

Лосич М.А.^{1,2}, Зайкова О.Н.^{1,2}, Непоклонова И.В.², Гребенникова Т.В.^{1,3},
Верховский О.А.², Одноров А.И.³, Алипер Т.И.^{1,2}

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВАКЦИННОГО ШТАММА ERA-CB 20M ВИРУСА БЕШЕНСТВА

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва;

²АНО «НИИ диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, г. Москва;

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва

В статье представлена молекулярная и биологическая характеристика вакцинного вируса бешенства штамм ERA-CB 20M, полученного российским рабиологом, доктором медицинских наук С.В. Грибенча путём адаптации и клонирования штамма ERA и SAD в перевиваемой культуре клеток ВНК-21 С13. Установлен спектр наиболее чувствительных к вирусу бешенства штамм ERA-CB 20M линий клеток, количественно определён уровень гликопротеина. Получена информация о первичной структуре фрагментов генома штамма ERA-CB 20M (гены N и G) и проведён филогенетический анализ. Методами молекулярного анализа установлено, что данный штамм попадает в группу вакцинных штаммов SAD1. При сравнении с референсным штаммом SAD1 выявлено 10% нуклеотидных отличий во фрагменте гена N и 15% – во фрагменте гена G.

Ключевые слова: бешенство; штамм ERA-CB 20M; секвенирование; гликопротеин вируса бешенства; титр вируса.

Для цитирования: Лосич М.А., Зайкова О.Н., Непоклонова И.В., Гребенникова Т.В., Верховский О.А., Одноров А.И., Алипер Т.И. Молекулярно-биологическая характеристика вакцинного штамма ERA-CB 20M вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(5): 224-232. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-224-232>

Losich M.A.^{1,2}, Zaykova O.N.^{1,2}, Nepoklonova I.V.², Grebennikova T.V.^{1,3}, Verkhovsky O.A.²,
Odnorov A.I.³, Aliper T.I.^{1,2}

MOLECULAR AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF VACCINARY ERA-CB 20M OF RABIES VIRUS

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 109428, Russian Federation;

²Diagnostic and Prevention Research Institute for Human and Animal Diseases, Moscow, 123098, Russian Federation;

³Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russian Federation

The molecular and biological characteristics of the vaccine against rabies virus strain ERA-CB 20M obtained by the Russian rabbiologist, doctor of medical sciences S.V. Gribencha by adapting and cloning the strain ERA and SAD in a transplantable BHK-21 C13 cell culture are presented. The spectrum of the most sensitive strain of rabies ERA-CB 20M cell lines was determined and the level of glycoprotein was quantitatively determined. Primary nucleotide sequences of fragments of the genome of the strain ERA-CB 20M (genes N and G) were obtained and phylogenetic analysis was carried out. Molecular analysis showed that this strain belongs to the group of vaccine strains SAD1. When compared with the reference strain SAD1, 10% of the nucleotide differences were revealed in the gene fragment N; 15%, in the gene fragment G.

Keywords: rabies; strain ERA-CB 20M; sequencing; rabies virus glycoprotein; virus titer.

For citation: Losich M.A., Zaykova O.N., Nepoklonova I.V., Grebennikova T.V., Verkhovsky O.A., Odnorov A.I., Aliper T.I. Molecular and biological characteristics of vaccinary ERA-CB 20M of rabies virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(5): 224-232. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-5-224-232>

For correspondence: Milana A. Losich, Candidate of Biological Sciences, Researcher scientist, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 109428, Russian Federation. E-mail: mkohnovich@rambler.ru

Information about authors:

Grebennikova T.V., <http://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Verkhovsky O.A., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>

Acknowledgments. The publication was prepared with the support of the RUDN University Program 5-100.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 22 December 2017

Accepted 06 March 2018

Для корреспонденции: Лосич Милана Анатольевна, канд. биол. наук, научный сотрудник Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: mkohnovich@rambler.ru

Введение

Бешенство – это острое нейроинфекционное заболевание, возбудитель которого – вирус бешенства (ВБ) – передаётся со слюной больного животного через укус или при ослонении повреждённых участков кожи. Вирус бешенства относится к порядку *Mononegavirales*, семейству *Rhabdoviridae*, роду *Lyssavirus*, и единственный из известных представителей царства *Virae* поражает всех теплокровных животных, в том числе человека, в глобальном масштабе с летальностью 100% [1].

На сегодняшний день род *Lyssavirus* насчитывает 14 видов: вирус бешенства (ВБ, G1), *Lagos bat lyssavirus* (G2), *Mokola lyssavirus* (G3), *Duvenhage lyssavirus* (G4), *European bat lyssavirus-1* (EBLV-1, G5), *European bat lyssavirus-2* (EBLV-2, G6), *Australian bat lyssavirus* (G7), *Aravan lyssavirus* (G8), *Khujand lyssavirus* (G9), *Irkut lyssavirus* (G10), *West Caucasian bat lyssavirus* (G11), *Shimoni bat lyssavirus* (G12), *Bokeloh bat lyssavirus* (G13), *Ikoma lyssavirus* (G14), 1 неклассифицированный *Lleida bat lyssavirus*. Установлено, что 7 генотипов встречались у людей (*Rabies*, *European*, *Irkut*, *Duvenhage*, *Australian*, *Mokola*) [2].

