

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский
институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и
Я.Р. Коваленко Российской академии наук»

На правах рукописи

ГУЛЮКИН АЛЕКСЕЙ МИХАЙЛОВИЧ

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

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 Макаров В.В.

Москва, 2018

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ	антиген
АГГ	антирабический гамма-глобулин
АТ	антитела
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВИЭВ	Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии
ВБ	вирус бешенства
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ГИС	геоинформационная система
ГИТ	геоинформационная технология
ГП	гликопротеиновый
ИФА	иммуноферментный анализ
ИФ	иммунофлуоресценция
КББ	карбонатно-бикарбонатный буфер
КГ	конъюгат
КДТЛ	коэффициент дифференцировки Т-лимфоцитов
K_{sp}	коэффициент специфичности
кД	килодальтон
КК	культура клеток
КРС	крупный рогатый скот
КС	комплементсвязывающий
МКА	моноклональные антитела
МРС	мелкий рогатый скот
МЭБ	Международное эпизоотическое бюро
НАФ	неполный адъювант Фрейнда
НБ	нейробластома
НГУК-1	перевиваемая линия клеток невриномы Гассерова узла крысы-1
НИФА	непрямой иммуноферментный анализ

НК	нуклеокапсидный
НМФА	непрямой метод флуоресцирующих антител
Н.П.	нуклеотидная последовательность
НД	нормативные документы
Н.О.	нуклеотидное основание
ОФД	орто-фенилендиамин
ПААГ	полиакриламидный гель
ПАФ	полный адъювант Фрейнда
ПЭГ	полиэтиленгликоль
РДСК	реакция длительного связывания комплемента
РДП	реакция диффузионной преципитации
РИА	радиоиммунный анализ
РН	реакция нейтрализации
РТ	Республика Татарстан
С.П.	сельское поселение
УЦФ	ультрацентрифугирование
ФАГ	флуоресцирующий антирабический глобулин
ФАН	фагоцитарная активность нейтрофилов
ФБР	фосфатно-буферный раствор
ФБР-Т	фосфатно-буферный раствор с твином
ФГУ	Федеральное государственное учреждение
Ф.О.	Федеральный округ
ФЦТРБ	«Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных»
ФЦБ	фосфатно-цитратный буфер
ФИ	фагоцитарный индекс
ЦПД	цитопатическое действие
IgG (A, M)	иммуноглобулин класса G (A, M)
CVS	challenge virus standard (стандартный вирусный штамм)

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Общая характеристика и эпизоотологический мониторинг бешенства.....	15
1.2 Биологические свойства возбудителя бешенства	24
1.3 Социально-экономическое значение бешенства	27
1.4 Методы лабораторной диагностики бешенства	34
1.5 Специфическая профилактика бешенства животных	49
2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	69
2.1 Материал и методы исследований	69
Результаты исследований	78
2.2 Эпизоотологический мониторинг бешенства	78
2.2.1 Геоинформационная система (ГИС) эпизоотологического мониторинга	78
2.2.2 Общая характеристика эпизоотического процесса бешенства на территории Российской Федерации в динамике за 1991-2015 гг.	81
2.2.3 Особенности эпизоотического процесса бешенства разных видов животных	85
2.2.4 Автокорреляционный анализ динамики неблагополучных пунктов и заболевших бешенством животных на территории РФ (1991-2015 гг.)	109
2.2.5 Современная эпизоотической ситуации бешенства на территории Российской Федерации (2015 г.)	112
2.2.6 Экономический ущерб, причиняемый бешенством сельскохозяйственных животных в Российской Федерации.....	125
2.2.7 Региональные особенности эпизоотического процесса бешенства	129
2.2.8 Случаи гидрофобии в эпизоотологии и эпидемиологии бешенства	146
2.2.9 Филогенетический анализ геномов полевых изолятов вируса бешенства...155	155
2.2.10 Методика расчета потребности биопрепаратов для специфической профилактики бешенства животных	189

2.3 Контроль эффективности вакцинации против бешенства животных	192
2.3.1 Тест-система на основе гликопротеина вируса бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ) методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА)....	193
2.3.2 Тест-система на основе блок-иммуноферментного анализа (блок-ИФА)	202
2.3.3 Результаты испытания тест-систем для контроля эффективности вакцинации против бешенства животных разных видов	210
2.4 Усовершенствование методов лабораторной диагностики бешенства животных	220
2.4.1 Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1)	220
2.4.2 Синтетические олигонуклеотидные праймеры к гену гликопротеина и способ выявления РНК вируса бешенства в обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)	226
2.4.3 Гематологический профиль и иммунный статус плотоядных животных, вакцинированных против бешенства разными вакцинами	236
2.4.4 Иммунный статус собак, вакцинированных против бешенства в сочетании с иммуностимуляторами	240
2.5 Разработка средств специфической профилактики бешенства	244
2.5.1 Препарат против бешенства для местной обработки ран при укусах человека плотоядными животными	244
2.5.2 Вакцина против бешенства для оральной иммунизации диких плотоядных животных	250
2.6 Контроль эффективности оральной вакцинации против бешенства. диких плотоядных животных	255
3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ	270
3.1 Выводы	291
3.2 Предложения для практики.....	294
4 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	297
5 ПРИЛОЖЕНИЯ	347

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. 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., 2015).

Бешенство относится к числу наиболее опасных болезней вирусной этиологии, регистрируется на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды (Бакулов И.А. и др., 1998) и, по оценке ВОЗ, входит в пятерку инфекционных болезней, общих для человека и животных, наносящих наибольший социальный и экономический ущерб. С учетом исключительности бешенства с присущими ему характеристиками многих классических инфекционных болезней – мировой нозоарел, природная очаговость, чрезвычайная контагиозность, трансмиссивность, восприимчивость большинства видов животных, социальная, экономическая и экологическая значимость, оно включено в список особо опасных инфекционных болезней МЭБ (Кодекс здоровья наземных животных МЭБ, 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).

Во многих странах Западной Европы бешенство в последние годы не регистрируется (Rabies Bulletin Europe). Россия в этом списке (41 страна) занимает доминирующее положение, как по числу неблагополучных пунктов (очагов), так и заболевших 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). Только за 2008-2011 гг. в

РФ зарегистрирован 61 случай гидрофобии, а ежегодно антирабическую помощь получают от 250 до 450 тысяч человек (Онищенко Г.Г., 2012).

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 людям (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 основные 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, как «зооноз номер один» 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 (RBE) и World survey of rabies (WSR).

Эпизоотологический мониторинг бешенства во взаимосвязи с эпидемиологией проведен 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.), регулярно проводится, а результаты публикуются в информационно-аналитических бюллетенях и размещаются на сайтах Роспотребнадзора, Россельхознадзора, ФГБУ ВНИИЗЖ, Минздрава

России, Центральной научно-методической ветеринарной лаборатории, Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко, Омского НИИ природно-очаговых инфекций. Аналогичные исследования проведены по территориям многих административных регионов РФ.

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 электронных 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 (ГОСТ 26075-84; Хисматуллина Н.А. и др., 2001). Однако многие тесты малочувствительны, 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 животных разработаны отечественные вакцины из штаммов РВ-97(Синраб, Оралбивак), ТС-80 и генномодифицированного штамма ERA G333 (Рабивак-О/333), но они характеризуются 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. и др., 2005).

Цель и задачи исследований. Целью исследований является анализ эпизоотологического мониторинга бешенства на территории Российской Федерации за период с 1991 по 2015 годы, усовершенствование методов диагностики и специфической профилактики.

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. На основе программного обеспечения ArcGIS (компания ESRI, США) нами разработана геоинформационная система (ГИС) эпизоотологического мониторинга бешенства животных, 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 (СУБД) Microsoft Access ® (корпорация Microsoft, США). Данные кадастра привязаны к атрибутивной

таблице цифровой карты РФ, что позволяет визуализировать данные через построение нозологических карт.

С использованием ГИС впервые в Российской Федерации 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 разных видов животных против бешенства.

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 обратно-транскриптазной гнездовой ПЦР (ОТ-ПЦР).

Нами 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, проведено сравнение изолятов с референтными штаммами на данном участке генома, а также филогенетический анализ изолятов, на основе чего построены филогенетические дендрограммы, раскрывающие геномные территориальные особенности лиссавирусов.

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) (Приложение 11);

– Препарат против бешенства (Приложение 12);

– Вакцина против бешенства для оральной иммунизации диких плотоядных животных (Приложение 13);

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

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. Данные мониторинга используются в ежеквартальных информационных Бюллетенях Европейского центра ВОЗ «WHO Rabies Bulletin Europe» (Приложение 4).

Разработаны «Методические рекомендации по расчету годовой потребности в биопрепаратах для проведения профилактических и противоэпизоотических мероприятий в хозяйствах всех форм собственности», позволяющие научно-обоснованно планировать потребность вакцин на иммунизацию разных видов животных против бешенства (Приложение 6).

Разработанные иммуноферментные тест-системы для контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства животных (ИФА с применением гликопротеина вируса бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ) и антивидовых пероксидазных конъюгатов, блок-ИФА на основе антирабического глобулина и пероксидазного конъюгата) по чувствительности и экспрессности значительно превосходят традиционную реакцию нейтрализации, что определяет их практическую значимость в лабораторной диагностике.

Предложен 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» (Приложение 9).

Разработаны способ и методические указания по выявлению РНК лиссавируса в гнездовой обратно-транскриптазной ПЦР (ОТ-ПЦР), с возможностью установления диагноза бешенства в течение 6 часов (в классической биопробе на белых мышах – до 34 суток) (Приложение 10).

Разработаны «Рекомендации по купированию первичных очагов и профилактике бешенства», а также «Учебно-методическое пособие в иллюстрациях – «Бешенство: этиология, эпизоотология, диагностика» (Приложение 5).

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.

Положения, выносимые на защиту:

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

Степень достоверности и апробация результатов. 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: «Биотехнология: экология крупных городов» (Москва, 2010), «Актуальные вопросы инфектологии» (Казань, 2010), «Биотехнология: Реальность и перспективы» (Казань, 2014), «Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных» (Москва, 2014), «Биотехнология и качество жизни» (Казань, 2014), «Научные перспективы XXI века» (Новосибирск, 2015), V и VII Международном ветеринарном конгрессе (Москва, 2015, 2017), 7-й Международной конференции по медицинской геологии - 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).

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

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

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая характеристика, распространение и эпизоотологический мониторинг бешенства

Распространение бешенства среди животных является одним из важнейших международных и национальных критериев оценки биологической и экологической безопасности среды обитания человека. Бешенство относится к числу наиболее опасных болезней вирусной этиологии, регистрируется на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды (Бакулов И.А. и др., 1998) и, по оценке ВОЗ, входит в пятерку инфекционных болезней, общих для человека и животных, наносящих наибольший экологический, социальный и экономический ущерб.

С учетом исключительности бешенства с присущими ему многочисленными характеристиками многих классических инфекционных болезней – мировой нозоарел, природная очаговость, чрезвычайная контагиозность, трансмиссивность, восприимчивость большинства видов животных, социальная, экономическая и экологическая значимость, оно включено в список особо опасных инфекционных болезней МЭБ (Кодекс здоровья наземных животных МЭБ, 2013), 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).

Источником возбудителя бешенства являются больные дикие и домашние животные, в некоторых случаях – летучие мыши. Выделение рабического вируса из организма происходит со слюной (Бессарабов Б.Ф. с соавт., 2007).

К вирусу бешенства восприимчивы все виды теплокровных животных. Для рыб, змей, черепах и других хладнокровных характерна выраженная невосприимчивость к рабическому вирусу (Груздев К.Н., Недосеков В.В., 2001).

Заражение животных и человека происходит контактным путем – при укусе или ослонении. Доказана возможность аэрогенного, алиментарного и трансплацентарного путей передачи вируса. Не исключена передача инфекционного начала от человека человеку (Груздев К.Н., Недосеков В.В., 2001). Описаны случаи заражения людей в результате операций по трансплантации внутренних органов (Иванов А.В. и др., 2006).

Мониторинговые исследования свидетельствуют о глобальном распространении бешенства, регистрируемого на шести континентах в более чем 150 странах, в которых от бешенства ежегодно погибают от 55 до 70 тыс. человек, половина из которых приходится на детей. Свыше 15 млн. человек ежегодно подвергаются укусам и травмам, нанесенным различными животными, с необходимостью последующей специфической антирабической помощи (Ведерников В.А., 1974-1987; Таршис М.Г., 1990; Шестопалов А.М. с соавт., 2001; Макаров В.В. с соавт., 2002, 2015; World survey of rabies. 1996-1999. – WHO/EMC/ZOO/99/6; Черкасский Б.Л., 2005; Smith A. et al., 2005; Arai Y. et al., 2005). В мировом нозоареале бешенства исключения составляют некоторые островные государства и территория Антарктиды (Smith et al., 1995; Таршис М.Г. и др., 1997).

Осуществлен мониторинг бешенства по территории Европы и Северной Азии (Сидоров Г.Н., 2002; Anderson et al., 1981; Wandeler A., 1988; Bourhy H., Kissi B., 1999; Pastoret P., Brochier B., 1999; Muller W., 2000, 2001; Rabies bull. Europe. WHO, 2000-2015; Potzsch, C., 2002; Nokireki, T., 2011), территории Восточной и Западной Европы (Бегель К. и др., 1981; Бусол В.А. и др., 2001; Макаров В.В. с соавт., 2008; Ведерников В.А., 2014).

Установлено, что в большинстве европейских стран, граничащих с Ближним Востоком, основным резервуаром бешенства являются собаки, на северо-востоке – енотовидные собаки, а в Центральной и Восточной Европе – лисицы, а также насекомоядные летучие мыши, распространенные во всей Европе (Bourhy H. et al., 1992; Whitby J. et al., 1996; Aubert M., 1997).

В Европе зарегистрированы многочисленные трансконтинентальные случаи бешенства среди животных, завезенных из неблагополучных территорий Африки и Азии (Toma et al., 2005; Bourhy H. et al., 2005; Stantic-Pavlinic et al., 2005). Случаи заболевания бешенством среди населения в Европе редки, а большинство их регистрируют после укусов собаками людей, прибывающих в странах Африки и Азии (Lontei I., 1986).

Самая сложная эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по бешенству сохраняется в Азии, где основными источниками и переносчиками рабического вируса являются собаки. На этом континенте регистрируют большинство случаев бешенства и смертей населения и животных, особенно в Индии, где ежегодно погибает ориентировочно от 35 до 40 тыс. человек (Bhargava et al., 1996; Wasi et al., 1997; John T., 1997).

В странах Латинской Америки основными резервуарами бешенства остаются собаки и летучие мыши. Программа вакцинации животных и населения, активно осуществляемая в странах этого континента, позволила снизить заболеваемость бешенством людей до 200 в год (Schneider M. et al., 1996; Delpietro et al., 1996).

В Африке, на большей части территории, преобладает собачье бешенство. Эпизоотологический мониторинг территории таких стран континента как Малави (Edelsten R., 1995) и Зимбабве (Bingham et al., 1999) показал, что от 5 до 25% случаев бешенства приходится на долю шакалов и гиен. В целом на Африканском континенте складывается неблагоприятная тенденция увеличения случаев бешенства среди популяций диких животных и появления новых резервуаров рабического вируса (Cleaveland S., 1998).

В США эпизоотическая и эпидемическая ситуация по бешенству характеризуется как сложная и постоянно меняющаяся, с вовлечением в эпизоотический процесс енотов, лисиц, скунсов и койотов. Важную трансмиссивную роль играют также насекомоядные летучие мыши, однако случаи заболевания бешенством людей регистрируются редко и не превышают 1-2 в год (Smith et al., 1996; Fu Z., 1997; Krebs et al., 1998).

Из островных государств, штаммы лиссаподобных вирусов выделены в Австралии от летучих мышей, лошадей и человека (Sing T. et al., 1996; Gould et al., 1998; Torvaldsen et al., 1998). На территории Японии бешенство не регистрировалось с 1957 г., кроме одного случая, связанного с завозом больного животного в 1970 г., однако не исключена возможность других случаев, так как японцы все чаще посещают страны, неблагополучные по рабической инфекции (Fukaya K., 1997).

Великобритания является одной из первых стран, на территории которых бешенство ликвидировано, однако вновь появилась угроза рецидива, так как лиссаподобные вирусы изолированы от летучих мышей в прибрежных районах страны (Whitby et al., 1996).

В Российской Федерации бешенство на современном этапе рассматривается преимущественно как эпизоотия природного типа, обусловленная активной миграцией диких животных и возникновением новых очагов природного бешенства (Полюшкина Г.С., 1998).

В процессе эволюции эпизоотического процесса на территории РФ, по определению Ботвинкина А.Д., Сидорова Г.Н. (1992) сформировалось несколько основных крупных природных очагов бешенства: Среднерусский, Прибалтийский, Средневолжский, Нижневолжский, Западносибирско-Казахстанский, Северо-Кавказский, Забайкальский, Маньчжурский и Арктический. При этом природные очаги бешенства в Восточном Забайкалье, Приморье и Приамурье, по всей видимости, не связаны с распространением инфекции в других зонах. В зоне тундры периодически активизируются древние очаги арктического бешенства. Официально не регистрируется бешенство на обширной территории северной тайги России с ее малочисленной заселенностью. Вместе с тем, это не исключает эпизоотическое проявление бешенства в биотопах данного региона среди диких животных, так как отсутствуют данные мониторинговых исследований.

На территории России выражена цикличность эпизоотии бешенства с трехлетними периодами подъема и спада заболеваемости животных каждые два

года, а также расширение нозоареала инфекции (Б.Л. Черкасский и др., 1995; Хисматуллина Н.А. и др., 1996; Быков В.П., Таршис М.Г., 1996; Сидоров Г.Н., 2002, 2004).

В неблагополучных по бешенству территориях рабический вирус выявляют среди диких млекопитающих отряда хищных, парнокопытных, грызунов и рукокрылых. Основным резервуаром рабического вируса на территории России были и остаются виды семейства псовых – лисица, волк, енотовидная собака, корсак, песец, шакал, реже представители семейства куньих и барсук. Однако основным источником заражения сельскохозяйственных животных и человека, а также активным распространителем вируса является лисица (Полещук, Е.М., 2005).

Очаги эпизоотии природного бешенства приурочены, в основном, к местностям повышенной плотности населения хищников, в том числе к закрытым биотопам лесостепных ландшафтов и степей, а также прибрежным биоценозам (Селимов М.А. и др., 1994; Черкасский Б.Л. и др., 1995; Сидоров Г.Н., 1998; Авилов В.М. и др., 1998; Дудников С.А., 2002).

Обширные эпизоотологические мониторинговые исследования бешенства как в целом, так и по отдельным группам восприимчивых животных во взаимосвязи с эпидемиологической ситуацией проведены по территории Российской Федерации (Черкасский Б.Л. с соавт., 1995; Селимов М.А., 1998; Седов В.А. с соавт., 1998; Груздев К.Н., Недосеков В.В., 2001; Дудников С.А., 2002; Апалькин Н.А. с соавт., 2004; Авилов В.М. с соавт., 2002, 2016; Ведерников В.А. и др., 2002, 2003, 2010, 2014; Сидоров Г.Н. с соавт., 2004, 2010; Макаров В.В. с соавт., 2006; 2008; Бардина Н.С., 2008; Полещук Е.М. с соавт., 2012, 2013; Петрова А.Г., Новикова И.В., 2015), на основе чего установлены новые особенности и даны пространственно-временные характеристики эпизоотического процесса болезни.

Эпизоотическая ситуация по бешенству животных на территории России, исходя из данных перечисленных авторов, остается напряженной. В настоящий период ареал болезни распространяется на территорию 64 регионов РФ, входящих

в состав девяти Федеральных округов. Характер расположения неблагополучных пунктов и очагов, пространственно-временные особенности развития эпизоотий бешенства подтверждают существование глобальных природно-очаговых комплексов. Масштабность эпизоотии бешенства, по всей видимости, является одной из ведущих причин того, что предпринимаемые усилия по нормализации эпизоотической ситуации в каждом отдельно взятом регионе дают слабый эффект. Для получения сдвигов в этом направлении необходимо налаживание четкой координации действий между всеми регионами, входящими в зону риска.

Учитывая важность проблемы в краевой инфекционной патологии животных и человека, эпизоотологические мониторинговые исследования по бешенству в разные периоды, были проведены по территориям различных природно-экономических районов Российской Федерации, в частности, по Западной Сибири (Ботвинкин А.Д. с соавт., 1988; Сидоров Г.Н. с соавт., 1990; Джупина С.И., Юрик С.А., 1997; Кузьмин И.В. с соавт., 2001; Юрик С.А., 2002; Андрейцев К.М., 2006), по Уральскому региону (Ведерников В.А., 2014), Северному Кавказу (Калабеков М.И., 1998), по региону Нижней Волги (Быков В.П., Таршис М.Г., 1996), по Заполярью и Крайнему Северу (Кантарович Р.А., 1956; Соколов Н.Н., Ча Н.И., 1957).

Региональные особенности эпизоотологии и эпидемиологии бешенства выявлены в мониторинговых исследованиях на территориях Республики Татарстан (Юсупов Р.Х., 1992; Хисматуллина Н.А. с соавт., 1995, 2003-2005), Саха - Якутии (Колесникова Р.А., 1972), Курганской области (Коротков Г.Ф., 1967), Ставропольского края (Фоменко М.В., 1997; Фоменко М.В., Тутов И.К., 1997, 1998), Липецкой области (Жуков И.В. с соавт., 2004), Ульяновской области (Нафеев А.А. с соавт., 2012), Саратовской области (Еремин В.И. с соавт., 2011, Мясников А.П. с соавт., 2012; Барегомян Л.А., 2014), Кировской области и Пермского края (Древясникова С.Г., 2011, Крюков С.В., 2011; Балдина И.В., 2004), Краснодарского края (Львов Д.К. и др., 2008), Владимирской области (Белик Е.В. с соавт., 2010), Московской области (Г.С. Полюшкина, А.А. Горкунов, 1998; Цвиль Л.А., Родионова Л.В., 2001, 2002; Балдина И.В., 2003, 2004;

Мовсесянц А.А., 2003, 2011; Аникеев М.А., 2006; Заводских А.В., 2007; Анисина О.В., 2011), Свердловской области (Петрова О.Г., 2010), Республики Башкортостан (Гайсаров М.С., 2009; Камалетдинова А., Казанина М.А. 2009), Новосибирской области (Шестоपालов А.М. и др., 1999; Аксенов В.И. И др., 2002; Амироков М.А. с соавт., 2009), Алтайском крае (Барышников П.И. с соавт., 2007; Барышников П.И., Андрейцев К.М., 2008), Челябинской области (Шкаева Н.А., Пешков А.С., 2006; Показий А.Г., Давыдова Т.Н., 2007).

Особую эпидемиологическую опасность приобретает бешенство в курортно-санаторных зонах и местах отдыха с массовым сосредоточением людей, в связи с чем, обширные эпизоотологические исследования по мониторингу бешенства животных проведены в Республике Крым (Ковалев В.Л., Кузнецов Ю.А. 1999; Павленко Н., Троценко З., 2000; Барабаш А.Ф., 2002; Литвин В.П., Поліщук В.В., 2003; Падалка О.В. и др., 2003; Ничик С.А., 2004; Барабаш А.Ф. и др., 2004).

Актуальность проблемы бешенства на территории Российской Федерации подтверждается тем, что регулярно на официальных сайтах Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав населения (Роспотребнадзор), Управления Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), Федерального центра охраны здоровья животных (ФГБУ ВНИИЗЖ), Минздрава России, Центральной научно-методической ветеринарной лаборатории (ФГБУ ЦНМВЛ), Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко (ФГБНУ ВИЭВ), Омского НИИ природно-очаговых инфекций, а также региональных организаций и специальных форумах. По материалам эпизоотолого-эпидемиологического мониторинга размещаются информационно-аналитические обзоры и бюллетени.

Бурное развитие вычислительной техники предопределило появление специальных программных комплексов – географических информационных систем (ГИС), являющихся мощным инструментом в эпизоотологии и эпизоотологическом мониторинге. ГИС – это многофункциональная

информационная система, предназначенная для сбора, обработки, моделирования и анализа пространственно-временных данных, как в глубокой длительной перспективе, так и в небольших временных интервалах, их отображения и использования при решении самых разнообразных задач, подготовке и принятия решений (Шабейкин А.А. и др., 2015; Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., 2016).

Использование ГИС-технологий обеспечивает хранение, моделирование, анализ и визуализацию больших массивов данных, имеющих географическую привязку. Применение ГИС для эпизоотологического анализа, позволило вывести ветеринарную географию на новый уровень, с возможностями централизованного сбора и хранения информации о пространственном распределении вспышек болезней животных; автоматизированного анализа данных для выявления закономерностей эпизоотического процесса, создания электронных и бумажных карт для отображения эпизоотической ситуации, создания карт риска прогноза заноса и возникновения болезней (Коренной Ф.И., Гуленкин В.М., 2011; Захарченко И.А., 2015; Белименко В.В., Гулюкин А.М., 2016).

В настоящее время разработаны методы сбора и анализа картографической информации об эпизоотической ситуации по особо опасным болезням животных с применением GPS-навигаторов, интегрированных с геоинформационной системой ArgGIS и с космической навигационно-топографической системой Google Earth (Планета Земля) (Коренной Ф.И. и др., 2010; Гуленкин В.М., Коренной Ф.И., 2011).

Широкое применение ГИС в эпизоотологии начато во второй половине 90-х годов прошлого столетия, пионерами которого явились такие исследователи как Р. Durr (Австралия), А. Gatrell (Великобритания), М. Ward (Австралия), А. Lawson (США) (Durr, P., Gatrell, A., 2004). ГИС широко использована также в области эпидемиологии (Kistemann, T. et. al., 2002).

Организованы международные ассоциации в составе специалистов здравоохранения и ветеринарии, активно использующие ГИС-технологии для анализа статистических данных. Одной из них является неформальная организация GisVET (в последние годы – GEOVET), применяющая методы ГИС-

анализа в области ветеринарии (<http://sydney.edu.au/vetscience/research/geovet/program.shtml>), а также регулярно публикующая материалы международных конференций под эгидой этой ассоциации (http://www.elsevier.com/wps/find/journal-description.cws_home/503315/description#description; http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/719813/description#description).

Другой известной организацией, объединяющей специалистов здравоохранения и ветеринарии в области ГИС-технологий, является коммерческая ассоциация GnosisGIS (<http://www.gnosisgis.org/>), специализирующаяся на данных дистанционного зондирования Земли по выявлению природных очагов заболеваний, главным образом паразитарных. Методология исследований организации заключается в анализе спутниковых снимков, характеризующих состояние биомассы, температуры, влажности на анализируемой территории, и выделении ареалов, пригодных по климатическим условиям для обитания и размножения того или иного вида возбудителя болезни (метод «экологических ниш»). При составлении карт риска возникновения болезней используется метод байесовского картографирования (Lawson B., 2008), основанный на теореме Байеса для вычисления вероятности возникновения заболевания на исследуемой территории путем анализа факторов риска и учета данных о заболеваемости за предыдущий период времени.

В нашей стране широкомасштабные мониторинговые исследования с использованием ГИС-технологий (на основе ArcGIS) проводятся в информационно-аналитическом центре Управления ветнадзора, созданного на базе ФГУ «Федеральный центр охраны животных» (г. Владимир) по болезням животных на территории Российской Федерации и за рубежом, таких как ящур, африканская чума свиней, классическая чума свиней, высокопатогенный грипп птиц, бешенство, бруцеллез, лептоспироз и другие (Коренной Ф.И., Гуленкин В.М., 2011).

С использованием ГИС-технологий созданы и постоянно пополняются базы данных о проявлении эпизоотического процесса сибирской язвы (Черкасский Б.Л.

и др., 2005; Дугаржапова З.Ф. и др., 2010; Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., 2015) и чумы (Дубянский В.М., 2012; Кузнецов А.А. с соавт., 2012; Буравцева Н.П. и др., 2014).

Впервые методы компьютерного анализа в географической эпизоотологии бешенства и других особо опасных болезней животных с применением элементов ГИС-технологий использованы в лаборатории общей эпизоотологии ФГБНУ ВИЭВ (Шабейкин А.А., 2004). Создана и постоянно пополняется база данных о проявлении эпизоотического процесса бешенства (Седов В.А., Ведерников В.А., 1998; Макаров В.В. и др., 2008; Гулюкин А.М., 2010, 2014; Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., 2016). С применением ГИС-технологий проведен мониторинг эпизоотической ситуации бешенства по территории Республики Казахстан (Абдрахманов С.К., 2013).

1.2 Биологические свойства возбудителя бешенства

Возбудитель бешенства – РНК-содержащий вирус, относящийся к роду *Lissavirus* и семейству *Rhabdoviridae*, включающего вирусы, персистирующие в организме позвоночных, беспозвоночных и растений (Francki R. et al., 1991). Семейство рабдовирусов позвоночных включает в себя роды *Lissavirus* и *Vesiculovirus*. Род *Lissavirus* включает вирус бешенства и подобные ему лиссаподобные вирусы, характеризующиеся общностью основных свойств генома вириона и способностью вызывать энцефалит у позвоночных животных. У лиссавирусов всех видов обнаружен общий групповой нуклеокапсидный антиген, ответственный за продуцирование комплементсвязывающих преципитирующих антител (Павловский В.В., 1975; Шубладзе А.К. и др., 1975; Вагабов А.М., 1979; Черкасский Б.Л., 1985;). Расшифрован генетический полиморфизм гена нуклеопротеина вируса бешенства (Kissi B., 1995).

Вирионы рабдовирусов имеют пуле- или бациллоподобную форму, спиральный нуклеокапсид, окруженный белково-липидной оболочкой с

поверхностными выступами. Геном вируса бешенства представляет собой одноцепочную РНК с молекулярной массой $3,5-4,6 \times 10^6$ дальтон. Вирионы, кроме того, содержат РНК-зависимую РНК-полимеразу. В составе очищенного вириона содержится 2-3% РНК, 3% углеводов, 23% липидов и более 70% белка. В составе вириона выявлены 4 мажорных и 1 минорный белковый компонент. Полипептид с самой высокой относительной молекулярной массой является гликопротеином G, ответственным за продукцию вируснейтрализующих антител, антигемагглютининов и формирование иммунитета.

На основе различий гликопротеидного компонента, выявляемого в реакции нейтрализации, в группе вируса бешенства выделяют 7 серотипов. К первому относят абсолютное большинство уличных и фиксированных штаммов вируса из различных частей света, в том числе, и классический стандартный – CVS, а также все вакцинные штаммы вируса бешенства: «Внуково-32», «Овечий» ГНКИ, «Щелково-51», «РБ-71» и др. Лиссаподобные вирусы остальных типов выделены первоначально на Африканском континенте: 2-й серотип – от летучих мышей (*Lagos bat* вирус); 3-й серотип – от землеройки и человека (*Mokola* вирус); 4-й – от человека и летучей мыши (*Duvenhage* вирус). Позднее вирус *Duvenhage* был изолирован на территории ФРГ и России (Селимов М.А., 1987). К 5-му и 6-му относят вирусы европейских летучих мышей (*EBL1* и *EBL2*), к 7-му – австралийских летучих мышей (*ABL*) (Francki R.I.V. et al., 1991; <http://www.who-rabies-bulletin.org>).

По результатам филогенетического анализа первичной структуры генома все изоляты вируса бешенства из разных регионов земного шара сгруппированы в 9 кластеров: I (4 изолята, США); II (2 изолята, Южная Америка); III (3 изолята, Африка); IV (52 штамма, Европа, Ближний Восток, Африка, Южная Америка); V (16 изолятов, Северная Америка, арктический штамм); VI (17 изолятов, Африка); VII (1 изолят, Африка); VIII (6 изолятов, Тайланд, Малайзия); IX (1 изолят, Шри-Ланка) (Груздев, К.Н., Недосеков В.В., 2001).

Биологические свойства вируса бешенства подвержены естественной изменчивости (Юсупов Р.Х., Хисматуллина Н.А., 2001). Установлено несколько

биологических вариантов уличного вируса. Определенные особенности имеют штаммы вируса, выделяемые при арктическом или тундровом бешенстве («дикування») животных, при «болезни безумной собаки» в Западной Африке, при бешенстве крупного рогатого скота, источниками которых являются летучие мыши, обитающие в Центральной и Южной Америке (вызывают паралитическую форму болезни). Некоторые значительные отклонения от классических, имеют биологические свойства «лисьего бешенства», а также рабдовирусы, выделенные от мышевидных грызунов в центральной Европе, а также лиссаподобные вирусы, изолированные от землеройки, летучих мышей и насекомых в Африке (Селимов М.А., 1978; Кузьмин А.В. с соавт. 1992, 2002; Грибенча С.В., 1993; Бучатский Л.П., 2002).

Антигенные различия между штаммами вируса бешенства и родственными вирусами изучают с помощью полной и сокращенной панели антинуклеокапсидных (анти-НК) и антигликопротеиновых (анти-ГП) МКА (Селимов М.А. и соавт., 1982, 1983; Хисматуллина Н.А., 1989; Ботвинкин А.Д. и соавт., 1990, 1998; Wiktor T.J. et al., 1980). Селимовым М.А. и соавт. (1987, 1990) детально изучена антигенная характеристика полевых штаммов вируса бешенства, выделенных от животных и людей из различных районов бывшего СССР с помощью набора из 36-ти антинуклеокапсидных моноклональных антител. На основании анализа результатов исследований авторы делают заключение, что циркулирующие на территории нашей страны штаммы вируса бешенства по нуклеокапсидной структуре неоднородны и принадлежат штамму классического вируса, серотипа 1. Так называемый «Вирус Юли», выделенный от человека, укусанного летучей мышью, идентифицирован как лиссаподобный типа *Duvenhage*, серотип 4. Это первый случай обнаружение лиссаподобного вируса на территории России (Selimov M., 1987; Ботвинкин А.Д., 1990). Позднее было обнаружено еще два аналогичных типа вируса, один из которых персистирует на территории Западной Украины (Selimov M.A., 1991). Другой штамм – «Араван», выделенный от летучей мыши в Кыргызстане, оказался лиссавирусом с оригинальным антигенным профилем, не имеющим аналогов

среди известных на сегодня серотипов (Ботвинкин А.Д., 1992; Кузьмин И.В. и соавт., 1992).

1.3 Социально-экономическое значение бешенства

По экспертным оценкам ВОЗ, бешенство, по размерам причиняемого экономического ущерба среди болезней инфекционной патологии, как животных, так и человека, занимает пятое место. При этом в мировой экономике ущерб от бешенства, складывающийся из убытков вследствие гибели животных, людей и затрат на антирабические мероприятия, и составляет свыше \$1 млрд. в год (Метлин А.Е., 2008), в том числе затраты на профилактику, мониторинговый контроль бешенства – \$300 млн. (Макаров В.В. и др., 2015).

Социальное и экономическое значение бешенства постоянно возрастает (Донченко А.С., Опанасюк А.С., 2002), так как современные эпизоотии болезни природного и городского типа приобрели глобальное распространение. Несмотря на это, данные по экономической значимости бешенства на страницах научной литературы немногочисленны, отрывочны и представлены в основном количественной оценкой павших и вынуждено уничтоженных животных разных видов.

Рассмотрим ряд примеров, в определенной степени раскрывающих огромную социально-экономическую значимость проблемы бешенства в нашей стране и за рубежом.

В 1989 г. по официальным статистическим данным в мире погибло от бешенства 24,1 тыс. человек, однако по неофициальным сведениям только в Индии ежегодно умирает 25 тыс. (официально сообщено о 288 случаях) и в Китае не менее 5 тыс. человек (King A., Turner G., 1993). По другим оценкам социальные потери населения Земли от бешенства составляли в 80-е годы около 35 тыс. человек и 3,5 млн. проходили курс антирабического лечения. Коэффициент смертности людей от бешенства достигает 5 на 1 млн. населения (Uogel K.,

Meslin Г., 1990). В последние годы от бешенства погибает не менее 50 тыс. населения планеты и до 6,5 млн. человек подвергаются постэкспозиционным антирабическим обработкам (Макаров В.В., 2015).

По данным Warrell D. (1989), Bogcl K. et al. (1990), King A., Turner G. (1993) в мире ежегодно погибает от бешенства 35-50 тыс. человек, и около 1 млн. сельскохозяйственных и диких животных разных видов, при этом 99% всех смертей приходится на зону тропиков. Только в СССР в 1960-1970-е годы ежегодно умирало 60-90 человек (Щербак Ю.Н., 1982). В Российской Федерации за 1974-2002 гг. зарегистрировано 386 случаев смерти людей от бешенства (Сидоров и др. Г.Н., 2004).

Прямые экономические затраты только на профилактику бешенства животных (без учета стоимости павших) обходятся России в 30 млн. американских долларов в год (Селимов М.А. и соавт., 1983; Сидоров Г.Н., 1995). Затраты денежных средств на вакцинопрофилактику бешенства характеризуются следующими показателями. В развивающихся странах на полный курс вакцинации против бешенства одного человека расходуется 55 долларов, а стоимость затрат на человеческий иммуноглобулин составляет от 80 до 275 долларов (в среднем 100). Всего на пассивную и активную иммунизацию одного человека массой тела 50 кг требуется 105-215 долларов, а на вакцинацию одной собаки – 1,3 доллара (Bogcl K., Meslin F., 1990).

В Литовской ССР одно обращение по поводу контакта с больным (или подозреваемым) бешенством животным обходилось здравоохранению в сумме 236 руб. (Юркиявичус П. с соавт., 1984).

С учетом основных методологических и методических положений экономики ветеринарного дела, экономический ущерб, причиняемый бешенством, – это денежное выражение экономических потерь, связанных с падежом и уничтожением различных видов сельскохозяйственных животных. Следствием этого является сокращение срока эксплуатации продуктивных животных, выражающееся в недополучении продукции – молока, мяса, шкур, шерсти,

приплода, побочной продукции и других видов потерь, связанных с видом пораженных бешенством животных.

Кроме прямых экономических потерь, бешенство требует больших затрат средств на профилактические и вынужденные противозoonотические ветеринарные мероприятия. Прежде всего, эти затраты складываются из материальных и трудовых расходов на массовые профилактические и вынужденные иммунизации животных разных видов, диагностические, карантинные и ограничительные мероприятия, уничтожение и утилизацию павших и вынужденно уничтоженных животных. Имеют место и другие многочисленные виды потерь, обусловленные эпизоотиями бешенства, однако они трудно поддаются выражению в денежной форме (нарушение хозяйственной деятельности, ограничение экономических связей, потеря генофонда и др.).

Экономические потери крупного рогатого скота от бешенства в натуральном выражении в целом по РФ только в 2002 г. составили 1126 голов скота разных видов (Ведерников В.А. с соавт., 2005). При этом только в Астраханской области пало и вынужденно уничтожено 100 овец, а в одном из хозяйств Липецкой области 7 лошадей.

За 2 года (2003-2004 гг.) экономика животноводства Харьковской, Полтавской и Сумской областей Украины по причине бешенства потеряла в общей сложности 486 голов разных видов сельскохозяйственных и домашних животных (Прохорятова Е.В. с соавт., 2005), а за период с 1960 по 2002 гг. на территории России по официальным данным зарегистрировано 123142 случая заболевания бешенством животных всех видов (Сидоров Г.Н., 2004).

По данным лаборатории эпизоотологии ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко потери сельскохозяйственных животных в 2004 г. составили: 714 голов крупного рогатого скота различных половозрастных групп, 39 голов мелкого рогатого скота, 55 лошадей и 4 свиньи. При этом в отдельных общественных хозяйствах (Новосибирская, Оренбургская области, Республика Башкортостан) возникли крупные вспышки болезни с потерей от 6 до 18 голов крупного рогатого скота. Анализ видовой структуры заболеваемости животных бешенством показал, что на

долю потерь крупного рогатого скота пришлось 21,8% и 13,1% на долю сельскохозяйственных животных других видов (Обзор эпизоотической ситуации бешенства в Российской Федерации в 2004 г. и прогноз на 2005 г.).

С учетом эпизоотологических данных определенные экономические потери несут владельцы собак и кошек, особенно ценных пород, пушное звероводство, питомники животных, зоопарки, цирки, охотничье-промысловые хозяйства.

Во время вспышки эпизоотии бешенства в 1946 г. в штате Джорджия (США) гибель сельскохозяйственных животных причинила экономический ущерб в сумме \$138678 долларов (Gter H., 1948). В Бразилии экономические потери от гибели скота разных видов, вследствие укусов бешеными вампирами, оцениваются ежегодно в размере \$50 млн. (King A., Turner G., 1993).

В период крупной вспышки бешенства в Курганской области в 1961-1963 гг., вследствие укусов лисицами вынужденно убито и пало 395 голов крупного рогатого скота, 96 овец, 12 лошадей, одна свинья и три песца с экономическим ущербом 435,5 тыс. руб. (Коротков Г.Ф., 1967). При этом по решению облисполкома за уничтожение одной лисицы выплачивалось 5 руб., бродячей собаки и кошки 1 руб. В результате такого «экономического стимулирования» населением области было отловлено и уничтожено 35 тыс. диких плотоядных животных и свыше 50 тыс. собак и кошек.

За 1960-1989 гг. в Киргизии заболело и пало от бешенства 2731 голова сельскохозяйственных животных разных видов, привито против бешенства 1240 тыс. собак, 352, 5 тыс. голов крупного рогатого скота, уничтожено 1400 бродячих собак и кошек, антирабическую помощь получили 63,7 тыс. человек (Тайчиев И.Т. и др., 1990). По расчетам авторов, общий экономический ущерб выразился в сумме 21,3 млн. руб., или в среднем 710,5 тыс. руб. ежегодно, причем более половины экономических потерь пришлось на падеж животных и затраты на антирабическую вакцинацию населения. Экономическая эффективность антирабической помощи населению республики ежегодно составляет не менее 4 млн. руб., или 120 руб. в расчете на один рубль затрат, вложенный в противоэпидемические мероприятия.

Учитывая наибольший удельный вес гибели разных видов сельскохозяйственных животных, вследствие укусов лисиц, многие исследователи напрямую связывают размеры экономических потерь в животноводстве с плотностью популяции этого вида хищников (Kauker E., 1963; Н. Pizschke, 1963; С. Eichwald, 1971; А. Wandeler et al., 1974; I. Koltei, 1976;).

Стоимость ежегодно расходованных здравоохранением антирабических препаратов в СССР, составляла около 2 млн. рублей, а экономические потери от падежа и уничтожения, заболевших бешенством сельскохозяйственных животных разных видов за 1975 г. в натуральном выражении – 11600 голов (Селимов М.А., 1978). Кроме того, по данным автора, десятки тысяч овец ежегодно использовались (с последующим уничтожением) при производстве антирабических биопрепаратов для ветеринарных и медицинских целей.

Коэффициент экономического ущерба в расчете на одну заболевшую голову крупного рогатого скота составляла 324,6 руб. (Методика определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий, 1997), что, в переводе на современные цены, выражается примерно в сумме 58,2 тыс. руб.

Экономический ущерб от бешенства крупного рогатого скота в республике Татарстан за 5 лет (1991-1995 гг.) составил 996 млн. руб. с тенденцией устойчивого нарастания по годам анализа (Хисамутдинов Ф.Ф., 1999).

Затраты только на вакцинацию диких и сельскохозяйственных животных в РФ ежегодно составляют свыше 16 млн. руб. Ежегодные расходы, связанные с применением импортного антирабического иммуноглобулина человека составляют десятки миллионов рублей, а на ликвидацию одного очага бешенства тратится 8-9 млн. руб. (Черкасский Б.Л. с соавт., 2005; Роспотребнадзор РФ, 2010).

Рассматривая проблему экономической значимости бешенства, следует, на наш взгляд, раскрыть уровень смертности разных видов животных и человека. Научные данные, характеризующие уровень смертности полезных домашних и промысловых животных от бешенства, довольно многочисленны. Так, одним из ранних является сообщение о гибели в Канаде от арктического бешенства до 90%

всех ездовых собак (Elton С., 1931). В периоды эпизоотий бешенства в Нижне-Колымской тундре погибало до 25% ездовых собак и не менее 15% популяции промысловых песцов (Соколов Н.Н., Ча Н.И., 1959). По другим данным, от эпизоотии дикования, песцы гибли в годы подъема их численности до 10-15%, а в годы депрессий этот показатель составлял 1,8-3,0% (Колесникова Р.С., 1972; Поляков А.В., 1972).

По данным Канторовича Р.А. (1967), естественная пораженность песцов и лисиц вирусом бешенства, а, следовательно, и гибель, достигала в отдельные годы 75%. Наблюдения, проведенные в 50-60-х гг. прошлого столетия свидетельствуют, что каждая вспышка бешенства на Камчатке вызывала падение численности красной лисицы более чем в 10 раз, а также гибель 40-50% упряжных ездовых собак (Лазарев А.А., 1972). По данным, полученным несколько позже, во время активизаций эпизоотии бешенства естественная инфицированность песцов достигала в этом регионе 20,8%, лисиц – 8,8% (Татаров А. с соавт., 1977).

На территории Западной Европы при высокой плотности лисицы эпизоотии бешенства распространялись очень быстро, что приводило к гибели 20-60% популяции (Wandeler A. et. al, 1974; Lloyd H., 1977). В 13 странах Европы в период пика эпизоотий бешенства погибало до 50% популяции лисицы (Бегель К. с соавт., 1981). В ФРГ в начале 80-х годов ежегодно от бешенства гибло 10 тыс. лисиц (Schneider L., 1985).

В Европе в 1977-1984 гг. из 122,5 тыс. случаев бешенства 76,6% приходилось на лисиц, 1,9% – на барсуков, 3,9% – на благородных оленей, 2,1% – на собак, 4,1% – на кошек, 5,1% – на крупный рогатый скот, 0,4% – на лошадей и 2,2% – на овец и коз (Dufouy J., Fivard G., 1985).

Следует отметить, что оценка показателя смертности от бешенства диких животных сложна, однако методологические и методические подходы решения этой проблемы разрабатываются, и в этом направлении исследований получены конкретные результаты. Так, по данным Сидорова Г.Н. с соавт. (1998), материалы многолетних исследований Омского НИИ природно-очаговых инфекций за

период 1974-1996 гг. свидетельствуют, что спонтанная зараженность красной лисицы в стране составила 1,8%, енотовидной собаки – 3,8%, волка – 0,6%, корсака – 1,6%, песца – 16,5%, диких куньих – 0,08%, грызунов – 0,1%, рукокрылых – 0,4%. Дальнейший анализ показал, что в России в тот период ежегодно заболело бешенством не менее 15-30 тыс. диких животных только семейства псовых. При этом официальная выявляемость гибели у такого массива больных бешенством животных составляла всего лишь 0,8-1,7% (Сидоров Г.Н., 1995). По расчетам автора (Сидоров Г.Н. и др. (2004) в 1995-2002 гг. для экспертизы в ветеринарные лаборатории попадал биоматериал только от одной из 13,4 больных бешенством лисиц, от одного из 34 волков и от одной из 220-230 енотовидных собак и корсаков.

Роль диких собачьих в заражении сельскохозяйственных животных бешенством и, следовательно, их опосредованном влиянии на размеры экономических потерь в животноводстве обстоятельно изучалась Ведерниковым В.А. (1987). Характерен такой пример автора: из 29 случаев достоверного установления источника бешенства заболело (пало и уничтожено) 28 голов крупного рогатого скота различных половозрастных групп от укусов лисиц и только в одном случае – от собаки.

Таким образом, исходя из данных научной литературы, социально-экономическое значение бешенства огромно. В социальном плане, в первую очередь, это высокая смертность населения в отдельных регионах земного шара; в экономическом – большие экономические потери вследствие гибели и вынужденного уничтожения сельскохозяйственных продуктивных животных и представителей дикой фауны, а также больших затрат на противоэпидемические и противоэпизоотические антирабические мероприятия.

1.4 Методы лабораторной диагностики бешенства

При проведении противоэпизоотических мероприятий при бешенстве животных, а также назначении курса антирабических прививок пострадавшим от укусов людей немаловажное значение имеет своевременная и точная диагностика (Хисматуллина Н.А. и др., 2001; Груздев К.Н. и др., 2001; Недосеков В.В., 2002).

Необходимость постоянного контроля за состоянием природных очагов бешенства и расширение работ за последние годы по оральной вакцинации диких животных требуют совершенствования экспресс-методов выделения и индикации вируса. Диагностика бешенства проводится на основании комплекса эпизоотологических, клинических данных и лабораторных методов исследования. В связи с тем, что классическое течение бешенства со всеми характерными для него стадиями у диких и домашних животных в настоящее время проявляется редко, окончательный и достоверный диагноз может быть поставлен только лабораторным методом (Жуков В.И., 1988).

Методы лабораторной диагностики бешенства основаны как на обнаружении цитоплазматических включений (телец Бабеша-Негри) или специфического антигена (световая и люминесцентная микроскопия, реакция диффузионной преципитации, иммуноферментный анализ), так и выделении рабического вируса в биологической пробе на лабораторных животных или в культуре клеток, а также обнаружении генома возбудителя бешенства (Хисматуллина Н.А. с соавт., 2001).

Диагноз на бешенство считается установленным при получении положительных результатов хотя бы по одному из многочисленных методов лабораторного исследования, включающих световую микроскопию, реакцию диффузионной преципитации в агаровом геле (РДП), метод флуоресцирующих антител (МФА), биологическую пробу на лабораторных животных, выделение вируса в культуре клеток, иммуноферментный анализ (ИФА), индикацию вируса с помощью моноклональных антител, обнаружение генома вируса, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), реакцию нейтрализации.

Световая микроскопия. Сущность метода заключается в выявлении в клетках нервной ткани специфических цитоплазматических включений – телец Бабеша-Негри. Лабораторная диагностика с помощью обнаружения телец Бабеша-Негри описана во многих классических обзорах и руководствах по бешенству и широко используется в практике лабораторных исследований (Ковалев Н.А., 1982; ВОЗ, 1996; Селимов М.А., 1987; Груздев К.Н., Недосеков В.В., 2001; Tierkel, E., Иванов В.С., и др., 2007; Таршис М.Г. и др., 1990; 1973; Atanasiu P., 1975). Общеизвестно, что тельца Бабеша-Негри являются исключительно специфичными для бешенства и их обнаружение является достоверным диагностическим признаком.

Выявление телец Бабеша-Негри проводят методом световой микроскопии в мазках-отпечатках ткани мозга животных на предметном стекле и окрашивания с помощью красок по Селлерсу, Гимза и Манну в соответствии с ГОСТом 26075-84 (Методы лабораторной диагностики бешенства).

Одним из преимуществ метода является его экспрессность, составляющая 45-60 минут. Вместе с тем, по данным Tierkel E. (1973), тельца Бабеша-Негри чаще обнаруживают в стадии выраженной клинической картины болезни, поэтому у вынужденно уничтоженных животных они могут отсутствовать или проявляться в виде единичных, мелких включений. Кроме того, метод световой микроскопии обладает низкой чувствительностью. Так, по данным Груздева К.Н., Недосекова В.В. (2001), тельца Бабеша-Негри выявляются только в 65-85% случаев бешенства, а по сообщению Полещук Е.М. и соавт. (2013) – лишь в 40%.

Не всегда удается обнаружить тельца Бабеша-Негри из мозга больных и павших от бешенства животных, так как частота их выявления зависит от продолжительности инкубационного периода, вида возбудителя и свойств штамма вируса, поэтому их отсутствие не является достоверным диагнозом (Ведерников В.А., с соавт., 1974).

Кроме того, при световой микроскопии необходимо дифференцировать тельца Бабеша-Негри от телец-включений, характерных для других вирусных болезней (чума, гепатит собак, энцефалит лисиц), а также неспецифических

артефактов, таких, например, как ацидофильные мелкие включения у кошек и грызунов, особенно у белок и собак, погибших в результате отравления змеиным ядом или пораженных электрическим током (Фоменко М.В., 1997; Kantorovich R. et al., 1964; Baer G. et al., 1968; Jorgenson R. et al., 1976).

Реакция диффузионной преципитации в агаровом геле (РДП) – разработана и широко используется для лабораторной диагностики бешенства (Бучнев К.Н., 1963; Бусыгин К.Ф., 1964; Коломакин Г.А., 1970; ГОСТ 26075-84 (СТ СЭВ 3452-81. Методы лабораторной диагностики бешенства). С этой целью налажен выпуск «Набора компонентов для диагностики бешенства животных в реакции диффузионной преципитации (РДП)» (производитель ВНИИТиБП, Щелково).

Этим методом допускается исследовать несвежий патологический биоматериал, контаминированный бактериальной микрофлорой. Одним из преимуществ метода является его экспрессность (45-60 мин.). Вместе с тем, метод не вполне технологичен, так как результаты РДП учитывают через 6, 24, 48 ч после ее постановки. Следует отметить, что по данным ряда авторов (Селимов М.А., 1978; Недосеков В.В., 2003), РДП является низкочувствительным тестом и выявление вирусного антигена в исследуемом материале составляет от 45 до 70%. Реакция дает положительный результат лишь при достаточной концентрации вирусного антигена, составляющей не менее $4,5 \lg LD_{50}$ (Груздев К.Н., Недосеков В.В., 2001) и при отрицательных результатах РДП нельзя исключить бешенство. В связи с изложенным, РДП в настоящее время практически не используется.

Кроме того, отрицательным моментом является то, что биоматериал, консервированный глицерином, формалином, ацетоном и спиртом для РДП становится не пригодным (Ведерников В.А., 1974; Ковалев Н.А., 1982), а реакция бывает положительной только тогда, когда антиген и антитело находятся в соответствующей пропорции (Коломакин Г.А. и др., 1972; Фоменко М.В. с соавт., 1977).

Метод флуоресцирующих антител (МФА) из всех существующих методов микроскопической диагностики бешенства признан

высококочувствительным, специфичным и экспрессным (Бусыгин К.Ф. с соавт., 1983, 1984; ВОЗ, 1996, Иванов А.В. с соавт., 2010; Ключева Е.В., Селимов М.А., 1967; Хисматуллина Н.А. с соавт., 1995; Метлин А.Е., 2006), а полученные результаты до 98,7% совпадают с данными биологической пробы на белых мышах (Анина-Радченко Н.Д., 1979; Хисматуллина Н.А., 2000; Недосеков В.В., 1998; Shcnaider L., 1969).

Наиболее широкое распространение получил прямой вариант иммунофлуоресценции (Шеточенко М.А. и др., 1979; Селимов М.А., 1978; Иванов А.В. и др., 2010; Meslin F., 1996), порог чувствительности которого составляет 3,8 lg LD₅₀/мл, а время анализа не превышает 5-6 часов (Хисматуллина Н.А. и др., 2001).

Сообщается о возможности прижизненного выявления антигена вируса бешенства в МФА в эпителиальных клетках роговицы (корнеальная проба) и в биоптатах кожи больных бешенством (Ковалев Н.А., Шашенько А.С., 1970; Хисматуллина Н.А. и др., 2003; Schneider L., 1969; Zimmervann T., 1971), в опытах, которые проводились на экспериментально зараженных овцах и кроликах, положительный диагноз был поставлен за 3-5 дней до появления характерных признаков болезни.

С помощью МФА окончательный диагноз на бешенство может быть поставлен уже на 4-8 день после заражения белых мышей исследуемым материалом (Груздев К.Н., Недосеков В.В., 2001). Вместе с тем, для исследований в МФА пригоден только свежий или свежемороженый материал. Кроме того, нельзя исключить неспецифическое свечение при исследовании материала, консервированного глицерином (Хисматуллина Н.А. с соавт., 2001; Груздев К.Н., Недосеков В.В., 2001).

По заключению многих ученых МФА является высококочувствительным тестом и при квалифицированном выполнении полученные результаты совпадают с данными биологической пробы до 98,7% (Селимов М.А., 1978; Хисматуллина Н.А. и др., 2001; Груздев К.Н., 2001; Недосеков В.В., 2003). Метод используется

также для титрации антирабических антител с помощью теста ингибции фокусов флуоресценции (Недосеков В.В. и др., 1998).

В зарубежной и отечественной литературе имеются сообщения о перспективности и результатах применении метода флуоресцирующих антител (МФА) для прижизненной диагностики бешенства у человека и животных, а также контроля эффективности вакцинопрофилактики болезни (Субботина Л.С. и др., 1985; Ботвинкин А.Д. и др., 1986; Хисматуллина Н.А. и др., 1989, 2001, 2012; Nicholson K., 1982; Cliquet L., 2000). При этом в качестве биоматериала используют отпечатки роговицы глаз у экспериментально зараженных животных (Ковалев Н.А., Шашенько А.С., 1970; Zimmermann I., 1971), а также у больных гидрофобией (Мишаева Н.П., 2002; Баширова и др., 2007; Хисматуллина Н.А. и др., 2003, 2014; Laurent D. et al., 2008).

В научной литературе имеются сообщения о применении МФА на основе моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства (Тимиргалеев Р.В., 2006; Р.В. Грибенча С.В. и др., 2013), значительно повышающие результативность теста. В диагностических лабораториях России МФА является одним из основных тестов в диагностике бешенства и выполняется с использованием коммерческих наборов «Флуоресцирующего антирабического глобулина» на основе поликлональных антител производства ФГБУ ФЦТРБ-ВНИВИ (Казань) и ФГБУ ВНИТИБП (Щелково).

Биологическая проба на лабораторных животных – один из наиболее чувствительных и достоверных методов лабораторной диагностики бешенства (Atanasiu P., 1975) и широко используется в практике диагностических исследований. В диагностических ветеринарных лабораториях России эта проба регламентирована с последующей идентификацией антигена вируса бешенства методом флуоресцирующих антител (Государственный стандарт СССР 26075. Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики бешенства. М., 1984).

Биопробу считают положительной, если в препаратах из мозга зараженных мышей обнаруживают тельца Бабеша-Негри, или выявляют рабический антиген в

МФА или РДП. Недостатками пробы являются длительность исследования (до 30 дней), потенциальная опасность выноса возбудителя во внешнюю среду, а также невозможность использования разложившегося биоматериала. Кроме того, постановка биопробы неэкономична, так как требует дополнительных затрат на лабораторных животных при их содержании в специально оборудованном виварии и работы подготовленного обслуживающего персонала (Селимов М.А., 1978; Хисматуллина Н.А. с соавт., 2001).

Реакция нейтрализации (РН) на мышах. Используется для идентификации возбудителя бешенства, а также количественной оценки и определения активности антирабической сыворотки и иммуноглобулина (Johnson H, 1975; Atanasiu P., 1975). Следует отметить, что РН на белых мышах достаточно трудоемкий и длительный по времени метод (Stantic-Pavlinic M., 2006).

Для контроля уровня поствакцинальных антирабических антител ВОЗ рекомендует применять реакцию нейтрализации в культуре клеток ВНК-21/13 (Manual OIE, 2005).

Кроме того, для диагностики бешенства были предприняты попытки использования таких диагностических тестов как реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и ИФА (ELISA) (Селимов М.А., 1978).

Выделение вируса бешенства в культуре клеток. Реальная возможность использования систем культур тканей для диагностики бешенства, создалась после установления высокой чувствительности клеток нейробластомы мыши, в частности, клонов 18 и 1300, а также клеток CER, клеток почки сирийского хомячка (ВНК-21, клон 13) к уличному вирусу бешенства, эквивалентность которых в сравнении с другими тестами достигает 93,8% (Amano T., 1972; Breakfield X, 1976; Smith A.L. et al., 1978; Glick M., 1973; Rudd R. et al., 1980, 1987; Portnoi D. et al., 1982; Smith A., 1978; Barrat J. et al., 1986; Webster W.A., 1987; Татаров А.Г. и др., 1987; Хисматуллина Н.А., 1989).

Установлена перспективность использования перевиваемой культуры клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1) для выделения уличного вируса бешенства из биоматериала, с последующей идентификацией его с

помощью МФА. В нашей стране, имеются данные о применении перевиваемой культуры клеток невриномы Гассерова узла крысы для выделения уличных штаммов рабического вируса, с последующим обнаружением рабического антигена с помощью метода флуоресцирующих антител (МФА) (Селимов М.А., 1978; Авцын А.П. и др., 1985; Татаров А.Г. и др., 1987; Хисматуллина и др., 1989, 2001; Юсупов Р.Х. и др., 1989; Чернов С.М. и др., 1989; Иванов А.В. и др., 2010), а также сообщение Wiktor T., Koprowski H. (1978). При этом тест в культуре клеток НГУК-1 рассматривается как контрольный, подтверждающий результаты МФА и дополняющий биопробу с инокуляцией биоматериала белым мышам.

При этом срок анализа составляет 2-3 суток после заражения культурой клеток НГУК-1. Антиген вируса выявляется в цитоплазме клеток НГУК-1 в виде ярких желто-зеленых гранул различной формы и величины – от едва заметных до 15-20 мкм в диаметре, иногда отмечается большое количество мелких желто-зеленых частиц (до 5 мкм) округлой и овальной формы. Метод выделения вируса бешенства в культуре клеток НГУК-1 рассматривается как альтернатива биопробы на белых мышах, так как эквивалентность их совпадения составляет 93,8% (Smith A., 1978; Portnoi D. et al., 1982). Отметим, что МЭБ рекомендовано использование перевиваемой культуры клеток ВНК-21/13 для оценки поствакцинального иммунитета (Manual OIF, 2005).

Вместе с тем следует отметить, что метод применяется ограниченно, так как требует высокой квалификации и необходимостью постоянного поддержания культуры.

Иммуноферментный анализ (ИФА) имеет ряд преимуществ перед другими серологическими тестами: высокая чувствительность, стабильность соединений меченных ферментами; оборудование для измерения продукта иммуноферментной реакции отличается простотой и невысокой стоимостью, анализ может быть легко автоматизирован, что позволяет применять его для проведения массовых обследований. Порог чувствительности метода ИФА для диагностики чумы составляет 3,3 Ig LD₅₀/мл, а время анализа 5-6 часов (Селимов М.А., 1978; Wiktor T., Koprowski H., 1978).

Ряд авторов считают, что ИФА полезен не столько в диагностике бешенства, сколько при контроле иммуногенной активности антирабических вакцин (Недосеков В.В., 1998; Груздев К.Н. и соавт., 2008).

Имеются сообщения о применении ИФА для индикации вируса бешенства в культуральной жидкости или мозге экспериментально и спонтанно зараженных животных (Wiktor T., Koprowski H., 1978; Schneider L., 1983).

Показано, что метод может быть использован как экспресс-способ для постановки предварительного диагноза, так и в сочетании с методом иммунофлуоресценции и биологической пробой, что расширяет возможности лабораторной диагностики бешенства (Зуев Н.Я. и др., 1984; Хисматуллина Н.А. и др., 1985-2004; Ботвинкин А.Д. и др., 1987; Цетлин Е.М., 1996; Чернов С.М. и др., 1989; Назаров Н.А. и др., 2003, 2006, 2008).

Разработаны различные варианты ИФА для определения титра антирабических антител в сыворотке крови человека и животных (Субботина Л.С., 1985; Ботвинкин А.Д. с соавт., 1986; Бойко А.А. с соавт., 1987; Сазанова Э.Я. с соавт., 1998; Хисматуллина Г.А. с соавт., 1999, 2000; Сологуб Т.В., 1992; Sureu P. et al., 1983). Показана перспективность использования непрямого варианта ИФА, для определения специфических к вирусу бешенства антител в сыворотках крови вакцинированных против бешенства животных (А.Д. Ботвинкин и соавт., 1990; В.И. Клюкина и соавт., 2008; А.М. Гулюкин и соавт., 2010; P. Atanasiu et al., 1977; K.G. Nicholson et al., 1982). Однако для проведения непрямого варианта ИФА требуется наличие антивидовых пероксидазных конъюгатов к каждому виду животного, что является препятствием к его широкому практическому использованию.

В лабораторной практике часто применяется так называемый сэндвич-вариант ИФА, преимуществом которого перед конкурентным методом является большая чувствительность и возможность использования неочищенных антигенов (Wiktor T., Koprowski H., 1978).

Показано, что одновременное применение двух экспресс-методов – ИФА и МФА обеспечивает более надежный диагноз. При этом визуальный учет

результатов ИФА не требует специальной аппаратуры, что позволяет использовать его в полевых и лабораторных условиях, не оснащенных люминесцентным микроскопом (Селимов М.А., 1978).

Выявлена тесная корреляция между показателями ИФА и реакцией нейтрализации при бешенстве (Коваклова Л. и др., 1984; Субботина Л.С. и др., 1985; Nicholson K. et al., 1982). Имеются сообщения об обнаружении антител к вирусу бешенства с помощью иммунопероксидазного монослойного метода (Недосеков В.В. и др., 1998).

Идентификация рабического вируса с помощью моноклональных антител. Перспективным в диагностике бешенства является и применение моноклональных антител (МКА), обладающих моноспецифичностью в сравнении с поликлональными антисыворотками и, позволяющими проводить идентификацию штаммов рабического вируса, в частности, дифференцировать серотипы 1-7 и 9-12 вирусов группы бешенства (Селимов М.А. и др., 1983; Бонвинкин А.Д. и др., 1990, 1992; Молодкин В.А. и др., 2009; Полещук Е.М. и др., 2013; Webster W., et al., 1986; King A. et al., 1990; Smith J., King A., 1996).

В настоящее время, МКА успешно применяются для диагностики антигенного анализа лиссавирусов, селекции аттенуированных и высокоиммуногенных мутантов вакцинного вируса, для картирования антигенной структуры рабического гликопротеина, идентификации эпизоотических вариантов полевых штаммов, а также дифференциации полевых и вакцинных штаммов вирусов в опытах по оральной иммунизации диких плотоядных (Ботвинкин А.Д., 1992; Грибенча С.В., 1993; Селимов М.А. с соавт., 1994; Ботвинкин с соавт., 2004; Metlin A.E., 2004).

Использование МКА позволяет проводить также оценку антирабических вакцин по выявлению эпитопов гликопротеина и других структурных белков вируса бешенства, которые участвуют в формировании иммунного ответа организма (Ковалев Н.А., Шашенько А.С., 1970). Имеются данные о применении МКА в качестве терапевтического средства при экспериментальном бешенстве (Селимов М.А. и др., 1987).

В нашей стране изучением антигенных особенностей вирусов бешенства, циркулирующих на территории России, занимались такие известные рабиологи как Селимов М.А. и соавт. (1987-1989, 1994), Ботвинкин А.Д. и соавт. (1990, 1992, 1994), Грибенча С.В. (2003, 2008), Кузьмин И.В. и соавт. (1992). Впервые в стране авторы использовали МКА к нуклеопротеиду из панелей института Wistar (Филадельфия, США) (Smith J., King A., 1996), Центральной ветеринарной лаборатории Великобритании (CVL, Уэйбридж) (Полещук Е.М. и соавт., 2013), и Центра вирусных болезней животных (Тюбенген, Германия) (King, A., 1990).

Установлено, что на территории России среди наземных млекопитающих распространены штаммы вирусов только серотипа 1, а среди летучих мышей (рукокрылые) – циркуляция вирусов серотипов 1 и 5 (Ботвинкин А.Д. и др., 1990, 2004) . Серотип 5 в настоящее время соответствует виду *European bat lyssavirus-1* (*EBLV-1*, лиссавирус европейских летучих мышей 1-го типа). В России вирус этого генотипа был впервые выделен в 1985 г. от девочки, укушенной летучей мышью в Белгороде (Леонова Г.Н. и др., 2009).

В 2003 г. среди рукокрылых в России была установлена циркуляция двух новых вирусов с оригинальными генотипами – «Иркут» (*Irkut virus*), выделенный Ботвинкиным А.Д. от трубконоса сибирского *Murina leucogaster* в Восточной Сибири (Иркутск) и Западной Сибири – Кавказский лиссавирус летучих мышей (*West Caucasian batvirus*), обнаруженный Полещук Е.А. и Ботвинкиным А.Д. (цит. по Е.М. Полещук и соавт. (2013).

В 2007 г. в Приморском крае из биоматериала от погибшей женщины, укушенной летучей мышью, был выделен штамм «Озерное», аналогичный вирусу *Irkut* (Kuzmin I., et al., 2008). Это второй случай гибели людей от бешенства после укуса летучими мышами в стране и третий случай выделения лиссавирусов «не серотипа 1» на территории России.

Среди представителей вирусов серотипа 1, циркулирующих среди наземных млекопитающих в России, было выявлено 9 антигенных вариантов (Грибенча С.В., 1993; Ботвинкин А.Д. и др., 2004; Metlin A. et al., 2004). При этом связь с каким-либо специфическим хозяином генетическое подтверждение не получила.

Обнаружения генома вируса бешенства. Для обнаружения генома вируса бешенства используют два метода: дот-гибридизацию и обратнo-транскриптазную полимеразную цепную реакцию (ОТ-ПЦР).

Дот-гибридизация. Сущность метода заключается в выявлении и идентификации РНК вируса с использованием специфических ДНК зондов, в качестве которых используют меченый P^{32} фаг M_{13} , несущий вставки размером 200-400 п.о., комплементарные различным генам вакцинного штамма вируса бешенства (штамм *PV*) или рекомбинантную плазмиду, содержащую 96% кодирующей последовательности гена нуклеопротеина вируса бешенства (штамм *ERA*). Гибридизация *in situ* может применяться для ретроспективной диагностики в случаях, когда выявление специфического антигена не всегда дает четкие результаты и невозможно выделить вирус в культуре клеток или в биопробе на лабораторных животных (Tierkel E, 1973).

Полимеразная цепная реакция. Одним из широко используемых методов детекции РНК вируса бешенства является обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) (Sacramento D. et al., 1991; Tordo N. et al., 1996; Crepin P. et al., 1998; Nadin-Davis S. et al., 2003; Kuzmin I. et al., 2004, 2005; Nagaraj T. et al., 2006; Bourhy H. et al., 2008). С помощью ПЦР диагноз можно поставить в срок до 5 часов (Nadin-Davis S. et al., 1996). Кроме того, применение автоматического секвенирования позволяет получить характеристику изолятов.

В большинстве случаев ОТ-ПЦР применяют для штаммовой дифференциации вируса бешенства (Nadin-Davis S.A. et al., 1996; Crepin P. et al., 1998; Nadin-Davis S. et al., 2003; Wakeley P.R. et al., 2005; Nagaraj T. et al., 2006) и идентификации полевых изолятов вируса (Sacramento D. et al., 1991; Tordo N. et al., 1996; Bourhy H. et al., 2008) при высокой чувствительности этой реакции, которая составляет 1-10 $LD_{50}/мл$.

Установлено применение ОТ-ПЦР для прижизненного обнаружения вирусной РНК в слюне, спинномозговой жидкости инфицированных животных и в биоптате слюнной железы (Crepin P. et al., 1998; Kuzmin I.V. et al., 2004, 2005; Nagaraj T. et al., 2008; Kumar S. et al., 2008;).

Наиболее приемлемым с точки зрения описанных выше недостатков биопробы и принятым за прототип, является способ выявления РНК вируса бешенства, основанный на ОТ-ПЦР, включающей выделение РНК вируса из вирусосодержащей суспензии, синтез олигонуклеотидных праймеров на ген нуклеопротеина, амплификацию РНК вируса в ОТ-ПЦР, специфическую идентификацию продуктов ОТ-ПЦР с помощью дот-блот анализа (Tordo N., 1996). При этом выделение РНК в ОТ-ПЦР основано на фенольно-хлороформном методе, позволяющем выделять тотальную РНК без посторонних примесей (фосфолипиды головного мозга и др.), оказывающие ингибирующее действие на ОТ-ПЦР.

Вместе с тем, для выделения высококачественной РНК фенольно-хлороформным методом требуется соблюдение низкотемпературных условий. В то же время часто используемый сорбентный метод выделения РНК прост в исполнении и не требует соблюдения особых температурных условий. Однако данный метод не позволяет получать качественные нативные образцы РНК. В связи с этим, чувствительность одностадийной ОТ-ПЦР значительно снижается. Кроме того, количество вирусного материала в исследуемых образцах может быть ниже детектируемого ПЦР, вследствие несоблюдения условий хранения или транспортировки клинического материала и др.

Для определения низких количеств вирусной РНК в пробах в научной литературе описано применение гнездовой модификации ПЦР, позволяющей повысить чувствительность в 10000 раз (Taylor M.G. et al., 1991; Oxford Univ.: IRL Press, 1995).

Гнездовая ПЦР заключается в амплификации в первом раунде реакции фрагмента к ДНК, служащего матрицей для второго раунда. Данный метод разработан и применяется в отношении ряда патогенов (Поклонская Н.В. с соавт., 2003). Кроме того, различные модификации метода ПЦР применяются в диагностике энтеровирусных инфекций (Eggerding F.A. et al., 1991; Vyse A.J., Jin L., 2002; Jin L., Thomas, B., 2007; Hubschen J.M. et al., 2008). Однако метод гнездовой ОТ-ПЦР для детекции РНК вируса бешенства ранее не использовался.

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.

Aravan lyssavirus. Выделен в 1991 году от насекомоядной летучей мыши в Кыргызстане, распространён в Азии. Данных об инфицированности людей нет.

Australian bat lyssavirus. Выделен от растительноядной летучей мыши в Австралии. Известны два случая гибели людей инфицированных данным вирусом.

Bokeloh bat lyssavirus. Выделен в 2010 году от насекомоядной летучей мыши в Германии, распространён в Европе. Данных об инфицировании людей нет.

Duvenhage lyssavirus. Выделен от насекомоядной летучей мыши в ЮАР, распространён в Африке. Известно три случая инфицирования человека.

European bat 1 lyssavirus. Выделен в 1954 году от ребенка, укушенного летучей мышью; позднее выделен от насекомоядной летучей мыши в Дании, распространён в Европе.

European bat 2 lyssavirus. Выделен в 1986 году от зоолога, умершего в Финляндии с диагнозом бешенство, позднее выделен от насекомоядной летучей мыши в Англии и Нидерландах, распространён в Европе.

Ikoma lyssavirus. Выделен от насекомоядной летучей мыши в Южной Африке, распространён в Африке. Данных об инфицировании людей нет.

Irkut virus. Выделен в 2002 году от насекомоядной летучей мыши в Иркутской области, распространён в Евразии. Есть данные об одном летальном случае у человека.

Khujand lyssavirus. Выделен в 2001 году от насекомоядной мыши в северном Таджикистане, распространён в Азии. Есть данные об одном летальном случае у человека. Данных об инфицировании людей нет.

Lagos bat lyssavirus. Выделен от растительноядной летучей мыши в

Нигерии, также был выделен от насекомоядной летучей мыши, распространён в Африке. Данных об инфицировании людей нет.

Mokola lyssavirus. Выделен от землеройки, а затем от детей с синдромами заболеваний ЦНС в Нигерии, распространён в Африке.

Rabies lyssavirus. Первые описания бешенства находят в Вавилонских рукописях 2-3 века до нашей эры. Вирусная природа бешенства открыта в 1903 году в институте Пастера. Поражает всех теплокровных позвоночных, распространён повсеместно. По данным ВОЗ погибает 50 000 человек ежегодно.

Shimoni bat lyssavirus выделен от растительноядной летучей мыши в Кении, также был выделен от насекомоядной летучей мыши, распространён в Африке. Данных об инфицировании людей нет.

West Caucasian bat lyssavirus выделен в 2002 году от насекомоядной летучей мыши в Краснодарском крае, распространён в Евразии. Есть данные об одном летальном случае у человека. Данных об инфицировании людей нет.

Геном вируса бешенства представлен единой односпиральной линейной молекулой минус-РНК, состоящей из 11932 нуклеотидов. Вирионная РНК рабдовирусов не обладает инфекционностью. В вирионах рабдовирусов обнаружено 5 полипептидов (гликопротеин, матриксный белок М, нуклеопротеин N, фосфопротеин NS, обратная транскриптаза L (РНК-зависимая РНК-полимераза), три из которых (L, N, S,) связаны с нуклеокапсидом, а два (G, M) входят в состав липопротеидной оболочки. Белок G гликолизирован, образует на поверхности вириона выступы, индуцирует синтез вируснейтрализующих антител и обеспечивает развитие иммунитета. Белки нуклеокапсида N и NS имеют группоспецифические антигенные детерминанты. Белки нуклеокапсида L и NS являются компонентами транскриптазы. Гены расположены в следующем порядке: 3'-N-NS-M-G-L-5' (Tordo N. et al., 1986, 1988, 1996).

На территории России в популяциях наземных млекопитающих циркулируют две основные группы вирусов группы бешенства. Первая – это группа арктических вирусов, в которой выделяются две подгруппы – собственно арктических А и арктически подобных Б. Ко второй группе относят широко

распространенные вирусы-космополиты (Stantic-Pavlinic M., 2006; Kuzmin I.V. et al., 2008). По данным авторов, на территории России эта группа представлена четырьмя подгруппами. Описаны филогенетические подгруппы вирусов бешенства соответствующие определенным географическим территориям. При этом связь с каким-либо одним специфическим хозяином генетическое подтверждение не получила.

Филогенетический анализ геномов вируса бешенства. Является одним из подходов к теоретическому изучению структуры и функции генетических макромолекул (РНК, ДНК, белков) и их эволюционного преобразования. Метод основан на сравнении близких по структуре или по функции генов (или белков), главным образом в сравнении их первичных последовательностей.

Создание банка данных на основе филогенетического анализа позволит судить о структуре генов, нуклеотидных различиях и датирования событий молекулярной эволюции циркулирующих вирусов бешенства на различных территориях (Жарких А.А., 1985).

Mannen K. et al (1991) впервые определил большую зависимость различий в N-гене лиссавирусов от географической локализации, чем от хозяйской специфичности. Kiss N., et al (1995) представили первое сравнение между генотипами и молекулярными различиями внутри первого генотипа. Филогенетический анализ гена нуклеопротеина 82-х изолятов лиссавирусов подтвердил существование шести генотипов вируса.

1.5 Специфическая профилактика бешенства животных

На современном этапе борьба с бешенством включает уничтожение бродячих собак, снижение плотности популяции диких животных – переносчиков и резервуаров вируса бешенства, а также вакцинацию восприимчивых животных (Авилов В.С., Седов В.А., 1994; Ведерников В.А. и соавт., 1988; Джупина С.И., Юрик С.А., 1997; Иванов В.В. и соавт., 2007).

Одним из основных и эффективных способов предотвращения бешенства является своевременная и эффективная иммунопрофилактика, основанная на использовании антирабических вакцин (Pastoret P., 2002). С момента создания Л. Пастером первой антирабической вакцины прошло более 100 лет. За это время предложено, апробировано и внедрено в ветеринарную практику множество разных препаратов против бешенства (Sureau P., 1987; Perrin P. et al., 1999).

Главную роль в борьбе с бешенством на сегодняшний день играет профилактика заболевания восприимчивых животных, прежде всего плотоядных, способных к дальнейшей передаче возбудителя.

Анализ эпизоотической ситуации показывает, что в России имеются стойкие природные очаги заболевания, поддерживаемые, в первую очередь, за счет диких плотоядных (лисица, енотовидная собака и др.), являющихся основным резервуаром и источником вируса бешенства. В эпизоотический процесс вовлекаются также собаки и кошки, что требует повышенного внимания в свете их непосредственной близости к человеку (Елаков А.Л. и др., 2011). Основу профилактики бешенства у домашних животных составляет иммунизация их при помощи моно- и ассоциированных вакцин.

Разработка антирабических вакцин ведет свое начало с XIX века, когда Луи Пастер впервые продемонстрировал возможность защитить собак от принудительного заражения бешенством (цит. по Селимову М.А., 1978). С тех пор для практического применения разработано и апробировано большое количество различных ветеринарных антирабических вакцин (мозговые, эмбриональные, культуральные и др.). Совершенствование технологии производства приводит к отказу от устаревших образцов в пользу более прогрессивных и более качественных препаратов.

С учетом принципов изготовления и механизмов действия в организме, все антирабические вакцины условно можно разделить на 4 группы: цельновирсионные, субъединичные, рекомбинантные и ДНК-вакцины.

В настоящее время для профилактики бешенства у домашних и сельскохозяйственных животных в России зарегистрированы, производятся и

применяются инактивированные культуральные антирабические вакцины из фиксированных штаммов вируса бешенства: Щелково-51, ТС-80, Внуково-32, ERA-SB20M. Штамм Щелково-51 получен путем адаптации штамма «Овечий-ГНКИ» (вариант Пастеровского штамма) к перевиваемой культуре клеток почки сирийского хомячка ВНК-21/13 (Иванов В.С., 2001).

Из штамма «Щелково-51» ФГУП «Щелковский биокомбинат» (Московская обл.) производит: вакцину антирабическую инактивированную сухую культуральную из штамма «Щелково-51» для собак и кошек Рабикан, вакцину антирабическую из штамма «Щелково-51» инактивированную жидкую культуральную Рабиков и вакцину антирабическую инактивированную сухую культуральную из штамма «Щелково-51». Все эти препараты содержат инактивированный β -пропиолактоном вирус бешенства и предназначены для профилактической и вынужденной иммунизации домашних животных: Рабикан – для собак и кошек, Рабиков – для крупного и мелкого рогатого скота и лошадей, вакцина антирабическая инактивированная сухая культуральная из штамма «Щелково-51» – для всех видов животных. Вакцина антирабическая инактивированная сухая культуральная из штамма «Щелково-51» может поставляться в комплекте с растворителем (РКАВ), содержащим сапонин и предназначенным для повышения иммуногенности данной вакцины только у крупного и мелкого рогатого скота. На сегодняшний день ФГУП «Щелковский биокомбинат» является крупнейшим в Российской Федерации производителем антирабической вакцины (около 10 млн. доз).

Для предупреждения распространения бешенства и оперативной ликвидации выявляемых очагов этого опасного зооноза ветеринарная служба страны ежегодно проводит плановую профилактическую вакцинацию инактивированными культуральными антирабическими вакцинами из штамма Щелково-51: «Рабикан» - для домашних и «Рабиков» - для сельскохозяйственных животных (Елаков А.Л. и соавт., 2007).

Штаммы «Внуково-32» и ERA являются дериватами штамма SAD (State Alabama Dufftring), который был выделен в США от заболевшей бешенством

собаки и прошел 130 последовательных пассажей через мозг мышей и 25 чередующихся пассажей через мозг мыши и клетки почки сирийского хомячка. Штамм ERA получен из штамма SAD путем проведения 10-ти пассажей на развивающихся куриных эмбрионах и 30 пассажей в культуре клеток почки эмбриона свиней (Селимов М.А., 1978). Штамм ERA был адаптирован к культуре клеток ВНК-21 и после проведения 20 последовательных пассажей получил название ERA-CB20M (Грибенча С.В. с соавт., 2012).

Из штамма ERA-CB20M вируса бешенства инактивированного β -пропиолактоном и сорбированного на гидроокиси алюминия ЗАО «Ветбиохим» (г. Москва) производит следующие ассоциированные вакцины:

– Мультикан-8 – вакцина против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного, коронавирусного энтеритов, лептоспироза и бешенства собак;

– АСТЕРИОН DHPPiR – вакцина против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного энтерита, парагриппа и бешенства собак;

– АСТЕРИОН DHPPiLR – вакцина против чумы, аденовирусных инфекций, парвовирусного энтерита, парагриппа, лептоспироза и бешенства собак.

Следует отметить, что среднегодовой объем выпускаемых ассоциированных вакцин, содержащих антирабический компонент, не превышает в стране 200 тыс. доз.

В нашей стране и за рубежом для оральной иммунизации диких плотоядных (лисица, енотовидная собака и песец) на определенном этапе успешно применялась живая культуральная вакцина из штамма «Внуково-32» (Гришок А.П. и соавт., 1985, 1987, 1988; Селимов М.А., 1987, 1998; Цвиль Л.А., и соавт., 1998).

Штамм «Внуково-32» также был получен из штамма ERA путем проведения 10 пассажей в первичной культуре клеток почки сирийского хомячка (ПСХ) при 37°C и 163 пассажей в ПСХ при температуре 32°C (Елаков А.Л., 2013). Из штамма «Внуково-32» репродуцированного в первичной или перевиваемой культуре клеток сирийского хомяка, инактивированного ультрафиолетовыми лучами и лиофилизированного в специальной защитной среде, ЗАО «Ветзвероцентр» (г.

Москва) производит рабический компонент ассоциированной вакцины против бешенства, чумы плотоядных, парвовирусного энтерита, инфекционного гепатита, аденовируса и лептоспироза собак Дипентавак, предназначенной для иммунизации собак. Годовой объем выпускаемой антирабической вакцины не превышает 100 тысяч доз.

Штамм ТС-80 был получен из штамма V-319, выделенного из слюнной железы летучей мыши в Мексике, путем адаптации к перевиваемой культуре клеток ВНК-21. Он прошел 10 пассажей в культуре клеток ВНК-21, а затем свыше 70 пассажей в перевиваемой культуре клеток почки сайги (ПС), после чего был взят за основу при конструировании инактивированной вакцины против бешенства животных (Вишняков И.Ф. и др., 1998).

Из штамма ТС-80 во ВНИИВВиМ (Владимирская обл.) производится вакцина антирабическая инактивированная культуральная сорбированная жидкая, содержащая репродуцированный в культуре клеток ПС инактивированный теотропином вирус бешенства, сорбированный на гидроокиси алюминия, и предназначена для иммунизации крупного и мелкого рогатого скота, собак и кошек. Годовой объем выпуска данной вакцины не превышает 1 млн. доз.

Кроме отечественных вакцин в нашей стране зарегистрированы и применяются также следующие зарубежные препараты, содержащие в своем составе компонент бешенства:

– препараты производства компании Merial (Франция) – Рабизин®, Квадрикват®, Эурикан DHPPI2-LR, Гексадог®, содержащие инактивированный β -пропиолактоном штамм GS-57 вируса бешенства, сорбированный на гидроокиси алюминия (Добротворский Е.В., 2002). Вакцина Рабизин предназначена для иммунизации сельскохозяйственных, домашних и диких животных против бешенства. Ассоциированные вакцины Квадрикват®, Эурикан DHPPI2-LR и Гексадог® предназначены, соответственно, первая – для кошек, две остальные – для собак, и в составе жидкого компонента содержат инактивированный вирус бешенства;

– Нобивак-RL и Нобивак-Рабиес производства компании «Интервет Интернэшнл» (Нидерланды) содержат инактивированный β -пропиолактоном вирус бешенства штамм Pasteur/RIV, сорбированный на фосфате алюминия. Вакцина Нобивак- RL предназначена для иммунизации собак, а Нобивак-Рабиес – для собак и кошек, и могут служить растворителями для группы вакцин, производимых данной фирмой;

– вакцина Дефенсор-3 производства компании Pfizer (США) предназначена для профилактики бешенства у крупного рогатого скота, овец, собак и кошек, содержит инактивированный β -пропиолактоном вирус бешенства, штамм PV-Paris, сорбированный на гидроокиси алюминия;

– вакцина Рабвак 3TF производства компании Fort Dodge Animal Health (США) предназначена для иммунизации собак и кошек, содержит инактивированный β -пропиолактоном вирус бешенства штамм HCP-SAD и 0,1 % карбопола 941 в качестве адъюванта;

– вакцины Биофел PCRH, Биокан R, Биокан LR, Биокан DHPPi+LR производства компании Bioveta (Чехия) содержат в качестве рабического компонента инактивированный β -пропиолактоном штамм «Внуково-32» вируса бешенства, сорбированный на гидроокиси алюминия, и предназначены для иммунизации кошек (Биофел PCRH) и собак (Биокан R, Биокан LR и Биокан DHPPi+LR).

Все перечисленные выше инактивированные вакцины, как отечественного, так и зарубежного производства, регулярно проходят сертификационные испытания в ФГУ ВГНКИ, безопасны в применении и вызывают стойкий иммунитет к инфицированию бешенством, что позволяет успешно применять их на территории Российской Федерации.

Одним из видов антирабических вакцин являются субъединичные препараты, которые безопасны, так как не содержат вируса и свободны от балластных белков (Грибенча С. В., 1988). Однако из-за низкой иммуногенной активности и высокой стоимости их использование ограничено.

Новым этапом рабиологической вакцинологии является разработка ДНК-вакцин, представляющих собой плазмидную ДНК, в которую встроены ген гликопротеина вируса бешенства. Преимущества этих препаратов: стабильность, высокая степень очистки, отсутствие балластных белков и контаминации посторонними агентами и индуцирование у животных системного и местного иммунитета (Perrin P. et al., 1999). Двукратная внутримышечная вакцинация собак плазмидной ДНК, экспрессирующей гликопротеин вируса бешенства, защищает животных от контрольного заражения вирулентным штаммом вируса бешенства (Stanley A. et al., 1999).

Кроме того, еще одним важным преимуществом ДНК-вакцин является возможность встраивания в ДНК плазмиды гликопротеинов нескольких лиссавирусов, что позволяет повысить степень защиты против нескольких серотипов вируса бешенства (Desmezieres E. et al., 1999).

Одним из важнейших факторов иммунопрофилактики является способ инъектирования антигена. На протяжении длительного времени использовали подкожный метод введения антирабических препаратов. Установлено, что после внутрикожной и подкожной иммунизации мышей и овец инактивированными вакцинами у животных формировались антирабические вируснейтрализующие антитела с практически идентичной активностью (Недосеков В.В. и др., 2000, 2002).

Полученные данные подтвердили связь между вводимым антигеном и центральной нервной системой, которая проявлялась усилением иммунного ответа при инъектировании антирабической вакцины в места, богатые нервными окончаниями (Иванов В.С. и др., 2000). В связи с этим актуально испытание внутрикожного введения антигена с помощью механических, безыгольных инъекторов, которое позволит существенно уменьшить материальные затраты при высокой технологичности процесса и иммунологической эффективности (Недосеков В.В., 2014).

Оральная вакцинация плотоядных животных. Меры борьбы с бешенством диких плотоядных, а также бездомных животных основана на двух

основных составляющих: регулирование численности и вакцинация с помощью оральных вакцин (Заволока А.А., 2013; Елаков А.Л., 2013).

МЭБ рекомендовано поддерживать численность лисиц, как основных переносчиков бешенства, на уровне не более 1-2 животных на 10 км², что должно обеспечить эпизоотическое благополучие территории. Однако данная рекомендация приемлема лишь для условий Западной Европы и является лишь временной мерой (Ведерников В.А. и др., 1974; Метлин А.Е. и др., 2009). В условиях России, с ее огромными площадями и ландшафтно-географическим многообразием территории регулирование численности диких плотоядных трудноосуществимо и не обеспечивает репродуктивных требований для сохранения биологического вида (Карпан С., 1977). В связи с этим в качестве действенной меры профилактики бешенства диких плотоядных на территории РФ остается оральная вакцинация.

Наиболее эффективным способом борьбы с бешенством является ликвидация очагов этой инфекции в популяции лисиц и других плотоядных. Наряду со снижением численности популяции до уровня ниже критического, практически действенным способом профилактики бешенства среди диких животных является оральная иммунизация (Селимов М.А., 1987; Метлин А.Е. и соавт., 2009). Главными принципами оральной вакцинации является долговременность, широкомасштабность, научно обоснованное планирование и мониторинг ее эффективности (Груздев К.Н., Недосеков В.В., 2001; Метлин А.Е. и соавт., 2009; Иванов А.В. и соавт., 2010).

Оральная вакцинация плотоядных животных против бешенства, разработанная более 25 лет назад, предложила новую перспективу контроля этой болезни в дикой природе (Макаров В.В., 2009; 2002), причем оральная вакцинация позволяет достичь цели без депопуляции диких животных (Макаров В.В., Воробьев А.А., 2004).

