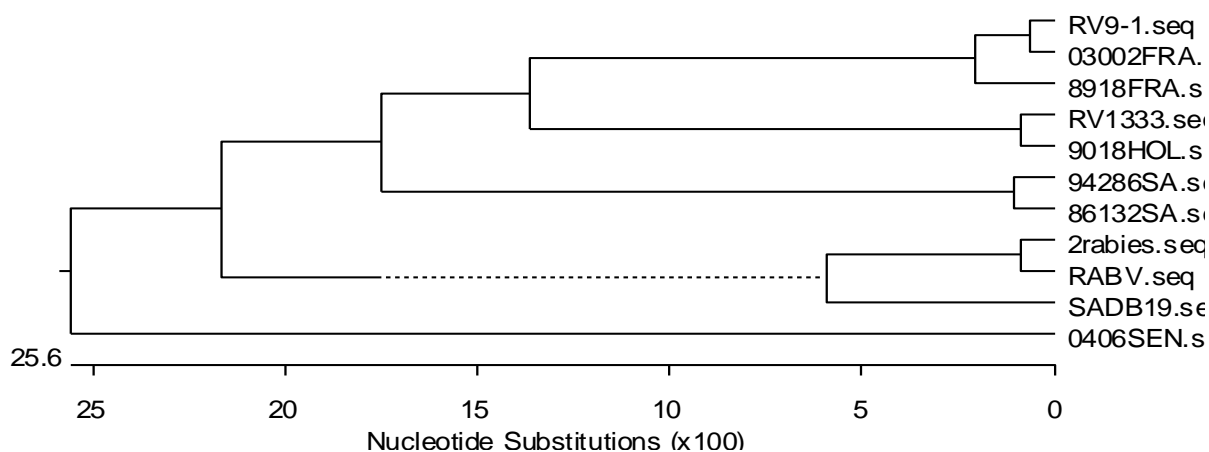


ном медицинскими работниками (слюна, слезная жидкость, отпечатки с роговицы глаз, различные отделы головного мозга и слюнные железы), диагноз гидрофобии был подтвержден. Проведен филогенетический анализ изолята вируса бешенства (индийский вариант).

**Филогенетический анализ геномов полевых изолятов вируса бешенства.** Филогенетический анализ геномов лиссавирусов, в значительной мере дополняет эпизоотическую и эпидемическую характеристику полевых изолятов возбудителя в различных регионах и дает возможность мониторинга их молекулярной структуры в процессе распространения заболевания (Глушков А.А., Луговцева В.Ю., 2004; Львов Д.К. и др., 2008; Хисматуллина Н.А. и др., 2012; Zaberezhny A.D., 1999).

Нами изучены и определены молекулярно-генетические характеристики полевых изолятов вируса бешенства, выделенных на территории РФ и в Республике Таджикистан от различных видов животных и человека, а также их сравнительный анализ с референтными штаммами, представленными в Национальном Центре Биотехнологической Информации (NCBI). В анализе использовали метод гнездовой ПЦР, совмещенный с обратной транскрипцией ПЦР (ОТ-ПЦР). ОТ-ПЦР проводили с помощью реагентов ThermoFisher, США.

На основе нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов генов гликопротеина G и N вируса бешенства были построены филогенетические дендрограммы и проведен филогенетический анализ последовательностей нуклеотидов в сравнении с изолятами вируса из других регионов и с референтными штаммами, представленными в базе данных NCBI. Филогенетический анализ изолята лиссавируса, выделенного от человека, представлен на рисунке 4.



**Рис. 4 – Филогенетический анализ изолята (2 rabies), выделенного от человека, укушенного бродячей собакой на о. Гоа (Индия)**

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности в геноме изолятов вируса бешенства, выделенных на территории Республики Татарстан, идентичны, и на 8% отличаются от референтных штаммов, а геном вируса, изолированного от человека, укушенного собакой в Индии, филогенетически близок к Пастеровскому штамму. Полевые изоляты вируса бешенства из Таджикистана образуют отдельный кластер и филогенетически близки к украинским, бурятским и иранскому 8681IRA штаммам, а изолят от волка филогенетически близок к рабдовирусам из Китая, Ирана и Украины.

Изоляты лиссавируса из Кировской области по аминокислотному составу фрагмента гена N идентичны RABV 8622IRA и близки к изолятам из Бурятии, Брянска, Липецка и Украины. Кроме того на основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов N и G полевых изолятов из Кировской области и вакцинного штамма вируса ERAG333 не обнаружено циркулирующих ревертантных изолятов данного вакцинного штамма. Ранее отсутствие реверсии у вакцинного штамма RV-97 было установлено Метлиным А.Е. (2008).

**Методика расчета потребности биопрепаратов для специфической профилактики бешенства животных.** На основе нормативов профилактических и вынужденных годовых обработок, зоотехнической структуры стада и потерь биопрепаратов при транспортировке и в процессе обработок, разработана методика определения коэффициентов головообработок, позволяющая научно-обоснованно планировать и оптимизировать расход вакцин на иммунизацию разных видов животных против бешенства. Так, для вынужденной вакцинации крупного рогатого скота на одну голову требуется 3,54 дозы вакцины, мелкого рогатого скота – 3,54 дозы, для профилактической иммунизации пушных зверей и собак необходимо планирование расхода вакцины в количестве 1,15 доз, кошек – 0,56. Умножением планируемого восприимчивого к бешенству поголовья по видам животных на коэффициенты головообработок устанавливается общий расход вакцин.