По форме вирион ВБ пулеобразный, имеет длину в среднем 180 нм, диаметр – 75 нм и состоит из несегментированного генома, представленного одной молекулой спиралеобразно скрученной негативной РНК и пятью структурными белками: нуклеопротеином (N), фосфопротеином (P), матричным белком (M), гликопротеином (G) и РНК-зависимой РНК полимеразой или большим белком (*L-large protein*). Именно гликопротеин, образуя поверхностные пепломеры, участвует в проникновении вируса в клетку (прикрепление к клеточным рецепторам, слияние мембран и эндоцитоз), индуцирует образование вируснейтрализующих антител и клеточно-опосредованного иммунного ответа. Гликопротеин гликозилирован по N-связям, а также отвечает за гемагглютинирующую активность и определяет серотип вируса [3, 4].

В Российской Федерации и в мире проблема бешенства остаётся актуальной. За последние годы стабильно высокий уровень распространения рабической инфекции наблюдался в Центральном и Приволжском федеральных округах. Наибольшее число неблагополучных пунктов в 2016 г. зарегистрировано в Московской области (274). Всего за 2016 г. выявлен 2151 случай бешенства животных на территории РФ, большая часть заболевших – дикие и домашние плотоядные [5, 6].

На сегодняшний день нет гарантированного 100% лечения бешенства, и основным методом борьбы с распространением инфекции является вакцинопрофилактика. В настоящее время совершенно очевидно, что без углублённого знания природы возбудителя, включая детальное изучение молекулярной организации генома, невозможно создание высокоэффективных средств специфической профилактики.

ВБ штамм ERA-CB 20M был получен д-ром мед. наук, рабиологом Сергеем Васильевичем Грибенча из штамма ERA и SAD. Культуру клеток заражали вирусом ERA в дозах 50, 250, 1250, 6250 и 31250 LD₅₀, затем через 5, 7, 10 и 13 дней определяли титр вируса в вирусодержащей жидкости путём внутримозгового заражения мышей, а также концентрацию гликопротеина методом твердофазного ИФА. В результате проведённых пассажей удалось получить популяцию вируса с относительно стабильной

высокой экспрессией гликопротеина от 500 до 2400 нг/мл. Выделенный биологический вариант прошёл 20 последовательных пассажей в культуре клеток ВНК-21 и получил новое обозначение – ERA-CB 20M (С – селекция, В – вариант, 20 – 20 последовательных пассажей, М – Москва) [7, 8].

В работе исследованы молекулярные и биологические свойства вакцинного штамма ERA-CB 20M ВБ.

Материал и методы

Штаммы ВБ. В работе были использованы следующие штаммы ВБ: ERA-CB 20M, депонированный в государственной коллекции вирусов Всероссийского государственного центра качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов (ФГУ «ВГНКИ»); референс-штаммы, предоставленные референсной лабораторией ОИЕ по бешенству ANSES (Нанси, Франция): вирус бешенства CVS-11 мозговой (*challenge virus standard*); CVS-11 (фиксированный культуральный штамм).

Культуры клеток. Культивирование вируса проводили в стационарном и роллерном монослое клеток ВНК-21 (почка сирийского хомячка), BSR (клон ВНК-21), Vero (почка зеленой мартышки) и ПС (почка сайги), ВНК-О (клон ВНК-21). Культуры клеток получали из лаборатории ANSES и лаборатории культур и тканей ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи». Титр вируса рассчитывали по методу Рида и Менча.

Филогенетический анализ фрагментов генома штамма ERA-CB 20M

Выделение РНК. РНК выделяли с использованием коммерческого препарата TRI[®] Reagent («Sigma Aldrich») по методике производителя и ресуспендировали в 30–50 мкл деионизированной H₂O при 55°C, периодически перемешивая пробы пипетированием.

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Обратную транскрипцию и получение кДНК с использованием M-MLV *reverse transcriptase* («Fermentas») проводили согласно инструкции производителя с использованием 5 мкл РНК. Реакционная смесь для ПЦР содержала: 16 mM TrisHCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 1% Triton x-100; по 10 пМ каждого праймера; 2,5 mM dNTPs; 2 ед. TAQ-полимеразы. В реакционную смесь вносили 5 мкл кДНК. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР и секвенирования участка гена N были взяты из работы P. Heaton и соавт. [9]: JW12 (5'-ATGTAACACCCYCTACAATG-3'), JW6 (DPL) (5'-CAATTCGCACACATTTTGTG-3'), JW6 (E) (5'-CAGTTGGCACACATCTTGTG-3'), JW6 (M) (5'-CAGTTAGCGCACATCTTATG-3'), JW10 (DLE2) (5'-GTCATCAAAGTGTGRTGCTC-3'), JW10 (ME1) (5'-GTCATCAATGTGTGRTGTTTC-3'), JW10 (P) (5'-GTCATTAGAGTATGGTGTTC-3').

Подбор праймеров для секвенирования гена G осуществлялся нами самостоятельно с использованием программного обеспечения Primer Premier 5 («Premier Biosoft») [10]. Праймеры приведены в табл. 1.

Очистка образцов из геля и секвенирование. Образцы очищали из агарозного геля с помощью набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit («Fermentas») согласно инструкции производителя и секвенировали. Реакцию проводили на амплификаторе Mastercycler Gradient («Eppendorf») с применением BigDye[®] Terminator v. 3.1 Ready Reaction Kit («Applied Biosystems»), затем продукты амплификации переосаждали для последующего

Таблица 1

Олигонуклеотиды (праймеры) для ОТ-ПЦР и секвенирования фрагмента гена G ВБ

Название праймера	Праймеры
F1	CTGCATTTTCATCAAAGTCAA
F2	AGCGGTGTCTTCTACCTACT
R1	TCTACAACAAGGTGCTCAAT
R2	GGAGGACTATTGAACCCA

секвенирования с использованием автоматического секвенатора Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer.