Идея оральной иммунизации диких плотоядных животных принадлежит американским вирусологам Baer и Winker (Baer G. et al., 1971). В дальнейшем в Европе отработана и реализована программа оральной вакцинации лисиц,

предусматривающую сплошную многократную вакцинацию в природных очагах бешенства, получившей название «Баварской модели» (Макаров В.В., 2009).

В США оральная иммунизация диких плотоядных животных с положительными результатами была начата еще в 1970 г. (Baer G. et al., 1971).

В дальнейшем, одна из первых кампаний по оральной вакцинации лисиц была проведена в 1978 г. в Швейцарии, а первые документированные положительные результаты в национальных масштабах межгосударственной кампании получены в ФРГ в 1983-1986 гг. В качестве приманок использовали куриные головы, внутрь которых, помещали пакет из пластика и алюминиевой фольги с вакцинным штаммом SAD и тетрациклином в качестве биомаркера. При этом на территории пяти земель использовано 2,4 млн. приманок при трехкратном применении. В целом в результате этой кампании количество случаев бешенства животных в большинстве стран Европы сократилось за 1989-1999 гг. почти в четыре раза (Schneider L. und and., 1987; Muller W., 2000; Matouch O., Vitasek J, 2002).

Крупномасштабные полевые испытания оральной антирабической вакцины проведены в Австрии, Швейцарии, Германии, Бельгии, Италии, Франции, Канаде, Финляндии, Словении, Чехии, Люксембурге и других странах (ВОЗ, 1994; Meredith C.D., 1980; Brochier B. et al., 1995; Krebs J. W. et al., 1995; Schluter H. et al., 1995). Приманки, в виде полистироловых капсул или куриных голов, распространялись с вертолета или самолета.

С 1989 г. Европейский союз начал финансирование кампаний по оральной вакцинации лисиц, в результате были полностью оздоровлены и получили статус «rabies free» Финляндия и Голландия (1991 г.), Италия (1997), Швейцария (1998), Франция (2000), Бельгия и Люксембург (2001), Чехия (2004). При этом лишь в отдельных случаях отмечено трансреинфицирование диких плотоядных животных со стороны соседних граничащих территорий (Селимов М.А., 1998; Brochier B. et al., 1995).

В 1994 г. в Словакии проведены две кампании по оральной вакцинации диких рыжих лисиц с использованием 1350000 приманок. При этом у 56,9%

отстреленных лисиц в зонах вакцинации в костях обнаружен биомаркер (тетрациклин), а антитела к вирусу бешенства выявлены в иммуноферментном анализе в 89% проб плевральных трансудатов (Durove A. et al., 1996).

Muller T. et al. (1995) сообщают, что с введением оральной иммунизации лисиц против бешенства, во многих регионах Германии значительно уменьшилось его распространение. Во Франции положительные результаты оральной иммунизации плотоядных животных опубликованы Masson E. et al. (1993).

В рамках национальных программ эрадикации бешенства при поддержке Европейского союза мероприятия по оральной иммунизации лисиц целенаправленно осуществлялось в шести странах – прежде всего в Польше, Словакии и левобережной Венгрии (Potzsh C., et al., 2002).

Позднее широкомасштабные кампании оральной вакцинации были проведены в других европейских странах, в результате чего в настоящее время в странах Евросоюза регистрируются лишь спорадические случаи бешенства среди диких плотоядных (Метлин А.Е. с соавт., 2009).

Благополучие стран Западной Европы позволило прекратить оральную вакцинацию лисиц. В настоящее время иммунизацию по «Баварской модели» проводят в нескольких центрально-европейских странах и Восточной Европе, в том числе в России, Белоруссии, Украине, однако, к сожалению, она проводится несистематически (Rabies, animal-Ukraine: oral vaccinanion. <http://www.promedmail.org.>, Макаров В.В. с соавт., 2015).

Первые специальные мероприятия по оральной вакцинации диких плотоядных животных были начаты в России в 1998 г. Одним из первых полевых испытаний оральной иммунизации диких плотоядных животных живой цельновирионной вакциной из штамма «Внуково-32» было проведено в Мурманской области (Хозинский В.В. с соавт., 1997).

Начиная с 1998 г. в Российской Федерации была предпринята, попытка перенять успешный опыт Западной Европы по оральной иммунизации диких животных. Количество используемых доз вакцины и зона её применения с

течением времени периодически менялись. В начале программы использовали 900 тыс. доз вакцины в 22 субъектах страны, далее в 2004 г. этот объем сократился до ежегодных 272 тыс. доз, а максимум был достигнут в 2012 г. и составил 20,3 млн. доз с охватом территории 51 субъекта. Однако впоследствии программа оральной иммунизации диких плотоядных опять стала сокращаться, и в 2014 г. было использовано только 4,5 млн. доз вакцины с охватом территории 21 субъекта (Авилов В.М. с соавт., 2016).

Как показало время, реальный эффект этой программы был значительно меньше ожидаемого. Причин слабой отдачи от оральной вакцинации диких хищников видимо много, но к основным причинам можно отнести чрезвычайно огромную площадь ареала обитания животных-резервантов, быстрое обновление их поголовья, обширное развитие эпизоотии, как на территории страны, так и в сопредельных территориях. Масштаб проблемы природного бешенства в Российской Федерации оказался несоизмерим с задачами, которые пришлось ранее решать Западной Европе.

Вакцины «Lysvulpen», а затем «Синраб» отечественного производства распределялись по годовым разрядам в 25 областях страны в количестве от 2-5 до 115 тыс. доз, в большинстве – по 30-50 тыс. доз. Однако несложный расчет, исходя из плотности лисиц в регионах, показывает, что такие объемы препарата занижены в 20-60 раз, что компрометирует эффективность мероприятий по оральной вакцинации диких плотоядных (Макаров В.В. с соавт., 2015).

В условиях России крупномасштабные кампании оральной вакцинации трудноосуществимы, тем не менее, на отдельных территориях, наиболее и стационарно неблагополучных по бешенству, эти мероприятия оправданы (Елаков А.Л., 2013), а в ряде случаев безальтернативны (Макаров В.В., 2009).

В нашей стране разработаны пероральные антирабические вакцины на базе отечественных штаммов РВ-97 и ТС-80. Вирусвакцина против бешенства для оральной вакцинации диких плотоядных животных производства ВНИИВВиМ содержит фиксированный штамм вируса бешенства, полученный в 1980 г. Сафроновым Г.А. с соавт., и депонированный в ВГНКИ в 1988 г. Данная вакцина

выпускается в ограниченном количестве и не получила широкого практического применения.

Наиболее широко использовались оральные вакцины из штамма РВ-97, полученного в 1999 г. путем адаптации штамма РБ-71 к суспензионной культуре клеток ВНК-21/2. Первоначально из этого штамма готовили вакцину «Синраб», содержащую в составе брикета в качестве приманки отходы биологического производства. В последующем вакцину из штамма РВ-97 стали производить в промышленных объемах на базе Щелковского биокомбината под названием «Вирус-вакцина для оральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства «Оралрабивак». Благодаря новому составу приманки, включающей говяжий жир и рыбную муку, удалось повысить привлекательность и поедаемость вакцины дикими плотоядными.

Вместе с тем, учитывая, что основными критериями при выборе штамма для приготовления живых вакцин является безопасность и иммуногенность (Шестопапов А.М., 2010), серьезным недостатком вакцин из штаммов ТС-80 и РВ-97 является их остаточная вирулентность для животных (Борисов А.В., 2003; Сливко И.А., 2003). Так как практическая ветеринарная служба не в состоянии дифференцировать эпизоотические изоляты от вакцинных штаммов вируса, то при появлении случаев бешенства среди грызунов стал подниматься вопрос о целесообразности оральной вакцинации диких плотоядных в целом (Ведерников В.А. и др., 2010).

В связи с изложенным, в 2008 г. в РФ был депонирован безопасный для животных, в том числе для грызунов, генномодифицированный штамм ERA G333, полученный в центре по контролю болезней (Атланта, США) путем замены аргинина в позиции 333 эктодомена гликопротеина исходного штамма ERA на глютаминовую кислоту. Штамм, в рамках Международного проекта, был передан в ОАО «Покровский завод биопрепаратов», оказался пригодным для изготовления живых и инактивированных антирабических вакцин, и на его основе разработана и зарегистрирована в РФ «Вакцина для оральной иммунизации диких

плотоядных животных против бешенства «Рабивак-О/333» (Елаков А.Л., с соавт., 2011).

Кроме того, в 2010 г. в РФ зарегистрирована вакцина «Раборал® V-RG» производства фирмы «Мериал» (Франция), содержащая рекомбинантный вирус осповакцины (штамм V-RG-187XP), экспрессирующий гликопротеин вируса бешенства. Достоинством данной вакцины является ее безвредность и стабильность во внешней среде (Елаков А.Л., 2013).

Накоплен положительный опыт оральной вакцинации бешенства среди диких плотоядных в ряде регионов России. Так, в неблагополучных по лисьему бешенству Новозерском и Терском районах Кольского полуострова в 1989-1990 гг. было распространено 17 тыс. доз оральной антирабической вакцины из штамма «Внуково-32» и с этого периода территория полуострова остается свободной от рабической инфекции.

В настоящее время на территории РФ для оральной вакцинации диких плотоядных наиболее широко используется антирабическая вакцина «Оралрабивак» из штамма РВ-97 вируса бешенства, производства ООО «Щелковский завод фармацевтических и ветеринарных препаратов» (Щелково).

Широкомасштабное применение живых антирабических вакцин требует пристального контроля за их безопасностью, в связи с чем, применяемые в РФ оральные вакцины проходят обязательный контроль на безвредность и эффективность, определяемые наличием тетрациклина в зубах и костной ткани челюстей животных. Антибиотик используется в качестве маркера поедаемости вакцин и определения титра антирабических антител (Дудников С.А., 2003; Макаров В.В., 2009).

При этом традиционный метод определения вируснейтрализующих антител (реакция нейтрализации на белых мышах или в культуре клеток) многозатратна, в связи с чем, предложена универсальная тест-система – блок-ИФА, не требующая использования антивидовых пероксидазных конъюгатов к каждому виду животных (Хисматуллина Н.А. с соавт., 2012, 2013).

Весьма перспективными считаются оральные антирабические вакцины: живая модифицированная цельновирионная вакцина из аттенуированных вакцинных штаммов (РБ-71, РБ-97, ERA, SAD, SAD В 19, SAD Bern, SAG₁, SAG₂ и др.) и рекомбинантная генно-инженерная оральная вакцина с использованием в качестве вектора вируса осповакцины (штамм Копенгаген, Листер-МИВЦ и др.), экспрессирующего ген G-протеина вируса бешенства (Грабко В.И. и соавт., 1998; Селимов М.А., 1998 и др.). Однако, используемые штаммы вируса бешенства РБ-71 (РБ-97), ERA, SAD В 19, SAD Bern имеют остаточную вирулентность и могут привести к поствакцинальному бешенству привитых животных и людей (Ведерников В.А., Балдина И.В., 2008, 2010; Гулюкин М.И., Ведерников В.А., 2008; Иванов В.С. и соавт, 2000; Жестерев И.В. и соавт., 2008; Онищенко Г.Г., 2008; Rupprecht С.Е. et al., 2001). Кроме того, рекомбинантный штамм VRG, который создан на основе вектора штамма «Копенгаген» вируса осповакцины для профилактики бешенства диких плотоядных, обладает исходной дермотропностью и способностью вызывать у человека энцефалиты с летальным исходом (Метлин А.Е. и соавт, 2009; Технический отчет ВОЗ, 2004).

В этом направлении для создания безопасной вакцины проведены исследования свойств модифицированного штамма ERA G333 вируса бешенства (Сафонов Г.А., Баньковский Д.О., 2009; 2010; Баньковский Д.О., 2010 и др.). Авторами установлена безвредность, иммуногенность штамма ERA G333 вируса бешенства для лабораторных и диких животных.

Успехи в области клонирования и экспрессии генов позволили конструирование рекомбинантных вакцин против бешенства, которые просты в изготовлении, устойчивы во внешней среде и индуцируют напряженный иммунитет. Применение рекомбинантного вируса исключает попадание во внешнюю среду потенциально опасного генома вакцинного вируса бешенства.

Рекомбинантные вакцины для борьбы с бешенством диких плотоядных животных широко применяют во многих странах мира как экологически наиболее безопасные и эффективные (Горбачева П., Макаров В.В., 2010).

Проведены исследования по созданию рекомбинантных вакцин для профилактики бешенства. В опытах L. Donald et al. (1995) мышам вводили путем скарификации на кожу хвоста рекомбинантный вирус осповакцины, экспрессирующий гликопротеин фиксированного вируса бешенства штамма CVS, или инокулировали внутривенно вакцину из выращенного в диплоидных клетках человека вируса бешенства. Животные оставались здоровыми после заражения 17-тью штаммами вируса бешенства, выделенных от собак в Азии, Африке и Латинской Америке, а также от диких плотоядных и летучих мышей. Полученные данные указывают на возможность создания в мировом масштабе одной универсальной антирабической вакцины.

Наибольшее распространение рекомбинантные препараты получили при пероральной вакцинации диких плотоядных. Хотя использование антигенов разных серотипов вируса бешенства позволяет изготавливать мультивалентные вакцины для парентерального введения. Так, использование вектора, несущего участки гликопротеинов серотипов 1 и 5, позволило создавать активный иммунитет к этим серотипам вируса бешенства (Desmezieres E. et al., 1999).

Одной из первых рекомбинантных вакцин является вакцина V-RG (*Vaccina Rabies Glycoprotein*) – оспенный гликопротеин вируса бешенства на основе первого в мире оспенного орального рабического антигена, полученного путем введения в геном вируса оспы ДНК-копии гликопротеина вируса бешенства (Горбачева П., Макаров В.В., 2010).

Примечателен положительный опыт применения рекомбинантной антирабической вакцины «Brovarabies V-RG» (на основе штамма V-RG, Merial, Франция) на Украине, в результате чего коренным образом улучшилась эпизоотическая ситуация по природно-очаговому бешенству в шести областях (Rabies, animal-Ukraine: oral vaccination. <http://www.promedmail.org>).

В США первые лабораторные и полевые испытания генно-инженерной вакцины для оральной иммунизации енотов-полоскунов проведены в 1990 г. на островах Паррамор и Ривел. В 1995 г. организованы две крупные кампании по элиминации эпизоотии бешенства среди койотов в южном Техасе, а также среди

серебристо-черных лисиц в западно-центральном Техасе (Селимов М.А., 1990, 1998).

Генно-инженерную вакцину отечественного производства успешно испытали при оральной иммунизации красных и серебристо-черных лисиц, енотовидных собак, песцов, и собак в ряде звероводческих хозяйств Московской области (Селимов М.А., 1998).

В отличие от цельновирионных, генно-инженерные и модифицированные вакцины безопасны, так как не содержат инфекционного рабического вируса и не могут закрепиться и циркулировать в природе (Сафонов Г.А. и соавт., 2009; 2010; Баньковский Д.О., 2010; Rupprecht C.T. et al., 1996 и др.).

Сформулированы основные требования, предъявляемые к оральным антирабическим вакцинам и приманкам, включающим авирулентность, высокая специфическая активность, стабильность, привлекательность, поедаемость и др. (Евсеева С.Д. с соавт., 2005).

Таким образом, существующие меры борьбы с бешенством включают вакцинацию сельскохозяйственных, домашних и диких животных, главным образом лисиц. Однако контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства животных на территории РФ, в том числе поедаемость вакцин и уровень вируснейтрализующих антител в сыворотках крови животных, вакцинированных против бешенства, практически не проводится. Вместе с тем, необходимо учитывать особенности современной эпизоотологии бешенства, связь неблагополучия с определенными зонами и приуроченностью эпизоотических очагов биоценозам.

Из-за чрезвычайной опасности и абсолютной летальности вопросы профилактики бешенства после повреждения человека, нанесенного больным или подозрительным на бешенство животным, имеют исключительно важное значение. Во всем мире существует единая тактика профилактики заболевания после контакта с возбудителем инфекции, которая достигается путем немедленной местной обработки раны с последующим специфическим лечением антирабической вакциной, а в случаях тяжелых множественных укусов опасной

локализации и антирабическим иммуноглобулином (по схеме, рекомендованной в инструкции по применению вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой и антирабического иммуноглобулина от 12.03.2003 г.).

Комитет экспертов ВОЗ по бешенству (Серия технических докладов. – Женева, 1994) подчеркивает особую важность срочной местной обработки ран, следов укусов, царапин и мест ослюнений после контакта с плотоядным животным, которые могут быть инфицированы вирусом бешенства. При этом тяжелые формы нанесенных укусов из числа обратившихся за антирабической помощью, достигают 30 и более процентов (Кобзарь Л.В., 2002).

Немедленная местная обработка ран, нанесенных животными, в порядке первой помощи может проводиться самим пострадавшим. Среди людей, проживающих в районах неблагополучия по бешенству, должна проводиться санитарно-просветительная работа по ознакомлению с простыми местными средствами обработки ран с учетом того, что удаление вируса бешенства из места заражения химическими или физическими методами является наиболее эффективным механизмом защиты. Для этих целей рекомендуется обильное промывание раны мыльным раствором или любым детергентом с последующей обработкой дезинфицирующими средствами: 40%-70% этиловым спиртом, спиртовым или водным раствором йода, слабым раствором перекиси водорода. Своевременная обработка ран после укусов может до 90% снизить риск заболевания бешенством. Вместе с тем, необходимо помнить, что местная обработка ран ни в коем случае не исключает последующего специфического лечения человека антирабическими препаратами.

Предприняты попытки поиска других средств для обработки ран после укусов людей животными, в частности антибиотиков и ряда химиотерапевтических средств, однако они ограничились лишь экспериментальным обоснованием и, кроме того, часто вызывали осложнения у человека.

После обработки ран, нанесенных плотоядными животными, необходима обязательная постэкспозиционная антирабическая лечебно-профилактическая вакцинация, основанная на комбинированном применении антирабической вакцины и антирабического иммуноглобулина (АИГ). Основная функция АИГ, гомологичного или гетерологичного, предназначена для создания пассивного иммунитета с целью предупреждения развития болезни с коротким инкубационным периодом (Селимов, М.А., 1998). Однако гетерологичный АИГ, поступающий в Россию из Украины, где налажено его массовое производство, может вызывать аллергические реакции, включая сывороточную болезнь и анафилактический шок, а гомологичный иммуноглобулин является дорогостоящим. К тому же при нарушении технологии производства его применение связано с потенциальным риском заражения ВИЧ, вирусным гепатитом и другими вирусными агентами.

На основании современных данных о патогенезе заболевания, можно заключить, что лечение, основанное на комбинированном применении антирабической вакцины и антирабического иммуноглобулина, будет успешным только при применении его в начальный период, то есть до проникновения вируса в клетки центральной нервной системы (ЦНС). Однако после проникновения вируса в клетки ЦНС специфические антитела не способны влиять на течение и исход инфекционного процесса, так как вирус становится недоступным действию иммунокомпетентных клеток, вырабатывающих антитела.

При экспериментальной рабической инфекции установлено выраженное антирабическое действие антибиотика Рифампицин (Зубович И.К. и соавт, 1989), обусловленное подавлением синтеза РНК за счет связывания с ДНК-зависимой РНК-полимеразой (Wehril W., 1969).

Имеются данные об антирабическом эффекте ряда других химиотерапевтических препаратов, в частности алкиламиноалкиловых эфиров флуоренондикарбоновой кислоты, алкокси- и алкилтиопроизводных флуорена и флуоренона (Fleming, R.W. et al., 1970); резерпина (Вотяков В.И. и др., 1991); кетамина (Lockhart B.P. et al., 1992); тиоцинат 4-(1-адамантил) фениламмония, 1-

фенил-3-аминоадамантана, 1-(4-тиотил)-3-аминоадамантана, 1-фенил-3-(1-аминоэтил) адамантана гидрохлорида, 4-(1-адамантил)-1-(1-аминоэтил) бензол гидрохлорида, 4-(1-адамантил)-1-(1-аминопропил) бензола гидрохлорида, 4-(1-адамантил)-1-(1-аминобутил) бензолагидрохлорида, 1-(4-(1-адамантил) фенокси)-2-аминоэтана (Даниленко Г.И. и др., 1998).

Хороший антирабический эффект при экспериментальном заражении бешенством обеспечивает РНКаза *Bacillus intermedius* – бактериальный фермент, гидролизующий РНК, внутримышечное введение которого в место заражения в дозе 5 мг/кг через 2 ч после введения вируса приводит к 40-70%-ной защите белых мышей, морских свинок и кроликов (Грибенча С.В. с соавт., 2004, 2006). Антирабический эффект РНКазы предположительно связан с ферментативной активностью и зависит от ее дозы. Известно, что ее можно использовать в качестве ингибитора РНК-геномных бактериофагов. В СССР опытные партии РНКазы *Bacillus intermedius* выпускали в Латвии, а в настоящее время в России ее получение возможно лишь в лабораторных условиях. Основными недостатком РНКазы является ее токсичность при введении в мозг в дозах свыше 5 мг/кг, а также проявление аллергических реакций при внутримышечном введении.

Другим антирабическим препаратом является эндонуклеаза бактериальная – порошок белого или слегка желтоватого цвета, без запаха, хорошо растворимый в воде, нерастворим в органических растворителях, неустойчив в кислой среде (теряет активность). Эндонуклеаза обладает выраженным противовирусным действием – тормозит развитие различных РНК и ДНК-содержащих вирусов животных путем гидролиза вирусных нуклеиновых кислот. Препарат относится к малотоксичным соединениям, не раздражает кожу и слизистые оболочки глаза.

Эндонуклеаза бактериальная – это природный биологический катализатор белковой природы, она нетоксична благодаря способности и самопроизвольной инактивации, безвредна для человека, животных и растений. Лиофильно высушенный препарат эндонуклеазы можно хранить при температуре -20°C в течение длительного времени. Период хранения раствора эндонуклеазы при температуре -20°C без изменения ферментативной активности короче.

Внутримышечное или интрацеребральное введение препарата эндонуклеазы, представляющего собой водный раствор данного фермента с активностью 330000 ед./мл, содержащий 0,85% NaCl, не оказывало влияние на жизнеспособность как инфицированных вирусом бешенства, так и интактных мышей. Полученный результат свидетельствовал об отсутствии токсичности препарата эндонуклеазы, а также об отсутствии проявления антирабической активности эндонуклеазы в указанной композиции.

Эндонуклеаза относится к ферментам, активность которых сильно зависит от присутствия в среде катионов Mg (Лещинская И.Б. с соавт., 1974; Машковский М.Д., 1998), а стабилизации ферментативной активности способствует присутствие в среде стабилизаторов, одним из которых является поливинилпирролидон (Филимонова М.Н. и соавт., 1983), входящий в состав дезинтоксикационного водно-солевого раствора «Гемодез-Н» или средства «Энтеродез».

Водно-солевой раствор «Гемодез-Н» содержит 6% поливинилпирролидона низкомолекулярного медицинского, а также 0,55% натрия хлорида, 0,042% калия хлорида, 0,05% кальция хлорида 6-водного, 0,0005% магния хлорида 6-водного, 0,023% натрия гидрокарбоната (Мельникова Е.П. и др., 1988; Машковский М.Д., 1998). Оптимальной для проявления нуклеодеполимеразной активности эндонуклеазы является среда с рН 7,0-8,5 (Лещинская И.Б. и др., 1974; Машковский М.Д., 1998).

Перспективно, на наш взгляд, создание препарата на основе секретируемого фермента – эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens*, широко применяемой в пчеловодстве для профилактики вирусных болезней и стимуляции развития пчелосемей, а также в животноводстве при респираторных болезнях телят. В растениеводстве препарат используется для получения безвирусных сортов растений. Однако механизм ее действия до конца не расшифрован (Аликин Ю.С. и др., 1998).

Резюмируя все опубликованное в мировом информационном пространстве, можно сделать вывод, что бешенство, в настоящее время, имеет широкое

распространение в мире и представляет большую опасность здоровью и жизни для диких и домашних животных и, особо нужно подчеркнуть, ярко выраженную угрозу здоровью и жизни людей.

Особенности течения этой инфекционной болезни, широта распространения, социальные риски и антропологические факторы требуют постоянной, скоординированной работы от медицинских и ветеринарных работников, направленные на совершенствование анализа и контроля современными средствами эпизоотического процесса бешенства и средств диагностики и профилактики данного заболевания.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал и методы исследований

Работа выполнена в 1998-2018 гг. в ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» в соответствие 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) (Приложение 1), а также 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 ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» в рамках задания тематического плана НИР «Биологическая безопасность», хозяйствах Республики Татарстан, Смоленской, Калининградской областей и Североказахстанской области Республики Казахстан (Приложение 2).

Общая архитектура исследований.

Опыты ставили на лабораторных и плотоядных животных, для чего использовано 200 беспородных белых мышей живой массой 14-16 г., 10 мышей-сосунков (ГОСТ 26075-84) массой 6-7 г, 20 кроликов массой 3-3,5 кг, 19 собак, 6 серебристо-черных и красных лисиц клеточного содержания, 2 домашние кошки.

В качестве биологического материала для контроля эффективности вакцинации против бешенства использовали 515 проб крови и сыворотки крови разных видов сельскохозяйственных и мелких домашних 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, умерших от бешенства, поступивших из различных учреждений для

диагностических исследований и полученные при изучении природных очагов рабической инфекции в различных регионах страны.

Эффективность оральной вакцинации против бешенства изучали исследованием биоматериала от диких плотоядных животных, отстрелянных на территориях неблагополучных регионов после проведения оральной антирабической иммунизации Смоленской, Калининградской областей и Республики Татарстан. В общей сложности исследовано 2065 проб биоматериала, в том числе по 655 проб головного мозга, глазной жидкости и костной ткани диких плотоядных животных.

Штаммы вируса бешенства, использованные в работе:
Производственный фиксированный штамм «Овечий» ГНКИ; стандартный, штамм CVS (*challenge virus standard*); эпизоотический, штамм «Соб-2580»; авирулентные штаммы РВ-97 и ERA G333; полевые изоляты (28 образцов).

Другие культуры микроорганизмов.

При определении специфичности гнездовой ОТ-ПЦР с использованием праймеров к гену гликопротеина вируса бешенства использовали ДНК следующих культур микроорганизмов: *E.coli*, *M.bovis* (штамм BCG), *M.avium*, *Br.abortus*, *B.anthraxis* (штамм 55), вирус болезни Ауески (штамм ВГНКИ), *St.aureus*.

Используемые биологические препараты:

– перевиваемая культура клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1) (Авцын А.В. с соавт., 1984);

– флуоресцирующий антирабический глобулин (ТУ 9388-027-00492374-2007, зарег. в РФ, № ПВР-1- 4.9/00196 и сертифицированный ФГУ «ВГНКИ» № РОСС RU. ФВ 01.Н21864);

– набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства методом иммуноферментного анализа (ИФА) (ТУ 9388- 025-00492374-2007, зарег. в РФ, № ПВР-1-1.9/00261 и сертифицированный ФГУ «ВГНКИ» № РОСС RU. ФВ 01.Н 218665);

– наборы «РИБО-сорб» и «Реверта-L» для выделения ДНК из биоматериала (производство: ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, выпуск: ООО «ИнтерЛабСервис», Россия).

– антивидовые конъюгаты – антитела диагностические против иммуноглобулинов быка и овец, меченные пероксидазой (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН);

– антитела контрольных положительных и контрольных отрицательных сывороток крови кролика против иммуноглобулинов (Ig) собак и лисиц, меченные пероксидазой (ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»);

– гетерологичные сыворотки разных видов животных, иммобилизованных на полистироловом планшете;

– референс-сыворотка (ВГНКИ) – отраслевой стандартный образец антирабической сыворотки в качестве контрольной положительной;

– контрольная положительная (№ 1924 с активностью в РН 6,01 МЕ) и контрольная отрицательная сыворотки плотоядных животных;

– контрольная отрицательная эмбриональная сыворотка плодов коров;

– калибровочный набор белков для электрофореза (Pharmacia Biotech, США);

– блокирующий раствор NEW LAV BLOT I R2, 5X (Sanofi diagnostics pasteur, Франция);

– набор BigDye Terminator Cycle Sequencing kit («Applied Biosystems», США) для секвенирования ампликонов;

– набор SilicaBead DNA GelExtractionKit («Fermentas», Литва) для очистки продуктов ПЦР от агарозного геля;

– пакет программ DNASTAR V.3.12 («LasergenInc.», США) и программы BioEdit 7.0.1. для выравнивания нуклеотидных последовательностей фрагмента гена G вируса бешенства и с помощью базы данных NCBI была получена филогенетическая дендрограмма.

– пероксидаза хрена с RZ=3 (Sigma, Россия);

– полный адьюванта Фрейнда (ПАФ);

- эндонуклеаза бактерий *Serratia marcescens* и Гемодез-Н;
- перевиваемые монослойно-суспензионные сублинии клеток почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21/13-02 и почки сайги.

Использованная аппаратура и приборы:

- амплификатор Mastercycler Gradient (Eppendorf, Германия) для секвенирования ампликонов с применением BigDye® Terminatorv3.1 Ready Reactionkit (Applied Biosystems, США);
- спектрофотометр СФ-16 (ЛОМО, Россия);
- сканирующий спектрофотометр Titertek multiskan (Швейцария);
- прибор Трансиллюминатор (Россия) для учета результатов электрофореза;
- колонка с ДЭА-целюлазой;
- центрифуги (различные, в т.ч. ультрацентрифуга Beckman, ротор Ti-60), термостаты, холодильные установки;
- световой микроскоп Биолам, люминесцентные микроскопы Люмам-И2 и Nikon (Япония), рН-метр, аналитические весы, автоматическая многоканальная пипетка с переменным объемом от 50 до 200 мкл;
- реактор с роторной мешалкой.

Эпизоотологический мониторинг бешенства.

Эпизоотологический мониторинг осуществляли в целом по территории Российской Федерации; региональные особенности эпизоотического процесса – на территории Республики Татарстан, Калининградской области и трансграничных территориях (на примере Западно-Казахстанской области Республики Казахстан). Для эпизоотологического мониторинга использовали статистические сведения и оперативную фоновую информацию, полученную в Федеральном государственном учреждении «Центр ветеринарии» МСХ РФ, управлениях ветеринарии субъектов РФ, данные Росстата о численности поголовья сельскохозяйственных животных разных видов и стоимости продукции животного происхождения (2015 г.).

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 (Бакулов А.И. и др., 1975, 1979, 1982, 2002; Таршис М.Г., 1975; Таршис М.Г., Константинов В.М., 1991, 1994; Бакулов И.А., Дудников С.А., 2005; Джупина С.И., Ведерников В.А., 1981; Джупина С.И., Колосов А.А., 1991; Макаров В.В., 1999; Макаров В.В., Воробьев А.А., 2004). Эпизоотологическое районирование и картографический анализ проводили по методикам, описанным Нуйкиным Я.В., 1970; Кисленко В.Н. и др., 1997. Неблагополучные территории ранжировали по количеству случаев бешенства на 1000 км².

Геоинформационную систему (ГИС) в эпизоотологическом мониторинге бешенства мы разрабатывали на платформе ArcGIS® for Desktop, для чего создавали электронный кадастр случаев заболевания животных бешенством, построенный на платформе реляционной базы данных Microsoft Office Access®. Данные кадастра привязывали к атрибутивной таблице цифровой карты Российской Федерации масштаба 1:1000000.

Экономический ущерб, причиняемый бешенством сельскохозяйственных животных, определяли с использованием «Методики определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий» (1997) с использованием средней стоимости живой массы по видам животных (Росстат, 2017) и стоимости биологической утилизации павших животных.

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

Иммунологические и гематологические исследования.

Метод иммунофлуоресценции (ИФ) проводили в прямом варианте по ГОСТу 26075-84 с использованием флуоресцирующего антирабического глобулина (ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»). Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили в прямом сэндвич-варианте на 96-луночных микротитрационных

планшетах для иммунологических реакций из полистирола «Пл-Б-М» (ТУ 9393-009-16548645-2005).

Прямой сэндвич-вариант ИФА для определения антигенов ставили с использованием «Набора препаратов для диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа (ИФА) (ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»).

Контролем служили отрицательный иммуноглобулин Ig (для сенсibilизации планшета), отрицательный антиген в разведениях, аналогичных испытуемому антигену, гетерологичный антиген – вирус болезни Ауески. Опыт учитывали по отношению к контролю с большей оптической плотностью.

Непрямой вариант ИФА для определения антител. В иммунологический планшет вносили производственный штамм «Овечий» ГНКИ вируса бешенства в разведении, определяемом путем шахматного титрования со специфической сывороткой. Исследуемую сыворотку вносили в лунки планшета с иммобилизованным антигеном и инкубировали 1 час при 37⁰С, после чего добавляли антивидовой пероксидазный конъюгат или белок А из *St. aureus*, меченный ПХ. Контролем служили отрицательный антиген и отрицательная сыворотка.

Реакция нейтрализации (РН). Проводили по методике Р. Atanasiu (1975) на белых беспородных мышах живой массой 14-16 г с использованием вируса бешенства (штамм CVS) в дозах от 30 до 300 LD₅₀/0,03 мл.

Получение и очистка антигена. Использовали метод накопления вирусного материала при интрацеребральном введении 10% вирусосодержащей суспензии белым мышам. Культуральный вирус бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ) получали путем заражения культуры клеток НГУК-1 и внесения 10% вирусосодержащей суспензии мозга белых мышей в суспензию клеточной культуры в концентрации 5x10⁵ кл/мл в соотношении 1:1.

Вирусный материал освобождали от клеточного дебриса по методу Хисматуллиной Н.А., Юсупова Р.Х. (1988), с последующей очисткой в линейном градиенте плотности сахарозы (15-50% по Dietzschold В. (1996)).

Методы вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблоттинга. Степень очистки рабического вируса и его белковых фракций изучали методом диск-электрофореза в 12,5% ПААГ с додецилсульфатом натрия по Laemmli U.K. (1970) и Dietzschold B. (1996). Контролем служил набор белков стандартной молекулярной массы (94.0, 67.0, 43.0, 30.0, 20.1, 14.4 кД). Специфичность белковых фракций определяли иммуноблоттингом по Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) с использованием поликлональной мышиной антирабической сыворотки и конъюгата (диагностические антитела против иммуноглобулинов белой мыши, меченные пероксидазой, производства НИИЭиМ им. Н.Ф. Гамалеи).

Гематологические и морфологические показатели крови определяли общепринятыми методами. Мазки крови окрашивали 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. Показатели иммунитета изучали стандартными методами, включающими определение относительного и абсолютного содержания Т- и В-лимфоцитов в периферической крови по методу Julius M. et. al. (1973). Количество Т-лимфоцитов определяли методом спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана (Е-РОК) по методу Jondal M. et. al. (1972), количество Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток – в реакции розеткообразования (Е-РОК) с теофиллином (Shore A., 1978; Keane R. et. al., 1982). Фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН) и фагоцитарный индекс (ФИ) определяли по методу Кост Е.А., Стенко М.И. (1981) с использованием тест-культуры *Staph. aureus*.

Эффективность оральной вакцинопрофилактики бешенства диких плотоядных животных изучали в РИФ, ИФА, реакции нейтрализации, биопробе на белых мышах и в культуре клеток НГУК-1. Поедаемость оральных вакцин устанавливали согласно «Методическим указаниям по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в ткани зубов и

костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин» (ФГУ ВНИИЗЖ, г. Владимир).

Разработка средств специфической профилактики бешенства.

Комплексный антирабический препарат для обработки ран при укусах человека животными конструировали на основе эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens* и Гемодеза-Н в разработанных соотношениях.

Экспериментальную вакцину для оральной иммунизации плотоядных животных конструировали на основе культуральной жидкости авирулентных штаммов вируса бешенства РВ-97 и ERA G333, выращенных в перевиваемой культуре клеток. В качестве пищевых и формообразующих компонентов использовали рыбную муку, говяжий жир, парафин или пищевой полимер и неочищенное зерно хлебных злаков. В состав вакцины включали маркер-тетрацилин. В процессе исследований отработано 14 различных вариантов состава и технологий приготовления оральной вакцины против бешенства.

Синтетические олигонуклеотидные праймеры к гену гликопротеина вируса бешенства определяли в гнездовой полимеразной цепной реакции (ПЦР). Нуклеотидные последовательности олигонуклеотидных наружных и внутренних праймеров для детекции РНК вируса бешенства определяли методом гнездовой ОТ-ПЦР в двухраундовой амплификации.

Праймеры конструировали сравнением нуклеотидных последовательностей различных штаммов лиссавирусов, депонированных в международной базе данных GeneBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/GeneBank/GeneBankSearch.html>) с помощью пакета программного обеспечения «Vector NTI 9.1» (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), для чего рассчитывали и синтезировали олигонуклеотидные праймеры на район гена гликопротеина (ЗАО «Синтол», Россия). Химический синтез праймеров осуществляли амидофосфидным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U. Концентрацию синтетических олигонуклеотидных праймеров в маточном растворе определяли спектрофотометрическим методом.

Анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакета программ BioEdit version 7.0.5.2. (Ibis Biosciences, США).

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.

Подробные методы и методики исследований изложены в соответствующих разделах диссертации.

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 коэффициента корреляции (r).

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»), 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) за неоценимую помощь и содействие в проведении исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2 Эпизоотологический мониторинг бешенства

2.2.1 Геоинформационная система (ГИС) эпизоотологического мониторинга бешенства. Современная система регистрации, анализа, контроля и обработки большого объема эпидемиологических и эпизоотологических показателей, основывается на программных информационно-аналитических комплексах, одной из которых являются геоинформационные системы (ГИС), или ГИС-технологии. В обобщенном виде, разработанная нами ГИС, схема построения которой представлена на рисунке 1, состоит из следующих основных блоков:

- пространственная модель исследуемой территории в виде набора цифровых административно-географических карт;
- банк данных, характеризующих первичные эпизоотологические и эпидемиологические показатели бешенства;
- программное приложение, обеспечивающее хранение, обработку и визуализацию данных.

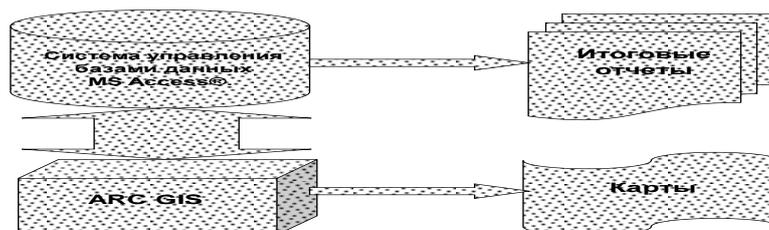


Рисунок 1 – Схема построения геоинформационной системы эпизоотологического мониторинга бешенства

В качестве платформы построения эпизоотологической ГИС нами использовано программное обеспечение ArcGIS, способное к функционированию без сбоев в сложных, нагруженных информационных комплексах, обладающих широкими возможностями визуализации картографической информации и обширным набором инструментов пространственного и временного анализа.

В геоинформационной системе общение между банком данных (о случаях заболеваемости) и географической картой (в формате геоданных) происходит в двустороннем режиме, что позволяет, по таблице эпизоометрических данных создать соответствующую нозологическую карту, определить параметры и особенности пространственного расположения очагов заболевания, провести наложение нозологической карты на карты природных, социально-экономических факторов, и по результатам пространственных запросов синтезировать новые таблицы и отчеты в формате базы данных.

Использование ГИС-технологий при исследовании границ ареала бешенства позволяет выявить пространственно-временные закономерности, характеризующие особенности эпизоотии за определенный промежуток времени, в том числе плотность распределения неблагополучных пунктов и эпизоотических очагов на так называемой тепловой карте, на которой по интенсивности окраски территории дифференцируются в зависимости от концентрации пунктов и их возможного взаимного влияния друг на друга. Кроме того, ГИС позволяет на картосхемах в различных цветовых гаммах проводить поквартальную разбивку динамики выявления неблагополучных пунктов с параллельным отображением зон, в которых происходили изменения.

Проводимое автоматически в геоинформационной системе оперативное выявление зон наибольшего риска развития эпизоотии (эпидемий), определение необходимого объема и характера противоэпизоотических и противоэпидемических мероприятий может использоваться для формирования экспертных заключений, необходимых для выработки своевременных и адекватных управленческих решений ветеринарной и медицинской службами страны.

Инструменты пространственного и временного анализа ГИС, в том числе ранговой корреляции Спирмена, позволяют производить не только ретроспективную оценку эпизоотической обстановки на территории, но и строить прогнозные информационные ситуации. Внесение в информационную модель эпизоотической (или эпидемической) ситуации дополнительных критериев,

влияющих на развитие эпизоотии (или эпидемий), способствует получению более точного прогностического результата. Такими влияющими критериями (прямыми или косвенными) могут быть данные о плотности популяций целевых животных, объемах проводимых вакцинаций и т.д.

Информационная система, производя многокритериальный анализ всех имеющихся показателей, способна качественно оценить возможные изменения в характере пространственного распространения заболеваемости с учетом проводимых или планируемых мер воздействия на влияющий критерий. Результаты прогноза предоставляются пользователю в виде удобном для дальнейшего анализа формате: карты, статистические таблицы, диаграммы и графики. Проводимое в ГИС оперативное выявление зон наибольшего риска развития эпизоотии (или эпидемий), определение необходимого объема и характера противоэпизоотических (или противоэпидемических) мероприятий может использоваться для формирования экспертных заключений, необходимых для выработки своевременных и адекватных управленческих решений ветеринарной и медицинской службами страны.

Для анализа пространственно-временных закономерностей эпизоотического процесса бешенства нами создан электронный кадастр случаев заболевания животных бешенством, построенный на платформе реляционной базы данных Microsoft Office Access®. Все данные кадастра привязаны к атрибутивной таблице цифровой карты Российской Федерации масштаба 1:1000000, что позволило реализовать проект геоинформационной системы на платформе ArcGIS® for Desktop и проводить визуализацию эпизоотологических данных через построение нозологических карт.

ГИС дает возможность отдельного анализа эпизоотической ситуации по заболеваемости диких и домашних животных, что позволяет сформировать более реалистичную картину распространенности бешенства в дикой природе. Полученные данные можно рекомендовать к широкому использованию в эпизоотологическом мониторинге бешенства и научно-обоснованном планировании противоэпизоотических и противоэпидемических мероприятий.

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 (Приложение 3). Данные мониторинга используются в ежеквартальных информационных Бюллетенях Европейского центра ВОЗ «WHO Rabies Bulletin Europe» (Приложение 4).

2.2.2 Общая характеристика эпизоотического процесса бешенства на территории Российской Федерации в динамике за 1991-2015 гг

Ретроспективный анализ основных показателей эпизоотического процесса бешенства на территории Российской Федерации за последние 25 лет (1991-2015 г.) свидетельствует, что эпизоотия регистрируется на стабильно высоком уровне и охватывает значительную часть территории страны. При этом изменение показателей заболеваемости бешенством часто носит эвентуальный скачкообразный характер с более чем двукратным ростом или падением в течение календарного года.

За анализируемый период по сумме всех видов животных с учетом повторяемости в эпизоотическом процессе бешенства на территории РФ участвовало 58463 неблагополучных пункта, или в среднем 2339 пунктов в год. Наибольшее количество неблагополучных пунктов было зарегистрировано в 2005 г. – 4277 пунктов и 2007 г. – 4562 пункта (рисунок 2). Свыше 3 тыс. неблагополучных пунктов числилось в 2002, 2003, 2008-2010 и, в последний период, в 2013 и 2015 г. Минимальное значение показателя отмечено в 1994 г., составившее 550 пунктов.

Показатель абсолютного количества заболевших бешенством животных всех видов за 1991-2015 гг. составил 75890 гол., или 3036 гол. в среднем за год. Наибольшее количество заболевших животных отмечено в 1992 г. – 5240 гол., 2005 г. – 5253 гол. и 2007 г. – 5503 гол. Свыше 4 тыс. животных заболело бешенством в 2003, 2008, 2010 и 2015 г. В многолетней динамике проявления эпизоотического процесса, с периодами пиков, просматривается неуклонное повышение как числа неблагополучных пунктов, так и заболевших бешенством животных (трендовые линии графика) и только с 2010 г. регистрируется стабилизация на сравнительно высоком уровне.

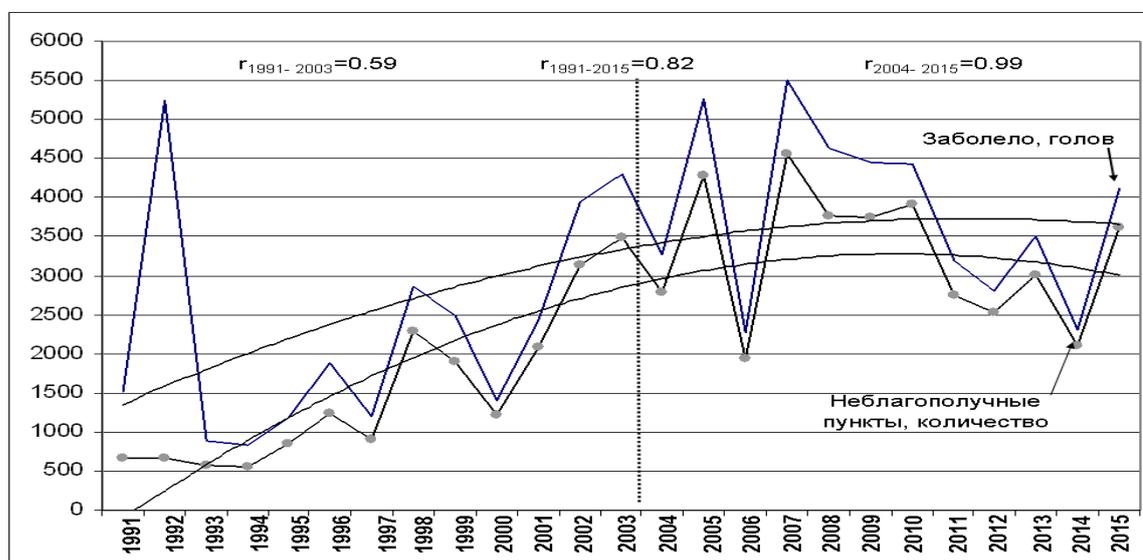


Рисунок 2 – Динамика неблагополучных пунктов и заболевших бешенством животных на территории Российской Федерации (1991-2015 гг.)

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

В общей структуре количества заболевших животных за весь период анализа (25 лет) преобладают дикие животные, доля которых в эпизоотическом процессе составила 40,4% (30,6 тыс. в абсолютном значении), что отражено на рисунке 3. Второе место по этому показателю принадлежит крупному рогатому скоту – 18,7% и, далее, с небольшим отставанием, собакам – 17,9%, затем кошкам – 11%. Число случаев заболевших бешенством верблюдов и свиней незначительно и связано как с их малочисленностью (верблюды), так и особенностями содержания (свиньи).

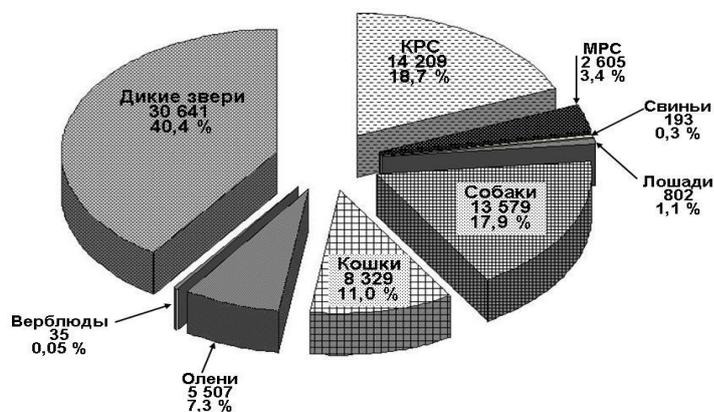


Рисунок 3 – Структура заболеваемости животных бешенством на территории Российской Федерации (1991-2015 гг.)

Научно-практический интерес представляет показатель изменения видовой структуры заболевших животных в динамике эпизоотического процесса, а также корреляционные взаимосвязи заболеваемости диких зверей, как основных источников вируса бешенства и распространителей инфекции, и других видов восприимчивых животных.

В динамике эпизоотического процесса бешенства животных на территории РФ изменилась структура заболеваемости, в частности значительно увеличилась доля случаев болезни среди диких зверей. Так, если в период 1991-2003 гг. бешенство было зарегистрировано по этой группе животных у 8497 гол., или у 28,2% в структуре общей заболеваемости, то в последующий период показатель

увеличился в 2,6 раза (22144 гол.) – 48,4%. (рисунок 4). На фоне повышения заболеваемости диких зверей увеличилось количество случаев заболевания бешенством собак и кошек, как в абсолютных показателях, так и в процентном отношении в общей структуре.

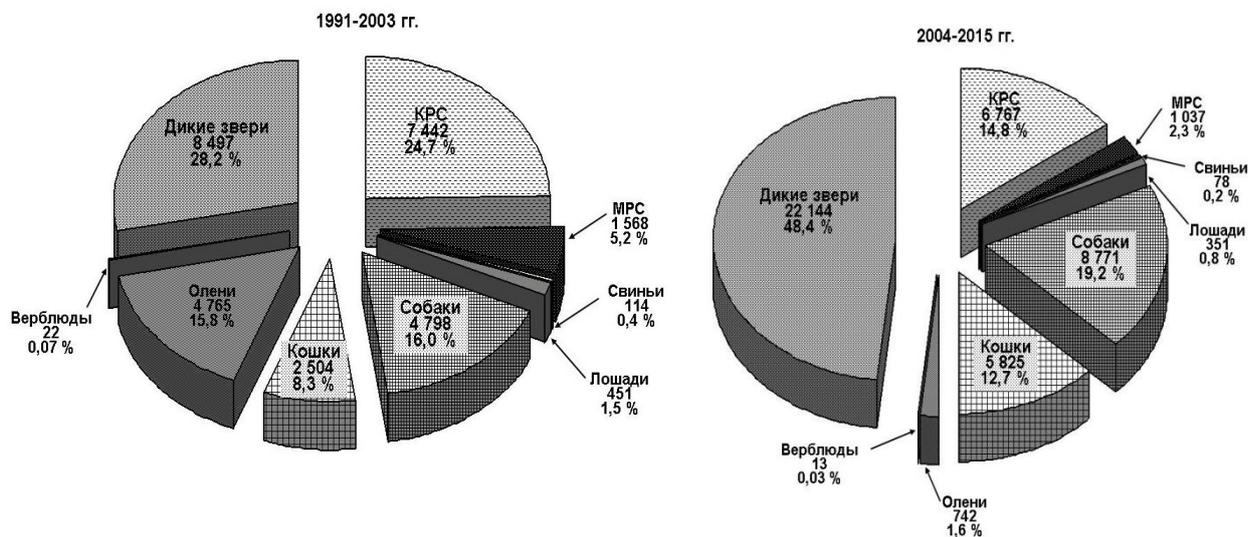


Рисунок 4 – Изменение структуры заболеваемости животных бешенством на территории Российской Федерации за периоды 1991-2003 и 2004-2015 гг.

Исходя из анализа поступающих оперативных статистических сведений, из различных учреждений регионов РФ, в последнее десятилетие количество видов животных, вовлеченных в эпизоотический процесс бешенства, постоянно расширяется. Из плотоядных животных, кроме лисицы, волка, енотовидной собаки и песца, как потенциально наиболее значимых источников вируса бешенства, в эпизоотическую цепь все чаще включаются дикие куньи. Единичные случаи бешенства зарегистрированы в различные периоды среди барсуков, корсаков, рысей, зайцев, ежей, серых крыс, шакалов, норок, бобров, ондатр, хомяков, мышей, в том числе летучих. Из копытных животных бешенство отмечено у сибирских косуль, маралов, пятнистых оленей, лосей и кабанов. Так, в 2004 г. в зоопарке г. Нальчика жертвами только случайных заражений бешенством стали 2 лося, 2 бобра и муфлон, 2 ондатры и хонорик.

2.2.3 Особенности эпизоотического процесса бешенства разных видов животных

Сельскохозяйственные животные. В современных условиях на территории Российской Федерации случаи заболевания сельскохозяйственных животных бешенством не являются самостоятельным вектором, однако служат достоверным индикатором проявления эпизоотического процесса в дикой природе. В сравнении с мониторинговыми исследованиями в дикой природе случаи бешенства сельскохозяйственных животных учитываются в эпизоотологической статистике более стабильно, редко игнорируются, и их учет дает наиболее реалистичную картину территориального распространения болезни.

В эпизоотический процесс бешенства, по официальным статистическим данным, на территории России в настоящее время вовлечено шесть основных видов сельскохозяйственных животных – крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, свиньи, лошади, олени и верблюды, относящиеся (кроме свиней) к жвачным, являющихся тупиком в эпизоотии бешенства, и заболевание их свидетельствует о проявлении бешенства в популяции диких плотоядных даже, в случае если эпизоотия природного типа не регистрируется.

В общей сложности за 1991-2015 гг. в эпизоотическом процессе бешенства всех основных видов сельскохозяйственных животных на территории РФ участвовало свыше 11,9 тыс. неблагополучных пунктов при среднегодовом показателе 477 пунктов (таблица 1). При этом из оборота стада всех видов продуктивных животных от заболевания бешенством выбыло (пало и вынужденно уничтожено) суммарно 23,4 тыс. голов скота при среднегодовых потерях 934 гол. Заболеваемость в расчете на 10 тыс. восприимчивого к бешенству поголовья животных составила 0,67 гол., в одном неблагополучном пункте (коэффициент очаговости) заболело в среднем 2 гол.

Таблица 1 – Основные показатели эпизоотического процесса бешенства сельскохозяйственных животных в Российской Федерации (1991-2015 гг.)

Вид животного	Неблагополучные пункты		Заболело, гол.			Очаговость, гол.
	всего	в средн. в год	всего	в сред. 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

Крупный рогатый скот. В структуре всех видов сельскохозяйственных животных по показателю неблагополучия и заболеваемости первое место принадлежит крупному рогатому скоту, как наиболее массовому в животноводстве страны и распространенному повсеместно в категориях хозяйств всех форм собственности.

Неблагополучные пункты перманентно в относительно равном количестве в динамике по годам регистрируются почти во всех регионах РФ (за исключением заполярных территорий) со среднегодовым показателем 404,2 пункта с некоторым общим повышением в период 2000-2008 гг. (рисунок 5). В общей сложности, с учетом повторяемости и вновь выявленных, в эпизоотический процесс бешенства крупного рогатого скота в стране было вовлечено за 25 лет анализа 10104 неблагополучных пунктов, или преобладающая доля пунктов по всем видам сельскохозяйственных животных – 84,7%.

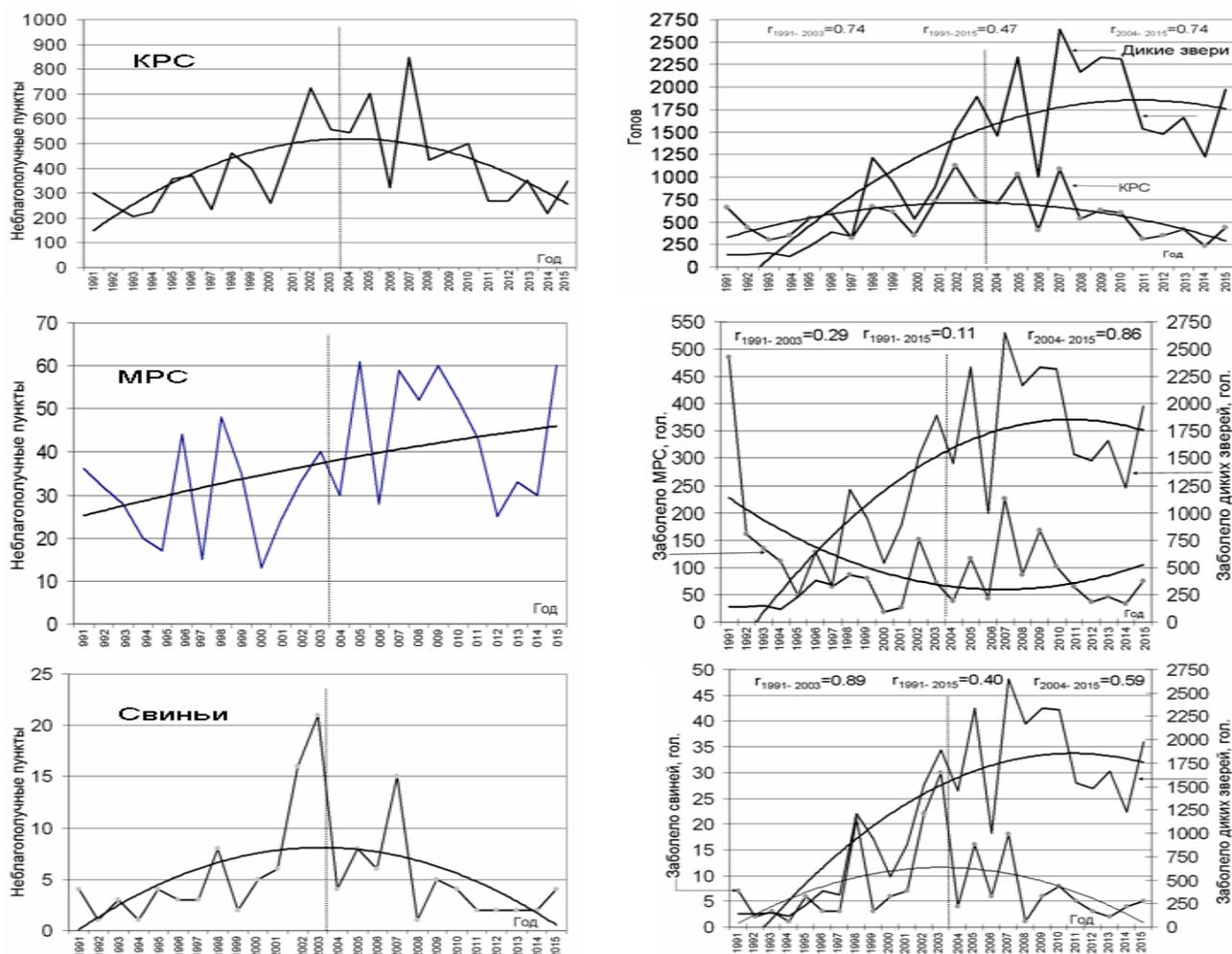


Рисунок 5 – Динамика неблагополучных пунктов по бешенству крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота и свиней (графики слева) и корреляционная связь между количеством заболевших бешенством животных и диких зверей (графики справа)

Среди этого вида животных отмечено также наибольшее количество заболевших бешенством животных – 14209 голов различных половозрастных групп (60,8% от числа заболевших с.-х. животных по всем видам), или 568,4 головы в среднем за год. 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 (рисунок 5). Заболеваемость в расчете на 10 тыс. голов, с учетом общей численности поголовья крупного рогатого скота в РФ (19,8 млн. гол. в 2015 г. (Росстат)) составила 0,21 гол., коэффициент очаговости – 1,7 гол. Рост количества неблагополучных пунктов и

заболевшего бешенством крупного рогатого скота отчетливо проявлялся до 2004 г. с дальнейшей динамикой снижения, однако это снижение во многом связано с общим уменьшением поголовья этого вида животных в РФ.

Заболеваемость бешенством 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 ($r=0,74$) в границах обоих сравниваемых периодов (рисунок 5), что вполне закономерно, исходя из основных источников заражения – диких плотоядных.

Мелкий рогатый скот. Среди мелкого рогатого скота, представленного, в основном, овцами и козами, за 25 лет анализа зарегистрировано 918 неблагополучных пунктов, или 36,7 в среднем в год (второе место после крупного рогатого скота), в которых заболело 2605 голов (104,2 гол. в год). Динамика неблагополучных пунктов характеризуется тенденцией роста на протяжении всего периода и нарастающим повышением числа заболевших животных с 2007 г. (рисунок 5).

Всплески количества заболевшего бешенством мелкого рогатого скота, превышающие среднегодовой показатель, регистрировали в 1991 г. – 486 гол. и в 2007 г. – 226 гол. В расчете на 10 тыс. поголовья, при общем их количестве, равном 26 млн., заболеваемость составила 0,02 гол., коэффициент очаговости – 2,8 гол. Отмечается, что если в первом учетном периоде корреляционная взаимосвязь заболеваемости мелкого рогатого скота и диких зверей характеризуется как слабая ($r = 0,29$), то во втором периоде она приобрела выраженную сильную связь ($r = 0,86$).

Свиньи. Несмотря на общую большую численность свиней в структуре животноводства РФ (22,2 млн. гол. в 2015 г.), эпизоотическая ситуация по

бешенству среди этого вида животных не напряжена. Всего за 25 лет анализа выявлено 133 неблагополучных пунктов (5,3 в среднем в год), в которых жертвами нападений и укусов больными бешенством дикими плотоядными животными явились 193 свиньи, или в среднем 7,7 гол. в год. Общая тенденция динамики эпизоотического процесса носит дугообразный трендовый характер (рисунок 5) с повышением уровня неблагополучных пунктов и заболевших животных в период 1991-2004 гг. и снижением в последующий учетный период.

Установлено, что если в 1991-2013 гг. проявлялась тесная коррелятивная взаимосвязь заболевших бешенством свиней и диких плотоядных ($r = 0,89$), то в последующий период она ослабла и характеризовалась как средняя ($r = 0,59$). Данное обстоятельство объясняется снижением поголовья свиней в подворьях владельцев. В расчете на 10 тыс. поголовья заболеваемость составила 0,002 гол., а в одном неблагополучном пункте заболело в среднем 1,5 свиньи. Низкая напряженность эпизоотической ситуации по бешенству в отрасли связана с тем, что основное поголовье свиней в современный период содержится в крупных свиноводческих комплексах закрытого типа, в которые проникновение посторонних животных, в том числе диких плотоядных, практически невозможно. Заражение свиней вирусом бешенства в основном происходит в сельской местности в крестьянско-фермерских хозяйствах и личных подворьях граждан, где контакт с больными бешенством плотоядными наиболее вероятен.

Лошади. В динамике за 25 анализа показатели проявления эпизоотического процесса бешенства среди лошадей на территории РФ сглажены как по количеству неблагополучных пунктов, так и уровню заболеваемости (рисунок 6). Корреляционная взаимосвязь заболеваемости лошадей и диких плотоядных 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 (Башкирия, Калмыкия, Татарстан), что повышает вероятность контакта с больными бешенством дикими плотоядными животными во все сезоны года. Всего в эпизоотический процесс бешенства было

вовлечено 672 неблагополучных пунктов (26,9 пунктов в год), в которых заболело 802 гол. (в среднем 32,1 гол. в год). Заболеваемость в расчете на 10 тыс. гол. составила 0,02 гол., очаговость – 1,2 гол. В динамике неблагополучия и заболеваемости отмечаются те же особенности (повышение и снижение), что и по другим основным видам сельскохозяйственных животных.

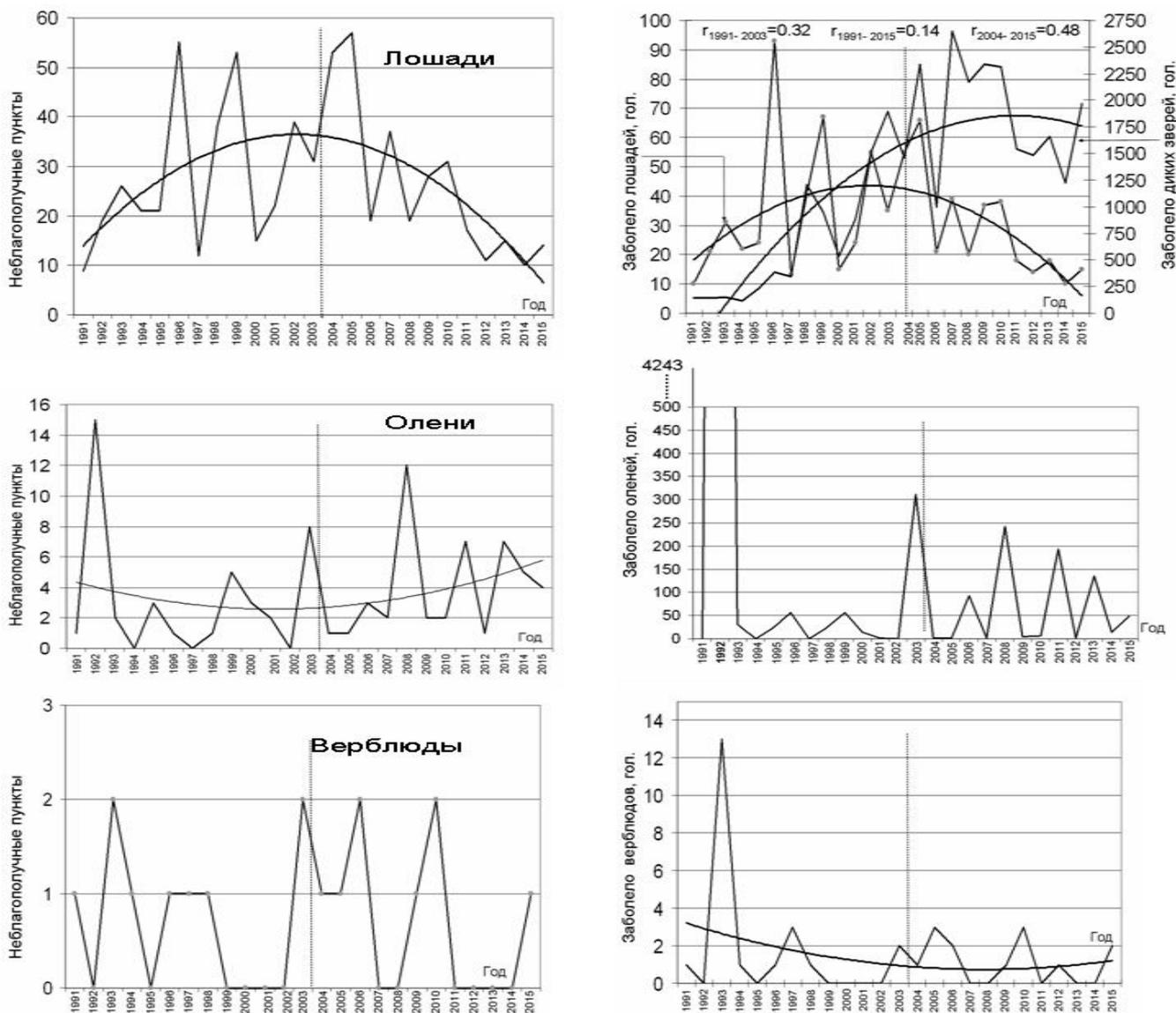


Рисунок 6 – Динамика неблагополучных пунктов по бешенству лошадей, оленей и верблюдов (графики слева) и корреляционная связь между количеством заболевших бешенством животных и диких зверей (графики справа)

При сравнительно невысоких среднегодовых показателях неблагополучия (3,5 пункта) и количества заболевших животных (280,3 гол.), примечательна

эмерджентная «архивспышка» бешенства среди северных оленей в 1992 г. (рисунок 6). При этом было объявлено 15 неблагополучных пунктов, в которых заболело и погибло 4243 животных, в одном неблагополучном пункте заболело в среднем (очаговость) 283 гол., что значительно выше, чем по всем другим видам животных.

Корреляционные взаимосвязи заболеваемости этого вида животных с заболеваемостью диких плотоядных установить не представляется возможным, ввиду отсутствия статистических данных по количеству заболевших бешенством песцов в природе.

Крупные эмерджентные вспышки эпизоотии бешенства среди северных одомашненных оленей регистрировали позднее с различными по времени межэпизоотическими периодами в 2003, 2008 и 2011 годах, что также предопределило высокий уровень очаговости – 63,3 гол. Многие исследователи связывают эмерджентность арктического бешенства среди северных оленей с резким увеличением популяционной плотности песцов в биотопах тундры в периоды наиболее благоприятной кормовой базы, связанной с массовым увеличением популяции леммингов (грызун подсемейства полевок) – как основных природных носителей рабического вируса в биотопах Севера и, вследствие этого, активизацией эпизоотического процесса.

Верблюды. Ввиду малочисленности данного вида животных в РФ (ориентировочно 7,2 тыс. гол. в 2015 г.), поголовье которого в настоящее время сосредоточено в основном в Астраханской области (70%), Республике Калмыкия, Республике Татарстан, Республике Алтай и Республике Тыва (Росстат), определяющими основной нозоареал инфекции, бешенство регистрируется спорадически лишь в отдельные годы (рисунок 6), однако со сравнительно высоким показателем заболеваемости в расчете на 10 тыс. поголовья – 1,9 гол.

Плотоядные животные. Одной из особенностей современной эпизоотической обстановки по бешенству является возрождение эпизоотии так называемого городского бешенства, распространяемого домашними плотоядными

– собаками и кошками. Элементарные правила содержания домашних животных не соблюдаются даже в крупных городах, а в сельских населенных пунктах, на дачных участках и в многочисленных садово-огородных кооперативах вольное содержание собак и кошек, формально имеющих хозяев, стало обычным и привычным явлением. Соответственно, не может на стационарно неблагополучных территориях не расти число прямых контактов вольно гуляющих собак, числящихся домашними, с больными бешенством дикими хищниками.

Проведенный нами анализ оперативной информация, поступающей в ФГУ «Центр ветеринарии» МСХ РФ из различных регионов страны показал, что далеко не всегда отражается реальная частота возникновения таких контактов. Так, в 2009 г. мы смогли обобщить данные лишь по 8 областям (Ярославская, Московская, Самарская, Нижегородская, Омская, Рязанская, Липецкая, Тюменская) и Алтайскому краю. Выявлено, что больные бешенством лисицы и енотовидные собаки на этих территориях 146 раз вступали в прямой контакт с «домашними» собаками и кошками, в большинстве случаев, не имеющими вакцинальной защиты. Трудно представить количество таких инцидентов по стране в целом.

Считаем, что собаки, как категория животных «животные, подозреваемые в заражении», весьма опасны в эпизоотологии бешенства. Прямых указаний в отношении к этой категории животных в инструктивных документах, к сожалению, нет. На практике поступают по-разному. В Алтайском крае, Тюменской и Нижегородской областях нередко немедленно усыпляют таких собак. В большинстве других субъектов обходятся вынужденной вакцинацией, изоляцией во дворе у хозяев и «ветеринарным наблюдением», о котором вскоре забывают. Существует мнение, что 10-дневного наблюдения за вакцинированной и изолированной собакой вполне достаточно. Примечателен опыт в этом отношении США, где подозреваемые в заражении бешенством собаки и кошки (после контакта с дикими плотоядными), не имеющие гарантированной

вакциной защиты, подлежат немедленной эвтаназии или, по согласованию с владельцами, строгому 6-месячному карантинированию.

Настораживают полученные в последние годы данные о выявлении бешенства у бродячих собак и кошек, чаще именуемых в отчетах безнадзорными, не имеющими хозяев. Рост числа таких случаев следует расценивать, как еще одно очень важное доказательство возможности осложнения эпизоотической и эпидемической обстановки в самое ближайшее время.

Собаки и кошки являются главной причиной активизации городского бешенства, поддерживаемого за счет увеличения численности бродячих и безнадзорных животных в городах и крупных населенных пунктах, слабо регламентированное законодательством и обусловленное безответственностью владельцев.

Бродячие и безнадзорные собаки и кошки концентрируются в наиболее «кормных» местах – на свалках, окраинах и в ближайших окрестностях крупных населенных пунктов. К этим же пунктам приблизились места обитания диких плотоядных – конкурентов сформированной урбанизацией пищевой цепи собак и кошек. При этом эпизоотические цепи природного и городского бешенства зачастую смыкаются.

Возросла опасность расширения ареала бешенства, связанная не только с возможностью дальних миграций диких плотоядных (волки), но и с угрозой неконтролируемого завоза зараженных собак и кошек на территорию благополучных районов страны. В связи с увеличением ввоза собак и кошек из зарубежных стран, усилилась угроза трансконтинентального бешенства.

В многочисленных городах России, при почти повсеместном неблагополучии окружающих сельских районов, стали неизбежными случаи заражения принадлежащих горожанам собак и кошек на загородных дачных и садово-огородных участках. Неизбежны и направленные к городам сезонные миграции бродячих собак, чаще обитающих в теплое время года в сельской местности. Соответственно, городские популяции бродячих и безнадзорных собак и кошек стали явным контингентом риска заражения бешенством населения.

Таким образом, эпизоотии природного и городского типа активизировались одновременно, что и знаменует новый, современный этап эволюции эпизоотического процесса бешенства в специфических российских условиях.

Анализ показал, что в эпизоотический процесс бешенства на территории РФ за 1991-2015 гг. было вовлечено 3 основных группы плотоядных животных, учитываемые в официальной статистике – собаки, кошки и дикие звери (таблица 2), обуславливающие перманентность эпизоотического процесса рабической инфекции на территории РФ. В целом за анализируемый период в эпизоотическом процессе бешенства плотоядных животных на территории РФ участвовало свыше 46,3 тыс. неблагополучных пунктов при среднегодовом показателе 1853 пунктов (очага), в которых сумма заболевших животных, учтенных в официальной статистике, составила 52,5 тыс. голов (2102 гол. в среднем в год) при сравнительно невысокой очаговости, что отражено в таблице 2.

В последние годы резко обострилась проблема безнадзорности домашних животных и, как следствие этого, возрастала заболеваемость бешенством собак, и особенно кошек.

Таблица 2 – Основные показатели эпизоотического процесса бешенства плотоядных животных на территории Российской Федерации (1991-2015 гг.)

Вид животного	Неблагополучные пункты (очаги)		Заболело, гол.		Очаговость, гол.
	1991-2015 гг.	в среднем в год	1991-2015 гг.	в среднем в год	
Собаки	11131	445,2	13579	543,2	1,2
Кошки	7534	301,4	8329	333,2	1,1
Дикие звери	27658	1106,3	30641	1225,6	1,1
Всего	46323	1852,9	52549	2102,0	1,1

Собаки. Собаки являются наиболее распространенным видом восприимчивых к бешенству непродуктивных домашних животных во всех регионах России. Так как большое количество собак содержится у частных владельцев, а территория их содержания ограничивается площадью городской

квартиры или подворья (питомник, вольер и др.), считаем целесообразным, в данном случае, использовать определение эпизоотического очага бешенства, в отличие от неблагополучного пункта.

Отличительной особенностью собак в эпизоотологии бешенства является то, что большинство их пород, в силу выраженных природных качеств, сами идут на контакт с дикими животными (в том числе с больными бешенством), забежавшими на территорию населенного пункта, а также себе подобными.

За период анализа в эпизоотическом процессе бешенства среди собак, участвовал, в общей сложности, 11131 эпизоотический очаг, или в среднем 445,2 очага в год, относительно равномерно распределенных в динамике неблагополучия (рисунок 7).

Суммарное количество, заболевших бешенством собак, составило за 25 лет 13579 (543,2 гол. в год) при очаговости 1,2 гол. Показатель заболеваемости в расчете на 10 тыс. поголовья собак установить не представляется возможным, ввиду отсутствия достоверных данных по их общему поголовью в стране.

Динамические изменения характеризуются постоянным нарастанием, как числа неблагополучных пунктов (очагов), так и заболевших животных. Лишь в последние 3 года эти показатели сравнительно стабилизировались. Четко прослеживается тесная корреляция увеличения заболеваемости бешенством собак с ростом количества заболевших диких зверей как в целом, так и в обоих периодах анализа (рисунок 7).

Кошки. При сравнительно несколько более низких показателях количества эпизоотических очагов и заболевших бешенством кошек, в динамике неблагополучия просматриваются примерно те же эпизоотические особенности, что и по группе собак, в том числе высокая корреляция количества неблагополучных пунктов и заболевших животных с аналогичными показателями среди диких зверей (рисунок 7).

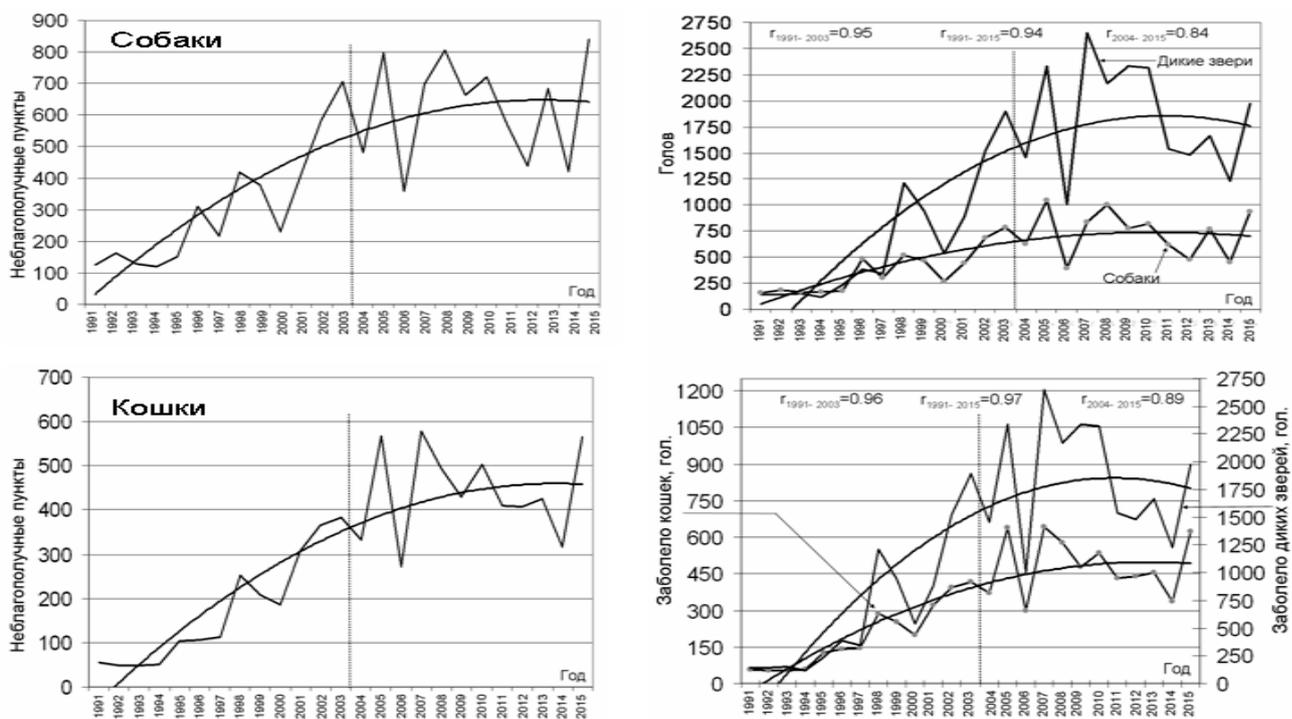


Рисунок 7 – Динамика неблагоприятных пунктов по бешенству собак и кошек (графики слева) и корреляционная связь между количеством заболевших бешенством домашних плотоядных и диких зверей (графики справа)

Вместе с тем, настораживает и вызывает к размышлениям высокая заболеваемость кошек бешенством и большое количество регистрируемых неблагоприятных пунктов (эпизоотических очагов) в эпизоотическом процессе.

Так, за период анализа зарегистрировано 8329 случаев заболевания кошек бешенством. Если не принимать во внимание крупный рогатый скот, как наиболее многочисленный, а также северных оленей, разводимых территориально обособленно, то количество заболевших бешенством кошек в 2,3 раза превосходит этот показатель по таким видам животных как мелкий рогатый скот, свиньи и лошади, вместе взятых.

Дикие звери. Основным резервуаром и источником распространения вируса бешенства на территории Российской Федерации являются дикие звери (хищники), в основном семейства псовых – лисицы, волки, енотовидные собаки,

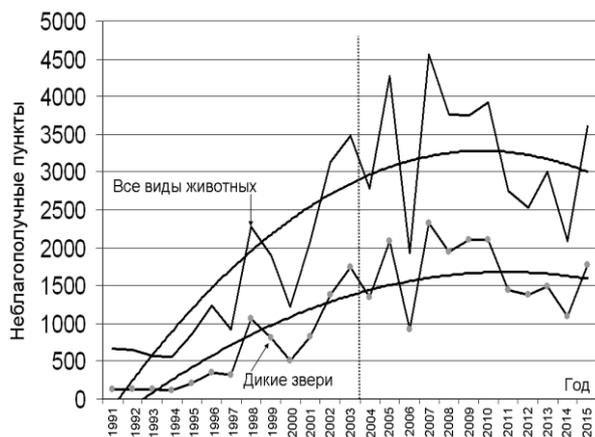


Рисунок 8 – Динамика количества заболевших бешенством диких зверей на территории РФ

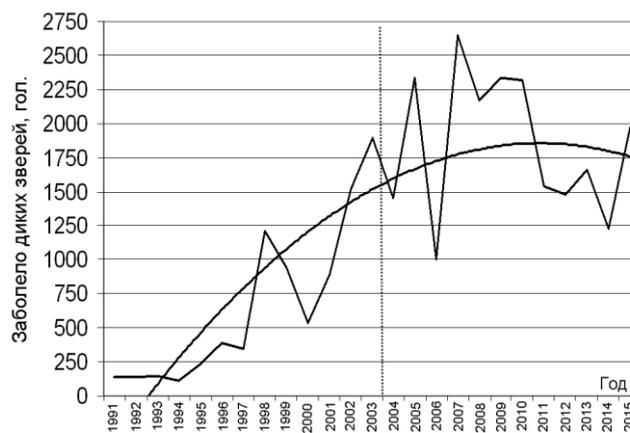


Рисунок 9 – Динамика количества неблагополучных пунктов на территории РФ

песцы (арктическое бешенство), реже другие виды. Арел обитания диких плотоядных животных, особенно лисиц, занимающих лидирующие позиции, в России настолько обширен, что делает трудноосуществимой задачу проведения тотального мониторинга распространённости природного бешенства в масштабе всей территории страны. Можно также отметить отсутствие единой стратегии и стандарта проведения мониторинговых исследований бешенства в дикой природе, обязательных для всех регионов, что значительно снижает точность формируемой официальной статистики по этой болезни.

Среди рассматриваемых групп плотоядных животных показатели эпизоотического процесса бешенства среди диких зверей значительно преобладают с таковыми как по всем видам животных, так и по группам домашних плотоядных – собак и кошек. Общее количество неблагополучных пунктов (очагов), зарегистрированных среди диких животных за 1991-2015 гг. (27658 гол.), а также их среднегодовое число (1106,3) составляет почти половину (47,3%) этого показателя по сумме всех видов животных (рисунки 8, 9), в 2,5 раза превышают показатели среди собак, а количество заболевших животных – в 2,3 раза.

В сравнении групп кошек и диких зверей соотношение неблагополучных пунктов и заболевших животных составляет 1:3,7. Вместе с тем, неизменным по

всем видам плотоядных животных остается показатель очаговости бешенства, составляющий 1,1-1,2 гол.

Главные причины осложнения эпизоотической ситуации по диким плотоядным кроются в социально-экономических изменениях всех отраслей сельского хозяйства, в том числе природопользования. На фоне развала охотничьего хозяйства фактически прекратился контроль численности диких хищников – лисицы, волка, енотовидной собаки, песца. Есть все основания утверждать, что истинный ареал бешенства в дикой природе гораздо шире представленного в официальной статистике. На обширных и труднодоступных территориях Севера страны (особенно Сибири) и Дальнего Востока плановые мониторинговые исследования на бешенство давно прекратились.

Кроме того, дикие плотоядные отличаются высокой мобильностью и преодолевают (особенно волк) большие расстояния, оказывая трансэпизоотические изменения ситуации бешенства в сопредельных регионах не только в масштабе РФ, но и других странах.

Роль енотовидной собаки в современной эпизоотологии бешенства. В последние годы в РФ в значительной мере изменилась видовая структура заболеваемости животных бешенством, в том числе плотоядных. Возросло число случаев бешенства животных отдельных негостальных видов в антропогенных и природных условиях.

Обстановка по бешенству енотовидных собак (ЕС) приближается к угрожаемому. Число случаев бешенства ЕС в Европе в 2006 г. составило 1400, или 15,3% от общей заболеваемости. В Финляндии (1988-1989 гг.) эпизоотия бешенства протекала преимущественно среди енотовидных собак (73%) без участия лисиц, так как инфекция была обусловлена заносом вируса арктического биовара в регион с высокой плотностью популяции именно этих животных. Плотность ЕС составляла 3-10 гол/10 км², тогда как для лисиц этот показатель равен 1,5-3 (Макаров В.В., Воробьев А.А., 2005; Макаров В.В. и др., 2008; Potzsch C. et al., 2002).

Енотовидная собака (уссурийская енотовидная собака, уссурийский енот (*Nystereutes procyonoides Jrauy, Racoon dog*)) изначально была распространена только на востоке и юго-востоке Азии, в частности, в Уссурийском крае, Китае, Корее, Вьетнаме, Японии. Однако начатые в середине 1930 г. работы по ее акклиматизации в западных районах СССР (Украина, Белоруссия, Прибалтика), сопровождались успешной экологической экспансией новых территорий и освоением свободных ниш. К 1990 г. на западе и в центре РФ (Псковская, Смоленская, Тверская, Московская области, а также сопредельные регионы) предполагаемая плотность популяции ЕС достигла 3-10 гол/10 км² (Яременко Д.Н., 2002; Сидоров Г.Н. и др., 2004).

Причиной этого послужили разнообразные уголья, близкие к водоемам и болотам. ЕС обитает в зарослях кустарников, густого смешанного или лиственного подлеска, в долинах и поймах рек, у ручьев и озер, в местах с оврагами и балками, избегает сухих возвышенных участков, чистых хвойных лесов и насаждений. Это сильный и довольно крупный зверь длиной 65-80 см и массой тела до 10 кг. Морфологические признаки ее характерны для всеядного хищника – небольшие клыки, притуплённые зубы. Индивидуальный участок обитания составляет до 10 км². Зверь ведет сумеречный образ жизни, хорошо плавает и посещает острова, находящиеся на большом расстоянии от берега, кормится на мелководье. Летом питается преимущественно животными кормами (амфибии, моллюски, насекомые), осенью – растительными (плоды диких фруктовых деревьев, желуди, орехи, зерна злаков), а также мышевидными грызунами и рыбой. ЕС – не активный хищник, а типичный «собиратель», ее рацион зависит от наличия, частоты встречаемости того или иного корма, и его доступности. В отличие от животных других видов семейства *Canidae*, важными фенологическими особенностями ЕС являются зимняя спячка с ноября до второй половины февраля - середины марта и умение притворяться мертвой (Яременко Д.М., 2002).

Согласно данным научной литературы за 1995-2002 гг. бешенство ЕС по количеству зарегистрированных случаев занимает второе место после лисицы.

Нозоареал бешенства ЕС в основном приходится на запад и центр РФ. Среднегодовая заболеваемость в этот период составила 18 случаев.

Клинические признаки болезни проявляются в этологических аномалиях, сходных с поведением больных лисиц – утрате естественной осторожности и активность днем, появлении в несвойственных местах (населенные пункты), контактах и неспровоцированной агрессивности в отношении других животных, особенно собак. Больные ЕС могут служить источником инфекции для человека, что усугубляется неизвестностью зверя для широкого круга людей и его склонностью к «притворству». В числе известных случаев гидрофобии заражение от ЕС составляет 4-6 % (Сидоров Г.Н. с соавт., 2008; Макаров В.В. с соавт., 2008).

Цель данного фрагмента исследований – с помощью методов дескриптивной и количественной эпизоотологии проанализировать текущее состояние и, учитывая экологические аспекты, дать сравнительную оценку роли енотовидной собаки в современной эпизоотологии бешенства на территории Российской Федерации.

Эпизоотические и экологические признаки природного бешенства ЕС анализировали и сравнивали с таковыми для лисицы, как основного хозяина инфекции в данной паразитарной системе. Материалом служили результаты эпизоотологической статистики, полученные в собственных исследованиях, а также ежеквартальные публикации Rabies Bulletin Europe за 1999-2007 гг. (Makarov V.V., Sukharev A.A., Gulyukin A.M. и др., 2008).

Эпизоотическую обстановку изучали в областях центра и запада РФ, где была территориально сконцентрирована заболеваемость ЕС бешенством и происходило прогрессивное возрастание напряженности общей эпизоотической обстановки по этой болезни. Заболеваемость – основной признак, характеризующий эпизоотическую обстановку, выражали в относительных измерениях, как плотность инфекции – годовое число случаев на 100 тыс. км², а также выведением экспоненциальных трендов. Сведения о численности диких животных получали из официальной информации Государственной службы учета охотничьих животных РФ (Состояние ресурсов охотничьих животных в

Российской Федерации в 2003-2007 гг.). Плотность популяции ЕС и лисицы выражали в количестве голов (экз.) на 10 км². Количественные данные географического порядка получали из официального источника (Советский энциклопедический словарь, 1987).

Общая картина эпизоотической обстановки по бешенству в Европейской части РФ и ее динамика за последнее десятилетие приведены на рисунке 10.

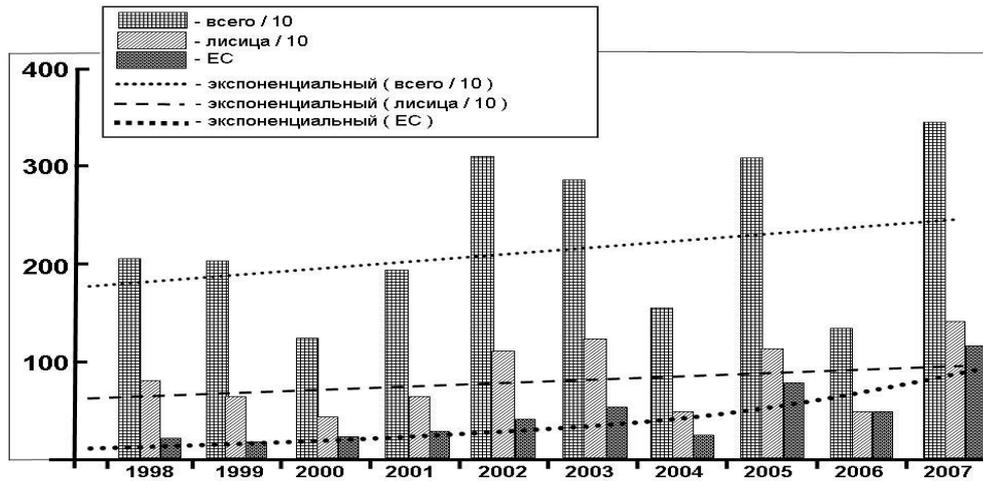


Рисунок 10 – Графики и тренды эпизоотической статистики по бешенству в Европейской части РФ в 1998-2007гг.; заболеваемость (количество случаев) общее, лисицы и ЕС (данные комасштабированы)

По графическим данным и, особенно, по трендам наблюдали высокий уровень стабильного неблагополучия в целом по видовой структуре восприимчивости (от 1076 до >3000 случаев в год), по заболеваемости лисицы (300-1250) и ЕС (10-78) с параллельной динамикой и некоторой тенденцией к росту заболеваемости ЕС. Данные рисунка 11 количественно характеризуют поголовье ЕС и лисицы. Популяционная плотность ЕС в областях расселения относительно гомогенна и варьирует от 0,26 до 0,5 гол. на 10 км² (исключением является Псковская область, где плотность ЕС 1,6 гол/км², что настораживает и требует особого анализа). Плотность населения лисицы в неблагополучных областях составляет около 1 гол. на 10 км² и выше, что соответствует ее

предельному нижнему популяционному уровню в паразитарной системе бешенства и обеспечивает экологическую устойчивость последней.