### **Контроль уровня антирабических антител у вакцинированных животных**

***Тест-система на основе гликопротеина вируса бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ) для непрямого иммуноферментного анализа (ИФА).*** Цельновирионный антиген получали культивированием вируса бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ) в культуре клеток НГУК-1 с очисткой и концентрированием ультрацентрифугировани-

ем. Специфичность антигена была подтверждена иммуноблотингом. Активность в ИФА 1:2560,  $K_{сп}=2,1$ , концентрация белка 338 мкг/мл.

Установлена высокая специфичность разработанной тест-системы для определения уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках крови иммунизированных крупного рогатого скота, овец, собак и лисиц. Результаты теста коррелируют с данными реакции нейтрализации в биопробе на белых мышах, однако, по экспрессности превосходят ее.

**Тест-система на основе блок-иммуноферментного анализа (блок-ИФА).** Тест разработан на основе принципа конкуренции сывороточных антител с антителами, мечеными пероксидазой, за связывание с антигеном абсорбированном на твердой фазе. В анализе использовали антирабический глобулин и антирабический пероксидазный конъюгат, входящие в стандартный «Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом ИФА» (Россельхознадзор, 2008); в качестве специфического антигена – гликопротеин вируса бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ и стандартный штамм CVS).

Титры антител в сыворотках крови разных видов животных, иммунизированных против бешенства, и контрольной референс-сыворотки (ВГНКИ) варьируют в блок-ИФА от 1:20 до 1:6400 ( $K_{инт} \geq 2,1$  в разведении 1:10) при отрицательной реакции с гетерологичными сыворотками, что свидетельствует о высокой специфичности разработанного теста. Установлена прямая корреляция результатов блок-ИФА и реакции нейтрализации на белых мышах ( $r = 0,9$ ). Вместе с тем, по чувствительности и скорости получения результатов ИФА (7-8 час.) значительно превосходит РН на мышах (14 сут.). Разработанный тест (блок-ИФА) является универсальным для определения антирабических антител в сыворотках крови, так как не требуются антивидовые пероксидазные конъюгаты к каждому виду животных.

**Результаты испытания тестов для контроля эффективности вакцинации против бешенства разных видов животных.** Разработанные тест-системы для определения уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках крови различных видов животных, вакцинированных против бешенства, апробированы при проведении серологического контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства крупного рогатого скота, собак и лисиц в неблагополучных хозяйствах и лесных угодьях ряда регионов страны. Установлено, что специфические к вирусу бешенства антитела в

сыворотках крови крупного рогатого скота (77 проб) через 3, 6 и 9 мес. после иммунизации антирабической инактивированной жидкой культуральной вакциной из штамма «Щелково-51» Рабиков, проявляются в титрах от 1:400 до 1:6400 при коэффициенте специфичности 2,1 и более, что соответствует активности 10-20 МЕ/мл и более. Положительная контрольная сыворотка (референс-сыворотка ВГНКИ, серия НСА-03 с активностью 20 МЕ/мл) показала в ИФА титр 1:800.

Как известно, защитный от бешенства титр антител составляет 0,5 МЕ/мл. Следовательно, установленный нами уровень антител в сыворотке крови обеспечивает защиту крупного рогатого скота от заболевания бешенством.

В экспериментах с сыворотками крови служебных собак, иммунизированных культуральной антирабической инактивированной вакциной «Рабикан» из штамма «Щелково-51», установлен высокий уровень специфических антител к вирусу бешенства через 3-11 мес. после вакцинации, составляющий от 1:320 до 1:1280 в непрямом ИФА и от 1:10 до 1:160 в блок-ИФА, что соответствует активности 1,25-20 МЕ/мл.

Скрининговая оценка проб глазной жидкости лисиц, добытых на территориях, где проводилась оральная вакцинация, на наличие антирабических антител методом блок-ИФА показала высокий титр антител в 59% пробах, совпадающий с результатами обнаружения маркера-тетрациклина в зубах и костной ткани.

Кроме того, установлено, что в динамике иммуногенеза уровень антител в пробах сывороток крови крупного рогатого скота и собак через 12 мес. после вакцинации также обеспечивает защиту животных от бешенства.

### **Усовершенствование методов лабораторной диагностики бешенства**

*Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1).* Имеются данные о применении перевиваемой культуры клеток НГУК-1 для индикации вируса бешенства (Селимов М.А., 1978; Авцын А.П. и др., 1985; Татаров А.Г. и др., 1987; Хисматуллина и др., 1989, 2010; Юсупов Р.Х. и др., 1989; Wiktor T., Korprowski H., 1978), однако тест рассматривается как контрольный, подтверждающий результаты МФА и дополняющий биопробу на белых мышцах (Smith A., 1978; Portnoi D. et al., 1982).

Для заражения клеток НГУК-1 использовали 554 изолята вируса бешенства, выделенных из проб мозга, поступивших из различных учреждений страны от диких,

сельскохозяйственных и непродуктивных домашних животных, а также людей, умерших от бешенства. Изоляты регистрировали в коллекции лаборатории профилактики бешенства и природной очаговости вирусных зоонозов ИПВЭ РАМН им. М.П. Чумакова.

Анализ клеток на наличие антигена вируса бешенства проводили прямым МФА каждые 24 часа в течение 5-6 суток. В качестве положительных контролей использовали препараты клеток, зараженных стандартным вирусом бешенства (штамм CVS или производственный штамм «Овечий», ГНКИ). Отрицательным контролем служили препараты клеток, обработанные 10% суспензией мозга интактных белых мышей.

