

Хисматуллина Н.А.<sup>1,3</sup>, Гулюкин А.М.<sup>2,1</sup>, Гулюкин М.И.<sup>2</sup>, Иванов А.В.<sup>1</sup>, Сабирова В.В.<sup>1</sup>, Южасков А.Г.<sup>2</sup>,  
Александрова Н.М.<sup>3,1</sup>, Самерханов И.И.<sup>1</sup>, Алипер Т.И.<sup>4,2</sup>

## Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: прижизненная и постмортальная лабораторная диагностика

<sup>1</sup>ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Минсельхоз России, 420075, г. Казань;

<sup>2</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко, 109428,

г. Москва; <sup>3</sup>Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, г. Казань;

<sup>4</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

Представлены результаты прижизненной и постмортальной лабораторной диагностики двух случаев гидрофобии в Республике Татарстан: пострадавших от укуса волком в 2002 г. и укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии в 2013 г.

При исследовании отпечатков с роговицы глаза пострадавшей от укуса волком по методу флюоресцирующих антител (МФА) положительный результат установлен за 6 сут до смерти больной. Полученные результаты подтверждены постмортально исследованием различных отделов головного мозга и слюнных желез по МФА, методом иммуноферментного анализа (ИФА), световой микроскопией и биопробой.

При исследованиях проб роговицы глаза пострадавшего от укуса бродячей собаки по МФА, слюны по методу ИФА выявлен антиген вируса бешенства, а также в слюне и слезной жидкости - геном вируса бешенства в гнездовой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией за 9 сут до смерти больного. Результаты прижизненной диагностики больного гидрофобией подтверждены постмортально при исследовании различных отделов головного мозга по МФА, методом ИФА и биопробой.

Положительные результаты по прижизненной и постмортальной диагностике подтверждают клинически поставленный диагноз гидрофобии.

Результаты анализа последовательности нуклеотидов фрагмента гена G вируса бешенства размером 238 н.о. указали на незначительное отличие изучаемого изолята (2 rabies) от от RABV AY956319, составляющее 1,68%, отличие от вакцинных штаммов «Внуково-32» на 10,5% и SAD B19 на 10,9%, относящихся к вирусам бешенства 1-го генотипа; значительное отличие от лиссаподобных вирусов 2, 4, 5 и 6-го генотипов, составляющее 21–32,7%. Полученные результаты свидетельствуют о филогенетической близости изучаемого изолята (2 rabies) со штаммом RABV AY956319 вируса бешенства, относящегося к 1-му генотипу.

Ключевые слова: гидрофобия; прижизненная и постмортальная диагностика; метод флюоресцирующих антител; иммуноферментный анализ; полимеразная цепная реакция; секвенирование; филогенетический анализ.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(2): 18–24.

Khismatullina N.A.<sup>1,3</sup>, Gulyukin A.M.<sup>2,1</sup>, Gulyukin M.I.<sup>2</sup>, Ivanov A.V.<sup>1</sup>, Sabirova V.V.<sup>1</sup>, Yuzhakov A.G.<sup>2</sup>,  
Alexandrova N.M.<sup>3,1</sup>, Samerkhanov I.I.<sup>1</sup>, Aliper T.I.<sup>4</sup>

### Two cases of hydrophobia in the Republic of Tatarstan: *in vivo* and *postmortem* laboratory diagnosis

<sup>1</sup>Federal Centre for Toxicological, Radiation and Biological Safety, 420075, Kazan, Russia; <sup>2</sup>All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, 109428, Moscow, Russia; <sup>3</sup>Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, 420008, Kazan, Russia; <sup>4</sup>The D.I. Ivanovsky Institute of Virology Federal State Budgetary Institution "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

The results of rabies *in vivo* and *postmortem* laboratory detection in two cases registered in the Republic of Tatarstan are reported: a victim bitten by a wolf in 2002 and another one bitten by a stray dog on Goa Island, India, in 2013. In the patient bitten by a wolf cornea imprints studies using the method of fluorescent antibodies (MFA) showed rabies-positive result 6 days before the patient's death.

The results were confirmed by *postmortem* examination of different parts of the brain and salivary glands using the MFA, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), optical microscopy, and bioassay methods.

In the patient bitten by a stray dog the rabies virus specific antigen was detected by eye cornea studies using the MFA method and saliva studies using the ELISA. The rabies virus genome was also isolated from saliva and tear fluid using nested reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 9 days before the patient's death. The *in vivo* studies results were consistent with the *postmortem* study of different parts of the brain using the MFA, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), optical microscopy, and bioassay methods.

All the infection-positive results of both *in vivo* and *postmortem* studies were consistent with the clinical studies, i.e. rabies diagnosis was confirmed.