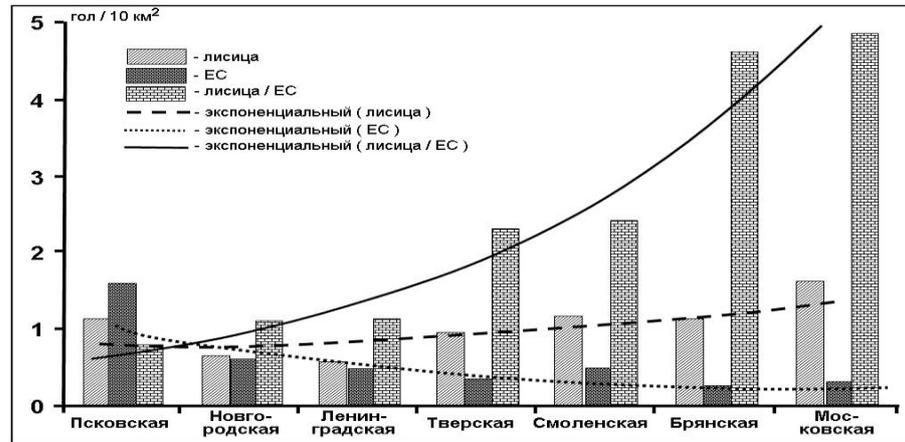


Рисунок 11 – Графики и тренды среднегодового населения лисицы и енотовидной собаки (гол/10 км²) и их соотношение в областях в 2004-2007 гг. (вариационный ряд построен по возрастанию вовлечений признака «соотношение лисица/ЕС»).

Тренды на рисунках 12 и 13 свидетельствуют о положительной корреляции плотности населения лисицы и напряженности эпизоотической ситуации по областям, в частности, заболеваемости.

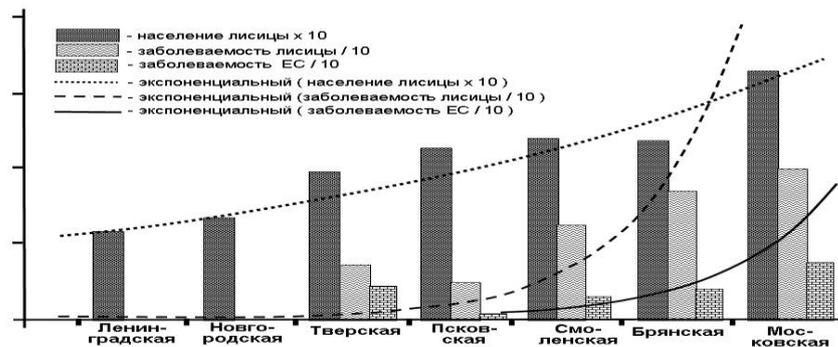


Рисунок 12 – Графики и тренды среднегодового населения лисицы (гол/10 км²) и среднегодовая заболеваемость бешенством (случаев/100 тыс. км²) лисицы и ЕС в областях Северо-Запада РФ в 2004-2007 гг. (вариационный ряд построен по возрастанию значений признака «население лисицы»)

Графический формат взаимосвязи трендов признаков «население» — «заболеваемость» (как лисицы, так и ЕС) полностью соответствует классической зависимости «жертва — хищник» применительно к паразитарной системе

природноочагового бешенства. Тренды в вариационном ряду на рисунке 13 в неблагоприятном по бешенству ЕС регионе РФ показали выраженную прямую положительную коррелятивную связь между признаком «соотношение населения лисица/ЕС» и заболеваемостью последней. Увеличение степени преобладания численности лисицы по сравнению с таковой ЕС с высокой долей вероятности служит еще одним фактором риска заболеваемости последней. В то же время тренд «соотношение заболеваемости лисица/ЕС» имеет обратное значение, как лисицы, так и ЕС, что указывает на отсутствие прямой корреляции между заболеваемостью бешенством ЕС и таковой лисицы.

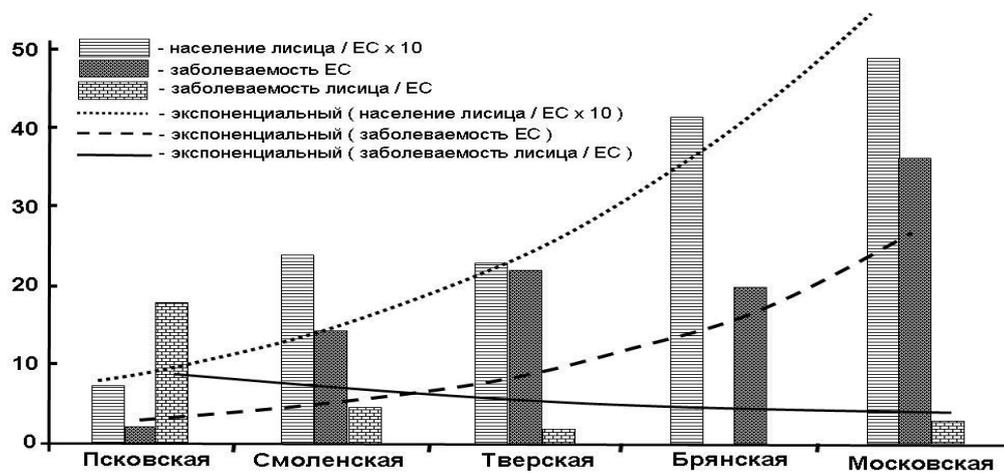


Рисунок 13 – Графики и тренды соотношения населения (гол/10 км²), заболеваемости бешенством лисицы и ЕС, заболеваемость бешенством ЕС (случаев/100 тыс. км²) в областях Северо-Запада РФ в 2004-2007 гг. (данные комасштабированы)

Формальный графический анализ выполнен на уровне крупных административных территориальных образований (областей) в связи с ограниченностью источников статистического материала и отсутствием или недоступностью более глубоких, частных сведений экологического и эпизоотологического порядка (отдельные районы и природно-территориальные комплексы). Крупный масштаб определяет некоторую методологическую условность оценок и усредненность количественных данных, тем не менее результаты анализа позволяют сделать обоснованное предположение, что

бешенство ЕС зависит в наибольшей степени от популяционной плотности лисицы – ведущего фактора риска, определяющего эпизоотическую обстановку по бешенству в регионе.

Исходя из приведенных выше характеристик, принципиальное значение в заболеваемости бешенством ЕС могут иметь также сходства и отличия ее экологии от условий жизни и поведения лисицы. Их взаимоотношения представляют собой очевидную аллобиотопию, то есть сосуществование в пределах общего ареала, но в разных биотопах. Конкуренция между ними в питании и использовании нор незначительна. Пищевые цепи лисицы не совпадают с таковыми у ЕС. Первая охотится преимущественно на полях, тогда как ЕС добывает корм в основном у воды и на мелководьях (растительные корма, земноводные, пресмыкающиеся, насекомые). В зимний период пищевые интересы зверей вообще не пересекаются в связи с адаптивной способностью енотовидной собаки к накоплению больших запасов жира и зимнему сну. ЕС и лисица не являются экологическими эквивалентами, поэтому в местах кормежки ЕС ведет себя очень смело по отношению к лисице, что увеличивает вероятность их контактов с эпизоотическими последствиями.

Вместе с тем экологическое перекрытие – взаимное перекрытие популяциями ЕС и лисицы имеющихся ресурсов в экосистеме в рамках аллобиотопии и в целом близость их экологических ниш является серьезным фактором эпизоотического риска. Это вторая важная причина эмерджентной заболеваемости ЕС бешенством в цепи «больная лисица – ЕС».

Следовательно, наиболее вероятными причинами обострения текущей ситуации по бешенству ЕС служат факторы риска как эпизоотического, так и экологического порядка. Последние обуславливают особую и возрастающую роль животных этого вида в характере проявления природного бешенства на территории северо-запада РФ. Все это требует серьезных усилий по дальнейшему достоверному контролю и прогнозированию экологических и иных последствий экспансии ЕС северо-западных и сопредельных территорий РФ, прежде всего ее популяционной численности.

Важным остается вопрос о потенциальном викариате ЕС применительно к современной паразитарной системе бешенства, где хозяином являются лисицы, — способности стать эпизоотологическим эквивалентом, дополнительным или запасным хозяином и природным резервуаром инфекции. Установленная коррелятивная связь заболеваемости ЕС с ростом численности и степени преобладания лисиц указывает на первостепенную роль увеличения интенсивности жизненных контактов этих животных. В то же время, несмотря на значительное число случаев бешенства ЕС и второе место после лисицы в видовой структуре поражаемых животных, нет корреляции показателя «заболеваемость лисица/ЕС» с другими анализируемыми признаками. По-видимому, бешенство ЕС, так же как и бешенство восприимчивых животных прочих видов, кроме лисицы, имеет случайный, жертвенный характер эпизоотического тупика. На основании статистических данных нельзя предполагать, что бешенство ЕС может иметь самостоятельные циклы и эпизоотическое проявление.

Существуют и экологические предпосылки неспособности животных этого вида обеспечивать природные циклы рабической инфекции (тип и рацион питания, зимняя спячка). Более того, ЕС можно отнести только к «таксономическим хищникам», зверь не является облигатно плотоядным, не составляет звена в системе «жертва – хищник» и не зависит от такой системы межвидовых взаимоотношений, как лисица и прочие облигатные хищники.

Поэтому предположения и заключения ряда исследователей, что енотовидная собака в последнее время становится дополнительным хозяином и потенциально может стать резервуаром природноочагового бешенства, пока не имеют серьезных оснований.

Сезонность проявления эпизоотического процесса бешенства. Сезонность бешенства анализировали по территории Европейской части Российской Федерации, как наиболее неблагоприятной в стране. За период анализа (1994-2013 гг.) эпизоотический процесс бешенства характеризовался четко выраженной сезонностью заболеваемости, за исключением тех лет, когда

происходил циклический спад, растягивавшийся на несколько лет, и ежегодный пик подъема был незначительный (рисунок 14). Как видно из рисунка 14, пики подъема заболеваемости, суммарные по всем видам животных, находятся в прямой зависимости от скачков заболеваемости лисиц.

За последние 20 лет сезонный подъем заболеваемости у лисиц преимущественно приходился на первый квартал года, что наблюдалось 16 раз. Несколько раз точка максимума была смещена и пройдена в четвертом или во втором квартале, что видимо, связано с более ранним или поздним началом периода гона у этого вида животных.

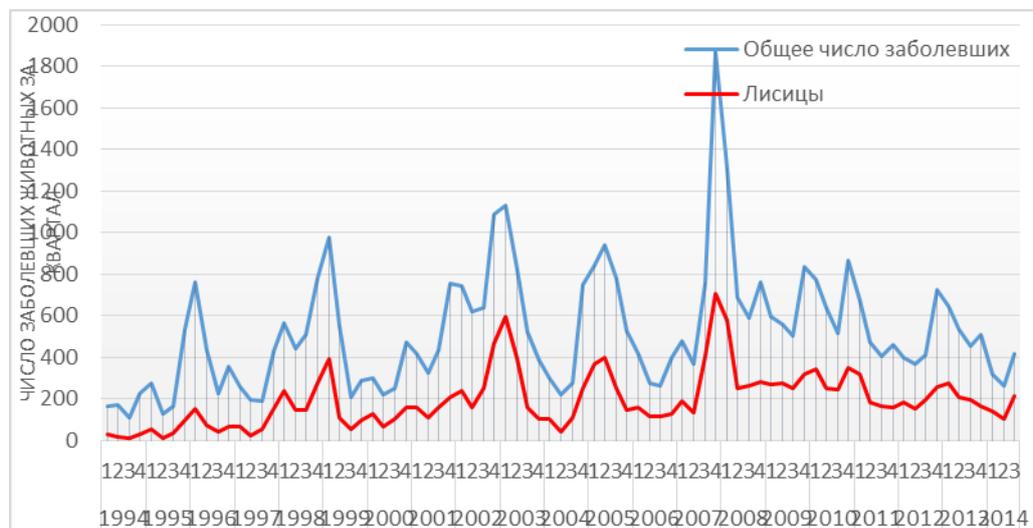


Рисунок 14 – Сезонность заболеваемости животных бешенством лисиц и остальных видов животных на Европейской части РФ (1994-2014 гг.)

По другим видам животных, вовлеченных в эпизоотический процесс бешенства, также прослеживаются пики сезонности, но с небольшими отличиями. Сезонность бешенства у собак в наибольшей степени синхронизирована с волной подъема заболеваемости у лисиц (рисунок 15), тогда как пики максимума у кошек и крупного рогатого скота чаще приходятся на 4 квартал и к 1 кварталу следующего года уже начинается спад (рисунок 16). Подобное явление можно объяснить особенностью биологии лисиц, которая предопределяет два ежегодных

периода, характеризующихся повышением внутрипопуляционных контактов и в качестве результата провоцирует рост интенсивности природного бешенства.

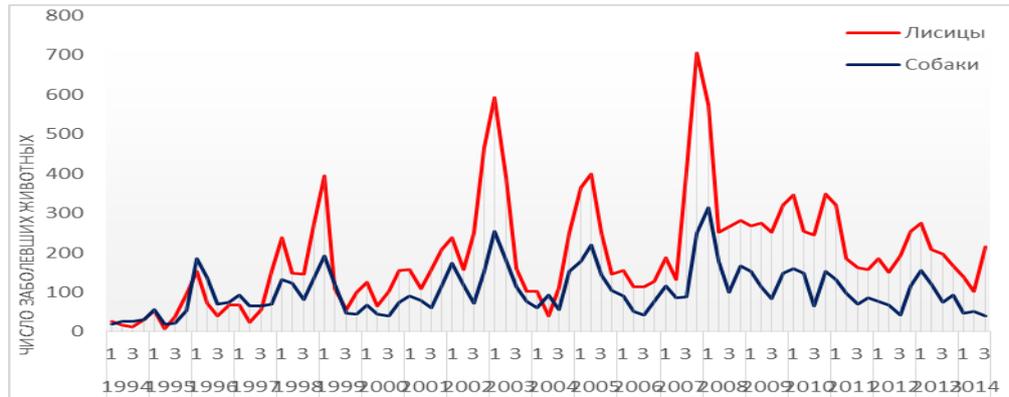


Рисунок 15 – Сезонность заболеваемости животных бешенством лисицы и собак на Европейской части РФ (1994-2014 гг.)

Первый всплеск эпизоотии наблюдается осенью, когда идет расселение лисят. В этот период лисицы ищут грызунов в местах хозяйственной деятельности человека и происходит их вторжение на территорию традиционной охоты кошек и посещение мест содержания крупного рогатого скота. Это автоматически инициирует активное вовлечение домашних животных в нарастающую волну эпизоотии четвертого квартала.

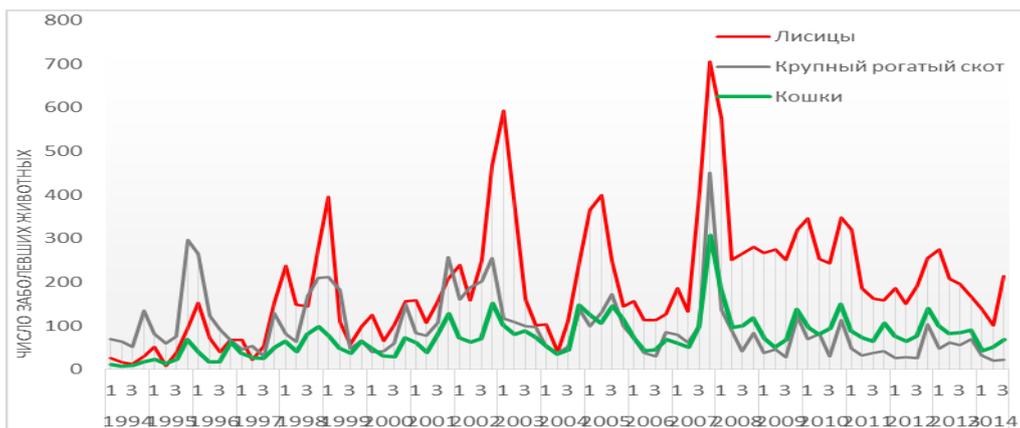


Рисунок 16 – Сравнительная сезонность заболеваемости бешенством лисицы, крупного рогатого скота, кошек

Следующий пик подъема эпизоотии совпадает с периодом гона у лисиц и приходится на период зима-начало весны, когда крупный рогатый скот уже

переведен на стойловое содержание, а охотничья активность кошек минимальна, что, видимо, и является причиной расхождения динамики показателей в 1 квартале.

Если разбить графики на три периода по шесть лет, то можно дать следующую оценку сезонности заболеваемости животных бешенством.

За шесть лет с 4 квартала 1996 г. по 3 квартал 2002 г. заболеваемость крупного рогатого скота не значительно уступает этому показателю у лисиц и находится на втором месте. Четко прослеживается сезонность и цикличность эпизоотического процесса.

В последующие шесть лет (с 4 квартала 2002 г. по 3 квартал 2008 г.) графики подъема и последующего падения обладают наибольшим размахом. Пик заболеваемости у лисицы приходится преимущественно на 1 квартал и один раз на 2 квартал.

За последние шесть лет (с 4 квартала 2008 г. по 3 квартал 2013 г.) можно отметить значительное превышение числа заболевших лисиц в сравнении с показателями по другим видам животных. Расхождение на графике линий заболеваемости лисиц и крупного рогатого скота максимально. Сезонные и циклические колебания сглажены. Пик заболеваемости у лисицы распределен между 1 и 4 кварталом. Наблюдаемое «срезание» пика заболеваемости лисиц в первый квартал года, возможно, связано с проведением оральной иммунизации диких плотоядных, однакостораживает слабое снижение заболеваемости животных в летний период, что было наиболее выражено в годы, когда вакцинация лисиц осуществлялась максимально интенсивно.

За последний период в 12 месяцев отмечены два подъема заболеваемости, которые затрагивают сразу все категории животных: октябрь-ноябрь 2013 года и февраль-март-апрель 2014 года (рисунок 17). Подъем заболеваемости лисиц в конце лета 2014 года происходил без соответствующего отклика у других видов животных, что, скорее всего, свидетельствует о проведении более обширной кампании мониторинговых исследований в дикой природе.

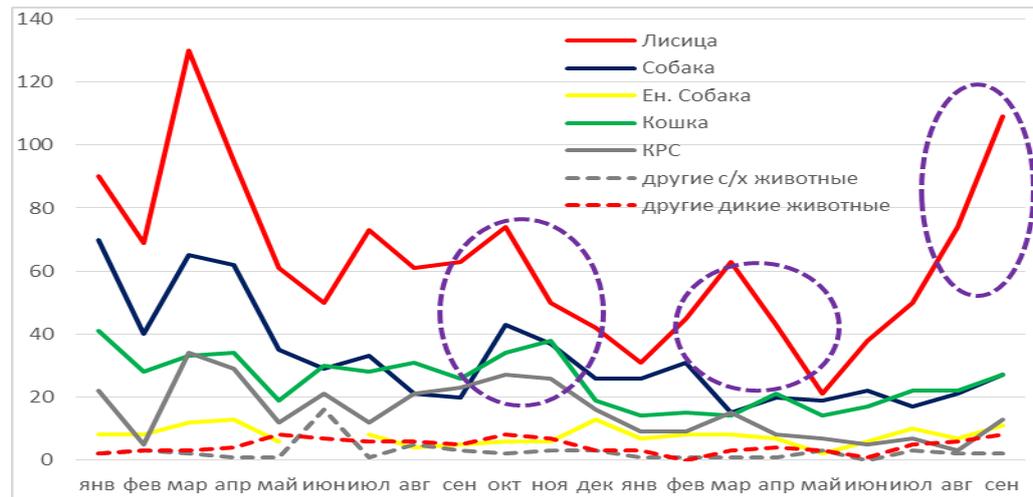


Рисунок 17 – Динамика помесечной заболеваемости бешенством животных разных видов на Европейской части РФ с января 2013 г. по август 2014 г.

Сентябрь 2014 года характеризовался продолжающимся подъемом заболеваемости диких животных и началом роста заболеваемости домашних плотоядных и сельскохозяйственных животных, что является показателем начала ежегодного осеннего пика эпизоотии бешенства.

2.2.4 Автокорреляционный анализ динамики неблагополучных пунктов и заболевших бешенством животных на территории РФ (1991-2015 гг.).

Автокорреляция – это статистическая взаимосвязь между последовательностями величин одного ряда, взятыми со сдвигом по времени. Данное понятие широко используется в эконометрике – науке, изучающей количественные и качественные взаимосвязи с помощью математических и статистических методов и моделей.

Использование автокорреляций в анализе временных рядов в настоящее время широко практикуется в биологических исследованиях. Так, метод использован в исследовании динамики эпизоотической активности и численности

монгольской пищухи в Горно-Алтайском природном очаге чумы (Корзун В.М. с соавт., 2010), что позволило по коэффициентам автокорреляции судить о закономерном характере оцениваемых показателей, а коррелограммы временных рядов давали представление о периоде колебаний.

Представленные ряды данных отражают изменения во времени процесса заболеваемости животных, когда наблюдения осуществляются через один и тот же интервал – год. Следовательно, анализ этих рядов, возможно проводить, используя методологию изучения временных рядов. Так, в частности, полагая, что между членами ряда может существовать тот или иной тип связи, наличие её обнаруживают с помощью корреляции между последовательными членами, сдвинутыми относительно друг друга на заданный интервал времени – 1, 2 , ... k года, называемый лагом запаздывания. Упорядоченная по лагу совокупность полученных таким образом коэффициентов авторкорреляции образует коррелограмму, которая в ряде случаев может вскрыть природу внутренней связи членов временного ряда. В качестве основных причин, вызывающих наличие автокорреляции во временном ряду, отражающем эпизоотический процесс, можно выделить:

- инерционность процесса во времени, когда рост заболеваемости и её спад происходят не мгновенно, а обладают некоторой инертностью;
- наличие эффекта запаздывания эпизоотического процесса на изменения факторов, вызывающих заболевание;
- наличие выраженной тенденции в динамике ряда, вызванной спецификой учета данных во времени.

В наших исследованиях анализ коррелограмм временных рядов количества неблагополучных пунктов и заболевших бешенством животных разных видов используется в основном с целью их сопоставления и доказательства наличия или отсутствия некой общей природы, определяющей внутреннюю связь членов временного ряда.

Визуальный анализ построенных автокоррелограмм (рисунок 18) позволяет сформулировать следующее:

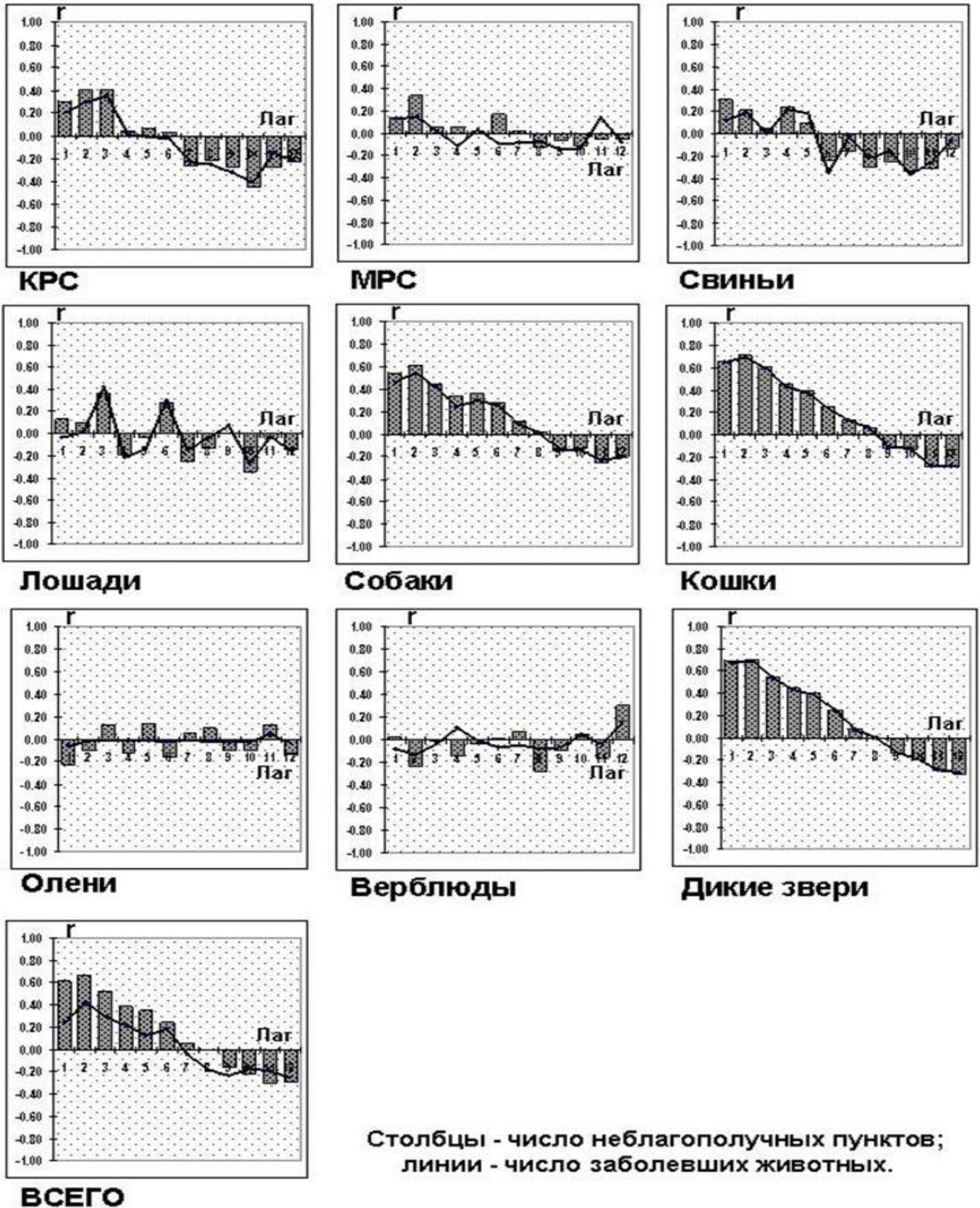


Рисунок 18 – Коррелограммы временных рядов количества неблагоприятных пунктов и заболевших бешенством животных разных видов на территории Российской Федерации (1991-2015 гг.)

Природу связи между членами соответствующих рядов для числа неблагополучных пунктов и числа заболевших животных можно считать очень схожей, особенно для крупного рогатого скота, свиней, лошадей, собак, кошек и диких зверей. Очень низкие коэффициенты автокорреляции этих показателей установлены по мелкому рогатому скоту, оленям и верблюдам.

Очень идентичными оказались коррелограммы 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, влияющих на схожесть динамики эпизоотического процесса. Отличительной особенностью этих видов животных является их «плотоядность», определяющая основные механизмы и пути передачи вируса бешенства в природных условиях.

Таким образом, эпизоотическая ситуация в Российской Федерации в период с 1991 по 2015 год была стабильно напряженной. Учитывая размеры ареала болезни, охватывающего большую часть регионов страны, можно констатировать отсутствие реальной возможности полного искоренения эпизоотии в ближайшей и средне отдаленной перспективе. В этих условиях оптимальным направлением противоэпизоотических мероприятий является проведение ежегодной антирабической вакцинации домашних плотоядных при одновременной жесткой регуляции численности бродячих животных.

2.2.5 Современная эпизоотическая ситуация бешенства на территории Российской Федерации

Общие особенности формирования ареалов бешенства в современный период отчетливо прослеживаются на рисунке 19. Тепловая карта плотности распределения неблагополучных пунктов через интенсивность окраски, дифференцирует районы в зависимости от концентрации пунктов и их возможного взаимного влияния.

Как видно из рисунка, Центральный и Приволжский Федеральные округа образуют единый природно-очаговый комплекс. Уральский Федеральный округ с запада частично изолирован горной цепью, и этот разрыв отчетливо виден на карте. Естественный барьер уральских гор позволяет развиваться эпизоотии бешенства в этом округе по собственному циклу.



Рисунок 19 – Карта плотности распределения вспышек бешенства животных на территории Российской Федерации за 2014 г.

Эпизоотическая ситуация на северных территориях в силу их удаленности не может находиться под влиянием обстановки в центральных регионах страны. Здесь можно говорить о существовании независимого ареала или ареалов бешенства, которые распространяются на весь север РФ и функционируют с собственными закономерностями развития, соответствующими северной экосистеме. Дополнительно можно выделить эпизоотическую ситуацию, наблюдаемую в Забайкальском и Приморском краях, которые также расположены изолированно и, видимо, находятся под влиянием ситуации на территории южного соседа.

Согласно сведениям ФГБУ «Центр ветеринарии», ФГБУ «Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория», лаборатории эпизоотологии ФГБНУ ВИЭВ в Российской Федерации за 2015 г. было зарегистрировано 4114 случаев заболевания бешенством животных в 3614 пунктах. Вся поступившая в

2015 г. первичная информация по бешенству животных была введена в базу данных ВИЭВ, что позволило агрегировать ее для публикации ежеквартальных отчетов в Европейский бюллетень по бешенству (RABIES BULLETIN EUROPE) и одновременно интегрировать данные в эпизоотологическую геоинформационную систему (ГИС) для последующего пространственного анализа с визуализацией в виде нозологических карт.

Ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по бешенству позволяет сделать заключение, что начавшийся в конце 2014 г. резкий подъем заболеваемости животных, является проявлением цикличности эпизоотий, и продолжением динамики роста числа случаев в 2015 г. При этом в 2015 г. показатели заболеваемости животных по итогам года вышли на уровень наиболее высоких значений за последние пять лет (рисунок 20).

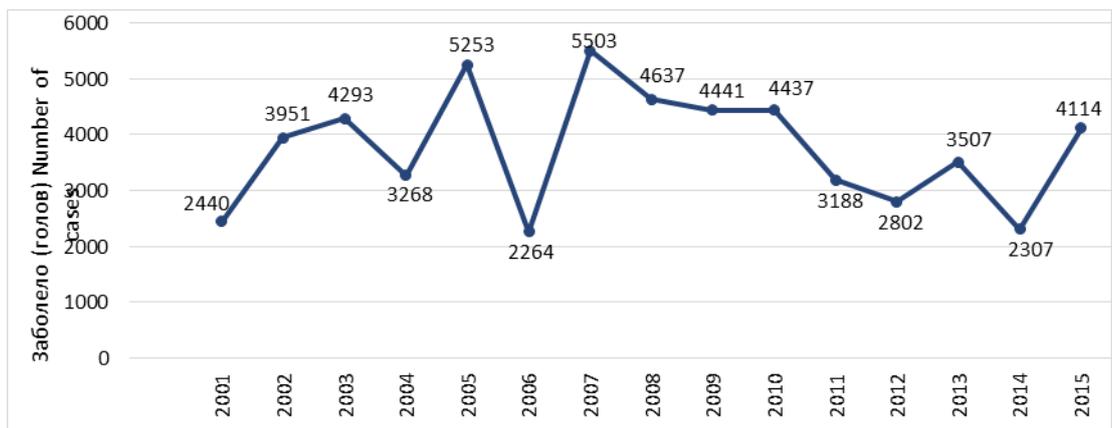


Рисунок 20 – Динамика случаев заболеваемости бешенством животных на территории Российской Федерации (2001-2015 гг.)

Современная эпизоотия бешенства (2015г.) характеризуется распространением в 65 субъектах (76,5%) всех 9 федеральных округов РФ с превалированием количества заболевших животных всех видов в Центральном и Приволжском (таблица 3). В эпизоотический процесс было вовлечено свыше 4,1 тыс. животных, из которых 48% приходится на диких, 37,8% – на домашних плотоядных (собаки и кошки) и 14,1% – на сельскохозяйственных животных. 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-ти регионах число заболевших животных превышало 100 голов.

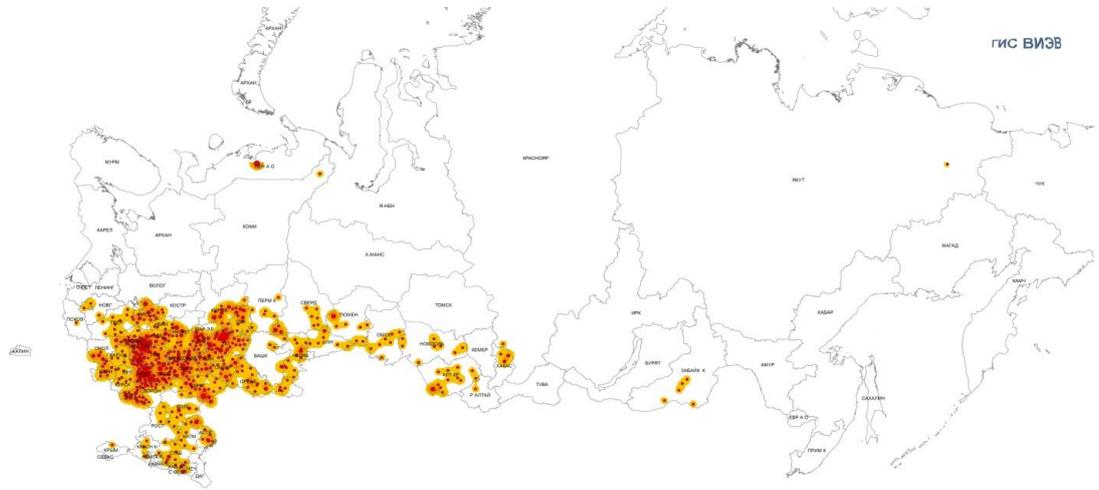
В 2015 г. произошел рост заболеваемости бешенством во всех Федеральных округах, составивший 1807 животных всех видов, или 78,4% по сравнению с 2014 годом.

Таблица 3 – Распространение бешенства животных по федеральным округам РФ (2015 г.)

Федеральный Округ	Случаи бешенства, всего	Плотоядные		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

Границы ареала бешенства и особенности территориального распределения неблагополучных пунктов отчетливо прослеживаются на квартальных нозологических картах плотности, построенных в ГИС по принципу «тепловых карт», на которых интенсивность окраски представлена с переходом от желтого (минимальный уровень) к красному (максимальный уровень), что представлено на рисунке 21.

1 квартал 2015 г.



2 квартал 2015 г.



3 квартал 2015 г.



4 квартал 2015 г.

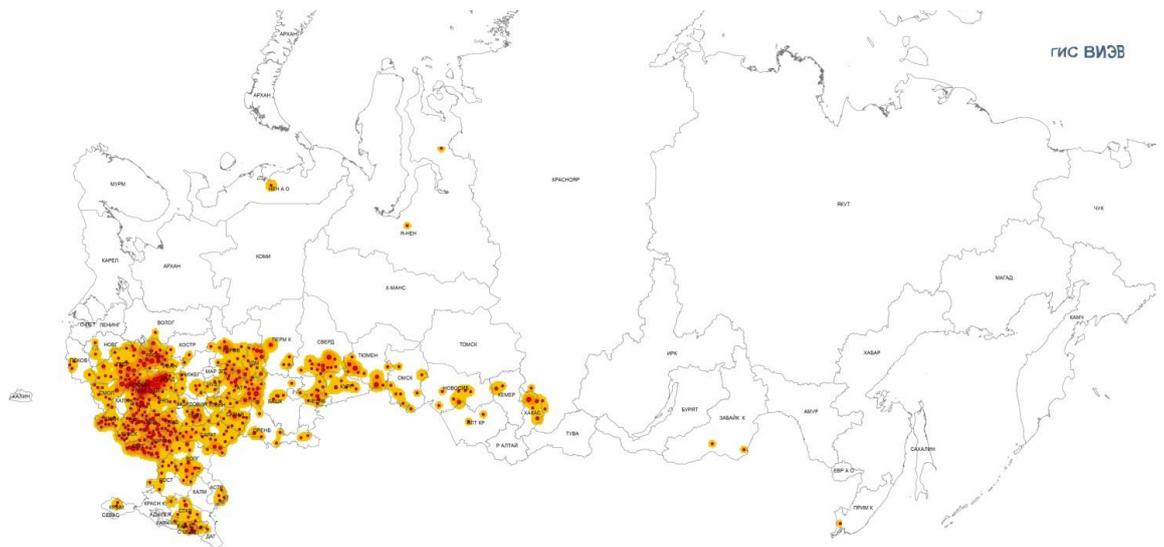


Рисунок 21 – Поквартальные карты плотности распределения очагов бешенства животных на территории Российской Федерации в 2015 г.

Как видно из карт, представленных на рисунке 21, ареал эпизоотии бешенства в 1 квартале 2015 г. преимущественно сфокусировался в самом центре Европейской части страны. Неблагополучные пункты на юге Европейской части и

за Уралом расположены несколько обособленно, что позволяет говорить о наличии географического разрыва в эпизоотии бешенства. Сравнивая карты во временной динамике в течение года, можно отметить процесс разделения основного Европейского ареала болезни на два кластера: Западный и Восточный.

На рисунке 22 приведена карта калькуляции различий, где отражены зоны отличия в плотности территориального распределения эпизоотических очагов бешенства при сравнении начала и конца 2015 г. Красным и оранжевым цветом выделены зоны, в которых интенсивность эпизоотии бешенства стала нарастать к концу года. Зеленым и синим цветом выделены зоны, где в течение года плотность территориального распределения эпизоотических очагов стала уменьшаться. На картах отчетливо прослеживается прохождение эпизоотической нагрузки от центра к периферии с наиболее выраженным смещением интенсивности эпизоотического процесса на северо-запад, где расположена наиболее обширная «красная» зона.



Рисунок 22 – Зоны отличий в плотности территориального распределения очагов бешенства в первом и последнем кварталах 2015 г.

Смещение интенсивности эпизоотического процесса от центра к периферии в 2015 г. было диаметрально противоположным направлению вектора продвижения эпизоотии, которое наблюдалось годом ранее. В 2014 году, в относительно благополучное первое полугодие, центр Европейской части РФ по плотности размещения эпизоотических очагов заметно уступал областям на внешнем радиусе традиционного ареала болезни, но в последствии, в 3-4 кварталах, именно на центральные территории пришелся крайне резкий подъем эпизоотии (Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Хисматуллина Н.А. с соавт., 2015).

Результаты регистрации бешенства среди различных групп животных с ранжированием от наиболее неблагополучных регионов по нисходящей приведены в таблице 4.

В общей сложности в эпизоотический процесс бешенства в современный период (2015 г.) было вовлечено свыше 4,1 тыс. животных всех видов, из которых почти половина (48%) приходится на диких животных. На втором месте находятся домашние плотоядные животные (собаки и кошки), доля которых составляет 37,8% и, далее, – сельскохозяйственные животные (6,8%).

По итогам 2015 г. наибольшее число животных всех видов, заболевших бешенством, было зарегистрировано на территории Московской области, республики Татарстан, Липецкой, Саратовской, Белгородской и Ярославской областей. В 9-ти регионах число заболевших животных превышало 100 голов.

Превалирующая доля заболевших животных в первых трех субъектах РФ приходится на диких и домашних плотоядных животных. «Лидирующие позиции» по числу заболевших бешенством сельскохозяйственных животных принадлежат Республике Татарстан (67 гол.), Ненецкому автономному округу (за счет арктического бешенства среди одомашненных северных оленей – 48 гол.), Саратовской (34 гол.) и Оренбургской (31 гол.) областям.

Таблица 4 – Распространение, ранжирование и структура случаев бешенства животных на территории регионов Российской Федерации в 2015 г.

Регион	Дикие	%	Дома шние плото ядные	%	Сельск охозяй ственн ые	%	Всего (100 %)
Московская обл.	239	59,9	133	33,3	27	6,8	399
Республика Татарстан	151	47,6	99	31,2	67	21,1	317
Липецкая область	109	47,0	94	40,5	29	12,5	232
Саратовская область	45	26,2	93	54,1	34	19,8	172
Белгородская область	45	29,4	94	61,4	14	9,2	153
Ярославская область	135	88,2	13	8,5	5	3,3	153
Владимирская область	90	61,2	54	36,7	3	2,0	147
Тамбовская область	57	41,6	51	37,2	29	21,2	137
Республика Удмуртия	98	76,0	21	16,3	10	7,8	129
Пензенская область	42	33,6	75	60,0	8	6,4	125
Тульская область	25	20,7	90	74,4	6	5,0	121
Тверская область	102	88,7	12	10,4	1	0,9	115
Воронежская обл.	25	23,6	71	67,0	10	9,4	106
Кировская область	75	71,4	21	20,0	9	8,6	105
Оренбургская область	18	17,8	52	51,5	31	30,7	101
Самарская область	13	13,8	63	67,0	18	19,1	94
Свердловская область	52	65,0	19	23,8	9	11,3	80
Рязанская область	6	7,9	65	85,5	5	6,6	76
Ульяновская область	27	36,5	43	58,1	4	5,4	74
Смоленская область	60	82,2	13	17,8	–	0,0	73
Брянская область	40	57,1	21	30,0	9	12,9	70
Волгоградская область	14	21,2	31	47,0	21	31,8	66
Тюменская область	46	71,9	9	14,1	9	14,1	64
Ненецкий АО	11	18,0	2	3,3	48	78,7	61
Нижегородская область	37	60,7	22	36,1	2	3,3	61
Челябинская область	45	75,0	12	20,0	3	5,0	60
Республика Чувашия	44	74,6	14	23,7	1	1,7	59
Новосибирская область	17	34,7	10	20,4	22	44,9	49
Астраханская область	10	20,8	26	54,2	12	25,0	48
Орловская область	13	27,7	29	61,7	5	10,6	47
Республика Мордовия	8	17,4	24	52,2	14	30,4	46
Республика Хакасия	31	72,1	4	9,3	8	18,6	43
Курганская область	27	73,0	7	18,9	3	8,1	37
Ставропольский край	8	23,5	17	50,0	9	26,5	34
Курская область	11	33,3	15	45,5	7	21,2	33
Респ. Северная Осетия	2	6,3	19	59,4	11	34,4	32
Ростовская область	13	40,6	13	40,6	6	18,8	32

Омская область	13	41,9	10	32,3	8	25,8	31
Алтайский кр.	14	46,7	5	16,7	11	36,7	30
Забайкальский край	4	13,3	–	0,0	26	86,7	30
Пермский край	26	89,7	3	10,3	–	0,0	29
Респ. Башкортостан	10	38,5	14	53,8	2	7,7	26
Калужская область	18	75,0	4	16,7	2	8,3	24
Костромская область	17	70,8	7	29,2	–	0,0	24
Республика Марий Эл	11	45,8	6	25,0	7	29,2	24
г. Москва	14	70,0	6	30,0	–	0,0	20
Респ. Кабардино-Балкария	5	29,4	7	41,2	5	29,4	17
Ивановская область	11	68,8	4	25,0	1	6,3	16
Республика Калмыкия	3	23,1	10	76,9	–	0,0	13
Краснодарский край	4	40,0	5	50,0	1	10,0	10
Новгородская область	8	80,0	2	20,0	–	0,0	10
Псковская область	8	88,9	1	11,1	–	0,0	9
Республика Дагестан	–	0,0	1	11,1	8	88,9	9
Красноярский край	3	37,5	5	62,5	–	0,0	8
Республика Крым	4	50,0	4	50,0	–	0,0	8
Кемеровская область	3	42,9	3	42,9	1	14,3	7
Карачаево-Черкес. респ.	–	0,0	2	50,0	2	50,0	4
Республика Саха(Якутия)	3	100,0	–	0,0	–	0,0	3
Ямало-Ненецкий А.О.	2	66,7	1	33,3	–	0,0	3
Республика Алтай	2	100,0	–	0,0	–	0,0	2
Чукотский А.О.	–	0,0	2	100,0	–	0,0	2
Волгоградская область	–	0,0	1	100,0	–	0,0	1
Приморский край	–	0,0	1	100,0	–	0,0	1
Республика Коми	–	0,0	1	100,0	–	0,0	1
Чеченская республика	–	0,0	1	100,0	–	0,0	1
Всего по РФ	1974	48,0	1557	37,8	583	14,2	4114

Эпизоотия бешенства на территории Российской Федерации в последние годы, как свидетельствует анализ, преимущественно относятся к природному типу, когда основным резервуаром вируса являются дикие животные семейства псовых (Седов В.А., Ведерников В.А. и др., 1998; Полещук Е.М. с соавт., 2009; Хисматуллина Н.А. и др., 2012, 2014). Однако, как видно из таблицы 4, процентное выявление случаев болезни у диких животных в различных регионах значительно отличается. Даже принимая во внимание региональные отличия в способах ведения животноводства, и в условиях содержания мелких домашних

животных, низкий процент выявления случаев бешенства у диких животных указывает на их игнорирование. Разобщенность региональных и межгосударственных программ проведения мониторинговых исследований в дикой природе, значительно затрудняет оценку реальной эпизоотической ситуации и её прогнозирование. Как следствие, трансграничность рабической инфекции требует четкой синхронизации всех противоэпизоотических мероприятий, как между регионами, так и со всеми сопредельными государствами, на территорию которых распространяется ареал бешенства.

Доминирующим резервантом и распространителем бешенства в Российской Федерации выступают лисицы, что не было исключением в 2015 г. (рисунок 23). На втором месте среди диких животных по числу заболевших были енотовидные собаки, чья роль в распространении эпизоотий бешенства продолжает с каждым годом неуклонно возрастать.

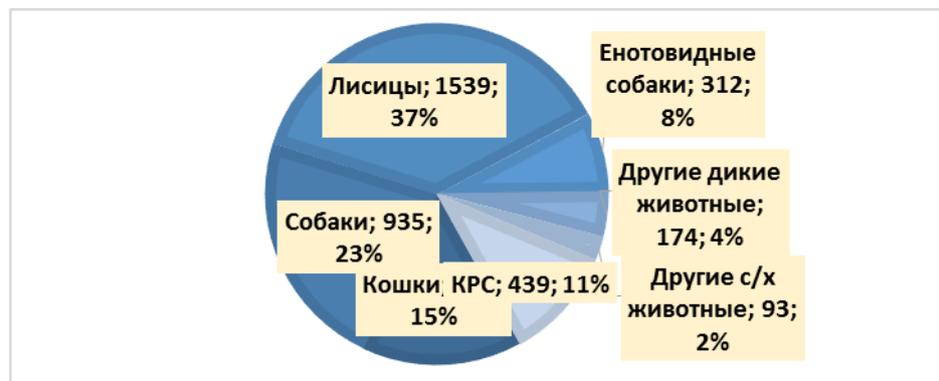


Рисунок 23 – Долевое распределение диких видов животных, вовлеченных в эпизоотический процесс бешенства на территории РФ в 2015 г.

Второе и третье место, от общего числа выявляемых в РФ случаев бешенства, занимают собаки и кошки. Домашние плотоядные в условиях нашей 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.

В эпидемиологическом плане в 2014 г. заболело бешенством три человека, в 2016 г. – шесть. Относительно других нозологических форм болезней смертность от бешенства людей в настоящее время на сравнительно невысоком уровне, что обеспечивается огромными затратами на профилактические мероприятия при укусах животными. Вместе с тем, на высоком уровне остается показатель количества 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%.

Учитывая, что последний подъем заболеваемости животных бешенством в РФ обусловлен циклическими колебаниями природной эпизоотии, его прогнозная продолжительность будет находиться в прямой зависимости от состояния популяции лисицы. Резкий подъем заболеваемости животных бешенством в 2015 г. связан именно с началом циклического пика эпизоотии.

Однако гибель лисиц от бешенства и других инфекционных болезней, их выживаемость в зимний период, численность грызунов и множество других антропогенных факторов крайне сложно определить и, тем более, спрогнозировать даже в краткосрочной перспективе.

Продолжительность периодов подъема эпизоотий бешенства в РФ при анализе данных за последние 25 лет колебалась в границах от двух до пяти лет. Следовательно, 2016-2017 гг. должны характеризоваться показателем в границах 3500-4500 случаев заболевания. При этом при уменьшении затрат на противоэпизоотические мероприятия эта цифра может увеличиться.

Учитывая, что эпизоотия бешенства с 2014 г. прокатилась с периферии ареала болезни к центру и обратно, наиболее вероятным прогнозным сценарием развития ситуации будет некоторый спад заболеваемости.

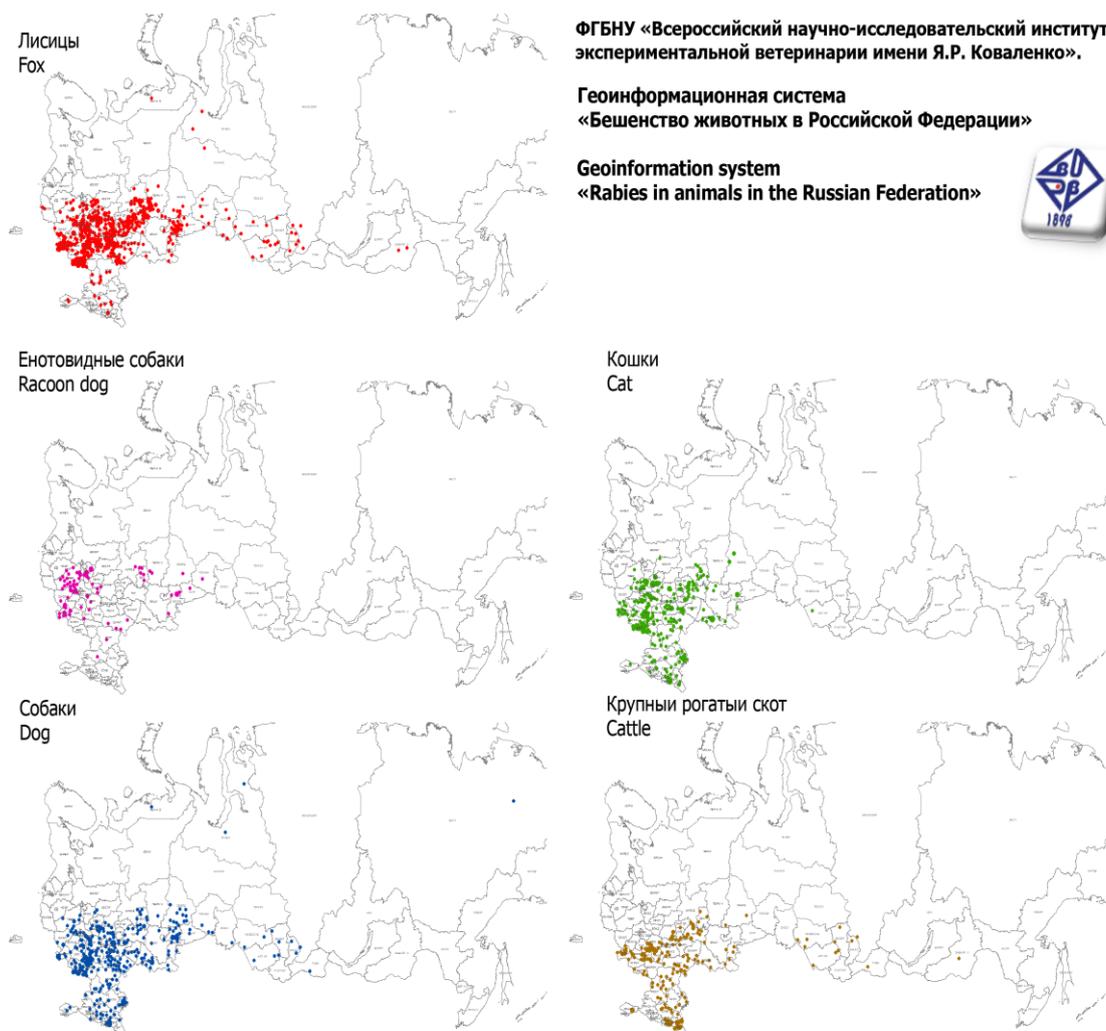


Рисунок 24 – Карта ареалов бешенства животных на территории Российской Федерации за 2014 год

Характер распределения случаев бешенства среди животных разных видов приведен на рисунке 24, который свидетельствует, что лисицы и енотовидные собаки в максимальной степени участвуют в формировании современной эпизоотии бешенства (2014 г.) преимущественно в средней полосе России и в сопоставимых широтах за Уралом. Ареал бешенства домашних животных повторяет границы ареала диких животных, но как отличие, более интенсивно проявляется в южных регионах. Границы ареала бешенства у крупного рогатого скота имеют еще более сильное смещение к югу, что вполне объяснимо условиями ведения сельского хозяйства в стране.

2.2.6 Экономический ущерб, причиняемый бешенством сельскохозяйственных животных в Российской Федерации.

Одним из показателей, характеризующих эпизоотическую ситуацию и эпизоотический процесс, является экономический ущерб, причиняемый инфекционными болезнями сельскохозяйственных животных.

С учетом основных методических положений экономики ветеринарного дела, экономический ущерб, причиняемый инфекционными болезнями животных, в том числе бешенством, – это денежное выражение потерь, связанных с падежом, вынужденным убоем и уничтожением сельскохозяйственных животных, снижением продуктивности. В отличие от многих инфекционных болезней бешенство предопределяет неизбежную (фатальную) гибель или вынужденное уничтожение заболевших животных.

Экономический ущерб от падежа и уничтожения сельскохозяйственных животных при бешенстве ($У$) обусловлен прямыми потерями живой массы, выраженной в денежной форме и определяемый по формуле:

$$У = П \cdot М \cdot С, \quad (1),$$

где, $П$ – количество павших (вынужденно уничтоженных) животных;

$М$ – средняя живая масса одной головы;

$С$ – средняя стоимость единицы живой массы животного.

Средняя живая масса одной головы павшей (вынужденно уничтоженной) от бешенства по каждому виду животных, установлена нами по обратным ведомостям выбытия животных по ряду хозяйств; стоимость единицы живой массы – по усредненным данным Росстата РФ за 2015 г.

Расчеты показали, что за 25 лет анализа прямые потери мясной продукции в живой массе по всем видам животных составили 526,2 т, или 210 т в среднем в год (таблица 5). В структуре по видам животных превалирует крупный рогатый скот, на который приходится 86,4% потерь.

Таблица 5 – Потери мясной продукции вследствие падежа и вынужденного уничтожения сельскохозяйственных животных от бешенства в Российской Федерации (1991-2015 гг.)

Вид животных	Пало и вынужденно уничтожено, гол.		Средняя живая масса 1 гол, кг	Потери мясной продукции, ц	
	Всего	в среднем за год		всего	в среднем за год
Крупный рогатый скот	14209	568,4	320	45468,8	1818,8
Мелкий рогатый скот	2605	104,2	18	468,9	18,8
Свиньи	193	7,7	87	167,9	6,7
Лошади	802	32,1	345	2766,9	110,7
Олени	5507	220,3	68	3744,8	149,8
Верблюды	35	1,4	430	198,9*	8,0*
Всего	23351	934,0	211,3	52617,3	2104,7

Примечание: * – мясо используется в пищу редко

Расчеты показали, что экономический ущерб вследствие потерь мяса от заболевших бешенством животных всех видов составил, в ценах 2015 г., 497,9 млн. руб. (таблица 6), с превалированием потерь среди крупного рогатого скота.

Таблица 6 – Экономический ущерб, причиненный гибелью (вынужденным уничтожением) сельскохозяйственных животных при бешенстве в Российской Федерации, млн. руб. (1991-2015 гг.)

Вид животных	Стоимость 1 кг живой массы, руб.	Потери мясной продукции млн. руб.	Утилизация трупов, млн. руб.	Всего, млн. руб.	На 1 заболевшее животное, руб.
Крупный рогатый скот	95,1	432,83	136,41	569,24	40062
Мелкий рогатый скот	73,2	3,43	1,41	4,84	1858
Свиньи	94,1	1,58	0,50	2,08	10777
Лошади	67,8	18,76	8,30	27,06	33740
Олени	102,4	38,35	11,23	49,58	9003
Верблюды	85,0 *	2,98	0,60	3,58	102286
Всего	–	497,93	158,85	656,78	28126

Примечание: * – средняя рыночная стоимость одного верблюда в РФ (тыс. руб.) в 2015 г.

Экономический ущерб при бешенстве животных имеет свои особенности, так как труп животного подлежит уничтожению без предварительного снятия шкуры путем сжигания в утилизационных установках или специально оборудованных траншеях. Наиболее современным, технологичным и эффективным является первый способ, отвечающий ветеринарно-санитарным требованиям и гарантированно обеспечивающий нераспространение вируса бешенства во внешней среде.

Экономический ущерб вследствие утилизации трупов павших от бешенства животных устанавливали произведением массы утилизированных биологических отходов по видам сельскохозяйственных животных и нормативной стоимости утилизации единицы этих отходов. По усредненным данным стоимость утилизации 1 кг массы животных составляет в ценах 2015 г. 30 руб. Суммы этого вида экономических потерь в современных ценах пропорционально зависели от количества от количества павших и вынужденно уничтоженных больных бешенством животных (по видам) и их массы.

В целом этот вид экономического ущерба за 25 лет анализа по всем видам животных составил 158,9 млн. руб., также с преобладанием потерь при биологической утилизации трупов крупного рогатого скота.

Слагаемые экономического ущерба вследствие падежа и утилизации трупов, характеризовали общий экономический ущерб, который составил за 25 лет 656,8 млн. руб. Суммы ущерба по видам сельскохозяйственных животных являются отражением как общей эпизоотической ситуации, в частности, заболеваемости, и зависят от средней живой массы представителей каждого вида и, в определенной степени, стоимостных данных за единицу продукции.

В расчете на одно заболевшее (павшее, вынужденно уничтоженное) бешенством животное, или коэффициент экономического ущерба устанавливали как частное от деления суммы экономического ущерба на количество заболевших животных. Так, для крупного рогатого скота этот показатель составил 40062 руб., мелкого рогатого скота 1858 руб. Возможно использование установленных коэффициентов как нормативных для определения экономического ущерба по

отдельным административным территориям и неблагополучным пунктам, а также по видам животных.

Следствием падежа сельскохозяйственных животных от бешенства является сокращение срока эксплуатации животных, выражающееся в недополучении продукции – молока, мяса, шерсти, приплода, побочной продукции и других видов потерь.

Кроме прямых экономических потерь, бешенство требует больших затрат на противоэпизоотические мероприятия, складывающиеся из материальных и трудовых расходов на иммунизацию, диагностические, карантинные и ограничительные мероприятия. Сюда же следует отнести большое поголовье животных (в основном овец), используемых на биокомбинатах и биофабриках (с последующим уничтожением) для изготовления специфических антирабических биопрепаратов. В данном исследовании ввиду масштабности и большой глубины анализа, а также отсутствия достоверных исходных показателей, нам не удалось определить эти виды экономических потерь.

Имеют место и другие виды потерь, обусловленные эпизоотиями бешенства (нарушение хозяйственной деятельности, ограничение экономических связей, потеря генофонда животных и др.), однако они трудно, или не поддаются выражению в денежной форме.

Следует также учитывать расходы государственного бюджета различных уровней на мероприятия по борьбе и профилактике бешенства среди населения. Так, в 2004 г. число человек, обратившихся за антирабической помощью в медицинские учреждения всех уровней, составило в среднем по стране 25 человек на 10 тыс. населения. В 2005 г. этот показатель также составил 25 человек, а в 2009 г возрос до 30 человек. Всего в 2009 г. за антирабической помощью обратилось более 400 тыс. человек. При этом стоимость антирабических препаратов в настоящее время составляет для антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади 3350,4 руб. (7 доз), антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови человека – 5400 руб. (14 доз), вакцины сухой инактивированной «Рабиपुर» – 887,3 руб. (1 доза) и вакцины

культуральной антирабической инактивированной «Кокав» – 1720 руб. (10 доз). В сочетании с трудовыми затратами на оказание медицинских услуг это приводит к большим расходам бюджетных средств.

Таким образом, экономическое значение бешенства в Российской Федерации трудно переоценить. Только прямые экономические потери мясной продукции от падежа и вынужденного уничтожения больных животных, а также расходов на их утилизацию, за 1991-2015 гг. в современных ценах на продукцию животноводства составили 657 млн. руб.

2.2.7 Региональные особенности эпизоотического процесса бешенства

Республика Татарстан. На территории Республики Татарстан (РТ), как и в Российской Федерации, в целом, и в Приволжском федеральном округе, бешенство регистрируется на протяжении длительного времени и, являясь энзоотической болезнью, входит в состав глобального рабического ареала европейской части РФ.

Ранее нами проведен ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по бешенству животных в РТ в системе эпизоотологического мониторинга (Гулюкин М.А., 2008, 2010, 2011).

Целью исследований было дальнейшее проведение мониторинга эпизоотии бешенства на территории РТ за 2013-2014 гг., анализ уникальных случаев гидрофобии в эпидемиологии и эпизоотологии бешенства, а также, на основе методов молекулярной эпизоотологии, изучение и сравнение последовательностей нуклеотидов фрагмента гена G полевых изолятов, полученных от разных видов животных различных районов региона

Статистическому, линейно-графическому и пространственно-временному анализу подвергнуты данные первичной отчетности Управления ветеринарии РТ

с использованием программного пакета Microsoft Office Excel, программного комплекса геоинформационная система (ГИС) ArcGis for Desktop.

Установлено, что в 2013-2014 гг. в Приволжском Федеральном округе РФ выявлено 2043 случая бешенства животных, в Республике Татарстан лабораторно подтверждено 387 случаев рабической инфекции. Наибольший удельный вес в структуре всех заболевших животных составили дикие животные, преимущественно лисицы – 60% (рисунок 25).

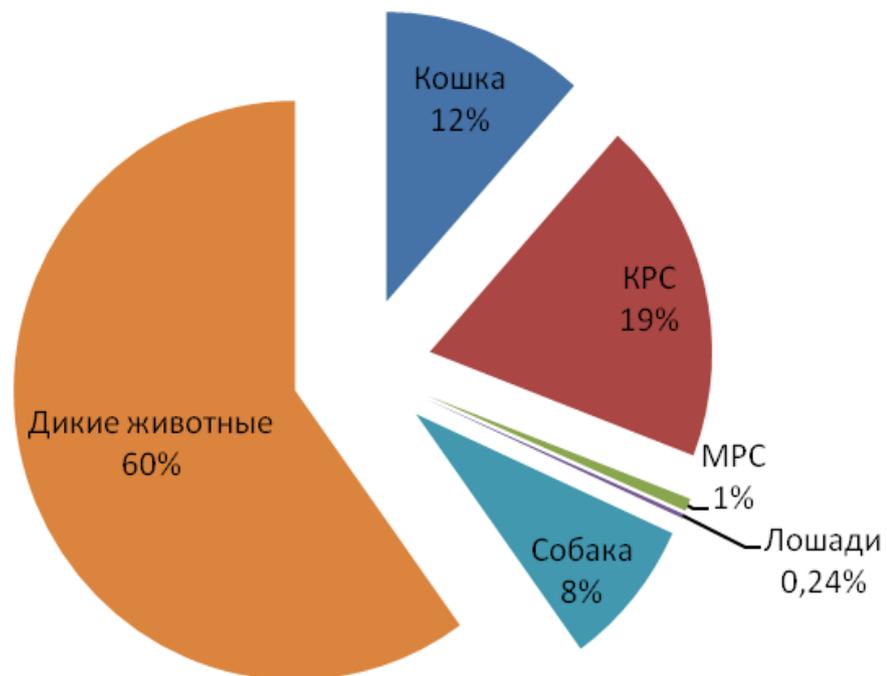


Рисунок 25 – Структура заболеваемости животных бешенством на территории Республики Татарстан (2013-2014 гг.)

Второе место принадлежит крупному рогатому скоту – 19%, что свидетельствует о самой массовой жертве этого вида животных в эпизоотическом процессе бешенства. Суммарная доля домашних плотоядных животных (собаки и кошки) составляет 20%. С учетом того, что популяция этих видов животных не является территориально обособленной, нельзя исключать возможность смешанного характера течения эпизоотий.

В сравнении с 2013 г. в 2014 г. прослеживается улучшение эпизоотической ситуации по основным показателям эпизоотического процесса бешенства на территории Республики Татарстан – количеству неблагополучных пунктов и заболевших животных, заболеваемости в расчете на 10 тыс. голов восприимчивого поголовья и очаговости (таблица 7).

Таблица 7 – Основные показатели эпизоотического процесса бешенства животных на территории Республики Татарстан (2013-2014 гг.)

Год	Заболело, гол.	Неблагополучные пункты, кол-во	Заболеваемость на 10 тыс. поголовья, гол.	Очаговость, гол.
2013	255	206	1,45±0,003	1,23
2014	132	108	1,11±0,004	1,22

Мониторинг, проведенный с использованием ГИС-технологии, выявил его сезонные изменения вектора распространения эпизоотии бешенства на территории региона. На рисунке 26 представлено территориальное распространение бешенства в неблагополучных районах Республики Татарстан за 2013-2014 гг. и 1 квартал 2015 г.

Так, в первом квартале 2013 г. вспышки бешенства 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 Республики Татарстан.

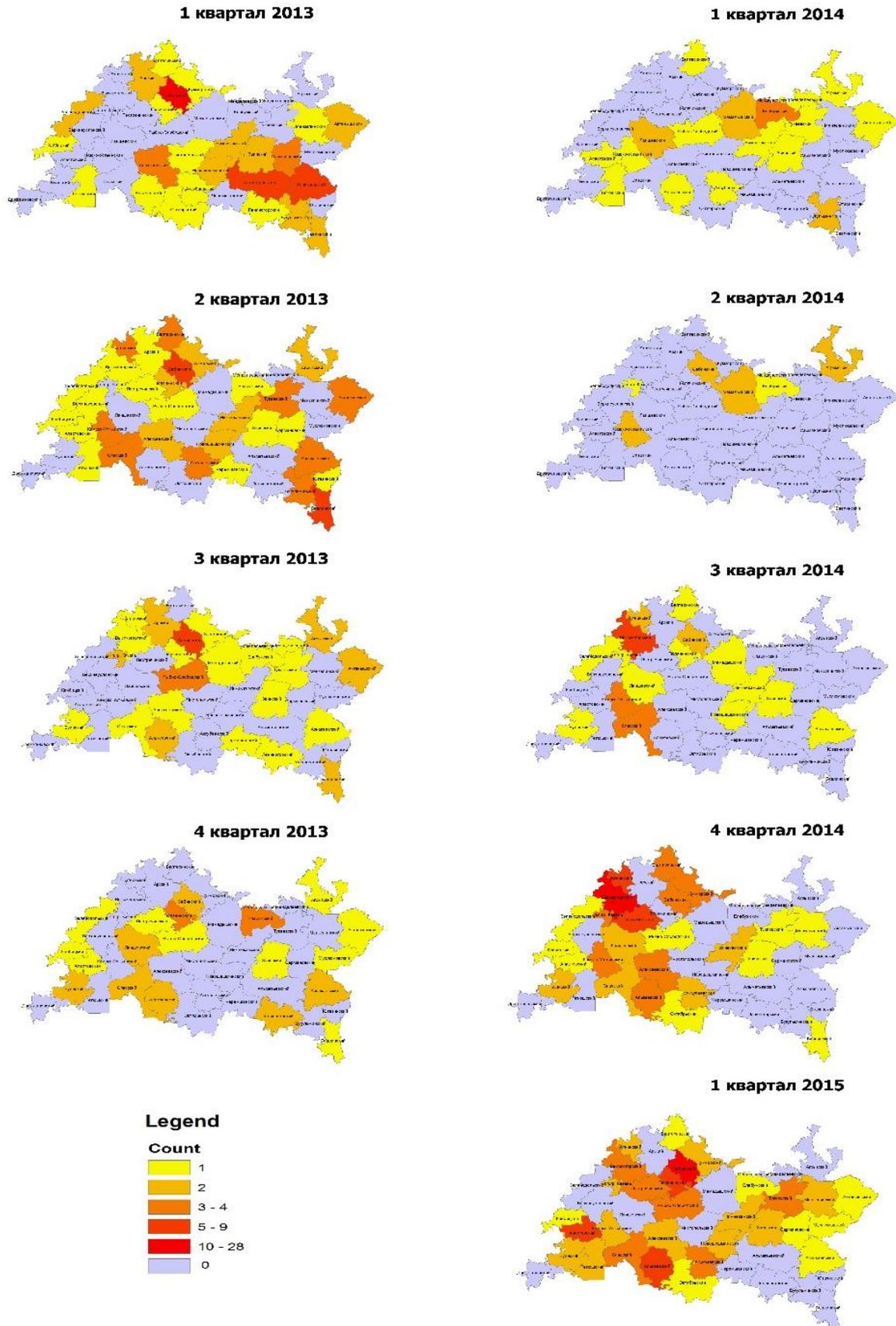


Рисунок 26 – Продвижение волны эпизоотии бешенства животных в Республике Татарстан (2013-2014 гг.)

К концу 2014 г. наиболее неблагополучными районами по бешенству явились Атнинский, Высокогорский, Пестречинский, а также г. Казань. 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 животных – векторов этого заболевания в природе.

Во втором полугодии 2014 г. в силу активизации эпизоотического процесса в граничащих соседних регионах, где основным резервуаром рабической инфекции остаются дикие хищники семейства псовых, прежде всего лисица, наблюдали рост количества случаев бешенства среди животных и в РТ.

Анализ показал, что бешенство на территории Республики Татарстан распространено повсеместно с вовлечением в эпизоотический процесс в последние годы (2013-2014) всех сорока административных сельских районов (таблица 8).

В 2013 г. из 3042 сельских округов республики бешенство было зарегистрировано в 206, то есть распространённость составила 7,7%. Наиболее неблагополучными по показателю распространённости явились Сабинский (29,9%), Бавлинский (21,9%), Спасский (20,5%), Азнакаевский (16,7%), в которых распространённость превышала среднюю по РТ в 2,2-3,9 раза. Кроме того, три случая бешенства животных в 2013 г. отмечены в черте г. Казани.

Эпизоотическая ситуация по показателю распространённости бешенства в РТ в 2014 г. характеризовалась улучшением. Так, общее количество неблагополучных пунктов снизилось до 108 (3,2% всех имеющихся населенных пунктов), или почти в два раза. При этом в восьми районах неблагополучных пунктов не регистрировали (Альметьевский, Арский, Верхнеуслинский, Лениногорский, Новошешминский, Черемшанский, Чистопольский и Ютазинский районы). Вместе с тем, в пяти административных районах Татарстана количество неблагополучных пунктов увеличилось (Атнинский, Высокогорский, Камско-Устимский, Мамадышский и Пестречинский).

**Таблица 8 – Показатели неблагополучия по бешенству животных
в Республике Татарстан (2013-2014 гг.)**

Район	Количество сельских округов	2013 г.		2014 г.	
		к-во н.б. пунктов	неблагопо- лучие, %	к-во н.б. пунктов	неблагопо- лучие, %
Агрызский	72	5	6,9	3	4,2
Азнакаевский	78	13	16,7	1	1,3
Аксубаевский	79	5	6,3	3	3,8
Актанышский	87	7	8,1	1	1,2
Алексеевский	59	8	13,6	2	3,4
Алькеевский	71	5	7	4	5,6
Альметьевский	98	9	9,2	0	0
Арский	128	6	4,7	0	0
Атнинский	46	4	8,7	7	15,2
Бавлинский	41	9	21,9	1	2,4
Балтасинский	77	7	9,1	4	5,2
Бугульминский	65	5	7,7	2	3,1
Буинский	98	4	4,1	3	3,1
Верхнеуслонский	72	1	1,4	0	0
Высокогорский	128	2	1,6	16	12,5
Елабужский	49	6	12,2	3	6,1
Заинский	85	5	5,9	3	3,5
Зеленодольский	106	3	2,8	2	1,9
Кайбицкий	56	3	5,4	1	1,8
Камско-Устьинский	53	3	5,7	6	11,3
Кукморский	124	4	3,2	3	2,4
Лаишевский	69	2	2,9	5	7,2
Лениногорский	67	6	9	0	0
Мамадышский	130	1	0,8	5	3,8
Мензелинский	70	2	2,9	1	1,4
Муслимовский и Сармановский	71	3	4,2	0	0
Нижнекамский	67	8	11,9	4	6
Новошешминский	30	5	16,7	0	0
Нурлатский	82	3	3,7	2	2,4
Пестречинский	74	1	1,4	5	6,8
Рыбно-Слободский	80	3	3,8	2	2,5
Сабинский	67	20	29,9	7	10,4
Спасский	39	8	20,5	4	10,2
Тетюшский	57	3	5,3	1	1,8
Тукаевский	86	5	5,8	3	3,5
Тюлячинский	53	7	13,2	1	1,9
Черемшанский	48	4	8,3	0	0
Чистопольский	61	3	4,9	0	0
Ютазинский	38	2	5,3	0	0
Всего: (40 районов)	3042	206	7,7	108	3,2

Общепринятая стратегия по борьбе с бешенством животных строится на введении повсеместной антирабической вакцинации разных видов животных, в том числе диких.

В РТ эффект вакцинного прессинга наиболее четко прослеживается в течение эпизоотической ситуации среди популяции домашних собак. В условиях чрезвычайно напряженной ситуации по бешенству в дикой природе и традиционного уличного содержания собак, доля последних в общей структуре заболеваемости бешенством была в два раза ниже, чем это наблюдалось в целом по стране.

Учитывая эпидемиологическую значимость бешенства среди собак, усиленную вакцинопрофилактику среди этих животных, как базовый фактор борьбы, можно оценить как наиболее оправданную стратегию по снижению факторов риска для человека. В таблице 9 представлены объемы специфической профилактики бешенства разных видов животных в общественном и частном секторах хозяйств всех форм собственности в РТ за 2013-2014 гг.

Таблица 9 – Объемы антирабической вакцинации сельскохозяйственных и мелких домашних животных в Республике Татарстан, гол. (2013-2014 гг.)

Вид животных	Общественный сектор		Частный сектор	
	2013 г.	2014 г.	2013 г.	2014 г.
Крупный рогатый скот	246990	341489	30679	39573
Мелкий рогатый скот	635	1184	4499	1454
Лошади	1602	2351	1187	687
Собаки	1434	873	54340	69636
Кошки	1818	633	37600	51008

Калининградская область. Калининградская область расположена в Центральной Европе и входит в состав Северо-Западного Федерального округа РФ. По итогам Международного семинара-совещания ветеринарных служб 39

стран СНГ и Европы (2003 г.) по согласованию с Минсельхозом РФ регион был включен в долгосрочную Международную Программу по искоренению бешенства животных.

Несмотря на факт неблагополучия, обстоятельные исследования по эпизоотологии бешенства в Калининградской области не проводились. Не изучены также биологические свойства эпизоотических изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории региона.

Анализ эпизоотической ситуации за 2002-2014 гг. в Калининградской области показал, что бешенство животных до 2013 г. регистрировалось ежегодно, однако в 2013-2014 гг. бешенство не регистрировали.

За 2002-2012 гг. заболевание в области зарегистрировано в 15 муниципальных районах и 14 городах в целом у 378 животных различных видов (таблица 10).

Таблица 10 – Видовая структура заболевших бешенством животных в Калининградской области (2002-2012 гг.)

Вид животных	Заболело, гол.	Структура заболевших, %
<i>Сельскохозяйственные:</i>	55	14,5
Крупный рогатый скот	50	13,2
Мелкий рогатый скот	4	1,1
Лошадь	1	0,3
<i>Домашние:</i>	129	34,1
Собака	86	22,7
Кошка	43	11,4
<i>Дикие животные:</i>	194	51,3
Лисица	175	46,3
Енотовидная собака	9	2,4
Всего	378	100,0

Из сельскохозяйственных животных в эпизоотический процесс бешенства были вовлечены крупный рогатый скот (50 гол.), мелкий рогатый скот (4 гол.) и лошади (1 гол.). Из домашних животных заболели собаки (86 гол.) и кошки (43

гол.). Из диких животных болезни были подвержены лисицы (175 гол.) и енотовидные собаки (9 гол.).

Кроме того, заболевание бешенством регистрировали среди других диких животных: в трех случаях у хоря и по одному случаю в различные годы у волка, куницы, выдры, ежа, хомяка, зайца и белки. При этом основным источником и распространителем бешенства в Калининградской области являются лисицы, на долю которых среди заболевших диких животных приходится 90,2%. Необходимо отметить также, что собаки и кошки, составляющие соответственно 22,7 и 11,4% от всех заболевших бешенством животных, также представляют угрозу заболеваемости животных и людей.

Анализ статистических данных по заболеваемости животных бешенством в Калининградской области за 19 лет (1994- 2012 гг.) показал, что проявление эпизоотий бешенства характеризуются подъемами и спадами. Первый подъем заболеваемости был зарегистрирован в 2000 г., когда заболело 53 животных, с последующим снижением в 2002 г. до 15 случаев. Второй подъем был отмечен в 2003 г. – 63 случая и снижение заболеваемости в 2004 г. до 28 случаев с последующим подъемом в 2005 г. до 47. Тем не менее, строгой периодичности в проявлении бешенства не прослеживается.

При анализе периодичности эпизоотии бешенства в Калининградской области за 2002-2012 гг. просматривается снижение амплитуды кривой заболеваемости. Пики заболеваемости в 2003, 2005, 2009 и 2010 г. идут по убывающей – 63, 47 и 43 случая соответственно. При этом заболеваемость среди диких животных коррелирует с таковой среди сельскохозяйственных и домашних животных, что связано, по-видимому, с недостаточным охватом вакцинацией диких плотоядных животных в 2006 г. и домашних животных – в 2010 г. (рисунок 27).

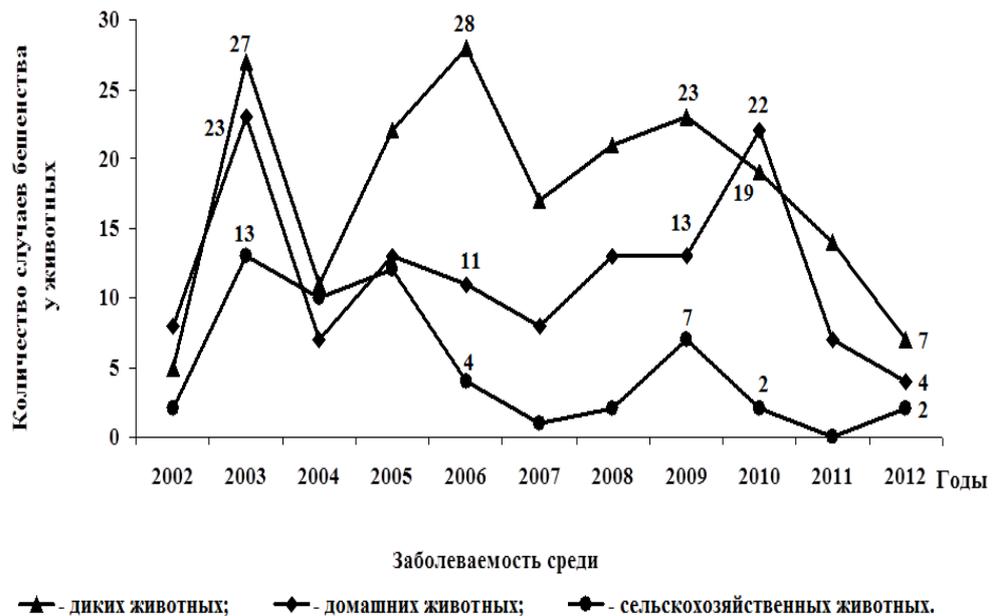


Рисунок 27 – Динамика заболеваемости бешенством животных в Калининградской области (2002-2012 гг.)

В 2011-2012 гг., в сравнении с предыдущими двумя (2009 и 2010), наблюдается спад эпизоотии бешенства в 2,5 раза, в том числе среди диких животных – в 2 раза, домашних – в 3,2 раза (среди собак – в 5,4 раза, среди кошек – 1,3 раза), сельскохозяйственных – в 4,5 раза.

Анализ сезонной заболеваемости бешенством показал, что максимальное его значение отмечается в осенний период года – 35,1%. В весенний период заболеваемость составила 31,1% и минимальная в летний период года – 12,2%. Данная тенденция сезонности бешенства характерна для всех видов домашних и диких животных. Среди сельскохозяйственных животных наименьшая заболеваемость регистрируется в зимний период года (10,9%) и возрастает в летний период, что связано с пребыванием скота на пастбищах и летних выгульных площадках.

Сезонность бешенства связана с биологией лисицы: первый подъем, совпадающий с периодом гона у лисиц, наблюдается в зимний и ранневесенний, и второй, связанный с расселением молодняка – в осенне-зимний сезоны года. Летом, когда лисицы заняты воспитанием выводков, и подвижность их ограничена, число заболеваний минимально. Периодичность и сезонность

бешенства в Калининградской области необходимо учитывать при проведении противоэпизоотических мероприятий в очагах бешенства.

Кроме того, изучена взаимосвязь заболеваемости бешенством животных с плотностью популяций лисиц на территории Калининградской области. По данным официальной статистики, численность лисиц – главного источника и распространителя бешенства в регионе, за 2006-2010 гг. варьировала от 2352 до 2650 особей, а плотность популяции составляла от 0,7 до 0,8 гол/км², то есть выше пороговой, приводимой в научной литературе (0,2 гол/км² по Тома В., 1977; 0,6-1 гол/км² по Stubbe М., 1981). В связи с этим, считаем целесообразным искусственное снижение популяции лисиц в Калининградской области до 0,1-0,2 гол/км² в районах, в которых этот показатель выше.

При изучении территориальной приуроченности и картографировании неблагополучных сельских районов и городских округов установлено, что за 2007-2012 гг. в Калининградской области бешенство регистрировали во всех 15 сельских районах и в 4-х городских округах из 7. Проведено разделение районов области по степени напряженности на 3 условные группы с ранжирование территории области проводили по количеству случаев бешенства на 1000 км².

Первая группа – наиболее опасная зона, где регистрировали от 13 до 28 случаев бешенства в пяти районах области: Гвардейском, Неманском, Полесском, Нестеровском и Черняховском. Вторая группа – средняя зона, где за указанный период регистрировали от 8 до 12 случаев болезни в пяти районах: Гусевском, Багратионовском, Правдинском, Славском, Озерском. Третья группа – слабая зона (от 1 до 7 случаев заболевания) в пяти районах области: Балтийском, Светлогорском, Гурьевском, Зеленоградском и Краснознаменском. Выделенные эпизоотические районы первой, второй и третьей группы характеризуются соответствующим риском заражения человека и животных. Выяснение зон повышенного риска распространения болезни позволяют уточнять оптимальные масштабы и сроки профилактической вакцинации животных, своевременно регулировать численность диких животных и вести борьбу с бродячими собаками.

Анализ заболеваемости бешенством по городским округам показал, что заболевание регистрировали в 4-х городских округах из 7 имеющихся: Светловском, Советском, Янтарном и г. Калининград. Благополучными по данному заболеванию городскими округами были: Ладушкинский, Мамоновский и Пионерский, где за 2007-2012 гг. бешенство не отмечено. В тоже время нельзя не учитывать факт опасности заноса инфекции из сопредельных государств – Польши, Литвы, Латвии, Белоруссии и других. Так, в Варенском районе Литвы в 2013 г. зарегистрирован первый случай бешенства у не вакцинированной собаки. Деревня Балбугай, где выявлен случай заболевания, находится в зоне, приграничной с Белоруссией, на территории которой в Гродненском районе было зарегистрировано заболевание у домашнего кота и коровы.

В результате планомерной и целенаправленной работы бешенство среди животных и населения на территории Калининградской области с 2013 г. не регистрируется.

Так, был разработан совместный Межведомственный план мероприятий по профилактике бешенства людей и животных в Калининградской области на 2006-2010 гг., предусматривающий проведение в полном объеме специфических мер профилактики районными и городскими службами, включающие противоэпидемические, противоэпизоотические мероприятия в период эпидемиологического неблагополучия и мероприятия по ликвидации очагов бешенства. В соответствии с этим планом Территориальные управления Роспотребнадзора и Россельхознадзора по Калининградской области, а также Госветслужба региона проводят ежегодные совещания заинтересованных служб для решения вопросов профилактики бешенства среди животных и предупреждения заболевания у людей, эпидемиологическое расследование в очагах бешенства по каждому случаю укусов людей животными. Кроме того, ветеринарные специалисты СББЖ обеспечивают своевременную диагностику бешенства животных, ликвидацию очагов болезни и в случае подтверждения диагноза разрабатывают оперативные планы по оздоровлению очагов заболевания. Для купирования первичных очагов и профилактики бешенства

нами были разработаны рекомендации, утвержденные ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» от 09.06.2011 г. (Приложение 5).

Госветслужба области и приграничных городов осуществляет взаимодействие с приграничными государствами (Польша и Литва) по вопросам профилактики бешенства у животных. В районах и хозяйствах области, неблагополучных по бешенству, ветеринарной службой организована профилактическая вакцинация поголовья сельскохозяйственных животных, охотничьих, служебных и хозяйственных собак, а также оральная иммунизация диких плотоядных животных. В городах и других населенных пунктах региона специализированными бригадами проводится отлов бродячих собак и кошек и их отстрел на территориях охотничьих угодий.

Кроме того, Агентство по охране и воспроизводству животного мира по Калининградской области и охотопользователи регулируют численность плотоядных животных на территории региона независимо от сезона года и хозяйственной принадлежности территории. Так, в 2008-2010 гг. в лесных угодьях Калининградской области отстреляно 3685 лисиц, 630 енотовидных собак, 1540 куниц и 283 барсука.

Трансграничные территории (на примере Западно-Казахстанской области Республики Казахстан). В эпизоотологическом плане определенный интерес представляет изучение ситуации и эпизоотологический мониторинг бешенства на трансграничных с Российской Федерацией 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 пятью регионами РФ – Оренбургской (Север), Астраханской (Юг), Волгоградской и Саратовской (Запад) и Самарской (Северо-Запад) областями с общей протяженностью границ 2423 км.

В Западно-Казахстанской области, как и в целом в Республике Казахстан, эпизоотическая ситуация по бешенству остаётся напряжённой на протяжении многих лет. В течение последних 14-ти лет наблюдается расширение ареала

бешенства на фоне роста эпизоотий, которые по-прежнему сохраняют выраженный природный характер. Число случаев бешенства животных за 2013-2014 гг., в сравнении с 2011-2012 гг. возросло в 9 раз (с 7 до 65 случаев). Бешенство ежегодно регистрируется во всех сельских районах и городах региона. Наиболее неблагополучными являются Акжайкский, Бурлинский, Зеленовский, Каратобинский и Сырымский районы, в которых основные показатели эпизоотического процесса бешенства выше, чем в других в 1,5-3 раза.

Целью исследований было проведение эпизоотологического мониторинга бешенства на территории Западно-Казахстанской области Республики Казахстан в ретроспективе за 2000-2014 гг.

Исследования проводили на базе Западно-Казахстанского аграрно-технического университета им. Жангирхана (г. Уральск). Были проанализированы и подвергнуты статистическим и линейно-графическим исследованиям данные, полученные в результате эпизоотологического мониторинга за течением эпизоотического процесса бешенства животных на изучаемой территории с использованием программного пакета Microsoft Office Excel, данных ежегодной первичной отчетности областной территориальной инспекции Комитета ветеринарного контроля и надзора МСХ РК, областного эпизоотического отряда, областного филиала «Республиканской ветеринарной лаборатории» и департамента комитета государственного эпидемиологического надзора МЗ РК.

С 2000 по 2014 г. в Западно-Казахстанской области лабораторно подтверждено 376 случаев рабической инфекции животных, из них 180 случаев среди крупного рогатого скота, 31 среди мелкого рогатого скота, 88 случаев бешенства собак и кошек (47 и 36 случаев соответственно), 48 и 19 случаев (суммарно) бешенства лис и волков, 5 случаев среди лошадей, и 5 случаев корсаков и енотовидных собак (рисунок 28).

Из данного числа положительных проб, 56% приходится на сельскохозяйственных животных – крупный, мелкий рогатый скот и лошадей, что свидетельствует о их роли в поддержании эпизоотического неблагополучия. При этом заболевает в основном крупный рогатый скот, доля которого составляет

49%. Далее следуют домашние плотоядные животные (собаки и кошки) – 24% и дикие плотоядные – лисы (14%), волки (6%) и корсаки (1%).

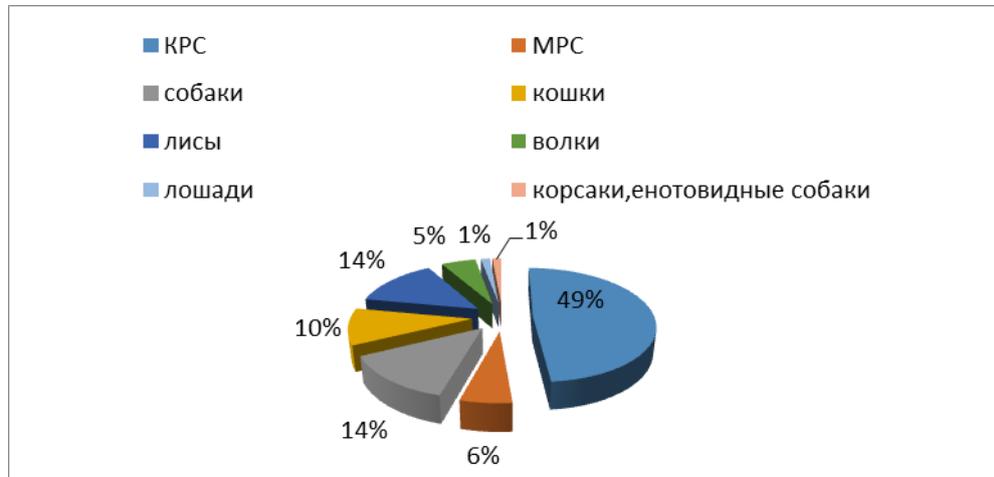


Рисунок 28 – Структура (%) заболеваемости бешенством животных в Западно-Казахстанской области Республики Казахстан (2000-2014 гг.)

При анализе случаев бешенства среди различных видов животных провели дифференцировку регистрации болезни в период с 2000 по 2014 годы среди трех групп животных – диких, домашних плотоядных (собаки, кошки) и сельскохозяйственных животных (рисунок 29).

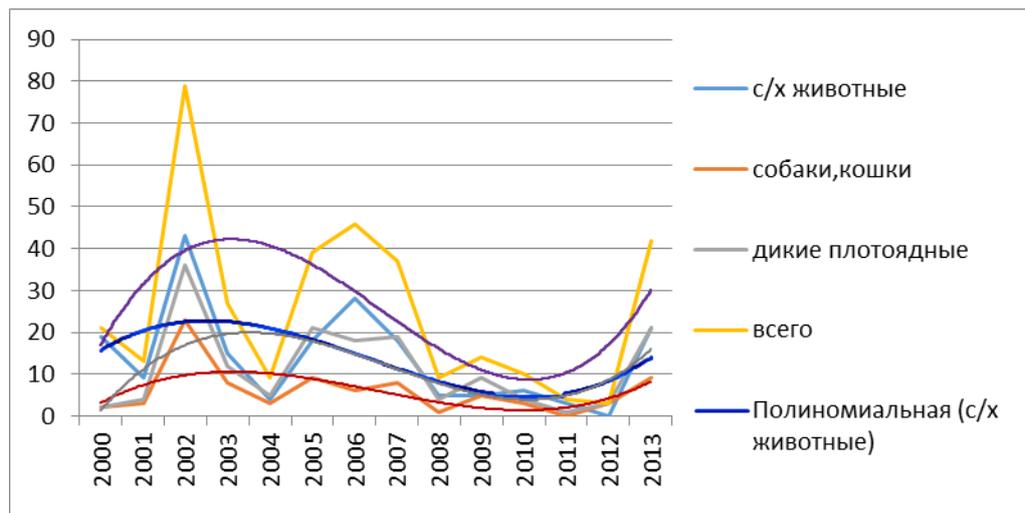


Рисунок 29 – Динамика заболеваемости бешенством разных видов животных в Восточно-Казахстанской области Республики Казахстан

Наибольшее число случаев бешенства в области регистрируется среди сельскохозяйственных животных, за которыми следуют собаки и кошки, затем дикие животные. С учетом того, что популяция собак и кошек, возможно, не является обособленной, более правильно будет определение смешанного или природного типа бешенства в регионе. Среди сельскохозяйственных животных бешенство чередуется подъемами и спадами. Если в 2007 г. отмечено 19 случаев, то в 2011-2012 гг. 4 и 3 случая соответственно. В 2013 г. зарегистрировано 42 случая, что в 2,2 раза больше чем в 2007 г.