Пробу считали положительной при отчетливо выраженной, достаточно яркой желто-зеленой люминесценции, при отсутствии таковой в контрольных отрицательных препаратах. В цитоплазме клеток НГУК-1, зараженных вирусосодержащим материалом, обнаруживали желтовато-зеленые, яркосветящиеся комплексы, расположенные преимущественно в перинуклеарной зоне. Вирусный антиген в зараженных клетках обнаруживали по МФА через 24-48 час. Максимальное накопление уличного вируса бешенства наблюдали на третий день после заражения. Положительный ответ в этот срок исследований получен в 100% случаев. Специфичность результатов подтверждена интрацеребральным заражением белых мышей культуральной жидкостью.

Сравнительное испытание показало полное совпадение результатов биопробы на белых мышках и на линии клеток НГУК-1, однако в клетках невриномы крысы рабический вирус может быть выделен в течение до трех суток, а в биопробе – на 7-34. Метод включен в Межгосударственный стандарт – ГОСТ 26075-2013. «Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства».

***Синтетические олигонуклеотидные праймеры к гену гликопротеина и способ выявления РНК вируса бешенства в обратнo-транскриптной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).*** Разработан способ индикации возбудителя бешенства в биоматериале от животных в ПЦР с использованием электрофоретической детекции результатов. В процессе исследований (таблица 5) разработаны специфические нуклеотидные последовательности олигонуклеотидных наружных и внутренних праймеров для детекции РНК вируса бешенства методом гнездовой ОТ-ПЦР в двухраундовой амплификации.

Праймеры конструировали на основе сравнительного анализа нуклеотидных по-

следовательностей различных штаммов лиссавирусов, депонированных в международной базе данных GeneBank. Были сконструированы и синтезированы олигонуклеотидные праймеры на участок гена гликопротеина вируса бешенства.

Окончательный выбор праймеров основывали на критериях высокого индекса сходства фрагмента и РНК различных штаммов вируса бешенства, высокой температуры отжига (G-C-метод) и большой длины консервативных участков. Праймеры фланкируют консервативный участок гена гликопротеина вируса бешенства, который не имеет палиндромных повторов нуклеотидов и не образует выраженных вторичных структур, а также не имеет протяженных G-C. Для обеих пар праймеров расчетная температура отжига была близкой и составила 58°C.

Таким образом, были выбраны специфичные для вируса бешенства синтетические олигонуклеотидные праймеры, комплементарные консервативной области генома вируса бешенства района гена гликопротеина.

**Таблица 5 – Нуклеотидные последовательности олигонуклеотидных праймеров для детекции РНК вируса бешенства методом гнездовой ОТ-ПЦР**

Название	Позиция	Ген	Последовательность (5'-3')
<i>Наружные праймеры для первого раунда амплификации</i>			
fp_850_gp_rabv	4072-4096	G	TTAGACTTATGGATGGAACATGGGT
rp_850_gp_rabv	4805-4826	G	AGTGACTGACACCTCCCTCCCT
<i>Внутренние праймеры для второго раунда амплификации</i>			
fp_350_gp_rabv	4167-4189	G	TCAGACGAAATTGAGCACCTTGT
rp_350_gp_rabv	4404-4425	G	ACCTCCCCCAACTCTTAAACA

Опыты по определению специфичности двухраундовой гнездовой ОТ-ПЦР с использованием внешних и внутренних праймеров к гену гликопротеина вируса бешенства, проводимые на полевых изолятах вируса бешенства, стандартном вирусе бешенства CVS, производственном штамме «Овечий» ГНКИ и вакцинных штаммах («Внуково-32», «Щелково-51» и ERA 0/333), показали положительный результат. В то же время реакции не проявлялись с отрицательными контролями – нуклеиновыми кислотами из мозговой ткани здоровых животных (лисицы, кошки, собаки, овцы и кролика), а также гетерологичными контролями – нуклеиновыми кислотами различных микроорганизмов (*E.coli*, *M. bovis*, *M. avium*, *B. anthracis*, *Br. abortus*, *St. aureus*) что свидетельствует о специфичности гнездовой ОТ-ПЦР.

Диагностическое испытание праймеров проводили с использованием изолятов вируса бешенства от различных видов диких плотоядных, домашних животных и

больных людей Установлено, что применение разработанных праймеров для индикации РНК вируса бешенства в гнездовой ОТ-ПЦР в биоматериале обеспечивает синтез фрагментов ДНК рассчитанных размеров (внешнего 755 н.п.) и (внутреннего 259 н.п.). Преимущества разработанного метода перед классической биопробой на белых мышах также состоят в значительном сокращении срока диагностики (до 6 час.), отсутствии необходимости дополнительного подтверждения в других тестах, снижения себестоимости диагностики в 9,8 раза, трудозатрат – в 40 раз.

***Гематологические показатели и иммунный статус плотоядных животных, вакцинированных против бешенства разными вакцинами.***

Собаки. Для профилактики бешенства у собак используют отечественные и зарубежные вакцины «Рабикан» (ФГУП «Щелковский биокомбинат»), «Мультикан» (ЗАО «НПО Нарвак»), «Дипентавак» (ЗАО «Ветзвероцентр»), «Дефенсор» («Пфайзер», США), «Нобивак-Рабиес» («Интервет Интернэшнл», Нидерланды). В этой связи изучение иммунного статуса организма собак в различные сроки после вакцинации, представляло научно-практический интерес. Гематологические и иммунологические показатели крови собак изучали в различные сроки после вакцинации.