The analysis of the rabies virus gene G fragment nucleotide sequence of 238 nd length showed a slight difference between the studied isolates (2 rabies) and the RABV AY956319 (1.68%), difference by 10.5% from the Vnukovo-32 vaccine strains and by 10.9 % from the SAD B19 rabies strain, respectively (rabies viruses of 1st genotype). It was also significantly different from the lissaviruses of 2, 4, 5, and 6 genotypes (21.0-32.7%). The obtained results indicate phylogenetic closeness of the studied isolates (2 rabies) with the RABV AY956319 rabies virus strain belonging to the 1st genotype.

Key words: hydrophobia; *in vivo* and *postmortem* diagnosis; fluorescent antibody method; enzyme-linked immunosorbent assay; polymerase chain reaction; sequencing; phylogenetic analysis.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60 (2): 18–24. (In Russ.)

For correspondence: Nailya Khismatullina, Sc.D, Prof.; e-mail: nailaanvar@gmail.com

## Введение

Ситуация по уровню заболеваемости бешенством в России характеризуется как крайне неблагоприятная [1-3]. За последние 20 лет в России регистрируется самая высокая смертность среди развитых стран [4]. За 2008–2011 гг. зарегистрирован 61 случай гидрофобии [5]. Ежегодно в стране антирабическую помощь получают от 250 до 450 тыс. человек.

В Республике Татарстан (РТ) эпизоотическая обстановка по бешенству остается напряженной [6]. По данным Управления Роспотребнадзора по РТ, в РТ за последние 15 лет за медицинской помощью из числа пострадавших в разные годы обратились 11 990–16 065 человек, а показатель на 100 тысяч населения – 319,4–424,5. По данным Управления Роспотребнадзора по РТ только за 4 мес текущего года за медицинской помощью обратились около 4 тыс. татарстанцев, пострадавших от укусов различных животных, из них 45% подверглись нападению безнадзорных собак [7].

С 1951 по 2013 г. в РТ зарегистрированы 48 человек, больных гидрофобией. При анализе случаев гидрофобии в РТ установили, что основными причинами заболеваний людей гидрофобией, укушенных бешеными животными, являются несвоевременное обращение пострадавших за медицинской помощью, нарушение схемы иммунизации, отказ от назначенного курса вакцинации, нарушение режима труда и отдыха в период проведения антирабических прививок.

В 2002 г. в РТ зарегистрирован случай гидрофобии.

Б о л ь н а я Б., 49 лет, поступила в Казанскую инфекционную больницу (КИБ) № 1 из Центральной районной больницы (ЦРБ) Муслумовского района РТ с предположительным диагнозом гидрофобии. В с. Тархан волк был застрелен, материал от трупа волка был направлен на ветэкспертизу, которая дала положительный результат на бешенство.

В 2013 г. в Зеленодольском районе РТ зарегистрирован случай гидрофобии. Б о л ь н о й Г. поступил в Республиканскую клиническую инфекционную больницу 26.12.2013 на 9-е сутки болезни с признаками гидрофобии. Находясь в Индии на о. Гоа, был укушен бездомной собакой в правую голень 25.10.2013, за антирабической помощью не обратился.

Как известно, предварительный диагноз ставят с учетом эпидемиологических и клинических показателей, окончательный диагноз – на основании данных лабораторных исследований [5]. Лабораторную диагностику бешенства в основном проводят постмортально. В зарубежной и отечественной литературе имеются сообщения о применении метода флюоресцирующих антител (МФА) для прижизненной диагностики бешенства при исследовании отпечатков роговицы глаз у экспериментально зараженных животных [8, 9], а также у больных гидрофобией [10, 11]. Имеются сообщения о применении МФА на основе моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства [12, 13], что повышает результативность МФА.

Прижизненная диагностика бешенства включает исследование отпечатков роговицы, биоптатов кожи, мозга, выделение вируса из слюны, слезной и спинномозговой жидкости путем интрацеребрального заражения новорожденных мышей.

По данным многих авторов, прижизненная диагностика гидрофобии необходима для дифференциации от схожих с клиникой заболеваний: столбняка, белой горячки, отравления атропином, стрихнином, истерии. Бульбарные формы бешенства дифференцируют от ботулизма, полиомиелита, летаргического энцефалита, а паралитические от полиомиелита и инфекционного полиневрита.

Научно-практический интерес представляют также исследования генома изолятов вируса бешенства методом полимеразно-цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с последующим секвенированием продуктов ОТ-ПЦР, что позволяет выявлять межштамбовые различия и проводить дифференциацию эпизоотических изолятов вируса бешенства с вакцинными штаммами рабического вируса [14].

**Цель исследований** – провести анализ прижизненной и постмортальной лабораторной диагностики двух случаев гидрофобии в РТ: пострадавших от укуса волком в 2002 г. и укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии в 2013 г., а также филогенетический анализ фрагмента гена, который кодирует гликопротеин вируса, выделенного из мозга пострадавшего Г. от укуса бродячей собаки в сравнении с вирусами 1, 2, 4, 5 и 6-го генотипов.