За последние 14 лет мониторинга эпизоотической ситуации по бешенству в Западно-Казахстанской области наблюдалось три циклических подъема превышающих среднюю расчётную величину (2002, 2006 и 2013 г.), межэпизоотический интервал между подъемами составил 3 и 6 лет соответственно. По-видимому, это связано с циклическостью эпизоотического процесса при бешенстве и вымиранием части популяции векторов этого заболевания в природе. В среднем за весь период регистрации (2000- 2014 гг.) просматривается следующая периодичность бешенства в области: вследствие применения профилактических мероприятий (вакцинации животных, в том числе диких – оральная), т.е. воздействия антропогенного (человеческого) фактора, за последние годы наблюдался относительный спад инфекционного процесса (2011-2012 гг.). Но в последние годы (2013-2014 гг.), в силу усиления эпизоотического процесса в соседних регионах, где основным резервуаром рабической инфекции остаются дикие хищники семейства псовых, прежде всего лисица, наблюдается рост случаев бешенства среди животных и в Западно-Казахстанской области. Такая циклическость наблюдается через 2-3 года.

Динамика основных показателей эпизоотического процесса бешенства животных на территории в Западно-Казахстанской области РК (2000-2014 гг.) представлена в таблице 11, из которой следует, что болезнь в республике регистрируется ежегодно. За анализируемый период (15 лет) в 168 пунктах заболело 376 голов скота, среднегодовая заболеваемость в расчете на 10 тыс.

поголовья составила 0,44, очаговость варьировала от 1,1 до 9,47 голов (2,7 гол. в среднем).

Таблица 11 – Динамика основных показателей эпизоотического процесса бешенства животных в Западно-Казахстанской области РК (2000-2014 гг.)

Год	Заболело животных, гол.	Количество неблагополучных пунктов	Заболееваемость на 10 тыс. гол.	Очаговость, гол.
2000	21	8	0,021±0,007	1,3
2001	13	8	0,12±0,009	1,1
2002	79	24	0,79±0,009	1,5
2003	27	10	0,31±0,006	1,5
2004	9	7	0,13±0,008	2,2
2005	39	12	0,78±0,002	9,5
2006	46	11	0,98±0,008	7,8
2007	37	12	0,81±0,008	3,4
2008	9	7	0,20±0,003	1,5
2009	14	13	0,32±0,004	1,1
2010	10	10	0,2±0,003	1,0
2011	4	4	0,09±0,006	1,0
2012	3	3	0,06±0,007	1,0
2013	42	22	0,90±0,003	1,9

Индекс неблагополучия бешенства животных возрос в 2013-2014 годах до 11,2% и 10%, по сравнению с 2,2-1% в 2011 и 2012 годах (таблица 12), что является достаточно высокими показателями для данного заболевания. Заболеваемость бешенством животных охватывает практически всю территорию Западно-Казахстанской области. В эпизоотический процесс вовлекаются все населенные пункты области.

Таблица 12 – Уровень неблагополучия по бешенству животных в Западно-Казахстанской области Республики Казахстан (2011-2014гг.)

Район	Сельские округа, кол-во	2011 г.		2012 г.		2013 г.		2014 г.	
		н.б. пункт к-во	% неблагополуч.						
Акжайыкский	18	–	–	–	–	3	16,7	3	16,7
Бокейординский	7	–	–	1	14,3	–	–	2	20,6
Бурлинский	16	–	–	–	–	5	31,3	3	18,8
Жангалинский	9	–	–	–	–	1	11,1	1	11,1
Жаныбекский	9	1	11,1	–	–	–	–	–	–
Зеленовский	24	1	4,2	–	–	6	25,0	2	8,3
Казталовский	16	2	12,5	–	–	2	12,5	1	6,3
Каратобинский	9	–	–	–	–	2	22,2	2	22,2
Сырымский	12	–	–	–	–	2	16,7	2	16,7
Таскалинский	9	–	–	–	–	–	–	–	–
Теректинский	22	–	–	2	9,1	1	4,5	1	4,5
Чингирлауский	9	–	–	–	–	–	–	–	–
г. Уральск	5	–	–	–	–	3	60,0	–	–
Всего:	165	4	2,4	3	1,8	25	15,2	17	10,3

Наибольший охват территории данным заболеванием наблюдается в Казталовском, Зеленовском и Бурлинском районах: здесь почти в каждом втором населенном пункте регистрируют бешенство животных. Наиболее благоприятная эпизоотическая ситуация наблюдается в Таскалинском и Чингирлауском районах, территории которых 4 года являются благополучными по бешенству.

2.2.8 Случаи гидрофобии в эпизоотологии и эпидемиологии бешенства

Считаем необходимым подробно изложить два уникальных случая гидрофобии у человека, зарегистрированных в Республике Татарстан, классическим образом раскрывающих тесную взаимосвязь инфекционного

процесса с эпизоотологическими и эпидемиологическими показателями бешенства.

В первом случае в хронологическом аспекте событий больная Б. в возрасте 49 лет с множественными ранами от укусов волка поступила в Казанскую инфекционную больницу №1 из Центральной районной больницы Муслумовского района с предположительным диагнозом гидрофобия. В с. Тархан волк был застрелен, а биоматериал от трупа направлен на ветсанэкспертизу, которая дала положительный результат на бешенство.

Во втором случае в Зеленодольском районе РТ также зарегистрирован случай гидрофобии, который можно отнести к трансконтинентальному. Больной Г. поступил в Республиканскую клиническую инфекционную больницу 26.12.2013 г. на 9-ый день болезни, с выраженными клиническими признаками гидрофобии. Находясь в Индии на о. Гоа он был укушен бродячей собакой в области правой голени 25.10.2013 г., но за антирабической помощью сразу не обратился.

Целью исследований явились прижизненная и постмортальная лабораторная диагностика указанных случаев гидрофобии.

В качестве биологического материала для диагностики использовали слюну, слезную жидкость, отпечатки с роговицы пострадавших от укусов волка и бродячей собаки, а также различные отделы головного мозга и слюнные железы умерших от гидрофобии. Исследовали также сыворотки крови пострадавших от укусов животных. Лабораторные исследования проведены с использованием следующих диагностических тестов:

– прямой метод флюоресцирующих антител (ГОСТ 26075-84) с использованием «Флуоресцирующего антирабического глобулина» (ТУ 9388-027-00492374-2007);

– сэндвич-вариант иммуноферментного анализа с использованием «Набора препаратов для диагностики бешенства методом ИФА» (ТУ 9388-025-00492374-2007), разработанных ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань);

– световая микроскопия мазков при окраске по Селлерсу;

– непрямой метод ИФА с использованием кроличьих иммуноглобулинов против глобулинов человека, меченных пероксидазой производства ИЭМ им. Гамалеи РАМН (Москва);

Анамнез первого случая гидрофобии выявил следующее. Жительница пос. «Русский Шуган» Муслюмовского района в 4 часа утра по пути следования на животноводческую ферму подверглась нападению волка в момент, когда она услышала шаги и обернулась лицом к животному. Повреждения, нанесенные волком, характеризовались множественными глубокими рваными ранами в волосистой части головы, подбородочной области, кистей рук, нижних конечностей, сопровождавшихся обильным кровотечением. Больная, находясь в тяжелом состоянии, обратилась в ЦРБ Муслюмовского района, откуда была направлена в Казанскую инфекционную больницу с предположительным диагнозом гидрофобии. В этот же день был проведен отбор пробы крови в объеме 5 мл из вены для исследования на содержание антител к вирусу бешенства, а также отпечатков с роговицы глаза и слюны на обнаружение антигена вируса бешенства.

В прямом методе флюоресцирующих антител в отпечатках с роговицы глаза пострадавшей (при жизни) нами в нескольких полях зрения обнаружен специфический антиген вируса бешенства в виде типичных отчетливо выраженных ярких желто-зеленых гранул различной формы и величины с интенсивностью свечения в три креста (рисунок 30). При этом в контрольных препаратах подобных образований не отмечено.

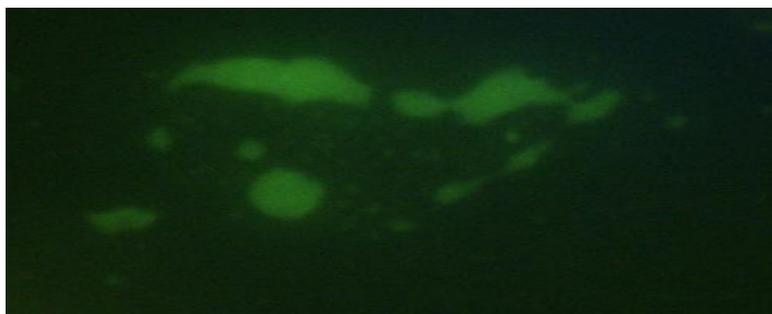


Рисунок 30 – Антиген вируса бешенства в роговице глаза, (метод флюоресцирующих антител, объектив 90, гомаль 1,7)

Активность сыворотки крови больной Б. составила в непрямом методе ИФА 1:10 при коэффициенте специфичности ($K_{сп}$), равном 2,3. Низкое содержание специфических к вирусу бешенства антител в сыворотке крови пострадавшей в период разгара болезни (за 6 дней до смерти), по-видимому, было связано с образованием комплексов антител с вирусом, циркулирующим в организме, что ещё более снизило уровень антирабических антител, полученных и вырабатываемых при комбинированном введении антирабического иммуноглобулина и вакцины.

Постмортальный анализ различных отделов головного мозга в прямом МФА выявил специфический антиген вируса бешенства, оцениваемый в крестах: в аммоновом роге – множество специфических комплексов-включений (+++); в коре больших полушарий, мозжечке и продолговатом мозге – единичные ярко светящиеся комплексы-включения (+++).

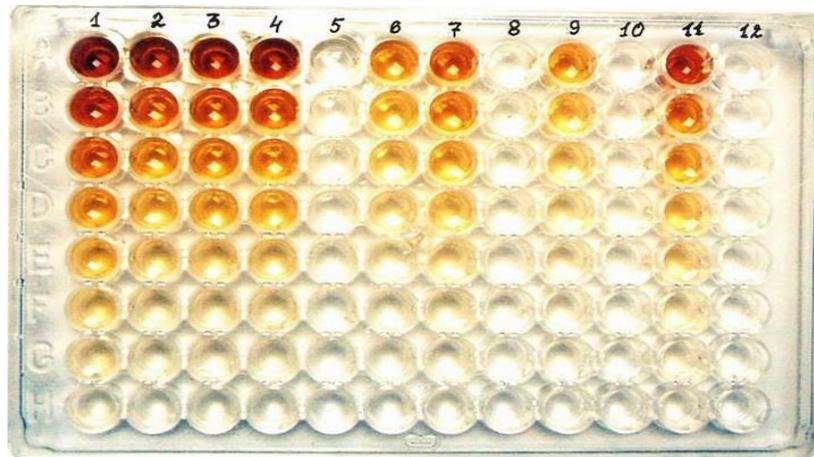


Рисунок 31 – Иммуноферментное обнаружение антигена вируса бешенства в различных отделах головного мозга и слюнных желез

Обозначения: 1 – аммоновый рог; 2 – продолговатый мозг; 3 – мозжечек; 4 – кора больших полушарий; 6 – слюнные железы; 7,9 – пробы мозга лисиц (экс. № 4241, титр 1:40 и № 235, титр 1:10); 5, 8, 10 – отрицательные пробы от интактных животных (не окрашены); 11 – контрольный положительный антиген вируса бешенства, титр 1:80; 12 – контрольный отрицательный антиген от интактных белых мышей (не окрашен)

Методом ИФА в суспензиях различных отделов головного мозга и слюнных железах обнаружен специфический антиген вируса бешенства в титрах: в аммоновом роге – 1:160 ($K_{\text{сн}}=2,2$), продолговатом мозге – 1:80 ($K_{\text{сн}}=2,2$), мозжечке – 1:80 ($K_{\text{сн}}=2,2$), коре больших полушарий – 1:40 ($K_{\text{сн}}=3,1$), слюнных железах – 1:20 ($K_{\text{сн}}=3,1$), что видно из рисунка 31. Световой микроскопией отпечатков с проб аммонова рога, продолговатого мозга, мозжечка и коры больших полушарий при окраске по Селлерсу были обнаружены тельца Бабеша-Негри, являющиеся патогномоничными для бешенства (рисунок 32).

В цитоплазме гибнущих немногочисленных нейронов обнаруживали единичные или по 2-3 образования телец Бабеша-Негри округлой или овальной формы, разных размеров.

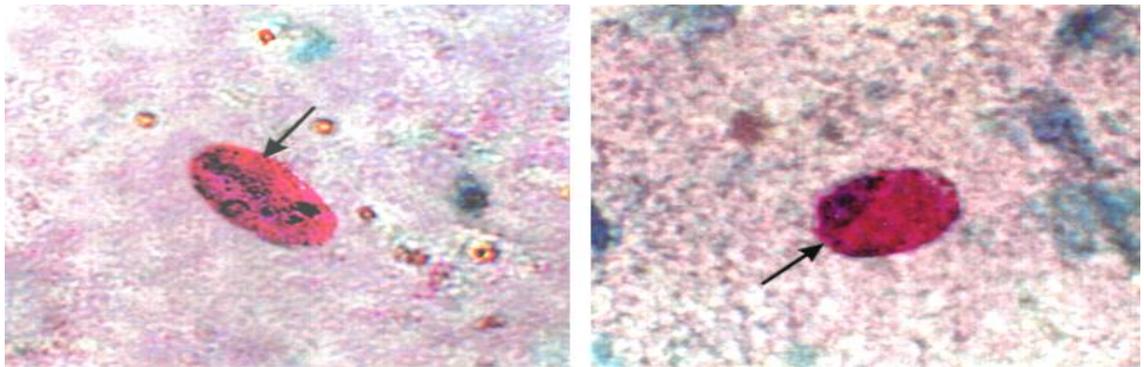


Рисунок 32 – Включения в цитоплазме телец Бабеша-Негри с базофильной «внутренней зернистостью» (x 2400) уличного бешенства в мозге человека

Для биопробы использовали 10 белых мышей-сосунков (ГОСТ 26075-84). Интрацеребральное заражение белых мышей суспензиями мозга и слюнных желез дало положительный результат на 14-17 день, с характерными клиническими признаками – взъерошенность шерсти, горбатость спины, паралич и др. Результаты биопробы были подтверждены положительными результатами в МФА отпечатков мозга белых мышей.

Необходимо отметить, что пострадавшая Б. получила в первые 48 часов комбинированное введение антирабического иммуноглобулина и антирабической вакцины. Несмотря на это, у нее остро развилась развернутая клиника

гидрофобии с прогрессированием основных психоневрологических симптомов в течение 7 суток. Гидрофобия и аэрофобия носили умеренный характер, доминировали психические расстройства и быстрое развитие пареза конечностей. Инкубационный период составил 26 суток.

Таким образом, в комплексе диагностических тестов получены положительные результаты по обнаружению специфического антигена вируса бешенства и в отпечатках с роговицы глаза пострадавшей, а также различных отделов головного мозга и слюнных желез, что подтверждает клинически поставленный диагноз гидрофобии. При этом иммунофлуоресцентное исследование отпечатков с роговицы глаза пострадавшей показало положительный результат за 6 суток до смерти больной.

Дальнейшее эпизоотолого-эпидемиологическое расследование показало, что в тот же день, когда была покусана бешеным волком больная Б., поступили сообщения из Азнакаевского района Татарстана, что в трех селах (Боланлы Буляк, Масыгутово, Тархан), граничащих с Муслюмовским районом, бешеный волк покусал еще 8 человек и столько же имели «ослюнения» открытых частей тела при контакте с этим животным. Таким образом, общее число пострадавших составило 16 человек.

Всем пострадавшим был назначен лечебно-профилактический курс антирабических прививок с использованием культуральной антирабической вакцины из штамма «Внуково-32» (производство ИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, Москва). По истечении курса прививок 12 проб сывороток крови от пострадавших исследовали на уровень специфических антител в ИФА и реакции нейтрализации (РН). Сыворотки крови титровали в РН на белых мышах с использованием стандартного вируса бешенства (штамм CVS) в концентрации от 15 до 500 LD₅₀/0,03 мл.

Установлена тесная прямая корреляция результатов ИФА и РН (коэффициент корреляции $r = 0,9$). При этом по чувствительности и скорости получения результатов ИФА (6-7 часов) значительно превосходит РН на мышах (14 сут.). Титры антител в сыворотках крови пострадавших, в ИФА варьировали

от 1:200 до 1: 3200, в РН от 1:163 до 1:397, что свидетельствовало о выраженной иммунологической защите вакцинированных пострадавших от бешенства людей.

В 2013 г. в Зеленодольском районе РТ зарегистрирован второй случай гидрофобии. Больной Г. поступил в республиканскую клиническую инфекционную больницу 26.12.2013 г. на 9-ый день болезни с клиническими признаками гидрофобии, выражающиеся в нарушении поведенческих реакций, возбуждении, беспокойстве, затрудненном дыхании. Анамнез показал, что находясь в Индии на о. Гоа, пациент был укушен бродячей собакой в области правой голени 25.10.2013 г., однако за антирабической помощью в медицинское учреждение сразу не обратился.

27.12.2013 г. проведены лабораторные исследования проб, взятых от больного Г. по прибытию в Татарстан на наличие антигена вируса бешенства прямым МФА, а также в сэндвич-варианте ИФА и гнездовой ОТ-ПЦР.

В прямом МФА отпечатков с роговицы глаза пострадавшего в нескольких полях зрения был обнаружен специфический антиген вируса бешенства в виде типичных, отчетливо выраженных ярких желто-зеленых гранул различной формы и величины с интенсивностью свечения в три креста (рисунок 33). В контрольных препаратах подобных образований не отмечено.

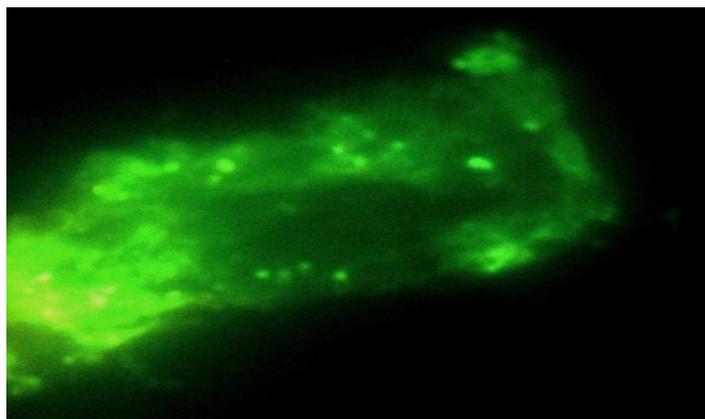


Рисунок 33 – Антиген вируса бешенства в роговице глаза пациента Г. методом флуоресцирующих антител (объектив 90, гомаль 1,7)

При исследовании слюны больного Г. в ИФА обнаружен антиген вируса бешенства с титром 1:16 при K_{cut} равном 2,2. Методом гнездовой ОТ-ПЦР в пробах слюны и слезы пациента выявлен геном вируса бешенства, что отражено на рисунке 34.

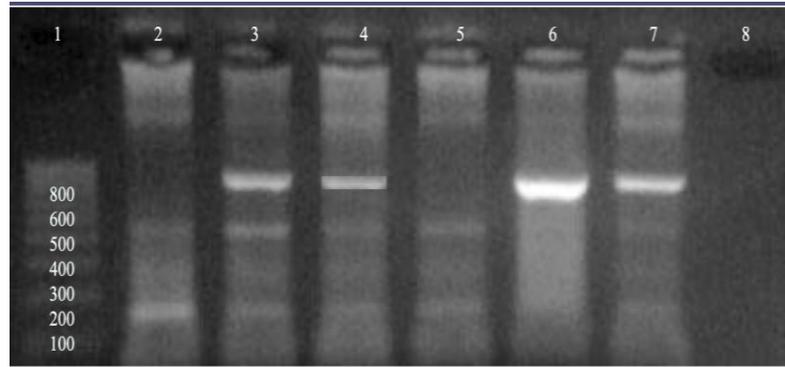


Рисунок 34 – Электрофореграмма продуктов первичной амплификации проб слюны и слезы (праймеры 817 п.н.).

Обозначения: 1 – маркер молекулярного веса 100-1000 пар оснований (Ferments); 2 – слеза здорового человека; 3 – слеза больного Г.; 4 – вирус бешенства (штамм. «Овечий» ГНКИ); 5 – слюна здорового человека; 6 – стандартный вирус бешенства CVS; 7 – слюна больного Г.; 8 – отрицательный контрольный образец.

Результаты идентификации генома вируса бешенства в слюне и слезе пострадавшего г-на Г. гнездовой ОТ-ПЦР представлены на рисунках 35.

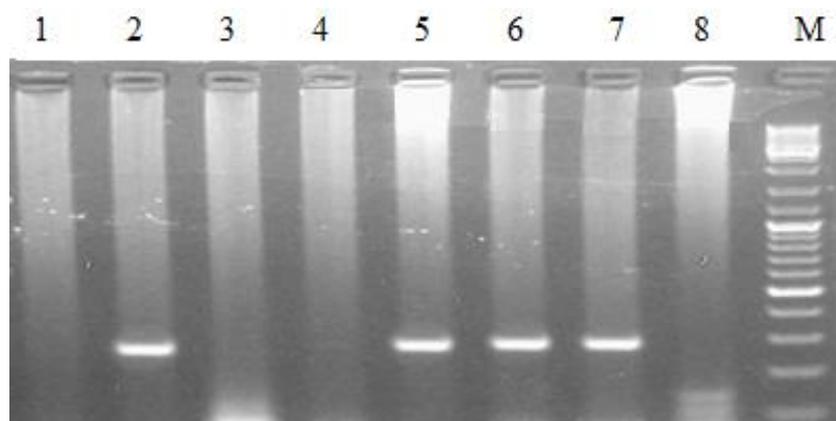


Рисунок 35 – Электрофореграмма продуктов второго этапа амплификации (праймеры 288 п.н.)

Обозначения: 1 – отрицательный контрольный образец; 2 – слеза больного; 3 – слеза глаза здорового донора; 4 – слюна, не инфицированная рабическим вирусом; 5 – вирус бешенства (штамм «Овечий», ВГНКИ); 6 – стандартный вирус бешенства *CVS*; 7 – слюна больного; 8 – слюна здорового человека; М – маркер молекулярного веса 100-3000 пар оснований (Ferments)

Таким образом, на основе комплекса диагностических тестов прижизненно был поставлен диагноз – гидрофобия. 04.01.2014 г. больной Г. в состоянии комы скончался. Инкубационный период заболевания составил 55 дней. Смерть наступила на 18 день проявления клинических признаков болезни.

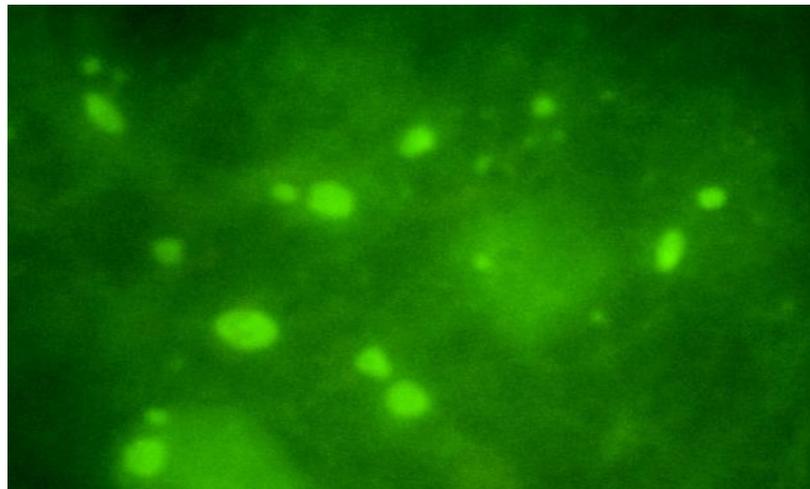


Рисунок 36 – Антиген вируса бешенства в отпечатке головного мозга методом флуоресцирующих антител (объектив 90, гомаль 1,7).

Постмортальный анализ различных отделов головного мозга (аммонов рог, продолговатый мозг, мозжечок и кора больших полушарий) в прямом МФА обнаружен специфический антигена вируса бешенства, оцениваемый в три креста (рисунок 36).

2.2.9 Филогенетический анализ геномов полевых изолятов вируса бешенства

Филогенетический анализ геномов лиссавирусов, как один из методов молекулярной биологии в теоретическом изучении структуры и функции генетических макромолекул РНК и ДНК, в значительной мере дополняет эпизоотическую и эпидемиологическую характеристику бешенства в различных регионах. Изучение молекулярно-генетических характеристик «полевых» изолятов вируса бешенства, выделяемых от животных дает возможность мониторинга их молекулярной структуры в процессе распространения заболевания (Глушков А.А., Луговцева В. Ю, 2004; Львов с соавт., 2006, 2008, 2014; Хисматуллина Н.А. с соавт., 2012; Zaberezhny A.D., 1999).

Геном вируса бешенства составляет 12 kb, включает в себя 5 структурных генов – N, P, M, G, L, разделённых некодирующими межгенетическими последовательностями от 3' к 5'- концу и кодирующих, соответственно, нуклеопротеин, фосфопротеин, матриксный белок, гликопротеин и большую субъединицу транскриптазы (РНК-зависимая РНК-полимераза, Large- протеин) (Fumitaka Osakada, 2013).

N ген, кодирующий нуклеопротеин, в геноме вируса бешенства более консервативен и может быть эффективно экспрессирован, что является причиной его использования для генотипирования и определения популяционных вариаций вируса бешенства. Филогенетический анализ гена N показал, что вирусы бешенства демонстрируют региональное сходство, т.е. образцы из одинаковых географических территорий организуются в кластеры или субкластеры, что соответствует выводу о том, что вирус бешенства имеет определённые региональные характеристики (Елаков А.Л. и др., 2015; Иванов А.В. и др., 2015; Зайкова О.Н. и др., 2016).

Белок гликопротеин (G ген) образует поверхностные пепломеры и гликозилирован по N-связям. Гликопротеин участвует в проникновении вируса в

клетку (прикрепление к клеточным рецепторам, слияние мембран и эндоцитоз), индуцирует образование вируснейтрализующих антител и клеточно-опосредованного иммунного ответа, проявляет гемагглютинирующую активность (Гулюкин А.М., 2011, 2014). Гликопротеин оболочки играет ведущую роль для сборки и трансинаптического распределения вируса, но не для транскрипции вирусных генов или репликации вирусного генома. Удаление гликопротеина из вирусного генома может ограничить трансинаптическую передачу вируса в нервной системе. Вирус бешенства, лишённый гликопротеина, не может распространяться с момента инфицирования, пока не будет альтернативных источников гликопротеина (Гулюкин А.М., 2011).

Целью работы была молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выделенных на различных территориях РФ и в Республике Таджикистан от разных видов животных и человека.

Республика Татарстан. Нами проведены исследования по филогенетическому анализу фрагмента гена, кодирующего гликопротеин вируса, выделенного из мозга (постмортально) пострадавшего Г., пребывающего в Индии (остров Гоа), от укуса бродячей собаки в сравнении с вирусами генотипов 1, 2, 4, 5 и 6.

В анализе использовали метод гнездовой обратной транскрипции ПЦР (ОТ-ПЦР). ОТ-ПЦР проводили с помощью Thermo Scientific Maxima Reverse (Ferments, Литва) с использованием маркера молекулярного веса 100-3000 пар оснований. Ген G вируса бешенства анализировали методами *neighbor joining (NJ)* и *maximum likelihood (ML)*. Для выявления нуклеотидных замен использовали данные NCBI и программы BioEdit version 7.0.5.2. (Ibis Biosciences, США), для сравнительного анализа – нуклеотидные последовательности гена G штаммов вируса бешенства различных генотипов 1-го; 2-го; 4-го; 5-го и 6-го из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Полученные ампликоны секвенировали с применением праймеров, которые использовались в ОТ-ПЦР, и набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit («Applied Biosystems», США). Анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием

пакета программ BioEdit version 7.0.5.2. (Ibis Biosciences, США). 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.

Ген *G* изучаемого изолята (2 rabies) сравнивали со штаммами различных генотипов, взятых из базы данных GenBank: генотип 1 – RABV, SADB19, генотип 2 – 0406SEN, генотип 4 – 86132SA, 94286SA, генотип 5 – 03002FRA, 8918FRA, RV9-1; генотип 6 – 9018HOL, RV1333 и штаммов генотипов: генотип 1 – RABV, SADB19, генотип 2- 0406SEN, генотип 4 - 86132SA, 94286SA, генотип 5- 03002FRA, 8918FRA, RV9-1; генотип 6 - 9018HOL, RV1333.

Филогенетическое древо, полученное NJ и ML-методами для изолята лиссавируса, выделенного от человека представлено на рисунке 37.

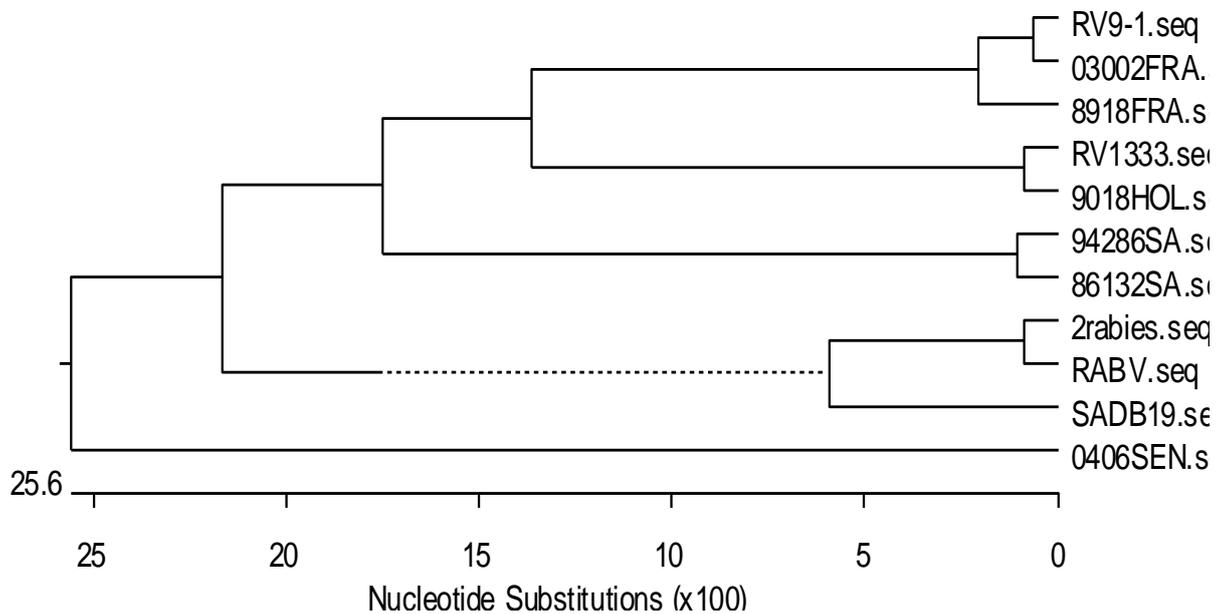


Рисунок 37 – Филогенетическое древо для изолята (2 rabies), выделенного от человека, укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии

Нуклеотидная последовательность фрагмента гена *G* изолята вируса бешенства, выделенного от человека, выражалась следующим образом:

CTCGGACGAGATCGAACATCTTGTGTGGAGGAGTTGGTCAAGAAAAGAGA
 GGAGTGTCTGGATGCACTGGAGTCCATCATGACCACCAAGTCGGTGAGTTTCAGA
 CGTCTCAGCCACTTGAGAAAACCTTGTCCCTGGGTTCGGAAAGGCATACACCATATT
 CAACAAAACCTTGATGGAAGCAGATGCCCATTACAAGTCAGTCCGAACCTGGAAT
 GAGATCATCCCCTCCAAAGGG

Анализ последовательности нуклеотидов фрагмента гена G вируса бешенства размером 238 н.о. показал, что изучаемый изолят (2 rabies) отличается от вакцинного штамма SAD B19 на 6%, от RABV (вирус бешенства 1-го генотипа) – на 0,9-1%. От вируса бешенства *Lagos bat* (изолят 0406SEN, генотип 2, серотип 2) изучаемый образец отличается примерно на 25,6%. Процент отличий данного образца от вируса бешенства *Duvenhage* (94286SA и 86132SA изоляты, генотип 4, серотип 4) составляет примерно 18-22%, от вируса бешенства летучих мышей 1-го и 2-го типа (*European bat lyssavirus type 2*, изолят RV1333 и 9018HOL, серотип 6, *European bat lyssavirus type 1*, штамм RV 9-1, 03002FRA и 8918FRA, серотип 5) – 22%.

К 1-му генотипу (*RABV*) относят абсолютное большинство уличных и фиксированных штаммов вируса бешенства из различных частей света, в том числе, и классический стандартный – *CVS*, а также все вакцинные штаммы вируса бешенства: «Внуково-32», «Овечий» ГНКИ, «Щелково-32», «РБ-71» и др. (Иванов А.В. и др., 2010). Представители 1-го генотипа поддерживаются в природе межвидовой передачей повсеместно (кроме Австралии и некоторых островов) среди представителей *Carnivora* и *Microchiroptera*.

Для выявления нуклеотидных замен использовали данные NCBI и программы BioEdit. При сравнении нуклеотидных последовательностей образца и вируса бешенства первого генотипа было выявлено 4 нуклеотидные замены (1,68% отличий), в том числе 2 замены нуклеотидов в позиции 890 (гуанина на аденин) и 1072 (цитозина на аденин). В сравнении с вакцинными штаммами отмечены 2 замены аминокислот: аргинина на лизин и лейцина на изолейцин. Те же замены наблюдались и в нуклеотидной последовательности штамма RABVAY956319 вируса бешенства, свидетельствующие о филогенетической

близости изолята вируса бешенства, выделенного от человека, укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии с указанным штаммом.

Анализ последовательности нуклеотидов фрагмента гена G вируса бешенства размером 238 н.п. показал на незначительное отличие изучаемого изолята (2 rabies) от RABV, составляющее 1,68%, отличие от вакцинных штаммов «Внуково-32» на 10,5% и SADB19 на 10,9%, относящихся к вирусам бешенства 1-го генотипа и значительное отличие от лиссаподобных вирусов 2, 4, 5 и 6 –го генотипов, составляющее 21,0-32,7%. Результаты свидетельствуют о филогенетической близости изучаемого изолята (2 rabies) со штаммом RABVAU956319 вируса бешенства, относящегося к 1-му генотипу.

Таким образом, анализ последовательности нуклеотидов фрагмента гена G вируса бешенства размером 238 н.п. показал на незначительное отличие изучаемого изолята (2 rabies) от вакцинного штамма SAD B19, составляющее 6%, от RABV (вирусы бешенства 1-го генотипа) – 0,9-1%, и значительное отличие от вирусов 2-го, 4-го, 5-го и 6 -го генотипов, составляющее 18-25,6%. Полученные результаты свидетельствуют о филогенетической близости изучаемого изолята (2 rabies) с Пастеровским штаммом вируса бешенства, относящемуся к 1-му генотипу.

Для получения нуклеотидной последовательности фрагмента гена гликопротеина изолятов вируса бешенства из Республики Татарстан нами исследовано 28 образцов по выделению ДНК в ПЦР. Реакционная смесь для ПЦР содержала: 16 мМ TrisHCl, pH 7,4; 50 мМ KCl; 1,5 мМ MgCl₂; 1% Triton X-100 по 10 пМ для каждого праймера; 2,5 мМ dNTPs; 2 ед. Taq-полимеразы. В смесь вносили по 5 мкл кДНК. Температурные режимы и экспозиция для амплификации: 95°C – 10 мин.; (95°C – 0,5 мин.; 55°C – 5 мин.; 72°C – 1 мин.) – 35 циклов; 72°C – 7 мин. в последнем цикле. В ходе исследований использовали олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие фрагмент гена G вируса бешенства размером 288 нуклеотидных пар.

Продукты ПЦР очищали от агарозного геля с помощью набора SilicaBead DNA GelExtractionKit («Fermentas», Литва). Реакцию для секвенирования

проводили на амплификаторе Mastercycler Gradient («Eppendorf», Германия) с применением BigDye® Terminator v3.1 Ready Reactionkit («Applied Biosystems», США). Затем продукты амплификации пересаждали. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (США). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей применяли пакет программ DNASTAR V.3.12 («LasergenInc.», США) и программы Bio-Edit 7.0.1. (Ibis Biosciences, США). По результатам секвенирования методами neighbor joining (NJ) и maximum likelihood (ML) были построены филогенетические дендрограммы и проведен филогенетический анализ.

Из 28 полевых изолятов вируса бешенства 11 (39%) оказались положительными на бешенство в ПЦР. Полученный фрагмент гена гликопротеина G вируса бешенства секвенировали на основе чего были построены филогенетические дендрограммы и проведен филогенетический анализ. Описание проб и полученные последовательности фрагмента гена G показаны в таблицах 12 и 13. Размер фрагмента гена G в результате секвенирования проб составил 227-260 н.п. Ранее нами был изучен образец, выделенный от человека, укушенного бешеной собакой на о. Гоа (2 rabies). Нуклеотидная последовательность фрагмента гена G данного изолята составляет 238 н.п.:

CTCGGACGAGATCGAACATCTTGTGTGGAGGAGTTGGTCAAGAAAAGAGA
GGAGTGTCTGGATGCACTGGAGTCCATCATGACCACCAAGTCGGTGAGTTTCAGA
CGTCTCAGCCACTTGAGAAAACCTGTCCCTGGGTTTCGGAAAGGCATACACCATATT
CAACAAAACCTTGATGGAAGCAGATGCCCATTACAAGTCAGTCCGAACCTGGAAT
GAGATCATCCCCTCCAAAGGG

В качестве референтных, использовали последовательности гена G штаммов 1-го генотипа RV-97, RABV AY956319, CVS-11, Внуково-32, SAD B19, ERA. Размер исследуемого фрагмента составил 227 н.о. (75 аминокислот), положение в геноме 852-1079 (284-359 в последовательности аминокислот).

В ходе исследований фрагмента гена G вируса бешенства с помощью базы данных NCBI была получена филогенетическая дендрограмма (рисунок 38).

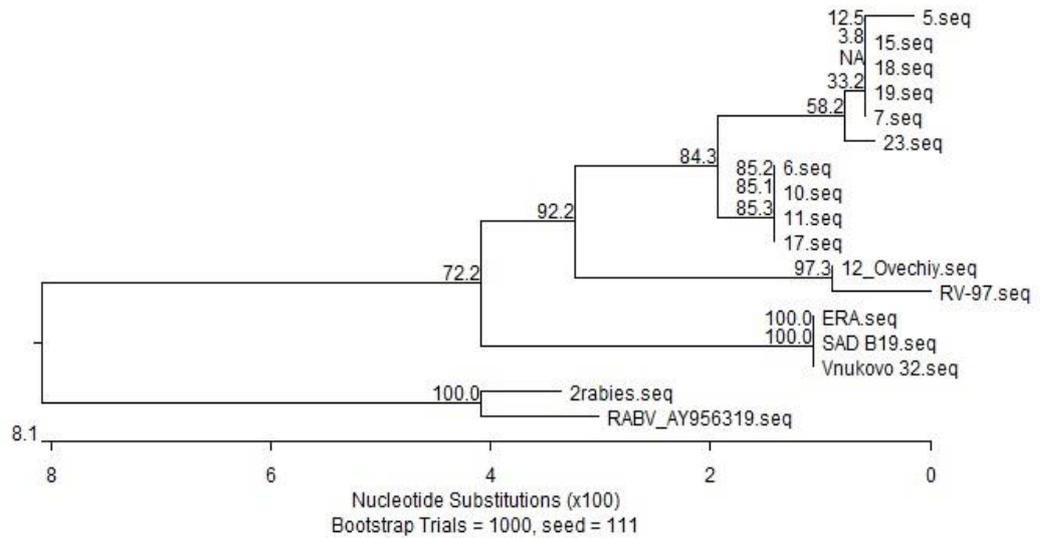


Рисунок 38 – Филогенетическая дендрограмма, полученная при сопоставлении фрагментов гена G полевых изолятов вируса бешенства (Республика Татарстан) и референтных штаммов

Последовательности нуклеотидов фрагмента гена G вируса бешенства из образцов Республики Татарстан представлены в таблицах 13 и 14.

Таблица 13 - Последовательности нуклеотидов фрагмента гена G вируса бешенства из образцов Республики Татарстан (пробы 5-7, 10-12, 15)

№ пробы	Вид Животного	Район, город	Последовательность фрагмента гена G
5	Собака	Пестречинский	CAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTGGTC AAGAAAAGAGAGGAATGTCTGGATGCGCTGGAGTCCAT CATGACCACTAAGTCAGTGAGTTTCAGACGTCTCAGTC ATTTAAGAAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGAAAAGCATAT ACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAGGCTGATGCTCA CTACAAGTCAGTCCGGACTTGGAATGAGATCATCCCCT CAAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGGAGGT

6	Ли Са	г. Казань	TCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTGGT CAAGAAAAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCC ATCATGACCACCAAGTCAGTGAGTTTCAGACGTCTCAG TCATTTAAGAAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGAAAAGCAT ATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAGGCTGATGCT CACTACAATCAGTCCGGACTTGGAATGAGATCATCCC CTCAAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGGAGG
7	Ли Са	Лаишевский	TCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTGGT CAAGAAAaGAGAGGAATGTCTGGATGCACTGGAGTCCA TCATGACCACTAAGTCAGTGAGTTTCAGACGTCTCAGTC ATTTAAGAAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGAAAAGCATAT ACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAGGCTGATGCTCA CTACAAGTCAGTCCGGACTTGGAATGAGATCATCCCCT CAAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGGAGGTA
10	Ли Са	Высокогорский	TCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTGGT CAAGAAAaGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCCA TCATGACCACCAAGTCAGTGAGTTTCAGACGTCTCAGT CATTTAAGAAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGAAAAGCATA TACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAGGCTGATGCTC ACTACAATCAGTCCGGACTTGGAATGAGATCATCCCC TCAAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGGAGG
11	Ли Са	Высокогорский	TCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTGGT CAAGAAAAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCC ATCATGACCACCAAGTCAGTGAGTTTCAGACGTCTCAG TCATTTAAGAAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGAAAAGCAT ATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAGGCTGATGCT CACTACAATCAGTCCGGACTTGGAATGAGATCATCCC CTCAAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGGAGG
12	производствен ный штамм вируса бешенства «Овечий» ГНКИ		TCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTGGT CAAGAAAAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGAGTCC ATCATGACCACCAAGTCAGTAAGTTTCAGACGTCTCAG TCATTTAAGAAAACCTTGTCCTGGGTTTCGGAAAAGCAT ATACCATAATCAACAAGACTTTGATGGAGGCTGAGGCT CACTACAAGTCAGTCCGGACTTGGAATGAGATCGTCCC CTCAAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGGAGG
15	Ли Са	Новошешминский	TCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTGGT CAAGAAAAGAGAGGAATGTCTGGATGCACTGGAGTCC ATCATGACCACTAAGTCAGTGAGTTTCAGACGTCTCAG TCATTTAAGAAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGAAAAGCAT ATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAGGCTGATGCT CACTACAAGTCAGTCCGGACTTGGAATGAGATCATCCC CTCAAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGGGGGGAGGTA

Таблица 14 - Последовательности нуклеотидов фрагмента гена G вируса бешенства из образцов Республики Татарстан (пробы 17-19, 23)

17	Лиса	Пестречинский	TCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTG GTCAAGAAAAGAGAGGAGTGTCTGGATGCACTAGA GTCCATCATGACCACCAAGTCAGTGAGTTTCAGACG TCTCAGTCATTTAAGAAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGAA AAAGCATATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAG GCTGATGCTCACTACAAATCAGTCCGGACTTGGAAT GAGATCATCCCCTCAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGG GGGAGGT
18	Лиса	Алькеевский	TCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTG GTCAAGAAAAGAGAGGAATGTCTGGATGCACTGGA GTCCATCATGACCACCTAAGTCAGTGAGTTTCAGACG TCTCAGTCATTTAAGAAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGAA AAAGCATATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAG GCTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACTTGGAAT GAGATCATCCCCTCAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGG GGGAGGT
19	Кошка	Атнинский	CAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTGG TCAAGAAAAGAGAGGAATGTCTGGATGCACTGGAGT CCATCATGACCACCTAAGTCAGTGAGTTTCAGACGTC TCAGTCATTTAAGAAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGAA AAGCATATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAGG CTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACTTGGAATG AGATCATCCCC
23	КРС	Алькеевский	TCAGACGAAATTGAGCACCTTGTTGTAGAGGAGTTG GTCAAGAAAAGAGAGGAATGTCTGGATGCACTGGA GTCCATCATGACCACCTAAGTCAGTGAGTTTCAGACG TCTCAGTCATTTAAGAAAACCTTGTTCCCGGGTTTCGGA AAAGCATATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAG GCTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACTTGGAAT GAGATCATCCCCTCAAAGGGTGTTTAAGAGTTGGG GGGAGG

В дальнейшем было проведено сравнение последовательностей нуклеотидов фрагмента гена G полевых изолятов с референтными штаммами и образцом «2 rabies», а также последовательностей аминокислот на заданном участке. Результаты представлены на рисунках 39 и 40.

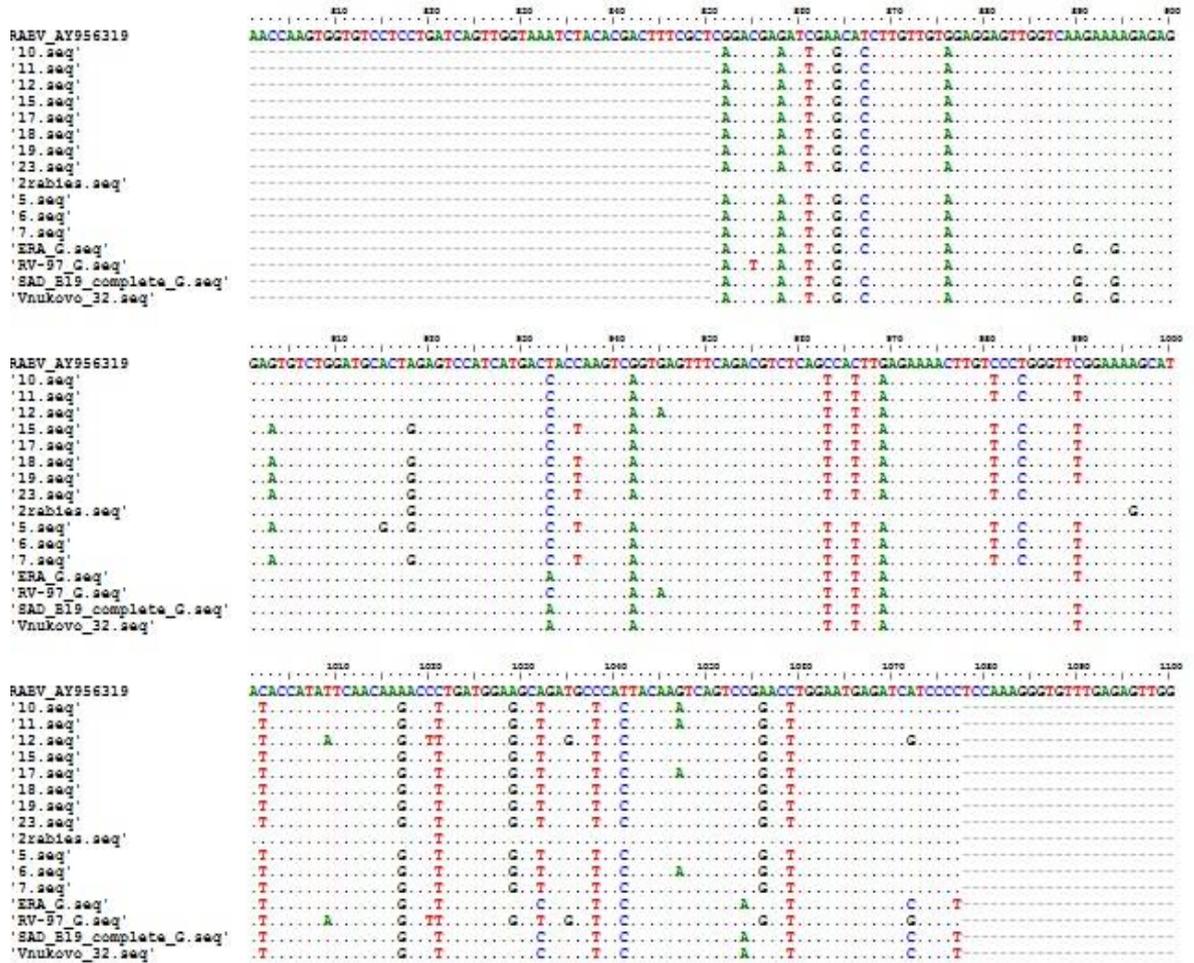


Рисунок 39– Нуклеотидные отличия в последовательностях изолятов вируса бешенства Республики Татарстан и референтных штаммов

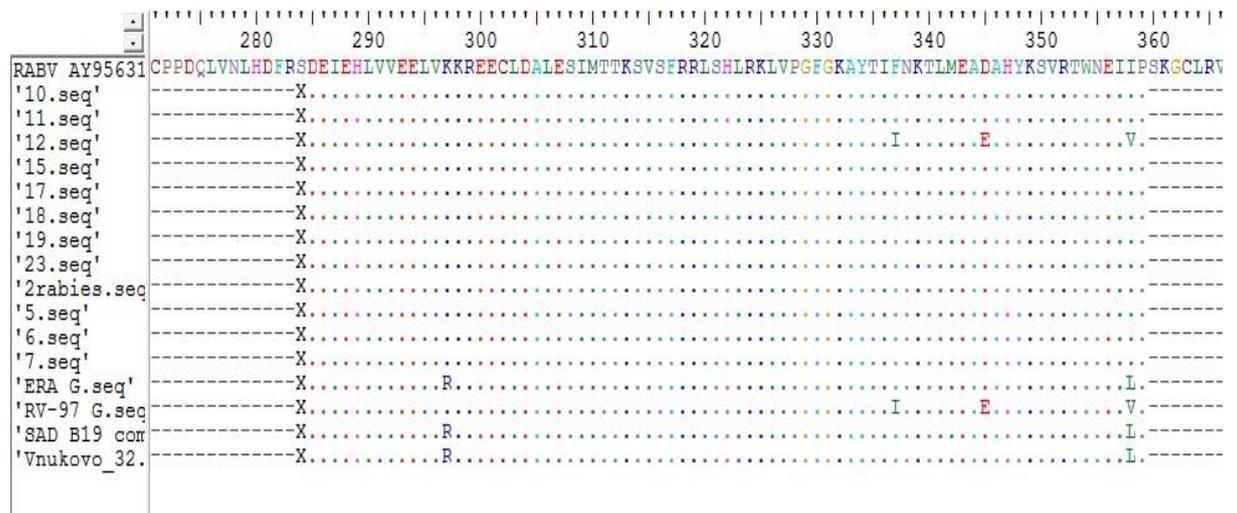


Рисунок 40 – Аминокислотные отличия в последовательностях изолятов вируса бешенства Республики Татарстан и референтных штаммов

При сравнении нуклеотидных и аминокислотных последовательностей исследуемых изолятов между собой геномных отличий практически не выявлено. При сравнении исследуемых проб с референтными штаммами первого генотипа было выявлено около 8% отличий в последовательности нуклеотидов.

При сравнении последовательностей аминокислот исследуемых проб и референтных штаммов 1-го генотипа отличий также не выявлено, что свидетельствует о селективном давлении на структуру аминокислот, кодируемую в данном фрагменте. Проба № 12 (штамм «Овечий» ГНКИ) на заданном участке генома соответствует штамму RV-97.

Республика Таджикистан. Целью работы была молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выделенных в 2015 г. на территории Республики Таджикистан от разных животных.

В филогенетическом анализе для получения первичной структуры фрагмента гена глико- и нуклеопротеина из образцов ткани мозга животных выделяли РНК с применением коммерческого препарата TRI®Reagent (Sigma Aldrich) по методике производителя и ресуспендировали в 30-50 мкл деионизированной H₂O при 55⁰С, периодически перемешивая пробы пипетированием. Выделенную РНК (5 мкл), использовали для проведения реакции обратной транскрипции и получения кДНК для постановки ПЦР.

Реакционная смесь для ПЦР с обратной транскрипцией содержала: 16 мМ TrisHCl, pH 7,4; 50 мМ KCl; 1,5 мМ MgCl₂; 1% Triton X-100; по 10 пМ каждого праймера; 2,5 мМ dNTPs; 2 ед. Taq-полимеразы, 0,625 мМ MMLV ревертазы+ингибитора РНКаз (для первой амплификации). В реакционную смесь вносили 5 мкл РНК. В ПЦР и ОТ-ПЦР использовали олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие фрагмент гена G вируса бешенства размером 817 нуклеотидов для первой амплификации и 288 нуклеотидов для второй амплификации; фланкирующие фрагмент гена N размером 600 нуклеотидов.

Продукты ПЦР очищали из агарозного геля с помощью набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («Fermentas», Литва) согласно инструкции производителя. Реакцию для секвенирования проводили на амплификаторе Mastercycler Gradient

(«Eppendorf», Германия) с применением BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction kit («Applied Biosystems», США). Затем продукты амплификации переосаждали. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (США). Для выравнивания нуклеотидных последовательностей применяли пакет программ DNASTAR V.3.12 («Lasergen Inc.», США) и программы Bio Edit 7.0.1. (Ibis Biosciences, США). По результатам секвенирования методами neighbor joining (NJ) и maximum likelihood (ML) были построены филогенетические дендрограммы и проведен филогенетический анализ.

Исследованы 7 образцов ткани мозга, полученных в апреле 2015 г. от больных бешенством животных, доставленных из Республики Таджикистан (две пробы от собак и 5 – от крупного рогатого скота). Методами МФА и ОТ-ПЦР было установлено наличие вируса бешенства во всех образцах.

Полученные фрагменты генов N и G вируса бешенства секвенировали. По результатам секвенирования были построены филогенетические дендрограммы и проведен филогенетический анализ с использованием программ BioEdit, пакета программ Lasergene и базы данных NCBI. Сравнение первичной структуры полученных фрагментов генов N и G проводили с вакцинными штаммами и штаммами вируса бешенства, представленными в базе данных GenBank, а также с изолятами, выделенными нами ранее (Республика Татарстан).

Описание проб и полученные последовательности фрагмента гена G представлены в таблице 15. Размер фрагмента гена G составил от 274 до 291 нуклеотидов. Размер исследуемого фрагмента составил 271 нуклеотидов кодирующий 90 аминокислот, и занимающий положение в гене между нуклеотидами 825-1095.

Таблица 15 – Последовательности нуклеотидов фрагмента гена G лисавирусов, изолированных от животных на территории Республики Таджикистан

№ п/п	Вид Животного	Район, город	Последовательность фрагмента гена G
1	Собака	Варзобский	TTAGTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTC GGATGAAATTGAGCATCTTGTTGTAGAGGA ATTGGTCAAGAAAAGAGAGGAGTGTCTGG ATGCACTAGAGTCCATCATGACCACCAAGT CAGTGAGTTTCAGACGTCTCAGTCATTTAA GAAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGGAAAGCAT ATACCATATTCAACAAAACCTTGATGGAGG CTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACTT GGAATGAGATCATCCCCTCAAAGGGGTGTT TGAAAGTTGGAGGAAGGTGCC
2	Собака	Вахдатский	GTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTCGGA TGAAATTGAGCATCTTGTTGTAGAGGAATT GGTCAAGAAAAGAGAGGAGTGTCTGGATG CACTAGAGTCCATCATGACCACCAAGTCAG TGAGTTTCAGACGTCTCAGTCATTTAAGAA AACTTGTTCCCGGGTTTGGGAAAGCATATA CCATATTCAACAAAACCTTGATGGAGGCTG ATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACTTGGA ATGAGATCATCCCCTCAAAGGGGTGTTTGA AAGTTGGAGGAAGGTGCCA
3	Крупный рогатый скот	Рудакинский	TTAGTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTC GGATGAAATTGAGCATCTTGTTGTAGAGGA ATTGGTCAAGAAAAGAGAGGAGTGTCTGG ATGCACTAGAGTCCATCATGACCACCAAGT CAGTGAGTTTCAGACGTCTCAGTCATTTAA GAAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGGAAAGCAT ATACCATATTCAACAAAACCTTGATGGAGG CTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACTT GGAATGAGATCATCCCCTCAAAGGGGTGTT TGAAAGTTGGAGGAAGGTGCCA
4	Крупный рогатый скот	г. Рогун	GTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTCGGA TGAAATTGAGCATCTTGTTGTAGAGGAATT GGTCAAGAAAAGAGAGGAGTGTCTGGATG CACTAGAGTCCATCATGACCACCAAGTCAG TGAGTTTCAGACGTCTCAGTCATTTAAGAA AACTTGTTCCCGGGTTTGGGAAAGCATATA CCATATTCAACAAAACCTTGATGGAGGCTG ATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACTTGGA

			ATGAGATCATCCCCTCAAAGGGGTGTTTGA AAGTTGGAGGAAGGTGCCA
5	Крупный рогатый скот	Варзобский	AGTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTCGG ATGAAATTGAGCATCTTGTTGTAGAGGAAT TGGTCAAGAAAAGAGAGGAGTGTCTGGAT GCACTAGAGTCCATCATGACCACCAAGTCA GTGAGTTTCAGACGTCTCAGTCATTTAAGA AAACTTGTTCCCGGGTTTGGGAAAGCATAT ACCATATTCAACAAAACCTTGATGGAGGCT GATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACTTGG AATGAGATCATCCCCTCAAAGGGGTGTTTGA AAAGTTGGAGGAAGGTGCCA
6	Крупный рогатый скот	г. Рогун	TTAGTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTC GGATGAAATTGAGCATCTTGTTGTAGAGGA ATTGGTCAAGAAAAGAGAGGAGTGTCTGG ATGCACTAGAGTCCATCATGACCACCAAGT CAGTGAGTTTCAGACGTCTCAGTCATTTAA GAAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGGAAAGCAT ATACCATATTCAACAAAACCTTGATGGAGG CTGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACTT GGAATGAGATCATCCCCTCAAAGGGGTGTT TGAAA
7	Крупный рогатый скот	г. Душанбе	TAGTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTCG GATGAAATTGAGCATCTTGTTGTAGAGGAA TTGGTCAAGAAAAGAGAGGAGTGTCTGGA TGCACTAGAGTCCATCATGACCACCAAGTC AGTGAGTTTCAGACGTCTCAGTCATTTAAG AAAACCTTGTTCCCGGGTTTGGGAAAGCATA TACCATATTCAACAAAACCTTGATGGAGGC TGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGACTTG GAATGAGATCATCCCCTCAAAGGGGTGTTT GAAAGTTGGAGGA

В качестве референтных использовали штаммы RV-97, RABV AY956319, CVS-11, Внуково-32 и ERA. При сравнении первичных нуклеотидных последовательностей изолятов нуклеотидных и аминокислотных отличий между ними не выявлено. При сравнении с референтными штаммами выявлено 10-16% отличий в последовательности нуклеотидов и 6,7% в последовательности аминокислот (рисунок 41, 42).

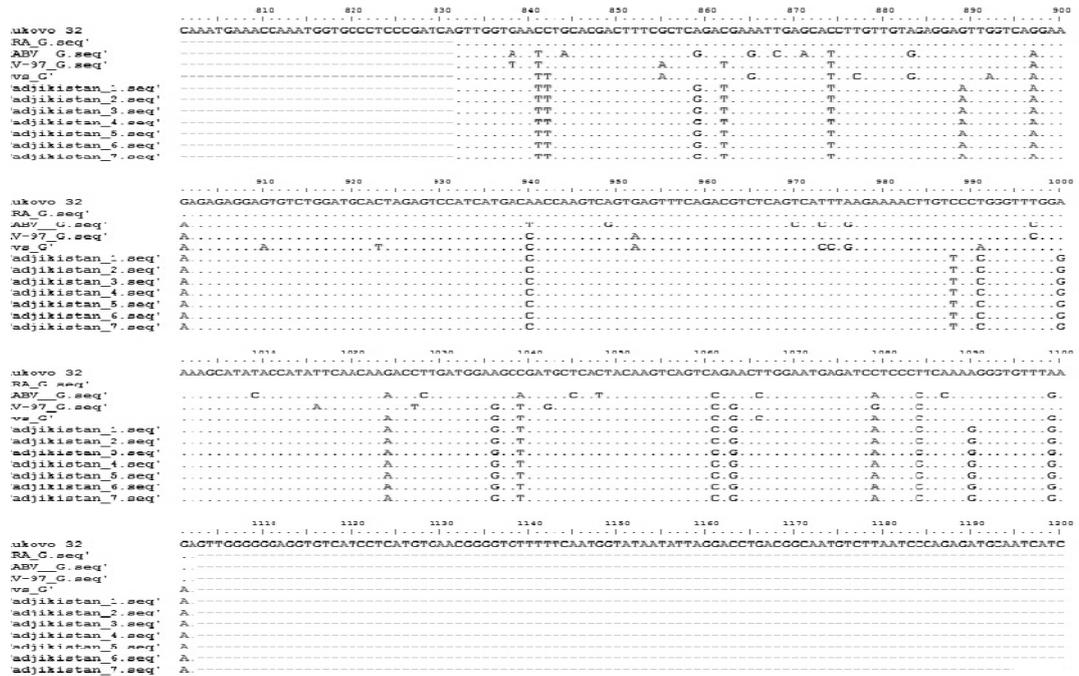


Рисунок 41 – Нуклеотидные отличия в последовательностях вирусов бешенства из Республики Таджикистан и референтных штаммов

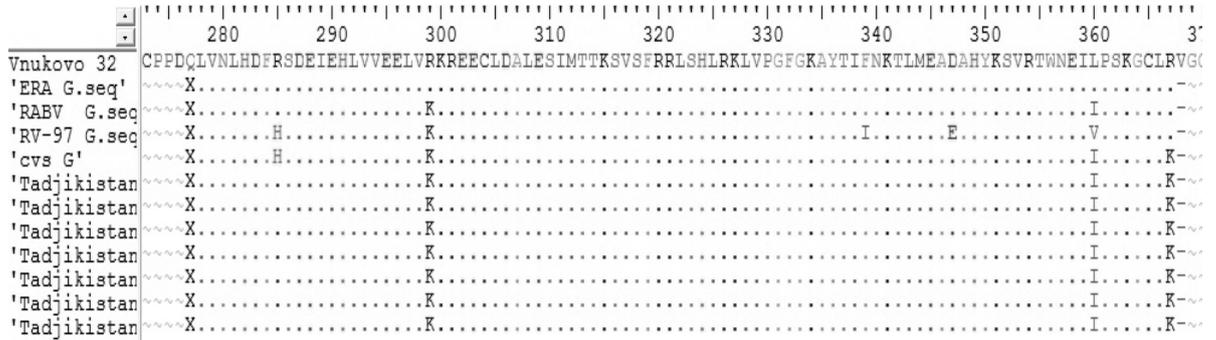


Рисунок 42 – Аминокислотные отличия в последовательностях вирусов бешенства из Республики Таджикистан и референтных штаммов

При сопоставлении первичной структуры фрагмента гена G вируса бешенства исследуемых изолятов, была получена филогенетическая дендрограмма (рисунок 43). Размер исследуемого фрагмента при этом составил 228 нуклеотидов (положение в геноме 851-1077), кодирующих 76 аминокислот (положение 285-359).

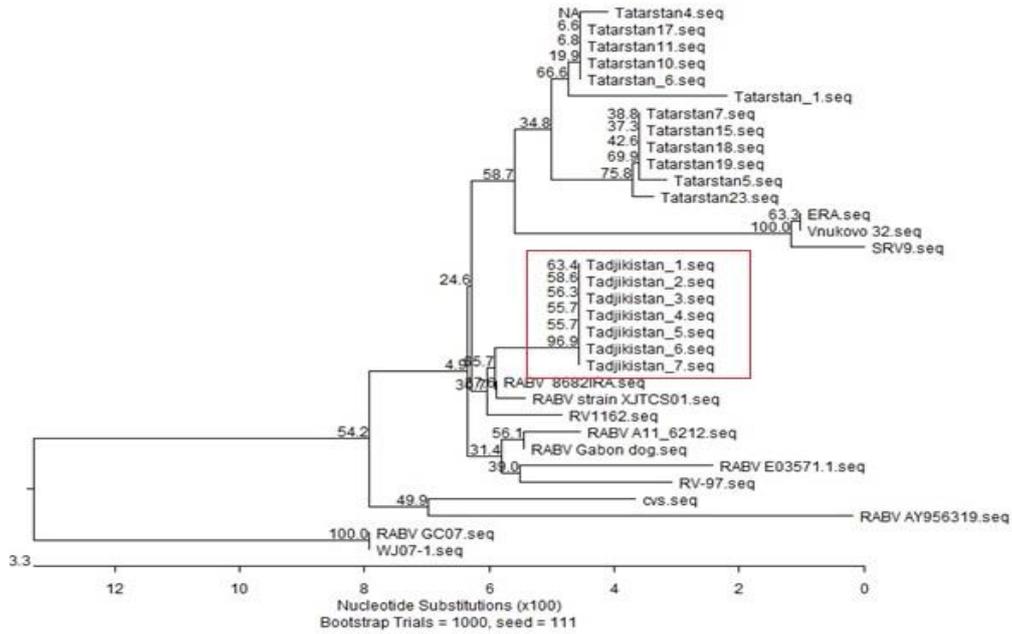


Рисунок 43 – Филогенетическая дендрограмма изолятов вируса бешенства из Республики Таджикистан. Рамкой обозначены, исследуемые изоляты.

Примечательно, что филогенетически изоляты лиссавирусов из Таджикистана оказались ближе к изоляту RABV 8682IRA, выделенному от овцы в Иране [Pant,G.R., Lavenir,R., Wong,F.Y., et all, Recent emergence and spread of an arctic-related phylogenetic lineage of rabies virus in Nepal]. На рисунке 44 отражены замены в последовательностях аминокислот исследованных штаммов лиссавирусов.

	260	270	280	290	300
				
RABV 8682IRA	GLRLMDGTWIAMQTSDETKWCPPDQLVNLHDFRSDEIEHLVVEELVKKRE				
'ERA_G.seq'	-----X.....R...				
'RABV_G.seq'	-----X.....				
'A11_6212_g.seq'	-----X.....				
'GC07_G.seq'	-----X.....				
'Gabon_dog_g.seq'	-----X.....				
'RABV_E03571.1_G.seq'	-----X.....I.....				
'RV-97_G.seq'	-----X.....				
'RV1162_g.seq'	-----X.....				
'SRV9_G.seq'	-----X.....R...				
'Tadjikistan_1.seq'	-----X.....				
'Tadjikistan_2.seq'	-----X.....				
'Tadjikistan_3.seq'	-----X.....				

```
'Tadjikistan_4.seq' -----X.....
'Tadjikistan_5.seq' -----X.....
'Tadjikistan_6.seq' -----X.....
'Tadjikistan_7.seq' -----X.....
'Tatarstan10.seq' -----X.....
'Tatarstan11.seq' -----X.....
'Tatarstan15.seq' -----X.....
'Tatarstan17.seq' -----X.....
'Tatarstan18.seq' -----X.....
'Tatarstan19.seq' -----X.....
'Tatarstan23.seq' -----X.....
'Tatarstan4.seq' -----X.....
'Tatarstan5.seq' -----X.....
'Tatarstan7.seq' -----X.....
'Tatarstan_1.seq' -----X.....
'Tatarstan_6.seq' -----X.....
'Vnukovo_32.seq' -----X.....R...
'WJ07-1_G.seq' -----X.....
'cvs_G' -----X.....
'strain_XJTCS01_g.seq' -----X.....
```

310 320 330 340 350

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```
RABV_8682IRA ECLDALESIMTTKSVSFRRLSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKS
'ERA_G.seq' .....
'RABV_G.seq' .....
'All_6212_g.seq' .....
'GC07_G.seq' .....T.....
'Gabon_dog_g.seq' .....
'RABV_E03571.1_G.seq' .....I.....Y.....E.....
'RV-97_G.seq' .....I.....E.....
'RV1162_g.seq' .....
'SRV9_G.seq' .....A.....
'Tadjikistan_1.seq' .....
'Tadjikistan_2.seq' .....
'Tadjikistan_3.seq' .....
'Tadjikistan_4.seq' .....
'Tadjikistan_5.seq' .....
'Tadjikistan_6.seq' .....
'Tadjikistan_7.seq' .....
'Tatarstan10.seq' .....
'Tatarstan11.seq' .....
'Tatarstan15.seq' .....
'Tatarstan17.seq' .....
'Tatarstan18.seq' .....
'Tatarstan19.seq' .....
'Tatarstan23.seq' .....
'Tatarstan4.seq' .....
'Tatarstan5.seq' .....
```

```

'Tatarstan7.seq' .....
'Tatarstan_1.seq' .....
'Tatarstan_6.seq' .....
'Vnukovo_32.seq' .....
'WJ07-1_G.seq' .....T.....
'cvs_G' .....
'strain_XJTCS01_g.seq' .....

          360      370      380      390      400
          ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
RABV_8682IRA      VRTWNEIIPSKGCLRVGGRCHPHVNGVVFNGIILGPDGHVLIPEMQSSLL
'ERA_G.seq'      .....L-----
'RABV_G.seq'      .....-----
'A11_6212_g.seq' .....-----
'GC07_G.seq'      I.....-----
'Gabon_dog_g.seq' .....-----
'RABV_E03571.1_G.seq' .....-----
'RV-97_G.seq'      .....V-----
'RV1162_g.seq'      .....D-----
'SRV9_G.seq'      .S...VL-----
'Tadjikistan_1.seq' .....-----
'Tadjikistan_2.seq' .....-----
'Tadjikistan_3.seq' .....-----
'Tadjikistan_4.seq' .....-----
'Tadjikistan_5.seq' .....-----
'Tadjikistan_6.seq' .....-----
'Tadjikistan_7.seq' .....-----
'Tatarstan10.seq' .....-----
'Tatarstan11.seq' .....-----
'Tatarstan15.seq' .....-----
'Tatarstan17.seq' .....-----
'Tatarstan18.seq' .....-----
'Tatarstan19.seq' .....-----
'Tatarstan23.seq' .....-----
'Tatarstan4.seq' .....-----
'Tatarstan5.seq' .....-----
'Tatarstan7.seq' .....-----
'Tatarstan_1.seq' .....-----
'Tatarstan_6.seq' .....-----
'Vnukovo_32.seq' .....L-----
'WJ07-1_G.seq'      I.....-----
'cvs_G' .....-----
'strain_XJTCS01_g.seq' .....-----

```

Рисунок 44 – Отличия в последовательностях аминокислот при сравнении изолятов из Республики Татарстан и штаммами вируса бешенства базы данных NCBI

На указанном участке генома отличий в последовательностях аминокислот исследуемых изолятов и изолятов из Республики Татарстан и RABV 8682IRA не выявлено, в то время как при сравнении с другими изолятами и вакцинными штаммами наблюдаются некоторые геномные отличия.

Следующим этапом работы было получение первичной структуры фрагмента гена N вируса бешенства изолятов из Таджикистана и сравнение этой структуры с последовательностями референтных штаммов базы данных GenBank. В таблице 16 приведены последовательности нуклеотидов фрагмента гена N исследуемых изолятов, размер которого в результате секвенирования составил от 470 до 567 нуклеотидов. Размер исследуемого фрагмента составил 468 нуклеотидов, кодирующих 156 аминокислот, положение в гене – между нуклеотидами 18-486.

Таблица 16 – Последовательности нуклеотидов фрагмента гена N изолятов вируса бешенства от различных видов животных территории Республики Таджикистан.

№ п/п	Вид животного	Район, город	Последовательность фрагмента гена N
1	Собака	Варзобский	TGTATTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCTCTTTGA AGCCCGAGATTATCGTGGATCAATATGAGTACAA GTACCCTGCTATCAAAGATTTGAAAAAGCCTTGTA TAACCCTAGGGAAAGCCCCTGACTTAAACAAAGC ATACAAGTCTGTATTGTCAGGCATGAATGCAGCCA AACTAGATCCTGATGATGTATGTTCTACTTGGCA GCAGCAATGCAGTTCTTTGAGGGGACGTGTCCGGA AGACTGGACCAGCTATGGAATCTTGATTGCACGAA AAGGAGACAAGATCACCCCGGATTCCTGGTGGGA AATAAAGCGTACTGATGTAGAAGGAAATTGGGCT CTGACAGGAGGCATGGAACCTGACAAGGGACCCCA CTGTCTCTGAACATGCGTCTTTAGTCGGTCTTCTCT TGAGTCTGTATAGGTTGAGCAAAATATCAGGACA AAACACTGGTAACTATAAAACAAACATCGCAGAT AGGATAGAGCAGATATTCGAGACCGCCCCTTTGT TAAAATCGTGGAACACCATACTCTAATGACAACCTC ACAAAATGTGTGC
2	Собака	Вахдат	TGTATTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCTCTTTGA

	ка	кий	AGCCCGAGATTATCGTGGATCAATATGAGTACAA GTACCCTGCTATCAAAGATTTGAAAAAGCCTTGTA TAACCCTAGGGAAAGCCCCTGACTTAAACAAAGC ATACAAGTCTGTATTGTCAGGCATGAATGCAGCCA AACTAGATCCTGATGATGTATGTTCTACTTGGCA GCAGCAATGCAGTTCTTTGAGGGGACGTGTCCGGA AGACTGGACCAGCTATGGAATCTTGATTGCACGAA AAGGAGACAAGATCACCCCGGATTCCTGGTGGGA AATAAAGCGTACTGATGTAGAAGGAAATTGGGCT CTGACAGGAGGCATGGAAGTACAAAGGACCCCA CTGTCTCTGAACATGCGTCTTTAGTCGGTCTTCTCT TGAGTCTGTATAGGTTGAGCAAAATATCAGGACA AAACACTGGTAACTATAAAACAAACATCGCAGAT AGGATAGAGCAGATATTCGAGACCGCCCCTTTTGT TAAAATCGTGGAACACCATACTCTAATGACAACATC ACAAAATGTGTGC
3*	КРС	Рудакин ский	Результат не получен
4	КРС	г. Рогун	TGTATTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCTCTTTGA AGCCCGAGATTATCGTGGATCAATATGAGTACAA GTACCCTGCTATCAAAGATTTGAAAAAGCCTTGTA TAACCCTAGGGAAAGCCCCTGACTTAAACAAAGC ATACAAGTCTGTATTGTCAGGCATGAATGCAGCCA AACTAGATCCTGATGATGTATGTTCTACTTGGCA GCAGCAATGCAGTTCTTTGAGGGGACGTGTCCGGA AGACTGGACCAGCTATGGAATCTTGATTGCACGAA AAGGAGACAAGATCACCCCGGATTCCTGGTGGGA AATAAAGCGTACTGATGTAGAAGGAAATTGGGCT CTGACAGGAGGTATGGAAGTACAAAGGACCCCA CTGTCTCTGAACATGCGTCTTTAGTCGGTCTTCTCT TGAGTCTGTATAGGTTGAGCAAAATATCAGGACA AAACACTGGTAACTATAAAACAAACATCGCAGAT AGGATAGAGCAGATATTCGAGACCGCCCCTTTTGT TAAAATCGTGGAACACCATACTCTAATGACAACATC
5	КРС	Варзобс кий	TGTATTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCTCTTTGA AGCCCGAGATTATCGTGGATCAATATGAGTACAA GTACCCTGCTATCAAAGATTTGAAAAAGCCTTGTA TAACCCTAGGGAAAGCTCCTGACTTAAACAAAGC ATACAAGTCTGTATTGTCAGGCATGAATGCAGCCA AACTAGATCCTGATGATGTATGTTCTACTTGGCA GCAGCAATGCAGTTCTTTGAGGGGACGTGTCCGGA AGACTGGACCAGCTATGGAATCTTGATTGCACGAA AAGGAGACAAGATCACCCCGGATTCCTGGTGGGA AATAAAGCGTACTGATGTAGAAGGAAATTGGGCT CTGACAGGAGGCATGGAAGTACAAAGGACCCCA

			CTGTCTCTGAACATGCGTCTTTAGTCGGTCTTCTCT TGAGTCTGTATAGGTTGAGCAAAATATCAGGACA AAACACTGGTAACTATAAAACAAACATCGCAGAT AGGATAGAGCAGATATTCGAGACCGCCCCTTTTGT TAAAATCGTGGAACACCATACTCTAATGACAACCTC
6	КРС	г. Рогун	TGTATTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCTCTTTGA AGCCCGAGATTATCGTGGATCAATATGAGTACAA GTACCCTGCTATCAAAGATTTGAAAAAGCCTTGTA TAACCCTAGGGAAAGCCCCTGACTTAAACAAAGC ATACAAGTCTGTATTGTCAGGCATGAATGCAGCCA AACTAGATCCTGATGATGTATGTTCCCTACTTGGCA GCAGCAATGCAGTTCTTTGAGGGGACGTGTCCGGA AGACTGGACCAGCTATGGAATCTTGATTGCACGAA AAGGAGACAAGATCACCCCGGATTCCTGGTGGGA AATAAAGCGTACTGATGTAGAAGGAAATTGGGCT CTGACAGGAGGTATGGAACCTGACAAGGGACCCCA CTGTCTCTGAACATGCGTCTTTAGTCGGTCTTCTCT TGAGTCTGTATAGGTTGAGCAAAATATCAGGACA AAACACTGGTAACTATAAA
7	КРС	г. Душан бе	TGTATTCAAAGTCAATAATCAGGTGGTCTCTTTGA AGCCCGAGATTATCGTGGATCAATATGAGTACAA GTACCCTGCTATCAAAGATTTGAAAAAGCCTTGTA TAACCCTAGGGAAAGCTCCTGACTTAAACAAAGC ATACAAGTCTGTATTGTCAGGCATGAATGCAGCCA AACTAGATCCTGATGATGTATGTTCCCTACTTGGCA GCAGCAATGCAGTTCTTTGAGGGGACGTGTCCGGA AGACTGGACCAGCTATGGAATCTTGATTGCACGAA AAGGAGACAAGATCACCCCGGATTCCTGGTGGGA AATAAAGCGTACTGATGTAGAAGGAAATTGGGCT CTGACAGGAGGCATGGAACCTGACAAGGGACCCCA CTGTCTCTGAACATGCGTCTTTAGTCGGTCTTCTCT TGAGTCTGTATAGGTTGAGCAAAATATCAGGACA AAACACTGGTAACTATAAA

*– в образце № 3 не удалось получить первичную структуру фрагмента гена N

На основании полученных данных были построены филогенетические дендрограммы и проведен филогенетический анализ (рисунок 45). Помимо ранее указанных, при исследовании участка гена G референтных штаммов, в анализ были включены изоляты из Республики Бурятия, Китая, Московской области и Украины.

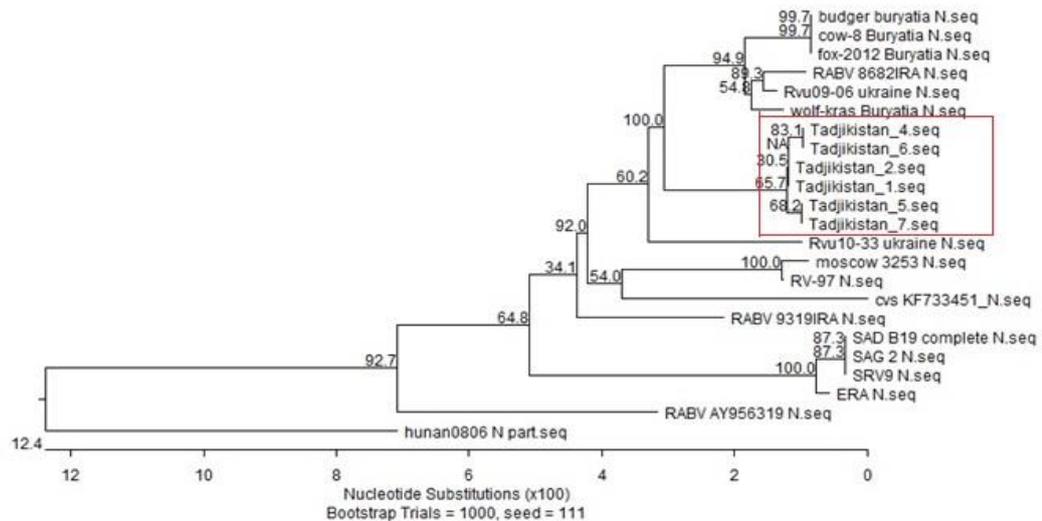


Рисунок 45 – Филогенетическая дендрограмма, полученная на основании данных о первичной структуре фрагмента гена N полевых изолятов из Республики Таджикистана. Рамкой обозначены исследуемые изоляты.

Данные рисунка 45 свидетельствуют, что изоляты вирусов бешенства из Таджикистана образуют отдельный кластер и филогенетически близки к украинским изолятам, изолятам из Бурятии и изоляту 8682IRA.

На рисунке 46 показаны отличия в последовательностях аминокислот между полевыми изолятами и референтными штаммами. Выявлено, что между собой исследуемые изоляты отличаются двумя нуклеотидными заменами, которые не привели к заменам аминокислот – в позициях 138 (№ 5 и 7) и 375 (№ 4 и 6). В обоих случаях произошла замена цитозина на тимин. С изолятом 8682IRA наблюдается примерно 4% отличий по аминокислотному составу: исследуемые изоляты и 8682IRA отличаются в позиции 101 заменой аспарагина на аспарагиновую кислоту. При сравнении с другими референтными штаммами и изолятами также выявлены отличия в последовательностях аминокислот. Интересно, что при сравнении с 9319IRA выявлено примерно 5,3% нуклеотидных отличий и ни одного в последовательности аминокислот.

10 20 30 40 50

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

RABV 8682IRA MDADKIVFKVNNQVVSLKPEIIVDQY EYKYP AIKDLKKPCITL GKAPDLN

'9319IRA_n.seq' -----X.....

'ERA_N.seq' -----X.....H.....

'RABV_AY956319_N.seq' -----X.....S.....

'RV-97_N.seq' -----X.....

'Rvu09-06_ukraine_N.seq' -----X.....

'Rvu10-33_ukraine_N.seq' -----X.....

'SAD_B19_complete_N.seq' -----X.....

'SAG_2_N.seq' -----X.....

'SRV9_N.seq' -----X.....

'Tadjikistan_1.seq' -----X.....

'Tadjikistan_2.seq' -----X.....

'Tadjikistan_4.seq' -----X.....

'Tadjikistan_5.seq' -----X.....

'Tadjikistan_6.seq' -----X.....

'Tadjikistan_7.seq' -----X.....

'budger_buryatia_N.seq' -----X.....

'cow-8_Buryatia_N.seq' -----X.....

'cvs_KF733451_N.seq' -----X.....

'fox-2012_Buryatia_N.seq' -----X.....

'hunan0806_N_part.seq' -----X.....S.S.....

'moscow_3253_N.seq' -----X.....

'wolf-kras_Buryatia_N.seq' -----X.....

60 70 80 90 100

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

RABV 8682IRA KAYKSVLSCGMNAAKLDPDDVCSYLA AAMQFFEGT CPE DWTSYGIL IARKG

'9319IRA_n.seq'

'ERA_N.seq'S.....V.....

'RABV_AY956319_N.seq'L.....

'RV-97_N.seq'

'Rvu09-06_ukraine_N.seq'

'Rvu10-33_ukraine_N.seq'S.....

'SAD_B19_complete_N.seq'S...N.....V.....

'SAG_2_N.seq'S...N.....V.....

'SRV9_N.seq'S...N.....V.....

'Tadjikistan_1.seq'

'Tadjikistan_2.seq'

'Tadjikistan_4.seq'

'Tadjikistan_5.seq'

'Tadjikistan_6.seq'

'Tadjikistan_7.seq'

'budger_buryatia_N.seq'I.....

'cow-8_Buryatia_N.seq'I.....

'cvs_KF733451_N.seq'

'fox-2012_Buryatia_N.seq'I.....
 'hunan0806_N_part.seq'
 'moscow_3253_N.seq'
 'wolf-kras_Buryatia_N.seq'I.....

110 120 130 140 150

....|....|....|....|....|....|....|....|....|

RABV_8682IRA NKITPDSLVEIKRTDVEGNWALTGGMELTRDPTVSEHASLVGLLLSLYRL
 '9319IRA_n.seq' D.....
 'ERA_N.seq' D...G.....P.....
 'RABV_AY956319_N.seq' D.....P.....
 'RV-97_N.seq' D...N.....P.....
 'Rvu09-06_ukraine_N.seq' T.....
 'Rvu10-33_ukraine_N.seq' D.....G.....
 'SAD_B19_complete_N.seq' D...G.....P.....
 'SAG_2_N.seq' D...G.....P.....
 'SRV9_N.seq' D...G.....P.....
 'Tadjikistan_1.seq' D.....
 'Tadjikistan_2.seq' D.....
 'Tadjikistan_4.seq' D.....
 'Tadjikistan_5.seq' D.....
 'Tadjikistan_6.seq' D.....
 'Tadjikistan_7.seq' D.....
 'budger_buryatia_N.seq'
 'cow-8_Buryatia_N.seq'
 'cvs_KF733451_N.seq' DR...N.....
 'fox-2012_Buryatia_N.seq'
 'hunan0806_N_part.seq' D.....
 'moscow_3253_N.seq' D...N.....P.....
 'wolf-kras_Buryatia_N.seq'

160 170 180 190 200

....|....|....|....|....|....|....|....|....|

RABV_8682IRA SKISGQNTGNKYKTNIAADRIEQIFETAPFVKIVEHHTLMTTHKMCANWSTI
 '9319IRA_n.seq'
 'ERA_N.seq'
 'RABV_AY956319_N.seq'
 'RV-97_N.seq'
 'Rvu09-06_ukraine_N.seq'
 'Rvu10-33_ukraine_N.seq'
 'SAD_B19_complete_N.seq'
 'SAG_2_N.seq'
 'SRV9_N.seq'
 'Tadjikistan_1.seq'
 'Tadjikistan_2.seq'
 'Tadjikistan_4.seq'
 'Tadjikistan_5.seq'