Установлено, что вакцинация оказывает стимулирующее действие на гематологические и иммунологические показатели. Через 1 мес. после иммунизации вакциной «Рабикан» количество лейкоцитов в крови превышало показатели интактных животных на 17%, увеличилось содержание Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, В-лимфоцитов на 24,7 и 20,2%, соответственно. Уровень фагоцитарной активности нейтрофилов (ФАН) и фагоцитарного индекса (ФИ) увеличился на 21,1 и 6,5% соответственно.

Через 3 мес. после вакцинации отмечено значительное повышение количества лейкоцитов (на 80%), лимфоцитов (на 12,3%). Содержание иммунокомпетентных клеток – Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, В-лимфоцитов возросло в среднем на 76,8 и 50%, показатели фагоцитоза – на 65,8%. Через 6 мес. после вакцинации отмечено повышенное содержание лейкоцитов (на 32%), иммунокомпетентных клеток (на 19,7 и 70%) и ФАН (на 32,8%). Через 9 и 10 мес. после вакцинации содержание лейкоцитов, лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, В-лимфоцитов, показатели ФАН и ФИ восстанавливались.

При гематологическом и иммунологическом исследовании крови собак через две

недели после иммунизации вакциной «Мультикан-8» установлено увеличение числа лейкоцитов, лимфоцитов, иммунокомпетентных клеток и ФАН (фагоцитарная активность нейтрофилов). Через 9 и 10 мес. после вакцинации значительных отклонений в содержании лейкоцитов и лимфоцитов, ФАН и ФИ не отмечено, тогда как количество Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток было выше нормы на 25,3 и 29,9%, В-лимфоцитов – на 23,8 и 23,2% соответственно.

Через 6 мес. после иммунизации вакциной «Дипентавак» установлено повышенное содержание по сравнению с нормой лейкоцитов (на 25,3%), лимфоцитов (на 11,2%), Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, В-лимфоцитов, соответственно, на 35,5 и 79,7%, ФАН – на 23,7%. Через 10 мес. после иммунизации собак вакциной «Дефенсор» отклонений гематологических показателей от нормы не отмечено.

Значительные изменения наблюдали при иммунизации собак вакциной «Нобивак-Рабиес». Так, через 3 мес. после вакцинации количество лейкоцитов и лимфоцитов повысилось на 76,9 и 16,2%, иммунокомпетентных клеток – на 67,9 и 51,2%, ФАН и ФИ – на 42,3 и 69,2% соответственно.

Таким образом, антирабическая вакцинация собак активизирует специфические, клеточные и гуморальные факторы защиты организма.

Лисицы. Иммунизация лисиц клеточного содержания вакциной «Рабикан» способствует увеличению содержания в крови лейкоцитов и лимфоцитов, соответственно на 28,4% и 4,3% в сравнении с показателями контрольных не вакцинированных животных. Установлено также повышение Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, В-лимфоцитов на 25,7 и 59,9% соответственно, а также высокий уровень показателей неспецифической резистентности – ФАН и ФИ (выше нормы на 19,2 и 14,2%). Отмечено увеличение числа Т-хелперов и ФАН и ФИ при уменьшении количества цитотоксических Т-клеток.

Выявлен высокий уровень специфических антител к вирусу бешенства в сыворотках крови собак через 21 и 51 сутки после иммунизации вакцинами, зарегистрированными для применения на территории России.

### **Разработка средств специфической профилактики бешенства**

***Препарат против бешенства для обработки ран при укусах человека плотоядными животными.*** Высокая обращаемость населения за медицинской помощью



при укусах животными свидетельствует о чрезвычайной значимости первичной обработки ран, с последующим специфическим лечением, причем проблема продолжает нарастать (Мовсесянц А.А. с соавт., 2003; Черкасский Б.Л. с соавт., 2005).

Проведенный нами структурный анализ случаев гидрофобии (91 чел.) показал, что укусы наиболее часто наносят больные бешенством собаки, кошки – 64,1% и дикие животные (лисица, волк, енотовидная собака и др.) – 33,7%.

Препарат конструировали на основе эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens* в 1%-ном водном растворе хлорида натрия в комбинации с водно-солевым раствором (45-50%) «Гемодеза-Н» и 0,125-1,0%-ным раствором магния сульфата семиводного в соотношении 1:1:2 соответственно. Разработана технология приготовления препарата и в серии опытов с заражением 200 белых мышей культурой эпизоотического вируса бешенства (штамм «Соб-2580»), установлено его выраженное антирабическое действие. Препарат нетоксичен и прост в технологии приготовления.

**Вакцина против бешенства для оральной иммунизации диких плотоядных животных.** В качестве основных компонентов для конструирования вакцины использовали культуральную жидкость выращенных в перевиваемых монослойно-суспензионных сублиниях культур клеток почки новорожденного сирийского хомячка или почки сайги авирулентных штаммов вируса бешенства (PB-97 или ERA G333), а также пищевые, формообразующие компоненты (рыбная мука, говяжий жир, парафин или пищевой полимер, неочищенное зерно хлебных злаков) и маркер-тетрациклин.

Опыты на лисицах и песцах показали высокую иммунологическую эффективность (91%) и безвредность (пятикратные дозы не вызывали клинических изменений) вакцины. Препарат обладает стабильностью по вируссодержащему материалу (до 10 дней), механической прочностью, влагуостойчивостью, сроком хранения до 6 мес. (при температуре –20°C), пищевой привлекательностью и высокой поедаемостью в природных условиях. Сконструированная вакцина и способ ее приготовления имеют приоритет научной новизны (патент РФ).