Построение филогенетических дендрограмм и выявление геномных отличий. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей применяли пакет программ DNASTAR v. 3.12 («Lasergen Inc.», США) и программы Bio Edit 7.0.1. В табл. 2 приведены названия штаммов, использованных для сравнения, и их номера доступа в GenBank.

Результаты

Определение спектра наиболее чувствительной линии клеток для получения вакцинного ВБ штамм ERA-CВ 20М

Для определения чувствительности клеток к вакцинному вирусу штамм ERA-CВ 20М провели серию опытов для наработки культурального вирусосодержащего материала. Для решения этой задачи были выбраны 6 линий клеток ВНК-21-13С, ВНК-ф, BSR, ПС, Vero, любезно предоставленных лабораторией культур и тканей ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи». Клеточный монослой отобранных линий клеток заражали ВБ штамм ERA-CВ 20М с активностью не менее $10^{5,0-5,5}$ lg ТЦД₅₀/мл. Титр ВБ в каждой линии клеток определяли по методу Рида и Менча.

Наиболее интенсивная репродукция ВБ штамм ERA-CВ 20М была определена при заражении линии клеток ПС на уровне 3—4-го сбора (пула), и титр вируса состав-

Таблица 2

Штаммы ВБ, используемые для сравнения [11]

Штамм ВБ	Номер доступа
SAD1 variant 1	EF206717
SAD1 variant 2	EF206718
CVS-11	GQ918139
RV-97	EF542830
SAD Bern (Sanafox)	EF206720
SAD Bern (Lysvulpen)	EF206708
SAD B19 (Fuchsoral)	EF206709
SAD P5/88 (Rabifox)	EF206715
ERA	EF206707
SAD Vnukovo isolate 9503TCH	GU992319
4aGV7	JN234414
CTN-1V5	JN234418
PV-2061-2	JN234424

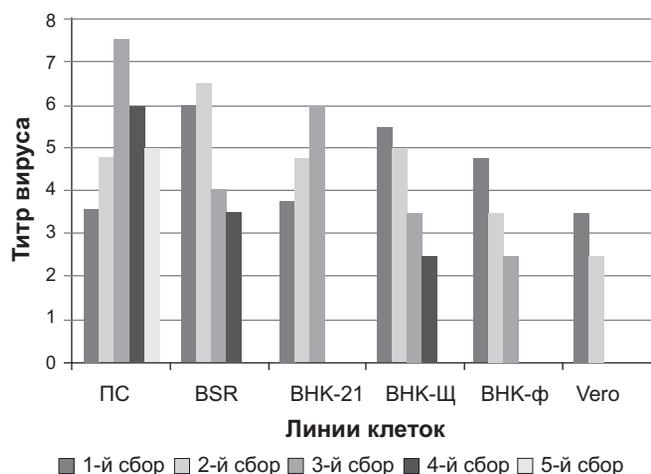


Рис. 1. Зависимость репродукции вакцинного ВБ штамм ERA-CВ 20М от линии клеток.

вил $7,5 \pm 0,15$ lg ТЦД₅₀/мл, а также линии клеток BSR на уровне 1—2-го сбора (пула) (титр вируса $6,5 \pm 0,26$ lg ТЦД₅₀/мл) и третьей линии клеток ВНК-21-13С -на уровне 3-го сбора (пула), где титр вируса составил $6,0 \pm 0,15$ lg ТЦД₅₀/мл (рис. 1).

Исходя из полученных данных был сделан вывод о том, что перевиваемые линии клеток ПС, BSR и ВНК-21-13С являются наиболее чувствительными к ВБ штамм ERA-CВ 20М, в культуральной жидкости которых происходит максимальное накопление вируса.

Количественное определение гликопротеина ВБ

Поскольку G-белок является основным иммуногеном вакцинного ВБ, следующим этапом исследований было количественное определение гликопротеина при культивировании вакцинного ВБ методом ИФА (Институт полиомиелита им. Чумакова, Москва) на следующих линиях клеток: ВНК-О, ВНК-Ф, ВНК-21 BSR, ПС (рис. 2).

Количественный анализ уровня экспрессии G-белка в линиях клеток, заражённых ВБ штамм ERA-CВ 20М, показал, что наиболее высокий уровень гликопротеина наблюдается в следующих клеточных линиях: BSR (в количестве 285 нг/мл, 1-й пассаж, 1-й сбор), затем ВНК-21 (275 нг/мл, 1-й пассаж, 1-й сбор), ВНК-О (270 нг/мл, 1-й пассаж, 1-й сбор).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагментов генома штамма ERA-CВ 20М ВБ

Проведён филогенетический анализ вакцинного ВБ штамм ERA-CВ 20М. Определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов, кодирующих нуклео- и гликопротеин. Полученные данные о первичных последовательностях генома исследуемого штамма сравнивали с данными о первичной последовательности генома штамма Щёлково-51, а также с последовательностями других вакцинных штаммов ВБ из базы данных NCBI.