```
'Tadjikistan_6.seq' .....-----
'Tadjikistan_7.seq' .....-----
'budger_buryatia_N.seq' .....-----
'cow-8_Buryatia_N.seq' .....-----
'cvs_KF733451_N.seq' .....-----
'fox-2012_Buryatia_N.seq' .....-----
'hunan0806_N_part.seq' .....-----
'moscow_3253_N.seq' .....-----
'wolf-kras_Buryatia_N.seq' .....-----
```

**Рисунок 46 – Анализ фрагмента нуклеопротеина
полевых изолятов вируса бешенства из Республики Таджикистан**

На заключительном этапе работы был исследован ещё один изолят из Республики Таджикистан, выделенный в конце 2015 г. от волка в Ражском районе (обозначение в дендрограмме: *Tadjikistan_wolf*). Методами МФА и ОТ-ПЦР было установлено наличие в материале вируса бешенства. Полученный фрагмент гена G и N вируса бешенства секвенировали (Приложение 7) . Размер фрагмента гена G в результате секвенирования пробы составил 288 н.п., а фрагмента гена N – 562 н.п. (таблица 17).

**Таблица 17 – Последовательности нуклеотидов фрагмента гена G и N
вируса бешенства изолятов из Республики Таджикистан**

Участок генома	Последовательность фрагмента
Фрагмент гена G	GTTGGTGAATTTGCACGACTTTCGCTCGGATGAAATTGAGCA TCTTGTTGTAGAGGAGTTGGTCAAGAAAAGAGAGGAGTGTC TAGATGCACTAGAGTCCATCATGACCACCAAGTCAGTGAGT TTCAGACGTCTCAGTCATTTAAGAAAACCTTGTTCCCGGGTTT GGGAAAGCATATACCATATTCAACAAGACCTTGATGGAGGC TGATGCTCACTACAAGTCAGTCCGGAATGAGATCA TCCCCTCCAAGGGTGTTTGAAAGTTGGAGGAAGGTGCCA

Фрагмент гена N	TCAAGAATCAGGTGGTCTCTTTGAAGCCTGAGATTATCGTGG ATCAATATGAGTACAAGTACCCTGCTATCAAAGATTTGAAA AAGCCCAGTATAACCCTAGGGAAAGCCCCTGACTTGAACAA AGCATACAAGTCAGTTTTTGTGAGGCATGAATGCAGCCAAAC TAGATCCTGATGATGTATGTTCCCTACTTGGCAGCAGCAATGC AGTTCTTTGAGGGGACGTGTCCGGAAGACTGGACCAGCTAT GGAATCTGGATTGCGCGAAAAGGAGACAAGATCACCCCGGA TTCCTGGTGGAAATAAAGCGTACTGATGTAGAAGGAAATT GGGCTCTGACAGGAGGCATGGAAGTACAAAGGGACCCCACT GTCTCTGAACATGCGTCTTTGGTTGGTCTTCTCTTGAGTCTGT ATAGGTTGAGCAAAATATCAGGACAAAACACTGGCAACTAT AAAACAAACATCGCAGATAGGATAGAGCAGATATTCGAGAC CGCCCCTTTTGTAAAATCGTGGAACACCATACTCTAATGAC AACTCACAAAATGTGTGCGAATTG
-----------------	--

На рисунке 47 отражена филогенетическая дендрограмма, построенная на основании данных о первичной структуре гена N. В результате сравнения первичной структуры фрагмента нуклеопротеина данного образца с другими образцами региона выявлено примерно 10 отличий (1,8%) и 3 отличия в последовательности аминокислот (1,6%). При сравнении первичной структуры фрагмента гена гликопротеина с другими образцами региона выявлено 4 отличия (1,5%) и ни одного отличия в последовательности аминокислот. Полученные данные представляют интерес, поскольку известно, что ген N, кодирующий нуклеопротеин, более консервативный, и это используется для генотипирования лиссавирусов. В нашем случае было выявлено 3 замены в последовательности аминокислот фрагмента нуклеопротеина при сравнении исследуемого образца и других образцов региона. Фрагменты генов G и N, данного изолята, были добавлены в базу данных NCBI под регистрационными номерами KX346708 и KX346709.

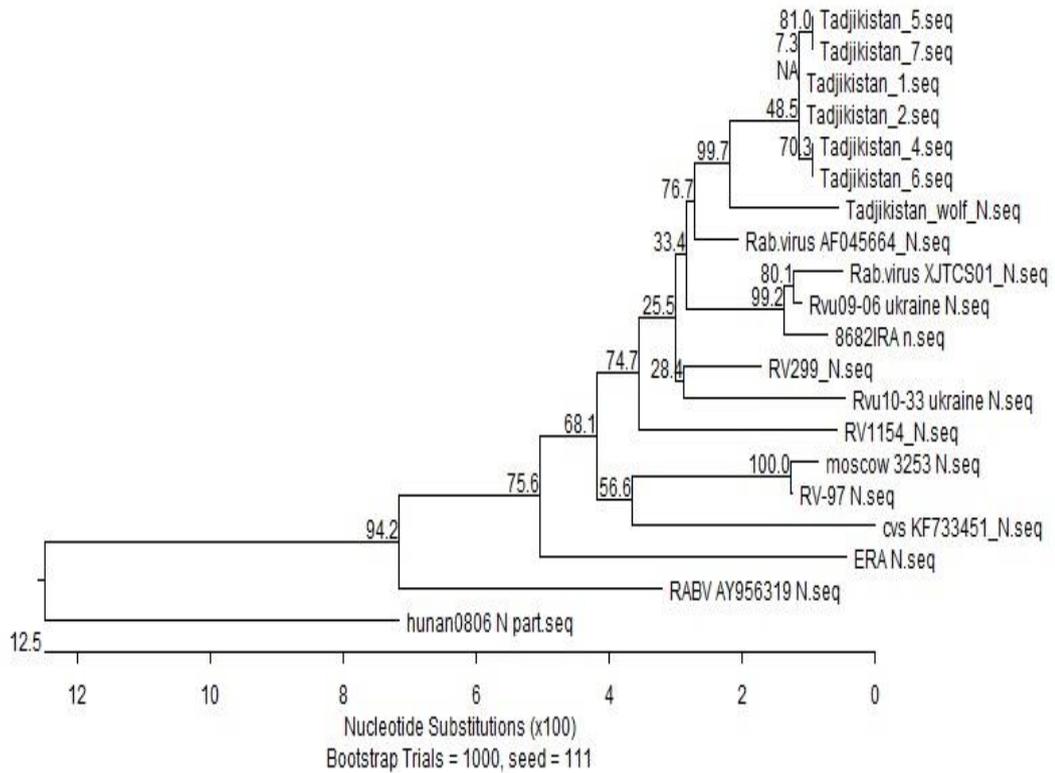


Рисунок 47 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании первичных структур фрагмента гена N, изолята вируса бешенства из Республики Таджикиста.

Выявлено, что исследуемый образец по первичной структуре фрагмента гена N очень близок филогенетически к изоляту *Rab.virus AF045664*, выделенному из мозга лисы (публикация в NCBI от 12.12.1998 г.), а также высокий уровень гомологии наблюдается в сравнении с изолятами *Rab.virus XJTCS01*, выделенного из мозга овцы в Китае, и изоляту из Украины (рисунок 48). Размер исследуемого фрагмента составил 453 нуклеотида (позиция в геноме 29-481), кодирующих 186 аминокислот (позиция 11-196).

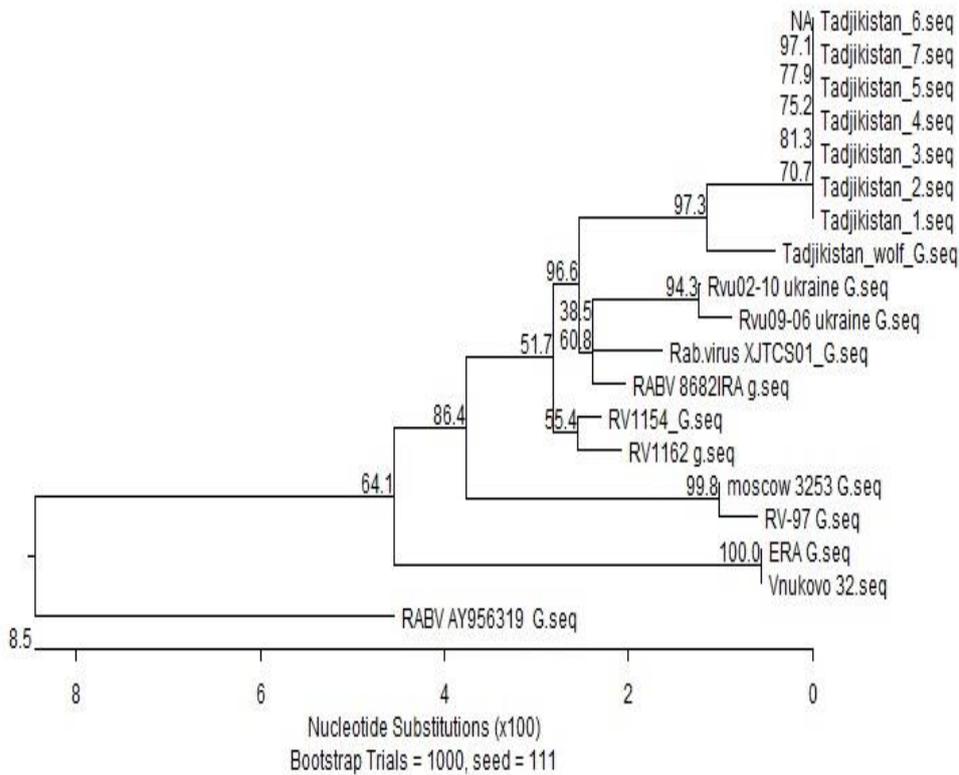


Рисунок 48 – Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании первичных структур фрагмента гена G, изолята вируса бешенства из Республики Таджикистан

По первичной структуре фрагмента гена G исследуемый образец филогенетически близок к изолятам из Украины, изоляту *Rab.virus XJTCS01* и *RABV8682IRA* (Иран). Отличие наблюдается в позиции 367, как и у других изолятов из Республики Таджикистан – вместо аргинина присутствует лизин. При сравнении последовательности аминокислот образца не выявлено ни одного отличия в сравнении с другими изолятами региона. Размер исследуемого фрагмента составил 270 нуклеотидов (позиция в гене 825-1095), кодирующих 90 аминокислот (позиция 278-367).

При сравнении первичных нуклеотидных последовательностей фрагмента генов G (270 н. п.) и N (453 н. п.) исследуемых изолятов вируса бешенства из Республики Таджикистан между собой нами не выявлено ни нуклеотидных, ни

аминокислотных отличий, за исключением изолята, выделенного от волка. При сравнении с референтными штаммами выявлено 10-16% отличий в последовательности нуклеотидов и примерно 6,7% в последовательности аминокислот.

Получены первичные нуклеотидные последовательности фрагментов генов N и G вируса бешенства, выделенного от волка в Республике Таджикистан. При исследовании изолята, выделенного от волка, показано, что при сравнении первичной структуры фрагмента гена N данного образца с другими образцами региона выявлено примерно 1,8%, а в последовательности аминокислот 1,6%. При сравнении первичной структуры фрагмента гена G с другими образцами региона выявлено 1,5% и ни одного отличия в последовательности аминокислот.

Анализ показал, что изоляты из Таджикистана образуют отдельный кластер и филогенетически близки к украинским изолятам, изолятам из Бурятии и иранскому изоляту 8681IRA. Кроме того, изолят полученный от волка, также филогенетически близок к изолятам из Китая, Ирана и Украины.

Представляет научный и практический интерес дальнейшее изучение молекулярно-генетических характеристик полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Республики Таджикистан, выделенных в различных районах, с целью изучения возможности изменения их молекулярной структуры в процессе движения эпизоотии.

Кировская область. Ранее в странах Европы и Канады от диких плотоядных были изолированы вирусы бешенства в ассоциации с ревертировавшим вакцинным штаммом. В 2012 г. в нашей стране стала выпускаться оральная вакцина Рабивак-0/333 из авирулентного штамма ERAG333, в связи, с чем представлял научно-практический интерес изучения первичной структуры геномов полевых изолятов штаммов вируса бешенства на территориях оральной вакцинации диких плотоядных.

Исследования проводили в двух направлениях, включающих:

– филогенетический анализ полевых изолятов, выделенных на территории Кировской области, в частности сравнение первичной структуры фрагментов

геномов этих изолятов, выделенных в других регионах страны, с референтными штаммами, представленными в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI);

– молекулярно-генетический анализ полевых изолятов лиссавирусов (Кировская область), полученных на территориях оральной вакцинации диких плотоядных с целью отслеживания появления мутаций, связанных с реверсией вакцинного штамма к вирулентному.

В исследованиях использовали 24 образца мозга диких плотоядных (23 лисицы и 1 енотовидная собака), представленные ветеринарной службой Кировской области. Использовали также приманку с вакциной Рабивак-0/333.

Из ткани мозга животных готовили мазки на предметных стеклах для исследования в МФА с использованием антирабического моноклонального ФИТЦ-иммуноглобулина фирмы «Fujirebio» (США) и набора антирабического флюоресцирующего иммуноглобулина, ГОСТ 26075-2013 (Всероссийский ВНИИТИ биологической промышленности). Окрашенные препараты микроскопировали.

РНК выделяли из 200 мкл 10% суспензии мозга и использованием коммерческого препарата TR^R Reagent («Sigma Aldrich») по методике производителя и ресуспендировали в 30-50 мкл деонизированной воды при 55°C, периодически перемешивая пипетированием. РНК (5 ккл) использовали для обратной транскрипции и получения кДНК.

В ОТ-ПЦР для обратной транскрипции и получения кДНК использовали M-LV reverse transcriptase («Fermentas», Литва) и 5 мкл РНК. Реакционная смесь (20 мкл) для ПЦР содержала 16 mM Tris HCl, pH 7,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1% Trion X-100, 10 nM каждого праймера, 2,5mM dNTPs, 2 ед. Tag-полимеразы. В смесь вносили 5 мкл кДНК. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР и секвенирования участка гена N заимствовали из работы Heaton et al. (1977).

Образцы очищали от агарозного геля с помощью набора Silica Bead DNA Gel Extration Kit («Fermentas», Литва) и секвенировали. Реакцию ставили на

амплификаторе Mastercycler Gradient («Eppendorf», Германия) с применением Big Dye[®] Terminator v. 3.1 Ready Reaction Kit («Applied Biosystems», США). Продукты амплификации пересаждали для последующего секвенирования с использованием автоматического секвенатора Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали пакет программ DNASTAR v. 3.12 («Lasergene Ins», США) и Bio Edit 7.0.1. (Ibis Biosciences, США).

На первом этапе результаты МФА показали содержание вируса бешенства во всех образцах. Результаты МФА были подтверждены в ОТ-ПЦР. ПЦР-продукты секвенировали и получали первичную структуру фрагментов генов N и G вируса бешенства. Полученные последовательности фрагментов генов N и G полевых изолятов вируса и вакцины сравнивали между собой с последовательностями изолятов из других регионов и с референтными штаммами, представленными в базе данных GeneBank NCBI, в результате чего были построены филогенетические дендрограммы (рисунки 49, 50).

При анализе филогенетической дендрограммы, полученной на основании фрагментов гена N, установлено, что полевые изоляты вируса, циркулирующие на территории Кировской области, образуют первую группу, состоящую из двух близких кластеров (рисунок 49).

Анализ фрагментов гена G показал, что «кировские» изоляты образуют две отдельные группы, разделенные изолятом, выделенном в 2011 г. в Липецке, а также «украинскими» изолятами (2006 и 2010 г.) (рисунок 50). «Брянские» изоляты вируса бешенства по данному участку генома не исследовали.

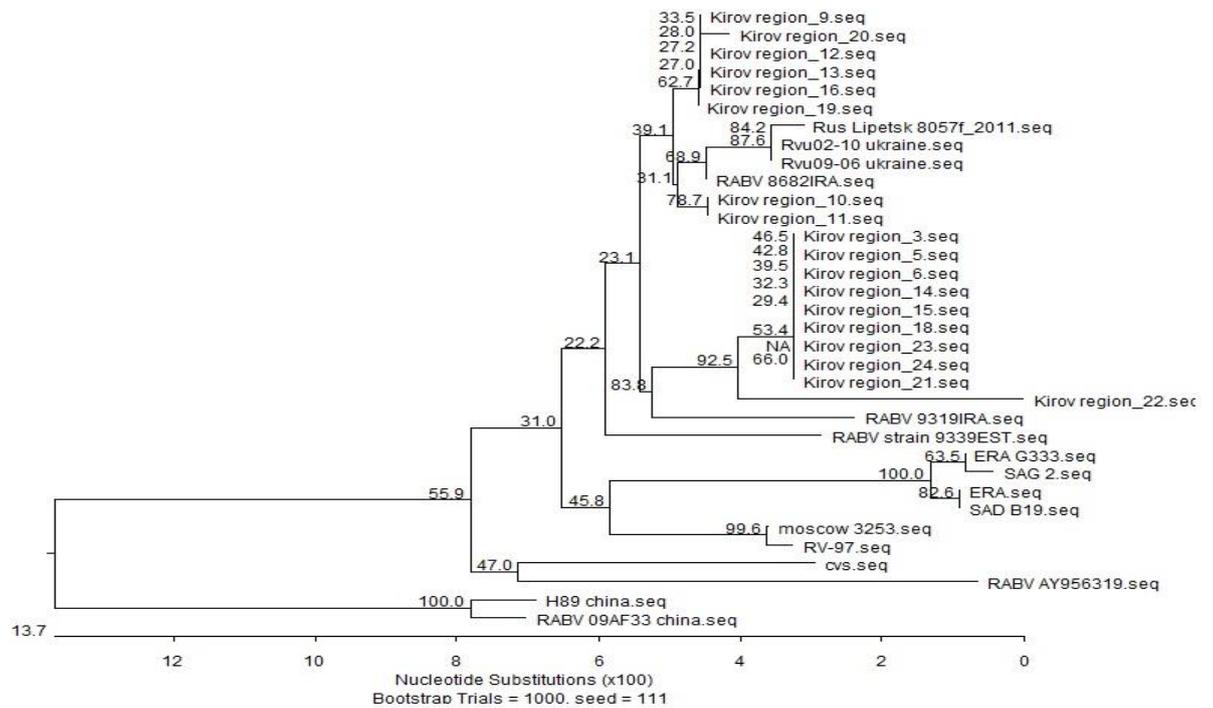


Рисунок 49 – Филогенетическая дендрограмма, полученная при сравнении фрагментов гена N исследуемых изолятов, вакцинного штамма ERA G333, других вакцинных штаммов и полевых изолятов, представленных в NCBI

На втором этапе провели мелекулярно-генетический анализ полевых изолятов из Кировской области, полученных после оральной вакцинации для отслеживания появления маркерных мутаций, с реверсией вакцинного штамма в исходный вирулентный.

Исследуемый участок гена N составил 270 нуклеотидов, кодирующих 90 аминокислот (аминокислотные остатки – а.о.). При сравнении фрагмента гена N полевых изолятов и штамма ERA G333 было выявлено 5 аминокислотных отличий на сравнительно коротком участке. Исследуемый участок гена G составил 235 нуклеотидов, кодирующих 78 аминокислот. При сравнении последовательностей гена G полевых изолятов и штамма ERA G333 в большинстве образцов было выявлено 4 аминокислотных отличия в пробах № 10 и 11 – по 2 идентичных замены.

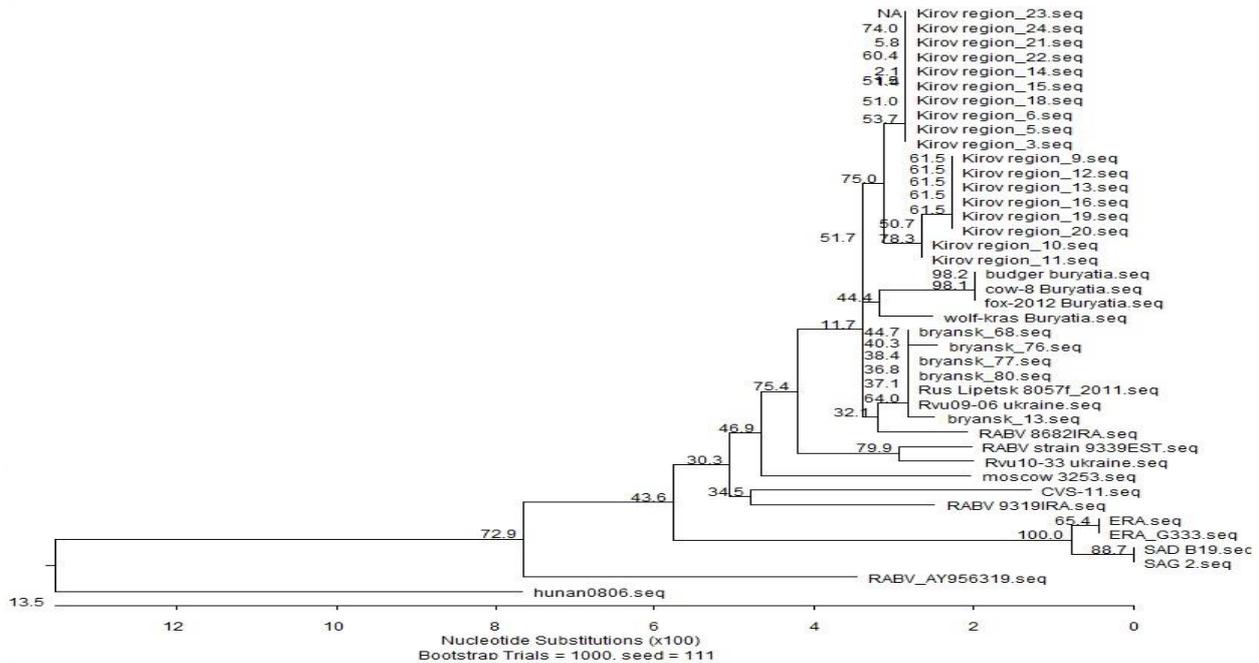


Рисунок 50 – Филогенетическая дендрограмма, полученная при сравнении фрагментов гена G исследуемых изолятов, вакцинного штамма ERAG333, других вакцинных штаммов и полевых изолятов, представленных в NCBI

По аминокислотному составу фрагмента гена N «кировские» изоляты оказались абсолютно идентичны изоляту RABV 86221RA (рисунок 51).

По аминокислотному составу фрагмента белка существует достаточно близкое свойство фрагмента белка N с изолятами из Бурятии и г. Брянска. Аминокислотная последовательность фрагмента белка G на заданном участке исследуемых изолятов близка к RABV AY956319 и к RABV 86221RA. Проба № 22 имеет 3 аминокислотных отличия от остальных образцов и указанных выше изолятов. Аминокислотная последовательность «кировских» изолятов подтверждает их филогенетическую близость к изолятам из Липецка и Украины. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов N и G «кировских» изолятов и вакцинного штамма ERAG333 достаточно далеко отстоят от таковых у полевых изолятов вируса бешенства.

	110	120	130	140	150															
RABV AY956319_N	DKIT	FD	SL	VEIK	RRTD	VE	GN	WALT	GG	MEL	TR	DP	TV	PE	HA	SL	VGL	LL	SL	YRL
'10'	N..	X-																		
'11'	N..	X-																		
'12'	N..	X-																		
'13_N'	N..	X-																		
'14_N'	N..	X-																		
'15_N'	N..	X-																		
'16_N'	N..	X-																		
'18_N'	N..	X-																		
'19_N'	N..	X-																		
'20_N.ab1'	N..	X-																		
'21_N'	N..	X-																		
'22_N'	N..	X-																		
'23_N'	N..	X-																		
'24_N'	N..	X-																		
'3.ab1'	N..	X-																		
'5_N'	N..	X-																		
'6_N'	N..	X-																		
'8682IRA_n.seq'	N..	X-																		
'9.ab1'	N..	X-																		
'9319IRA_n.seq'	..	X-																		
'CVS-11.seq'	.R.	X-																		
'ERA_G333_N'	..	X-																		
'ERA_N'	..	X-																		
'Rus Lipetsk_8057f_2011_N.seq'	T..	X-																		
'Rvu09-06_ukraine_N.seq'	T..	X-																		
'Rvu10-33_ukraine_N.seq'	..	X-																		
'SAD_B19_complete_N.seq'	..	X-																		
'SAG_2_N.seq'	..	X-																		
'bryansk_13.seq'	T..	X-																		
'bryansk_68.seq'	T..	X-																		
'bryansk_76.seq'	T..	X-																		
'bryansk_77.seq'	T..	X-																		
'bryansk_80.seq'	T..	X-																		
'budger_buryatia_N.seq'	N..	X-																		
'cow-8_Buryatia_N.seq'	N..	X-																		
'fox-2012_Buryatia_N.seq'	N..	X-																		
'hunan0806_N part.seq'	..	X-																		
'moscow_3253_N.seq'	..	X-																		
'strain_9339EST_n.seq'	..	X-																		
'wolf-kras_Buryatia_N.seq'	N..	X-																		

Рисунок 51 – Сравнение аминокислотных последовательностей фрагмента белка N изолятов из Кировской области с последовательностями референтных штаммов и полевых изолятов, представленных в NCBI

При сравнении со штаммом ERAG333, выделенным из вакцины, выявлены замены в последовательности аминокислот фрагментов генов N и G. Согласно нашим исследованиям, проведенным ранее, скорость мутирования составляет $1,4 \times 10^4$ замены в год. Это означает, что штамм, выделенный из вакцины, не является родоначальником вирусов, выделенных из исследованных проб полевых штаммов.

2.2.10 Методика расчета потребности биопрепаратов для специфической профилактики бешенства животных

Значительное сокращение бюджетного финансирования противоэпизоотических мероприятий не должно отражаться на ветеринарной и экологической безопасности, однако требует более строгого контроля за использованием выделяемых средств. Достижению этой цели служит научно-обоснованный расчет количества биопрепаратов, в том числе для специфической профилактики, необходимых для эффективного проведения противоэпизоотических мероприятий.

Потребность в биопрепаратах для проведения противоэпизоотических мероприятий при особо опасных и карантинных болезнях животных, в том числе при бешенстве, целесообразно определять с учетом половозрастной структуры стада по видам животных, в расчете на 100 голов и количества обработок, которые необходимо провести в течение календарного года в соответствии с нормативно-технической документацией.

На основе изложенного принципа определяют коэффициент головообработок (К) – количество коммерческих доз биопрепарата в расчете на одно животное соответствующего вида. С учетом стандартизированных зоотехнических показателей половозрастной структуры сельскохозяйственных и домашних животных в РФ и нормативов потерь биопрепаратов при транспортировке и проведении обработок, формулы расчета коэффициентов головообработок можно представить в следующем виде.

Крупный рогатый скот.

$$K = [A(x \cdot y) + B(x \cdot y) + C(x \cdot y) + D(x \cdot y) + E(x \cdot y)] : 100 + 15\%, \quad (1),$$

где А – число коров на 100 гол. в обороте стада = 60;

В – число нетелей на 100 гол. в обороте стада = 7,2;

С – число молодняка старше года на 100 гол. в обороте стада = 7,8;

- Д – число молодняка до года на 100 гол. в обороте стада = 25;
 Е – возможный приплод, гол. = 53,4;
 х – количество доз препарата на одну обработку;
 у – норматив количество обработок за год;
 15% – потери препарата при транспортировке и обработках.

Расчет возможного количества приплода (Е) проводится по формуле:

$$E = (A \cdot 77 : 100) + (B \cdot 100 : 100) = 46,2 + 7,2 = 53,4, \quad (2),$$

где, 77 – средний выход телят на 100 коров;

100 – выход телят на 100 нетелей.

Свиньи.

$$K = [A(x \cdot y) + B(x \cdot y) + C(x \cdot y) + D(x \cdot y) + E(x \cdot y)] + H(x \cdot y) : 100 + 15\%, \quad (3),$$

где, А – число хряков на 100 голов = 0,4

В – число основных маток на 100 голов = 4,0

С – число разовых проверяемых маток на 100 голов = 4,0

Д – число поросят до 4-х мес. возраста на 100 голов = 32,5

Н – число поросят откормочников на 100 голов = 59,1

Е – возможный приплод на 100 голов = 94,4

х – количество доз препарата на одну обработку;

у – норматив количества обработок в год;

15% – потери препарата при транспортировке и обработках.

Расчет возможного приплода свиней (Е) определяется по формуле:

$$E = (B + C) \cdot 1180 : 100 = 94,4 \quad (4),$$

где, 1180 – выход поросят на 100 свиноматок в год.

Мелкий рогатый скот

$$K = [A(x \cdot y) + B(x \cdot y) + C(x \cdot y) + D(x \cdot y) + E(x \cdot y)] : 100 + 15\%, \quad (5),$$

где, А – число баранов-производителей на 100 голов = 0,4
 В – число овцематок на 100 голов = 65,0
 С – число переярок на 100 голов = 11,0
 Д – число ягнят в возрасте до 1 года на 100 голов = 23,6
 Е – возможный приплод на 100 голов = 53,95
 х – количество доз препарата на одну обработку;
 у – норматив количество обработок за год;
 15% – потери препарата при транспортировке и обработках.

Расчет возможного приплода овец (Е) определяется по формуле:

$$E = B \cdot 83 : 100 = 53,95 + 15\%, \quad (6),$$

где, 83 – выход ягнят на 100 овцематок.
 15% – потери препарата при транспортировке и обработках

Лошади, верблюды, олени, пушные звери, собаки, кошки, птицы.

$$K = A(x \cdot y) : 100 + 15\%, \quad (7),$$

где, А – число подлежащих обработке животных;
 х – количество доз препарата на одну обработку;
 у – норматив количество обработок за год;
 15% – потери препарата при транспортировке и обработках.

Расчеты по приведенным формулам позволяют определить коэффициенты головообработок в год при иммунизации против бешенства разных видов

животных. Так, при вынужденной вакцинации крупного рогатого скота на одну голову требуется 3,54 дозы вакцины, мелкого рогатого скота – 3,54.

Для профилактической иммунизации пушных зверей и собак необходимо планирование расхода вакцины в количестве 1,15 доз, кошек – 0,56.

Умножением планируемого восприимчивого к вакцинации против бешенства поголовья животных по видам на коэффициенты головообработок устанавливается необходимый общий расход вакцин.

Исходя из результатов исследований, разработаны «Методические рекомендации по расчету годовой потребности в биопрепаратах для проведения профилактических и противозoonотических мероприятий в хозяйствах всех форм собственности» (Приложение 6).

2.3 Контроль уровня антирабических антител у вакцинированных животных

2.3.1 Тест-система на основе гликопротеина вируса бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ) методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА)

Целью исследований явилась разработка иммуноферментной тест-системы, имеющей в качестве антигена гликопротеин вируса бешенства для контроля напряжённости иммунитета животных, вакцинированных против бешенства, и проведение сравнительного анализа её эффективности с эффективностью реакцией вирусной нейтрализации (РН).

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили в непрямом формате, реакцию вирус-нейтрализации (РН) – по методике Р. Atanasiu (1973). Для приготовления конъюгата с пероксидазой хрена использованы диагностические антитела против иммуноглобулинов животных, стафилококковый протеин А,

(НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН). Использовались также антитела из сывороток крови кролика против иммуноглобулинов (Ig) собак и лисиц, меченные пероксидазой (ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань). Исследования проводили с использованием производственного штамма «Овечий» ГНКИ и стандартного вируса бешенства (штамм CVS).

Получение антивидовых пероксидазных конъюгатов. В качестве доноров сывороток крови использовали кроликов живой массой 2,8-3 кг, в качестве антигенов – очищенные иммуноглобулины из сывороток крови собак и лисиц. На первом этапе гипериммунизации в плантарную поверхность задних лап кролика вводили по 0,2-0,3 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Через 7 сут. в увеличенные подколенные лимфатические узлы вводили смесь 0,5 мл ПАФ и антигена. Спустя 21 день подкожно в область спины вводили смесь ПАФ и двойную концентрацию антигена. Через 1 месяц кроликам внутривенно вводили по 0,5 мл раствора антигена. Через 24 часа манипуляцию повторяли при удвоенной концентрации антигена.

Взятие проб крови проводили через 14 дней. Из полученных сывороток выделяли иммуноглобулин при помощи переосаждения насыщенным раствором сульфата аммония, определяли концентрацию белка, фракцию выделяли IgG, которую конъюгировали с пероксидазой хрена.

Преципитацию иммуноглобулинов насыщенным раствором сульфата аммония проводили по методике Kaplan M., Korowski H. (1975) в авторской модификации. При этом 8 мл сыворотки разбавляли в два раза физиологическим раствором (pH=7,4) и смешивали с 8 мл насыщенного раствора сульфата аммония при постоянном помешивании, после чего инкубировали при + 4°C в течение 18 ч. Белковую фракцию осаждали центрифугированием при 2000 g в течение 15 мин., и дважды отмывали насыщенным раствором сульфата аммония. Осадок растворяли в объеме 50% от исходного, т.е. в 4 мл физиологического раствора (pH=7,4) и подвергали диализу против 0,01 М ФБР, pH 7,4. Концентрацию белка (К) определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм по формуле Schreier M. et al. (1980):

$$K = (A_{280} \times \text{разведение пробы}):1,4 \quad (1),$$

Где A_{280} – оптическая плотность раствора при длине волны 280 нм, измеренная на спектрофотометре.

Концентрация белка, рассчитанная по данной формуле, составила 35 мг/мл.

Глобулин класса G (Ig G) выделяли методом ионо-обменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой по методике Федорова Ю.Н. (1981). В качестве исходного материала для выделения иммуноглобулинов из сыворотки крови использовали гамма-глобулиновую фракцию, полученную методом осаждения сульфатом аммония. На колонку размером 2 x 35 см, уравновешенную 0,02 М ФБР, рН 7,4, наносили 3 мл гамма-глобулиновой фракции и элюировали со скоростью 0,5 мл/мин. Фракции Ig (по 3 мл) концентрировали ПЭГ 6000. Часть Ig сразу же использовали для конъюгации с пероксидазой хрена, оставшуюся часть хранили при -20°C или -80°C . Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при 280 нм. Для конъюгирования с пероксидазой брали препараты глобулинов с концентрацией белка 5 мг/мл.

Для конъюгации Ig использовали пероксидазу хрена с удельной активностью 600-900 ед/мг производства «Sigma», США. Конъюгацию проводили по методу P. Nakane et al. (1974) в модификации Дзантиева Б.Б. (1974), согласно которому к 5 мг пероксидазы хрена в 1 мл воды добавляли 0,2 мл 0,01М метапериодата натрия. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем ставили на диализ против 0,05 М ацетатного буфера, рН 4,4, на 24 часа. Буфер заменяли два раза. После окончания диализа, рН раствора доводили до 9,5, 0,2 М карбонатно-бикарбонатным буфером (КББ), после чего к раствору активированной пероксидазы добавляли (1:1) Ig в концентрации 10 мг/мл по белку в 1 мл 0,01 КББ, рН 9,5, смесь периодически перемешивали при комнатной температуре в течение 2-3 ч. Добавляли 5 мг боргидрита натрия, инкубировали в течение 2 часов при $+4^{\circ}\text{C}$. Раствор подвергали диализу при $+4^{\circ}\text{C}$ против 0,01 М ФБР, рН 7,4, в течение 24 часов.

После диализа раствор наносили на колонку (1,5 см х 90 см) с сефадексом G-100, уравновешенную 0,01 М ФБР, рН 7,4. Элюировали тем же буфером при 4°C, собирали фракции по 3 мл. Каждую фракцию исследовали на спектрофотометре СФ-16 ЛОМО (Россия) при длинах волн 280 нм и 403 нм. Соотношение спектрофотометрических показателей при 403 нм и 280 нм (RZ) должно быть не менее 0,5 (Nakane P.K. et al, 1974). Полученные антивидовые конъюгаты были активны в разведениях 1:100-1:400.

Во фракции с RZ равным или большим 0,5 (пиковые фракции), добавляли бычий сывороточный альбумин (БСА) до концентрации 10 мг/мл. Готовый конъюгат разливали по 0,1 мл и хранили при температуре -20°C или -80°C. Часть конъюгатов лиофилизировали и хранили при температуре 4°C.

Специфичность и активность антивидовых пероксидазных конъюгатов определяли при помощи шахматного титрования с использованием гомологичных и гетерологичных сывороток. В качестве гомологичных сывороток использовали смесь антирабических сывороток крови лисиц и смесь антирабических сывороток крови собак для оценки соответствующих конъюгатов. При этом гетерологичные сыворотки иммобилизовывали непосредственно на поверхность полистиролового планшета, тогда как отрицательную и положительную контрольные сыворотки наносили на иммобилизованный специфический антиген вируса бешенства.

Установлена высокая специфичность фракции Ig G сыворотки крови кролика против Ig G лисиц, т.к. она реагирует с контрольной положительной сывороткой и не реагирует с антителами гетерологичных сывороток крови животных (таблица 18), а также высокая специфичность фракции Ig G сыворотки крови кролика против Ig G собак, т.к. она реагирует с контрольной положительной сывороткой и не реагирует с антителами гетерологичной сыворотки крови лисиц.

Таблица 18 – Специфичность антивидовых иммуноглобулинов из сывороток крови кролика против Ig G лисиц и собак

Сыворотка	Против Ig G лисиц		Против Ig G собак	
	титр антител в ИФА	K _{сп}	титр антител в ИФА	K _{сп}
Контрольная положительная	1:1280	2,1	1:640	2,2
Контрольная отрицательная	–	–	–	–
Гетерологичные:				
– овец;	–	–	–	–
– крупного рогатого скота;	–	–	–	–
– собак	–	–	–	–

Получение гликопротеина вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ.

Гликопротеин вируса бешенства получали по методу D. Dietzschold (1996). Цельновирионный антиген возбудителя бешенства получали путем культивирования вируса бешенства в культуре клеток НГУК-1 с последующей очисткой и концентрированием с помощью ультрацентрифугирования при 25000 g на ультрацентрифуге Beckman (США). Для приготовления антигена вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, использовали культуральные вируссодержащие жидкости с инфекционными титрами не ниже 5,7 LD₅₀/0,03мл. Для частичной очистки и концентрирования вирусный антиген подвергали ультрацентрифугированию. Осадок ресуспендировали в NTE-буфере с pH 7,5. Вирус очищали в линейном градиенте плотности сахарозы (15-50%) в течение 120 мин. при 50000 g (ротор Ti-60, США) и температуре 4°C.

Наличие антигена вируса бешенства выявляли в сэндвич-варианте ИФА. Фракция, содержащая гликопротеин, располагалась в менее плотных фракциях градиента сахарозы. Методом электрофореза в 12,5%-ном ПААГ с ДС-натрия установлена молекулярная масса этой фракции, равная 67 кД.

Специфичность гликопротеиновой фракции была подтверждена методом иммуноблотинга. Таким образом, получен специфический антиген на основе гликопротеина вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, активность которого в ИФА составила 1:2560 ($K_{ср}=2,1$), концентрация белка – 338 мкг/мл.

В дальнейших исследованиях изучалась возможность применения гликопротеина вируса бешенства в качестве антигена для выявления специфических антител в сыворотках крови животных и людей, вакцинированных против бешенства с использованием ИФА. Предварительно провели эксперименты по оптимизации условий постановки непрямого варианта твердофазного ИФА для выявления антирабических антител. Это сделано для достижения максимальной точности и чувствительности анализа.

Оптимизация условий постановки ИФА. Подбор условий иммобилизации антигена осуществляли путем изменения рН, температуры и времени инкубации. Влияние кислотности буфера на иммобилизацию антигена изучали в диапазоне рН 7,2-10,0, используя 0,01 М фосфатный и карбонатно-бикарбонатный буферные растворы. В результате проведённых исследований оказалось, что максимальное связывание гликопротеина вируса бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ) с полистиролом отмечается при рН 9,6. Сдвиг этого показателя в ту или другую сторону приводил к уменьшению адсорбции антигена в лунках планшета. Установлено, что наиболее приемлемым является сенсibilизация планшетов специфическим антигеном в течение 3 ч при 37°C или 18 ч при 4°C в концентрации 5 мкг/мл на 0,01М карбонатно-бикарбонатном буфере, рН 9,6. Оптимальными условиями реакции являются: инкубация сывороток в течение 2 ч, а конъюгата – 1 ч при 37°C.

На основе гликопротеина рабического вируса опробована иммуноферментная тест-система, включающая:

- гликопротеин вируса бешенства из штамма «Овечий» ГНКИ;
- контрольные положительную и отрицательную сыворотки;
- белок А (или антивидовой глобулин), меченный пероксидазой;
- концентрат фосфатно-буферного раствора, рН 7,4, с твином (ФБР-Т);

- фосфатно-цитратный буферный раствор, рН 4,9 (ФЦБ);
- карбонатно-бикарбонатный буфер, рН 9,6 (КББ);
- орто-фенилендиамин (ОФД).

В дальнейшем проведены испытания опробованной нами иммуноферментной тест-системы с применением гликопротеина вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, при выявлении специфических антител в сыворотках крови животных, вакцинированных против бешенства для контроля их иммунного статуса.

Для проведения исследований использовали сыворотки крови от 5-ти лисиц и от 11 собак, вакцинированных против бешенства антирабической культуральной инактивированной вакциной «Рабивак» на основе штамма «Щелково-51»; вирус бешенства, штамм CVS; гипериммунные сыворотки крови от 10 овец, иммунизированных антигеном вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, а также 10 проб сывороток крови КРС, вакцинированных против бешенства вакциной «Рабиков» из штамма «Щелково-51», из неблагополучных по бешенству районов РТ. Результаты ИФА сопоставляли с результатами реакции нейтрализации на белых мышах. Сыворотки титровали в реакции нейтрализации с использованием вируса бешенства, штамм CVS в концентрации от 30 до 300 LD₅₀/ 0,03 мл.

Установлено, что титры антител в сыворотках крови овец и КРС, вакцинированных против бешенства (таблица 19) варьирует в ИФА от 1:800 до 1:6400 ($K \geq 2,1$). Прослеживается также прямая корреляция результатов ИФА и РН ($r=0,9$). При этом по чувствительности и скорости получения результатов ИФА (6-7 ч) превосходит РН на мышах (14 сут.).

Таблица 19 – Титры сывороток крови иммунизированных овец и крупного рогатого скота в непрямом твердофазном ИФА и реакции нейтрализации

Группа иммунизированных животных	Титр антител в РН	Титр антител в ИФА	К _{сп}
Овцы, антиген вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ	202,0	1:800	2,1
	206,4	1:800	2,1
	208,6	1:800	2,2
	214,0	1:800	2,3
	219,0	1:1600	2,1
	229,0	1:1600	2,3
	278,6	1:3200	2,1
	294,8	1:3200	2,1
	368,4	1:3200	2,3
	397,4	1:3200	2,2
Крупный рогатый скот, антирабическая вакцина «Рабикан» из штамма «Щелково-51»	204,0	1:800	2,2
	215,6	1:800	2,1
	217,0	1:800	2,1
	224,0	1:1600	2,2
	226,4	1:1600	2,1
	237,0	1:1600	2,2
	301,0	1:3200	2,1
	307,2	1:3200	2,2
	473,0	1:6400	2,1
	575,4	1:6400	2,3

Результаты титрования сывороток крови собак, вакцинированных вакциной «Рабикан» из штамма «Щелково-51» с использованием антивидовых антител кролика против Ig собаки (производства ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Казань) представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Результаты анализа сывороток крови собак, вакцинированных против бешенства, методом непрямого твердофазного ИФА

Кличка собаки	Срок исследования после вакцинации, мес.	Метод исследования		
		ИФА		РН
		титр антител	$K_{сп}$	
Гамма	1	1:320	2,1	93,6
Гарда	3	1:640	2,2	134,0
Гамма	3	1:640	2,3	145,2
Танго	7	1:1280	2,1	219,5
Нео	8	1:1280	2,3	224,0
Лора	9	1:160	2,1	34,2
Найс	10	1:160	2,0	33,3
Актиния	12	1:80	2,0	14,3
Инглер	19	1:320	2,5	97,4
Готика	не вакцин.	–	–	–
Виза	не вакцин.	–	–	–
Гетерологичные сыворотки:				
– лисицы	–	–	–	
– КРС	–	–	–	
– овцы	–	–	–	

Исходя из результатов, представленных в таблице 20, высокое содержание антител в сыворотках крови собак, иммунизированных против бешенства, наблюдалось на всех сроках исследования. Через 30 дней после вакцинации титр антител по методу ИФА составил 1:320, через 3 мес. – 1:640; максимальный титр антител наблюдался к 7-8 месяцев после вакцинации и составил 1:1280 ($K_{сп} > 2,1$). К 10-му месяцу отмечено снижение титра антител до 1:80. Результаты ИФА коррелируют с данными реакции нейтрализации. Из данных таблицы 20 следует также, что антитела кролика против Ig собаки, меченные пероксидазой, не реагируют с антителами крупного рогатого скота, овец и лисиц, что свидетельствует об их специфичности. Результаты титрования сывороток крови лисиц, вакцинированных против бешенства антирабической вакциной «Рабикан» из штамма «Щелково-51» в непрямом твердофазном ИФА с использованием

Антивидовые пероксидазные конъюгаты (антитела кролика, против Ig лисицы и собаки) обладают высокой специфичностью, так как реагируют с антителами контрольных положительных и не реагируют с антителами гетерологичных и отрицательных сывороток. Комиссионное испытание разработанной иммуноферментной тест-системы подтвердило ее эффективность в опытах на животных. На основе результатов исследований разработана «Инструкция по применению иммуноферментной тест-системы для определения уровня антирабических антител в сыворотках крови вакцинированных против бешенства методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА)» (Приложение 8).

2.3.2 Тест-система на основе блок-иммуноферментного анализа (блок-ИФА)

Практический интерес представляет расширение возможностей применения ИФА для определения антирабических антител в сыворотках крови животных, вакцинированных против бешенства, с использованием принципа подавления титров специфического антигена сывороточными антителами исследуемых сывороток в блок-сэндвич-варианте ИФА. При этом использовали антирабический глобулин и антирабический пероксидазный конъюгат, входящий в «Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом ИФА» (Россельхознадзор, 2008).

Для проведения конкурентного твердофазного ИФА использовали компоненты иммуноферментной тест-системы, включающие: специфический антиген вируса бешенства; антирабический глобулин, антирабический пероксидазный конъюгат; контрольные положительную и отрицательную сыворотки; концентрат фосфатно-буферного раствора с твином (рН 7,4); карбонатно-бикарбонатный буфер (рН 9,6); фосфатно-цитратный буферный раствор (рН 4,9); ортофенилендиамин.

Гликопротеин вируса бешенства из штамма «Овечий» ГНКИ, а также из стандартного штамма CVS вируса бешенства были использованы в качестве специфических антигенов. В опыте использовали в качестве исследуемого материала сыворотки крови от пяти лисиц, семи собак и двух кошек, иммунизированных против бешенства антирабической культуральной инактивированной вакциной «Рабикан» из штамма «Щелково-51»; гипериммунные сыворотки крови пяти овец, иммунизированных антигеном вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, шесть проб сывороток крови КРС, вакцинированных антирабической культуральной вакциной «Рабикон» из штамма «Щелково-51», доставленных из неблагополучных по бешенству регионов РТ а также 34 пробы сывороток крови от плотоядных животных, охарактеризованных в РН в культуре клеток в ФГУ «ВГНКИ» по стандартам МЭБ.

Результаты ИФА были сопоставлены с результатами РН на белых мышах и в культуре клеток. Сыворотки титровали в РН с использованием вируса бешенства, штамм CVS, в дозах от 30 до 300LD₅₀/0,03 мл. В качестве контрольной положительной сыворотки использовали отраслевую стандартную антирабическую референтную сыворотку ВГНКИ (серия NCA с активностью 20 МЕ/мл), а также антирабические сыворотки животных, охарактеризованных в РН. В качестве отрицательных контрольных использовали сыворотки крови собак, кошек, лисиц, КРС и овец, не иммунизированных против бешенства.

Дополнительно сравнивали эффективность разных вариантов проведения блок-ИФА: последовательного и одновременного внесения и инкубации специфического антигена и исследуемых сывороток на планшете, сенсibilизированном антирабическим глобулином. В ходе эксперимента определяли коэффициент ингибирования ($K_{инг.}$) связывания конъюгата сывороточными антителами по формуле:

$$K_{инг.} = (OD_{492} K^- - OD_{492} S) : (OD_{492} K^- - OD_{492} K^+) \cdot 100\% ; \quad (1),$$

где $OD_{492} K^-$ – оптическая плотность контрольной отрицательной сыворотки;

$OD_{492}K^+$ – оптическая плотность контрольной положительной сыворотки;

$OD_{492}S$ – оптическая плотность исследуемой сыворотки.

Пробу считали положительной при $K_{инг.}$ более 50% и отрицательной, если величина $K_{инг.}$ составляла менее 50%.

При титровании сыворотки $K_{инг.}$ вычисляли по формуле:

$$K_{инг.} = OD_{492}K^+ : OD_{492}S \quad (2)$$

За титр сыворотки принимали максимальное ее разведение, при котором $K_{инг.}$ равен или превышает 2,0. Пробу считали положительной, если $K_{инг.}$ был равен или составлял более 2,0.

Результаты исследования сывороток крови животных разных видов в РН на белых мышах и в блок-ИФА при последовательном внесении гликопротеина вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ и исследуемых сывороток крови животных, иммунизированных против бешенства представлены в таблице 22. Данные таблицы свидетельствуют о возможности определения уровня антител в сыворотках крови собак, кошек, лисиц, КРС и овец, вакцинированных против бешенства, в блок-ИФА с применением антирабического глобулина и антирабического пероксидазного конъюгата при последовательном внесении и инкубации гликопротеина вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ и исследуемых сывороток.

Титры антител в исследуемых сыворотках варьирует в ИФА от 1:20 до 1:6400 ($K_{инг.} \geq 2,1$). Установлена высокая прямая корреляция результатов блок-ИФА и реакции нейтрализации на белых мышах (коэффициент корреляции $r=0,9$). Вместе с тем, по чувствительности и скорости получения результатов ИФА (7-8 час.) превосходит реакцию нейтрализации на мышах (14 суток).

Из данных, приведённых в таблице 22, следует также, что антирабический пероксидазный конъюгат не реагирует с антителами сывороток крови животных, не иммунизированных против бешенства, что свидетельствует о его высокой специфичности.

Таблица 22 – Результаты исследования сывороток крови животных, иммунизированных против бешенства, методом блок-ИФА

Группа вакцинированных животных	Титр антител в блок-ИФА	K _{инг.}	Титр антител в РН на белых мышцах
Собаки. Вакцина «Рабикан» из шт. «Щелково-51»	1:160	2,9	14,3
	1:320	2,7	34,2
	1:320	2,8	33,3
	1:640	2,8	93,6
	1:1280	2,6	134,0
	1:1280	2,9	219,5
Кошки. Вакцина «Рабикан» из шт. «Щелково-51»	1:160	2,5	12,3
	1:640	2,3	88,6
Лисицы. Вакцина «Рабикан» из шт. «Щелково-51»	1:20	2,1	н.и.
	1:20	2,0	н.и.
	1:40	2,2	н.и.
	1:40	2,3	н.и.
	1:160	2,1	н.и.
Крупный рогатый скот. Вакцина «Рабикан» из штамма «Щелково-51»	1:800	2,1	204,0
	1:800	2,2	215,6
	1:800	2,1	217,0
	1:1600	2,1	224,0
	1:1600	2,3	226,4
	1:1600	2,2	237,0
Овцы. Антиген вируса бешенства, штамма «Овечий» ГНКИ	1:1600	2,2	219,0
	1:1600	2,3	229,0
	1:3200	2,1	278,6
	1:3200	2,3	294,8
	1:3200	2,1	368,4
Референс-сыворотка «ВГНКИ» (контроль)	1:800	2,2	20 МЕ/мл
Гетерологичные сыворотки:			
– собаки	–	–	–
– кошки	–	–	–
– лисицы	–	–	–
– КРС	–	–	–
– овцы	–	–	–

Антирабический глобулин также не реагирует с сыворотками различных видов животных. После внесения соответствующих гомологичных антивидовых

конъюгатов реакция была отрицательной. Результаты титрования сывороток крови в блок-ИФА при последовательном внесении гликопротеина вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ и исследуемых сывороток плотоядных, иммунизированных против бешенства, а также в реакции нейтрализации в культуре клеток представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Результаты определения титров антирабических антител в сыворотках крови плотоядных животных методом блок-ИФА при последовательном внесении антигена и сывороток

Инв. № пробы	Титр антител в РН в КК, МЕ/мл	К _{инг} , % при разведении сывороток 1:10	К _{инг} при разведении сывороток 1:10
1887	23,93	80,9	3,0
1941	13,77	75,6	2,6
1908	0,66	46,6	отриц. - 1,6
1880	0,22	98,6	5,2
1877	0,22	75,2	2,6
1884	3,46	92,6	4,2
1882	2,62	98,4	5,2
1853	0,38	73,3	2,6
1933	18,15	102,3	6,2
1855	0,38	86,9	3,5
1906	2,62	90,6	3,8
1962	13,77	76,1	2,7
1844	0,09	71,2	2,4
1845	1,15	100,4	5,7
1924	6,01	100,0	5,6
1934	23,93	99,5	5,5
1860	1,51	96,7	5,0
1868	0,29	100,8	5,8
14	7,063	99,5	4,7
1907	1,51	99,4	5,5
1881	2,62	74,7	2,6
12	161,79	52,9	2,3
1947	0,38	81,7	3,0
1869	0,66	83,1	3,1
1890	6,01	82,9	3,1
1894	0,17	82,9	3,1
1949	10,45	71,4	2,4

1895	7,92	73,5	2,6
1856	0,17	73,8	2,5
1852	0,29	45,9	отриц. - 1,6
1858	1,99	66,5	2,2
1935	10,45	83,9	3,2
10	122,74	40,5	отриц. - 1,5
1939	18,15	80,8	2,9
1871	4,56	82,0	3,1

В качестве контрольной положительной сыворотки плотоядных использовали сыворотку №1924 с активностью в РН 6,01 МЕ, в разведении 1:10 активность ее составила 0,6 МЕ, соответственно, в качестве контрольной отрицательной – сыворотку крови собаки, не вакцинированной против бешенства.

Из данных таблицы 23 следует прямая корреляция результатов, полученных методом блок-ИФА с результатами в реакции нейтрализации в культуре клеток. Совпадение наблюдается по 31 сыворотке из 35 исследованных. Соответствие результатов блок-ИФА и РН составило 88,6%. Две несовпавшие сыворотки крови: № 10 (122,74 МЕ) и № 12 (161,79 МЕ), активные в реакции нейтрализации, оказались соответственно отрицательной и слабоположительной при исследовании в блок-ИФА, а 2 сыворотки - слабоположительные в РН: № 1908 (0,66МЕ) и № 1852 (0,29МЕ) показали отрицательный результат в блок-ИФА. Это составило 11,4% от всех исследованных сывороток.

Результаты исследования титров вирус-специфических антител в сыворотках крови плотоядных животных, иммунизированных против бешенства в блок-ИФА при одновременном внесении антигена вируса бешенства, штамм CVS и исследуемых сывороток, предварительно оттитрованных в реакции нейтрализации в культуре клеток, представлены в таблице 24.

Из данных таблицы 24 прослеживается прямая корреляция результатов исследований в блок-ИФА и в реакции нейтрализации в культуре клеток по 22 сывороткам из 25 исследованных, что составляет 88%. Три сыворотки: № 1887 (23,93 МЕ), № 1908 (0,66 МЕ) и № 1880 (0,22 МЕ), слабоположительные в РН,

показали отрицательный результат в блок-ИФА, что составило 12,0% от 25 исследованных сывороток.

Таблица 24 – Исследование сывороток крови плотоядных от животных в блок-ИФА при одновременном внесении исследуемых сывороток и антигена лиссавируса

Инв. № пробы	Титр антител, МЕ/мл	K _{инг} , % при разведении сывороток 1:10	Титр антител в ИФА; K _{инг}
1887	23,93	7,2	отриц.; 1,1
1941	13,77	103,5	1:80; 2,3
1908	0,66	40,0	отриц.; 1,4
1880	0,22	35,5	отриц.; 1,3
1877	0,22	96,0	1:5; 2,0
1882	2,62	69,6	1:5; 2,0
1853	0,38	55,1	1:20; 2,0
1933	18,15	115,1	1:320; 2,3
1855	0,38	55,1	1:20; 2,0
1924	6,01	100,0	1:40; 2,1
1934	23,93	98,8	1:40; 2,1
1860	1,51	102,8	1:40; 2,3
1868	0,29	48,3	1:40; 2,3
1907	1,51	51,1	отриц.; 1,5
1881	2,62	96,0	1:40; 2,2
12	161,79	76,3	1:80; 2,0
1947	0,38	56,5	1:5; 2,0
1869	0,66	96,0	1:40; 2,2
1894	0,17	76,3	1:80; 2,0
1949	10,45	56,5	1:40; 1,7
1895	7,92	62,3	1:5; 2,0
1935	10,45	114,7	1:80; 2,0
10	122,74	112,0	1:320; 3,2
1939	18,15	107,4	1:80; 2,0
1871	4,56	64,0	1:40; 2,0

Сравнительный анализ чувствительности метода блок-ИФА при последовательном и одновременном внесении рабического антигена, штамм CVS и исследуемых сывороток представлен в таблице 25, из которой видно, что

чувствительность блок-ИФА при последовательном внесении компонентов ИФА превосходит чувствительность блок-ИФА при одновременном их внесении и инкубации.

Таблица 25 – Чувствительность блок-ИФА при одновременном и последовательном внесении и инкубации антигена вируса бешенства и исследуемых сывороток

Инвентарный номер пробы	Титр антител в блок-ИФА при инкубации антигена вируса бешенства и сывороток			
	одновременно		последовательно	
	титр	$K_{инг}$	титр	$K_{инг}$
14	1:320	3,0	1:320	3,1
12	1:80	2,3	1:320	2,5
1941	1:320	2,2	1:320	3,5
ЛЗ	–	–	1:80	2,4
Референс-сыворотка «ВГНКИ»	1:320	2,4	1:2560	2,3
Контрольная отрицательная эмбриональная сыворотка плодов коров	–	–	–	–

Таким образом, установлена высокая специфичность иммуноферментной тест-системы с использованием в качестве специфического антигена гликопротеина вируса бешенства и стандартного вируса бешенства (штамм CVS) для определения уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках крови вакцинированных против бешенства разных видов животных – овец, крупного рогатого скота, собак, кошек и лисиц методом блок-ИФА.

Установлено, что результаты блок-ИФА коррелируют с данными реакции нейтрализации на белых мышах ($r=0,9$). При этом по чувствительности и скорости получения результатов ИФА (7-8 час.) превосходит РН на мышах (14 суток).

При исследовании тридцати пяти сывороток крови плотоядных животных, иммунизированных против бешенства, установлено соответствие результатов блок-ИФА с реакцией нейтрализации в культуре клеток, которая составила 88,0-88,6%.

Антирабический пероксидазный конъюгат и антирабический глобулин, которые реагировали со специфическими антигенами вируса бешенства и, не реагирующие с контрольными положительными и отрицательными сыворотками различных видов животных, свидетельствуют об их высокой специфичности.

Разработанный метод блок – ИФА представляет собой универсальный способ для определения специфических антител в сыворотках крови животных различных видов с помощью антирабического глобулина и антирабического пероксидазного конъюгата. При его использовании не требуется наличия антивидовых пероксидазных конъюгатов к каждому виду животного.

2.3.3 Результаты испытания тест-систем для контроля

эффективности вакцинации против бешенства животных разных видов

Разработанные иммуноферментные тест-системы для определения уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных различных видов, иммунизированных против бешенства, испытаны нами при проведении серологического контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства КРС, собак и лисиц в неблагополучных по бешенству хозяйствах всех форм собственности и лесных угодьях Смоленской области и РТ.

В качестве антивидового конъюгата применяли диагностические антитела против иммуноглобулинов быка, меченные пероксидазой (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи), и антитела кролика против иммуноглобулинов собак и лисиц, меченных пероксидазой (ФГУ ФЦТРБ-ВНИВИ).

Крупный рогатый скот. Сыворотки крови исследовали через 3 и 9 месяцев после вакцинации крупного рогатого скота вакциной антирабической инактивированной, жидкой культуральной из штамма «Щелково-51» Рабинов. В качестве контрольной положительной сыворотки применяли отраслевой стандартный образец антирабической референтной сыворотки ВГНКИ (серия NSA-03 с активностью 20 МЕ/мл).

Установлено, что специфические антитела к вирусу бешенства в сыворотках крови крупного рогатого скота (52 пробы) хозяйств РТ через 90 и 270 дней после иммунизации, проявляются в титрах от 1:400 до 1:6400 ($K_{сп}=2,1$ и более), что соответствует активности 10-20 МЕ/мл и более (таблицы 26, 27). Согласно Наземному кодексу (МЭБ), защитный титр антител от бешенства составляет 0,5 МЕ/мл. Следовательно, уровень антител в сыворотке крови обеспечивает защиту крупного рогатого скота от заболевания бешенством.

Таблица 26 – Эффективность специфической профилактики бешенства у крупного рогатого скота (через 3 мес. после иммунизации)

ООО «Уразаево Азнакаевского района»			ООО «Закирово» Азнакаевского района		
кличка, инв. №	титр антител в ИФА	Ксп	кличка, инв. №	титр антител в ИФА	Ксп
Мак	1:1600	2,8	104	1:400	2,2
Метеор	1:1600	2,5	26	1:400	2,2
Света	1:1600	2,7	51	1:800	2,4
Маркиза	1:1600	2,2	60	1:800	2,0
Настя	1:1600	2,1	47	1:800	2,0
Катерина	1:400	2,0	67	1:800	2,4
Луч	1:1600	2,8	14	1:1600	2,0
Липа	1:3200	2,0	69	1:800	2,0
Д. Роза	1:3200	2,1	45	1:400	2,0
126	1:6400	2,0	98	1:6400	2,1
Ольга	1:800	1,8	80	1:800	2,1
Малина	1:1600	2,5	2	1:400	2,0
087	1:1600	2,2	72	1:400	2,0
273	1:800	2,1	97	1:400	2,9
Жанна	1:3200	3,1	17	1:800	2,1
Тургай	1:400	2,6	91	1:800	2,0
Ч. Юля	1:800	2,3	68	1:400	2,6
Белоснежка	1:800	2,7	106	1:1600	2,0
Чернушка	1:400	2,1	7	1:800	2,0
Катюша	1:400	2,1	107	1:400	2,6
Вероника	1:800	2,2	61	1:800	2,1
235	1:800	2,4	1	1:800	2,3
Ч.Элла	1:800	2,0	12	1:1600	2,1
Юля	1:800	2,1	48	1:1600	2,1
Красуля	1:800	2,0	16	1:400	2,5
Референс-сыворотка	1:800	2,1	Референс-сыворотка	1:800	2,1

Таблица 27 – Эффективность специфической профилактики бешенства у крупного рогатого скота в ООО «Алтын-Саба» Республики Татарстан (через 9 мес. после иммунизации)

Инв. №	Титр антител в ИФА	К _{сп}
2021	1:1600	2,1
198	1:3200	2,1
69	1:800	2,1
373	1:800	2,1
493	1:3200	2,2
182	1:3200	2,1
109	1:3200	2,2
458	1:3200	2,2
60	1:800	2,1
238	1:3200	2,1
1009	1:3200	2,1
272	1:3200	2,2
214	1:6400	2,1
101	1:3200	2,2
1098	1:3200	2,2
213	1:6400	2,1
344	1:3200	2,1
491	1:1600	2,1
345	1:800	2,1
350	1:800	2,2
307	1:800	2,2
68	1:3200	2,2
147	1:3200	2,1
6	1:3200	2,1
21	1:3200	2,1
54	1:1600	2,1
176	1:1600	2,1
290	1:1600	2,1
433	1:1600	2,2
118	1:1600	2,1
Референс-сыворотка	1:1600	2,1

Кроме того, нами определен уровень антител в 25 пробах сывороток крови крупного рогатого скота из СПК «Заря» Вяземского района Смоленской области неблагополучного по бешенству через 180 дней после иммунизации. Установлено, что в этот срок исследований также обеспечивается полная защита

от бешенства животных этого вида, что подтверждается титрами антител в ИФА (таблица 28).

Таблица 28 – **Эффективность специфической профилактики бешенства у крупного рогатого скота (через 6 мес. после иммунизации)**

Животные	Титр антител в иммуноферментном анализе	K _{ср}
Березка	1:3200	2,2
Акация	1:3200	2,1
Золушка	1:3200	2,2
Вечера	1:3200	2,1
Принцесса	1:3200	2,1
Волга	1:3200	2,1
Апрелька	1:1600	2,1
Милка	1:1600	2,1
Галка	1:1600	2,1
Злата	1:1600	2,1
Венера	1:1600	2,2
Зоря	1:1600	2,2
Лилия	1:1600	2,1
Маруся	1:1600	2,1
Лаванда	1:1600	2,1
Вьюга	1:1600	2,0
Файна	1:1600	2,1
Зита	1:1600	2,2
Вакса	1:1600	2,2
Сирень	1:1600	2,1
Скалка	1:1600	2,1
Кукла	1:1600	2,1
Егоза	1:1600	2,2
Вишня	1:1600	2,2
Газель	1:1600	2,1
Референс-сыворотка	1:6400	2,1

Собаки. Для проведения исследований использовали 13 сывороток крови служебных собак учреждений собаководства г. Смоленска, иммунизированных культуральной антирабической инактивированной вакциной «Рабикан» из штамма «Щелково-51».

Установлен высокий уровень специфических антител к вирусу бешенства в сыворотках крови собак 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 (таблица 29). При этом активность контрольной референс-сыворотки ВГНКИ составляла 1:1280 в непрямом ИФА и 1:320 – в блок ИФА, и соответствовала 20 МЕ/мл.

Таблица 29 – Эффективность специфической профилактики бешенства у служебных собак г. Смоленска в различные сроки после иммунизации

Кличка животного	Срок после иммунизации, дней.	Титр антител			
		непрямом ИФА	К _{сп}	блок-ИФА	К _{св} , %
Катя, 4 года	90	1:320	2,0	1:20	57,3
Рада, 4 года	90	1:640	2,0	1:20	63,2
Босс, 7 лет	90	1:640	2,1	1:80	54,3
Цейс, 3 года	120	1:640	2,1	1:40	53,0
Сафа, 3 года	180	1:320	2,1	1:20	60,4
Рокси, 4 года	180	1:320	2,0	1:20	54,6
Бакс, 2 года	180	1:320	2,0	1:20	60,6
Граф, 4 года	180	1:320	2,1	1:20	74,6
Хелена, 3 года	180	1:320	2,0	1:20	56,2
Ричард, 5 лет	180	1:640	2,0	1:40	58,2
Дана, 2 года	180	1:1280	2,0	1:80	61,0
Даша, 5 лет	210	1:1280	2,0	1:160	60,0
Афелия, 2 года	330	1:320	2,0	1:40	84,6
Референс-сыворотка		1:1280	2,1	1:320	
Гетерологичная сыворотка лисицы		–	–	–	–

Согласно Наземному кодексу (МЭБ), защитный титр антител от бешенства составляет 0,5 МЕ/мл. Исходя из этого, уровень антител в пробах сывороток крови собак, взятых в разные сроки, в том числе через 330 дней после иммунизации, обеспечивает полную защиту животных от заражения бешенством. При этом чувствительность непрямого твердофазного ИФА выше показателя блок-ИФА.

Лисицы. При исследованиях, разработанная иммуноферментная тест-система на основе гликопротеина вируса бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ), была проверена и установлена возможность ее применения для иммуноферментного обнаружения антирабических антител в образцах глазной жидкости лисиц, добытых в регионах, где проводилась кампания по оральной вакцинации диких плотоядных.

Из представленных к исследованию 63 образцов глазной жидкости лисиц, отрицательными в ИФА оказалось 26 проб, что составило 41,3% от количества исследованных проб, соответственно, положительных – 37 проб (58,7%) с титром антител в ИФА 1:100-1:200 при $K_{сп} = 2,1$ и выше. Результаты скрининга проб глазной жидкости лисиц методом блок-ИФА на наличие антирабических антител представлены в таблице 30.

Таблица 30 – Скрининговая оценка проб глазной жидкости лисиц методом блок-ИФА на наличие антирабических антител

Титр антител в ИФА	Количество положительных проб		$K_{сп}$
	абс.	%	
1:100	18	28,6	2,1...2,4
1:200	19	31,7	2,1...2,5
Итого:	37	58,7	

Данные полученные в результате ИФА сравнивали с результатами РН на белых мышах. Из полученных 63 проб исследовали 32. Коэффициент соответствия определяли по формуле:

$$\frac{\bar{U} (\text{ИФА+РН}) + (\text{ИФА-РН})}{\bar{U}_1} \times 100 \quad (1)$$

где, \bar{U} - число проб;

\bar{U}_1 - число исследованных проб

Расчеты выявили совпадение результатов блок-ИФА и РН в 87,5%.

Разработанная и испытанная иммуноферментная тест-система с применением гликопротеина вируса бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ), обеспечивает выявление специфических антител в сыворотках крови животных, иммунизированных против бешенства, а также проведение контроля эффективности вакцинопрофилактики в течение 6-7 часов. Установлено, что возможно применение разработанной тест-системы блок-ИФА для скрининга иммунного статуса диких плотоядных в природных очагах бешенства и на территориях проведения оральной вакцинации.

На рисунке 52 продемонстрировано отсутствие специфической флуоресценции при окрашивании флуоресцирующим антирабическим глобулином мазков-отпечатков мозга лисиц, добытых в Смоленской области, в местах проведения оральной вакцинация диких плотоядных. Свидетельством об отсутствии антигена вируса бешенства в окрашенных препаратах мозговой ткани лисицы было отсутствие характерного свечения.

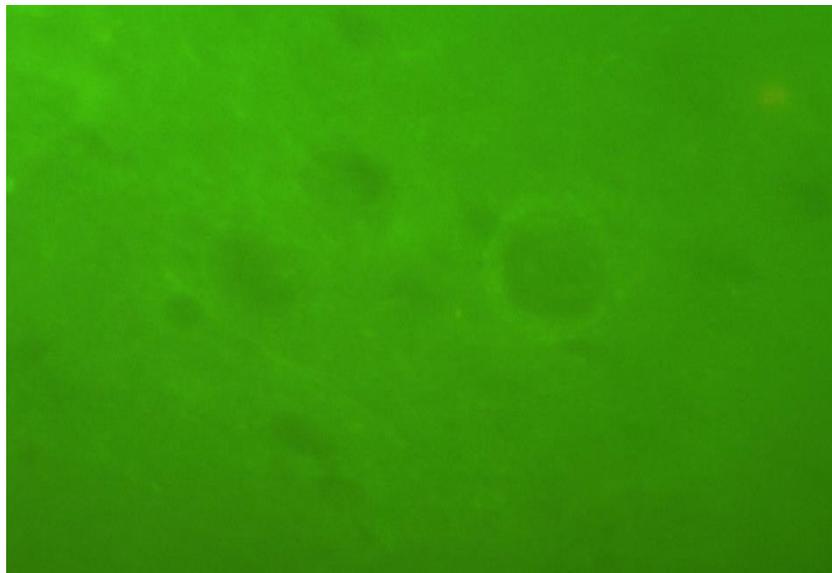


Рисунок 52 – Отсутствие специфической флуоресценции при окрашивании антирабическим глобулином мазков-отпечатков мозга лисицы (объектив 90, гомаль 1,7)

При постановке контроля выявлено характерное специфическое свечение комплексов «антиген-антитело» в нейронах в виде отчетливо-выраженных ярких желто-зеленых гранул различной формы и величины при окрашивании флуоресцирующим антирабическим глобулином в мазках-отпечатках мозга белых мышей, зараженных вирусом бешенства (штамм CVS) (рисунок 53).

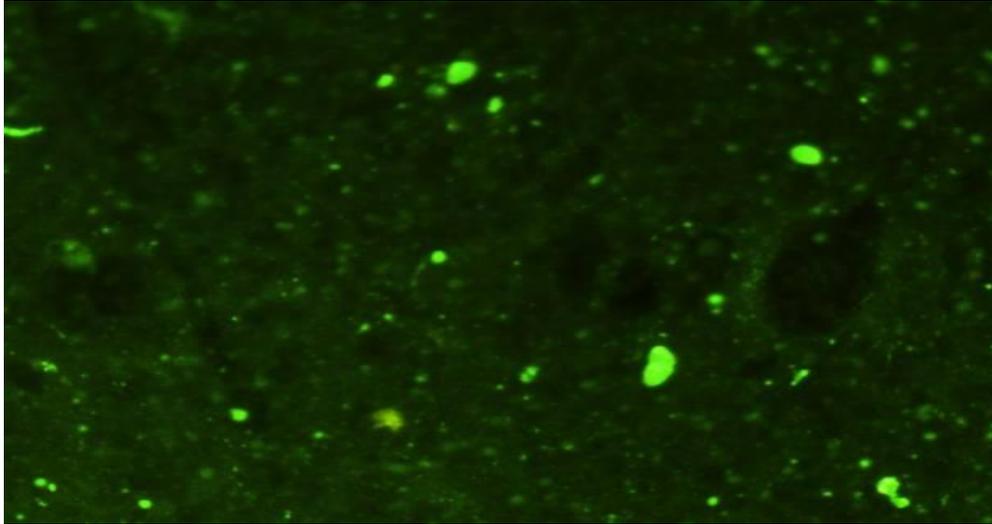


Рисунок 53 – Специфическая иммунофлуоресценция при окрашивании флуоресцирующим антирабическим глобулином отпечатков мозга мышей, зараженных вирусом бешенства, штамм CVS (объектив 90, гомаль 1,7)

Отрицательные результаты, полученные при исследовании проб мозга лисиц методом иммунофлуоресценции, подтверждены нами в блок-ИФА (рисунок 54, ряды 1-11). При исследовании в ИФА проб мозга лисицы и телянка (эксп. 756 и 3001), доставленных из неблагополучных по бешенству хозяйств Республики Татарстан, титры антигенов рабического вируса в ИФА соответствовали 1:80 (ряды 15 и 16). При этом активность контрольного положительного антигена вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ, составила в ИФА 1:320 (ряд 12), концентрированного вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ (ряд 14) – более 1:640.

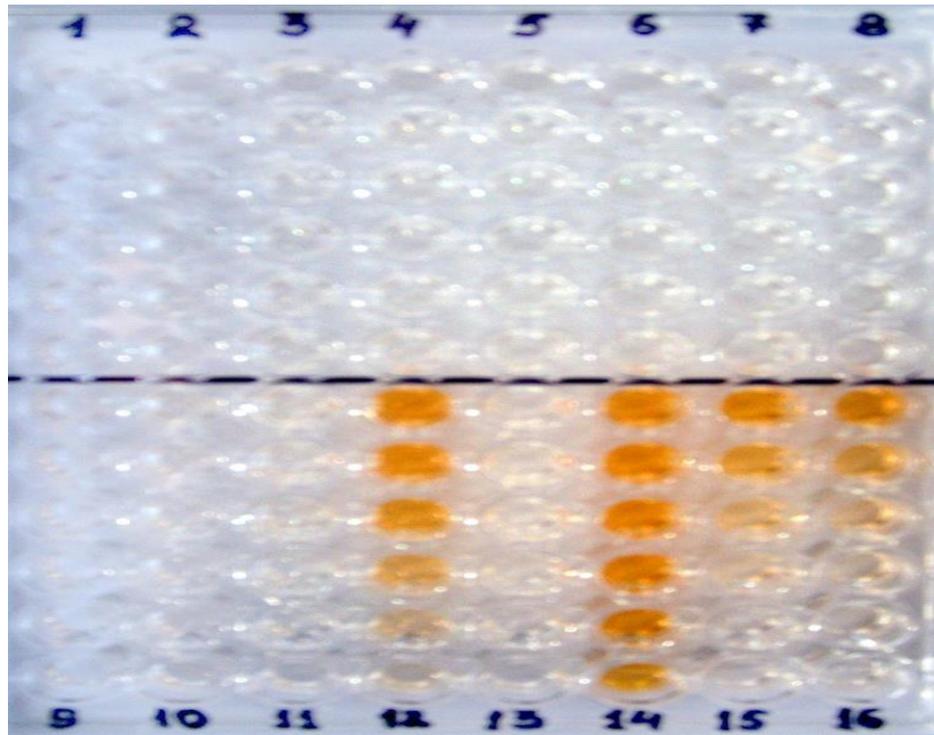


Рисунок 54 – Результат блок-ИФА проб мозга лисиц на наличие антигена вируса бешенства

ряды 1-11 – пробы из мест, где проведена оральная иммунизация диких плотоядных (отрицательный результат); ряд 12 – контрольный положительный антиген вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ (титр 1:320); ряд 13 – контрольный отрицательный антиген (отрицательный результат); ряд 14 – концентрированный вирус бешенства, шт. «Овечий» ГНКИ (титр более 1:640); ряд 15 – проба мозга лисицы (эксп.756, РТ, титр 1:80); ряд 16 – проба мозга теленка (эксп. 3001, титр 1:80)

На следующем этапе исследований практический интерес представлял вопрос изучения продолжительности напряженности иммунитета у животных, иммунизированных против бешенства. Был проведен иммуноферментный анализ 159 проб сывороток крови привитого против бешенства КРС и 15 проб сывороток крови собак в динамике иммуногенеза (таблица 31).

Таблица 31 – Титры антител в ИФА антирабических сывороток крови крупного рогатого скота и собак в динамике иммуногенеза

Срок после вакцинации	Количество голов с титрами антител в ИФА						
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
<i>Крупный рогатый скот, 159 проб</i>							
1 мес.	23	23	23	23	23	17	6
3 мес.	51	51	51	11	23	12	5
6 мес.	27	27	27	7	11	6	3
9 мес.	30	30	30	17	7	4	2
12 мес.	25	25	25	15	6	2	2
<i>Собаки, 15 проб</i>							
1 мес.	3	3	3	3	–	–	–
3 мес.	3	3	3	3	–	–	–
6 мес.	3	3	3	3	–	–	–
9 мес.	3	3	3	–	–	–	–
12 мес.	3	3	3	–	–	–	–
Референс-сыворотка	–	–	–	–	–	1	–

Из данных таблицы 31 виден высокий уровень специфических к вирусу бешенства антител в сыворотках крови крупного рогатого скота и собак при исследовании через 1, 3, 6, 9 и 12 мес. после вакцинации, составляющий от 1:200 до 1:3200, что соответствует активности 2,5-20 МЕ/мл и более. При этом активность референс-сыворотки ВГНКИ составила 1:1600 в ИФА и соответствовала 20 МЕ/мл. Известно, что защитный от бешенства титр антител составляет 0,5 МЕ/мл. Следовательно, уровень антител в исследуемых пробах сывороток крови крупного рогатого скота и собак через 12 мес. после вакцинации обеспечивает защиту животных от бешенства.

2.4 Усовершенствование методов лабораторной диагностики бешенства животных

2.4.1 Ускоренный метод диагностики бешенства в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1)

Целью исследований явилось дальнейшее изучение диагностической эффективности метода выделения уличного вируса бешенства в культуре клеток НГУК-1 с использованием представительного объема биоматериала, а также сравнительное изучение диагностической ценности клеточных линий НГУК-1, почки нормальной взрослой самки собаки породы кокер-спаниель (МДСК), почки эмбриона свиньи (СПЭВ) и биопробы на белых мышах.

Выделение эпизоотических штаммов вируса бешенства в культуре клеток НГУК-1 проводили согласно Методическим указаниям по лабораторной диагностике бешенства (Утв. ДВ МСХиП РФ, 1997). Наличие вируса в культуральной жидкости определяли в биологической пробе на белых мышах путем интрацеребральной инокуляции биоматериала (ГОСТ 26075-84).

Для заражения клеток использовали изоляты уличного вируса бешенства, выделенные из мозга человека и различных видов животных. Всего исследовано 554 пробы биоматериала, из которых 187 получено от различных видов диких животных, 324 – от сельскохозяйственных и домашних животных и 43 – от людей, умерших от бешенства. Материалы регистрировали в коллекции лаборатории профилактики бешенства и природной очаговости вирусных зоонозов ИПВЭ РАМН им. М.П. Чумакова (г. Москва), поступивших из различных практических учреждений для диагностических исследований или

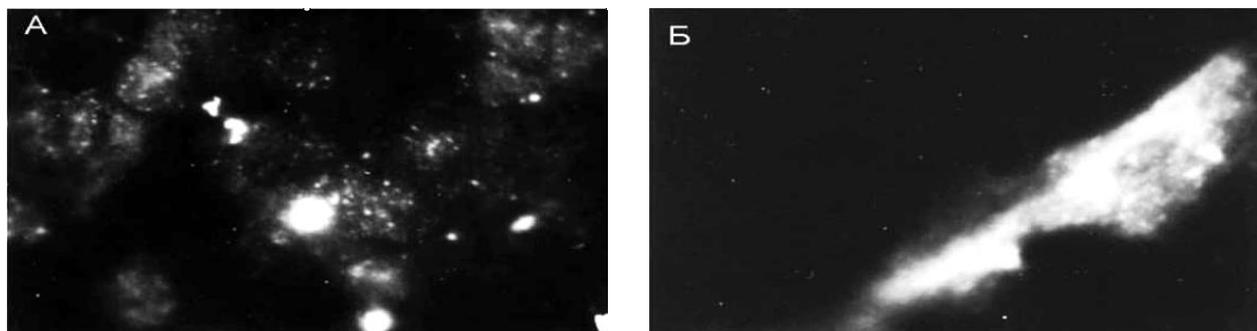
добыты при изучении природных очагов рабической инфекции в различных регионах страны.

Исследовали также биоматериал (головной мозг) от диких, сельскохозяйственных и мелких домашних животных, поступивших с подозрением на бешенство из неблагополучных по данной инфекции районов Республики Татарстан. Анализ клеток на наличие антигена вируса бешенства проводили прямым МФА каждые 24 часа в течение 5-6 сут. (Хисматуллина Н.А. с соавт., 1997). В качестве положительных контролей использовали препараты клеток, зараженных стандартным вирусом бешенства (штамм CVS) и (или) производственным штаммом «Овечий» ГНКИ рабического вируса. Отрицательным контролем служили препараты клеток, обработанные 10% суспензией мозга интактных белых мышей.

Препараты просматривали под люминесцентным микроскопом Nikon (Japan) под иммерсией при увеличении 10x1000. Для окраски их использовали «Флуоресцирующий антирабический глобулин», разработанный и изготовленный в лаборатории иммунологии и биохимии ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Казань), зарегистрированный в Российской Федерации и сертифицированный в ВГНКИ ветпрепаратов. Результаты учитывали по интенсивности свечения по четырехкрестовой системе. Пробу считали положительной при отчетливо выраженной, достаточно яркой желто-зеленой люминесценции, при отсутствии таковой в контрольных отрицательных препаратах.

Результаты исследований с применением изолятов вируса бешенства показали, что уличный рабический вирус размножается в культуре клеток НГУК-1, в то время как его репликация не установлена в культуре клеток МДСК и СПЭВ. В цитоплазме клеток НГУК-1, зараженных вирусосодержащим материалом, обнаруживали желтовато-зеленые, яркосветящиеся комплексы, расположенные преимущественно в ее перинуклеарной зоне. Так, в первый день инкубации специфически светящиеся включения обнаружены в единичных клетках. Но уже на 2 сутки происходило увеличение размеров специфически флуоресцирующих

гранул (0,4; 0,5 мкм), а также количества инфицированных клеток, достигающее $19,5 \pm 0,3\%$. В культуре клеток, инкубированных в течение 3 сут. после заражения,

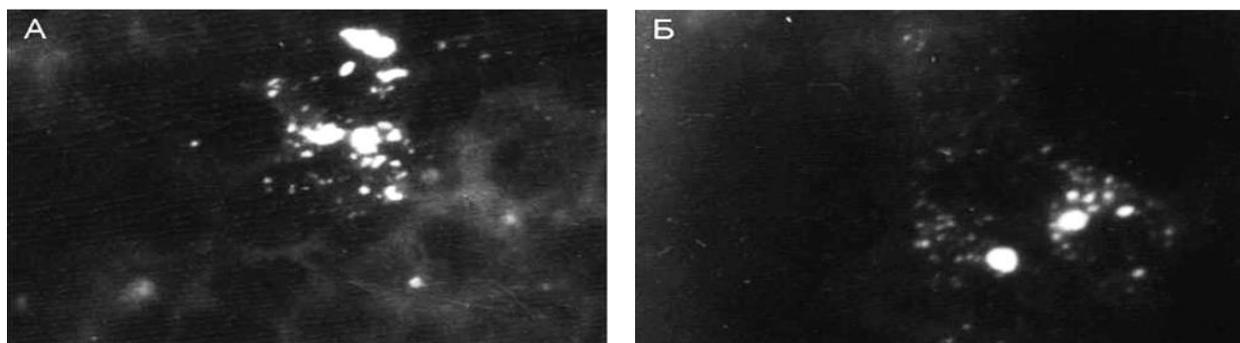


отмечено возрастание размеров флуоресцирующих гранул до 0,7-2,0 мкм и количества инфицированных клеток, составившие $27,5 \pm 1,2\%$ (рисунки 55, 56).

А – изолят «Л1»

Б – изолят «Л2»

Рисунок 55 – Культуры перевиваемых клеток НГУК-1 через 72 ч после внесения 10% суспензии мозга лисицы, павшей от бешенства (окраска флуоресцирующим антирабическим глобулином. Ув. x 1000)



А – изолят «М»;

Б – изолят «Х».

Рисунок 56 – Культуры перевиваемых клеток НГУК-1 через 72 ч после внесения 10% суспензии мозга человека, умершего от бешенства (окраска флуоресцирующим антирабическим глобулином. Ув. x 1000)

Вирусный антиген в зараженных клетках обнаруживали по МФА через 24-48 час. Максимальное накопление уличного вируса бешенства наблюдалось на третий день после заражения. Положительный ответ в этот срок исследований

получен в 100% случаев. Специфичность результатов подтверждена при интрацеребральном заражении белых мышей культуральной жидкостью.

Так как в качестве основного метода выделения возбудителя бешенства рекомендуется биологическая проба на белых мышах (ГОСТ 26075-84), провели ее сравнительное испытание с методом выделения вируса бешенства в культуре клеток НГУК-1. В таблице 32 приведены результаты сравнительного исследования биматериала (мозг) от различных видов диких, сельскохозяйственных и мелких домашних животных, а также человека, из которой видно полное совпадение результатов (100%) выделения уличного вируса бешенства в биопробе на белых мышах и в культуре клеток НГУК-1.

Таблица 32 – Сравнительные результаты исследования мозга различных видов животных и человека в биологической пробе, МФА и культуре клеток НГУК-1

Источник выделения вируса бешенства	Кол-во проб	Количество положительных проб			
		биопроба	МФА	заражение клеток НГУК-1	
				МФА	биопроба
Лисица	178	74	73	74	74
Куница	2	2	2	2	2
Барсук	5	5	5	5	5
Рысь	2	2	2	2	2
Крупный рогатый скот	111	62	61	62	62
Лошадь	25	25	24	25	25
Овца	19	10	10	10	10
Собака	120	45	45	45	45
Кошка	49	20	20	20	20
Человек	43	25	24	25	25
Контроль (10% суспензия мозга интактных мышей)	30	–	–	–	–
Контроль (10% суспензия головного мозга мышей, зараженных вирусом бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ)	30	30	30	30	30

В 30-ти контрольных пробах, в которых клетки НГУК-1 инкубировали с мозговой взвесью от клинически здоровых животных, при окрашивании флуоресцирующим антирабическим глобулином специфических гранул не обнаруживали.

Для сравнения чувствительности тестов по обнаружению уличного вируса бешенства в клетках НГУК-1 и биопrobe на белых мышах были проведены исследования по параллельному титрованию. При этом также получено полное совпадение результатов (таблица 33).

Таблица 33 – Сравнительная чувствительность диагностики бешенства в культуре клеток НГУК-1 и биологической probe на белых мышах

Штамм, изолят вируса	Исходный титр вируса IgLD ₅₀ /0,03 мл	Предельное разведение суспензии, в которой обнаруживается вирус		Срок выделения вируса, Сутки	
		белые мыши	НГУК-1, % в разведении (M±m)	белые мыши	НГУК-1
Штамм CVS	3,50	1:10000	(1:1000) 0,3±0,1	5-6	1
Лошадь № 1	1,42	1:100	(1:100) 1,8±0,1	14-20	2
Лошадь № 2	1,14	1:100	(1:10) 6,0±0,5	19-23	3
Лошадь № 3	1,11	1:100	(1:10) 2,5±0,2	15-21	3
Лошадь № 4	1,23	1:100	(1:10) 3,0±0,1	10-18	3
Корова № 1	1,53	1:1000	(1:100) 3,7±0,2	12-27	3
Корова № 2	2,33	1:100	(1:100) 4,7±0,2	11-25	1
Корова № 3	1,53	1:100	(1:100) 3,7±0,2	12-27	3
Кошка № 1	1,21	1:100	(1:10) 3,8±0,3	11-23	3
Кошка № 2	1,83	1:100	(1:100) 1,7±0,3	11-14	2
Кошка № 3	2,81	1:1000	(1:100) 1,7±0,3	7-14	1
Собака № 1	1,13	1:100	(1:10) 3,0±0,6	18-34	3
Собака № 2	1,27	1:100	(1:10) 3,0±0,6	15-32	3

Результаты исследований показали, что уличный вирус бешенства может быть выявлен в клетках НГУК-1 уже через 1-3 сут. после заражения. При этом

инкубационный период в организме белых мышей для данных изолятов рабического вируса составил от 7 до 34 сут.

В диагностике бешенства значительное внимание уделяется выделению уличного вируса бешенства в культуре клеток. Определенный интерес, заслуживают работы, посвященные выделению возбудителя болезни в культуре клеток на известных перевиваемых (ВНК-21, 46-47, CER, Wi-38 и др.) и первичных культурах клеток почки сирийского хомяка, собаки и др. (Селимов М.А. с соавт., 1963; Михайловский В.В., 1967; Smith A.L., 1978; Rudd R.J., Trimachi C.V., 1987).

Следует отметить, что указанные перевиваемые линии клеток недостаточно чувствительны для репликации уличных штаммов рабического вируса и не отвечают требованиям для диагностического применения, а для индикации вируса на первичных культурах клеток почки сирийского хомяка, собаки и др. требуется длительная адаптация (до 20 и более суток после заражения), что снижает ее преимущество перед биопробой на белых мышах.

Привлекает внимание использование опухолевых глиальных клеток для диагностики бешенства с последующим выявлением цитоплазматических включений с помощью световой микроскопией спустя 2-5 сут. после заражения (Atanasiu P. et al., 1961). Однако световая микроскопия для этих целей применяется редко. «Золотым стандартом» в диагностике бешенства остается МФА (Грибенча С.В. с соавт., 2013).

Установлено, что уличный рабический вирус размножается в культуре клеток НГУК-1, в то время как его репликация не установлена в культурах клеток МДСК и СПЭВ. В цитоплазме клеток НГУК-1, зараженных вирусосодержащим материалом, обнаруживали желтовато-зеленые, яркосветящиеся комплексы, расположенные преимущественно в перинуклеарной зоне.

В результате сравнительного исследования проб биоматериала от различных видов диких, сельскохозяйственных и мелких домашних животных, а также людей, установлена полная корреляция результатов биопробы на белых мышах и на линии клеток НГУК-1. Показано, что в клетках невриномы крысы

рабический вирус может быть выделен в более ранние сроки (через 1-3 сут. после заражения), чем при интрацеребральной инокуляции биоматериала мышам (7-10, иногда 34 день).

Таким образом, разработанный нами метод ускоренной диагностики бешенства в культуре клеток НГУК-1 в сравнении с биологической пробой на белых мышах обеспечивает более раннюю диагностику данной болезни у различных видов животных. Метод включен в Межгосударственный стандарт – ГОСТ 26075-2013. Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства (Приложение 9).

2.4.2 Синтетические олигонуклеотидные праймеры к гену гликопротеина и способ выявления РНК вируса бешенства в обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР)

До настоящего времени наиболее чувствительным и достоверным методом диагностики бешенства в России является классическая биологическая проба на белых мышах с последующей идентификацией антигена вируса бешенства методом флуоресцирующих антител (Государственный стандарт СССР 26075. Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики бешенства. М., 1984). Однако существенными недостатками биопробы являются длительный срок исследования (в отрицательных случаях до 30 суток), потенциальная опасность выноса возбудителя болезни во внешнюю среду, а также невозможность исследования разложившегося биоматериала. Кроме того, постановка биопробы неэкономична, требует наличия специально оборудованного вивария и подготовленного обслуживающего персонала (Хисматуллина Н.А. с соавт., 2001).

В последнее время для диагностики инфекционных болезней активно разрабатываются и применяются методы молекулярной диагностики, среди которых наиболее приемлемым является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Важным преимуществом ПЦР являются высокая специфичность,

чувствительность и быстрота исполнения. При этом исключается необходимость предварительного накопления биоматериала, что особенно важно в диагностике особо опасных болезней, в том числе бешенства.

Одним из широко используемых методов детекции РНК вируса бешенства является обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР), позволяющая поставить диагноз в течение 5 часов (Nadin-Davis S.A. et al., 1996). В большинстве случаев ОТ-ПЦР применяют для штаммовой дифференциации вируса бешенства (Nadin-Davis S.A. et al., 1996; Wakeley P.R. et al., 2005). Кроме того, возможно применение ОТ-ПЦР для прижизненного обнаружения вирусной РНК в слюне и биоптатах слюнной железы, а также спинномозговой жидкости животных (Crepin P. et al., 1998; Nagaraj T. et al., 2008; Kumar S. et al., 2008).

Наиболее приемлемым, с точки зрения описанных недостатков биопробы, и принятым за прототип является способ выявления РНК вируса бешенства, основанный на ОТ-ПЦР, включающей выделение РНК вируса из вирусосодержащей суспензии, синтез олигонуклеотидных праймеров на ген нуклеопротеина, амплификацию РНК вируса в ОТ-ПЦР, специфическую идентификацию продуктов ОТ-ПЦР с помощью дот-блот анализа (Tordo N., 1996). При этом выделение РНК в ОТ-ПЦР основано на фенольно-хлороформном методе, позволяющем выделять тотальную РНК без посторонних примесей (фосфолипиды головного мозга и др.), оказывающие ингибирующее действие в процессе постановки ОТ-ПЦР.

Вместе с тем, для выделения высококачественной РНК фенольно-хлороформным методом требуется соблюдение низкотемпературных условий. В то же время часто используемый сорбентный метод выделения РНК прост в исполнении и не требует соблюдения особых температурных условий. Однако данный метод не позволяет получать качественные нативные образцы РНК. В связи с этим, чувствительность одностадийной ОТ-ПЦР значительно снижается. Кроме того, количество вирусного материала в исследуемых образцах может быть ниже детектируемого ПЦР вследствие несоблюдения условий хранения или транспортировки клинического материала и др.

Для определения низких количеств вирусной РНК в пробах в научной литературе описано применение гнездовой модификации ПЦР, позволяющей повысить чувствительность реакции в 10000 раз (Taylor M.G. et al., 1991; Oxford Univ.: IRL Press, 1995).

Разработан способ индикации возбудителя бешенства в биоматериале методом ПЦР с использованием электрофоретической детекции результатов. В процессе исследований впервые определены оригинальные нуклеотидные последовательности олигонуклеотидных наружных и внутренних праймеров для детекции РНК вируса бешенства методом гнездовой ОТ-ПЦР в двухраундовой амплификации (таблица 34).

Таблица 34 – Нуклеотидные последовательности олигонуклеотидных праймеров для детекции РНК вируса бешенства методом гнездовой ОТ-ПЦР

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

Конструирование праймеров осуществляли на основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей различных штаммов лиссавирусов, депонированных в международной базе данных GeneBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/GeneBank-/Gene-BankSearch.html>) с помощью пакета программного обеспечения «Vector NTI 9.1» (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Были сконструированы и синтезированы олигонуклеотидные праймеры на участок гена гликопротеина вируса бешенства (ЗАО «Синтол», Россия).

Окончательный выбор праймеров основывали на следующих критериях: высокий индекс сходства фрагмента и РНК различных штаммов вируса бешенства, высокая температура отжига (GC-метод), большая длина

консервативных участков. Химический синтез праймеров осуществляли амидофосфидным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U. Концентрацию синтетических олигонуклеотидных праймеров в маточном растворе определяли спектрофотометрическим методом.

Праймеры фланкируют консервативный участок гена гликопротеина вируса бешенства, который не имеет полиндромных повторов нуклеотидов и не образует выраженных вторичных структур, а также не имеет протяженных G-C участков. Для пар праймеров расчетная температура отжига была близкой и составила 58°C.

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

Второй вариант выявления РНК лиссавируса с помощью набора синтетических олигонуклеотидных праймеров в ОТ-ПЦР осуществляли поэтапно.

Первый этап исследований включал выделение РНК вируса бешенства по следующей схеме. Обеззараженные в соответствии с ГОСТом 26075 пробы антигена вируса бешенства мозгового происхождения (10%-ные суспензии в физиологическом растворе) и клинического материала отбирали по 100 мкл. Выделение РНК из образцов головного мозга животных и клинического материала осуществляли стандартным способом с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» (ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, (Россия).

На втором этапе осуществляли реакцию ОТ-ПЦР для получения ДНК стандартным способом с использованием коммерческого набора «Реверта-L» производства ООО «ИнтерЛабСервис» (Россия). В пробирку, содержащую 10 мкл реакционной смеси (буфер для обратной транскрипции и 6 мкл ревертазы из набора «Реверта-L»), добавляли 10 мкл РНК-пробы, осторожно перемешивали и инкубировали в термостате при 37°C в течение 60 мин. и добавляли 20 мкл ДНК-буфера, тщательно перемешивая.

На третьем этапе осуществляли амплификацию участка кДНК вируса бешенства, содержащего ген гликопротеина. Для постановки ПЦР

предварительно готовится ПЦР-смесь-1 и ПЦР-смесь-1а и разливается по 5 мкл в микропробирки объемом 0,6 мл, сверху заливается воском. ПЦР-смесь-1 состоит из раствора праймеров в концентрации 1пкмоль/мкл каждого и смеси трифосфатов до конечной концентрации 0,2 mM каждого. Приготовленные пробирки хранили при температуре 4°C. В отдельной микропробирке смешивали ПЦР-смесь-2 непосредственно перед использованием: 10хПЦР буфер (60mM Tris-HCl, 2,5mM MgCl₂, 25mM KCl, 10mM 2-меркаптоэтанола, 0,1% Тритон X-100) из расчета по 1 мкл и по 9 мкл деионизированной стерильной воды на пробу (количество проб + 2 контроля + 1) и добавляли Tag F-ДНК-полимеразу с активностью 5 ед/мкл до конечной концентрации 0,5 ед/мкл. Затем отбирали необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1.

На поверхность воска вносили по 10 мкл ПЦР-смеси-2. Сверху добавляли по одной капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл). В подготовленные для ПЦР пробирки под масло или на масло вносили по 10 мкл исследуемых кДНК. Далее ставили контрольные реакции амплификации: отрицательный контрольный образец – в пробирку вносили 10 мкл ТЕ-буфера; в положительный контрольный образец – в пробирку вносили 10 мкл кДНК рабического вируса. Программа амплификации, состоящая состоит из различных температурных режимов, представлена в таблице 35

Таблица 35 – Экспозиции и температурные режимы программы амплификации

Температура	Время	Количество циклов
95°C	пауза	
95°C	15 мин	1
95°C	10 с	40
58°C	15 с	
72°C	30 с	
72°C	2 мин	1
10°C	Хранение	

Второй этап амплификации проводили аналогично первому с применением ПЦР-смеси-1а. В качестве матрицы использовали продукты амплификации первого этапа. Детекцию продуктов ПЦР-амплификации проводили методом электрофореза в агарозном геле по вышеописанной схеме. При этом в положительных пробах визуально регистрировали паттерн 259 п.н.

На следующем этапе определяли размер продуктов диагностической ПЦР. Продукты ОТ-ПЦР анализировали методом электрофореза в 1,7%-ном агарозном геле в стандартном трис-боратном буфере, рН 8,0, по стандартной методике. Результаты электрофореза учитывали, просматривая гель в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе «Трансиллюминатор» (Россия). Маркер молекулярного веса «Fermentas» (Литва) 100-3000 пар оснований. Результат ОТ-ПЦР считали положительным, если продукт ОТ-ПЦР визуализируется в виде светящегося фрагмента соответствующего 755 п.н.

В одном из вариантов для определения чувствительности реакции контрольный вирус бешенства (производственный штамм «Овечий» ГНКИ) титровали методом десятикратных разведений до 10^7 LD₅₀/мл. Образец каждого разведения исследовали в ПЦР. Чувствительность разработанной ОТ-ПЦР составила $1,3 \lg$ LD₅₀/мл.

Результаты опытов по определению специфичности гнездовой ОТ-ПЦР с использованием внешних и внутренних праймеров к гену гликопротеина вируса бешенства реакции представлены в таблице 36.

Таблица 36 – Специфичность гнездовой ОТ-ПЦР с использованием внешних и внутренних праймеров к гену гликопротеина вируса бешенства

ДНК из биоматериала	Результат гнездовой ОТ-ПЦР	
	с внешними праймерами (755 п.н.)	с внутренними праймерами (259 п.н.)
Мозговая ткань здоровой лисицы	отрицательна	отрицательна
Мозговая ткань здоровой собаки	отрицательна	отрицательна
Мозговая ткань здоровой кошки	отрицательна	отрицательна
Мозговая ткань здоровой овцы	отрицательна	отрицательна
Мозговая ткань здорового кролика	отрицательна	отрицательна

<i>Escherichia coli</i>	отрицательна	отрицательна
<i>Mycobacterium bovis</i> , ум. BCG	отрицательна	отрицательна
<i>Mycobacterium avium</i>	отрицательна	отрицательна
<i>Brucella abortus</i>	отрицательна	отрицательна
<i>Bacillus anthracis</i> , шт. 55	отрицательна	отрицательна
Вирус болезни Ауески, шт. ВГНКИ	отрицательна	отрицательна
<i>Staphylococcus aureus</i>	отрицательна	отрицательна
Изолят вируса бешенства 13991	положительна	положительна
Изолят вируса бешенства 3001	положительна	положительна
Изолят вируса бешенства 329	положительна	положительна
Изолят вируса бешенства 925	положительна	положительна
Изолят вируса бешенства 2228	положительна	положительна
Изолят вируса бешенства 139	положительна	положительна
Вирус бешенства, штамм «Овечий»	положительна	положительна
Стандартный вирус бешенства CVS	положительна	положительна
Вакцинный штамм «Щелково-51»	положительна	положительна
Вакцинный штамм «Внуково-32»	положительна	положительна
Вакцинный штамм ERA 0/333	положительна	положительна