### **Контроль эффективности оральной вакцинации против бешенства диких плотоядных животных**

Проведен широкомасштабный контроль эффективности оральной вакцинопрофилактики бешенства диких плотоядных в различных регионах России. Эффективность

изучали исследованием 2065 проб биоматериала от диких плотоядных (головной мозг, глазная жидкость, костная ткань), отстрелянных на территориях иммунизации Смоленской, Калининградской областей и Республики Татарстан. Пробы мозга исследовали в реакции иммунофлуоресценции (РИФ) и в ИФА. Уровень антител в глазной жидкости определяли в блок-ИФА по авторской методике и в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21/13 по стандартной методике МЭБ (2004).

Установлено, что поедаемость лисицами приманок с оральными вакцинами при ручной раскладке колеблется в пределах 29,9-61%, енотовидными собаками – 28,5-40%. При использовании малой авиации поедаемость повышается до 65-70%. Эффективность оральных вакцин варьировала от 59,4 до 79,8 у лисиц и 40-50% у енотовидных собак.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В эпизоотологическом мониторинге на основе ГИС-технологии изучены современные особенности эпизоотического процесса бешенства животных на территории РФ. В результате теоретического обоснования и экспериментальных исследований разработаны и усовершенствованы иммунологические методы диагностики и контроля эффективности иммунизации животных против бешенства, а также средства специфической профилактики, на основе чего сформулированы выводы и предложения для практического использования.

## **Выводы**

1. На основе программного обеспечения ArcGIS (ESRI, США) разработана геоинформационная система (ГИС) эпизоотологического мониторинга бешенства в РФ, состоящая из пространственной модели исследуемой территории в виде набора цифровых административно-географических карт, банка данных первичных эпизоотологических и эпидемиологических показателей и программного приложения для хранения, обработки и визуализации данных.

Создан электронный кадастр случаев заболевания животных бешенством, построенный на платформе реляционной базы данных MS Access®. Данные кадастра привязаны к атрибутивной таблице цифровой карты РФ, что позволяет визуализировать данные через построение нозологических карт.

2. Эпизоотическая ситуация по бешенству животных на территории Российской Федерации в мониторинге с 1991 по 2015 год характеризуется природной очагово-

стью с ареалом распространения на большей части страны и является стабильно напряженной. Эвентуальность эпизоотического процесса связана со скачкообразностью заболеваемости и количества неблагополучных пунктов. В структуре общей заболеваемости с 2004 г. увеличилась доля диких плотоядных, крупного и мелкого рогатого скота, собак и кошек, что коррелирует с заболеваемостью диких плотоядных животных.

3. В эпизоотологии бешенства на территории РФ енотовидная собака, несмотря на широкое распространение в ареалах обитания, не относится к облигатно плотоядным, не является дополнительным хозяином и резервуаром природно-очагового бешенства, что подтверждается методами дескриптивной и количественной эпизоотологии.

4. За 1991-2015 гг. от заболевания бешенством в России пало 23,4 тыс. голов сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, свиньи, лошади, олени, верблюды) с прямым экономическим ущербом в современных ценах в сумме 657 млн. руб. с превалированием потерь среди крупного рогатого скота (86,7%). Установленные коэффициенты ущерба в расчете на одно заболевшее животное позволяют проводить расчеты по любой неблагополучной по бешенству административной территории.

5. В современной эпизоотологии ареал бешенства животных распространяется на территории всех Федеральных округов России, с максимальной интенсивностью эпизоотического процесса в Центральном и Приволжском, на территорию которых приходится 80,4% всех заболевших животных, с наибольшей интенсивностью эпизоотического процесса в Республике Татарстан, Московской, Липецкой, Саратовской, Белгородской, Оренбургской, Ярославской областях. В структуре заболеваемости преобладают лисицы (37%), собаки (23%) и кошки (15%).

6. На основе нормативов профилактических и вынужденных годовых обработок, зоотехнической структуры стада и потерь биопрепаратов при транспортировке и в процессе обработок разработана методика определения коэффициентов головообработок, позволяющая научно-обоснованно планировать и оптимизировать расход вакцин на иммунизацию животных разных видов против бешенства.

7. Иммуноферментная тест-система (ИФА), разработанная с применением гликопротеина вируса бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ) и антивидовых пероксидазных конъюгатов, обеспечивает выявление специфических антител в сыворотках крови

вакцинированных собак, лисиц и сельскохозяйственных животных. Сравнительное испытание выявило прямую корреляцию ( $r=0,9$ ;  $P<0,05$ ) диагностической эффективности ИФА и реакции нейтрализации с преимуществом ИФА по чувствительности и экспрессности.

8. Иммуноферментная тест-система – блок-ИФА, разработанная на основе антирабического глобулина и пероксидазного конъюгата для определения специфических антител в сыворотках разных видов животных, вакцинированных против бешенства, показала соответствие с реакцией нейтрализации (88,6%) и преимущество блок-ИФА по чувствительности и экспрессности.

9. Метод диагностики бешенства в культуре клеток невриномы Гассерова у лагрысы (НГУК-1) достоверно выявляет уличный вирус в биологическом материале разных видов животных через 1-3 сут., вместо 7-10 сут. (иногда до 34) в биопробе на белых мышах при полном совпадении результатов.