Было выполнено множественное выравнивание полученных фрагментов генов N и G по наиболее старому из доступных сиквенсов штаммов вируса бешенства – SAD1, зарегистрированному в двух вариантах. Во фрагменте гена, кодирующего N-белок, были обнаружены в основном однонуклеотидные замены (61-я позиция). Также обнаружены двунонуклеотидные и трёхнуклеотидные замены. При этом выявлено всего 11 аминокислот-

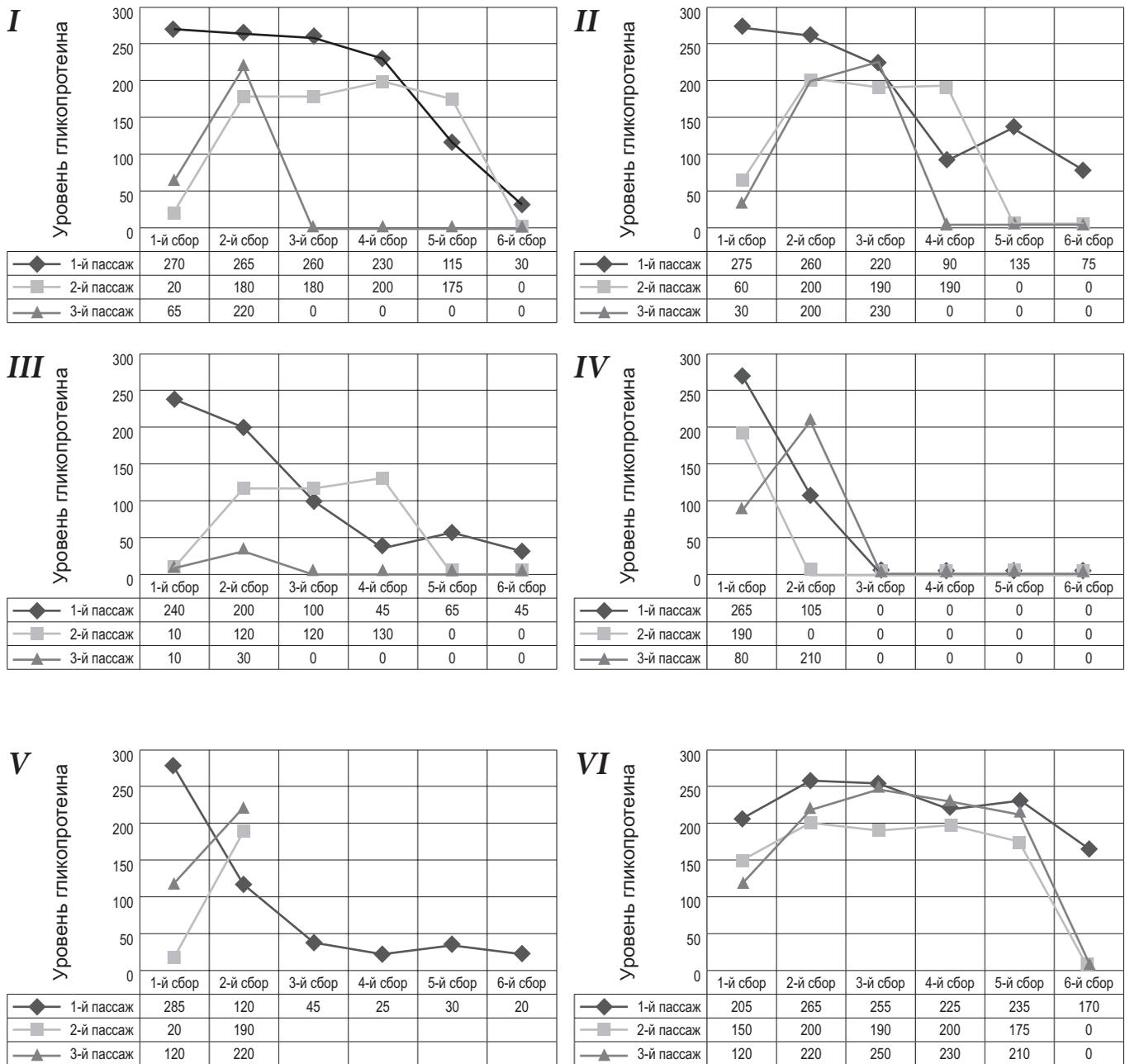


Рис. 2. Зависимость уровня гликопротеина ВВ штамм ERA-CV 20M в культуре клеток от пассажа/сбора (в нг/мл): I – ВНК-О; II – ВНК-21; III – ВНК-ф; IV – BSR; V – ПС.

ных замен (рис. 3). Для исследования был взят фрагмент размером 601 нуклеотид. Сравнение выявило наибольшее количество замен по отношению к SAD1 вариант 1 в штаммах CVS-11, RV-97 и Щёлково.

При сравнении первичной нуклеотидной последовательности гена *G* вышеуказанных штаммов рассматривался участок размером 1572 нуклеотида. Всего было выявлено 250 позиций с нуклеотидными заменами, которые привели к появлению 87 позиций с заменами аминокислот. Как и в случае с участком гена *N*, абсолютное большинство замен в гене *G* (по сравнению с SAD1) содержали штаммы CVS-11 и RV-97. В гене штамма ERA-CV 20M было обнаружено 5 нуклеотидных замен, все

они привели к появлению замен аминокислот (рис. 4).

Выровненные последовательности геномов вакцинных штаммов вируса ВВ были использованы для построения филогенетической дендрограммы с применением программы Mega Align из пакета программного обеспечения Lasergene фирмы DNA-Star (Clustal W Method). Полученные филогенетические дендрограммы представлены на рис. 5 и 6.

Сравнение с референсным штаммом SAD1 выявило 10% нуклеотидных отличий во фрагменте гена *N* и 1 замену в последовательности аминокислот гликопротеина (в позиции 95 аминокислота лейцин вместо валина) и 15% нуклеотидных отличий – во фрагменте гена *G*.