## Материалы и методы

В работе использовали слюну, слезную жидкость, отпечатки с роговицы пострадавших Б. и Г. от укусов волка и бродячей собаки, а также различные отделы головного мозга и слюнные железы умерших от гидрофобии. Исследовали также сыворотки крови людей, пострадавших от укусов животных. Лабораторные исследования проводили прямым МФА по ГОСТу 26075-84 с использованием «Флюоресцирующего антирабического глобулина» ТУ 9388-027-00492374-2007, а также сэндвич-вариантом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием «Набора препаратов для диагностики бешенства методом ИФА» ТУ 9388-025-00492374-2007, разработанных в ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Казань) и утвержденных Россельхознадзором 3.03.2008. Применяли также световую микроскопию (окраска по Селлерсу), непрямой вариант ИФА с использованием кроличьих иммуноглобулинов против глобулинов человека, меченных пероксидазой, производства ИЭМ им. Гамалеи РАМН (Москва), и гнездовую ОТ-ПЦР. ОТ-ПЦР проводили с помощью Thermo Scientific Maxima Reverse (Ferments). В работе использовали маркер молекулярного веса 100-3000 пар оснований (Ferments).

Нуклеотидную последовательность полученных ампликонов определяли с применением праймеров, которые использовали в ОТ-ПЦР, и набора BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США). Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакетов программ BioEdit (version 7.0.0. Copyright © 1997–2004) и программы SeqMan из пакета программ Lasergene (version 7.1.0. (44) Copyright © 1993–2006).

Выравнивание последовательностей выполняли, используя алгоритм neighbor joining (NJ).

Для сравнительного анализа использовали нуклеотидные последовательности гена *G* штаммов вируса бешенства 1, 2, 4, 5 и 6-го генотипов из базы данных GenBank: 1-й генотип – RABVAY956319 (RABV), выделенный из слюны реципиента, получившего донорский орган, импортированный из Индии (Pfeffer S., Panning M., Drosten C. Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine. 2005), SADB19; 2-й генотип 0406SEN; 4-й генотип 86132SA, 94286SA; 5-й генотип 03002FRA, 8918FRA, RV9-1; 6-й генотип 9018HOL, RV1333 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

## Результаты и обсуждение

Жительница поселка «Русский Шуган» Муслумовского района РТ в 4 ч утра по пути на ферму подверглась нападению бешеным волком в момент, когда она услышала шаги и обернулась лицом к животному. Укушенная бешеным волком, в тяжелом состоянии по по-



Рис. 1. Прижизненное обнаружение антигена вируса бешенства в роговице пациентки Б. методом флюоресцирующих антител.

Объектив 100, гомаль 1,7.

воду нанесенных волком множественных рваных ран в волосистой части головы, подбородочной области, кистей рук, нижних конечностей и обильного кровотечения обратилась в ЦРБ Муслумовского района, откуда поступила в КИБ с предположительным диагнозом гидрофобии.

В день поступления больной Б. в КИБ произвели забор материала на следующие исследования: крови в объеме 5 мл из вены – на содержание антител к вирусу бешенства, отпечатков с роговицы глаза и слюны – на обнаружение антигена вируса бешенства.

В результате лабораторных исследований, проведенных прямым МФА отпечатков с роговицы глаза пострадавшей, в нескольких полях зрения обнаружили специфический антиген вируса бешенства в виде типичных отчетливо выраженных ярких желто-зеленых гранул разной формы и величины с интенсивностью свечения в три креста (рис. 1).

В контрольных препаратах подобных образований не отметили.

Активность сыворотки крови больной Б. составила в непрямом ИФА 1:10 ( $K_{cn} = 2,3$ ). Низкое содержание специфических к вирусу бешенства антител в сыворотке крови пострадавшей в период разгара болезни (за 6 дней до смерти) связано, по-видимому, с образованием комплексов антител с вирусом, циркулирующим в организме пострадавшей, что еще более снизило определяемый уровень антирабических антител, вырабатываемых на комбинированное введение антирабического иммуноглобулина и вакцины.

Постмортальный анализ различных отделов головного мозга прямым МФА дал положительный результат по обнаружению специфического антигена вируса бешенства, оцениваемый в крестах: в аммоновом роге – множество специфических комплексов-включений (+++); коре больших полушарий, мозжечке и продолговатом мозге – единичное количество ярко светящихся комплексов-включений (+++).