10. Сравнением нуклеотидных последовательностей различных штаммов лисса-вирусов сконструированы синтетические оригинальные олигонуклеотидные праймеры к гену гликопротеина вируса бешенства и разработан способ выявления РНК рабического вируса в двухраундовой гнездовой обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции. В сравнении с биологической пробой на белых мышах (до 34 сут.) тест обеспечивает получение объективного результата в биологическом материале в течение 6 часов.

11. Сконструированный препарат против бешенства на основе эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens* и «Гемодеза-Н», для местной обработки ран при укусах человека и мест ослонения плотоядными животными, обладает выраженным антирабическим и дезинфицирующим действием, нетоксичен и прост в изготовлении.

12. Широкомасштабный контроль эффективности оральной вакцинопрофилактики бешенства диких плотоядных в различных регионах России (Смоленская, Калининградская области, Республика Татарстан) в комплексе диагностических тестов (реакция иммунофлуоресценции, ИФА, биопроба на белых мышах и в культуре клеток НГУК-1, реакция нейтрализации в культуре клеток ВНК-21/13) показал уровень сероконверсии в пробах мозга и глазной жидкости в пределах 59,4-79,8% у лисиц и 40-59% у енотовидных собак. Поедаемость приманок лисицами при ручной раскладке составляет 29,9-61%, енотовидными собаками – 28,5-40%, а при использовании ма-

лой авиации повышается до 70%.

13. Разработан способ приготовления и сконструирована вакцина для оральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства на основе авирулентного штамма вируса РВ-97 (или ERA G333) с использованием в качестве пищевых и формообразующих компонентов рыбной муки, говяжьего жира, парафина или пищевого полимера, неочищенного зерна хлебных злаков и маркера-тетрациклина. Вакцина механически и влагоустойчива, стабильна по активности вируса, безвредна, привлекательна для поедания и обладает высокой эффективностью.

### **Предложения для практики**

Результаты исследований использованы при разработке следующих нормативно-технических, информационных и методических документов, регламентирующих противоэпизоотические мероприятия при бешенстве животных, используются при чтении лекций на курсах повышения квалификации ветеринарных врачей по дисциплинам «Эпизоотология и инфекционные болезни животных» и «Вирусология»:

– Метод и методические рекомендации по индикации возбудителя бешенства из патологического материала в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1) (утв. ФГБУ «ФЦТРС-ВНИВИ», протокол № 29 от 12.11.2013, протокол № 11 от 19.12.2013);

– ГОСТ 26075-2013 (Межгосударственный стандарт). Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства (принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации, протокол № 57-П от 27.06.2013. Введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 01.01.2015);

– Обзоры и прогнозы эпизоотической ситуации по бешенству животных в Российской Федерации для информационной поддержки мероприятий по профилактике и борьбе с бешенством животных и человека;

– Ежеквартальные информационные Бюллетени Европейского центра ВОЗ «WHO Rabies Bulletin Europe»;

– Методические рекомендации по расчету годовой потребности в биопрепаратах для проведения профилактических и противоэпизоотических мероприятий в хозяйствах всех форм собственности (одобрены секцией «Инфекционная патология животных» отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии, протокол № 2 от

18.08.2005);

– Тест-система и Инструкция по применению иммуноферментной тест-системы для определения уровня антирабических антител в сыворотках крови животных, вакцинированных против бешенства, методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) (утв. ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», протокол № 10 от 21.06.2010);

Тест-системы для определения уровня антирабических антител в сыворотках крови животных, вакцинированных против бешенства, методом блок иммуноферментного анализа (блок-ИФА) (утв. ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», протокол № 29 от 12.11.2013);

– Бешенство: этиология, эпизоотология, диагностика: Учебно-методическое пособие в иллюстрациях (М., 2015);

– Способ и методические указания по индикации возбудителя бешенства методом ОТ-ПЦР (утв. ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», протокол № 29 от 12.11.2013);

– Рекомендации по купированию первичных очагов и профилактика бешенства (Утв. ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 19.11.2014).

– Новосеквенированные последовательности геномов изолятов вируса бешенства (включены в Международную базу данных (GenBank) Национального центра биотехнологической информации (NCBI)).

### **Список работ, опубликованных по теме диссертации, в рецензируемых научных изданиях Перечня ВАК**

1. Макаров, В.В. Тенденции распространения бешенства в Восточной Европе / В.В. Макаров, О.И. Сухарев, **А.М. Гулюкин** [и др.] // Ветеринария. – 2008. – № 7. – С. 20-22.

2. Макаров, В.В. Бешенство в Восточной Европе: актуальный вектор развития эпизоотического процесса / В.В. Макаров, О.И. Сухарев, **А.М. Гулюкин** [и др.] // Вест.

Российской академии с.-х. наук. – 2008. – № 4. – С. 58-60.

3. Макаров, В.В. Бешенство енотовидных собак: Статистический анализ заболеваемости / В.В. Макаров, О.И. Сухарев, **А.М. Гулюкин** [и др.] // Ветеринария. – 2009. – № 6. – С. 20-25.

4. Хисматуллина, Н.А. Совершенствование мер борьбы с бешенством в Смо-

ленской области / Н.А. Хисматуллина, **А.М. Гулюкин**, С.Р. Кулакова [и др.] // Ветеринария. – 2011. – № 4. – С. 24-27.

5. **Гулюкин, А.М.** Иммуноферментная оценка эффективности вакцинопрофилактики бешенства / А.М. Гулюкин, Н.А. Хисматуллина, А.Л. Елаков [и др.] // Ветеринария и кормление. – 2012. – № 6. – С. 26-28.