Исходя из результатов исследований, положительная реакция имеет место в двух раундах гнездовой ОТ-ПЦР с применением внешних и внутренних праймеров к гену гликопротеина рабического вируса, с ДНК эпизоотических изолятов вируса бешенства (№№ 13991, 3001, 329, 925, 2228, 139), стандартного вируса бешенства CVS, производственного штамма «Овечий» ГНКИ и вакцинных – «Внуково-32», «Щелково-51» и ERA 0/333 вируса бешенства. В то же время не регистрировали реакции с отрицательными контролями – ДНК из мозговой ткани здоровых животных (лисицы, кошки, собаки, овцы и кролика), а также гетерологичными контролями – ДНК различных микроорганизмов, что свидетельствует о специфичности гнездовой ОТ-ПЦР с использованием разработанного набора олигонуклеотидных праймеров к гену гликопротеина вируса бешенства.

Результаты электрофореграмм продуктов первого и второго этапов амплификации выборочно представлены на рисунках 57 и 58.

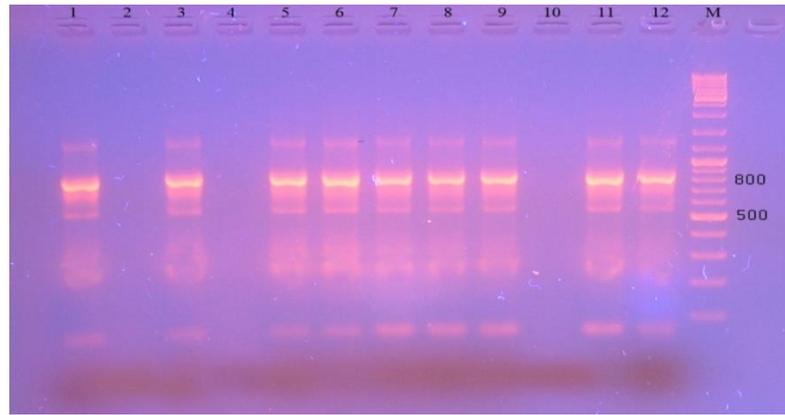


Рисунок 57 – Электрофореграмма продуктов первого этапа амплификации (праймеры 755 п.н.).

Обозначения: 1. Слезная жидкость больного человека с клиническими проявлениями гидрофобии; 2. Слезная жидкость здорового человека; 3. Слюна больного с клиническими проявлениями гидрофобии; 4. Слюна здорового человека; 5. Эпизоотические изоляты (№ 36, 40, 258, 5359), выделенные в Республике Татарстан; 9. Эпизоотический изолят, выделенный в Смоленской области.; 10. Отрицательный контрольный образец; 11. Вирус бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ; 12. Стандартный вирус бешенства, штамм CVS; 13. М – Маркер молекулярного веса Fermentas 100-3000 пар оснований.

Из данных рисунка 57 видно, что исследуемые пробы: слезная жидкость и слюна больного с клиническими признаками гидрофобии, эпизоотические изоляты (№№ 36, 40, 258 и 5359), выделенные в РТ, изолят № 36, выделенный в Смоленской области, а также производственный штамм «Овечий» ГНКИ вируса бешенства и стандартный вирус бешенства, штамм CVS, идентифицируются с помощью внешних праймеров *fp _850_gp _rabv* и *rp __850_ gp _rabv* на ген гликопротеина вируса бешенства, амплифицирующие участок гена гликопротеина в 755 п.н. Реакция не проявлялась с пробами слюны и слезной жидкости от здорового человека и в отрицательном контрольном образце, что свидетельствует о специфичности метода гнездовой ОТ-ПЦР.

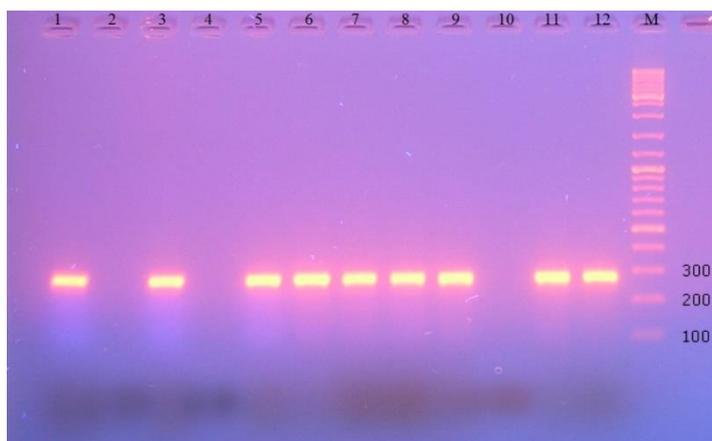


Рисунок 58 – Электрофореграмма продуктов второго этапа амплификации (праймеры 259 п.н.).

Обозначения: 1. Слезная жидкость больного с клиническими проявлениями гидрофобии; 2. Слезная жидкость здорового человека; 3. Слюна от больного с клиническими проявлениями гидрофобии; 4. Слюна здорового человека; 5. Эпизоотический штамм №36, выделенный в РТ; 6. Эпизоотический штамм № 40, выделенный в РТ; 7. Эпизоотический штамм №258, выделенный в РТ; 8. Эпизоотический штамм №5359, выделенный в РТ; 9. Эпизоотический штамм №36, выделенный в Смоленской обл.; 10. Отрицательный контрольный образец; 11. Вирус бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ; 12. Стандартный вирус бешенства, штамм CVS; 13. М–Маркер молекулярного веса Fermentas 100-3000 пар оснований.

Из данных рисунка 58 видно, что исследуемые пробы: слезная жидкость и слюна больного с клиническими признаками гидрофобии, эпизоотические изоляты (№№ 36, 40, 258 и 5359), выделенные в РТ и изолят № 36, выделенный в Смоленской области, а также производственный штамм «Овечий» ГНКИ вируса бешенства и стандартный вирус бешенства, штамм CVS, идентифицируются с помощью внутренних праймеров *fp_350_gp_rabv* и *gp_350_gp_rabv* на ген гликопротеина вируса бешенства, амплифицирующие участок гена гликопротеина в 259 п.н. Реакция отсутствовала с пробами слюны и слезной жидкости от здорового человека и с отрицательным контрольным образцом, что свидетельствует о специфичности метода ОТ-ПЦР.

Таким образом, предлагаемый способ гнездовой ОТ-ПЦР обладает специфичностью при выявлении РНК штаммов и изолятов вируса бешенства. Способ позволяет выявлять РНК вируса бешенства в исследуемых образцах (биоматериал от больных бешенством животных, культуральная жидкость вакцинных штаммов лиссавируса, клинический материал от больных гидрофобией – слезная жидкость, слюна). Разработаны «Методические указания по индикации возбудителя бешенства методом ОТ-ПЦР» (Приложение 10).

Диагностическое испытание праймеров проводили с использованием изолятов вируса бешенства, выделенных от различных видов диких плотоядных и домашних животных на территории Республики Татарстан и Смоленской области РФ (11 проб), трех вакцинных – производственного и стандартного штаммов вируса бешенства, а также клинического материала от больных людей (2 пробы).

Установлено, что применение разработанных оригинальных праймеров для индикации РНК вируса бешенства в гнездовой ОТ-ПЦР в патологическом и клиническом материале обеспечивает синтез фрагментов ДНК рассчитанных размеров (внешнего 755 н.п.) и (внутреннего 259 н.п.) Преимущества разработанного метода перед классической биопробой на белых мышах представлены в таблице 37, свидетельствующие о значительном сокращении срока диагностики, себестоимости теста и отсутствии необходимости дополнительного подтверждения в других диагностических тестах.

Таким образом, разработанный способ позволяет проводить эффективное выявление РНК штаммов и изолятов вируса бешенства в патологическом и клиническом материале, а также сократить сроки проведения исследований до 6 часов, снизить себестоимость диагностики в 9,8 раза, трудозатраты – в 40 раз. Способ включает проведение гнездовой ОТ-ПЦР с олигонуклеотидными праймерами, имеющие определенные нуклеотидные последовательности и синтезированы на консервативный ген гликопротеина. При этом ОТ-ПЦР проводят в два раунда. В случае положительной реакции синтезируется фрагмент, соответствующий размеру в первом раунде – 755 п.н., во втором – размеру 259 п.н.

Таблица 37 – Сравнительная оценка эффективности биопробы на белых мышах и гнездовой ОТ-ПЦР при исследовании образцов на бешенство

Показатель	Биопроба на белых мышах	Гнездовая ОТ-ПЦР
Продолжительность исследования одной пробы, сут.	от 7 до 30	0,4 (10 час.)
Себестоимость одной пробы, руб.	6651	680
Необходимость подтверждения выявления вируса бешенства методом флуоресцирующих антител (МФА)	да	Нет

Разработанные нами синтетические олигонуклеотидные праймеры к гену гликопротеина вируса бешенства и способ выявления РНК рабического вируса в гнездовой ПЦР явились предметом изобретения РФ (Приложение 11).

2.4.3 Гематологический профиль и иммунный статус плотоядных животных, вакцинированных против бешенства разными вакцинами

Собаки. Как известно, для профилактики бешенства у собак используют различные отечественные и зарубежные антирабические вакцины: «Рабикан» (ФГУП «Щелковский биокомбинат»), «Мультикан» (ЗАО «НПО Нарвак»), «Дипентавак» (ЗАО «Ветзвероцентр»), «Дефенсор» («Пфайзер», США), «Нобивак-Рабиес» («Интервет Интернэшнл», Нидерланды). Поэтому, было проведено изучение иммунного статуса организма собак после иммунизации различными антирабическими вакцинами.

Гематологические и иммунологические показатели крови собак изучали в различные сроки после вакцинации разными антирабическими вакцинами (сыворотки крови предоставлены Зональным Центром кинологической службы МВД по Республике Татарстан).

Таблица 38 – Гематологические показатели и иммунный статус крови собак после вакцинации антирабическими вакцинами, $M \pm m$ (n=8)

Срок иссл. после вакцинац., дн.	Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	Лимфоциты	Т-лимфоциты, отн., %	Т-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	В-лимфоциты, отн., %	В-лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$
Рабикан						
не вакц.	10,3 \pm 0,13	53,5 \pm 0,52	37,1 \pm 0,32	2,04 \pm 0,01	16,8 \pm 0,16	0,85 \pm 0,01
30	12,1 \pm 0,11	55,5 \pm 0,55	46,3 \pm 0,39	3,0 \pm 0,03	20,2 \pm 0,2	1,3 \pm 0,01
90	18,6 \pm 0,16	60,1 \pm 0,59	65,6 \pm 0,59	7,2 \pm 0,06	25,2 \pm 0,24	2,7 \pm 0,01
180	13,6 \pm 0,09	56,2 \pm 0,34	44,4 \pm 0,33	3,3 \pm 0,01	28,6 \pm 0,27	2,2 \pm 0,01
240	11,4 \pm 0,11	61,6 \pm 0,59	48,5 \pm 0,45	3,4 \pm 0,03	30,4 \pm 0,31	2,1 \pm 0,02
270	10,8 \pm 0,09	54,4 \pm 0,48	40,5 \pm 0,36	2,3 \pm 0,02	25,5 \pm 0,22	1,5 \pm 0,01
300	10,6 \pm 0,11	52,3 \pm 0,49	45,1 \pm 0,39	2,4 \pm 0,02	20,2 \pm 0,2	1,1 \pm 0,01
Мультикан-8						
15	11,5 \pm 0,14	56,2 \pm 0,34	44,4 \pm 0,33	3,3 \pm 0,01	25,6 \pm 0,25	1,6 \pm 0,02
270	10,9 \pm 0,09	61,6 \pm 0,59	48,5 \pm 0,45	3,4 \pm 0,03	20,8 \pm 0,21	1,3 \pm 0,01
300	11,1 \pm 0,11	54,4 \pm 0,48	40,5 \pm 0,36	2,3 \pm 0,02	20,7 \pm 0,2	1,4 \pm 0,01
Депентавак						
180	12,9 \pm 0,11	59,5 \pm 0,48	50,3 \pm 0,51	3,8 \pm 0,02	30,2 \pm 0,29	2,3 \pm 0,01
Дефенсор						
300	10,4 \pm 0,1	52,6 \pm 0,51	42,5 \pm 0,41	2,2 \pm 0,02	20,8 \pm 0,2	1,0 \pm 0,01
Нобивак Рабиес						
90	18,5 \pm 0,2	62,2 \pm 0,59	62,3 \pm 0,63	7,1 \pm 0,07	25,4 \pm 0,24	2,8 \pm 0,03

Срок иссл. после вакц., дн.	Т-лимфоциты хелп. отн., % Етр-РОК	Т-лимфоциты хелп. абс., $\times 10^9/\text{л}$ Етр-РОК	Цитотоксические Т-клетки отн., % Етч-РОК	Цитотоксические Т-клетки абс., $\times 10^9/\text{л}$ Етч-РОК	КДТЛ, ед.	ФАН, %	ФИ, ед.
не вак.	28,2 \pm 0,24	1,45 \pm 0,01	18,9 \pm 0,2	0,95 \pm 0,01	1,5 \pm 0,01	36,6 \pm 0,32	5,85 \pm 0,05
Рабикан							
30	30,1 \pm 0,29	2,0 \pm 0,02	20,3 \pm 0,2	1,25 \pm 0,01	1,5 \pm 0,01	44,5 \pm 0,45	6,2 \pm 0,06
90	33,2 \pm 0,31	3,6 \pm 0,03	21,2 \pm 0,21	2,3 \pm 0,02	1,5 \pm 0,01	50,1 \pm 0,49	9,7 \pm 0,1
180	29,5 \pm 0,21	2,2 \pm 0,07	17,9 \pm 0,16	1,3 \pm 0,01	1,3 \pm 0,01	48,6 \pm 0,47	6,0 \pm 0,06
240	28,5 \pm 0,29	2,0 \pm 0,02	20,8 \pm 0,21	1,4 \pm 0,01	1,4 \pm 0,01	42,2 \pm 0,50	6,0 \pm 0,1
270	24,3 \pm 0,24	1,4 \pm 0,01	20,7 \pm 0,2	1,2 \pm 0,01	1,2 \pm 0,01	38,9 \pm 0,35	6,1 \pm 0,06
300	29,9 \pm 0,3	1,6 \pm 0,01	19,6 \pm 0,18	1,0 \pm 0,01	1,5 \pm 0,01	36,8 \pm 0,55	6,6 \pm 0,08
Мультикан-8							
15	29,1 \pm 0,3	1,9 \pm 0,02	19,5 \pm 0,18	1,3 \pm 0,01	1,5 \pm 0,01	39,8 \pm 0,51	6,8 \pm 0,1
270	22,5 \pm 0,21	1,4 \pm 0,01	17,5 \pm 0,16	1,1 \pm 0,01	1,3 \pm 0,01	37,6 \pm 0,45	6,6 \pm 0,1
300	27,3 \pm 0,26	1,7 \pm 0,02	21,6 \pm 0,2	1,3 \pm 0,01	1,3 \pm 0,01	36,4 \pm 0,51	6,7 \pm 0,1
Депентавак							
180	29,1 \pm 0,28	2,2 \pm 0,01	21,8 \pm 0,2	1,6 \pm 0,01	1,4 \pm 0,01	45,3 \pm 0,55	6,9 \pm 0,09
Дефенсор							
300	30,3 \pm 0,31	1,6 \pm 0,01	20,9 \pm 0,21	1,0 \pm 0,01	1,5 \pm 0,01	38,5 \pm 0,47	6,3 \pm 0,08
Нобивак Рабиес							
90	32,5 \pm 0,32	3,6 \pm 0,04	22,5 \pm 0,22	2,5 \pm 0,02	1,4 \pm 0,01	52,1 \pm 0,51	9,9 \pm 0,1

Установлено, что вакцинация оказывает стимулирующее действие на гематологические показатели и иммунологический статус организма. Так, через 30 дней после иммунизации антирабической вакциной «Рабикан» из шт. «Щелково-51», количество лейкоцитов в крови превышало показатели серонегативных животных на 17,4% (таблица 38). В этот срок в крови вакцинированных животных отмечено увеличение содержания Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток и В-лимфоцитов на 24,7 и 20,2% соответственно. Уровень фагоцитарной активности нейтрофилов (ФАН) крови и фагоцитарного индекса (ФИ) увеличился на 21,1 и 6,5% соответственно. Через 90 дней 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 180 дней после вакцинации отмечено повышенное содержание лейкоцитов (на 32%), иммунокомпетентных клеток (на 19,7 и 70%) и ФАН (на 32,8%). Вместе с тем, через 270 и 300 дней 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 собак вакциной «Мультикан-8» установлено повышение лейкоцитов, лимфоцитов, иммунокомпетентных клеток и ФАН. Через 270 и 300 дней после вакцинации значительных отклонений от физиологической нормы в содержании лейкоцитов и лимфоцитов, ФАН и ФИ не отмечено.

При исследовании крови собак через 180 дней 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 300 дней после иммунизации собак антирабической вакциной «Дефенсор» отклонений гематологических показателей от физиологической нормы не отмечено.

Значительные изменения наблюдали при иммунизации собак вакциной «Нобивак-Рабиес». Так, через 90 дней после иммунизации 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 клеточные и гуморальные факторы иммунитета. В частности, у вакцинированных животных через 90 дней после вакцинации значительно возросло, хотя и в разной степени в зависимости от вида вакцины, количество лимфоцитов, Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток, В-лимфоцитов, а также уровень фагоцитарной активности нейтрофилов. Через 300 дней после иммунизации происходит снижение уровня содержания этих показателей.

Лисицы. В работе использовали лисиц клеточного содержания, принадлежащих ЗАО ПЗ «Бирюлинский» Республики Татарстан, иммунизированных вакциной «Рабикан» из штамма «Щелково-51».

Установлено, что иммунизация вакциной «Рабикан» способствует увеличению содержания в крови лейкоцитов и лимфоцитов, соответственно на 28,4%, а лимфоцитов на 4,3% в сравнении с показателями контрольных не иммунизированных животных (таблица 39).

Таблица 39 – Гематологические показатели и иммунный статус у лисиц, вакцинированных антирабической культуральной вакциной «Рабикан» из штамма «Щелково-51» $M \pm m$ (n=6)

Показатель	Интактные	Вакцинир.
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	5,8 \pm 0,06	7,45 \pm 0,07
Лимфоциты	53,2 \pm 0,52	55,5 \pm 0,56
Т-лимфоциты, отн., %	52,9 \pm 0,53	66,5 \pm 0,67
Т-лимфоциты, абс., $\times 10^9/\text{л}$	1,5 \pm 0,01	2,6 \pm 0,03
Б-лимфоциты, отн., %	17,2 \pm 0,16	27,5 \pm 0,25
Б-лимфоциты, абс., $\times 10^9/\text{л}$	0,52 \pm 0,01	1,0 \pm 0,01
Т-лимфоциты хелперы, отн., % (Етр-РОК)	25,2 \pm 0,22	29,7 \pm 0,30
Т-лимфоциты хелперы, абс., $\times 10^9/\text{л}$ (Етр-РОК)	0,76 \pm 0,01	1,2 \pm 0,01
Цитотоксические Т-клетки, отн., % (Етч-РОК)	18,1 \pm 0,19	14,2 \pm 0,15
Цитотоксические Т-клетки, абс., $\times 10^9/\text{л}$ (Етч-РОК)	0,55 \pm 0,01	0,55 \pm 0,01
КДТЛ, ед.	1,4 \pm 0,01	2,1 \pm 0,02
Фагоцитарная активность нейтрофилов, %	33,3 \pm 0,32	39,7 \pm 0,40
Фагоцитарный индекс, ед.	6,3 \pm 0,06	7,2 \pm 0,07

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% соответственно). Отмечено увеличение числа Т-лимфоцитов-хелперов и ФАН, ФИ в крови вакцинированных лисиц, при уменьшении количества цитотоксических Т-клеток.

2.4.4 Иммунный статус собак, вакцинированных против бешенства в сочетании с иммуностимуляторами

По данным ряда исследователей в РФ значительно участились случаи заболевания бешенством собак и кошек, что подтверждено и результатами наших исследований в процессе эпизоотологического мониторинга. При этом ни одно из погибших домашних животных не было вакцинировано (Арутюнова И.П., 2010; Березина Е.С., 2010; Иванов А.В. и др., 2010). Вместе с тем, вакцинация является одной из главных мер борьбы с бешенством непродуктивных домашних животных, особенно собак.

В связи с бурным развитием иммунологии, усилия многих исследователей направлены на разработку иммуностимулирующих и иммунокорректирующих препаратов, усиливающих иммунный ответ на введение вакцин (Петров Р.В. с соавт., 1983; Земсков В.М., Земсков А.М., 1984; Коромыслов Г.Ф. с соавт., 1985; Кенигсберг Я.Э., 1985; Лихолетов С.И., 1988; Донченко А.С. с соавт., 1995; Хабuzов И.П., 2004; Самбуров Н.В., 2006).

Целью исследований явилось изучение влияния иммуностимуляторов на усиление иммунного ответа у собак, иммунизированных различными антирабическими вакцинами, зарегистрированных для применения на территории России: Мультикан-8 (ЗАО «НПО Нарвак»), Нобивак-DHPPII+R («Интервет Интернэшнл»), Эурикан-DHPPI2-LR («Мериал», Франция). В экспериментах

использовали собак, принадлежащих Зональному Центру кинологической службы МВД по Республике Татарстан.

В качестве иммуностимулирующих препаратов использовали раствор циклоферона в концентрации 12,5% (ООО «Научно-технологическая фармацевтическая фирма Полисан», г. Санкт-Петербург) и 0,4%-ный раствор фоспренила (ЗАО «Микро-Плюс», г. Москва).

Было сформировано 4 опытных группы животных. Собак 1-й группы разделили на 2 подгруппы (по 3 гол. в каждой). Животных 1-й подгруппы иммунизировали вакциной «Нобивак-DHPPII+R» при одновременном введении циклоферона в дозе 125 мг (1 мл)/гол.; 2-й – вакциной «Нобивак-DHPPII+R» без иммуностимулятора.

Собак 2 группы разделили на 3 подгруппы (по 3 гол. в каждой) и вакцинировали антирабической вакциной «Мультикан-8». Животных 1-й подгруппы вакцинировали в сочетании с иммуностимулятором циклоферон; 2-й – в сочетании с иммуностимулятором фоспренил. Животные 3-й группы являлись контрольными (не вакцинированные).

Собак 3-й группы разделили на 3 подгруппы (по 3 гол. в каждой) и вакцинировали антирабической вакциной «Эурикан-DHPPI2-LR». Животных 1-й подгруппы вакцинировали в сочетании с иммуностимулятором циклоферон; 2-й – в сочетании с иммуностимулятором фоспренил; 3-й – без иммуностимулятора. 4-ю группу (3 гол.) составили интактные животные.

Сыворотки крови исследовали до вакцинации и на 21-е и 51-е сутки после вакцинации. Морфологические показатели крови: количество эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов, лейкоцитарную формулу определяли общепринятыми методами. Оценку специфического иммунного статуса проводили стандартными методами, включающими: определение содержания Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, коэффициент дифференцировки Т-лимфоцитов, фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН) и фагоцитарный индекс (ФИ).

Исследования по оценке эффективности вакцинопрофилактики бешенства проводили с использованием «Иммуноферментной тест-системы для определения

уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных, вакцинированных против бешенства методом непрямого иммуноферментного анализа», согласно инструкции по ее применению, разработанной в ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и утвержденной в установленном порядке. В качестве контрольной положительной сыворотки использовали отраслевой стандартный образец антирабической сыворотки (референс-сыворотка, сер. NCA-03 с активностью 20 МЕ/мл).

Установлен высокий уровень специфических антител к вирусу бешенства в сыворотках крови собак, взятых для исследований через 21 и 51 сутки после вакцинации всеми используемыми антирабическими вакцинами в сочетании с иммуностимулирующими препаратами. Он составил от 1:100 до 1:800 в непрямом ИФА, что соответствует активности 2,5-20,0 МЕ/мл.

Как известно, защитный от бешенства титр антител составляет 0,5 МЕ/мл. Следует отметить, что максимальный титр антител был получен на 51 сутки при использовании вакцины «Мультакин-8» в сочетании с циклофероном и фоспренилом. При этом титры специфических антител составили в ИФА от 1:400 до 1:800. Высокие показатели антителообразования были получены на 51 сутки после иммунизации собак вакциной «Нобивак-DHPPII+R» в сочетании с циклофероном, при этом титры специфических антител составили в ИФА от 1:200 до 1:800. При использовании вакцины «Эурикан-DHPPI2-LR» в сочетании с циклофероном и фоспренилом, титры антител составили от 1:200 до 1:400.

Таким образом, уровень антител в исследуемых пробах сывороток крови собак, взятых через 21 и 51 сутки после вакцинации различными антирабическими вакцинами в сочетании с иммуностимулирующими препаратами, обеспечивают надежную защиту животных от бешенства.

При исследовании крови собак I-й подгруппы до иммунизации вакциной «Нобивак-DHPPII+R» отмечено незначительное повышение количества лейкоцитов (на 6,6 %). В структуре лейкограммы изменений не выявлено. На 21 сутки после вакцинации была отмечена незначительная стимуляция лейкопоза (содержания лейкоцитов на 4,8% выше нормы). У животных активизировался

клеточный и гуморальный иммунитет, о чем свидетельствовало повышение содержания лимфоцитов (на 7,8%) и В-лимфоцитов (на 10,4%). У собак, вакцинированных без иммуностимулятора, аналогичных изменений не отмечено.

Изучением показателей естественной резистентности на 51 сутки после вакцинации установлено повышение содержания лейкоцитов (на 13,9%), фагоцитарной активности нейтрофилов (на 10,3%), содержания В-лимфоцитов (на 9,9%) и КДТЛ (на 8,7%). У собак, вакцинированных без иммуностимуляторов, изменений в содержании показателей крови не наблюдали, и они находились в пределах физиологической нормы.

В следующей серии опытов проводили изучение иммуногенеза при антирабической вакцинации вакциной «Мультикан-8» (II группа) в сочетании с циклофероном и фоспренилом. Установлено, что до вакцинации у животных показатели крови находились в пределах верхней границы физиологической нормы. Исследования, проведенные через 21 день после вакцинации, показали, что иммуностимуляторы на фоне вакцинации у собак всех 3-х подгрупп в разной степени оказывали стимулирующее действие на лейкопоз, клеточные и гуморальные факторы иммунитета, о чем свидетельствовало повышенное содержание лейкоцитов (на 23,4; 17,9 и 26,4 %), лимфоцитов (17,5; 43,5 и 13,7 %), В-лимфоцитов (на 33,2; 38,4 и 21,0 %), КДТЛ (на 11,1 и 44,4 %), ФАН (на 24,0; 29,7 и 17,2 %).

При иммунизации собак вакциной «Эурикан-DHPPI2-LR» (III группа) в сочетании с циклофероном и фоспренилом значительные изменения гематологических показателей наблюдали при исследовании крови собак на 21 сутки после вакцинации. Так, у собак всех трех подгрупп отмечено повышенное содержание лейкоцитов соответственно на 18,8; 16,5 и 2,2 %, эритроцитов – на 5,7; 15,6 и 17,1 %, гемоглобина – на 27,9; 21,9 и 25,4 %, лимфоцитов – на 49,0; 40,0 и 41,3 %, В-лимфоцитов – на 18,2; 41,7 и 3,3 %, ФАН – на 26,3; 12,7 и 12,3 %. Результаты гематологических и иммунологических исследований свидетельствуют об активации показателей естественной резистентности. Следует

отметить, что у животных, которых вакцинировали в сочетании с иммуностимуляторами, данные показатели были значительно выше.

Таким образом, изучением показателей естественной резистентности собак, вакцинированных различными антирабическими вакцинами: «Мультикан-8», «Нобивак-DHPPII+R» и «Эурикан-DHPPI2-LR» в сочетании с циклофероном и фоспренилом установлено увеличение числа Т- и В-лимфоцитов, а также повышение фагоцитарной активности нейтрофилов крови. Это свидетельствует об улучшении клеточных и гуморальных факторов неспецифической резистентности. Титры антител к вирусу бешенства в исследуемых пробах сывороток крови собак, взятых через 21 и 51 сутки после вакцинации различными антирабическими вакцинами в сочетании с иммуностимулирующими препаратами, обеспечивают защиту животных от бешенства. Одинаковые результаты по эффективности антирабической вакцинации в сочетании с иммуностимуляторами получены и с вакциной «Мультикан-8» в сочетании с циклофероном и фоспренилом, при этом максимальный титр специфических к вирусу бешенства антител отмечен через 51 сутки после вакцинации – 1:800 (20,0 МЕ/мл).

2.5 Разработка средств специфической профилактики бешенства

2.5.1 Препарат против бешенства для местной обработки ран при укусах человека плотоядными животными

Из-за чрезвычайной опасности и абсолютной летальности вопросы профилактики бешенства после повреждения человека, нанесенного больным или подозрительным на бешенство животным, имеют исключительно важное значение. Существующая во всем мире единая тактика профилактики заболевания после контакта с возбудителем инфекции, обеспечивается путем немедленной

местной обработки раны с последующим специфическим лечением антирабической вакциной, а в случаях тяжелых множественных укусов опасной локализации и антирабическим иммуноглобулином (по схеме, рекомендованной в инструкции по применению вакцины антирабической культуральной концентрированной очищенной инактивированной сухой и антирабического иммуноглобулина от 12.03.03 г.).

Ежегодно в мире свыше 10 млн. человек получают те или иные повреждения от разных видов животных. В РФ регистрируют 420-470 тыс. укушенных плотоядными животными людей в год (Мовсесянц А.А., 2011).

Проблема травматизма людей от укусов плотоядными животными продолжает нарастать. Так, по данным Управления «Роспотребнадзора по Республике Татарстан», количество пострадавших людей от укусов диких животных в последние годы возросло почти в два раза и составило 10,4 чел. на 100 тыс. населения (Иванов А.В. с соавт., 2010). На высоком уровне сохраняется удельный вес повреждений, нанесенных безнадзорными животными – 43%, причем это наиболее актуально для крупных городов региона.

Анализ обращаемости населения за медицинской помощью по поводу укусов различными животными свидетельствует о чрезвычайно высокой значимости первичной обработки ран с последующим специфическим лечением, причем эта проблема продолжает нарастать (Мовсесянц А.А. с соавт., 2003; Черкасский Б.Л. с соавт., 2005).

Наиболее опасны раны, нанесенные в области головы, шеи, плеч и рук, а также в незащищенных частях тела, так как одежда задерживает значительную часть слюны бешеного животного (Амироков М.М. и др., 2009).

Нами проанализирована локализация и определена структура повреждений людей (91 чел.), заболевших бешенством вследствие укусов дикими плотоядными животными. Установлено, что в 31,5% случаев (29 человек) животные наносили укусы в области головы и лица (нос, щека, губа), что отражено в таблице 40. У 27,2% заболевших (25 человек) были укусы пальцев рук, у 21,7% (20 человек) – укусы кистей рук, у 11,9% (11 человек) – стопы и голени, у 4,34% (4 человека) –

предплечья. Двое заболевших (2,2%), по сведениям из анамнеза, разделяли тушу лисицы. При этом в более чем половине случаев (52,2%) первичная обработка ран не проводилась или проводилась с большим опозданием.

Таблица 40 – Локализация и структура повреждений людей вследствие укусов дикими плотоядными животными

Локализация повреждений	Количество укушенных, чел.	Структура повреждений, %
Область головы и лица (нос, щеки, губы)	29	31,5
Пальцы рук	25	27,2
Кисти рук	20	21,7
Стопы и голени	11	11,9
Предплечья	4	4,3
Разделка туш плотоядных	2	2,2
Всего	91	100,0

Комитет экспертов ВОЗ по бешенству (8-й доклад: Серия технических докладов 864. – Женева, 1994) подчеркивает особую важность срочной местной обработки ран, следов укусов, царапин и мест ослюнений, которые могут быть инфицированы вирусом бешенства. Немедленная местная обработка ран, нанесенных животными, в порядке первой помощи может проводиться самим пострадавшим. Среди людей, проживающих в районах неблагополучия по бешенству, должна проводиться санитарно-просветительная работа по ознакомлению с простыми местными средствами обработки ран с учетом того, что удаление вируса бешенства из места заражения химическими или физическими методами является наиболее эффективным механизмом защиты.

Целью данного фрагмента исследований явилось создание нового комплексного антирабического препарата для обработки ран при укусах человека животными на основе эндонуклеазы бактериальной и Гемодеза-Н.

Препарат конструировали с использованием эндонуклеазы бактериальной в комбинации с водно-солевым раствором, содержащим 45-50%-ный «Гемодез-Н» и 0,125-1,0%-ный магний сульфат 7-водный. В качестве эндонуклеазы

бактериальной была взята 0,08%-ная эндонуклеаза бактерий *Serratia marcescens* в 1%-ном водном растворе хлорида натрия, причем «Гемодез-Н», магний сульфат и эндонуклеаза бактериальная взяты в соотношении 1:1:2, соответственно.

В результате введения водно-солевого раствора, включающего 45-50%-ный «Гемодез-Н» и 0,125-1,0%-ный магний сульфат, и использования 0,08%-ной эндонуклеазы бактериальной *Serratia marcescens* в 1%-ном водном растворе поваренной соли, взятых в соотношении 1:1:2 соответственно, создан новый комплексный препарат против бешенства с 31%-ной защитой. Препарат нетоксичен и отличается малой дозой введения – 0,8 мг/кг живой массы и, кроме того, расширился спектр действия эндонуклеазы бактериальной.

Технология приготовления препарата против бешенства заключается в следующем: 1 мл 45,0%-ного водно-солевого раствора «Гемодез-Н» смешивают с 1 мл 0,125%-ного водного раствора магния сульфата 7-водного. Затем полученную смесь смешивают при комнатной температуре с 2 мл 0,08%-ной эндонуклеазой бактерий *Serratia marcescens* в 1%-ном водном растворе хлорида натрия с активностью не менее 248000 ед/мл. Защитный эффект препарата составляет 31,0%.

Аналогичную защищенность от бешенства мы получали и при использовании 45,0-50,0%-ных водно-солевых растворов «Гемодез-Н» с 0,125-1,0%-ными растворами магния сульфата 7-водного и 0,08%-ной эндонуклеазой бактерий *Serratia marcescens* в 1%-ном водном растворе хлорида натрия. При этом в предварительных опытах изучали влияние растворов магния сульфата 7-водного и «Гемодеза-Н» на жизнеспособность белых мышей при внутримышечном и интрацеребральном введении в различных концентрациях. Зависимость токсического эффекта $MgSO_4 \times 7H_2O$ и «Гемодеза-Н» от их концентраций при интрацеребральном введении белым мышам представлена в таблице 41.

Из данных таблицы 41 видно, что магния сульфат семиводный в концентрации 2-25% весовых, что соответствует 200-80 ммоль/л, а также 100%-ный «Гемодез-Н» вызывали снижение жизнеспособности мышей, а в

концентрациях 0,125-1% (5-40 ммоль/л) магния сульфата 7-водного и 45-50% «Гемодез-Н» не оказывали влияния на жизнеспособность животных при их внутримышечном или интрацеребральном введении, следовательно, эти концентрации растворов не токсичны и могут быть использованы для инъекции.

Таблица 41 – Зависимость токсического эффекта $MgSO_4 \times 7H_2O$ и «Гемодеза-Н» от их концентраций при интрацеребральном введении белым мышам

Препарат	Концентрация, %	Выживаемость белых мышей, %
$MgSO_4 \times 7H_2O$	25	0
15	0	
5	60	
2,5	80	
2,0	90	
1	100	
0,5	100	
0,25	100	
0,125	100	
Гемодез-Н	100	
50	100	
45	100	

Для анализа антирабического эффекта сформировали 10 групп белых мышей по 20 голов в каждой (всего 200 гол.). Лабораторных животных заразили культурой эпизоотического вируса бешенства, штамм «Соб-2580», внутримышечно по 0,1 мл вирусной суспензии, в дозе 4 LD₅₀ / 0,1 мл. Через 2 часа в место инокуляции заражающего агента, вводили однократно по 0,1 мл испытуемого препарата. Дозу LD₅₀ эпизоотического вируса бешенства подбирали эмпирически.

Экспериментальный препарат, содержащий эндонуклеазу с активностью не менее 248000 ед/мл, в концентрации 0,8 мг/кг живой массы животного, 5 ммоль/л (0,125-1%-ный) магния сульфата 7-водного и 45-50%-ного водно-солевого раствора «Гемодез-Н» готовили непосредственно перед испытанием, смешивали сначала водно-солевой раствор «Гемодез-Н» с 0,125-1,0%-ным водным раствором

магния сульфата семиводного в объемном соотношении 1:1. На следующем этапе полученную смесь смешивали в равных объемных долях с водным раствором эндонуклеазы, содержащей 1% NaCl.

Зависимость антирабического эффекта препарата, от различных концентраций его составляющих, представлена в таблице 42, из которой следует, что отдельно взятые препараты и введенные внутримышечно инфицированным животным не оказывали антирабического эффекта (группы 2 и 3).

В то же время одноразовое введение его в малых дозах 0,8 мг эндонуклеазы на 1 кг массы животного в комплексе с 45-50%-ным «Гемодез-Н» и 0,125-1,0%-ного сульфата магния 7-водного обеспечивает 31%-ную защиту животных от бешенства (группа 6), а уменьшение содержания магния сульфата 7-водного – менее 0,125%, «Гемодез-Н» – менее 45% и эндонуклеазы – менее 0,08% снижает результат (группы 4, 5, 7 и 8).

Таблица 42 – Антирабический эффект экспериментального препарата в различных концентрациях, составляющих при заражении вирусом бешенства белых мышей

Группа	Состав препарата	Концентрация препарата	Смертность мышей, %	Повышение жизнеспособности, %
1	Вирус бешенства (контроль)	без препарата	55,0±0,51	0
2	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO ₄ ×7H ₂ O	0 45,0-50,0 0,125-1,0	55,0±0,51	0
3	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,08 0 0	55,0±0,51	0
4	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,033 45,0-50,0 0,125-1,0	50,0±0,5	5,0±0,5
5	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,066 45,0-50,0 0,125-1,0	35,0±0,3	20,0±1,0
6	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,08 45,0-50,0 0,125-1,0	24,0±0,2	31,0±0,30

7	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,08 45,0-50,0 0,01	35,0±0,2	20,0±0,21
8	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,08 45,0-50,0 0,001	50,0±0,5	5,0±0,5
9	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,08 35,0 0,125-1,0	29,0±0,2	26,0±0,3
10	Эндонуклеаза Гемодез-Н MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,08 25,0 0,125-1,0	36,0±0,4	19,0±0,1

Таким образом, сконструированный препарат против бешенства для местной обработки ран при укусах человека животными на основе эндонуклеазы бактерий *Serratia marcescens* и Гемодеза-Н обладает выраженным антирабическим действием, нетоксичен и прост в изготовлении, что явилось предметом изобретения РФ (Приложение 12).

2.5.2 Вакцина против бешенства

для оральной иммунизации диких плотоядных животных

Меры борьбы с бешенством диких плотоядных, а также бездомных животных основана на двух основных составляющих: регулирование численности и вакцинация с помощью оральных вакцин (Заволока А.А., 2013; Елаков А.Л., 2013). МЭБ рекомендовано поддерживать численность лисиц, как основных переносчиков вируса бешенства, на уровне не более 1-2 животных на 10 км², что должно обеспечить эпизоотическое благополучие территории. Однако эта рекомендация приемлема лишь для условий Западной Европы и является лишь временной мерой (Ведерников В.А. и др., 1974; Метлин А.Е. и др., 2009).

В условиях России, с ее огромными площадями, ландшафтно-географическим многообразием и природно-климатическими условиями

территории, регулирование численности диких плотоядных не вполне приемлемо и трудно осуществимо. В связи с этим в качестве действенной меры профилактики бешенства диких плотоядных, являющихся природным резервуаром болезни, на территории РФ остается оральная вакцинация.

Целью исследований явилось создание вакцины для оральной иммунизации плотоядных животных, а также разработка технологии ее изготовления, обладающей высокой антигенной и иммуногенной активностью и стабильностью, безвредностью, привлекательностью и высокой поедаемостью в условиях дикой природы. Кроме того, вакцина должна быть технологически приемлема для массового производства и широкого практического применения.

В качестве основных компонентов для конструирования вакцины против бешенства для оральной иммунизации диких плотоядных животных нами использованы вакцинный штамм вируса бешенства, выращенный в перевиваемой культуре клеток и пищевые и формообразующие компоненты.

В качестве вакцинного штамма была взята культуральная жидкость, содержащая авирулентный штамм вируса бешенства с титрами инфекционности $6,0-8,5 \lg \text{FFU}_{50}/\text{см}^3$, а в качестве пищевых и формообразующих компонентов – рыбную муку, говяжий жир, парафин или пищевой полимер и неочищенное зерно хлебных злаков. Кроме того, вакцина в своем составе дополнительно содержит маркер-тетрациклин.

В качестве авирулентного штамма вируса бешенства нами взят штамм вируса РВ-97 или ERA G333, в качестве неочищенного зерна хлебных злаков – зерно пшеницы, ржи, ячменя, овса, а в качестве пищевого формообразующего полимера – коллаген, крахмал или целлюлоза. Использование неочищенного зерна хлебных злаков в составе вакцины, позволяет нарушать целостность слизистой ротовой полости животных, что увеличивает эффект вакцинации. В качестве пищевых приманок использовали рыбную муку и говяжий жир, как отличающиеся специфическими вкусом и запахом, и привлекающими их поедание.

Вакцинный штамм вируса бешенства выращивали в перевиваемых монослойно-суспензионных сублиниях клеток почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21/13-02 или почки сайги. Полученную культуральную жидкость, содержащую авирулентный штамм вируса бешенства с титром инфекционности $6,0-8,5 \lg \text{FFU50}/\text{см}^3$, замораживали при температуре минус 20-40°C.

На следующем этапе тетрациклин, парафин, неочищенное зерно хлебных злаков, рыбную муку и говяжий жир тщательно перемешивали в течение 25-30 мин. при температуре 55-60°C и полученную массу разливали в пластиковые формы при температуре 40-45°C. В каждую ячейку формы помещали культуральную жидкость с авирулентным штаммом вируса бешенства и замораживали при температуре минус 20-40°C. В качестве контейнера для культуральной жидкости, содержащей авирулентный штамм вируса бешенства, использовали пакеты из полиэтилена или желатиновые блистеры.

Антибиотик тетрациклин использован нами в составе экспериментальной вакцины в качестве маркера, так как при заглатывании вакцины тетрациклин накапливается в тканях зубов животных и по его количеству можно определить количество съеденной приманки и, соответственно – вакцины.

В процессе исследований нами отработано 14 различных вариантов состава и технологии приготовления оральной вакцины против бешенства, что отражено в таблице 43.

Приведем один из примеров (вариант 1) технологии приготовления вакцины для оральной иммунизации плотоядных против бешенства.

Для приготовления вакцины используют сухой культуральный матровый вирус бешенства штамм РВ-97 с титром $6,0 \lg \text{FFU50}/\text{см}^3$ и перевиваемые клетки ВНК-21, выращенные в 10-роллерных бутылках. К снятым со стекла $6,0 \times 10^9$ клеткам добавляют 10 мл вируса. После этого клетки, инфицированные вирусом в дозе 0,003 МЛД 50/клетку, вносят в 100-литровый реактор, содержащий 20 литров питательной среды, приготовленной на основе питательных сред Игла 199, гидролизата лактальбумина и сыворотки крови крупного рогатого скота.

Таблица 43 – Состав различных вариантов экспериментальной вакцины против бешенства для оральной иммунизации диких плотоядных животных

Вариант	Культуральная жидкость вируса бешенства			Тетрациклин	Парафин, пищевой полимер	Зерно злаков	Рыбная мука	Говяжий жир
	штамм	титр	Масс. %					
1	PB-97	6,0 lg	1,0	0,3	п – 5,0	5,0	30,0	ост.
2	PB-97	8,5 lg	4,0	1,2	п – 10,0	15,0	40,0	ост.
3	ERA G333	6,3 lg	1,0	0,3	п – 5,0	5,0	30,0	ост.
4	ERA G333	8,5 lg	4,0	1,2	п – 10,0	15,0	40,0	ост.
5	PB-97	6,3 lg	1,0	0,3	п.п – 5,0	5,0	30,0	ост.
6	PB-97	8,5 lg	4,0	1,2	п.п – 10,0	15,0	40,0	ост.
7	ERA G333	6,0 lg	1,0	0,3	п.п – 5,0	5,0	30,0	ост.
8	ERA G333	8,5 lg	4,0	1,2	п – 10,0	15,0	40,0	ост.
9	ERA G333	6,0 lg	1,0	0,3	п.п – 5,0	5,0	30,0	ост.
10	ERA G333	8,5 lg	4,0	1,2	п – 10,0	15,0	40,0	ост.
11	PB-97	6,0 lg	1,0	0,3	п – 5,0	5,0	30,0	ост.
12	PB-97	8,5 lg	4,0	1,2	п – 10,0	15,0	40,0	ост.
13	ERA G333	6,0 lg	1,0	0,3	п. – 5,0	5,0	30,0	ост.
14	ERA G333	8,5 lg	4,0	1,2	п – 10,0	15,0	40,0	ост.

Примечание: п – парафин, п.п. – пищевой полимер, ост. – остальное

Инфицированные клетки выращивают при постоянном вращении мешалки со скоростью 30-120 об/мин с подачей в жидкую фазу стерильного воздуха. В конкретном примере, через 45 часов культивирования общее количество клеток в реакторе достигло величины $3,2 \times 10^{10}$. После их осаждения и удаления отработанной питательной среды в реактор вносят 60 литров свежей питательной среды и микроносители, например Цитодекс-2, с общей полезной поверхностью около 150000 см^2 . На каждый 1 см^2 носителя пришлось $2,1 \times 10^5$ клеток и 0,4 мл питательной среды.

Дальнейшее культивирование инфицированных клеток проводят при постоянном вращении мешалки со скоростью 30-70 об/мин с проведением сборов вирусосодержащей жидкости через каждые 24 часа, с одновременной заменой питательной среды. При этом в состав питательной среды вначале вносят

сыворотки в конечной концентрации 1%, а затем на 2, 3, 4 сутки культивирования доводят до концентрации сыворотки в питательной среде 2%, 3%, 7%, соответственно. Объем каждого сбора составляет 55-56 литров. Всего получено из одного сосуда культивирования (100-литрового реактора) 6 сборов вирусосодержащего материала общим объемом около 330 литров.

Получена культуральная жидкость, содержащая авирулентный штамм вируса бешенства РВ-97 с титром инфекционности $6,0 \lg \text{FFU } 50/\text{см}^3$, которую замораживают при температуре минус 20°C по 1 г. Далее смешивают: 0,3 г тетрациклина, 5 г парафина, 5 г неочищенного овса, 30 г рыбной муки и 58,7 г говяжьего жира. Смесь тщательно перемешивают в реакторе в течение 25 минут при температуре 55°C , помещают в пластиковую форму и распределяют ее шпателем по всей площади формы.

Во время розлива готовой массы поддерживали ее температуру в пределах $40,0^\circ\text{C}$ в течение всего времени розлива. В форму (пластиковые формы для изготовления вакцины имеют соотношение размера ширины, высоты и длины, равное 1:1,0:2,0 соответственно, а вес готовой вакцины, помещаемой в пластиковые формы, составляет 100 г) помещали 1 г замороженной культуральной жидкости, содержащей авирулентный штамм вируса бешенства РВ-97 с титром инфекционности $6,0 \lg \text{FFU } 50/\text{см}^3$, и шпателем разравнивают поверхность формы. Заполненную форму помещали в морозильную камеру и замораживают при температуре минус 20°C , получая при этом вакцину против бешенства для оральной иммунизации диких плотоядных животных.

Готовые вакцины испытывали на прочность (при свободном падении с высоты 10 м вакцина оставалась целой), влагоустойчивость в деминерализованной воде (при экспозиции в течение 24 часов при 20°C вакцина сохраняла форму), контаминацию грибной и бактериальной микрофлорой (количество микробных тел в 1 см^3 приманки не превышает 500), стабильность вирусосодержащего материала (инфекционная активность вакцинного вируса, помещенного в приманки, не изменялась в течение 15 дней при температуре 4°C и в течение 10 дней при 20°C), безвредность (пятикратные дозы, скормленные 6-

месячным щенкам лисиц, не вызывали видимых клинических изменений в течение 60 суток, интрацеребральное введение $6,0 \text{ Ig FFU50/см}^3$ пяти лисицам и пяти песцам не вызывало клинических признаков бешенства, и все животные оставались клинически здоровыми в течение 90 дней).

Через 60 суток после иммунизации 7 из 11 лис, иммунизированных одной дозой вакцины, имели титры вируснейтрализующих антител выше минимально допустимого предела в 0,5 МЕ, и 10 из 11 лисиц (91%) выжили после контрольного заражения вирулентным вирусом бешенства.

Вакцина для орального применения сохраняла свои иммунобиологические характеристики в течение 6 мес. хранения при температуре минус 20 °С.

Таким образом, предлагаемая технология изготовления позволяет получить безвредную и стабильную вакцину против бешенства с высокой иммунологической эффективностью при оральной иммунизации плотоядных животных, обладающую пищевой привлекательностью и высокой поедаемостью в природных условиях. Сконструированная нами вакцина и способ ее приготовления, имеющие приоритет научной новизны, явились предметом изобретения РФ (Приложение 13).

2.6 Контроль эффективности оральной вакцинации против бешенства диких плотоядных животных

Одной из причин сохранения неблагополучия по бешенству в России является недостаточный охват вакцинацией и отсутствие контроля эффективности вакцинопрофилактики диких, сельскохозяйственных и домашних животных. Нами проведены широкомасштабные исследования по контролю эффективности оральной вакцинопрофилактики бешенства диких плотоядных животных в различных регионах России, в частности, в Смоленской, Калининградской областях и Республике Татарстан.

Смоленская область. Исследования проводились согласно «Программе мероприятий по изучению эффективности антирабической вакцины для перорального применения на территории Смоленской области» с участием ФГУ «ВГНКИ», Главного управления ветеринарии Смоленской области и Департамента Смоленской области по охране, контролю и регулированию использования объектов животного мира и среды их обитания», утвержденной ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 14.01.2011 г. (Приложение 14).

Оральная вакцинация диких плотоядных животных на территории Смоленской области проводится ежегодно с 1998 г. с перерывами в отдельные годы. Раскладку вакцины осуществляли вручную. Для профилактики бешенства в дикой фауне в разные годы применялись различные антирабические вакцины. С 2012 г. для оральной иммунизации диких плотоядных использовалась вакцина Рабивак-0/333 (ОАО «Покровский завод биопрепаратов»). После каждого этапа вакцинации проводили диагностический отстрел диких плотоядных животных.

Целью исследований явился контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства плотоядных дикой фауны на территории Смоленской области за 2011- 2012 гг. Эффективность вакцинопрофилактики контролировали по эпизоотологическим показателям отчетных данных ГУВ Смоленской области.

Всего исследовано по 158 проб головного мозга, глазной жидкости и костной ткани диких плотоядных животных, в т.ч. 107 проб от лисиц, 34 – от енотовидных собак, 2 – от волков и 1 – от хоря, отстрелянных на территории региона до и после проведения антирабической вакцинации.

В работе использовали производственный фиксированный штамм вируса бешенства ««Овечий» ГНКИ и стандартный CVS; 10000 белых мышей, в реакции нейтрализации культуру клеток ВНК-21 С13 и для диагностического выделения вируса бешенства – биопробу на белых мышах и в культуре клеток НГУК-1.

Пробы мозга анализировали в реакции иммунофлуоресценции (РИФ) с использованием «Флуоресцирующего антирабического глобулина» и методом

иммуноферментного анализа (ИФА) с применением «Набора препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа (ИФА)» (разработчик: ФГБУ «ФЦТРС-ВНИВИ»), зарегистрированными в РФ. При получении отрицательных результатов в РИФ и ИФА дополнительно ставили биологическую пробу на белых мышах (ГОСТ 26075-84) или в культуре клеток НГУК-1. Уровень антител в глазной жидкости вакцинированных животных определяли в блок-ИФА по авторской методике (Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М. Сабилова В.В. и др., 2012) и реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21/13 с использованием вируса бешенства CVS-11 по методике, рекомендованной МЭБ (2004). В качестве контрольной положительной сыворотки использовали отраслевой стандартный образец антирабической сыворотки (серия НСА-03 с активностью 20 МЕ/мл).

Контроль поедаемости оральной антирабической вакцины проводили согласно «Методическим указаниям по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в ткани зубов и костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин» (ВНИИЗЖ, Владимир).

Из 144 особей, подвергшихся вакцинации, в 40 случаях установлено наличие тетрациклина в зубах и (или) ветви нижней челюсти, что составило 27,8%, в т.ч. у 32 лисиц (29,9%), из которых выработали антирабические антитела 19 или 59,4%. Из 34 енотовидных собак, 8 особей получили антирабическую вакцину (23,5%) и выработали специфические антитела 4 особи (50%). При этом антиген вируса бешенства в пробах мозга вакцинированных животных не обнаружен. Результаты серологических тестов (ИФА и ИФ) подтверждены в биопrobe на белых мышах и в культуре клеток НГУК-1. Кроме того, в зонах проведения вакцинации бешенство установлено в 13 пробах головного мозга животных. При этом тетрациклин в пробах зубов и челюстей этих животных не обнаружен, что свидетельствует об отсутствии поедаемости антирабической вакцины.

Таким образом, поедаемость приманок лисицами в зонах оральной вакцинации составила 29,9%, уровень сероконверсии – 59,4%; поедаемость приманок енотовидными собаками 23,5% и сероконверсия 50%.

Калининградская область. В 2006 г. разработана «Программа по ликвидации бешенства на территории Калининградской области», в соответствии с которой оральная вакцинация диких плотоядных животных проводится ежегодно с 2007 г. по настоящее время.

Оральную вакцинацию в разные годы проводили с использованием антирабических вакцин из разных штаммов: в 2007-2011 гг. – «Оралрабивак» из штамма «РВ-97», в 2012- 2014 гг. – «Рабивак» из штамма «ERA 0/333». В 2007-2009 гг. оральную вакцинацию проводили однократно, с 2010 г. – дважды в год: весной и осенью. В разные периоды отличался и способ раскладки вакцины. Так, в 2007 г. ее раскладку проводили вручную, в 2008-2010 гг. – с применением малой авиации, и частично, вручную, с 2011-2014 гг. – с помощью малой авиации.

Исследования проведены согласно гражданско-правовому договору № 135200000130000364-0267994 от 11.06.2013 г. «Дать оценку эффективности вакцинации диких плотоядных животных против бешенства на территории Калининградской области». По результатам исследований составлен соответствующий отчет (Приложение 15).

Объектом исследований явились 100 проб головного мозга для диагностики бешенства, 100 проб сывороток крови и глазной жидкости для определения титра антирабических антител и 100 проб костной ткани (нижняя челюсть, зубы) для определения наличия тетрациклина.

Исследования проводили методом иммунофлуоресценции (ИФ) в прямом варианте (ГОСТ 26075-84) с использованием «Флуоресцирующего антирабического глобулина», разработанного ФГБУ «ФТЦРБ-ВНИВИ», ТУ 9388-027-00492374-2007, зарегистрированного в РФ № ПВР-1-4.9/00196 и сертифицированного в ФГБУ «ВГНКИ», № РОСС RU.ВП01.Р00352. Анализ проб головного мозга проводили на люминесцентном микроскопе Nikon (Япония).

В работе использовали также иммуноферментный анализ (ИФА), который проводили на 96-луночных микротитрационных планшетах для иммунологических реакций из полистирола «Пл-Б-М», ТУ 9393-009-16548645-2005. Для определения антигена вируса бешенства применяли прямой сэндвич-вариант ИФА с использованием «Набора препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа (ИФА)», ТУ 9388-025-00492374-2007, сертифицированного в ФГБУ «ВГНКИ», № РОСС RU.ВФ01.Д12101. При получении отрицательного результата в ИФА ставили биопробу на белых мышах или в культуре клеток НГУК-1.

Для определения уровня антител в сыворотках крови иммунизированных животных применяли непрямой вариант ИФА с использованием антивидовых пероксидазных конъюгатов – антител диагностических против иммуноглобулина лисиц или белок А, меченные пероксидазой, а также в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 С13 по методике, рекомендованной МЭБ (Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test, OIE Manual, 2004). В качестве контрольной положительной сыворотки использовали отраслевой стандартный образец антирабической сыворотки (референс-сыворотка), серия NCA-03 с активностью 20 МЕ/мл.

Поедаемость оральной антирабической вакцины определяли согласно «Методическим указаниям по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в тканях зубов и костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин» (ВНИИЗЖ). Срезы зубов и костей ветви нижней челюсти изготавливали толщиной 0,5-1,0 мм на малогабаритном настольном токарном станке «Корвет-402» (Россия).

Обнаружение тетрациклина учитывали на люминесцентном микроскопе Nikon, оснащенного фильтрами от 400 до 600 нм. Образцы исследовали при увеличении $\times 40$ и считали положительными, если при просмотре в ткани зуба или кости в поле зрения микроскопа были видны тонкие кольца, полукольца или дуги желтого цвета. В препаратах, не содержащих маркер-тетрациклин, на равномерно светящемся поле подобных образований не отмечали.

В результате исследования 100 проб головного мозга лисиц (89 особей) и енотовидных собак (11 особей) методом иммунофлюоресценции, иммуноферментного анализа и в биопrobe на белых мышах антиген вируса бешенства во всех пробах не обнаружен, то есть все животные в отношении бешенства в период отстрела были здоровыми.

При исследовании проб костной и зубной ткани наличие тетрациклина выявлено у 63 особей, то есть поедаемость приманок с оральной вакциной составила 63% (таблица 44). При этом из 89 лисиц приманку съели 58 лисиц, то есть поедаемость составила 65,2%. Из 11 енотовидных собак тетрациклин обнаружен у 5-ти (поедаемость 45,5%). Маркер-тетрациклин чаще обнаруживали в пробах костной ткани нижней челюсти плотоядных – 45,4%.

Установлено, что в зубной ткани антибиотик находился в 28,6% случаев (18 гол.). В 17 пробах тетрациклин обнаружен одновременно в зубной и нижнечелюстной тканях, что составило 27%. Полученные данные свидетельствуют о необходимости обязательного исследования на наличие тетрациклина как зубной ткани, так и проб костной ткани нижней челюсти.

Из числа животных, получивших оральную вакцину (63 гол.), у 39 особей, или у 61,9% от вакцинированных животных выработались специфические к вирусу бешенства антитела (с титром в ИФА от 1:50 до 1:200 при коэффициенте специфичности более или равном 2,1), а также в реакции нейтрализации в культуре клеток, равном или более 0,5 МЕ/мл.

Этот показатель среди лисиц составил 63,8% (58 получили вакцину, у 37 выработались антитела), среди енотовидных собак – 45,4%.

Таблица 44 – Результаты исследований сыворотки крови, зубов и костной ткани диких плотоядных животных, отстрелянных на территориях оральной вакцинации в Калининградской области

№ пробы	Вид животного	Район	Титр антител			Наличие тетрациклина	
			ИФА		РН, МЕ/мл	+, –	локализация
			разведение	К _{СП}			
1	лиса	Полесский	1:100	2,4	1,25	+	ч
2	лиса	Полесский	1:100	2,5	1,25	+	з
3	Лиса	Гурьевский	–	–	–	–	–
4	лиса	Гурьевский	–	–	–	–	–
5	лиса	Гурьевский	1:50	2,1	0,625	+	ч
6	лиса	Неманский	–	–	–	–	–
7	лиса	Славский	–	–	–	–	–
8	лиса	Славский	1:100	2,1	1,25	+	з, ч
9	лиса	Гурьевский	1:100	2,4	1,25	+	з, ч
10	лиса	Гурьевский	–	–	–	–	–
11	лиса	Гурьевский	1:100	2,1	1,25	+	з, ч
12	лиса	Славский	–	–	–	+	з, ч
13	Лиса	Багратионовский	–	–	–	–	–
14	лиса	Гвардейский	1:100	2,1	1,25	+	з, ч
15	лиса	Гвардейский	1:100	2,1	1,25	+	з, ч
16	лиса	Краснознаменский	1:100	2,1	1,25	+	з, ч
17	лиса	Краснознаменский	–	–	–	–	–
18	лиса	Краснознаменский	–	–	–	+	ч
19	лиса	Полесский	–	–	–	–	–
20	лиса	Багратионовский	–	–	–	+	ч
21	лиса	Славский	–	–	–	+	ч
22	лиса	Славский	1:100	2,7	1,25	+	ч
23	лиса	Славский	1:100	2,1	1,25	+	з
24	лиса	Багратионовский	–	–	–	+	ч
25	лиса	Нестеровский	1:50	2,1	0,625	+	ч
26	лиса	Нестеровский	1:50	2,1	0,625	+	з
27	лиса	Нестеровский	1:100	2,1	0,625	+	з
28	лиса	Нестеровский	1:100	2,3	0,625	+	з, ч
29	лиса	Нестеровский	1:100	2,5	0,625	+	ч
30	лиса	Багратионовский	–	–	–	–	–
31	лиса	Багратионовский	1:50	2,1	0,625	+	з
32	лиса	Багратионовский	1:100	2,4	1,25	+	ч
33	лиса	Багратионовский	–	–	–	–	–

34	лиса	Багратионовский	1:50	2,1	0,625	+	з
35	лиса	Багратионовский	1:100	3,8	1,25	+	з
36	лиса	Краснознаменский	1:50	2,1	0,625	+	з
37	лиса	Краснознаменский	1:50	2,5	0,625	+	ч
38	лиса	Краснознаменский	1:100	4,0	1,25	+	ч
39	лиса	Краснознаменский	—	—	—	—	—
40	лиса	Краснознаменский	1:50	2,1	0,625	+	з
41	лиса	Краснознаменский	—	—	—	—	—
42	лиса	Багратионовский	—	—	—	—	—
43	лиса	Багратионовский	—	—	—	—	—
44	лиса	Неманский	—	—	—	—	—
45	лиса	Неманский	—	—	—	+	з
46	ЕС	Неманский	—	—	—	+	з
47	лиса	Нестеров	—	—	—	+	з
48	лиса	Нестеров	1:50	2,1	0,625	+	з, ч
49	лиса	Нестеров	—	—	—	—	—
50	лиса	Нестеров	1:200	2,1	1,25	+	з, ч
51	лиса	Нестеров	—	—	—	+	ч
52	лиса	Нестеров	—	—	—	—	—
53	лиса	Нестеров	—	—	—	+	ч
54	лиса	Краснознаменский	—	—	—	+	ч
55	лиса	Краснознаменский	—	—	—	—	—
56	лиса	Краснознаменский	1:200	2,4	1,25	+	з, ч
57	лиса	Гвардейский	—	—	—	+	з
58	лиса	Неманский	1:100	2,0	1,25	+	з
59	лиса	Полесский	1:100	2,3	1,25	+	ч
60	лиса	Неманский	1:100	2,2	1,25	+	ч
61	ЕС	Неманский	—	—	—	+	ч
62	лиса	Гурьевский	—	—	—	—	—
63	лиса	Гурьевский	—	—	—	+	ч
64	лиса	Гвардейский	1;100	2,4	1,25	+	ч
65	лиса	Гвардейский	—	—	—	—	—
66	лиса	Неманский	—	—	—	—	—
67	ЕС	Неманский	—	—	—	—	—
68	лиса	Полесский	1:50	2,1	0,625	+	з
69	лиса	Полесский	—	—	—	+	з, ч
70	лиса	Полесский	—	—	—	—	—
71	ЕС	Гвардейский	—	—	—	—	—
72	ЕС	Гвардейский	—	—	—	—	—
73	ЕС	Гвардейский	—	—	—	+	з, ч
74	ЕС	Полесский	—	—	—	—	—
75	лиса	Гвардейский	—	—	—	—	—
76	лиса	Гвардейский	1:50	2,1	0,625	+	ч

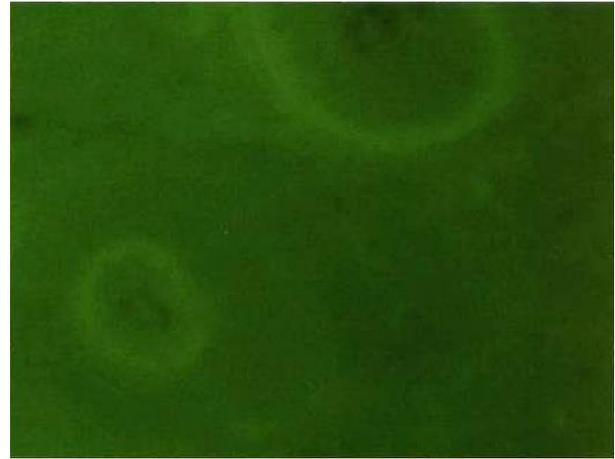
77	лиса	Гвардейский	1:100	3,1	1,25	+	ч
78	лиса	Гвардейский	–	–	–	–	–
79	лиса	Гвардейский	–	–	–	–	–
80	ЕС	Гусев	1:100	2,4	1,25	+	з
81	ЕС	Гусев	–	–	–	–	–
82	ЕС	Гусев	–	–	–	–	–
83	лиса	Гусев	–	–	–	–	–
84	лиса	Гусев	–	–	–	–	–
85	лиса	Гусев	–	–	–	–	–
86	лиса	Гусев	–	–	–	–	–
87	ЕС	Гусев	1:100	3,3	1,25	+	ч
88	лиса	Гусев	–	–	–	–	–
89	лиса	Гусев	–	–	–	+	з
90	лиса	Зеленоградский	–	–	–	+	ч
91	лиса	Зеленоградский	–	–	–	+	з
92	лиса	Зеленоградский	–	–	–	+	з, ч
93	лиса	Нестеров	–	–	–	–	–
94	лиса	Нестеров	–	–	–	–	–
95	лиса	Зеленоградский	1:100	2,4	1,25	+	з
96	лиса	Зеленоградский	–	–	–	+	з
97	лиса	Зеленоградский	1:100	2,4	1,25	+	ч
98	лиса	Зеленоградский	–	–	–	+	з, ч
99	лиса	Зеленоградский	–	–	–	+	ч
100	лиса	Зеленоградский	–	–	–	+	ч

Примечание: ЕС – енотовидная собака; ч – челюсть, з – зубы

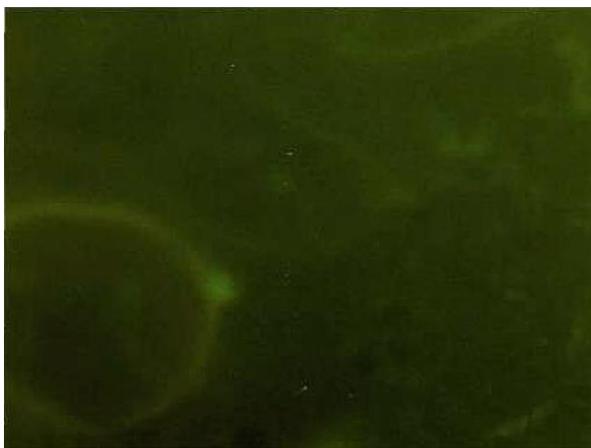
На рисунках 59, 60 и 61 выборочно представлены пробы с положительной флуоресценцией тетрациклиновой метки в зубной и нижнечелюстной тканях обследованных лисиц и енотовидных собак, а также пробы, в которых тетрациклин отсутствовал.



Проба № 8



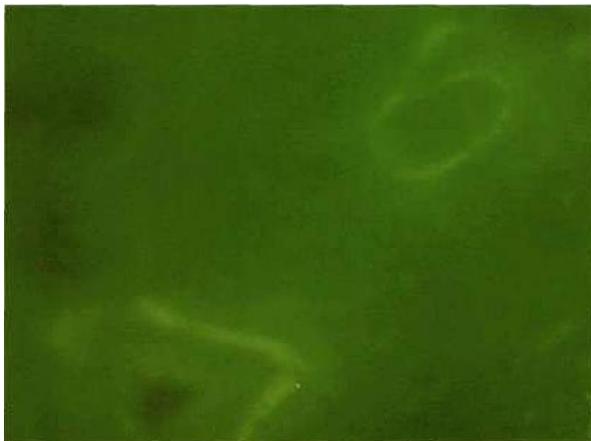
Проба № 14



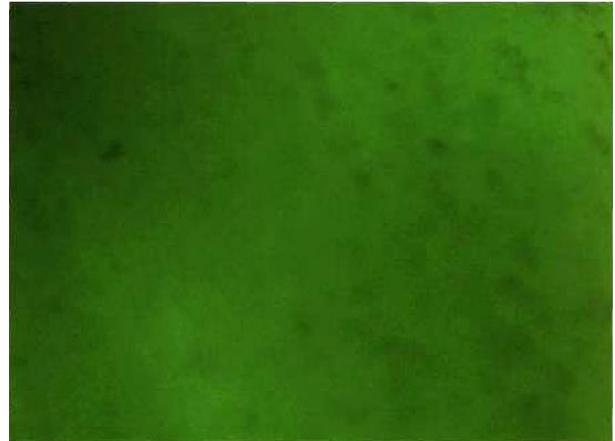
Проба № 20



Проба № 48



Проба № 56



Проба № 100

Рисунок 59 – Срезы тканей нижней челюсти лисиц, содержащих тетрациклин (пробы № 8, 14, 20, 48 и 56). Срез ткани нижней челюсти лисицы, не содержащей тетрациклин (проба № 100)



Проба № 9



Проба № 28



Проба № 57



Проба № 89



Проба № 98

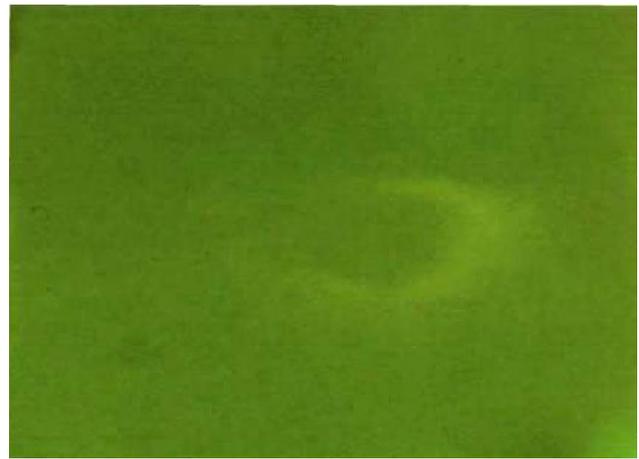


Проба № 4

Рисунок 60 – Срезы тканей зуба лисиц (пробы №, 9, 28, 57, 89 и 98), содержащих тетрациклин. Срез ткани зуба лисицы, не содержащей тетрациклин (проба № 4)



Проба № 73



Проба № 87



Проба № 71б



Проба № 82а

Рисунок 61 – Срезы тканей зуба (проба № 73) и нижней челюсти (проба № 87) енотовидных собак, содержащих тетрациклин. Срез ткани нижней челюсти (проба № 71б) и тканей зуба енотовидных собак (проба № 82а), не содержащих тетрациклин

Таким образом, поедаемость оральных вакцин лисицами составила 65,2%, енотовидными собаками – 45,4%; эффективность специфической профилактики бешенства (сероконверсия) соответственно 61,9 и 40%. Разница в показателях поедаемости и специфической эффективности связана, по-видимому, с жесткостью блистера приманки, внутри которого содержится вакцина, которая отличается по доступности для лисиц и енотовидных собак, а также видовыми особенностями иммунного ответа.

Установлено, что эффективность антирабической оральной иммунизации диких плотоядных животных зависит от вида применяемой вакцины, кратности и способа её раскладки. Так, раскладка вакцины с применением малой авиации, по нашим наблюдениям, является более эффективной на 20-30% по показателю поедаемости, что связано, по всей видимости, с отсутствием отпугивающих «следовых запахов» человека, что, в свою очередь, отражается на уровне заболеваемости бешенством диких плотоядных животных.

Выявлено, что заболеваемость бешенством животных в целом в Калининградской области имеет обратную корреляционную зависимость от объема оральной вакцинации диких плотоядных и кратности применения антирабической вакцины (коэффициент корреляции $r = -0,66$).

Кроме того установлено, что поедаемость оральных вакцин при двукратном применении и их раскладки с применением малой авиации отличалась, и составила 70,3% при использовании вакцины «Оралрабивак» в 2011 г. и 65% при использовании вакцины «Рабивак» из штамма «ERA 0/333» (2012- 2014 гг.). При этом заболеваемость бешенством диких плотоядных животных в 2012 г. снизилась в два раза (7 случаев), а в 2013-2014 гг. бешенство не регистрировали, что свидетельствовало о большей эффективности антирабической вакцины «Рабивак» из штамма «ERA 0/333».

Таким образом, вакцинопрофилактика бешенства в дикой фауне на территории Калининградской области за 2007-2013 гг. оказалась эффективной. В 2013-2014 гг. бешенство среди всех видов животных в целом в регионе не регистрировали. Тем не менее, несмотря на достигнутое благополучие по данной инфекции, на основании собственных исследований и рекомендаций МЭБ, ВОЗ и ЕС на территории Калининградской области, рекомендуем проводить непрерывное наблюдение и эпидемиологический скрининг для обнаружения или исключения любых новых вспышек бешенства на ранней стадии. Для создания популяционного иммунитета среди дикой фауны на территории Калининградской области, рекомендуем продолжать кампанию по оральной вакцинации и контролю эффективности ее проведения.

Республика Татарстан. На базе ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» осуществлен контроль эффективности оральной вакцинопрофилактики бешенства лисиц в РТ за 2013-2014 гг. Раскладку вакцины «Рабивак-0/333» (ООО «Покровский завод биопрепаратов») осуществляли вручную. Для контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства в дикой фауне исследовали по 397 проб головного мозга, глазной жидкости и костной ткани лисиц, отстрелянных на территории проведения вакцинации.

Установлено, что из 397 исследованных лисиц после отстрела в зонах вакцинации, антирабическую вакцину получили 170 особей (положительных по тетрациклину в зубах или челюстях), что составило 42,8%. При этом в поле зрения люминесцентного микроскопа наблюдали тонкие кольца, полукольца или дуги желтого цвета. В препаратах, не содержащих тетрациклин, на равномерно светящемся поле, подобных образований не отмечено. Из 170 лисиц, получивших вакцину, 134 особи выработали специфические к вирусу бешенства антитела (с титром антител в ИФА от 1:50 до 1:200 при $K_{сп}$ более или равным 2,0, соответствующие в реакции нейтрализации более или равным 0,5 МЕ/мл), что составило 78,8% от вакцинированных животных. Таким образом, 78,8% лисиц, иммунизированных оральной антирабической вакциной, защищены от заражения бешенством.

Суммируя результаты широкомасштабного контроля эффективности оральной вакцинопрофилактики бешенства диких плотоядных в различных регионах России, можно заключить, что поедаемость лисицами приманок 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 по показателю сероконверсии варьировала от 59,4 до 79,8 у лисиц и 40-50% у енотовидных собак.

Считаем целесообразным начинать кампании оральной вакцинации диких плотоядных в периоды циклических спадов эпизоотии бешенства. Первостепенными задачами являются ликвидация выявленных в ходе

эпизоотологического надзора очагов стационарного неблагополучия и создание защитных иммунных барьеров в угрожаемых зонах (кордонная вакцинация).

В связи с обширностью ареала природного бешенства целесообразно ориентироваться на раскладку приманок с вакциной у обитаемых лисьих нор. Кампании оральной иммунизации рекомендуется проводить два раза в год (весной и осенью) в течение трех-четырех лет. По мнению охотоведов, поедаемость приманок наиболее высока в конце апреля - начале мая, когда лисята уже вылезают из норы и ведут себя очень активно. Осенью, в октябре - начале ноября, вакцинация настигает молодняк, который не взял приманку весной. Выкладка приманок должна охватывать не только охотничьи угодья, но и другие биотопы хищников, в частности, лисьи тропы вдоль шоссе и железных дорог и обязательно – на мусорных полигонах и свалках.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Распространение бешенства среди животных является одним из важнейших международных критериев оценки биологической и экологической безопасности среды обитания человека. Достаточно констатировать, что в мире от бешенства ежегодно погибают от 55 до 70 тыс. человек, до 6,5 млн. подвергаются постэкспозиционным антирабическим обработкам (Smith A. et al., 2005; Arai Y. et al., 2005; Макаров В.В., 2015).

Бешенство относится к числу наиболее опасных болезней вирусной этиологии, регистрируется на всех континентах, кроме Австралии и Антарктиды (Бакулов И.А. и др., 1998) и, по оценке ВОЗ, входит в пятерку инфекционных болезней, общих для человека и животных, наносящих наибольший социальный и экономический ущерб. С учетом исключительности бешенства, с присущими ему характеристиками многих классических инфекционных болезней – мировой нозоарел, природная очаговость, чрезвычайная контагиозность и исключительная летальность, трансмиссивность, восприимчивость животных большинства видов, социальная, экономическая и экологическая значимость, оно включено в список особо опасных инфекционных болезней МЭБ (Кодекс здоровья наземных животных МЭБ, 2013), 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).

В связи с тем, что эпизоотии бешенства подвержены значительным динамическим изменениям, как во времени, так и пространстве, особое внимание в системе противоэпизоотических мероприятий уделяется регулярному эпизоотологическому мониторингу и надзору.

Обширные эпизоотологические мониторинговые исследования бешенства, как в целом, так и по отдельным группам восприимчивых животных во взаимосвязи с эпидемиологической ситуацией проводятся как в целом в мировом масштабе, так и по отдельным континентам и странам.

Актуальность проблемы бешенства на территории России подтверждается тем, что на официальных сайтах Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав населения (Роспотребнадзор), Управления Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), Федерального центра охраны здоровья животных (ФГБУ ВНИИЗЖ), Минздрава России, Центральной научно-методической ветеринарной лаборатории (ФГБУ ЦНМВЛ), Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко (ФГБНУ ВИЭВ), Омского НИИ природно-очаговых инфекций, а также региональных организаций и специальных форумах, по материалам эпизоотолого-эпидемиологического мониторинга размещаются информационно-аналитические обзоры и бюллетени. Вместе с тем, следует отметить использование отдельными авторами в эпизоотологическом мониторинге различных методологических и методических подходов, снижающих получение объективных показателей.

Бурное развитие вычислительной техники предопределило появление специальных программных комплексов – географических информационных систем (ГИС), являющихся мощным инструментом в эпизоотологии и эпизоотологическом мониторинге. Использование ГИС-технологий обеспечивает хранение, моделирование, анализ и визуализацию больших массивов данных, имеющих географическую привязку. Применение ГИС для эпизоотологического анализа позволило вывести ветеринарную географию на новый уровень с возможностями централизованного сбора и хранения информации о пространственном распределении вспышек болезней животных; автоматизированного анализа данных для выявления закономерностей эпизоотического процесса, создания электронных и бумажных карт для отображения эпизоотической ситуации, создания карт риска прогноза заноса и возникновения болезней (Коренной Ф.И., Гуленкин В.М., 2011).

В настоящее время разработаны методы сбора и анализа картографической информации об эпизоотической ситуации по особо опасным болезням животных с применением GPS-навигаторов, интегрированных с геоинформационной

системой ArgGIS и с космической навигационно-топографической системой Google Earth (Планета Земля) (Коренной Ф.И. и др., 2010; Гуленкин В.М., Коренной Ф.И., 2011).

В нашей стране широкомасштабные мониторинговые исследования с использованием ГИС-технологий (на основе ArcGIS) проводятся в информационно-аналитическом центре Управления ветнадзора, созданного на базе ФГУ «Федеральный центр охраны животных» (г. Владимир) по болезням животных на территории Российской Федерации и за рубежом, таких как ящур, африканская чума свиней, классическая чума свиней, высокопатогенный грипп птиц, бешенство, сибирская язва, бруцеллез, лептоспироз и другие (Коренной Ф.И., Гуленкин В.М., 2011).

Нами впервые, в составе авторского коллектива, использованы методы компьютерного анализа в географической эпизоотологии бешенства и других особо опасных болезней животных с применением элементов ГИС-технологий в лаборатории эпизоотологии ФГБНУ ВИЭВ имени Я.Р. Коваленко.

В качестве платформы построения эпизоотологической ГИС нами использовано программное обеспечение ArcGIS (ESRI, США) способное к функционированию без сбоев в сложных, нагруженных информационных комплексах, обладающих широкими возможностями визуализации картографической информации и обширным набором инструментов пространственного и временного анализа.

В геоинформационной системе общение между банком данных и географической картой происходит в двустороннем режиме, что позволяет, по таблице эпизоотических данных создать соответствующую нозологическую карту, определить параметры и особенности пространственного расположения очагов заболевания, провести наложение нозологической карты на карты природных, социально-экономических факторов.

Использование ГИС-технологий при исследовании границ ареала бешенства позволяет выявить пространственно-временные закономерности, характеризующие особенности эпизоотии за определенный промежуток времени,

в том числе плотность распределения неблагополучных пунктов и эпизоотических очагов, на так называемой тепловой карте, на которой по интенсивности окраски, территории дифференцируются в зависимости от концентрации пунктов и их возможного взаимного влияния друг на друга. Кроме того, ГИС позволяет на картосхемах в различных цветовых гаммах проводить поквартальную разбивку динамики выявления неблагополучных пунктов с параллельным отображением зон, в которых происходили изменения.

Проводимое автоматически в геоинформационной системе оперативное выявление зон наибольшего риска развития эпизоотии (эпидемий), определение необходимого объема и характера противоэпизоотических и противоэпидемических мероприятий может использоваться для формирования экспертных заключений, необходимых для выработки своевременных и адекватных управленческих решений ветеринарной и медицинской службами страны.

Инструменты пространственного и временного анализа ГИС, в том числе ранговой корреляции Спирмена, позволяют производить не только ретроспективную оценку эпизоотической обстановки на территории, но и строить прогнозные информационные ситуации. Внесение в информационную модель эпизоотической (или эпидемической) ситуации дополнительных критериев, влияющих на развитие эпизоотии (или эпидемий), способствует получению более точного прогностического результата. Такими влияющими критериями (прямыми или косвенными) могут быть данные о плотности популяций целевых животных, объемах проводимых вакцинаций и т.д.

Мониторинг бешенства животных на территории РФ с глубиной анализа в 25 лет (1991-2015 гг.) выявил следующие основные особенности проявления эпизоотического процесса.

Ретроспективный анализ основных показателей эпизоотического процесса бешенства свидетельствует, что эпизоотия, характеризующаяся природной очаговостью, регистрируется на стабильно высоком уровне и охватывает значительную часть территории страны.

За анализируемый период по сумме животных всех видов, с учетом повторяемости в эпизоотическом процессе бешенства на территории РФ, участвовало 58463 неблагополучных пункта, или в среднем 2339 пунктов в год. Показатель абсолютного количества заболевших бешенством животных всех видов за 1991-2015 гг. составил 75890 гол., или 3036 гол. в среднем за год.

В многолетней динамике проявления эпизоотического процесса, с эвентуальными скачкообразными периодами просматривается неуклонное повышение, как числа неблагополучных пунктов, так и заболевших животных и только с 2010 г. отмечается стабилизация показателей на сравнительно высоком уровне. Условное разделение всего учетного периода на два равнозначных временных промежутка – 1991-2003 и 2014-2015 гг. для сравнительного анализа динамических изменений показало впервые установленную нами, 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 ($r=0,99$).

Кластерный анализ показал, что в структуре заболеваемости преобладают дикие животные – 40,4% , крупный рогатый скот (18,7%), собаки (17,9%) и кошки (13,6%), однако с 2004 г. значительно увеличилась доля диких плотоядных в структуре общей заболеваемости, то в последующий период показатель увеличился в 2,6 раза (19984 гол.) – 51,2%. (рисунок 4). На фоне увеличения заболеваемости диких зверей закономерно увеличилось также количество случаев заболевания бешенством крупного и мелкого рогатого скота, а также собак и кошек.

В общей сложности за 1991-2015 гг. в эпизоотическом процессе бешенства всех основных видов сельскохозяйственных животных на территории РФ участвовало свыше 11,9 тыс. неблагополучных пунктов при среднегодовом показателе 477 пунктов. При этом из оборота стада всех видов продуктивных животных от заболевания бешенством выбыло (пало и вынужденно уничтожено) суммарно 23,4 тыс. голов скота при среднегодовых потерях 934 головы.

Заболееваемость в расчете на 10 тыс. восприимчивого к бешенству поголовья животных составила 0,67 гол., в одном неблагополучном пункте (коэффициент очаговости) заболело в среднем 2 гол.

Условное разделение всего учетного периода на два равнозначных временных промежутка – 1991-2003 и 2014-2015 гг. для сравнительного анализа динамических изменений 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 ($r=0,99$).

Анализ показал, что в структуре заболеваемости преобладают дикие животные – 40,4% , крупный рогатый скот (18,7%), собаки (17,9%) и кошки, однако с 2004 г. в 2,8 раза увеличилась доля диких плотоядных и, на этом фоне, – собак и кошек, что коррелирует с заболеваемостью диких плотоядных и подтверждается автокорреляционным анализом.

Исходя из анализа эпизоотической ситуации, можно заключить, что в современных условиях на территории Российской Федерации случаи заболевания сельскохозяйственных животных бешенством не являются самостоятельным вектором, однако служат достоверным индикатором проявления эпизоотического процесса в дикой природе. В сравнении с мониторинговыми исследованиями в дикой природе случаи бешенства сельскохозяйственных животных учитываются в статистике более стабильно, редко игнорируются, и их учет дает наиболее реалистичную картину территориального распространения болезни.

Взаимосвязь заболеваемости бешенством сельскохозяйственных и диких плотоядных животных отмечают многие исследователи (Седов В.А. и др., 1998; Селимов М.А., 1998; Авилов В.М. и др., 2002; Барышников П.И., 2007; Макаров В.В., 2008; Сидоров Г.Н. и др., 2010; Ведерников В.А. и др., 2010, 2014; Полещук Е.М. и др., 2013, и многие другие).

В результате проведенного нами впервые в мониторинге бешенства корреляционного анализа по видам животных установлено, что заболеваемость

крупного рогатого скота, собак и кошек тесно связана с заболеваемостью диких плотоядных. Среди мелкого рогатого скота эта взаимосвязь стала проявляться с середины 2000 годов, а у свиней наоборот, ослабла с этого периода, что связано со снижением поголовья свиней в подворьях владельцев, где наиболее вероятен контакт с дикими плотоядными. Среди лошадей взаимосвязи заболеваемости с дикими плотоядными не прослеживается.

Эпизоотический процесс бешенства среди оленей протекает в основном на поголовье одомашненных северных оленей по типу арктического бешенства и характеризуется выраженной эмерджентностью в отдельные периоды. Многие исследователи связывают эмерджентность арктического бешенства среди северных оленей с резким увеличением популяционной плотности песцов в биотопах тундры в периоды наиболее благоприятной кормовой базы, связанной с массовым увеличением популяции леммингов (грызун подсемейства полевок) – как основных природных носителей рабического вируса в биотопах Севера и, вследствие этого, активизацией эпизоотического процесса.

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 подтверждено нами методами дескриптивной и количественной эпизоотологии.

Эпизоотическая ситуация по бешенству животных в настоящий период остается напряженной. Ареал болезни распространяется на территорию 65 регионов РФ, входящих в состав 9 Федеральных округов. В 2015 г. в сравнении с 2014 г. произошел рост заболеваемости бешенством во всех Федеральных округах, составивший 1807 голов животных всех видов, или 78,4%. В общей сложности в эпизоотический процесс бешенства было вовлечено свыше 4,1 тыс. животных, из которых 48% приходится на диких плотоядных. Наибольшее число заболевших бешенством животных было зарегистрировано в Московской области, Республике Татарстан, Липецкой, Саратовской, Белгородской и

Ярославской областях. В 9-ти регионах число заболевших животных превышало 100 гол.

Как и ранее, доминирующим резервантом и распространителем бешенства в РФ выступают лисицы, что не было исключением и в 2015 г. На втором месте среди диких животных, по числу заболевших, были енотовидные собаки, чья роль в распространении эпизоотий бешенства продолжает с каждым годом неуклонно возрастать. Второе и третье место, от общего числа выявляемых в РФ случаев бешенства, занимают собаки и кошки. Домашние плотоядные в условиях нашей 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.

Одним из важных методов эпизоотологического мониторинга, по нашему мнению, является контроль эффективности оральной вакцинации диких плотоядных. Однако этот контроль, включающий определение уровня вируснейтрализующих антител в сыворотках крови и поедаемость вакцин, на территории РФ, к сожалению, практически не проводится.

Нами проведен широкомасштабный контроль эффективности оральной вакцинопрофилактики бешенства диких плотоядных в различных регионах России – Смоленской, Калининградской областях и Республике Татарстан. При этом, в общей сложности, в комплексе диагностических тестов, включающих реакцию иммунофлуоресценции, ИФА, биопробу на белых мышах и в культуре клеток НГУК-1, реакцию нейтрализации в культуре клеток ВНК-21/13 нами исследовано свыше 2 тыс. проб биоматериала от диких плотоядных (головной мозг, глазная жидкость, костная ткань), отстрелянных на территориях оральной вакцинации указанных регионов.

Результаты исследований показали, что уровень сероконверсии в пробах мозга и глазной жидкости находится 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 малой авиации повышается до 70%.

Анализируя проблему оральной иммунизации диких плотоядных, следует отметить, что в условиях России крупномасштабные кампании вакцинации, по примеру стран Западной Европы, трудноосуществимы, вследствие огромной площади ареала обитания животных-резервантов, быстрое обновление их поголовья, обширное развитие эпизоотии, как на территории страны, так и в сопредельных территориях. Тем не менее, по нашему мнению, согласующемуся с заключением Макарова В.В. (2009) и Елакова А.Л. (2013), на отдельных территориях, наиболее и стационарно неблагополучных по бешенству, эти мероприятия оправданы.

Исходя из результатов эпизоотологического мониторинга, можно заключить, что эпизоотическая ситуация в Российской Федерации в период с 1991 по 2015 г. была стабильно напряженной. Учитывая размеры ареала болезни, охватывающего большую часть страны, можно констатировать невозможность добиться полного искоренения эпизоотии в ближайшей и среднеотдаленной перспективе. В сложившихся условиях оптимальным направлением противоэпизоотических мероприятий, по нашему мнению, является более полное проведение ежегодной антирабической вакцинации домашних плотоядных при одновременной жесткой регуляции численности безнадзорных животных. В программе оральной вакцинации диких плотоядных против бешенства, по нашему мнению, более рациональным будет переход к созданию зональной иммунной защиты вокруг крупных населенных пунктов для уменьшения эпидемиологического риска. В дальнейшем, при появлении дополнительных материальных ресурсов, эти зоны всегда можно будет расширить, переходя к стратегии постепенного выдавливания.

Установленные нами особенности современного эпизоотического состояния по бешенству животных дополняют и расширяют имеющиеся теоретические данные эпизоотического процесса особо опасных и карантинных инфекций на территории РФ. 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. Данные мониторинга регулярно используются в ежеквартальных информационных Бюллетенях Европейского центра ВОЗ «WHO Rabies Bulletin Europe».

По ряду субъектов РФ нами изучены региональные особенности эпизоотологии бешенства.