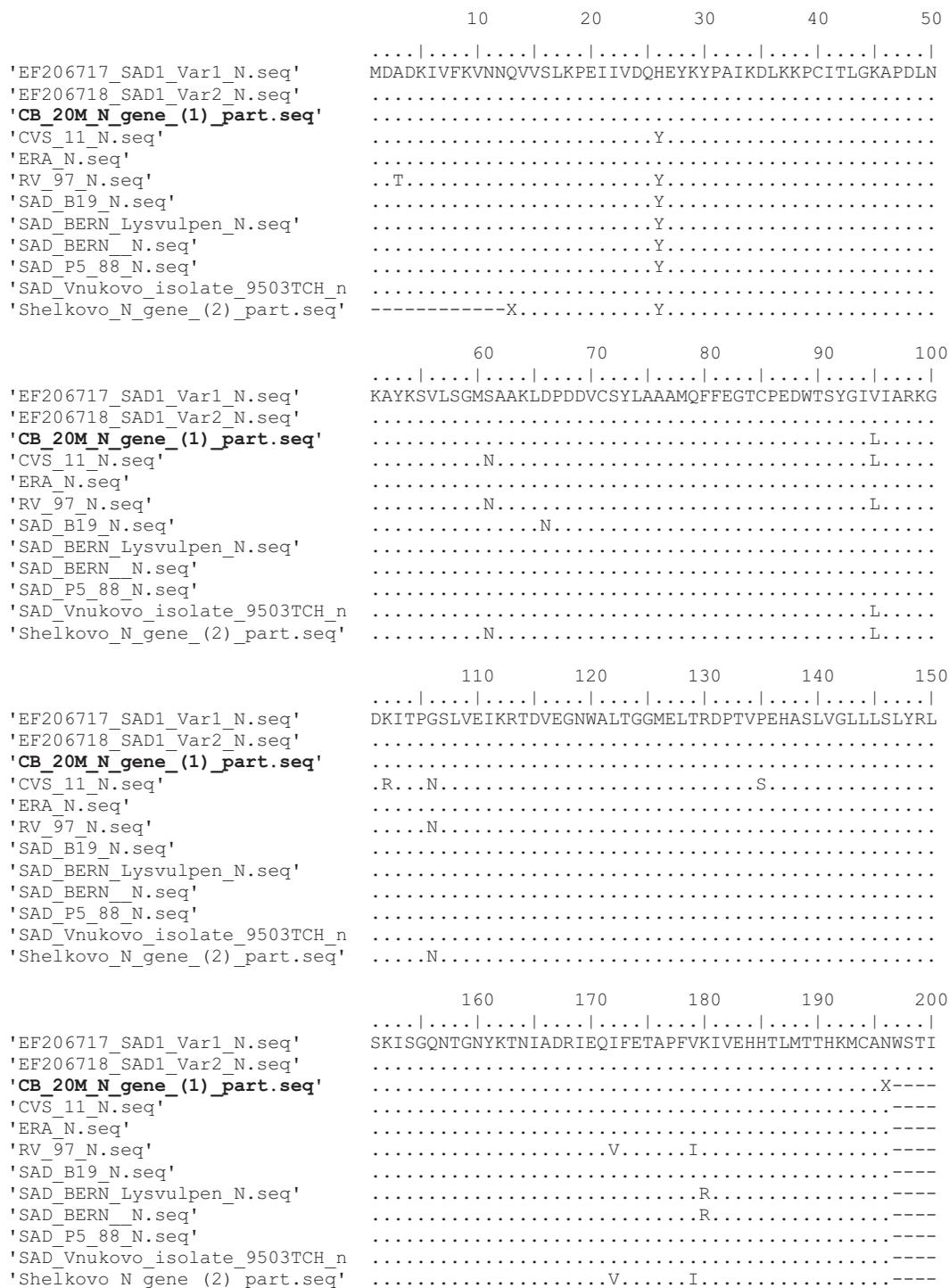


Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей фрагмента белка N штамма ERA-CB 20M с последовательностями референсных штаммов, представленных в NCBI.

Исследуемый участок предсказанных аминокислотных последовательностей гликопротеина содержал 525 аминокислот, при сравнении выявлено 0,95% различий в последовательности аминокислот, 5 замен в позициях 148 (вместо аргинина серин), 169 (вместо аспарагиновой кислоты валин), 215 (вместо метионина лизин), 455 (вместо валина аланин), 502 (вместо лейцина фенилаланин).

Обсуждение

Создание высокоэффективных средств специфической профилактики невозможно без углубленного знания природы возбудителя, включая детальное изучение молекулярной организации генома. На рис. 7 представлены штаммы ВБ, применяемые для изготовления антирабических вакцин.