6. Хисматуллина, Н.А. Контроль эффективности вакцинопрофилактики дикой фауны на территории Калининградской области / Н.А. Хисматуллина, Т.П. Петрова, **А.М. Гулюкин** [и др.] // Ветеринарный врач. – 2012. – № 6. – С. 8-11.

7. **Гулюкин, А.М.** Изучение иммунного статуса организма собак, вакцинированных против бешенства / А.М. Гулюкин, Н.А. Хисматуллина, А.З. Гафарова [и др.] // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2012. – Т. 2. – С. 52-56.

8. Хисматуллина, Н.А. 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. IX. – № 3. – С. 276-279.

9. **Гулюкин, А.М.** Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза / А.М. Гулюкин // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. 59. – № 3. – С. 5-10.

10. Иванов, А.В. Эпизоотическая ситуация и борьба с бешенством в Калининградской области / А.В. Иванов, Н.А. Хисматуллина, Т.В. Петрова, **А.М. Гулюкин** [и др.] // Ветеринария. – 2015. – № 4. – С. 9-13.

11. **Гулюкин, А.М.** Особенности эпизоотического процесса и молекулярно-генетическая характеристик изолятов вируса бешенства в Республике Татарстан / А.М. Гулюкин, А.А. Шабейкин, О.Н. Зайкова [и др.] // Ветеринарный врач. – 2015. – № 6. – С. 3-11.

12. Шабейкин, А.А. Анализ текущей эпизоотической ситуации по бешенству на территории Российской Федерации / А.А. Шабейкин, **А.М. Гулюкин**, П.Ю. Цареградский [и др.] // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2015. – № 4. – С. 5-7.

13. Herwijnen, R.V. Обзор эпизоотической ситуации бешенства, сложившейся в Российской Федерации в 2014 году / R.V. Herwijnen, А.А. Шабейкин, **А.М. Гулюкин**

[и др.] // Ветеринария и кормление. – 2015. – № 2. – С. 19-23.

14. Шабейкин, А.А. Анализ закономерностей эпизоотического процесса бешенства на территории европейской части Российской Федерации / А.А. Шабейкин, **А.М. Гулюкин**, А.В. Паршикова // Ветеринария и кормление. – 2015. – № 1. – С. 29-34.

15. Хисматуллина, Н.А. Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: Прижизненная и постмортальная лабораторная диагностика / Н.А. Хисматуллина, **А.М. Гулюкин**, М.И. Гулюкин [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2015. – Т. 60. – № 2. – С. 18-24.

16. **Гулюкин, А.М.** Экономический ущерб, причиняемый бешенством сельскохозяйственных животных в России / А.М. Гулюкин, Ю.И. Смолянинов, А.А. Шабейкин // RJOAS. – 2016. – № 8(56). – С. 34-38.

17. Зайкова, О.Н. Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области / Т.В. Гребенникова, А.Л. Елаков, К.С. Кочергин-Никитский, Т.И. Алипер, **А.М. Гулюкин** [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2016. – № 4. – С. 186-192.

18. Шабейкин, А.А. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации за период 1991 по 2015 годы / А.А. Шабейкин, О.Н. Зайкова, **А.М. Гулюкин** // Ветеринария Кубани. – 2016. – № 4. – С.15-17.

19. Зайкова, О.Н. Особенности молекулярно-генетической характеристики изолятов вируса бешенства в Республике Таджикистан / О.Н. Зайкова, Л.Г. Гуламадшоева, Т.В. Гребенникова, М.М. Аноятбеков, А.А. Шабейкин, И.В. Полякова, **А.М. Гулюкин** // Ветеринария и кормление. – 2016. – № 6. – С. 24-34.

20. **Гулюкин, А.М.** Эпизоотологические геоинформационные системы. Возможности и перспективы / А.М. Гулюкин, А.А. Шабейкин, В.В. Белименко // Ветеринария. – 2016. – № 7. – С. 21-24.

21. Зайкова, О.Н. Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей / О.Н. Зайкова, Т.В. Гребенникова, **А.М. Гулюкин** [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2017. – Т. 62. – № 3. – С. 101- 108.

22. **Гулюкин, А.М.** Особенности эпизоотологического процесса и молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Тверской области / А.М. Гулюкин, А.А. Шабейкин, В.В. Макаров [и др.] // Вопросы



**Список работ, опубликованных по теме диссертации в других изданиях**

23. Хисматуллина, Н.А. Разработка и применение средств и методов диагностики бешенства / Н.А. Хисматуллина, А.Н. Чернов, Р.Х. Юсупов, **А.М. Гулюкин** [и др.] // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. – Казань, 2012. – С.146-152.

24. **Гулюкин, А.М.** Контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства с помощью блок-иммуноферментной тест-системы / А.М. Гулюкин, Н.А. Хисматуллина, А.Л. Елаков [и др.] // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. – Казань, 2012. – С. 181-187.

25. Хисматуллина, Н.А. Разработка и применения блок-иммуноферментной тест-системы для контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства / Н.А. Хисматуллина, **А.М. Гулюкин**, В.В. Сабирова [и др.] // Ветеринарна медицина. – 2012. – № 96. – С. 64-66.

26. **Гулюкин, А.М.** Оценка иммунного статуса собак, вакцинированных различными антирабическим вакцинами в сочетании с иммуностимуляторами / А.М. Гулюкин, Н.А. Хисматуллина, А.З. Гафарова [и др.] // Ветеринарна медицина. – 2013. – № 97. – С. 266-288.