Республика Татарстан в настоящий период является наиболее неблагополучной 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 административных 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.

При изучении региональных особенностей бешенства нами отмечены два уникальных случая гидрофобии у человека, зарегистрированных в Республике Татарстан, классическим образом раскрывающих тесную взаимосвязь инфекционного процесса с эпизоотологическими и эпидемиологическими показателями. Диагноз гидрофобии подтвержден нами при жизни и

постмортально комплексом тестов – МФА, ИФА, ОТ-ПЦР, световая микроскопия, биопроба на белых мышах.

В Калининградской области, ранее стационарно неблагополучной, 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 своевременная 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 синхронизации профилактики бешенства среди животных.

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

Одним из методов молекулярной биологии в теоретическом изучении структуры и функции генетических макромолекул РНК и ДНК является филогенетический анализ геномов лиссавирусов, в значительной мере дополняющий эпизоотическую и эпидемиологическую характеристику возбудителя бешенства в различных регионах. Изучение молекулярно-генетических характеристик полевых изолятов вируса бешенства, выделяемых от животных и человека, дает возможность мониторинга их молекулярной структуры в процессе распространения заболевания (Глушков А.А., Луговцева В.Ю., 2004; Львов с соавт., 2006, 2008, 2014; Хисматуллина Н.А. с соавт., 2012; Zaberezhny A.D., 1999).

Нами изучены и определены молекулярно-генетические характеристики полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на различных территориях РФ и в Республике Таджикистан от разных видов животных и человека, а также

их сравнительный анализ с референтными штаммами, представленными в национальном центре биотехнологической информации (NCBI).

Установлено, что 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.

Изоляты из Таджикистана образуют отдельный кластер и филогенетически близки к украинским, бурятским и иранскому 8681IRA. Изолят от волка филогенетически близок к рабдовирусам из Китая, Ирана и Украины.

Изоляты рабдовируса из Кировской области по аминокислотному составу фрагмента гена N идентичны RABV 86221RA и близки к изолятам из Бурятии, Брянска, Липецка и Украины.

Кроме того установлено, что нуклеотидные последовательности фрагментов генов N и G полевых изолятов в Кировской области далеко отстоят от таковых в сравнении с вакцинным штаммом вируса бешенства ERAG333, то есть реверсия его в эпизоотический штамм отсутствует. Ранее отсутствие реверсии у вакцинного штамма RV-97 было установлено Метлиным А.Е. (2008).

Одним из показателей, характеризующих эпизоотическую ситуацию и эпизоотический процесс, является экономический ущерб, причиняемый инфекционными болезнями сельскохозяйственных животных.

По экспертным оценкам ВОЗ, бешенство, по размерам причиняемого экономического ущерба среди болезней инфекционной патологии как животных, так и человека, занимает пятое место. При этом в мировой экономике ущерб от бешенства, складывающийся из убытков вследствие гибели животных, людей и затрат на антирабические мероприятия, и составляет свыше \$1 млрд. в год (Метлин А.Е., 2008), в том числе затраты на профилактику, мониторинговый контроль бешенства – \$300 млн. (Макаров В.В. и др., 2015).

Данные по экономической значимости бешенства в РФ на страницах научной литературы отрывочны и представлены в основном количественной оценкой павших и вынуждено уничтоженных животных разных видов.

С учетом основных методических положений экономики ветеринарного дела нами впервые масштабно раскрыто экономическое значение бешенства животных в РФ. Расчеты показали, что за период с 1991 по 2015 г. от заболевания бешенством в России пало и вынужденно уничтожено 23,4 тыс. голов сельскохозяйственных животных разных видов (крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, свиньи, лошади, олени, верблюды). Только прямые экономические потери мясной продукции от падежа и вынужденного уничтожения больных животных, а также расходов на утилизацию трупов, за 1991-2015 гг. в современных ценах на продукцию животноводства составили 657 млн. руб. Исходя из этого, экономическое значение бешенства в Российской Федерации трудно переоценить.

Значительное сокращение бюджетного финансирования противоэпизоотических мероприятий не должно отражаться на ветеринарной и экологической безопасности, однако требует строгого контроля за использованием выделяемых средств. Достижению этой цели служит научно-обоснованный расчет количества биопрепаратов, в том числе для специфической профилактики, необходимых для эффективного проведения противоэпизоотических мероприятий. Потребность в биопрепаратах для проведения противоэпизоотических мероприятий при особо опасных и карантинных болезнях животных, в том числе при бешенстве, целесообразно определять с учетом половозрастной структуры стада по видам животных в расчете на 100 голов и количества обработок, которые необходимо провести в течение календарного года в соответствии с нормативно-технической документацией.

Разработанная нами методика нормирования дает возможность научно-обоснованно планировать расход вакцин с экономией средств на иммунизацию животных разных видов против бешенства. Исходя из результатов исследований,

разработаны «Методические рекомендации по расчету годовой потребности в биопрепаратах для проведения профилактических и противоэпизоотических мероприятий в хозяйствах всех форм собственности».

Одним из основных способов предотвращения бешенства является своевременная и эффективная иммунопрофилактика, основанная на использовании антирабических вакцин (Pastoret P., 2002). В связи с этим важным является контроль эффективности вакцинации, во многом определяющий качество специфической профилактики. Наличие в сыворотке крови вакцинированных животных вируснейтрализующих антител является фактором эффективности вакцинации, так как только антитела рассматриваются как основа защиты против рабической инфекции. В соответствии с рекомендациями ВОЗ по бешенству, содержание в сыворотках крови привитых против бешенства животных вируснейтрализующих антител 0,5 МЕ/мл, считается минимальным уровнем протективного антирабического иммунитета (Manual of standards Diagnostic Tests and Vaccines, 2004).

В практике применяются традиционные методы определения антирабических антител – РНГА, РСК, РНИФ, РДП. ВОЗ рекомендует использование для этих целей реакцию нейтрализации (РН) *in vivo* на мышах и тесты *in vitro* на культуре клеток: тест ингибиции фокусов флюоресценции и тест флюоресценции вируснейтрализующих антител. Однако большинство тестов требуют аккредитации лабораторий, длительного времени, необходимости поддержания культуры клеток, использования вирулентного вируса. Постановка РН на мышах трудоемка, длительна во времени требует живого вируса и значительного количества мышей, что увеличивает стоимость анализа.

Предложены методы иммуноферментного анализа, основанные на использовании целого вируса бешенства, или и его оболочечного белка – гликопротеина, однако эти методы пригодны для качественного определения антител, но не позволяют количественно определять наличие антител против бешенства в сыворотках крови животных после вакцинации. Для контроля уровня

поствакцинальных антирабических антител ВОЗ рекомендует применять реакцию нейтрализации в культуре клеток ВНК-21/13 (Manual OIE, 2005).

Для контроля иммунного состояния животных, вакцинированных против бешенства, нами разработана и предложена тест-система на основе гликопротеина вируса бешенства (штамм «Овечий» ГНКИ) методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА).

В ходе исследований отработаны методики и получены высокоспецифичные антивидовые пероксидазные конъюгаты (антитела кролика, против Ig лисы и собаки), так как они реагируют с антителами контрольных положительных и не реагируют с антителами гетерологичных сывороток, а также получен гликопротеин вируса бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ и оптимизированы условия постановки непрямого ИФА.

В опытах, нами установлена высокая специфичность иммуноферментной тест-системы на основе гликопротеина вируса бешенства для определения уровня антител к вирусу в сыворотках крови овец, крупного рогатого скота, собак и лисиц методом непрямого ИФА. Результаты непрямого ИФА коррелируют с данными РН. При этом по чувствительности и скорости получения результатов ИФА превосходит РН на белых мышцах.

Комиссионное испытание разработанной иммуноферментной тест-системы подтвердило ее эффективность в опытах на животных. На основе результатов исследований разработана «Инструкция по применению иммуноферментной тест-системы для определения уровня антирабических антител в сыворотках крови вакцинированных против бешенства методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА)».

Для определения титра антирабических антител в сыворотке крови человека и животных разработаны различные варианты ИФА (Субботина Л.С., 1985; Ботвинкин А.Д. с соавт., 1986; Бойко А.А. с соавт., 1987; Сазанова Э.Я. с соавт., 1998; Хисматуллина Г.А. с соавт., 1999, 2000; Сологуб Т.В., 1992; Sureu P. et al., 1983). Показана перспективность использования непрямого варианта ИФА для определения специфических к вирусу бешенства антител в сыворотках крови

вакцинированных против бешенства животных (А.Д. Ботвинкин и соавт., 1990; В.И. Клюкина и соавт., 2008; А.М. Гулюкин и соавт., 2010; P. Atanasiu et al., 1977; K.G. Nicholson et al., 1982). Однако для проведения непрямого варианта ИФА требуется наличие антивидовых пероксидазных конъюгатов к каждому виду животного, что является препятствием к его широкому практическому использованию.

Для определения уровня антирабических антител в сыворотке крови вакцинированных против бешенства животных нами разработана тест-система методом блок-иммуноферментного анализа (блок-ИФА). В основу метода нами положен принцип подавления титров специфического антигена сывороточными антителами исследуемых сывороток в блок-сэндвич-варианте ИФА.

Установлена высокая специфичность иммуноферментной тест-системы с использованием в качестве специфического антигена гликопротеина вируса бешенства и стандартного вируса бешенства (штамм CVS) для определения уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках крови вакцинированных против бешенства животных разных видов – овец, крупного рогатого скота, собак, кошек и лисиц методом блок-ИФА. Результаты блок-ИФА коррелируют с показаниями реакции нейтрализации (на белых мышях), однако, по чувствительности и скорости получения результатов ИФА (7-8 час.) превосходит РН на мышях (14 сут.). Тест-система является универсальной для определения специфических антител в сыворотках крови различных видов животных в блок-ИФА с помощью антирабического глобулина и антирабического пероксидазного конъюгата, так как не требуется наличия антивидовых пероксидазных конъюгатов к каждому виду животного.

Разработанные иммуноферментные тест-системы для определения уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных различных видов, вакцинированных против бешенства, апробированы нами при проведении серологического контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства крупного рогатого скота, собак и лисиц в неблагополучных хозяйствах и лесных угодьях Республики Татарстан и Смоленской области.

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, равном 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 оральной вакцинации, на наличие антирабических антител методом ИФА показала высокий титр антител в 59% пробах, совпадающий с результатами обнаружения тетрациклина в зубах и костной ткани.

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

В диагностике бешенства большое внимание уделяется выделению уличного вируса бешенства в культуре клеток. Имеются данные о применении перевиваемой культуры клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1) для выделения рабического вируса с последующим его обнаружением с помощью МФА (Селимов М.А., 1978; Авцын А.П. и др., 1985; Татаров А.Г. и др., 1987; Хисматуллина и др., 1989; Юсупов Р.Х. и др., 1989; Чернов С.М. и др., 1989;

Иванов А.В. и др., 2010; Wiktor T., Koprowski H. (1978). При этом тест в культуре клеток НГУК-1 рассматривается как контрольный, подтверждающий результаты МФА и дополняющий биопробу на белых мышах (Smith A., 1978; Portnoi D. et al., 1982). Отметим, что МЭБ рекомендовано использование перевиваемой культуры клеток ВНК-21/13 для оценки поствакцинального иммунитета (Manual OIF, 2005).

Нами на большом фактическом материале (554 пробы) установлена высокая чувствительность отечественной перевиваемой культуры клеток невральное происхождения НГУК-1 к репликации уличного вируса бешенства, не требующей длительной адаптации вируса к культуре клеток, с последующим выявлением цитоплазматических включений в МФА.

В результате сравнительного исследования проб биоматериала от различных видов диких, сельскохозяйственных и мелких домашних животных, а также людей, нами установлена полная корреляция результатов биопробы на белых мышах и на линии клеток НГУК-1. Показано, что в клетках невриномы крысы рабический вирус может быть выделен в более ранние сроки (через 1-3 сут. после заражения), чем при интрацеребральной инокуляции биоматериала мышам (7-10, иногда 34 день).

Предложенный нами метод ускоренной диагностики бешенства в культуре клеток НГУК-1 в сравнении с биологической пробой на белых мышах обеспечивает более раннюю диагностику болезни у животных различных видов. Метод принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (ГОСТ 26075-2013. Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства) и введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2015 г.

До настоящего времени наиболее чувствительным и достоверным методом диагностики бешенства в России является классическая биологическая проба на белых мышах с последующей идентификацией антигена вируса бешенства методом флуоресцирующих антител (Государственный стандарт СССР 26075. Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики бешенства. М., 1984). Однако существенными недостатками биопробы являются длительный

срок исследования (30 суток), потенциальная опасность выноса возбудителя болезни во внешнюю среду, а также невозможность исследования разложившегося биоматериала. Кроме того, постановка биопробы неэкономична, требует наличия специально оборудованного вивария и подготовленного обслуживающего персонала (Хисматуллина Н.А. с соавт., 2001).

Одним из широко используемых методов детекции РНК вируса бешенства является обратнo-транскриптазная полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР), позволяющая поставить диагноз в течение 5 часов (Nadin-Davis S.A. et al., 1996). Возможно применение ОТ-ПЦР для прижизненного обнаружения вирусной РНК в слюне, и биоптатах слюнной железы и спинномозговой жидкости (Crepin P. et al., 1998; Nagaraj T. et al., 2008; Kumar S. et al., 2008).

Для определения низких количеств вирусной РНК в пробах в научной литературе описано применение гнездовой модификации ПЦР, позволяющей повысить чувствительность реакции в 10000 раз (Taylor M.G. et al., 1991; Oxford Univ.: IRL Press, 1995).

Нами разработан способ индикации возбудителя бешенства в биоматериале методом ПЦР с использованием электрофоретической детекции результатов. В процессе исследований впервые определены оригинальные нуклеотидные последовательности олигонуклеотидных наружных и внутренних праймеров для детекции РНК вируса бешенства методом гнездовой ОТ-ПЦР в двухраундовой амплификации. Исследования показали, что способ обладает высокой специфичностью при выявлении РНК штаммов и изолятов вируса бешенства и позволяет выявлять РНК вируса в биоматериале от больных животных и людей, а также из культуральной жидкости вакцинных штаммов лиссавируса.

Диагностическое испытание показало сокращение срока проведения исследований до 6 часов, снижение себестоимости диагностики в 9,8 раз, в том числе трудозатрат – в 40 раз. Разработаны «Методические указания по индикации возбудителя бешенства методом ОТ-ПЦР».

Рынок вакцин против бешенства собак в настоящее время в России представлен достаточно широким ассортиментом отечественных и зарубежных

препаратов: «Рабикан» (ФГУП «Щелковский биокомбинат»), «Мультикан» (ЗАО «НПО Нарвак»), «Дипентавак» (ЗАО «Ветзвероцентр»), «Дефенсор» («Пфайзер», США), «Нобивак-Рабиес» («Интервет Интернэшнл», Нидерланды). Однако данные по уровню иммунного статуса организма собак после вакцинации различными антирабическими вакцинами ограничены.

Гематологические и иммунологические показатели крови собак в различные сроки после вакцинации перечисленными выше антирабическими вакцинами показали, что все они активизирует неспецифические, клеточные и гуморальные факторы защиты организма. В частности, у вакцинированных животных через 3 мес. значительно возросло, хотя и в разной степени в зависимости от вида вакцины, количество лимфоцитов, Т- и В-лимфоцитов, а также уровень фагоцитарной активности нейтрофилов. Через 10 мес. после вакцинации происходит снижение уровня содержания этих показателей до физиологической нормы.

У лисиц клеточного содержания, иммунизированных вакциной «Рабикан» из штамма «Щелково-51» увеличению содержания в крови лейкоцитов и лимфоцитов, Т- и В-лимфоцитов, уровень фагоцитарной активности нейтрофилов, фагоцитарный индекс, Т-лимфоцитов-хелперов при уменьшении количества цитотоксических Т-клеток, что свидетельствует о достаточно выраженном специфическом иммунном ответе.

В связи с бурным развитием иммунологии, усилия многих исследователей направлены на разработку иммуностимулирующих и иммунокорректирующих препаратов, усиливающих иммунный ответ на введение вакцин (Петров Р.В. с соавт., 1983; Земсков В.М., Земсков А.М., 1984; Коромыслов Г.Ф. с соавт., 1985; Кенигсберг Я.Э., 1985; Лихолетов С.И., 1988; Донченко А.С. с соавт., 1995; Хабuzов И.П., 2004; Самбуров Н.В., 2006).

Нами экспериментально установлено, что Вакцинация собак вакцинами: «Мультикан-8», «Нобивак-DHPPiL+R» и «Эурикан-ОНПП12-1» в сочетании с иммуностимулирующими препаратами циклоферон и фоспренил показала достоверное увеличение количества лейкоцитов, преимущественно за счет

увеличения числа лимфоцитов, в том числе Т- и В-лимфоцитов, а также повышение фагоцитарной активности нейтрофилов крови. Уровень антител к вирусу бешенства в исследуемых пробах сывороток крови собак, взятых через 21 и 51 суток после вакцинации различными антирабическими вакцинами в сочетании с иммуностимулирующими препаратами, обеспечивают полную защиту животных от бешенства.

Таким образом, 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.

3.1 Выводы

1. На основе программного обеспечения ArcGIS (ESRI, США) разработана геоинформационная система (ГИС) эпизоотологического мониторинга бешенства животных, 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 Microsoft Access®. Данные кадастра привязаны к атрибутивной таблице цифровой карты РФ, что позволяет визуализировать информацию через построение нозологических карт.

2. Эпизоотическая ситуация по бешенству животных на территории Российской Федерации в мониторинге с 1991 по 2015 год характеризуется природной очаговостью 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 превалируют 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 узла крысы (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 лиссавирусов сконструированы синтетические оригинальные олигонуклеотидные праймеры к гену гликопротеина вируса бешенства и разработан способ выявления РНК рабического вируса в двухраундовой гнездовой обратно-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 ослюнения 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 малой 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 иммунологической эффективностью.

3.2 Предложения для практики

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»:

– 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);

– Инструкция по применению иммуноферментной тест-системы для определения уровня антирабических антител в сыворотках крови животных, вакцинированных против бешенства, методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) (утв. ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности» 21.06.2010);

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

– Методические указания по индикации возбудителя бешенства методом ОТ-ПЦР (МСХ РФ. Департамент научно-технологической политики и образования. Утв. ФГБУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности» 14.11.2013);

– Рекомендации по купированию первичных очагов и профилактика бешенства (Утв. ФГБУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности» 19.11.2014).

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

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.

4 СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абуталип, А.А. Рекомендации по системе эпизоотологического мониторинга бруцеллёза сельскохозяйственных животных / А.А. Абуталип, Г.Г. Аб-сатиров, С.Е. Алпысбаева. – Алматы, 2010. – 18 с.
2. Авилов, В.М. Актуальные проблемы профилактики особо опасных инфекций животных / В.М. Авилов, В.А. Седов // Ветеринария. – 1994. – № 6. – С. 3-6.
3. Авилов, В.М. Необходим учет новых особенностей эпизоотологии бешенства / В.М. Авилов, В.А. Седов, С.А. Коломыцев [и др.] // Ветеринария. – 1998. – № 6. – С. 3-6.
4. Авилов, В.М. Эпизоотическое состояние и эффективность проводимых мероприятий против бешенства животных в России / В.М. Авилов, А.А. Гусев, А.В. Саввин // Ветеринария. – 2002. – № 6. – С. 3-6.
5. Авилов, В.М. Эпизоотическое состояние и эффективность проводимых мероприятий против бешенства животных на территории России в 1981-2000 гг. / В.М. Авилов, А.А. Гусев, А.В. Саввин // Ветеринарная патология. – 2002. – № 1. – С. 72-77.
6. Авилов, В.М. Эпизоотическая ситуация по бешенству в Российской Федерации / В.М. Авилов, О.В. Козыренко, А.Г. Лучкин [и др.] // Международный агробиологический симпозиум, посвящ. 80-летию чл.-корр. РАН, заслуженного деятеля науки РФ Сочнева В.В.: материалы симпозиума. – Нижегородская ГСХА. – Нижний Новгород, 2016. – С. 93-109.
7. Авцын, А.П. Новая нейрогенная клеточная линия НГУК-1 и ее применение в биотехнологии и медико-биологических исследованиях. Культивирование клеток животных и человека / А.П. Авцын, В.Я. Кармышева, Л.И. Кондакова [и др.] // II Всесоюз. совещание по бешенству: тезисы докладов. – Пущино, 1985. – С. 75-76.

8. Адамович, В.Л. Ландшафтно-экологические предпосылки к существованию природных очагов рабической инфекции / В.Л. Адамович // Зоологический журнал. – 1978. – Т. 57. – № 2. – С. 260-271.
9. Адамович, В.Л. Природа и охота. Бешеные волки / В.Л. Адамович, Д.И. Бибииков, И.Г. Ротси / Зоологический журнал. – 1995. – № 2-3. – С. 72-74.
10. Аксенов, В.И. Бешенство в Новосибирской области / В.И. Аксенов, Ю.Н. Рассадкин, Е.И. Рябчикова [и др.] // Проблемы инфекционной патологии: тезисы докладов науч. конф. – Новосибирск, 2002. – С. 104.
11. Аликин, Ю.С. Развитие технологии получения и перспективы использования эндонуклеазы *Serratia marcescens* / Ю.С. Аликин, Л.П. Сенженко, В.П. Клименко // Ферменты микроорганизмов. XI Всероссийская конф.: сборник докладов.– Казань, 1998. – С. 152-163.
12. Амироков, М.А. Система противозoonотических и профилактических мероприятий при бешенстве в Новосибирской области: методические рекомендации / М.А. Амироков, А.С. Донченко, С.К. Димов [и др.]. – Новосибирск, 2009. – 62 с.
13. Ананина, Т.Л. Применение метода автокорреляционного анализа в исследовании многолетней динамики численности жуужелиц (Coleoptera, Carabidae) Баргузинского хребта / Т.Л. Ананина // Вест. Бурятского государственного университета. – Улан-Удэ, 2012. – № 4. – С. 112-117.
14. Андерсонс, З.Э. Опыт районирования административной территории по риску возникновения бешенства животных / З.Э. Андерсонс // Всесоюзн. науч. конф. по проблемам зоонозных инфекций: тезисы докладов. – Казань, 1983. – С. 32.
15. Андрейцев, К.М. Особенности эпизоотического процесса бешенства на юге Западной Сибири: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. / Андрейцев Константин Михайлович. – Барнаул, 2006. – 23 с.
16. Анина-Радченко, Н.Д. К вопросу о применении реакции связывания комплемента для диагностики бешенства / Н.Д. Анина-Радченко // Симпозиум по

бешенству: тезисы докладов ин-та полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. – М., 1972. – С. 123-124.

17. Аникеев, М.А. Эпизоотическая ситуация по бешенству мелких домашних и диких животных в Московской области. Данные за 2004-2006 гг. / М.А. Аникеев // Российский ветеринарный журнал. – 2006. – № 4. – С. 9-10.

18. Анисина, О.В. Эпизоотическая ситуация по бешенству в Московской области и совершенствование методов экспресс-диагностики: дис. ... канд. биол. наук: 03.01.06. / Анисина Ольга Владимировна. – Щелково, 2013. – 160 с.

19. Апалькин, В.А. Бешенство животных в России. Особенности современной эпизоотической обстановки / В.А. Апалькин, В.А. Ведерников, И.В. Балдина [и др.] // Ветеринария. – 2004. – № 12. – С. 3-8.

20. Арутюнова, И.П. Бешенство антропургического типа – проблема больших городов / И.П. Арутюнова [и др.] // Ветеринарная патология. – 2010. – № 1. – С. 17-19.

21. Бакулов, И.А. Рекомендации по методике эпизоотологического исследования / И.А. Бакулов, Г.Г. Юрков, А.П. Песковацков, В.А. Ведерников. – Покров, 1975. – 75 с.

22. Бакулов, И.А. Руководство по общей эпизоотологии / И.А. Бакулов, А.Д. Третьяков. – М.: Колос. –1979. – С.424.

23. Бакулов, А.И. Методические указания по эпизоотологическому исследованию / А.И. Бакулов [и др.]. – М.: Колос, 1982. – 16 с.

24. Бакулов, И.А. Новые проблемы эпизоотологии / И.А.Бакулов // Материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ. – Покров, 1998. – С. 135-138.

25. Бакулов, И.А. Эпизоотология с микробиологией: монография / И.А. Бакулов, В.А. Ведерников, А.Л. Семенихин. – М.: Колос, 2000. – 480 с.

26. Бакулов, И.А. Система эпизоотологического мониторинга особо опасных, экзотических, малоизученных, в том числе зооантропонозных болезней животных / И.А. Бакулов, А.В. Книзе, В.М. Котляров [и др.] – М., 2001. – 72 с.

27. Бакулов, И.А. Эпизоотология: учебное пособие по курсу «Эпизоотология» / И.А. Бакулов. – Ульяновск, 2002. – 45 с.
28. Балдина, И.В. Эпизоотологические основы совершенствования профилактики бешенства в Московском регионе: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. / Балдина Ирина Викторовна. – М., 2004. – 142 с.
29. Баньковский, Д.О. Иммунобиологические свойства штамма ERA G 333 вируса бешенства для изготовления оральной антирабической вакцины: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 06.02.02. / Баньковский Денис Олегович. – Щелково, 2010. – 20 с.
30. Барабаш, А. Ф. Профилактика и оздоровление хозяйств при инфекционных заболеваниях / А.Ф. Барабаш, В.С. Ковалев, М.В. Трухановская // Научное обоснование основных направлений развития агропромышленного комплекса Крыма. – Симферополь: Таврия, 2004. – С. 112-114.
31. Бардина, Н.С. Бешенство в России. Оценка риска. Информационно-аналитический обзор / Н.С. Бардина, М.А. Титов, А.К. Караулов [и др.]. – Владимир: ФГУ «ВНИИЗЖ», 2008. – С.12-28.
32. Барышников, П.И. Эпизоотический процесс при бешенстве животных в Алтайском крае. Данные за 1950–2000 гг. / П.И. Барышников, К.М. Андрейцев // Ветеринария. – 2008. – № 6. – С. 22–25.
33. Барышников, П.И. Эпизоотология бешенства в Алтайском крае / П.И. Барышников, К.М. Андрейцев, А.М. Лапин // Сиб. вест. с.-х. науки. – 2007. – № 5 (173). – С. 63-66.
34. Баширова, Д.К. Прижизненная клинико-лабораторная диагностика гидрофобии / Д.К. Баширова [и др.] // Казанский медицинский журнал. – 2007. – № 88 (5). – С. 449-492.
35. Бегель, К. Особенности распространения эпидемии бешенства среди диких животных в Европе / К. Бегель // Бюл. ВОЗ. – 1977. – Вып. 54. – № 4. – С. 972–987.

36. Бегель, К. Оценка эффекта истребления лисиц в районах эндемичных по бешенству диких животных / К. Бегель, Х. Метле, Ф. Стек [и др.] // Бюл. ВОЗ. – 1981. – Вып. 59. – № 2. – С. 180-194.

37. Белоусов, В.И. О совершенствовании диагностической работы в ветеринарных лабораториях России / В.И. Белоусов // Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ: материалы конф. – Покров, 1998. – С. 13-14.

38. Березина, Е.С. Бешенство собак в России во второй половине XX-начале XXI века / Е.С. Березина [и др.] // Российский ветеринарный журнал. – 2010. – № 3. – С. 2-6.

39. Бессарабов, Б.Ф. Инфекционные болезни сельскохозяйственных животных: учебное пособие по курсу «Эпизоотология» / Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин [и др.]. – М.: КолосС, 2007. – 671 с.

40. Бешенство в Российской Федерации. Информационно-аналитический бюллетень / Составители: Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Березина Е.С. – Омск, 2013. – 65 с.

41. Бешенство в Гродно: всё больше заболевших регистрируется каждый день [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://itogi.info/obshhestvo/beshenstvo-v-grodno-vsyo-bolshe-zabolevshix-registriruetsya-kazhdyj-den.html>.

42. Бойко, А.А. Создание иммуноферментных препаратов / А.А. Бойко // III Всесоюзн. конф. «Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов»: тезисы докладов – М., 1987. – С. 201-202.

43. Большаков, И.М. Эпидемиология бешенства (особенности эпидемического и эпизоотического процесса в современных условиях и основные направления профилактики) / И.М. Большаков // Актуальные проблемы вет. медицины, животноводства, общественности и подготовки кадров на Южном Урале: матер. межд. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию УГИВМ – Челябинск, 1996. – С. 5-10.

44. Борисов, А.В. Разработка технологии изготовления вирусвакцины против бешенства диких плотоядных: автореф. ... дис. канд. вет. наук. 06.02.02 / Борисов Алексей Валерьевич. – Владимир, 2003. – 23 с.

45. Ботвинкин, А.Д. Обнаружение антител к вирусу бешенства в сыворотке крови людей с помощью иммуноферментного метода / А.Д. Ботвинкин, М.А. Селимов, Т.Н. Згурская // Вопросы вирусологии. – 1986. – Т. 31. – № 3. – С. 333-334.

46. Ботвинкин, А.Д. Обнаружение вируса бешенства в головном мозге и слюнных железах животных с помощью иммуноферментного метода / А.Д. Ботвинкин, С.М. Чернов, Л.Я. Грибанова // Вопросы вирусологии. – 1987. – № 6. – С. 747-750.

47. Ботвинкин, А.Д. Современное состояние и эпидемиологическое значение природных очагов бешенства в Западной Сибири / А.Д. Ботвинкин, Л.Я. Грибанова, Г.Н. Сидоров [и др.] // Природноочаговые болезни человека. – Омск, 1988. – С.111-113.

48. Ботвинкин, А.Д. Антигенные варианты вируса бешенства, циркулирующие в СССР: результаты исследований с применением моноклональных антител / А.Д. Ботвинкин, М.А. Селимов, Л.Я. Грибанова, Е.В. Ключева // XII Всесоюзн. конф. по природной очаговости болезней: материалы конф. – Новосибирск, 1989. – С. 56-57.

49. Ботвинкин А.Д. / А.Д. Ботвинкин, Л.Я. Грибанова, В.Ф. Чернявский [и др.] // Вопросы региональной гигиены, санитарии и эпидемиологии: сборник статей, МЗ Якутская АССР. – Якутск, 1990. – С. 160-161.

50. Ботвинкин, А.Д. Антигенная характеристика полевых штаммов вируса бешенства из различных районов СССР с помощью антинуклеокапсидных моноклональных антител / А.Д. Ботвинкин, М.А. Селимов, Е.В. Ключева [и др.] // ЖМЭИ. – 1990. – № 1. – С. 50-54.

51. Ботвинкин, А.Д. Особенности эпидемиологии гидрофобии и экология вируса бешенства в условиях преобладания очагов природного типа: автореф.

дис. ... д-ра мед. наук.: 14.00.30. / Ботвинкин Александр Дмитриевич – М., 1992. – 58 с.

52. Ботвинкин, А.Д. Антигенные варианты вируса бешенства, связанные с заболеваниями людей в России и странах ближнего зарубежья / А.Д. Ботвинкин, М.А. Селимов, М.А. Штыкова, В.В. Хозинский // Современные проблемы рабиологии. – М., 1998. – С. 34.

53. 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. 117-126.

54. Бусол, В.А. Эпизоотическая ситуация по бешенству в странах Европы / В.А. Бусол, В.М. Горжеев, А.С. Роговский // Научный вестник НАУ. – Киев, 2001. – Вып. 42. – С. 152-157.

55. Бусыгин, К.Ф. Применение метода диффузионной реакции преципитации в агаре-геле для изучения специфичности иммунных сывороток / К.Ф. Бусыгин // Ученые записки КГВИ. – 1964. – Т. 90 – С.144-149.

56. Бусыгин, К.Ф. Люминесцентная диагностика инфекционных болезней животных: монография / К.Ф. Бусыгин – М.: Колос. – 1975. – 160 с.

57. Бусыгин, К.Ф. Диагностика бешенства методом флуоресцирующих антител / К.Ф. Бусыгин // Всесоюзн. конф.: тезисы докладов. – Казань, 1983. – С. 136.

58. Бусыгин, К.Ф. Флуоресцирующие иммуглобулины из иммуноасцитической жидкости белых крыс для диагностики бешенства / К.Ф. Бусыгин, Р.Х. Юсупов // Сборник науч. трудов КГВИ. – Казань, 1984. – С. 79-81.

59. Бучатский, Л.П. Значение рукокрылых в эпидемиологии лиссавирусных инфекций / Л.П. Бучатский // Ветеринарная патология. – 2002. – № 1. – С. 26-31.

60. Бучнев, К.Н. Специфичность и чувствительность реакции преципитации в агаровом геле при диагностике бешенства / К.Н. Бучнев, А.А. Росляков, Э.В. Ивановский // Труды науч. контрольного ин-та вет. препаратов. – М., 1968. – Т. 15. – С. 30-35.

61. Быков, В.П. Ситуация по бешенству в регионе Нижней Волги / В.П. Быков, М.Г. Таршис // Ветеринария. – 1996. – № 7. – С. 38-40.
62. Бюллетень ВОЗ о распространении заболевания бешенством в Европе. – 1995. – № 4. – С. 19-21
63. Бюллетень ВОЗ о распространении заболевания бешенством в Европе. – 1996. – № 4 – С. 20-23.
64. Вагабов, А.М. Вирусы группы бешенства / А.М. Вагабов, И.Ф. Баринский // Вопросы вирусологии. – 1979. – № 5. – С.451-457.
65. Вакцины для животных // Технический отчет ВОЗ. – 1994. – серия 931.
66. Ведерников, В.А. Современная эпизоотология бешенства: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.03. / Ведерников Виктор Алексеевич. – М., 1987. – 47 с.
67. Ведерников, В.А. Бешенство животных: монография, Б-ка практич. ветеринар. врача / В.А. Ведерников, В.А. Седов, Э.В. Ивановский. – М.: Колос. – 1974. – 112 с.
68. Ведерников, В.А. К вопросу о прогнозировании эпизоотической ситуации бешенства / В.А. Ведерников, Б.Е. Землянова // Современные проблемы зоонозных инфекций: тезисы докладов. – М., 1981. – С. 183-184.
69. Ведерников, В.А. Бешенство / Эпизоотология с микробиологией: учебное пособие для ветеринарных техникумов / В.А. Ведерников: под ред. А.И. Бакулова. – 3-е изд. – М.: Агропромиздат, 1987. – 180 с.
70. Ведерников, В.А. Эпизоотологические основы совершенствования мероприятий по профилактике бешенства / В.А. Ведерников, В.А. Седов. – Львов, 1988. – С. 71-72.
71. Ведерников, В.А. Обзор эпизоотической ситуации бешенства в Российской Федерации в 2000 году и прогноз на 2001 год // В.А. Ведерников, А.А. Шабейкин, А.А. Харкевич [и др.] // Ветеринарная патология. – 2002. – № 1. – С.52-58.
72. Ведерников, В.А. Бешенство животных в Российской Федерации / В.А. Ведерников, И.В. Балдина, А.А. Шабейкин [и др.] // Вакцинация. – 2005. – № 1. – С.15-19.

73. Ведерников, В.А. И все-таки как лечить бешенство? / В.А. Ведерников, И.В. Балдина // Ветеринарная жизнь. – 2008. – № 5. – С. 4.

74. Ведерников, В.А. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации в 2007 году и I полугодии 2008 г. / В.А. Ведерников, М.И. Гулюкин, И.К. Рождественский [и др.]. – М., 2008. – 28 с.

75. Ведерников, В.А. Краткая характеристика обстановки по бешенству животных, сложившейся в России в октябре 2010 года. Краткая характеристика эпизоотической ситуации по бешенству, сложившейся в октябре 2010 года в Центральном экономическом районе России / В.А. Ведерников, И.В. Балдина // Ветеринарная жизнь. – 2010. – № 23. – С. 2.

76. Ведерников, В.А. Бешенство в России. Важные особенности современной эпизоотической ситуации / В.А. Ведерников, И.В. Балдина, М.И. Гулюкин // Совершенствование иммунологических средств профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней: тезисы докладов Всерос. науч.-практ. конф. – М., 2010. – С. 31-32.

77. Ведерников, В.А. Rabies bulletin Europe / В.А. Ведерников, А.А. Шабейкин, А.М. Гулюкин // Infor. surveillance research. – 2014. – № 1. – 36 p.

78. Ведерников, В.А. Аналитический обзор мероприятий по профилактике и борьбе с бешенством животных в Российской Федерации / В.А. Ведерников, А.А. Шабейкин, А.М. Гулюкин [и др.]. – М., 2014.

79. Вишняков, И.Ф. Инактивированная культуральная вакцина против бешенства животных / И.Ф. Вишняков, И.В. Никишин, В.В. Недосеков [и др.] // Ветеринария. – 1998. – № 6. – С.76-80.

80. В Литве у границы с Беларусью – первый случай бешенства [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.vilno.by/news/40-v-litve-u-granicy-s>.

81. Воронин, Е.С. Иммунология: учебное пособие / Е.С. Воронин, А.М. Петров, М.М. Серых, Д.А. Девришев. – М.: Колос-Пресс. – 2002. – 408 с.

82. Вотяков, В.И / В.И. Вотяков, Н.П. Мишаков, Т.И. Самойлова // Авт. св. СССР № 1678369. – 1991.

83. Гайсаров, М.С. Эпизоотологическая характеристика бешенства животных в Республике Башкортостан, профилактика и меры борьбы с ним: дис. ... канд. биол. наук: 16.00.03. / Гайсаров Миннула Сайфуллович. – Уфа, 2009. – 117 с.

84. Глушков, А.А. Эпизоотологический мониторинг и основы эпизоотологического исследования: учебное пособие, практикум для студентов по специальности «Ветеринария» / А. А. Глушков. – М.: 2003 – 49 с.

85. Горбачев, Е.Н. Влияние физико-химических факторов на чувствительность и специфичность иммуноферментного анализа / Е.Н. Горбачев, В.Н. Вербов, А.И. Артюхов // Твердофазный иммуноферментный анализ. – Л., 1988. – Т. 64. – С. 76-80.

86. Горбачева, П. Рекомбинантная антирабическая вакцина для оральной иммунизации лисиц / П. Горбачева, В.В. Макаров // Ветеринарная патология. – 2010. – № 2. – С. 16-18.

87. ГОСТ 26075-84 (СТ СЭВ 3452-81). Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики бешенства. – М., 1984. – 9 с.

88. Грабко, В.И. Рекомбинантный вирус осповакцины, экспрессирующий протективный антиген G рабического вируса / В.И. Грабко, М.А. Селимов, И.И. Фодор [и др.] // Современные проблемы рабиологии: тезисы докладов науч. конф. – М., 1998. – С.33-34.

89. Грибенча, С.В. Современные аспекты биологии и профилактики лиссавирусных инфекций (экспериментальное исследование): дис. ... д-ра мед. наук: 03.00.06. / Грибенча Сергей Васильевич. – М., 1993. – 81 с.

90. Грибенча, С.В. Рабдовирусы / С.В. Грибенча, Д.К. Львов // Монография: Медицинская вирусология; под общ. ред. Д.К. Львова – М.: МИА, 2008. – 594 с.

91. Грибенча, С.В. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства / С.В. Грибенча, А.Ю. Козлов, Л.В. Костина [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2013. – № 5. – С. 38-43.

92. Гришок, Л.П. Оральная иммунизация лисиц против бешенства живой культуральной вакциной из штамма «Внуково-32» / Л.П. Гришок, М.А. Селимов,

Т.А. Аксенова // Актуальные проблемы медицинской вирусологии: матер. науч.-практ. конф. – М., 1985. – С. 170-172.

93. Гришок, Л.П. Эффективность и безопасность оральной иммунизации диких плотоядных против бешенства живой концентрированной вакциной из штамма «Внуково-32» / Л.П. Гришок, М.А. Селимов, Т.А. Аксенова [и др.] // Современные проблемы профилактики зоонозных болезней и пути их решения: матер. науч.-практ. конф.. – Минск, 1987. – С. 25-26.

94. Гришок, Л.П. Эпизоотологический надзор при оральной иммунизации лисиц / Л.П. Гришок // Материалы Всесоюз. конф. – Львов, 1988. – С.74-75.

95. Груздев, К.Н. Возможность исследования альтернативных методов оценки антирабических вакцин / К.Н.Груздев, В.В. Недосеков, И.Ф. Вишняков [и др.] // Инфекционные и инвазионные болезни: материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 70-летию образования зооинженерного факультета КГВИ. – Казань, 2000. – С.49.

96. Груздев, К.Н. Бешенство животных: монография / К.Н. Груздев, В.В. Недосеков – М.: «Аквариум», 2001. – 303 с.

97. Гуленкин, В.М. Применение географических информационных систем в эпизоотологическом анализе / В.М. Гуленкин, Ф.И. Коренной // Аграрная наука. – 2011. – № 9. – С. 23-26.

98. Гулюкин, М.И. Ситуация уже кризисная / М.И. Гулюкин, В.А. Ведерников // Ветеринарная жизнь. – 2008. – № 12. – С.6-8.

99. Даниленко, Г.И. Синтез и защитное действие производных фениладамантана в отношении вируса бешенства / Г.И. Даниленко, Е.А. Шабловская, Л.А. Антонова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1998. – № 2. – Т. 32. – С. 28-30.

100. Джупина, С.И. Методы эпизоотологического исследования и теория эпизоотического процесса: монография / С.И. Джупина. – Новосибирск, 1991. – 142 с.

101. Джупина, С.И. Методы эпизоотологических исследований: метод. рекомендации / С.И. Джупина, А.А. Колосов.– Новосибирск, 1991. – 57 с.

102. Джупина, С.И. Эпизоотология бешенства животных в Западной Сибири / С.И. Джупина, С.А. Юрик // В сборнике: Эпизоотология, диагностика, профилактика и меры борьбы с болезнями животных. – Новосибирск, 1997. – С. 41-42.

103. Добротворский, Е.В. Профилактика бешенства / Е.В. Добротворский // Инфекционные и паразитарные болезни мелких домашних животных: материалы Сибирской региональной науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2002. – С. 15-16.

104. Донченко, А.С. Бешенство животных / А.С. Донченко, А.С. Опанасюк // Инфекционные и паразитарные болезни мелких домашних животных: материалы Сибирской региональной науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2002. – С. 3-4.

105. Древясникова, С.Г. Особенности развития эпизоотического процесса бешенства на территории Кировской области / С.Г. Древясникова // Ветеринария – основа развития животноводства и получения безопасной продукции: материалы науч.-практ. конф. – Киров, 2011. – С. 78-82.

106. Дудников, С.А. К вопросу о ситуации по бешенству в Российской Федерации / С.А. Дудников // Ветеринарная патология. – 2002.– № 1. – С. 78-82.

107. Дудников, С.А. Лисицы как маркер риска при бешенстве / С.А. Дудников // Труды конф. ВНИИВВиМ. – Покров, 2003. – С. 69-73.

108. Жарких, А.А. Методы филогенетического анализа генов и белков:/ А.А. Жарких // Молекулярная биология. – М.: ВНИИТИ, изд-во МГУ, 1985. – 335 с.

109. Журнал «Preventive Veterinary Medicine» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/503315/description#description.

110. Журнал «Spatial and Spatio-temporal Epidemiology» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/719813/description#description.

111. Заволока, А.А. О регулировании численности бездомных животных из-за проблем с бешенством / А.А. Заволока // VetPharma. – 2013. – № 4. – С. 25-27.

112. Зубович, И.К. Защитное действие рифампицина при экспериментальной рабической инфекции белых мышей / И.К. Зубович, В.И. Вотяков, Н.П. Мишаева [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. – 1989. – № 2. – С. 123-125.

113. Евсеева, С.Д. Требования к оральным антирабически вакцинам и приманкам / С.Д. Евсеева, Е.М. Хрикунов, М.Г. Окрошидзе, И.Ю. Хухоров // Труды ВНИИВиМ. – Покров, 2005. – С. 110-111.

114. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б. Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – М.: Высшая школа. – 1991. – С. 351.

115. Елаков, А.Л. Стандартизация контроля антирабических вакцин / А.Л. Елаков, В.И. Уласов, Е.С. Иванов // Актуальные проблемы здоровья скота, завозимого в Россию в рамках национального проекта «Развитие агропромышленного комплекса»: материалы междунар. конф. – Казань, 2008. – С. 54-57.

116. Елаков, А.Л. Случаи бешенства в Москве в 2000-2010 годах / А.Л. Елаков, М.А. Семенова, И.И. Розанова // «Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения», междунар. науч.-практ. конф., посвящ. всемирному году ветеринарии в ознаменование 250-летия профессии ветеринарного врача: материалы междунар. науч.-практ. конф. – Ульяновск, 2011. – С. 85-88.

117. Елаков, А.Л. Изучение биологических свойств штамма «ERA G333» вируса бешенства / А.Л. Елаков, В.И. Уласов, Д.О. Баньковский, Г.А. Сафонов // Ветеринария. – 2011. – № 2. – С. 22-25.

118. Елаков, А.Л. Антирабические вакцины для животных, применяемые в России / А.Л. Елаков // VetPharma. – 2013. – № 4. – С. 28-30.

119. Елаков, А.Л. 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.

120. Интернет-сайт DIVA-GIS. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.diva-gis.org/Data>.

121. Жестерев, В.И. Иммунобиологические свойства штамма РБ-71/10 вируса бешенства / В.И. Жестерев, О.Г. Лаптева, М.А. Филатова // Вестник РАСХН. – 2008. – № 4. – С. 60-61.

122. Жуков, И.В. Результаты изучения антигенной принадлежности штаммов уличного вируса бешенства с использованием моноклональных антител / И.В. Жуков // Бюл. ВНИИ экспериментальной ветеринарии. – 1988. – Вып. 65. – С.54-55.

123. Жуков, И.В. Особенности эпизоотологии бешенства на территории Липецкой области / И.В. Жуков, М.С. Гурьев, А.В. Кадин // Вторая региональная конф. практикующих ветеринарных врачей: материалы конф. – Воронеж, 2004. – С. 65-67.

124. Зибицкер, Д.Е. Бешенство и его профилактика (по материалам Белоруссии) / Д.Е. Зибицкер, Н.А. Ковалев. – Минск: Урожай, 1968. – С. 200.

125. Зуева, Н.Я. Выявление антигена вируса бешенства реакцией энзим-меченных антител / Н.Я.Зуева, Н.А. Хисматуллина, К.Ф. Бусыгин [и др.] // Сборник науч. трудов КГВИ. – Казань, 1984. – С. 104-110.

126. Еремин, В.И. Эпизоотическая ситуация при бешенстве в Саратовской области / В.И. Еремин, Н.А. Заяц, Л.И. Наркайтис [и др.] // Саратовский науч.-метод. журнал. – 2011. – Т. 7. – № 4. – С. 860-862.

127. Иванов, В.С. Состояние и перспективы борьбы с бешенством животных и человека / В.С. Иванов, П.П. Кузнецов, Е.Э. Школьников // Вестник РАСХН. – 2000. – № 2. – С. 48-52.

128. Иванов, В.С. Бешенство животных: экспериментально-теоретическое обоснование разработки, производства, применения культуральных инактивированных вакцин и новые подходы к проблеме экстренной защиты ЦНС от возбудителя заболевания: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.03. / Иванов Виктор Серафимович. – Щелково, 2001. – 40 с.

129. Иванов, А.В. Эпизоотолого-эпидемиологический надзор за бешенством: методическое руководство / А.В. Иванов, Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов [и др.] – Казань: ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 2007. – 95 с.
130. Иванов, А.В. Диагностика и профилактика бешенства животных: учебно-методич. пособие / А.В. Иванов, Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов, А.Н. Чернов. – М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2007. – 60 с.
131. Иванов, А.В. Эпизоотологический и иммунологический надзор за бешенством / А.В.Иванов, Н.А. Хисматуллина, А.М. Гулюкин // Ветеринарный врач. – Казань, 2010. – № 4 (17). – С. 3-6.
132. Иванов, А.В. Бешенство: этиология, эпизоотология, диагностика: учебно-методическое пособие в иллюстрациях / А.В. Иванов, Н.А. Хисматуллина, А.Н. Чернов, А.М. Гулюкин. – М.: Колос, 2010. – 54 с.
133. Канторович, Р.А. Актуальные проблемы природной очаговости бешенства / Р.А. Канторович // I республиканская конф. по проблемам снижения инфекционных заболеваний и оздоровлению внешней среды: материалы конф. – Душанбе, 1967. – С. 129-130.
134. Каплан, М.М. Методы лабораторных исследований по бешенству / М.М. Каплан // ВОЗ. – Женева, 1975. – С. 124–134.
135. Кисленко, В.Н. Основы географической эпизоотологии: учебное пособие, для студентов специальности «Ветеринария» / В.Н. Кисленко, Н.А. Шкиль, С.К. Димов [и др.]; под ред. А.С. Донченко. – Новосибирск, 1997. – 84 с.
136. Ключева, Е.В. Иммунофлуоресцентный метод индикации антигена вируса бешенства, выращиваемого *in vivo* и *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук – М., 1967. – 17 с.
137. Ключкина, В.И. Иммуноферментная тест-система для определения уровня иммунитета у вакцинированных против бешенства кошек и собак / В.И. Ключкина, П.П. Рахманин, А.В. Проничев // Ветеринария и кормление. – 2008. – № 3. – С. 12-14.
138. Кобзарь, Л.В. Организация противоэпизоотических мероприятий в г. Новосибирске / Л.В. Кобзарь // Инфекционные и паразитарные болезни мелких

домашних животных: материалы Сибирской региональной науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2002. – С. 12-14.

139. Коваклова, Л. Твердофазный вариант иммуноферментного анализа к вирусу бешенства в сыворотках людей / Л. Коваклова, М. Ешкенази, Т. Ганчева, В. Вачева // Acta virol. – 1984. – № 28. – С. 422-427.

140. Ковалев, Н.А. Иммунофлуоресцентное исследование отпечатков роговицы глаза при бешенстве / Н.А. Ковалев, А.С. Шашенько // Ветеринария. – 1970. – № 9. – С. 44-46.

141. Кодекс здоровья наземных животных МЭБ: Всемирная организация здравоохранения животных. – Париж, 2013. – Т. 1. – Изд. 22. – 432 с. (неофициальный перевод).

142. Ковалев, Н.А. Выделение вируса бешенства / Н.А. Ковалев // В книге: Новые методы диагностики зоонозных инфекций – Минск, «Урожай», 1982. – С. 47-69.

143. Ковалев, В. Л. Проблемы инфекционных болезней животных в Крыму и пути их решения в XXI веке / В.Л. Ковалев, А.Ф. Барабаш // Сборник статей: Агропромышленный комплекс Крыма в XXI веке. – Симферополь, 2002. – С. 140-150.

144. Колесникова, Р.А. Вопросы эпизоотологии дикования животных в Якутии / Р.С. Колесникова // 8 Всесоюзн. конф. по природной очаговости болезней животных и охране их численности: труды конф. – Киров, 1972. – С. 36-37.

145. Колесникова, Р.А. Дикование и колебание численности животных в Якутии / Р.А. Колесникова // 4 сессия зоологов Сибири: Зоологические проблемы Сибири: материалы сессии. – Новосибирск, 1972. – С. 52-54.

146. Коломакин, Г.А. О постановке, учете и специфичности реакции преципитации в агаровом геле при диагностике бешенства / Г.А. Коломакин, Г.А. Бельченко, М.М. Смирнова // Лабораторное дело. – 1970. – № 6. – С. 370-372.

147. Коломакин, Г.А. К вопросу серологической диагностики бешенства. / Г.А. Коломакин, М.С. Тимонина // Ветеринария. – 1972. – № 5. – С. 105-106.

148. Кондрахин, И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: справочник; под ред. проф. И. П. Кондрахина / И.П. Кондрахин, А.В. Архипов, В.И. Левченко [и др.]. – М.: Колос, 2004. – 520 с.

149. Коренной, Ф.И. Применение геоинформационной системы на основе ArcGIS в эпизоотологическом анализе / Ф.И. Коренной, В.М. Гуленкин // Геоинформационные системы для бизнеса и общества. – 2011. – № 3 (58). – С. 42-47.

150. Корзун, В.М. Динамика эпизоотической активности и численности монгольской пищухи в Горно-Алтайском природном очаге чумы / В.М. Корзун, Е.В. Чипанин, Т.И. Иннокентьева [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – Вып. 106. – С. 13-18.

151. Коротков, Г.Ф. К эпизоотологии бешенства животных в Курганской области / Г.Ф. Коротков // Троицкий ветеринарный ин-т: труды ин-та – Троицк, 1967. – С. 143-147.

152. Кост, Е.А. Определение фагоцитарной активности лейкоцитов: методическое пособие к лабораторным занятиям по основам научных исследований / Е.А. Кост, М.И. Стенко. – Саратов, 1981. – С. 98.

153. Красильников, В.Р. Прогнозирование активности очагов бешенства по биотическим и климатическим факторам / В.Р. Красильников, С.А. Куролап // ЖМЭИ –1987. – № 2. – С. 38-42.

154. Крупальник, В.П. Бешенство собак в Шри-Ланке и меры борьбы с ним / В.П. Крупальник, Самнат Нагасинг // Актуальные вопросы инфекционных и инвазионных болезней животных. – М., 1995. – С. 130-131.

155. Крюков, С.В. Особенности эпизоотического процесса и меры борьбы с бешенством в Кировской области / С.В. Крюков, Н.В. Мельник, В.Н. Боровой и [и др.] // Ветеринарный врач. – 2011. – № 3. – С. 7-10.

156. Крюков, С.В. Борьба с бешенством в Кировской области. Особенности эпизоотического процесса / С.В. Крюков, Н.В. Мельник, В.Н. Боровой, С.Г. Дресвянникова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2011. – № 2. – С. 25-28.

157. Кузьмин, И.В. Лиссавирус с необычной антигенной структурой, выделенный от летучий мыши на юге Кыргызстана / И.В. Кузьмин, А.Д. Ботвинкин, С.Н. Рыбин, А.В. Баялиев // Вопросы вирусологии. – 1992. – № 5–6. – С. 256-259.

158. Кузьмин, И.В. Р-41 положительный штамм рабического вируса выделен от человека на Севере Красноярского края / И.В. Кузьмин, З.С. Лукашенко // Современные проблемы рабиологии: тезисы докладов науч. конф. – М., 1998. – С. 6-7.

159. Кузьмин, И.В. Эпизоотическая ситуация и перспективы борьбы с бешенством диких животных на юге Западной Сибири / И.В. Кузьмин, Г.Н. Сидоров, А.Д. Ботвинкин // Журнал микробиолога – 2001. – № 3. – С. 28-35.

160. Кузьмин, И.В. Бешенство на юге Западной Сибири в 1990-2000 гг.: вопросы и поиск решений / И.В. Кузьмин, Г.Н. Сидоров, А.Д. Ботвинкин [и др.] // Ветеринарная патология. – 2002. – № 1. – С. 92-100.

161. Кузьмин, И.В. Современные данные о лиссавирусах, связанных с рукокрылыми, на территории СНГ / И.В. Кузьмин, А.Д. Ботвинкин, С.Н. Рыбин [и др.] // Ветеринарная патология. – 2002. – № 1. – С. 31-36.

162. Кузнецов, Ю. А. Эпизоотическая ситуация по бешенству в Крыму / Ю.А. Кузнецов, В.Я. Перемячкин, Н.С. Овдиенко, А.Ф. Барабаш // Ветеринарные науки. – Симферополь, 1999. – Вып. 63. – С. 78-84.

163. Лазарев, А.А. Значение промысловых зверей в распространении некоторых природноочаговых инфекций на Камчатке / А.А. Лазарев // 8 Всес. конф. по природной очаговости болезней: труды конф. – Киров, 1972. – С. 103-104.

164. Леонова, Г.Н. Изоляция и изучение лиссавируса, вызвавшего летальную инфекцию у человека в Приморском крае / Г.Н. Леонова, С.И. Беликов, И.Г. Кондратьев [и др.] // Актуальные проблемы природной очаговости болезней: мат. Всерос. конф. – Омск: ИЦ «Омский издательский центр», 2009. – С. 115-117.

165. Лещинская, И.Б. Получение и характеристика высокоочищенного препарата нуклеазы *Serratia marcescens* / И.Б. Лещинская, Н.П. Балабан,

Г.С. Егорова, В.И. Таняшин, Т.М. Третьяк // Биохимия. – 1974. – № 39. – С. 116-122.

166. Литвин, В.П. Єпізоотологічні аспекти прояву сказу в регіонах України та заходи боротьби / В.П. Литвин, В.В. Поліщук // Аграрний вісник Причорномор'я. Ветеринарні науки. – Одеса, 2003. – Вип. 21. – С.54-62.

167. Львов, Д.К. Вирусы гриппа: события и прогнозы / Д.К. Львов, А.Д. Забережный, Т.И. Алипер // Природа. – 2006. – № 6. – С. 3-13.

168. Львов, Д.К., Эпизоотия среди диких и домашних птиц, вызванная высоковирулентным вирусом гриппа А/Н5N1 генотипа 2.2 (цинхай – сибирский) на пути осенних миграций в северо-восточной части бассейна Азовского моря (Краснодарский край) / Д.К. Львов, М.Ю. Щелканов, П.Г. Дерябин [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2008. – Т. 53. – № 2. – С. 14-19.

169. Мальков, Г.Б. О биологических основах прогноза эпизоотической обстановки в природных очагах бешенства / Г.Б. Мальков, Л.Я. Грибанова // 10-я Всесоюзн. конф. по природной очаговости болезней: тезисы докладов. – Душанбе, 1979. – Вып. 2. – С. 132-134.

170. Мальков, Г.Б. Основные причины устойчивого эпизоотического и эпидемического неблагополучия и некоторые пути повышения эффективности мероприятий по профилактике бешенства в Восточной Сибири и Дальнем Востоке / Г.Б. Мальков, Л.Я. Грибанова, Б.А. Котов [и др.] // Природноочаговая инфекция в районах народнохозяйственного освоения Сибири и Дальнего Востока: сборник статей – Омск, 1983. – С. 112-120.

171. Макаров, В.В. Эволюционно-экологические особенности эпидемиологии бешенства на современном этапе / В.В. Макаров, В.А. Ведерников, С.И. Джупина [и др.] // Сводный отчет по проекту ФЦП «Интеграция» № Е 0096. – 2001. – С. 5.

172. Макаров, В.В. Бешенство: очерк мирового нозоареала и общие элементы контроля / В.В. Макаров // Ветеринарная патология. – 2002. – № 1. – С. 12-20.

173. Макаров, В.В. 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.

174. Макаров, В.В. Современная эпизоотология бешенства / В.В. Макаров, С.И. Джупина, В.А. Ведерников [и др.] // Журнал микробиолога – 2002. – № 4. – С. 33-36.

175. Макаров, В.В. Состояние и возможные направления развития центрально-европейского суперареала бешенства / В.В. Макаров // Ветеринарный консультант. – 2003. – № 7. – С. 7.

176. 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.

177. Макаров, В.В. Бешенство в Восточной Европе: актуальный вектор развития эпизоотического процесса / В.В. Макаров, О.И. Сухарев, А.М. Гулюкин, Б.В. Боев // Вестник Россельхозакадемии. – 2008. – № 4. – С. 58-60.

178. Макаров, В.В. Тенденции распространения бешенства в Восточной Европе / В.В. Макаров, О.И. Сухарев, А.М. Гулюкин [и др.] // Ветеринария. – 2008. – № 6. – С. 20-25.

179. 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.

180. Макаров, В.В. Оральная вакцинация лисиц против бешенства безальтернативна / В.В. Макаров // Ветеринарная патология. – 2009. – № 4. – С. 104-107.

181. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: справочник / М.Д. Машковский – Харьков: Торсинг, 1998. – Т. I. – С.142-143.

182. Машковский, М.Д. Лекарственные средства: справочник / М.Д. Машковский. – Харьков: Торсинг, 1998 – Т. 2. – С. 140-141.

183. Мельникова, Е.П. Гемодез-Н – новое дезинтоксикационное средство / Е.П. Мельникова [и др.] // Новые лекарственные препараты. –1988. – № 9.– С.1-8.

184. Метлин, А.Е. Молекулярно-биологические характеристики полевых изолятов и аттенуированных штаммов вируса бешенства: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03./ Метлин Артем Евгеньевич. – Владимир, 2004. – 27 с.

185. Метлин, А.Е. Диагностика бешенства животных с использованием реакции иммунофлуоресценции / А.Е. Метлин, Н.А. Назаров, С.С. Рыбаков [и др.] // Ветеринария с.-х. животных. – 2007. – №3. – С. 29-33.

186. Метлин, А.Е. Меры борьбы с бешенством / А.Е. Метлин // Ветеринария Кубани. – 2008. – № 1. – С. 68-73.

187. Метлин, А.Е. Оральная вакцинация диких плотоядных животных против бешенства / А.Е. Метлин, С.С. Рыбаков, В.В. Михалишин // Ветеринария. – 2009. – №8. – С.18-25.

188. Метлин, А.Е. Бешенство животных: эпизоотология, меры борьбы и перспективы / А.Е. Метлин, Е.В. Чернышева, С.С. Рыбаков // Ветеринария Кубани. – 2009. – № 6. – С. 2-4.

189. Методика определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий. – М., 1997. – 36 с.

190. Методические указания по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в тканях зубов и костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин / А.Ю. Сухарьков, Е.В. Чернышова, А.Е. Метлин [и др.] – М., 2010. – 11 с.

191. Методические рекомендации по использованию географической информационной системы / И.Ф. Коренной, М.В. Дудорова, В.М. Гуленкин, С.А. Дудников. – Владимир, 2010. – 3 с.

192. Мишаева, Н.П. Прижизненная экспресс-диагностика бешенства у больных / Н.П. Мишаева [и др.] // Заявка на патент в БелГосПатент. Рег. № U20080856.

193. Михайловский, В.В. Материалы по выращиванию уличного вируса в культуре ткани: дис. ... д-ра мед. наук – М., 1967. – 423 с.

194. Молодкин, А.В. Перспектива использования моноклональных антител для диагностики бешенства животных / А.В. Молодкин, Н.А. Назаров, Н.М.

Михайлина [и др.] // Федеральный центр охраны здоровья животных: труды ин-та. – Владимир, 2009. – Т. 7. – С. 43-50.

195. Мовсесянц, А.А. Вопросы экстренной профилактики бешенства / А.А. Мовсесянц, Г.Б. Агеенко // Ветеринарная патология. – 2002. – № 1. – С. 48-51.

196. Мовсесянц, А.А. Гидрофобия у людей, леченных специфическими иммунопрепаратами / А.А. Мовсесянц, Т.А. Бектимиров // Ветеринарная патология. – 2002. – № 1. – С. 40-47.

197. Мовсесянц, А.А. Бешенство – серьезная проблема наших дней / А.А. Мовсесянц // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2003. – № 3. – С. 12-15.

198. Мовсесянц, А.А. Бешенство: Особенности современной ситуации в России // А.А. Мовсесянц // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2011. – № 7. – С. 78-82.

199. Назаров, Н.А. Разработка твердофазного варианта иммуноферментного анализа для диагностики бешенства животных / Н.А. Назаров, Н.М. Михайлина, С.С. Рыбаков [и др.] // Федеральный центр охраны здоровья животных: труды ин-та. – Владимир, 2006. - Т. 4. – С. 81-85.

200. Назаров, Н.А. Получение моноклональных антител для диагностики бешенства животных / Н.А. Назаров, А.О. Шепеляковская, А.Е. Метлин [и др.] // Наука и образование для целей биобезопасности: материалы 5 междунар. конф. – Пущино, 2008. – С. 81-85.

201. Назаров, Н.А. Диагностика бешенства методом твердофазного непрямого сэндвич-варианта иммуноферментного анализа / Н.А. Назаров, А.В. Чепуркин, С.С. Рыбаков [и др.] // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: материалы междунар. науч. конф., посвящ. 45-летию ВНИИЗЖ. – Владимир, 2003. – С. 218-222.

202. Нафеев, А.А. Бешенство (эпизоотологический, эпидемический аспекты на территории Ульяновской области): монография / А.А. Нафеев, Д.А. Васильев, А.В. Меркулов, Н.И. Пелевина // Ульяновск: УГСХА им. П.А. Столыпина, 2014. - 197 с.

203. Недосеков, В.В. Разработка и усовершенствование средств и методов оценки эффективности вакцин против бешенства: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. / Недосеков Виталий Владимирович. – Покров, 1998. – 26 с.

204. Недосеков, В.В. Разработка и совершенствование средств и методов диагностики бешенства животных и контроля эффективности антирабических вакцин: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.03. / Недосеков Виталий Владимирович. – Покров, 2003. – 35 с.

205. Недосеков, В.В. Обнаружение антител к вирусу бешенства иммунопероксидазным монослойным методом / В.В. Недосеков, И.Ф. Вишняков, В.И. Жестерев [и др.] // Проблемы инфекционной патологии сельскохозяйственных животных: материалы междунар. конф., посвящ. 100-летию открытия вируса ящура. – Владимир, 1997. – С.181-182.

206. Недосеков, В.В. Титрование антирабических антител с помощью теста ингибиции фокусов флуоресценции / В.В. Недосеков, И.Ф. Вишняков, В.И. Жестерев [и др.] // Ветеринария. – 1998. – № 7. – С.28-30.

207. Herwijnen, R.V. Обзор эпизоотической ситуации, 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.

208. Ничик, С.А. Визначення оптимальної дози вірусу та схеми пероральної антирабичної імунізації диких хижаків / С.А. Ничик // Забезпечення ветеринарно-санітарного благополуччя тваринництва, якості і безпеки продукції. – Одеса, 2004. – Частина 1. – С. 159-162.

209. Обзор эпизоотической ситуации бешенства в Российской Федерации в 2004 году и прогноз на 2005 год / В.А. Ведерников, И.В. Балдина, М.И. Гулюкин [и др.]. – М., 2005.

210. Обзор эпизоотической ситуации бешенства в Российской Федерации в 2007 году и I полугодии 2008 года. Ориентировочный прогноз изменений эпизоотической обстановки / В.А. Ведерников, И.В. Балдина, М.И. Гулюкин [и др.] // Отчет о НИР: РАСХН. – М., 2008.

211. Онищенко Г.Г. Об усилении мероприятий по борьбе с бешенством в Российской Федерации / Постановление Главного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2008 г. № 53, в гос. рег. не нуждается, письмо Минюста РФ от 09.10.08 г. № 10/10484-АА // Российская газета, 21.11.2008, №4797 (0).

212. Онищенко, Г.Г. Об усилении мероприятий по борьбе с бешенством в Российской Федерации / Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 01 февраля 2012 г. № 15 «Об усилении мероприятий, направленных на профилактику бешенства в РФ»: зарег. в Минюсте РФ 15.03.2012., № 23493 // Российская газета, от 23.03.12 г., № 5737 (64).

213. Осипова, Н.И. Меры борьбы с бешенством / Н.И. Осипова // Ветеринария: Реферативный журнал. – ЦНСХБ. – 2008. – № 3. – С. 776.

214. Падалка, О.В. Динаміка епізоотичного процесу та напруженість епізоотичної ситуації що до сказу в різних регіонах Україні / О.В. Падалка // Аграрний вісник Причорномор'я. – Одеса: 2003. – Вип. 21. – С. 46-53.

215. Павленко Н., Троценко З. Деякі аспекти епізоотології сказу в Україні / Н. Павленко, З. Троценко // Ветеринарна медицина України. – 2001. – № 2. – С. 18-19.

216. Павлов, М.П. Волк – реально опасен в очагах бешенства на Вятской земле / М.П. Павлов // Научн.- практ. конф., посвящ. первой антирабической прививке в Вятской губернии: материалы научн.- практ. конф. – Киров, 1999. – С. 38-41.

217. Павловский, В.В. Специфическая профилактика бешенства. / В.В. Павловский, Л.П. Семенова, Э.В. Ивановский // ВГНКИ вет. препаратов: труды ин-та. – М., 1975. – С. 35-40.

218. Пантелеев, О.А. Непрямой твердофазный метод иммуноферментного анализа, его точность и источники погрешностей / О.А. Пантелеев, Л.И. Ванеев // ЖМЭИ. – 1986. – № 3. – С. 95-99.

219. Пантюшенко, М.С. Использование полимеразной цепной реакции для выявления полевых изолятов вируса бешенства / М.С. Пантюшенко,

М.А. Наумкина, В.В. Недосеков [и др.] // Современные проблемы рабиологии: тезисы докладов науч. конф.: – М., 1998. – С. 26-27.

220. Папуниди, К.Х. Иммуноферментный метод для серологической диагностики ботулизма / К.Х. Папуниди, Г.Л. Адгамова // Рациональные методы профилактики, диагностики и терапии незаразных болезней животных: сб. науч. трудов КГВИ. – Казань, 1993. – С. 94-95.

221. Перечень карантинных и особо опасных болезней животных / Приказ МСХ РФ от 19.12.2011 г., № 476, зарег. в Минюсте РФ 13.02.2012 г., рег. № 23206, опубл. «Российская газета» от 28.02.2012 г. № 23206.

222. Петрова, О.Г. Эпизоотическая обстановка по бешенству на территории Свердловской области / О.Г. Петрова, И.М. Мильштейн, А.В. Молокова // Аграрный вестник. – 2010. – № 11. – С. 35-36.

223. Петрова, Т.П. Иммунологический мониторинг бешенства в дикой фауне на территории Калининградской области / Т.П. Петрова // IV Международный Казанский инновационный нанотехнологический форум: материалы форума. – Казань, 2012. – С. 475-477.

224. Петрова, Т.П. Анализ заболеваемости бешенством среди различных видов животных и их роль в распространении этого зооноза на территории Калининградской области / Т.П. Петрова, В.Е. Кадочников // Биотехнологии в решении экологических проблем природы, общества и человека в Евразии: взгляд молодых ученых и специалистов. // матер. Межд. науч. – практ. конф. 26–29 марта. – Казань, 2013. – С. 114-116.

225. Петрова, О.Г. Современная эпизоотология бешенства животных / О.Г. Петрова, И.В. Новикова // Аграрный вестник Урала.– 2015.– № 10. – С. 12-15.

226. Пиле, Э.Р. Лиссавирусы / Э.Р. Пилле// Вопросы вирусологии . –1996. – № 1. – С. 2-6.

227. Плотникова, Э.М. Оценка иммуноферментного анализа для серологической диагностики бруцеллеза / Э.М. Плотникова, К.М. Салмаков // Юбилейная науч. конф., посвящ. 70-летию образования науч.-иссл. института микробиологии МО РФ: материалы науч. конф. – Киров, 1998. – С. 194-195.

228. Показий, А.Г. Паразитарная система бешенства в Челябинской области. Данные за 2000–2006 гг. / А.Г. Показий, Т.Н. Давыдова // Актуальные вопросы ветеринарной медицины и биологии. – Урал. гос. акад. ветеринар. медицины, Троицк, 2007. – С. 125–128.

229. Поклонская, Н.В. Использование различных модификаций метода полимеразной цепной реакции при диагностике энтеровирусных инфекций / Н.В. Поклонская, Т.В. Амвросьева, О.В. Дьяконова, О.Б. Щербакова // Медицинские новости. – 2003. – № 1. – С. 91-93.

230. Полещук, Е.М. Бешенство в Российской Федерации. Информационно-аналитический бюллетень / Е.М. Полещук, Г.Н. Сидоров, Е.С. Березина. – Омск, 2013. – 65 с.

231. Полещук, Е.М. Итоги изучения антигенного и генетического разнообразия вируса бешенства в популяциях наземных млекопитающих России / Е.М. Полещук, Г.Н. Сидоров, С.В. Грибенча // Вопросы вирусологии. – 2013. – № 3. – С. 9-16.

232. Полещук, Е.М. Бешенство в Российской Федерации. Информационно-аналитический бюллетень / Е.М. Полещук, Г.Н. Сидоров, Д.Г. Сидорова, Н.М. Колычев. – Омск, 2009. – 46 с.

233. Полюшкина, Г.С. Эпизоотическая ситуация по бешенству в Московской области и пути ее усовершенствования / Г.С. Полюшкина, А.А. Горкунов // Вопросы вирусологии. – 1998. – № 1. – С. 47-48.

234. Поляков, А.В. О роли численности песца и мышевидных в возникновении тундрового бешенства / А.В. Поляков // 8-я Всесоюзн. конф. по природной очаговости болезней: труды конф. – Киров, 1972. – С. 50-52.

235. Постановление Главного государственного санитарного врача по Смоленской области от 10.02.2009 г. №2 «Об усилении мероприятий по борьбе с бешенством на территории Смоленской области».

236. Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных. Бешенство. Санитарные правила СП 3.1.096-96. Ветеринарные правила 13.3.1103-96. – М., 1996.

237. Прохорятова, Е.В. Современная характеристика бешенства в Харьковской, Сумской и Полтавской областях / Е.В. Прохорятова, М.В. Бабкин, С.А. Нычик, З.Р. Троценко // Ветеринарна медицина. Міжвід. тематичний науковий зб. – Харків. – 2005. – Т. 2. – С. 930-933.

238. Рахманин, П.П. Иммуноферментная тест-система для определения уровня иммунитета у вакцинированных против бешенства кошек и собак / П.П. Рахманин, В.И. Клюкина, А.Б. Проничев // Ветеринария и кормление. – 2008. – № 3. – С. 12-14.

239. Рубан, В.И. Современные биотехнологические процессы и иммунологические методы при промышленном производстве ветеринарных препаратов (диагностикумов): мат. Межд. научно-пр. конф. «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» – Щелково, 2007. – С. 6-10.

240. Савицкий, В.П. Эпидемиологическое районирование и долгосрочное прогнозирование заболеваемости бешенством по Восточной Сибири и Дальнему Востоку / В.П. Савицкий, А.Д. Ботвинкин // Современные методы изучения природноочаговых болезней НИИЭМ им. Пастера – Л., 1980. – С. 41.

241. Савицкая, Т.А. Изучение иммунобиологических свойств изолятов рабического вируса и совершенствование эпизоотолого-эпидемиологического надзора за бешенством в Республике Татарстан: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 , 16.00.03 / Савицкая Татьяна Александровна. – Казань, 2007. – 23 с.

242. Савицкая, Т.А. Изучение иммунобиологических свойств изолятов рабического вируса и совершенствование эпизоотолого-эпидемиологического надзора за бешенством в Республике Татарстан: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 , 16.00.03 / Савицкая Татьяна Александровна. – Казань, 2007. – 164 с.

243. Сазанова, Э.Я. Иммуноферментный метод определения уровня антител к вирусу бешенства в сыворотке крупного рогатого скота / Э.Я. Сазанова, Е.В. Маслов, С.В. Кузнецова [и др.] // Всесоюзн. конф. по проблемам бешенства: тезисы докл. – Львов, 1988. – С. 96.

244. Самуйленко, А.Я. Современные биотехнологические методы при промышленном производстве ветеринарных препаратов / А.Я. Самуйленко, Е.А. Рубан, В.И. Еремец [и др.] // межд. науч.-практ. конф.: матер. конф. – Щелково, 2007. – С. 6-10.

245. Сатаров, Л. Вирусологическое изучение природных очагов бешенства в тундровом и центральном районах РСФСР / Л. Сатаров, Е. Ключева, М. Селимов [и др.] // Симпозиум по бешенству. – Потсдам, 1977. – С. 232.

246. Сафонов, Г.А. Изучение свойств штамма ERA G333 вируса бешенства / Г.А. Сафонов, Д.О. Баньковский // Вестник РАСХН. – 2009. – № 6. – С. 70-72.

247. Сафонов, Г.А. Оценка антигенных и иммуногенных свойств штамма ERA G333 вируса бешенства / Г.А. Сафонов, Д.О. Баньковский // Вестник РАСХН. – 2010. – № 6. – С. 61-63.

248. Седов, В.А. Бешенство животных в РФ. Некоторые пути совершенствования системы надзора и контроля / В.А. Седов, В.А. Ведерников, В.Е. Землянова [и др.] // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: материалы межд. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ. – Покров, 1998. – С. 156-159.

249. Седов, В.А. Особенности современного этапа эволюции эпизоотического процесса бешенства / В.А. Седов, В.А. Ведерников, В.Е. Землянова [и др.] // Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных: материалы межд. науч.-практ. конф., посвящ. 40-летию ВНИИВВиМ. – Покров, 1998. – С. 153-156.

250. Седов, В.А. Важнейшие инфекции диких парнокопытных животных / В.А. Седов, В.А. Ведерников, С.А.Черниченко // Болезни и паразиты диких животных. – М., 1992. – С. 4-11.

251. Селимов, М.А. Бешенство: монография / М.А. Селимов. – М.: Медицина.– 1978. – 336 с.

252. Селимов, М.А. Применение метода флуоресцирующих антител для индикации вируса бешенства на культуре клеток / М.А. Селимов, Е.В. Ключева,

Е.В. Семенова [и др.] // В кн.: Вопросы борьбы с бешенством. – М.: Медицина, 1963.

253. Селимов, М.А. Современная эпизоотическая ситуация и перспективы элиминации бешенства / М.А. Селимов // Вопросы вирусологии. – 1998. – № 5. – С. 196-198.

254. Селимов, М.А. Современные достижения в области рабиологии: обзорная информация / М.А. Селимов. – М.: ВНИИМИ, 1987. – Вып. 4. – С. 35-40.

255. Селимов, М.А. Идентификация штаммов лесного и арктического бешенства с помощью моноклональных антител / М.А. Селимов, А.Д. Ботвинкин, А.Г. Татаров // Современные проблемы профилактики и лечения заразных заболеваний и лейкозов: материал. научн.-практ. конф. – Минск, 1982. – С. 17-18.

256. Селимов, М.А. Идентификация штаммов сивьватического и арктического бешенства с помощью моноклональных антител / М.А. Селимов, А.Д. Ботвинкин, А.Г. Татаров // Вопросы вирусологии. – 1983. – № 2. – С. 243-244.

257. Селимов, М.А. Новые данные о распространении Р-41 положительных штаммов рабического вируса в арктическом и внеарктическом регионах / М.А. Селимов, А.Д. Ботвинкин, В.В. Хозинский, Л.Я. Грибанова // ЖМЭИ. – 1994. – № 2. – С.53-56.

258. Селимов, М.А. Применение реакции связывания комплемента для индикации вируса бешенства в культуре ткани / М.А. Селимов, Л.И. Калинина, Т.А. Аксенова [и др.] // Вопросы борьбы с бешенством. – М., 1967. – Т. 9. – С. 70-79.

259. Селимов, М.А. Современные методы лабораторной диагностики бешенства: монография / М.А. Селимов, Е.В. Ключева, Е.В. Семенова. – М.: Медицина, 1964. – С. 58.

260. Селимов, М.А. Лиссаподобный вирус Юли и идентификация его с помощью антинуклеокапсидных моноклональных антител / М.А. Селимов, А.Г. Татаров, А.Д. Ботвинкин М. [и др.] // Rabies information Exchange. – USA. – 1987. – P. 5-15.

261. Селимов, М.А. К проблеме генно-инженерной антирабической вакцины / М.А. Селимов, И.И. Фодор, В.И. Грабко // Генно-инженерные и синтетические вакцины: матер. науч.-практ. конф. – Пущино, 1990. – С. 64-70.

262. Сидоров, Г.Н. Пространственно-временное прогнозирование эпизоотий бешенства природного типа в России / Г.Н.Сидоров // Современные проблемы рабиологии: тезисы докладов науч. конф. – М., 1998. – С. 11-12.

263. Сидоров, Г.Н. Роль диких собачьих (canidae) в поддержании эпизоотического процесса в природных очагах бешенства на территории России в связи с особенностями экологии этих животных: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 16.00.03. / Сидоров Геннадий Николаевич. – Новосибирск, 1995. – 39 с.

264. Сидоров, Г.Н. Прогнозирование бешенства в Западной Сибири и регуляторные факторы эпизоотического процесса / Г.Н. Сидоров, Л.Н. Грибанова, Н.Г. Корсаков [и др.] // ЖМЭИ . – 1990. – № 7. – С. 31-37.

265. Сидоров, Г.Н. Особенности распределения диких собачьих в Якутии, как фактор эпизоотического неблагополучия по бешенству / Г.Н. Сидоров, Л.Я. Грибанова, С.М. Чернов [и др.] // Вопросы региональной гигиены, санитарии и эпидемиологии. – Якутск, 1987. – Вып. 2. – С. 148-151.

266. Сидоров Г.Н. Особенности поведения диких млекопитающих, инфицированных вирусом бешенства / Г.Н. Сидоров, А.Д. Ботвинкин, И.В. Кузьмин // Зоологический журнал. – 1998. – № 77 (11). – С. 1310-1316.

267. Сидоров, Г.Н. Аспекты исторического развития природных очагов бешенства в Европе и Северной Азии / Г.Н. Сидоров // Ветеринарная патология. – 2002. – № 1. – С. 21-26.

268. Сидоров Г.Н. Природные очаги бешенства в России в XX-начале XXI века / Г.Н. Сидоров, Е.М. Полещук, Д.Г. Сидорова // Ветеринарная патология. – 2004. – № 3 (10). – С.86-101.

269. Сидоров, Г.Н. К вопросу о прогнозировании эпизоотического процесса при бешенстве на территории России / Г.Н. Сидоров, Д.Г. Сидорова, Н.М. Колычев, Е.М. Полещук // Ветеринарная патология. – 2007. – № 3. – С. 17-23.

270. Сидоров Г.Н. Бешенство диких млекопитающих на территории России в конце 20- начале 21 века / Г.Н. Сидоров, Д.Г. Сидорова, Е.М. Полещук // Зоологический журнал. – 2010. – № 89 (1). – С. 26-36.

271. Сидорова, Д.Г. Современные экологические особенности проявления эпизоотического процесса бешенства в природных очагах: автореф. дис. ... канд. биол. наук.: 16.00.03. / Сидорова Дарья Геннадьевна – Новосибирск, 2009. – 25 с.

272. Сидорчук, А.А. Общая эпизоотология: учебное пособие для студентов специальности «Ветеринария» / А.А. Сидорчук, Е.С. Воронин, А.А. Глушков. – М.: Колос, 2004. – 62 с.

273. Советский энциклопедический словарь: под редакцией В.М. Кожевникова – М., 1987.

274. Состояние ресурсов охотничьих животных в Российской Федерации в 2003-2007 гг. // Охотничьи животные России. – 2007. – Вып. 8. – С. 3-5

275. Сологуб, Т.В. Выявление антител к вирусу бешенства методом ингибирования твердофазного ИФА / Т.В. Сологуб, В.Н. Никитин, Н.Ф. Вишняков // Вопросы ветеринарной вирусологии, микробиологии и эпизоотологии.– Покров, 1992. – Ч. 2 – С. 260-262.

276. Скачкова, М.А. Эпизоотологические особенности и эпидемическая проекция в Западно-Казахстанской области / М.А. Скачкова, Г.Г. Абсатиров // Новости науки Казахстана. – 2015. – № 4. – С. 36-39.

277. Сливко, И.А. Иммунобиологические свойства вакцинных штаммов ТС-80 и 71 БелНИИЭВ-ВГНКИ вируса бешенства: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. / Сливко Игорь Александрович. – Покров, 2003. – 22 с.

278. Соколов, Н.Н. Проблема эпизоотии «дикования» или «тундрового бешенства» млекопитающих крайнего Севера / Н.Н. Соколов, Н.И. Ча // Ботаника, почвоведение, зоология, зоотехника. – Якутск, 1957. – С. 148-156.

279. Субботина, Л.С. Результаты использования метода ELISA при изучении клещевого энцефалита и бешенства / Л.С. Субботина [и др.] // Микробиология, эпидемиология и иммунология.– 1985. – № 1. – С. 73-77.

280. Тайчиев, И.Т. Комплексная оценка социально-экономической значимости бешенства / И.Т. Тайчиев. Т.А. Сыпалиева, В.С. Тойкомбаева // Здравоохранение Киргизии. – 1999. – № 6. – С. 7-8.

281. Таршис, М.Г. Математические методы эпизоотологии: монография / М.Г. Таршис, В.М. Константинов – М.: Колос. – 1975. – 174 с.

282. Таршис, М.Г. Эпизоотологический прогноз и противоэпизоотический план / М.Г. Таршис – М.: Россельхозиздат.– 1979. – 112 с.

283. Таршис, М.Г. Бешенство животных: монография / М.Г. Таршис, Н.А. Ковалев, П.П. Кузнецов – Минск: Урожай, 1990. – 174 с.

284. Татаров, А.Г. Экспресс-диагностика бешенства в линии клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1) / А.Г. Татаров, М.А. Селимов, В.Я. Кармышева, Н.А. Хисматуллина // тезисы докл. Всесоюзн. конф. – М., 1985. – С. 172-173.

285. Татаров, А.Г. Выделение рабического вируса и экспресс-диагностика бешенства в культуре перевиваемых клеток невриномы Гассерова узла крысы / А.Г. Татаров, Н.А. Хисматуллина, М.А. Селимов, В.Я. Кармышева // Вопросы вирусологии. – 1987. – № 6. – С. 619-621.

286. Тимиргалеев, Р.В. Усовершенствование методов идентификации вируса бешенства и выявления антирабических антител: автореф. дис. ... канд. вет наук: 16.00.03 , 03.00.07 / Тимиргалеев Руслан Владимирович. – Казань, 2006. – 22 с.

287. Тятигачев, Ш.А. Краевая эпизоотология бешенства и усовершенствование мер борьбы с ним в Республике Башкортостан: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. / Тятигачев Ш.А. – Казань, 1998. – 19 с.

288. Усеня, М.М. Эпизоотическая ситуация по бешенству в Гродненской области и ее зависимость от численности диких плотоядных животных и объемом их оральной антирабической вакцинации / М.М. Усеня, Н.И. Кот, Р.В. Обухович // Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария. – Гродно, 2010. – С. 13-19.

289. Филимонова, М.Н. Антимикробный препарат / М.Н. Филимонова, Е.В. Ершова, Ю.И. Сафин [и др.] // Патент РФ №2337139.

290. Фоменко, М.В. Порядок и оценка результатов лабораторных исследований при диагностике бешенства / М.В. Фоменко, И.К. Тутов // Вестник ветеринарии. – 1997. – № 6. – С. 47-50.