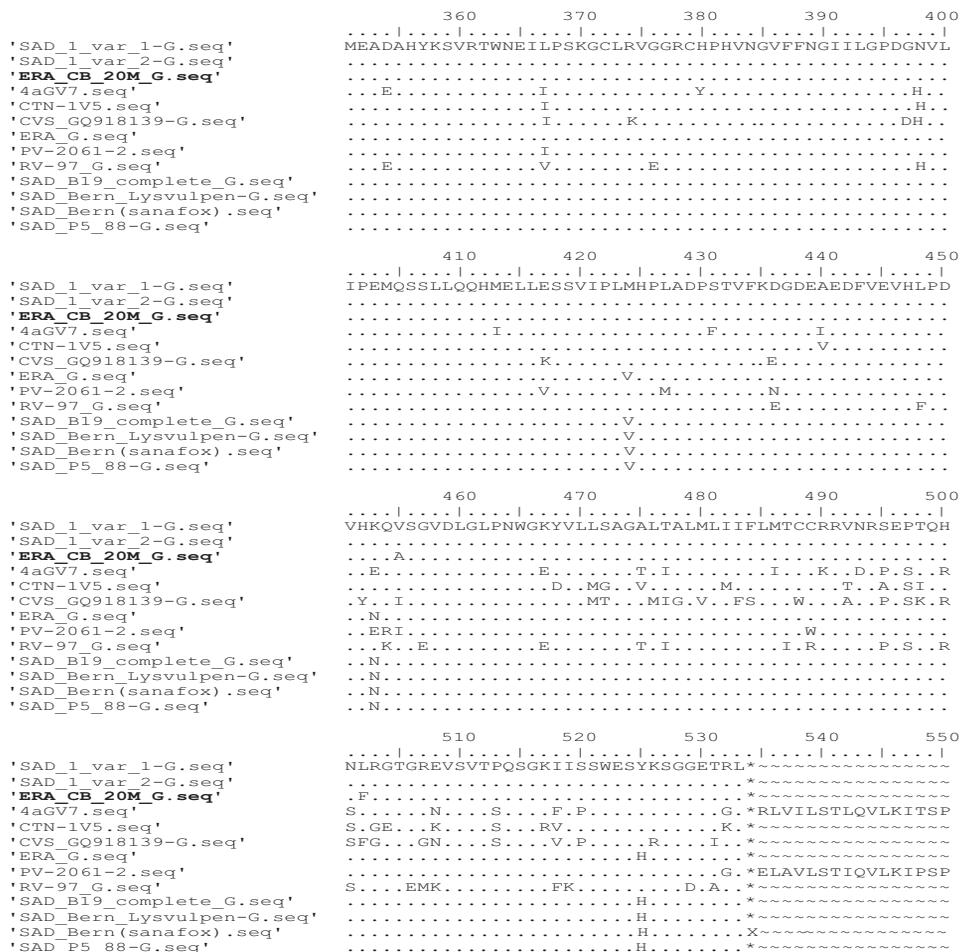


Рис. 4.
Продолжение со стр. 229.

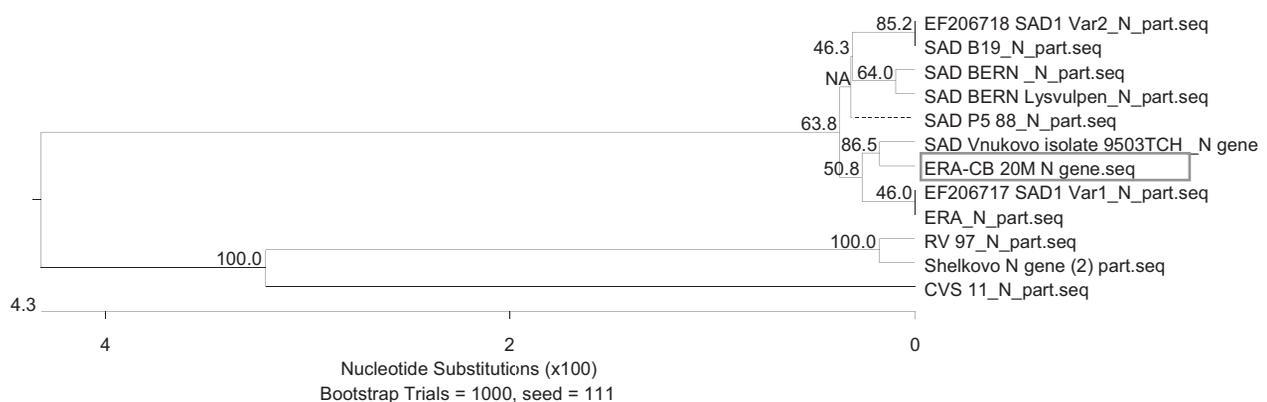


Рис. 5. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе фрагментов гена N вакцинных штаммов ВБ.

С.В. Грибенчей впервые было показано, что популяция штаммов уличного ВБ гетерогенна по составу биологических вариантов, а также установлена возможность выделения биологических вариантов из популяции вируса. Использование нового принципа селекции позволило выделить 16 биологических вариантов, которые прошли

более 20 последовательных пассажей в перевиваемой культуре клеток ВНК-21-13С. Выделенные биологические варианты отличались от родительского вируса штамм ERA более выраженными антигенными свойствами и были обозначены как варианты вируса штамм ERA-CB 20M [7].