27. **Гулюкин, А.М.** Контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства дикой фауны на территории Смоленской области РФ / А.М. Гулюкин, Н.А. Хисматуллина, А.З. Гафарова [и др.] // Тр.: Всерос. НИИЭВ им. Я.Р. Коваленко. – М., 2013. – Т. 77. – С. 197-200.

28. **Гулюкин, А.М.** Получение пероксидазного конъюгата для оценки эффективности вакцинопрофилактики бешенства лисиц / А.М. Гулюкин, Н.А. Хисматуллина, А.З. Гафарова [и др.] // Биотехнология: Реальность и перспективы: Международной науч.-практ. конф. – Казань. – 2014.– С. 220-222.

29. Хисматуллина, Н.А. Эпизоотическая ситуация и контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства животных в Республике Татарстан / Н.А. Хисматуллина, А.Г. Хисамутдинов, И.И. Самарханов, **А.М. Гулюкин** [и др.] // Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных: Международная науч.-практ. конф., посвящ. 55-летию ВНИИВМ. – М., 2014. – С. 331-338.

30. Хисматуллина, Н.А. К вопросу поедаемости антирабической вакцины лисицами на территории проведения вакцинации Республики Татарстан / Н.А. Хисматуллина, И.И. Самарханов, А.М. Гулюкин [и др.] //Международная науч.-практ. конф.: Биотехнология и качество жизни. – Казань, 2014. – С. 44.

31. Шабейкин, А.А. Опыт использования ГИС-технологий при оценке рисков в эпизоотологическом исследовании / А.А. Шабейкин, А.М. Гулюкин, Н.А. Хисматуллина // Сб.: V Международный ветеринарный конгресс. – М.: 2015. – С. 250-252.

32. Svatina, M.A. Epizootiological Characteristics of Animal Rabies in the West Kazakhstan Region / M.A. Svatina, G.G. Absatirov, M.S. Shalmenov, A.A. Sidorchuk, А.М. Gulukin // Biology and Medicine. – 2015. – № 5. – P. 152-156.

33. Забережный, А.Д. Современные способы модификации вакцинных вирусных штаммов / А.Д. Забережный, А.М. Гулюкин, И.В. Полякова [и др.] // Материалы X Международной науч.-практ. конф.: Научные перспективы XXI века. Новосибирск – 2015. – С. 155-158.

34. Гулюкин, А.М. Молекулярно-генетические характеристики генов N и G изолятов вируса бешенства, распространенного в Республике Татарстан / А.М. Гулюкин, О.Н. Зайкова, И.В. Полякова // Труды ВИЭВ. – М., 2016. – Т. 79. – С. 147-173.

35. Гулюкин, А.М. Эпизоотологические аспекты бешенства на территории Российской Федерации / А.М. Гулюкин, О.Н. Зайкова, А.В. Паршикова // В сб.: Единый мир – единое здоровье. Материалы VII Международного ветеринарного конгресса. – Москва, 2017. – С.259-264.

36. Belimenko, V.V. Prospects of Application of Geoinformational Systems for Veterinary Geology / V.V. Belimenko, А.М. Gulyukin, E.V. Novosad [et al.] // В книге: MedGeo 2017 Conference Materials of 7th International Conference on Medical Geology – MEDGEO 2017. – М., 2017. – С. 61.

#### Патенты

37. Патент № 2420309 от 10.06.2011. Препарат против бешенства / соавт. Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Чернов А.Н. [и др.]. Патентообладатель: Федеральное бюджетное государственное учреждение «Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (заявка № 2009130819 от 12.08.2009).

38. Патент № 2440139 от 20.01.2012. Вакцина против бешенства для оральной иммунизации диких плотоядных животных и способ ее получения / соавт. Рахманин

П.П., Крюков С.В., Тренев В.Н. [и др.]. Патентообладатель: Открытое акционерное общество «Институт биотехнологий ветеринарной медицины» (заявка № 2010144856 от 03.11.2010).

39. Патент № 2575088 от 18.01.2016. Набор синтетических олигонуклеотидных праймеров для выявления РНК вируса бешенства и способ выявления вируса бешенства с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) / соавт. Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Усольцев К.В. [и др.]. Патентообладатель: Федеральное бюджетное государственное учреждение «Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных» (заявка 2014139999 от 02.10.2012).

### **Монографии и научно-методическая литература**

40. Иванов, А.В. Бешенство: этиология, эпизоотология, диагностика / А.В. Иванов, Н.А. Хисматуллина, А.Н. Чернов, **А.М. Гулюкин** // Учебно-методическое пособие в иллюстрациях, М.: Колос, 2010. – 50 с.

41. Макаров, В.В. Бешенство: естественная история на рубеже столетий / В.В. Макаров, **А.М. Гулюкин**, М.И. Гулюкин. – М.: ЗооВетКнига, 2015. – 121 с.

Автор выносит искреннюю благодарность доктору биологических наук, профессору Хисматуллиной Н.А., доктору биологических наук Чернову А.Н., кандидату биологических наук Петровой Т.П. (ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» МСХ РФ), доктору ветеринарных наук, профессору Ведерникову В.А., кандидату ветеринарных наук Шабейкину А.А. (ФГБНУ ВИЭВ), член-корреспонденту РАН, доктору биологических наук, профессору Гребенниковой Т.В., доктору медицинских наук Грибенче С.В., кандидату биологических наук Южакову А.Г., Зайковой О.Н. (ФГНУ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрав РФ) за неоценимую помощь и содействие в проведении исследований.