291. Фоменко, М.В. Некоторые особенности эпизоотического процесса заболевания животных бешенством домашних и диких животных в Ставропольском крае / М.В. Фоменко // Сборник науч. трудов: Ставропольская ГСХА. – Ставрополь, 1997. – С. 13-17.

292. Фоменко, М.В. Эпизоотология бешенства и методов его диагностики / М.В. Фоменко, И.К. Тутов // Вестник ветеринарии. – 1997. – № 6. – С. 47-50.

293. Фоменко, М.В. Характеристика эпизоотического процесса бешенства домашних и диких животных / М.В. Фоменко, И.К. Тутов // Актуальные проблемы ветеринарной медицины мелких животных на Северном Кавказе: материалы II региональной конф. – Персиановка: Донской ГАУ, 1998. – С. 48-50.

294. Фомина, М.В. В области успешно борются с бешенством животных [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.agrariy-39.ru/number/detail.php?ID=2300>.

295. Хадарцев, О.С. «Бешенство в Российской Федерации в 2000 – 2005 гг.»: информационный бюллетень / О.С. Хадарцев, Ю.М. Федоров, Н.Я. Жилина [и др.] – М.: Роспотребнадзор – 2006. – 38 с.

296. Хисамутдинов, Ф.Ф. Экономический ущерб, причиненный инфекционными болезнями крупного рогатого скота в республике Татарстан / Ф.Ф. Хисамутдинов // Труды ВИЭВ. – М., 1999. – Т. 72. – С. 66-68.

297. Хисматуллина, Н.А. Разработка непрямых вариантов иммуноферментного анализа для определения антигена вируса бешенства и специфических антител / Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов // материалы Всесоюзн. конф. – Львов, 1988. – С. 98.

298. Хисматуллина, Н.А. Разработка и усовершенствование лабораторных методов диагностики бешенства: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.06. / Хисматуллина Наиля Анваровна. – Казань, 1989. – 21 с.

299. Хисматуллина, Н.А. Краевая эпизоотология бешенства в Республике Татарстан и роль диких животных в распространении этой болезни / Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов, И.А. Курбанова // Вирусные болезни с.-х. животных: тезисы докл. Всерос. науч.-практ. конф. – Владимир, 1995. – С. 173.

300. Хисматуллина, Н.А. Солнечная активность и прогнозирование эпизоотии бешенства в Татарстане / Н.А. Хисматуллина, Н.А. Сахибуллин, Р.Х. Юсупов [и др.] // Проблемы инфекционных и инвазионных болезней животноводства на соврем. этапе: тезисы докл. науч. конф.: – М., 1999. – С. 69-71.

301. Хисматуллина, Н.А. Разработка средств и методов иммунологического мониторинга и мер борьбы при бешенстве и лихорадке Ку животных: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07 , 16.00.03 / Хисматуллина Наиля Анваровна. – Казань, 2000. – 45 с.

302. Хисматуллина, Н.А. Разработка экспресс-методов иммунологического мониторинга при бешенстве / Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов, М.А. Селимов, С.Р. Янбарисова // Вопросы вирусологии. – 2001. – № 5. – С. 45-48.

303. Хисматуллина, Н.А. Прижизненная диагностика гидрофобии / Н.А. Хисматуллина, Т.А. Савицкая, Р.В. Тимиргалеев [и др.] // Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 45-летию ВНИИВВиМ: труды науч.-практ. конф. – Покров, 2003. – Ч I. – С. 157-161.

304. Хисматуллина, Н.А. Эпизоотолого-эпидемиологический надзор и прогноз бешенства в Республике Татарстан / Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов, Т.А. Савицкая [и др.] // Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 45-летию ВНИИВВиМ: труды науч.-практ. конф. – Покров, 2003. – Ч I. – С. 107-114.

305. Хисматуллина, Н.А. Иммунологический мониторинг бешенства / Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов, С.Р. Янбарисова, Т.А. Савицкая // Ветеринарный врач. – Казань, 2004. – № 1 (17). – С. 45-53.

306. Хисматуллина, Н.А. Взаимосвязь заболеваемости бешенством с некоторыми биотическими и абиотическими факторами / Н.А. Хисматуллина, Р.Х. Юсупов, И.Д. Ситдикова [и др.] // Ветеринарный врач. – 2003. – № 4 (16). – С. 33-36.

307. Хисматуллина, Н.А. Математическое прогнозирование энзоотий бешенства в Республике Татарстан / Н.А. Хисматуллина, Т.А. Савицкая, И.Д. Ситдикова [и др.] // Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний: матер. Междунар. симпозиума. – Казань, 2005. – Ч II. – С. 365-370.

308. Хисматуллина, Н.А. Информационно-образовательная работа по профилактике бешенства / Н.А. Хисматуллина, Т.А. Савицкая, Г.Х. Муртазина, А.М. Гулюкин // Актуальные вопросы инфектологии: материалы науч.-практ. конф., посвящ. 85-летию кафедры инфекционных болезней Казанского гос. мед. университета. – Казань, 2010. – С. 72-73.

309. Хисматуллина, Н.А. Разработка и применение блок-иммуноферментной тест-системы для контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства / Н.А. Хисматуллина, А.М. Гулюкин, В.В. Сабирова [и др.] // Ветеринарна медицина. Міжвідомчий тематичний наковий збіник. – Харків. – 2012. – Вып. 96. – С. 64-66.

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

311. Хисматуллина, Н.А. Контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства дикой фауны на территории Смоленской области / Н.А. Хисматуллина, А.М. Гулюкин, В.В. Сабирова [и др.] // Труды ВИЭВ. – М., 2013. – Т. 77. – С. 197-200.

312. Хисматуллина, Н.А. Прижизненная и постмортальная диагностика гидрофобии / Н.А. Хисматуллина, В.В. Сабирова, А.М. Гулюкин [и др.] // Современные достижения ветеринарной медицины и биологии – в

сельскохозяйственное производство: материалы II Всерос. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения профессора В.А. Хамита. – Уфа: Башкирский ГАУ. – 2014. – С.131-135.

313. Хозинский, В.В. Опыт полевой оральной иммунизации диких плотоядных животных вакциной (штамм «Внуково-32») в Мурманской области / В.В. Хозинский, М.А. Селимов, Т.А. Аксенова [и др.] // Современные проблемы рабиологии: тезисы докладов науч.-практ. конф. – М., 1998. – С. 41.

314. Хузин, Д.А. Иммуноферментный метод определения антител к возбудителю некробактериоза / Д.А. Хузин, Е.К. Акимов, Н.А. Хисматуллина, В.В. Сабирова // Международ. конф., посвящ. 125-летию мед. академии: материалы межд. конф. – Казань, 1998. – Ч.1. – С. 111-112.

315. Цвиль, Л.А. Состояние антирабической помощи и организация эпиднадзора за бешенством на территории г. Москвы / Л.А. Цвиль, Л.В. Родина, И.Р. Лебедева // Современные проблемы рабиологии: тезисы докладов научн. конф. – М., 1998. – С. 15-16.

316. Целуева, Н.И. Анализ изменений эпизоотической обстановки по важнейшим зооантропонозам в Смоленской области: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. / Целуева Надежда Ильинична. – М., 2006. - 28 с.

317. Цетлин, Е.М. Отработка оптимальной схемы учета результатов при применении иммуноферментной тест-системы для определения антигенной активности культуральной антирабической вакцины / Е.М. Цетлин, Р.А. Волкова // Вопросы вирусологии. – 1996. – № 1. – С. 21-24.

318. Черкасский, Б.Л. Эпидемиология и профилактика бешенства / Б.Л. Черкасский. – М.: Медицина, 1985. – 288 с.

319. Черкасский, Б.Л. Эпидемиология и эпизоотология бешенства на территории бывшего СССР / Б.Л. Черкасский, А.Г. Кноп, В.А. Ведерников // ЖМЭИ. – 1995. – № 1. – С. 21-27.

320. Черкасский Б.Л. Эпидемическая ситуация и меры профилактики бешенства / Б.Л. Черкасский, О.С. Хадарцев, А.А. Мовсесянц // Ветеринарные и

медицинские аспекты зооантропонозов: матер. науч.-практ. конф., посв. 45-летию ВНИИВВиМ, Покров, 2003. – Ч. I. – С. 98.

321. Черкасский, Б.Л. Эпидемиологический надзор за бешенством в Российской Федерации / Б.Л. Черкасский, О.С. Ходарцев, А.А. Мовсесянц // Вакцинация. – 2005. – № 1 (37). – С. 2-4.

322. Чернов, С.М. Анализ эффективности твердофазного иммуноферментного метода для ускоренной диагностики бешенства / С.М. Чернов, А.Д. Ботвинкин, Л.Я. Грибанова [и др.] // В кн.: Природноочаговые болезни человека. – Омск. 1989. – С. 90.

323. Шабейкин, А.А. Методы компьютерного анализа в географической эпизоотологии сибирской язвы и бешенства: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. / Шабейкин Александр Александрович. – М., 2004. – 22 с.

324. Шафикова, Р.А. Применение реакции энзим-меченных антител при диагностике хламидиозного аборта овец / Р.А. Шафикова, Х.З. Гаффаров [и др.] // Материалы Всесоюзн. конф. – Львов, 1988. – С. 107-108.

325. Шестопалов, А.М. Бешенство и его распространение в мире / А.М. Шестопалов, М.И. Кисурина, К.Н. Груздев // Вопросы вирусологии. – 2001. – № 2. – С. 7-12.

326. Шестопалов, А.М. Экологический полиморфизм и территориальная значимость различных вирусных патогенов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 06.02.02. / Шестопалов Александр Михайлович. – Новосибирск, 2010. – 34 с.

327. Шесточенко, М.А. Люминесцентный анализ в ветеринарии: монография / М.А. Шесточенко, Н.А. Кузьмин. – М.: Колос. – 1979. – С. 195-203.

328. Шкаева, Н.А. Распространение бешенства на территории Челябинской области / Н.А. Шкаева, А.С. Пешков // Ветеринария. – 2006. – № 1. – С. 20-23.

329. Шубладзе, А.К. Изучение антигенного родства различных штаммов вирусов группы бешенства / А.К. Шубладзе, Е.Н. Бычков // Вопросы вирусологии. – 1975. – № 6. – С. 571-574.

330. Шустерман, С.З. О случаях нападения бешеных волков в Витебской области / С.З. Шустерман // Современные проблемы профилактики зоонозных

болезней и пути их решения: материалы межд. научн.-практич. конф. – Минск, 1987. – С. 332-333.

331. Щербак, Ю.Н. Эпидемиология бешенства природного типа: автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.30. / Щербак Ю. Н. – Киев, 1982. – 38 с.

332. Юрик, С.А. Эпизоотология бешенства на территории Западно-Сибирского региона / С.А. Юрик // Инфекционные и паразитарные болезни мелких домашних животных: материалы Сибирской региональной науч.-практ. конф. – Новосибирск, 2002. – С. 5-11.

333. Юркиявичус, Ч.П. Эпизоотическая ситуация по бешенству в Литовской ССР / Ч.П. Юркиявичус, А.А. Буракаускас, Л.И. Мотеюнас // 11 Всесоюзн. конф. по проблемам природной очаговости болезней: тезисы докладов – М., 1984. – С. 187-188.

334. Юсупов, Р.Х. Оценка эффективности методов выделения уличных штаммов вируса бешенства в биологических системах / Р.Х. Юсупов, Н.А. Хисматуллина, М.А. Селимов [и др.] // Ветеринария. – 1989. – № 4. – С. 27-29.

335. Юсупов, Р.Х. Эпизоотическая характеристика и динамика заболеваемости животных бешенством в Татарстане / Р.Х. Юсупов, Н.А. Хисматуллина // В сб.: Болезни и паразиты диких животных. – М., 1992. – С. 84-88.

336. Юсупов, Р.Х. Эпизоотологическая значимость различных штаммов вируса бешенства / Р.Х. Юсупов, Н.А. Хисматуллина // Актуальные проблемы ветеринарии и зоотехнии: материалы науч.-произв. конф. – Казань, 2001. – Ч. 1. – С. 113-114.

337. Amano, T. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones / T. Amano, E. Rioheison, M. Nirenberg // Proc. natl. Akad. Sci. USA. – 1972. – V. 69. – P. 258-263.

338. Atanasiu, P. Multiplication du virus de la rage fixe sur cellules gliales en culture at apparition d'inclusions specifiques intracytoplasmiques. Application au

diagnostic de la rage / P. Atanasiu, S. Favre, M. Collombier // Acad. Sci. – 1961. – V. 25. – P. 2029-2031.

339. Atanasiu, P. Animal inoculation and the Negri body. The Natural History of rabies / P. Atanasiu // New York: academic Press. – 1975. – T. 1. – 373 p.

340. Atanasiu, P. Epreuve immunoenzymatique pour la detection rapide des anticorpus antirabiques / P. Atanasiu, V. Savy, P. Perrin // Ann. Microbiol. Inst. Pasteur. – 1977. – V. 128A. – P. 489-498.

341. Aubert, M. Le Rhin est il une barriere efficace contre la rage / M. Aubert, E. Masson // Bull. off. Nat. Chasse. – 1993. – V. 177. – P. 30-32.

342. Baer, G. Oral vaccination of for against rabies / G. Baer, J. Abelseth, J. Debbie // Am. J. Epidemiol. – 1971. – V. 93. – P. 487-490.

343. Barrat, J. Diagnostic de la rage sur culture cellulaire, comparaison des resultants de l'inoculation au neuroblastome murin et de l'inoculation a la souris / J. Barrat, M.J. Barrat, M. Picard [et. al.] // Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. – 1986. – V. 11. – P. 207-214.

344. Barrat, J. Larage animal en France en 1988 bilan die laboratoire d etudes sur la rage et la pathologie des animaux sauvages a nancy-malze-Ville / I. Barrat, M. Aubert // Rev.- Med. Veter. – 1990. – Vol. 141. – № 5. – P. 369-373.

345. Black, E.M. 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. Meth. – 2002. – V. 105 (1). – P. 25-35.

346. Bogel, K. Economic for human and canine rabies elimination / K. Bogel, F.-X. Messlin // Bull. World Health Organ. – 1990. – № 3. – P. 281-291.

347. Bourhy, H. Ecology and evolution of rabies in Europe / H. Bourhy, B. Kissi, L. Audry // J.Gen.Virol. – 1999. – Vol. 80. – № 10. – P. 2545-2557.

348. Bourhy, H. The origin and phylogeography of dog rabies virus / H. Bourhy, J. Reynes, E. Dunham [et. al.] // J. Gen. Virol. – 2008. – V. 89. – P. 2673-2681.

349. Breakfield, X. O. Neurobiasmmitter metabolism in murin neuroblastoma cells / X. O. Breakfield // Life Sci. – 1976. – V.18. – P. 267-278.

350. Brochier, B. Elimination of fox rabies from Belgium using a recombinant vaccinia -rabies vaccine: an update / B. Brochier, F. Costy, P. Pastoret // *Veter. Microbiol.* – 1995. – V. 46. – № 1/3 – P. 269-279.

352. Casey, G. A. Raccon rabies in eastern Canada (1963 to 1994): A retrospective report / G. A. Casey, A. I. Wandeler, K.M. Charlton // *Canad. veter. J.* – 1996. – V. 37. – № 6. – P. 347-348.

353. Cleaveland, S. Maintenance of a micro parasite infecting several host species. Rabies in the Serengeti / S. Cleaveland, C. Dye // *Parasitology.* – 1995. – V. 3. – P. 33-47.

354. Cliquet, L. & Aubert M.F.A. (2000). ELISA tests for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields / L. Cliquet // *Vaccine.* – 2000. – № 18. – P. 3272-3279.

355. Cortes, Valdson de Angelis. Abrigos diurnos e infecca rabica em morcogos de Botuatu, Sao Paulo Brasil / Valdson de Angelis Cortes, Souza Luiz Carlos de, Uieda Wilson, Fig-neirecto Antonio Carlos // *Vet -Zootecn.* – 1994. – V. 6. – P. 179-186.

356. Crawford-Miksza, L.K. Molecular epidemiology of enzootic rabies in California / L.K. Crawford-Miksza, D.A. Wadford, D.P. Schnurt // *J. Clin. Virol.* – 1999. – V. 14. – № 3. – P. 207-219.

357. Crepin, P. Intravital diagnosis of human rabies by PCR using saliva and cerebrospinal fluid / P. Crepin, L. Andru, Y. Rotivel [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – V. 36 (4). – P. 1117-1121.

358. David, J.M. Computer simulation model of epizootic disease of vulpine rabies / J.M. David // *Ecological Modelling.* – 1982. – V. 15. – P. 107-125.

359. Defoy, J. La situation de la rage en Europe / J. Defoy, G. Evrard // *Ann. Med. Vet.* – 1985. – V. 129. – № 4-5. – P. 263-274.

360. Dietzschold, B. Techniques for the purification of rabies virus, its subunits and recombinant products / B. Dietzschold, M.M. Kaplan, H. Koprowski, F.X. Meslin // *Laboratory techniques in rabies* Eds. WHO. – Geneva, 1996. – P. 175-179.

361. Donald, L. Rabies virus glycoprotein expressed in a vaccinia virus recombinant vaccine cross protects mice against unique genetic variants of rabies viruses isolated world-wide / L.Donald, I. Smith, C. Larry // *J. Cell Biochem.* – 1995. – V. 19. –P. 312.

362. Durove, A. Orale immunisierung freilebender Rotfuchse gegen Tolewut inder Slowakei im lahre 1994 / A.Durove, S. Svreek, I. Sokol // *Wien. Tierarztl. Monatsheft.* – 1996. –V. 83. – № 5. – S. 158-163.

363. Eggerding, F.A. Detection of rubella virus gene sequences by enzymatic amplification and direct sequencing of amplified DNA / F.A. Eggerding, J. Peters, R.K. Lee, C.B. Inderlied // *J. Clin. Microbiol.* – 1991. – V. 29 (5). – P. 945-952.

364. Elton, C. Epidemica among sleige dogs Canadian Arctic and their relation te discase in the arctic fox / C. Elton // *Canada. Reas.* – 1951. – V. 5. – P. 675-692.

365. Engvall, E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled antiimmunoglobulin in antigen coated tubes / E. Engvall, P. Perlmann // *J. Immunol.* – 1972. – V. 109. – P. 129-135.

366. Engvall, E. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin / E. Engvall, P. Perlmann // *Immunochemistry.* – 1971. – V. 8. – P. 871-874.

367. Fleming, R.W. Treating viral infections with bis-basic ethers and thioethers of fluorinon and fluorine and pharmaceutical compositions of the same / R.W. Fleming, D.L. Wenstrup, E.R. Andrews // US 3692907. *Brit. Chem. Abstr.* – 1970. – V. 73. – P. 327-442.

368. Francki, R.I.B. Classification and Nomenclature of viruses / R.I.B. Francki [et al.] – Wien, 1991. – № 8. – S. 254-157.

369. Gier, H. Rabies in the wild / H.T. Gier // *J. of wildlife Management.* – 1948. – Vol. 12. – № 2. –P. 142-153.

370. GIS and Spatial Analysis in Veterinary Science / Edited by Durr, P.A., Gatrell, A.C. // *CABI Publishing.* – 2004. – 307 p.

371. Glick, M.C. Glicopeptides from membranes of neuroblastoma cells / M.C. Glick, Y. Kimhi, U.Z. Littaner // Proc. natl. Acad. Sci. – USA. – 1973. – V. 70. – P. 1682–1687.

372. Hubschen, J.M. A multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus / J.M. Hubschen, J.R. Kremer, S. De Landtsheer, C.P. Muller // J. Virol. Methods. – 2008. – V. 149 (2). – P. 246-250.

373. <http://news.mail.ru/inregions/volgaregion/16/society/18435445/?frommail>

374. <http://www.who-rabies-bulletin.org>.

375. Jin, L. Application of molecular and serological assays to case based investigations of rubella and congenital rubella syndrome / L. Jin, B. Thomas // J. Med. Virol. – 2007. – V. 79 (7). – P. 1017-1024.

376. Kat, P.W. Rabies and African wild dogs in Kenya / P.W. Kat, K.A. Alexander, I.S. Smith, L. Munson // Proc. Roy. Soc. London B. – 1995. – V. 262. – № 1. – P. 229-233.

377. Kauker, E. The epidemiology of sylvan in Central European possibilities of combating / E. Kauker, K. Zetil // Vet.-Med. Nachrichtenr. – 1963. – V. 2-3. – S. 96-116.

380. King, A. Rabies: A Review / A.A. King, G.S. Turner // J. Comp. Path. – 1993. – Vol. 108. – P. 1-39.

381. King, A. The rabies viruses of bats / A. King, P. Davies, A. Lawrie A. // Vet. Microbiol. – 1990. – V. 23. – P. 165-174.

382. Kissi, B. Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene / B. Kissi, N. Tordo, H. Borhy // Virology. – 1995. – V. 209. – № 2. – P. 526-537.

383. Kistemann, T. New perspectives on the use of Geographical Information Systems (GIS) in environmental health sciences / T. Kistemann, F. Dangendorf, J. Schweikart // J. Hyg. Environ. Health, 2002. – V. 205. – P. 169-181.

384. Koltei, L. Rabies of nondomesticated animals in Hungary / L. Koltei // Bull. Office int Epizoot. – 1976. – V. 86. – S. 225-239.

385. Komarov, A. Diagnosis of rabies in dogs comparing smears, biological tests and fluorescent Antibody staining / A. Komarov, R.A. Goldwasser // WHO Expert Committee on Rabies. – Geneva. –1959. – V. 19. – P. 107.

386. Krebs, J. W. Rabies surveillance in the United States during 1994 / J. W. Krebs, T. W. Strine, J. S. Smith // J. Am. Veter. Med. Assn. – 1995. –V. 207. – № 2. – P. 1562-1575.

387. Kuzmin, I.V. Botvinkin A.D., McElhinney L.M. et al. 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. – V. 40 (4). – P. 617-31.

388. Kuzmin, I.V. Phylogenetic relationships of Irkut and West Caucasian bat viruses within the Lyssavirus genus and suggested quantitative criteria based on the N gene sequence for lyssavirus genotype definition / I.V. Kuzmin, G.J. Hughes., A.D. Botvinkin [et al.] // Virus. Res. – 2005. – V. 111 (1). – P. 28 – 43.

389. Kuzmin, I.V. Complete genomes of Aravan, Khujand, Irkut and West Caucasian bat viruses, with special attention to the polymerase gene and non-coding regions / I.V. Kuzmin, X. Wu, N. Tordo [et al.] // Virus Res. – 2008. – V. 136 (1-2). – P. 81-90.

390. Kumar, S. MEGA: biologist-centricsoltware for evolutionary analysis of DNA and protein sequences / S. Kumar, J. Dudley, M. Nei, K. Tamura // Brif. Bioinform. – 2008. – V. 9. – P. 299-306.

391. Kuwert, E. The complement fixation test / E.Kuwert // Laboratory Techniques in Rabies. – WHO. – Geneva. –1973. – P. 124.

392. Laurent, D. A Reliable Diagnosis of Human Rabies Based on Analysis of Skin Biopsy Specimens / D. Laurent [et al.] // Clin Infect Dis. – 2008. – № 47. – P. 1410-1417.

393. Lawson, A. Bayesian Disease Mapping: Hierarchical Models in Spatial pidemiology / A.B. Lawson // Chapman and Hall. CRC. – 2008. – 368 p.

394. Lloyd, H. Fox vulpes The Handbook of Britich Mammals / H. G. Lloyd // Oxford Blackwell Scientific Publication. – 1977. – P. 331-320.

395. Lockhart, B.P. Inhibition of rabies virus transcription in rat cortical neurons with the dissociative anesthetic ketamine / B.P. Lockhart, N. Tordo, H. Tsiang // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1992. – V. 36. – P. 1750-1755.
396. Lontei, I. The current state of rabies prevention in Europe / I. Lontei // *Vaccine.* – 1997/ – V. 15. – P. 16-19.
397. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. In: OIE Terrestrial Manual. – 2008. – Part 2. – section 1. – chapter 2.1.13. – P. 304-323.
398. Martorella, Luzia Fatima Alves Sodre. Isolamento de virus rabico de morcego insetivoro, *Lasyurus borealis* / Luzia Fatima Alves Sodre Martorella, Nunes Vania de Fatima, Plaza Aquiar Elizabeth, Amatuzzi da Costa, Almeida Marilene Fernandes.// *Rev. saude publ.* – 1996. – V. 30. – № 1. – P. 101-102.
399. Masson, E. Les consequences du ramassage par des personnes d appats vaccinaux antirabiques aux renards et distribues par helicoptere en France / E.Masson, P. Rollin, M. Aubert // *Ann. med. vet.* – 1993. – V. 137. – № 4. – P. 275-279.
400. Matouch, O. The oral vaccination of foxes against rabies / O. Matouch, J. Vitasek // *Rabies Bulletin Europe.* – 2002. – № 4. – P. 5-8.
401. Meredith, C.D. Rabies confirmed in Megachiroptera in South Africa / C.D. Meredith // *Rabies Information Exchange.* – 1980. – V.3. – P.26.
402. Metlin, A.E. Monoclonal antibody characterization of rabies virus isolates from Russia, Finland and Estonia / A.E. Metlin, J. Cox, S.S. Rybakov, A. Huovilainen, K. N. Grouzdev, E. Neuvonen. // *J. Vet. Med. B.* – 2004. – V. 51. – P. 94-96.
403. Metlin, A.E. Laboratory Techniques in Rabies In: Laboratory techniques in rabies / F.X. Meslin, M.M. Kaplan, H. Koprowski // WHO. 4-th ed. – Geneva, 1996. – P. 9-27.
404. Metlin, A.E. Monoclonal antibody characterization of rabies virus isolates from Russia, Finland and Estonia / A.E. Metlin, J. Cox, S.S. Rybacov [et al.] // *J. Vet. Med.* – 2004. – № 51. – S. 94-96.
405. Muller, T. Wechselwinkund von oraler Tollwut immunisierend und Fuchs poputions dynamik / T.Muller, H. Schluter, S. Kautzsch // *Tierarztl. Umsch* – 1995. – V. 50. – № 1. – P. 743-747.

406. Muller, W. Rabies in Europe – epidemiological cycles and the impact oral vaccination of foxes / W. Muller // Rabies bulletin Europe. – 2001. – V. 1. – P. 12-17.
407. Muller, W. Review of reported rabies case data in Europe to the WHO Collaborating Centre Tubingen from 1977 to 2000 / W. Muller // Rabies bulletin Europe. – 2001. – V. 4. – P. 1-19.
408. Nagaraj, T. 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. – V. 36 (1). – P. 17-23.
409. Nagaraj, T. MEGA: biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences / T. Nagaraj, S. Kumar, J. Dudley [et al.] // Brif. Bioinform. – 2008. – V. 9. – P. 299-306.
410. Nadin-Davis, S.A. Identification of regional variants of the Canadian province of Ontario / S.A. Nadin-Davis, G.A. Casey, A. Wandeler // Gen. Virol. – 1993. – V. 74. – № 5. – P. 829-837.
411. Nadin-Davis, S.A. Molecular and antigenic characterization of rabies viruses from Iran identifies variants with distinct epidemiological origins / S.A. Nadin-Davis, S. Simani, J. Armstrong, A. Fayaz, A.I. Wandeler // Epidemiol. Infect. – 2003. – V. 131. – P. 777-790.
412. Nadin-Davis, S.A. The design of strain-specific polymerase chain reactions for discrimination of the raccoon rabies virus strain from indigenous rabies viruses of Ontario / S.A. Nadin-Davis, W. Yuang, A.I. Wandeler // J. Virol. Methods. – 1996. – V. 57 (1). – P. 1-14.
413. Nadin, S. Recent advancement in the diagnosis of rabies / S. Nadin, S. Maiti // Asian Livestock. – 1994. – V. 19. – № 2. – P. 150-152.
414. Nicholson, K. Enzyme-linked immunosorbent Assay: A Peaped Reproducible. Test for the Measurement of Rabies Antibody / K.G. Nicholson, K. Prestage // J. Med. Virol. – 1982 – № 9. – P. 43-49.
415. Nokireki, T. Bat rabies surveillance in Finland / T. Nokireki // Muller // Rabies bulletin Europe. – 2011. – V. 1. – P. 8-10.

416. Pastoret, P. Epidemiology and control of fox rabies in Europe / P. Pastoret, B. Brochier // *Vaccine*. – 1999. – V. 17. – P. 1750-1754.
417. Piegorsch, W.W. Non-Hierarchical logistic models and case-only designs for assessing susceptibility in population - based case control studies / W.W. Piegorsch, C.R. Weinberg, J.A. Taylor // *Statistics in Medicine*. – 1994. – V. 13. – P. 153-162.
418. Pizschke, H. Die Telwat beim Rehwilden. Epizootologischen und lebensmittelhygiensches problem / H. Pizschke // *Monatsheft Vet.-Med.* – 1964. – № 4. – S. 151-154.
419. Portnoi, D. Use of Neuroblastoma cells (MNB) for the isolation of street rabies virus from field specimen / D. Portnoi, S. Favre, E.P. Sureau // *Department of Health. SC. Human Services Pullic Health Service Center for Disease Control*. – 1982. – P. 35-36.
420. Potzsch, C. Summaring the rabies situation in Europe 1990-2002 from the Rabies bulletin Europe / C Potzsch, Th. Muller, M. Kramer // *Rabies bulletin Europe*. – 2002. – V. 4. – P. 11-17.
421. Rabies Bulletin Europe, <http://www.who-rabies-bulletin.org>.
422. Rabies, animal-Ukraine: oral vaccination. <http://www.promedmail.org>.
423. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Welfare. EU. – 2002. – October.
424. Rohman, A. Rabies prevention and control in India from a veterinary perspective / A.Rohman // *International Rabies Meeting: Abstracts*. – Paris, 1997. – P. 504.
425. Rudd, R.G. Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus / R.G.Rudd, C.V. Trimarchi, M.K. Abelseth // *J. Clin. Microbiol.* 1980. V. – 12. – P. 590-593.
426. Rudd , R.J. Neurablastoma Cell Line Sensitized with DEA-Dextran for Routine Isolation of Street Strain Rabies virus. *J. Rabies Information Exchange* / R.J. Rudd // 1985. – P. 12 -20.

427. Rudd R.J., Trimachi C.V. Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus / R.J. Rudd, C.V. Trimachi // *J. Clin. Microbiol.* – 1987. – V. 25. – P. 145-168.
428. Rupprecht, C.T. Current issues in rabies prevention in the United States / C.T.Rupprecht, J.S. Smith, J. Krebs // *Publ. Health Rep.* – 1996. – V. 3. – P. 400–407.
429. Rupprecht, C.T. Human infection due to a recombinant vaccinia-rabies glycoprotein virus / C.T. Rupprecht, L. Blass, K. Smith [et al.] // *Engl. J. Med.* – 2001. – V. 11. – P. 302-309.
430. Sacramento, D. PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus / D.Sacramento, H. Bourhy, N. Tordo // *Molecular and cellular probes.* – 1991. – V. 5. – P. 229-240.
431. Schluter, H. Tollwutbekämpfung in Deutssfolgerungen aus uber 10 jahriger bekämpfung / H. Schluter, T. Muller // *Tierarztl. Umsch.* – 1995. – V.50. – № 11. – S. 748-758.
432. Schneider, L.G. The cornea test: a new method for the intravitum diagnosis of rabies / L.G.Schneider // *Zentralbl. Veterinarmed.* – 1969. – №. 16. – S. 24-31.
433. Selimov, M. The Rabies- Related Yuli virus and Identification with Panel of the Antinucleo capsid Monoclonal Antibodies (NC MKAb) / M. Selimov, A. Tatarov, A. Botvinkin, L. Kulikova, H. Khysmatullina/ / *J. Rabies Information Exchange.* – 1987. – V. 6. – P. 5-15.
434. Selimov, M.A. Antigenic variation in rabies viruses of the USSR / M. Selimov, A. King, E. Kluyeva [et al.] // *Rabies Inf. Exchange.* – 1988. – V. 17. – P. 40-42.
435. Selimov, M.A. Rabies-Related Yuli – virus; identification with a panel of Monoclonal Antibodies / M.A. Selimov, A.G. Tatarov, A.D. Botvinkin [et al.] // *Acta Virol.* – 1989. – V. 33 – P. 542-545.
436. Selimov, M.A. New strains of rabies–related Viruses isolated from bats in the Ukraine / M.A. Selimov, A.M. Smeknov, L.A. [et al.] // *Acta virol.* – 1991. – V. 35. – P. 326-231.

437. Smith, A.L. 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. – V. 9. – № 6. – P. 359-361.

438. Schneider, L.G. The cornea test: a new method for the intra-vital diagnosis of rabies / L.G. Schneider // *Zentrabl. Vet.-Med.* – 1969. – № 16. – S. 24-31.

439. Schneider, L.G. Application of Monoclonal Antibodies for Epidemiological Investigation and Oral Vaccination Studies. II. Arctic Viruses. In: Rabies in the tropics: Proceedings of the International Conference on Rabies Control in the Tropics. / L.G. Schneider // Berlin: Springer-Verlag, 1985. – P. 47-59.

440. Schneider, L.G. Der Feldversuch zur oraln Immunisierung von Fuchsen gegen die Tollwut in der BRD. Eine Zwischenbilanz / L.G. Schneider, J. Cox, W. Muller // *Tierarztl. Umschau*. – 1987. – № 42. – S. 184-198.

441. Smith, A.L. 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. – V. 96. – P. 359-361.

442. Smith, J.S. Monoclonal antibodies for the identification of rabies and non-rabies lyssaviruses . In: Laboratory Techniques in Rabies. 4th ed. / J.S. Smith, A.A. King // Geneva, 1996. – P. 145-156.

443. Sureu, P. Epidemiology analysis of antigenic variations of street rabies virus. Detection by monoclonal antibodies / P.Sureu, P. Rollin, T.J. Wiktor // *Amer. J. Epidem.* – 1983. – V. 117. – № 5. – P. 605-609.

444. Taylor, M.G. Medical virology: The practical Approach Series Ed. By U. Desselberger / M.G. Taylor, E. Godfrey, R. Baczko [et al.] // *J. Gen.Virol.* – 1991. – V. 72 (1). – P. 83-88.

445. Thraenhart, O. Aktueller Stand der Epidemiologie, Diagnostik und Praventioin der Tollwut / O. Thraenhart // *Prakt. Tierarzt.* – 1996. – V. 77. – № 5. – S. 433-442.

446. Tierkel, E.S. Reaped microscopic examination for Negri bodies and preparation of specimens for biological test. In: Laboratory Techniques in Rabies / E.S. Tierkel // Geneva: WHO. – 1973. – V. 41. – P. 136-140.

447. Tordo, N. 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. – V. 165 (2). – P. 565-576.
448. Tordo, N. Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? / N. Tordo, O. Poch, A. Ermine, G. Keith // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1986. – V. 83 (11). – P. 3914-3918.
449. Tordo, N. Structure of rabies virus. *Rabies* / N. Tordo, O. Roch. // Boston: Kluwer Academic Publishers. – 1988. – P. 25-45.
450. 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* Eds. – WHO. – Geneva, 1996. – P. 157-170.
451. Tsiang, H. Current concept in rabies / H. Tsiang // *Adv. Virus. Res.* – 1995. – V. 2. – P. 2-4.
452. Vaccination against rabies and protective antibodies – comparison of ELISA and fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) assays // *Veterinarski Arhiv.* – 2006. – V. 76 (4). – P. 281-289.
453. Vedernikov, V.A. Summary of Rabies in the Russian Federation-Particularities of the Present Situation / V.A.Vedernikov, V.A. Sedov, I.V. Baldina // *Rabies bul. Europe: Information surveillance research.* – 1999. – № 4. – P. 13-15.
454. Vyse, A.J. An RT-PCR assay using oral fluid samples to detect rubella virus genome for epidemiological surveillance / A.J. Vyse, L. Jin // *Mol. Cell. Probes.* – 2002. – V. 16 (2). – P. 93-97.
455. Wandeler, A. Rabies in wild carnivores in Central Europe. Ecology and biology of the fox in relation to control operations / A. Wandeler, G. Wachendorfer, W. Schale et al. // *Zbl. Vet.-Med.* – 1974. – V. 21. – № 10. – S. 765-773.
456. Wandeler, A. Control of wildlife rabies: Europe / A. Wandeler // *Rabies, Develop Vet. Virol.* – 1988. – P. 365-380.
457. Warrell, D. Human Rabies and prevention: an Overview / D.A. Warrel, M.J. Warrel // *Row. Infect Diseases.* – 1989. – № 4. – P. 726.

458. Wakeley, P.R. 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. – V. 43(6). – P. 2786-2792.
459. Webster, W.A. Mayor antigenic groups of rabies Virus in Canada determined by anty–nucleocapsid monoclonal antibodies / W.A. Webster, A. Casey, K.M. Charlton // *Comp. Immunol. monoclonal antibodies. Microbiol. infect. Dis.* – 1986. – V. 9. – № 1. – P. 59-69.
460. Webster, W.A. A tissue culture infection test in routine rabies diagnosis / W.A. Webster // *Can. J. Vet. Res.* – 1987. – V. 51. – P. 367-369.
461. Weemen, S.K.V. ELISA: Nightlights of the present state of the art / S.K.V. Weemen // *J. Virol. Meth.* – 1985. – V. 10 – № 4. – P. 371-378.
462. Weemen, B.K. Immunoassay using antigen- enzyme conjugate / B.K. Weemen, W.H. Schnurs // *TEES letters.* – 1971. – V. 15. – P. 232-236.
463. Wehril, W. The rifamycins-relation of chemical structure and action on RNA polymerase / W. Wehril, M. Starhelin // *Biochim. biophys. Acta.* – 1969. – V. 182. – P. 24-29.
464. Wiktor, T.J. Monoclonal antibodies against rabies virus produced by somatic cell hybridization: detection of antigenic variants / T.J. Wiktor, H. Koprowski // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1978. – V. 75. – P. 3938-3942.
465. Wiktor, T.J. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of rabies virus infection and differentiation of rabies and rabies-related viruses / T.J. Wiktor, A. Flamand, H. Koprowski // *J. Virol. Meth.* – 1980. – V. 1. – № 1. – P. 33-46.
466. World survey of rabies. 1996-1999. – WHO/EMC/ZOO/99.6.
467. Zaberezhny, A.D. Differentiation between vaccine strain and field isolates of classical swine fever virus using polymerase chain reaction and restriction test / A.D. Zaberezhny, T.V. Grebennikova, T.I. Aliper [et al.] // *Deutsche tierärztliche Wochenschrift.* – 1999. – V. 106. – № 9. – S. 394-397.
468. Zimmermann, I. Zur Brauchbarkeit des Cornea testes bei der Tollwut diagnose / I. Zimmermann // *Berl. Munch. Tierarztl.* – 1971. – № 9. – P. 172-174.

5 ПРИЛОЖЕНИЯ

ФАНО РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

**«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ Я.Р. КОВАЛЕНКО»
(ФГБНУ ВИЭВ)**

Рязанский проспект, д. 24, корпус 1, Москва, 109428
Тел./факс (495) 970-03-69. E-mail: admin@viev.ru

ОКПО 00496165, ОГРН 1037700258870, ИНН/КПП 7721017821/772101001

от 02.06.2016 № 523/22

по месту требования

На № _____ от _____

Настоящим удостоверяю, что Гулюкин Алексей Михайлович принимал участие в Научно исследовательской работе лаборатории эпизоотологии ФГБНУ ВИЭВ по темам:

1. Мониторинг изменений эпизоотической обстановки по инфекционным болезням животных, №0578-2014-0025.
2. Получить новые знания о генетической структуре вируса классического бешенства распространенного на территории России, №0578-2015-0003

Вр.и.о. директора
ФГБНУ ВИЭВ

Ученый секретарь



А.Д. Забережный

И.В. Полякова



Министерство сельского хозяйства РФ
Департамент научно-технологической политики и образования
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ И
БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

420075, г. Казань. Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11 тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33
<http://www.vnivi.ru> e-mail: vnivi@mail.ru ИНН – 1660022161, КПП – 166001001

«19» 04 2016 г. № 663

СПРАВКА
 по месту требования

Настоящим удостоверяю, что Гулюкин Алексей Михайлович принимал участие в выполнении научно-исследовательских работ лаборатории иммунологии и биохимии ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» в 2010-2015 гг., в рамках Задания 3: "Биологическая безопасность", тематического плана ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», утвержденного Департаментом научно-технологической политики и образования Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, по следующим темам НИР:

Год	Этап	Наименование НИР
2010	3.1.3.	Провести эпизоотологический и иммунологический мониторинг бешенства в отдельных республиках и областях Российской Федерации.
2011	3.1.1.	Провести эпизоотологический и иммунологический мониторинг бешенства в РТ, Калининградской и Смоленской областях РФ.
2012	3.2.1.	Изучить иммунологический статус организма продуктивных пород сельскохозяйственных животных и изыскать препараты для коррекции иммунодефицитов у животных.
2013	3.1.3	Провести эпизоотологический и иммунологический мониторинг бешенства в Республике Татарстан, Калининградской и Смоленской областях РФ.
2013	3.5.1.	Изучить иммунологический статус организма сельскохозяйственных животных, изыскать и разработать схему применения иммуномодуляторов для коррекции иммунодефицитов животных.
2013	3.3.1.	Разработать и внедрить новые средства диагностики туберкулеза и индикации его возбудителя на основе метода ИФА.

**ФАНО РОССИИ**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
**«ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ имени Я.Р. КОВАЛЕНКО»**

(ФГБНУ ВИЭВ)

УДК 619.616.981.51; 619.616.988.21

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВИЭВ

Академик РАН

М.И. Гулюкин

«21» *июль* 2016 г.



**Мониторинг изменений эпизоотической
обстановки по бешенству животных на территории
Российской Федерации.**

Москва 2016

ФГБНУ ВИЭВ. Мониторинг эпизоотической ситуации бешенства на территории РФ.

Шабейкин Александр Александрович - к.в.н., заведующий лабораторией эпизоотологии

Гулюкин Алексей Михайлович - к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории эпизоотологии

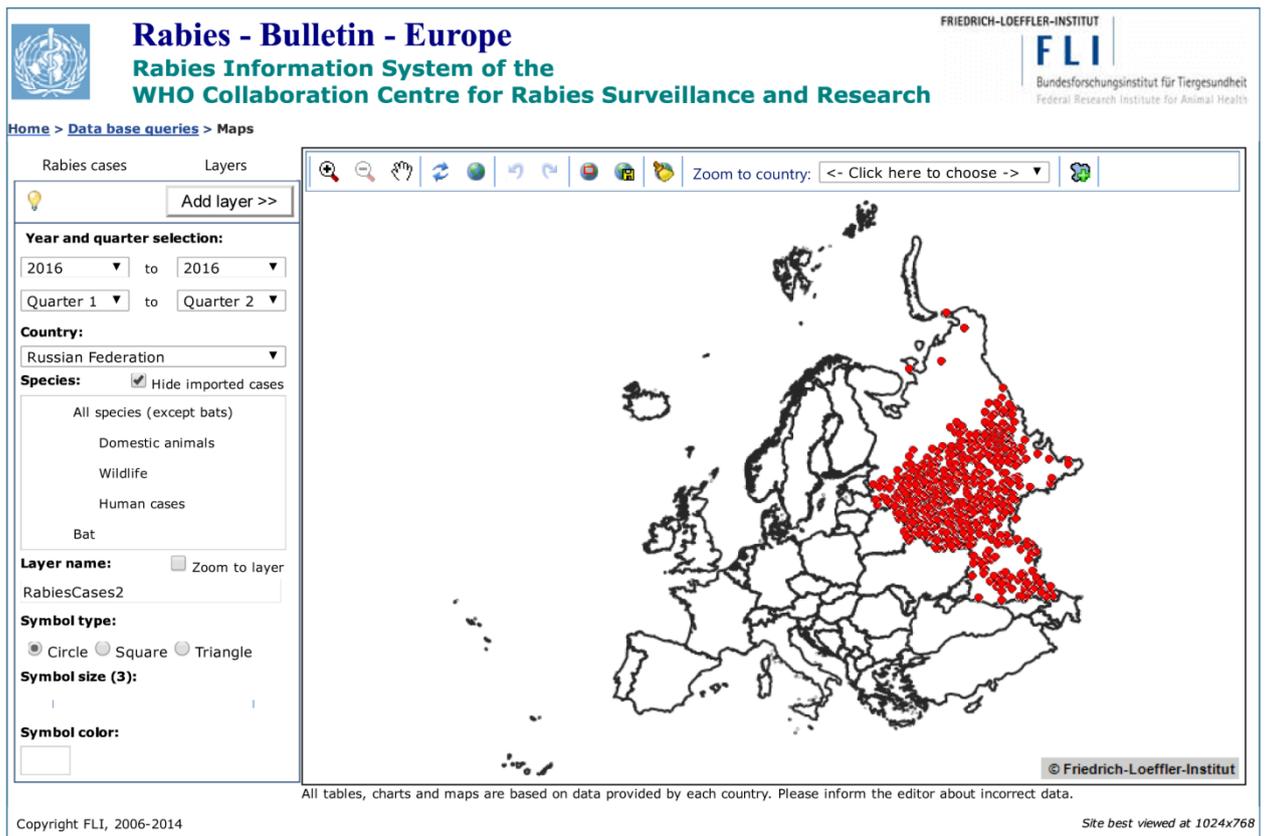
Цареградский Петр Юрьевич, к.т.н., старший научный сотрудник лаборатории эпизоотологии

Паршикова Анна Владимировна - научный сотрудник лаборатории эпизоотологии

Зайкова О.Н. – младший научный сотрудник лаборатории эпизоотологии

Мониторинг рассмотрен и одобрен на заседании Ученого совета ФГБНУ ВИЭВ протокол от 20 июля 2016 года № 3

Ежеквартальный информационный Бюллетень Европейского центра ВОЗ
«WHO Rabies Bulletin Europe»



 Rabies - Bulletin - Europe Rabies Information System of the WHO Collaboration Centre for Rabies Surveillance and Research		FRIEDRICH-LOEFFLER-INSTITUT  FLI Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit Federal Research Institute for Animal Health	
Home > The journal > List of contributors			
<ul style="list-style-type: none"> News About rabies The journal Travel and rabies Data base queries Meetings and dates World Rabies Day Links Imprint Acknowledgement  Members area Help 		Contributors	
ALB Albania Kujtim Mersini, DVM, MSc Head, National Veterinary Epidemiology Unit Food Safety and Veterinary Institute Rr. Aleksandër Moisiu no.10 Tirana / Albania Tel.: +355 4 2373096 Fax: +355 682738752 Email: mersini2003@yahoo.com		AUT Austria Mag. Ulrich Herzog CVO Bundesministerium für Gesundheit und Frauen Bereich IV/B (Verbraucher-Gesundheit) Radetzkystraße 2 A-1030 Wien Tel.: +43-1-7 11 00-4824 Fax: +43-1-7 10 41 51 Email: ulrich.herzog@bmgf.gv.at	
BEL Belgium Dr. Pierre Naassens, CVO AFSCA – Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire Direction Générale de la Politique de Contrôle 55, Boulevard du Jardin Botanique B-1000 Bruxelles/Belgium Tel.: +32-2-211 86 42 Fax: +32-2-211 86 30		BEL Belgium Responsible experts: Dr. Ingrid Le Roux Dr. Steven Van Gucht Dr. Bernard Brochier National Reference Centre of Rabies Viral Diseases Scientific Institute of Public Health (WIV-ISP) Rue Engelandstraat 642; 1180 B-1000 Bruxelles Tel.: +32(0)2 373 3256 Fax: +32(0)2 373 3286	
BIH Bosnia and Herzegovina Department of Infectious Diseases Veterinary Faculty Sarajevo Zmaja od Bosne 90 Sarajevo 71000 / Bosnia and Herzegovina Tel.: +387 61 160 361 Fax: Email: vetzar@bih.net.ba		BIH Bosnia and Herzegovina Dr. Sc. Drago N. Nedic Ministry Agriculture, Forestry and Water Management of Republika Srpska Milosa Obilica 51 76300 Bijeljina, Republika Srpska / Bosnia and Herzegovina Tel.: +387 55 401 812, 211 506, 403 508 Fax: +387 55 403 508, 472 353 Email: nedid@rstel.net / nedid@vetservice.org	
BLR Belarus Dr. A. M. Axenov Head of the Central Board of Veterinary Medicine Ministry of Agriculture and Food Kirova 15 Minsk / Belarus Tel.: +375 17 227 6623 Fax: +375 17 227 42 96 / +375 17 227 57 54 Email: vetinsp@mshp.minsk.by		BUL Bulgaria Dr. Petya Petkova National Veterinary Service Animal Health Directorate 15A "Pencho Slaveikov" blvd. 1606 Sofia, Bulgaria Tel.: +359 2 915 98 42 Fax: +359 2 952 38 35	
CHE Switzerland PD Reto Zanoni Dr. Urs Breitenmoser University of Bern - Swiss Rabies Centre Institute of Veterinary Virology Länggass Str. 122 CH-3012 Bern /Switzerland Tel.: +41-31-631 23 78 Fax: +41-31-631 25 34 Email: zanoni@ivv.unibe.ch breitenmoser@ivv.unibe.ch Internet: www.ivv.unibe.ch		CYP Cyprus Dr. Georgios Kyriakides, CVO Director of Veterinary Services Ministry of Agriculture, Natural Resources and Environment 1417 Athalassa Nicosia, Cyprus Tel.: +357 22 805200 Fax: +357 22 305211 Email: director@vs.moa.gov.cy	
CZH Czech Republic MVDr. Josef Vitásek State Veterinary Administration CR Slezska 7 CZ - 120 00 Praha 2 / Czech Republic Tel.: +420 227 010 144 Fax: +420 227 010 195 Email: j.vitasek@svscr.cz		CZH Czech Republik Responsible expert: MVDr. Ivan Nágľ National Reference Laboratory for Rabies State Veterinary Institute Prague Sídlištní 136/24 CZ -165 03 Praha 6 - Lysolaje/ Czech Republic Tel.: +420 251 031 281 Fax: +420 220 920 655 Email: i.nagľ@svupraha.cz	
DEU Germany Dr. Karin Schwabenbauer, CVO Fed. Ministry of Food, Agriculture and Consumer Protection PF 14 02 70 D-53103 Bonn, Germany Tel.: +49 228 529 41 57 Fax: +49 228 529 35 53 Email: poststelle@bmelv.bund.de		DEU Germany Responsible experts: Dr. Thomas Müller, Dr. Conrad Freuling WHO Collaborating Centre for Rabies Surveillance and Research Institute of Molecular Virology and Cell Biology Friedrich-Loeffler-Institut Federal Research Institute for Animal Health Südufer 10 D-17493 Greifswald - Insel Riems Tel.: +49-38351 71 659/660 Fax: +49 38351 7 1151 Email: who-rabies@fli.bund.de Internet: www.fli.bund.de	
DNK Denmark Dr. Per Henriksen, CVO Ministry for Food, Agriculture and Fisheries Danish Veterinary and Food Administration Stationsparken 31-33 DK-2600 Glostrup Tel.: +45 7227 6900 Email: pesh@fvst.dk		DNK Denmark Responsible expert: Tina Mørk Ministry for Food, Agriculture and Fisheries Danish Veterinary and Food Administration Stationsparken 31-33 DK-2600 Glostrup Tel.: +45 7227 6541 Email: tm@fvst.dk	

<p>NED Netherlands Dr. Christianne Brusckhe, CVO Dutch Ministry of Economic Affairs Bezuidenhoutseweg 73 - P.O. Box 20401 NL-2500 EK's-Gravenhage /Netherlands Tel.: +31 70 379 89 11 Fax: +31 70 378 68 68</p>	<p>NED Netherlands Dr. M. De Rosa Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority Catharijnesingel 59 P.O. Box 43006 NL 3540 AA Utrecht/ The Netherlands Tel.: +31 88 223 22 77 Fax: +31 88 223 3773 Email: mauro.de.rosa@vwva.nl</p>
<p>NOR Norway Dr. Keren Bar-Yaacov, CVO Norwegian Food Safety Authority, Head Office P.O. Box 383 N-2381 Brumunddal, Norway Tel.: +47 23 21 68 00 Fax: +47 23 21 68 01 Email: postmottak@mattilsynet.no</p>	<p>POL Poland Janusz Zwiazek, DVM Chief Veterinary Officer General Veterinary Inspectorate Veterinary Inspection 30, Wspolna Str, 00-930 Warsaw / Poland Tel.: +48 22 623 20 88 Fax: +48 22 623 14 08 Email: wet@wetgiw.gov.pl</p>
<p>POL Poland Responsible experts: Prof. Jan. F. Zmudzinski National Veterinary Research Institute Department of Virology National Reference Laboratory for Rabies Al. Partyzantow 57 24 -100 Pulawy / Poland Tel.: +48 81 889 32 61 Fax: +48 81 886 25 95 Email: jfzmudzi@piwet.pulawy.pl</p>	<p>POL Poland Responsible experts: Pawel Makowski, DVM Animal Health and Welfare Office General Veterinary Inspectorate Veterinary Inspection 30, Wspolna Str, 00-930 Warsaw / Poland Tel.: +48 22 623 22 42 Fax: +48 22 623 14 08 Email: pawel.makowski@wetgiw.gov.pl</p>
<p>PRT Portugal Dr.C.A.M.de Andrade Fontes Direccao-Geral da Pecuaria Fax:</p>	<p>ROU Romania Prof. Gabriel Predoi, CVO General Director of the Sanitary Veterinary General Direction, National Sanitary Veterinary and Food Safety Authority Bd. Carol I, nr. 24, sector 3 Bucuresti, cod 70.033 /Romania Tel.: +40-21-3157875 Fax: +40-21-3124967 Email: predoi@ansv.ro</p>
<p>RUS Russian Federation (European part) Dr. A.A. Shabeykin Dr. A.M. Gulukin Dr. A.V. Parshikova Institute of Experimental Veterinary Medicine Ryazanskij prospekt 24-1 109428 Moscow Tel.: + 74959700368 Fax: + 74959700369 Email: viev@mail.ru Internet: viev.ru</p>	<p>RUS Russian Federation (European part) Dr. N. A. Yaremenko Dr. S.A. Kolomytzev Department of veterinary and livestock Ministry of Agriculture Orlikov per., 1/11 107139, Moscow Tel.: (495) 975 - 5423 Fax: (495) 975 - 5423 Email: n.yaremenko@vet.mcx.ru</p>
<p>RUS Russian Federation (European part) Responsible expert: Dr. Artem Metlin Federal Centre for Animal Health, 600901, Vladimir, Russia. Fax: +74 922260753 Email: artem.metlin@inbox.ru</p>	<p>RUS Russian Federation (European part) Prof.A.A.Movsesyants Scientific Centre of Expertise of Medicals Devices 119002, Moscow Tel.: Tel. +7 499 2413784 Fax: Email: Movsesyans_AA@gisk.ru</p>
<p>SRB Serbia Prof. Dr Dušan Lalošević (Director) Dr. Nenad Vranješ (Rabies Epidemiology and prevention) Dr. Srdan Stankov (Rabies laboratory) Pasteur Institute Novi Sad Hajduk Veljkova 1 / P.O. Box 208 21000 Novi Sad / Serbia Tel.: +381 21 6611 003 +381 21 420 528 Fax: +381 21 6611 003 Email: paster-ns@neobee.net</p>	<p>SVK Slovak Republic Prof. Josef Bires, CVO Roman Matejčík, DVM State Veterinary Administration of the Slovak Republic Botanická No 17 842 13 Bratislava /Slovak Republic Tel.: +421-2-60 257 227 Fax: +421-2-65 411 159 Email: welfare@svssr.sk</p>
<p>SVK Slovak Republic Responsible expert: Miroslav Mojzis, DVM Státny veterinárny ústav Zvolen Pod Dráhami No. 918 960 86 Zvolen /Slovak Republic Fax:</p>	<p>SVN Slovenia Ales Brečelj, MSc, DVM Ministry of Agriculture, Forestry and Food Veterinary Administration of the Republic of Slovenia Parmova 53 1000 Ljubljana / Slovenia Tel.: +386-1-300 13 00 Fax: +386-1-300 13 56 Email: ales.brecelj@gov.si Internet www.sigov.si/vurs</p>
<p>SVN Slovenia Responsible expert: Peter Hostnik, PhD, DVM National Veterinary Institute, Unit for the diagnostic of contagious and other diseases, Laboratory of Virology Gerbiceva 60 1000 Ljubljana / Slovenia Tel.: +386-1-477 91 00 Fax: +386-1-477 93 52 Email: peter.hostnik@vf.uni-lj.si</p>	<p>SWE Sweden Dr. Leif Denneberg National Board of Agriculture Department for Animal Production and Health SE-551 82 Jönköping /Sweden Tel.: +46-36-15 50 00 Fax: +46-36-30 81 82 Email: leif.denneberg@sjv.se</p>

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФГБУ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ,
РАДИАЦИОННОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ"
(ФГБУ "ФЦТРБ - ВНИВИ")

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,
чл.-корр. РАН, д.б.и. профессор
 А.В.ИВАНОВ
« 19 »  2014 г.

РЕКОМЕНДАЦИИ
по купированию первичных очагов
и профилактике бешенства

Казань 2014 г.

Рекомендации по купированию первичных очагов и профилактике бешенства разработали сотрудники лаборатории иммунологии и биохимии зав. лаб. иммунологии и биохимии, д.б.н., профессор Н.А.Хисматуллина, соискатель в.н.с., к.б.н. А.М.Гулюкин, с.н.с., к.б.н. В.В.Сабилова, н.с., к.б.н. Т.П.Петрова, соискатель, к.б.н. М.М. Каримов, м.н.с. Самерханов И.И., соискатель Явкин С.Г.

Рекомендации рассмотрены и одобрены на заседании Научно - методического совета ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (протокол №27 от 18.11.2014 г.).

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК**

ОТДЕЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ



«УТВЕРЖДАЮ»

Академик-секретарь

Отделения ветеринарной

медицины

Академик РАСХН

А.М.Смирнов

18» 05.08.2005 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по расчету годовой потребности в биопрепаратах для проведения
профилактических и противозооотических мероприятий
в хозяйствах всех форм собственности

Методические рекомендации предназначены для ветеринарных специалистов, осуществляющих контроль обстановки по особо опасным и карантинным болезням животных и определяющих потребность в биопрепаратах для проведения профилактических и противозооотических мероприятий.

Методические рекомендации подготовлены научными сотрудниками Государственного научно-исследовательского учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко М.И. Гулюкиным, К.П. Юровым, А.Х. Наймановым, А.М. Гулюкиным, Л.А. Ивановой, А.В. Шишкиным, С.В. Лапуновым, В.Н. Скворцовым.

Методические рекомендации рассмотрены и одобрены на заседании секции «Инфекционная патология животных» отделения Ветеринарной медицины РАСХН 18 августа 2005 года.

Ответственный за выпуск: ученый секретарь отделения ветеринарной медицины РАСХН, доктор ветеринарных наук, профессор В.В. Субботин.

Москва 2007

ВЫПИСКА

из протокола №2 заседания секции Отделения ветеринарной медицины
Российской академии сельскохозяйственных наук «Инфекционная патология
животных»

от 18 августа 2005 года

Присутствовали члены секции

Слушали: информацию научного руководителя представленной работы, члена-корреспондента РАСХН, профессора М.И.Гулюкина на тему «Методические рекомендации по расчету годовой потребности в биопрепаратах для проведения профилактических и противозпизоотических мероприятий в хозяйствах всех форм собственности».

Рекомендации разработали: М.И.Гулюкин, К.П.Юров, А.Х.Найманов, А.М.Гулюкин, Л.А.Иванова, А.В.Шишкин, С.В.Лопунов, В.Н.Скворцов.

Рекомендации предназначены для ветеринарных специалистов, осуществляющих контроль обстановки по особо опасным и карантинным болезням животных и определяющих потребность в биопрепаратах для проведения профилактических и противозпизоотических мероприятий.

Выступили: рецензенты проф. Э.А.Шегидевич и проф. Н.П. Овдиенко, которые проанализировали представленные рекомендации и дали им положительную оценку, высказав ряд замечаний.

Постановили: одобрить «Методические рекомендации по расчету годовой потребности в биопрепаратах для проведения профилактических и противозпизоотических мероприятий в хозяйствах всех форм собственности» с учетом сделанных замечаний и представить в Россельхозакадемию на утверждение. Учитывая практическую значимость, рекомендовать издание рекомендаций массовым тиражом и разослать во все субъекты РФ для практического использования.

Председатель секции
Член-корреспондент РАСХН



M.I. Gulokin М.И.Гулюкин

Секретарь
Кандидат биологических наук

L.A. Ivanova Л.А.Иванова

Rabies virus isolate VIEV_RV_W-1/16 glycoprotein (G) gene, partial cds - Nucleotide - NCBI

Nucleotide

GenBank

Rabies virus isolate VIEV_RV_W-1/16 glycoprotein (G) gene, partial cds

GenBank: KX346709.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS KX346709 288 bp cRNA linear VRL 05-SEP-2016
 DEFINITION Rabies virus isolate VIEV_RV_W-1/16 glycoprotein (G) gene, partial cds.
 ACCESSION KX346709
 VERSION KX346709.1
 KEYWORDS .
 SOURCE Rabies lyssavirus
 ORGANISM [Rabies lyssavirus](#)
 Viruses; ssRNA viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales; Rhabdoviridae; Lyssavirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 288)
 AUTHORS Gulyukin,A.M. and Zaykova,O.N.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-MAY-2016) Ya.R.Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Ryazanskiy Avenue 24-1, Moscow 109428, Russia
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Assembly Method :: Applied Biosystems v. 3130 Genetic Analyzer
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..288
 /organism="Rabies lyssavirus"
 /mol_type="viral cRNA"
 /isolate="VIEV_RV_W-1/16"
 /host="wolf"
 /db_xref="taxon:11292"
 /country="Tajikistan"
 /collection_date="15-Jan-2016"
 gene <1..>288
 /gene="G"
 cds <1..>288
 /gene="G"
 /codon_start=2
 /product="glycoprotein"
 /protein_id="A0H73261.1"
 /translation="LVNLDHFRSDEIEHLVVEELVKKREECLDALESIMTTKVSFRR LSHLRKLVPGFGKAYTIFNKTLMEADAHYKSVRTWNEIIPSKGCLKVGGRC"
 ORIGIN
 1 gttggtgaat ttgcacgact ttcgctcgga tgaattgag catctgtgtg tagaggagtt
 61 ggccaagaaa agagaggagt gtctagatgc actagatcc atcatgacca ccaagtcagt
 121 gagtttcaga cgtctcagtc atttaagaaa acttgttccc gggtttggga aagcatatac
 181 catattcaac aagaccttga tggaggctga tgctcactac aagtcagtc ccgacttggaa
 241 tgagatcatc cctccaaag ggtgtttgaa agttggagga aggtccca
 //

Rabies virus isolate VIEV_RV_W-1/16 nucleoprotein (N) gene, partial cd - Nucleotide - NCBI

Nucleotide

GenBank

Rabies virus isolate VIEV_RV_W-1/16 nucleoprotein (N) gene, partial cds

GenBank: KX346708.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS KX346708 562 bp cRNA linear VRL 05-SEP-2016
 DEFINITION Rabies virus isolate VIEV_RV_W-1/16 nucleoprotein (N) gene, partial cds.
 ACCESSION KX346708
 VERSION KX346708.1
 KEYWORDS .
 SOURCE Rabies lyssavirus
 ORGANISM [Rabies lyssavirus](#)
 Viruses; ssRNA viruses; ssRNA negative-strand viruses; Mononegavirales; Rhabdoviridae; Lyssavirus.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 562)
 AUTHORS Gulyukin,A.M. and Zaykova,O.N.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (28-MAY-2016) Ya.R.Kovalenko All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Ryazanskiy Avenue 24-1, Moscow 109428, Russia
 COMMENT ##Assembly-Data-START##
 Assembly Method :: Applied Biosystems v. 3130 Genetic Analyzer
 Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
 ##Assembly-Data-END##
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..562
 /organism="Rabies lyssavirus"
 /mol_type="viral cRNA"
 /isolate="VIEV_RV_W-1/16"
 /host="wolf"
 /db_xref="taxon:11292"
 /country="Tajikistan"
 /collection_date="15-Jan-2016"
 gene <1..>562
 /gene="N"
 CDS <1..>562
 /gene="N"
 /codon_start=3
 /product="nucleoprotein"
 /protein_id="A0H73260.1"
 /translation="KNQVVSLKPEIIVDQYEQYKPAIKDLKKPSITLGKAPDLNKAYKSVLSGMNAAKLDPDDVCSYLAAMQFFEGTCEPDWTSYGIWIARKGDKITPDSLVEIKRTDVEGNWALTGGMELTRDPTVSEHASLVGLLLSLYRLSKISGQNTGNYKTNIADRIEQIFETAPFVKIVEHHTLMTTHKMCAN"
 ORIGIN
 1 tcaagaatca ggtggtctct ttgaagcctg agattatcgt ggatcaatat gagtacaagt
 61 accctgctat caaagatttg aaaaagccca gtataaccct agggaaaagcc cctgacttga
 121 acaaaagcata caagtcagtt ttgtcaggca tgaatgcagc caaactagat cctgatgatg
 181 tatgttccta cttggcagca gcaatgcagt tctttgaggg gacgtgtccg gaagactgga
 241 ccagctatgg aatctggatt gcgcgaaaag gagacaagat caccgccgat tcaactgtgg
 301 aaataaagcg tactgatgta gaaggaaatt gggctctgac aggaggcatg gaactgacaa
 361 gggaccccaac tgtctctgaa catgcgtctt tggttggtct tctcttgagt ctgtataggt
 421 tgagcaaaat atcaggacaa aacactggca actataaaac aaacatcgca gatagtagat
 481 agcagatatt cgagaccgcc ccttttgta aaatctgga acaccatact ctaatgacaa
 541 ctcaaaaat gtgtcgaat tg
 //

Федеральное государственное учреждение «Федеральный центр
токсикологической и радиационной безопасности животных»
(ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

УТВЕРЖДАЮ



по применению Иммуноферментной тест-системы для определения
уровня антирабических антител в сыворотках крови вакцинированных
против бешенства методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА)

(организация-производитель ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»
Минсельхоза России, г. Казань, Республика Татарстан)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Иммуноферментная тест-система для определения уровня антирабических антител в сыворотках крови вакцинированных против бешенства методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА).

2. В состав набора входят:

- специфический антиген (гликопротеин) вируса бешенства из штамма «Овечий» ГНКИ, 0,1 см³ - 2 ампулы;
- контрольная положительная сыворотка, содержащая антитела к возбудителю бешенства, 0,1 см³ - 2 ампулы;
- контрольная отрицательная сыворотка, 0,1 см³ - 2 ампулы;
- антивидовой глобулин (или белок А) меченный пероксидазой, 0,1 см³ - 2 ампулы;

ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА № 10

заседания научно-методического совета ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» от 01 июля 2010 года

Присутствуют: 7 чел. из 9 членов совета, научные сотрудники, аспиранты

Слушали: (пункт 4 повестки дня) заведующую лабораторией иммунологии профессора Хисматуллину Н.А. по результатам разработки иммуноферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных методом блок - иммуноферментного анализа.

С рецензией материала выступили: проф. Юсупов Р.Х., , проф. Садыков Н.С.

Постановили: одобрить представленные материалы с учетом состоявшегося обсуждения. Рекомендовать авторам доработать их и оформить в качестве «Инструкции по применению иммуноферментной тест-системы для определения уровня антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных методом блок - иммуноферментного анализа (блок-ИФА)» и утвердить в установленном порядке.

Гол. – единогласно.

Председатель
совета, профессор

п/п

ПАПУНИДИ К.Х.

Ученый секретарь совета

п/п

СТЕПАНОВ В.И.

Выписка верна:
Ученый секретарь совета



СТЕПАНОВ В.И.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

ГОСТ
26075—
2013

ЖИВОТНЫЕ

Методы лабораторной диагностики бешенства

Издание официальное



Москва
Стандартинформ
2014

ГОСТ 26075–2013

Предисловие

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 – 92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2–2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным учреждением «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии Российской Федерации

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 27 июня 2013 г. № 57-П)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Армения	AM	Минэкономики Республики Армения
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Россия	RU	Росстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 30 сентября 2013 г. № 1127-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 26075-2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2015 год

5 ВЗАМЕН ГОСТ 26075–84

Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты», а текст изменений и поправок – в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ежемесячно издаваемом информационном указателе «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования – на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет

© Стандартиформ, 2014

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА № 29

заседания научно-методического совета ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» от 12 ноября 2013 года

Присутствуют: 8 чел. из 9 членов совета,

Слушали: (пункт 2 повестки дня) заведующую лабораторией иммунологии профессора Хисматуллину Н.А. по результатам НИР, посвященных разработке методов индикации возбудителя бешенства – методом выделения вируса бешенства из патологического материала в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1)».

С рецензией материала выступили: проф. Макаев Х.Н., проф. Садыков Н.С.

Постановили: одобрить представленные материалы с учетом состоявшегося обсуждения. Рекомендовать авторам доработать их и оформить в качестве «Методических рекомендаций по индикации возбудителя бешенства методом выделения вируса бешенства из патологического материала в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1)» (авт. коллектив: Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Юсупов Р.Х., Гулюкин А.М., Чернов А.Н., Савицкая Т.А.).

Гол. – единогласно.

Председатель совета, профессор	п/п	ПАПУНИДИ К.Х.
Ученый секретарь совета	п/п	СТЕПАНОВ В.И.

Выписка верна:
Ученый секретарь совета



СТЕПАНОВ В.И. -

ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА № 11

заседания ученого совета ФГБУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных» от 19 декабря 2013 г.

Присутствовало 21 чел. из 25 членов ученого совета

Третий вопрос повестки дня.

Слушали: заведующую лабораторией иммунологии доктора биологических наук, профессора Хисматуллину Н.А. по «Методические рекомендации по индикации возбудителя бешенства методом выделения вируса бешенства из патологического материала в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1)» (авт. коллектив: Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Юсупов Р.Х., Гулюкин А.М., Чернов А.Н., Савицкая Т.А.).

С предложениями выступили: проф. Салмаков К.М., проф. Гаффаров Х.З. и проф. Фаизов Т.Х.

Постановили: Рекомендовать включение «Методических рекомендаций по индикации возбудителя бешенства методом выделения вируса бешенства из патологического материала в культуре клеток невриномы Гассерова узла крысы (НГУК-1)» (авт. коллектив: Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Юсупов Р.Х., Гулюкин А.М., Чернов А.Н., Савицкая Т.А.) в качестве метода диагностики бешенства в государственный стандарт.

Гол. – единогласно.

Председатель ученого
совета, профессор

ИВАНОВ А.В.

Ученый секретарь совета

СТЕПАНОВ В.И.

Выписка верна:

ученый секретарь совета

Степанов В.И.



Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Департамент научно-технологической политики и образования
ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и
биологической безопасности» (ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»)

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»
чл.-корр. РАСХН, профессор
 А.В.ИВАНОВ
«14» 11 2013 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ПО ИНДИКАЦИИ
ВОЗБУДИТЕЛЯ БЕШЕНСТВА МЕТОДОМ ОТ-ПЦР

Казань 2013

УДК 579.252.55:615.332:579.25:577.212.3

Методические указания по индикации возбудителя бешенства методом ОТ-ПЦР

Методические указания разработали: директор ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» чл.-корр. РАСХН, профессор, д.б.н. А.В. Иванов, профессор, д.вет.н. Т.Х. Фаизов, профессор, д.б.н. Н.А. Хисматуллина, зав. отделом биобезопасности, к.вет.н. А.Н. Чернов, в.н.с., к.вет.н. К.В. Усольцев, с.н.с., к.б.н. Н.М. Александрова, в.н.с., к.б.н. А.М. Гулюкин, м.н.с. Т.П. Петрова.

Методические указания предназначены для использования в научно-исследовательских организациях биологического, ветеринарного и медицинского профиля, а также в практической деятельности межрегиональных, областных, республиканских, районных ветеринарных лабораторий.

Методические указания рассмотрены и одобрены на заседании Научно-методического совета ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (протокол № 29 от 12.11.2013 г.).

Рецензенты: Гаффаров Х.З., профессор, доктор ветеринарных наук
Салмаков К.М., профессор, доктор ветеринарных наук

© ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), 2013г.

ВЫПИСКА ИЗ ПРОТОКОЛА № 29

заседания научно-методического совета ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» от 12 ноября 2013 года

Присутствуют: 8 чел. из 9 членов совета,

Слушали: (пункт 3 повестки дня) заведующую лабораторией иммунологии профессора Хисматуллину Н.А. по результатам НИР, посвященных разработке методов индикации возбудителя бешенства.

С рецензией материала выступили: проф. Макаев Х.Н., проф. Юсупов Р.Х.

Постановили: одобрить представленные материалы с учетом состоявшегося обсуждения. Рекомендовать авторам доработать их и оформить в качестве «Методических рекомендаций по индикации возбудителя бешенства методом ОТ-ПЦР».

Гол. – единогласно.

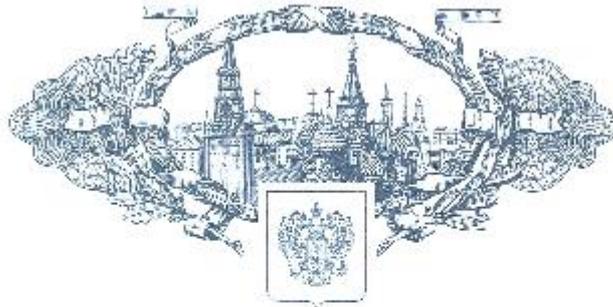
Председатель совета, профессор	п/п	ПАПУНИДИ К.Х.
Ученый секретарь совета	п/п	СТЕПАНОВ В.И.

Выписка верна:
Ученый секретарь совета



СТЕПАНОВ В.И.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2575088

**НАБОР СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ
ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА
БЕШЕНСТВА И СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА
БЕШЕНСТВА С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ
ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ В
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ОБРАТНОЙ
ТРАНСКРИПЦИЕЙ (ОТ-ПЦР)**

Патентообладатель(и): *Федеральное бюджетное государственное учреждение "Федеральный Центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности" (ФГБУ "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2014139999

Приоритет изобретения **02 октября 2014 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **18 января 2016 г.**

Срок действия патента истекает **02 октября 2034 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Г.В. Иванов Г.В. Иванов



Патент на изобретение №2575088

http://www1.fips.ru/fips_servl/fips_servlet

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(19) RU⁽¹¹⁾2575088⁽¹³⁾ C1(51) МПК
C12Q1/68 (2006.01)
C12N15/11 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: по данным на 10.05.2016 - действует

(21), (22) Заявка: 2014139999/10, 02.10.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.10.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 02.10.2014

(45) Опубликовано: 10.02.2016

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SATO G. ET AL., Rapid discrimination of rabies viruses isolated from various host species in Brazil by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction, J Clin Virol., 2005, v.33, no.4, p. 267-273. GUPTA P.K. ET AL., Preliminary report on a single-tube, non-interrupted reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of rabies virus in brain tissue, Vet Res Commun., 2001, v.25, no.3, p. 239-247. MULEYA W. ET AL., Molecular epidemiology and a loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis of infection with rabies virus in Zambia, Virus Res., 2012, v.163, no.1, p. 160-168. KAMEL A. ABD-ELSALAM, Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design, African Journal of Biotechnology, 2003, v. 2, no. 5, p. 91-95. RU 2511440 C2, 10.04.2014.

Адрес для переписки:

420075, г. Казань, Научный городок, 2, ФГБУ
"ФЦТРБ-ВНИВИ"

(72) Автор(ы):

Иванов Аркадий Васильевич (RU),
Хисматуллина Наиля Анваровна (RU),
Усольцев Константин Валерьевич (RU),
Гулюкин Алексей Михайлович (RU),
Александрова Наталья Михайловна (RU),
Южаков Антон Геннадьевич (RU),
Сабирова Валентина Васильевна (RU),
Чернов Альберт Николаевич (RU),
Иванов Александр Аркадьевич (RU),
Забережный Алексей Дмитриевич (RU),
Самерханов Ильнур Иршатович (RU),
Паршикова Анна Владимировна (RU),
Фаизов Тагир Хадиевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное бюджетное государственное
учреждение "Федеральный Центр
токсикологической, радиационной и
биологической безопасности" (ФГБУ "ФЦТРБ-
ВНИВИ") (RU)

(54) НАБОР СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА БЕШЕНСТВА И СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА БЕШЕНСТВА С ПОМОЩЬЮ СИНТЕТИЧЕСКИХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ (ОТ-ПЦР)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к способу выявления РНК вируса бешенства и набору, который используется в данном способе. Способ включает проведение ОТ-ПЦР с олигонуклеотидными праймерами. Праймеры имеют следующие нуклеотидные последовательности: fr_850_gp_rabv 5' TTAGACTTATGGATGGAACATGGGT 3', gr_850_gp_rabv 5' AGTGACTGACACCTCCCTCCCT 3', fr_350_gp_rabv 5'TCAGACGAAATTGAGCACCTTGT3', gr_350_gp_rabv 5'ACCTCCSSSSAACTCTTAAACA3'. ОТ-ПЦР проводят в два раунда, при этом в случае положительной реакции синтезируется фрагмент, соответствующий размеру в первом раунде - 755 п.н., во втором - размеру 259 п.н. Предложенное изобретение позволяет проводить выявление РНК штаммов и изолятов вируса бешенства различного происхождения на ранних этапах клинического проявления, а также снизить себестоимость диагностики. 2 н.п. ф-лы, 2 ил., 3 табл., 4 пр.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2420309

ПРЕПАРАТ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное учреждение "Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных (ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU), Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина" (ГОУВПО "КГУ") (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2009130819

Приоритет изобретения 12 августа 2009 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 10 июня 2011 г.

Срок действия патента истекает 12 августа 2029 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам



Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ 2 420 309 ⁽¹³⁾ **C2**(51) МПК
A61K 39/00 (2006.01)(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2009130819/15, 12.08.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.08.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.08.2009

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2011 Бюл. № 5

(45) Опубликовано: 10.06.2011 Бюл. № 16

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: ГРИБЕНЧА С.В. противовирусная
активность РНКазы *Bacillus intermedius* у
морских свинок и кроликов, зараженных
вирусом бешенства// Вопросы вирусологии,
2006, №5, с.41-43. ИВАНОВ А.В.
Диагностика и профилактика бешенства
животных. - М., 2007, с.53-55. RU 2007185 C1,
15.02.1994. CN 101307317 A, 19.11.2008.

Адрес для переписки:

420075, г.Казань, Научный городок, 2, ФГУ
"ФЦТРЕ-ВНИВИ", отдел биобезопасности,
ученому секретарю В.И. Степанову

(72) Автор(ы):

Иванов Аркадий Васильевич (RU).
Хисматуллина Наиля Анваровна (RU).
Чернов Альберт Николаевич (RU).
Юсупов Расых Халиуллович (RU).
Миронов Александр Николаевич (RU).
Гулюкин Алексей Михайлович (RU).
Филимонова Мария Николаевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное учреждение
"Федеральный Центр токсикологической и
радиационной безопасности животных
(ФГУ "ФЦТРЕ-ВНИВИ") (RU).
Государственное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования "Казанский государственный
университет им. В.И. Ульянова-Ленина"
(ГОУВПО "КГУ") (RU)

(54) **ПРЕПАРАТ ПРОТИВ БЕШЕНСТВА**

(57) Формула изобретения

Препарат против бешенства, включающий эндонуклеазу бактериальную,
отличающийся тем, что он дополнительно содержит водно-солевой раствор,
включающий 45-50%-ный «Гемодез-Н» и 0,125-1,0%-ный магний сульфат 7-водный, а в
качестве эндонуклеазы бактериальной используют 0,08% эндонуклеаза
бактерий *Serratia marcescens* в 1%-ном водном растворе хлорида натрия, причем
«Гемодез-Н», магний сульфат и эндонуклеаза бактериальная взяты в соотношении 1:1:
2, соответственно.

RU 2 4 2 0 3 0 9 C 2

RU 2 4 2 0 3 0 9 C 2

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2440139

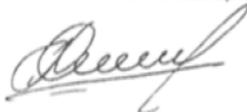
**ВАКЦИНА ПРОТИВ БЕШЕНСТВА ДЛЯ ОРАЛЬНОЙ
ИММУНИЗАЦИИ ДИКИХ ПЛОТОЯДНЫХ ЖИВОТНЫХ И
СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ**

Патентообладатель(ли): *Открытое акционерное общество
"Институт биотехнологий ветеринарной медицины" (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2010144856
Приоритет изобретения 03 ноября 2010 г.
Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации 20 января 2012 г.
Срок действия патента истекает 03 ноября 2030 г.

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной
собственности, патентам и товарным знакам


Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ(19) RU⁽¹¹⁾ 2 440 139⁽¹³⁾ C1(51) МПК
A61K 39/205 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010144856/15, 03.11.2010

(24) Дата начала отчета срока действия патента:
03.11.2010

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 03.11.2010

(45) Опубликовано: 20.01.2012 Бюл. № 2

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2311924 C2, 10.12.2007. RU 2250781
C2, 27.04.2005, US 4014991 A, 29.03.1977. EP
0100752 A2, 15.02.1984. CN 101757619 A,
30.06.2010.

Адрес для переписки:

105120, Москва, 3-й Сыромятинский пер.,
3/9, стр.1, ОАО "Институт биотехнологий
ветеринарной медицины", генеральному
директору П.П. Рахманину

(72) Автор(ы):

Рахманин Павел Петрович (RU),
Крюков Сергей Вениаминович (RU),
Тренев Владимир Николаевич (RU),
Мельник Николай Васильевич (RU),
Кузнецов Дмитрий Павлович (RU),
Соловьев Борис Васильевич (RU),
Сафонов Георгий Анатольевич (RU),
Баньковский Денис Олегович (RU),
Мякский Андрей Иванович (RU),
Чермашицева Наталья Анатольевна (RU),
Гулюкин Алексей Михайлович (RU),
Литенкова Ирина Юрьевна (RU),
Захарченко Олег Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Открытое акционерное общество "Институт
биотехнологий ветеринарной медицины"
(RU)(54) ВАКЦИНА ПРОТИВ БЕШЕНСТВА ДЛЯ ОРАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ ДИКИХ
ПЛОТЯНЫХ ЖИВОТНЫХ И СПОСОБ ЕЕ ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области ветеринарной вирусологии. Вакцина включает вакцинный штамм вируса бешенства, выращенный в перевиваемой культуре клеток, и пищевые и формообразующие компоненты. При этом вакцина содержит в качестве вакцинного штамма культуральную жидкость, содержащую авирулентный штамм вируса бешенства с титром инфекционности $6,0-8,5 \lg \text{FFU}_{50}/\text{см}^3$. В качестве пищевых и формообразующих компонентов вакцина содержит рыбную муку, говяжий жир, парафин или пищевой полимер и неочищенное зерно хлебных злаков, дополнительно содержит маркер-тетрациклин, при следующем соотношении компонентов, мас. %: культуральная жидкость, содержащая авирулентный штамм вируса бешенства с титром инфекционности $6,0-8,5 \lg \text{FFU}_{50}/\text{см}^3$, - 1,0-4,0, тетрациклин - 0,3-1,2, парафин или

пищевой полимер - 5,0-10,0, неочищенное зерно хлебных злаков - 5,0-15,0, рыбная мука - 30,0-40,0, говяжий жир - остальное. Способ получения вакцины заключается в том, что вакцинный штамм вируса бешенства выращивают в перевиваемых монослойно-сuspензионных субинициях клеток почки новорожденного сирийского хомячка ВНК-21/13-02 или почки сайги. Полученную культуральную жидкость, содержащую авирулентный штамм вируса бешенства с титром инфекционности $6,0-8,5 \lg \text{FFU}_{50}/\text{см}^3$, замораживают при минус 20-40°C. Далее тетрациклин, парафин, неочищенное зерно хлебных злаков, рыбную муку, говяжий жир перемешивают в течение 25-30 минут при температуре 55-60°C. Полученную массу разливают в пластиковые формы при температуре 40-45°C. В каждую ячейку формы помещают культуральную жидкость, содержащую авирулентный штамм вируса

RU 2 440 139 C1

RU 2 440 139 C1

СОГЛАСОВАНО:
 Директор ФГУ «ВГНКИ»,
 академик РАСХН
 А.Н.ПАНИН
 « 14 » сентября 2011 г.

Начальник ГУВ Смоленской
 области
 С.Р.КУЛАКОВА
 « 14 » сентября 2011 г.

Начальник Департамента
 Смоленской области по охране,
 контролю и регулированию
 использования объектов
 животного мира и среды их
 обитания
 А.В.ВАСИН
 « 14 » сентября 2011 г.

УТВЕРЖДАЮ:
 Директор ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,
 профессор
 А.В.ИВАНОВ
 « 14 » сентября 2011 г.

ПРОГРАММА

мероприятий по изучению эффективности поедаемости антирабической вакцины для перорального применения на ограниченной территории в Смоленской области РФ

Срок выполнения: 2011 - 2012 г.г.

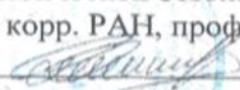
Руководитель разработки: зав. лабораторией иммунологии ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», д.б.н., профессор Н.А.Хисматуллина

Исполнители:

соискатель лаб. иммунологии ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», А.М. Гулюкин;
 зам. начальника ГУВ Смоленской области И.В. Амирова,
 заместитель начальника департамента Смоленской области по охране, контролю и регулированию использования объектов животного мира и среды их обитания Н.В. Миронов
 в.н.с. ФГУ «ВГНКИ», к.б.н. А.Л. Елаков;
 с.н.с. лаб. иммунологии ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», к.в.н. Ш.М. Насыров;
 н.с. лаб. иммунологии ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», к.б.н. В.В. Сабирова;
 м.н.с. лаб. иммунологии ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», к.б.н. Н.Р. Мифтахов.

Эффективность применения оральной вакцины можно оценивать как по снижению уровня заболеваемости, так и по наличию уровня вируснейтрализующих антител в сыворотках крови диких животных после применения препарата.

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»,
чл. - корр. РАН, профессор
 А.В.ИВАНОВ
« 12 » _____ 2014 г.

ОТЧЕТ

по результатам проведения исследований по оценке эффективности вакцинации диких плотоядных животных против бешенства на территории Калининградской области согласно гражданско-правовому договору №0135200000513000364-0267994-01 от 11 июня 2013 г.

Исследования проведены в лаборатории иммунологии и биохимии ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Объекты исследования: 100 проб головного мозга для диагностики бешенства, 100 проб сывороток крови и глазной жидкости для определения титра антирабических антител, а также 100 проб костной ткани для определения тетрациклина.

Методы исследования и оборудование:

Метод иммунофлуоресценции (ИФ) проводили в прямом варианте по ГОСТу 26075-84 с использованием «Флуоресцирующего антирабического глобулина», разработанного ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», ТУ 9388-027-00492374-2007, зарегистрированного в Российской Федерации № ПВР -1-4.9/00196 и сертифицированного в ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва № РОСС RU.ВР01.Н00352. Анализ проб мозга проводили на люминесцентном микроскопе Nikon (Japan).

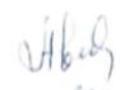
В работе использовали также иммуноферментный анализ (ИФА). ИФА проводили на 96-луночных микротитрационных планшетах для иммунологических реакций из полистирола «Пл-Б-М», ТУ 9393-009-16548645-2005. Для определения антигенов вируса бешенства применяли прямой сэндвич-вариант ИФА, с использованием «Набора препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа (ИФА)», ТУ 9388-025-00492374-2007, зарегистрированного в Российской Федерации № ПВР -1-1.9/00261 и сертифицированного в ФГБУ «ВГНКИ», г. Москва № РОСС RU.ФВ01.Д12101. В случае получения отрицательных результатов по ИФ и ИФА ставили биопробу на белых мышах по ГОСТу 26075-84 или в культуре клеток НГУК-1 согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике бешенства», разработанным ВНИВИ (г.Казань) и ИПВЭ РАН

Из данных таблицы следует, что антирабическую вакцину получило 61 особь (положительные по тетрациклину в зубах или челюстях), что составило 61,0% от 100 исследуемых проб; из них 39 особей выработали специфические к вирусу бешенства антитела (с титром антител в ИФА от 1:50 до 1:200 при K_{cp} более или равном 2,1, а также в реакции нейтрализации в культуре клеток равном или более 0,5 МЕ/мл), что составило 63,9% от вакцинированных животных. В Приложениях на рис. 1, 2 и 3 выборочно представлены пробы с положительной флуоресценцией тетрациклиновой метки в зубах и челюстях обследованных лисиц и енотовидных собак (пробы №№ 8, 9, 14, 20, 28, 48, 56, 57, 73, 87, 89 и 98).

При анализе эффективности применения оральной вакцины по видам животных установлено, что выборку из 100 исследуемых животных составило 11 енотовидных собак и 89 лисиц. Из них получило вакцину 5 енотовидных собак (45,4%) и выработало антирабические антитела 2 особи, что составило 40 % от вакцинированных. Вместе с тем, из 89 лисиц получило антирабическую вакцину 56 особей, что составило 62,9%, из них выработало специфические к вирусу бешенства антитела – 37 лисиц, что составило 66,0% от вакцинированных.

Таким образом, анализом полученных данных установлена эффективность применяемой антирабической вакцины на анализируемой выборке животных (89 лисиц и 11 енотовидных собак), обеспечивающей поедаемость вакцины 62,9% лисиц и енотовидными собаками – 45,4% и выработку специфических антител к вирусу бешенства у 66,0% лисиц и 40% енотовидных собак от вакцинированных.

Разница в количестве лисиц и енотовидных собак, выработавших специфические к вирусу бешенства антитела, связана по - видимому, с жесткостью блистера, внутри которого находится вакцина, которая отличается по доступности для этих видов животных, а также с видовыми особенностями иммунного ответа у этих животных.

Зав. лабораторией иммунологии и биохимии, д.б.н., профессор		Н.А. Хисматуллина
В.н.с. лаб. иммунологии и биохимии, к.б.н.		А.М. Гулюкин
С.н.с. лаб. иммунологии и биохимии, к.б.н.		В.В. Сабирова
Н.с. лаб. иммунологии и биохимии, к.б.н.		Т.П. Петрова
Н.с. лаб. иммунологии и биохимии, к.в.н.		А.Ф. Авзалова
М.н.с. лаб. иммунологии и биохимии		И.И. Самерханов