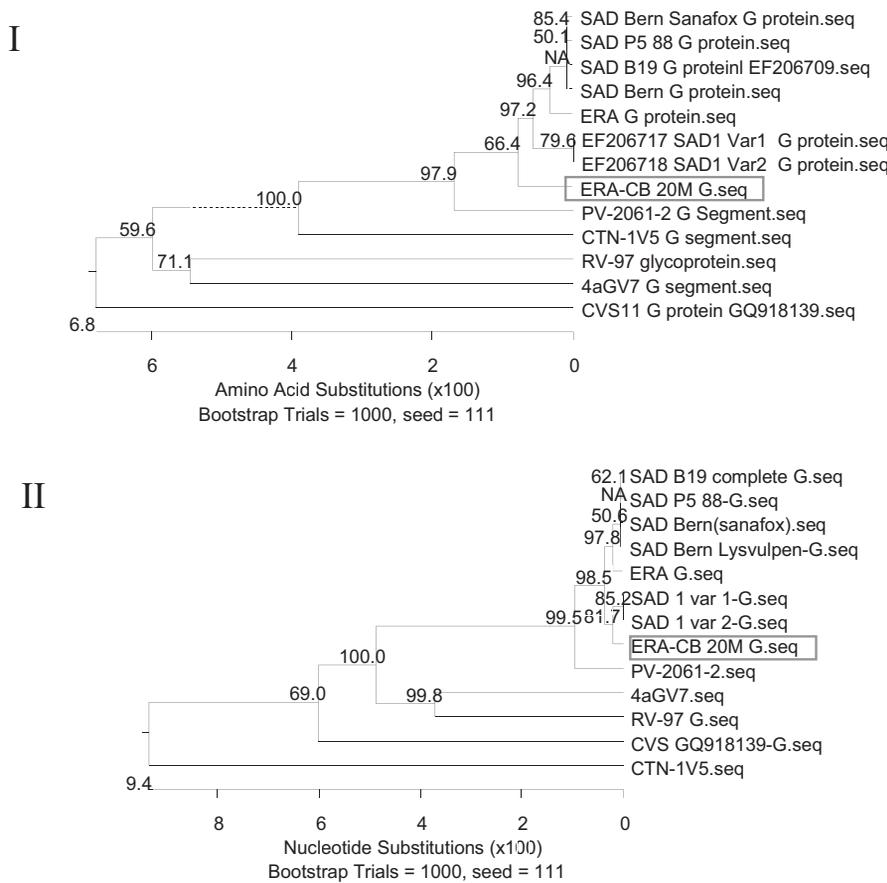


Рис. 6. Филогенетическая дендрограмма вакцинных штаммов ВБ, построенная с использованием аминокислотных последовательностей (I) гликопротеина от начала открытой рамки считывания до позиции 524 (MegAlign v. 7.0., метод Clustal W), и фрагментов гена G (II).

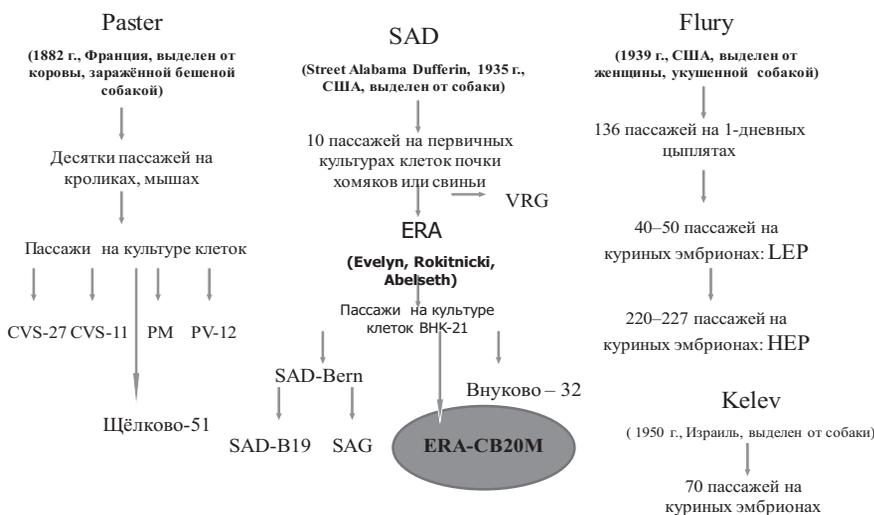


Рис. 7. Штаммы ВБ, применяемые для изготовления антирабических вакцин.

Биологические варианты вируса штамм ERA-CB 20M, как и родительский штамм ERA, размножались без цитопатического действия в перевиваемой культуре клеток ВНК-21-13С и накапливались в головном мозге

молодых мышей в титре до $8,0 \pm 0,5$ Ig LD₅₀/мл [7].
Ранее было установлено, что вакцинный вирус штамм ERA-CB 20M обладает выраженными антигенными свойствами: в опытах на лабораторных, домашних и диких животных индуцирует выработку вируснейтрализующих антител в титрах, значительно превосходящих защитный пороговый уровень антител ($\geq 0,50$ МЕ/мл). Так, у мышей (n = 50) средний титр вируснейтрализующих антител варьирует от 1,50 до 2,87 МЕ/мл; у белых крыс (n = 30) средний титр антител варьирует от 0,87 до 2,1 МЕ/мл; у песцов (n = 30) средний титр антител составил 2,87 МЕ/мл; у кошек (n = 20) средний титр антител составил 6,01 МЕ/мл, у собак (n = 20) – 3,46 МЕ/мл [7, 8, 12].
При изучении патогенности вакцинного вируса штамм ERA-CB 20M установили, что данный штамм является патогенным при интрацеребральном заражении мышей, слабопатогенным при применении периферических методов заражения белых крыс и морских свинок и непатогенным при применении периферических методов заражения кроликов, собак, кошек и песцов [7, 8].
В ходе предыдущих исследований было установлено, что вакцинный штамм ERA-CB 20M является высокоиммуногенным и индуцирует формирование напряжённого (не менее 1,0 МЕ/мл), стабильного антирабического иммунитета при определении методом НИИ (рекомендованного КЭБ ВОЗ) на белых беспородных мышках. Обеспечивает защиту после внутримозгового заражения референт-штаммом CVS-11 (мозговой) в опытах на белых мышках (иммуногенность составляла от 1,50 до 2,2 МЕ/мл) и сохраняет свои иммуногенные свойства на протяжении 12 мес. [7, 8].
К ВБ чувствителен целый ряд перевиваемых культур клеток, например Vero, ПС, ВНК и ее клоны (BSR и другие). Результаты, полученные в ходе экспериментов, говорят о том, что культуры клеток существенно различаются по чувствительности к штамму ВБ ERA-CB 20M. Несмотря на то что линии клеток ВНК-О, ВНК-21 и BSR имеют общий источник происхождения – линию клеток почки золотистого хомячка, они существенно отличаются друг от друга, во-первых, по морфологии и, во-вторых, по выходу вирусного гликопротеина после заражения. Необходимо отметить, что наименьший уровень выхода белка наблюдался при использовании линии клеток Vero. Однако учитывая различия по данному параметру между клонами ВНК, можно допустить суще-

ствование и клонов Vero, более чувствительных к ВБ. В частности, антиген вакцины против бешенства на основе штамма Пастер получают именно на клетках Vero.

Ранее мы предполагали, что накопление вируса и уровень гликопротеина коррелируют между собой. Однако полученные результаты демонстрируют более сложную картину. Поскольку в предыдущих исследованиях была установлена исключительно важная корреляционная связь между уровнем патогенности (или апатогенности) и уровнем экспрессии G-белка на модели уличного бешенства и модели вакцинных штаммов (ERA и ERA-CB 20M) [7, 8], для характеристики накопления вакцинного штамма предлагается использовать именно уровень экспрессии гликопротеина.

Одним из важных этапов изучения свойств штамма ERA-CB 20M был молекулярно-генетический анализ фрагментов его генома в сравнении с другими вакцинными штаммами, используемыми в производстве различных антирабических вакцин. Так, ранее А. Метлин и соавт. [13] исследовали российский вакцинный штамм RV-97. Было установлено, что данный штамм образует отдельную филогенетическую ветвь на дендрограмме, имеет уникальные замены и не ревертирует к полевым изолятам.

Филогенетический анализ фрагментов генов N и G вакцинного ВБ штамм ERA-CB 20M показал, что данный штамм попадает в группу вакцинных штаммов SAD1. Сравнение с референсным штаммом SAD1 показало только 1 аминокислотную замену в последовательности аминокислот нуклеопротеина (в позиции 95 аминокислота лейцин вместо валина) и на участке гликопротеина (525 аминокислот); при сравнении выявлено 0,95% различий. Необходимо отметить, что на заданном участке гена N штамм ERA-CB 20M полностью соответствует штамму SAD Vnukovo isolate 9503TCH. Повидимому, это связано с тем, что штамм Внуково, как и штаммы SAD Bern, SAD B19 и SAG, а также штамм ERA-CB 20M берут своё начало от штамма ERA. Как известно, ген ВБ достаточно консервативен, в особенности в пределах одного генотипа.

Финансирование. Публикация подготовлена при поддержке Программы «5-100».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 9, 10, 13 см. REFERENCES)

1. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
2. Васильев Д.А., Луговцев В. Ю., ред. *Курс лекций по вирусологии. Часть вторая. Вирусы, вызывающие болезни общие для многих видов сельскохозяйственных животных*. Ульяновск; 2004
3. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. Available at: <http://www.fsvps.ru>
4. Всемирная организация здравоохранения. Available at: <http://www.who.int/ru>
5. Гривенча С.В., Лосич М.А., Гривенча Л.Ф., Непоклонова И.В. Новый принцип селекции вакцинного вируса на основе количественного уровня экспрессии G-белка- главного иммуногена вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(2): 44-7.
6. Гривенча С.В., Алипер Т.И., Непоклонова И.В. Происхождение и характеристика вакцинного вируса бешенства штамм ERA-CB-20M. В кн.: *Труды и материалы XII Международного ветеринарного конгресса*. Москва, Измайлово; 2002.
7. Национальный центр биотехнологической информации. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
8. Лосич М.А., Непоклонова И.В., Верховский О.А., Гривенча С.В., Мухин А.Н., Раев С.А. и др. Иммунобиологические свойства новой вакцины РАБИКС. *Ветеринария*. 2011; (12): 17-21.

REFERENCES

1. L'vov D.K., ed. *Guidelines for Virology: Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii: Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
2. International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV. Available at: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
3. Cox J.H., Dietzschold B., Schneider L.G. Rabies Virus Glycoprotein II. Biological and Serological Characterisation. *Infect. Immun.* 1977; 16(3): 754-9.
4. Vasil'ev D.A., Lugovtsev V.Yu., eds. *Course of Lectures on Virology. Part II. The Virus Causes Disease Common to Many Species of Animals [Kurs lektiy po virusologii. Chast' vtoraya. Virusy vyzyvayushchie bolezni obshchie dlya mnogikh vidov sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh]*. Ul'yanovsk; 2004. (in Russian)
5. The Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance. Available at: <http://www.fsvps.ru> (in Russian)
6. World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/>
7. Gribencha S.V., Losich M.A., Gribencha L.F., Nepoklonova I.V. A new principle of vaccine virus selection based on the quantitative expression level of G-protein, the main immunogen of the rabies virus. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(2): 44-7. (in Russian)
8. Gribencha S.V., Aliper T.I., Nepoklonova I.V. Origin and characteristics of vaccine rabies virus strain ERA-CB-20M. In: *Proceedings and Materials of XII Veterinary Congress [Trudy i materialy XII Mezhdunarodnogo veterinarnogo kongressa]*. Moscow, Izmaylovo; 2002. (in Russian)
9. Heaton Pr., Johnstone P., Mcelhinney L.M., Cowley R., O'sullivan E., Whitby J. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(11): 2762-6.
10. PREMIER Biosoft. Available at: <http://www.premierbiosoft.com/>
11. National Center for Biotechnology Information. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (in Russian)
12. Losich M.A., Nepoklonova I.V., Verkhovskiy O.A., Gribencha S.V., Mukhin A.N., Raev S.A. Immunobiological properties of the new vaccine RABIX. *Veterinariya*. 2011; (12): 17-21. (in Russian)
13. Metlin A., Paulin L., Suomalainen S., Neuvonen E., Rybakov S., Mikhailishin V., et al. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res.* 2008; 132(1-2): 242-7.

Поступила 22.12.17

Принята в печать 06.03.18