Методом ИФА в суспензиях различных отделов головного мозга и слюнных железах обнаружили специфический антиген вируса бешенства в титрах: в аммоновом роге – 1:160,  $K_{cn} = 2,2$ ; продолговатом

мозге – 1:80,  $K_{cn} = 2,2$ ; мозжечке – 1:80,  $K_{cn} = 2,2$ ; коре больших полушарий – 1:40,  $K_{cn} = 3,1$ ; слюнных железах – 1:20,  $K_{cn} = 2,1$ .

Световой микроскопией на отпечатках с аммонова рога, продолговатого мозга, мозжечка и коры больших полушарий обнаружили тельца Бабеша–Негри, являющиеся патогномоничными для бешенства (рис. 2).

В цитоплазме гибнущих немногочисленных нейронов обнаружили единичные или по 2–3 образования телец Бабеша–Негри округлой или овальной формы, разного размера.

Для постановки биопробы использовали белых мышей-сосунков по ГОСТу 26075-84. Интрацеребральное заражение белых мышей суспензиями мозга и слюнных желез дало положительный результат на 14–17-е сутки после заражения с характерными клиническими признаками (взъерошенность шерсти, горбатость спины, паралич и др.). Результаты биопробы подтверждены положительными результатами по МФА отпечатков мозга белых мышей.

Необходимо отметить, что пострадавшая получила в первые 48 ч комбинированное введение антирабического иммуноглобулина и антирабической вакцины. Однако у нее остро развилась развернутая клиника гидрофобии с прогрессированием основных психоневрологических симптомов в течение 7 сут. Гидрофобия и аэрофобия носили умеренный характер, доминировали психические расстройства и быстрое развитие парезов конечностей. Инкубационный период составил 26 сут. Гидрофобия у данной больной установлена клинически и подтверждена результатами лабораторных исследований при жизни и постмортально [11]. По данным А.А. Мовсесянца и Т.А. Бектимирова (2002), одной из причин заболевания и смерти людей от гидрофобии являются случаи позднего обращения пострадавших [15].

Таким образом, проведенными лабораторными исследованиями по МФА, ИФА и световой микроскопией, а также биопробой на белых мышах получены положительные результаты по обнаружению специфического антигена вируса бешенства и в отпечатках с роговицы глаза пострадавшей, а также в различных отделах головного мозга и слюнных желез. Полученные результаты подтверждают клинически поставленный диагноз гидрофобии. При этом иммунофлюоресцентное исследование отпечатков с роговицы глаза пострадавшей показало положительный результат за 6 сут до смерти больной.

В тот же день, когда была покусана бешеным волком

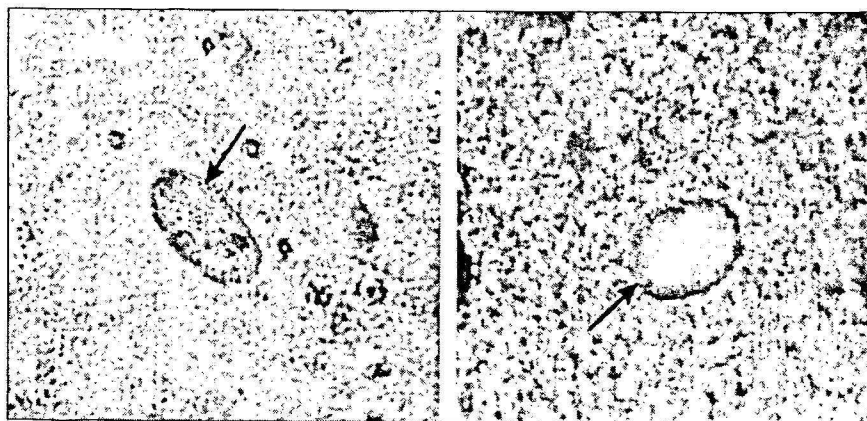


Рис. 2. Уличное бешенство, мозг человека. Включение в цитоплазме дегенерированного нейрона – типичное тельце Бабеша–Негри с базофильной внутренней зернистостью.

Окраска по Селлерсу. Ув. 2400.

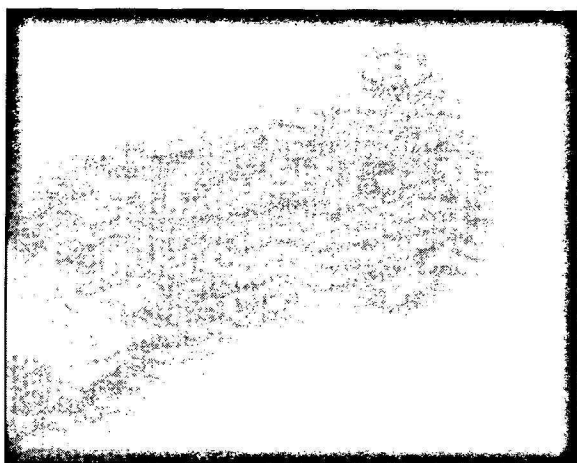


Рис. 3. Прижизненное обнаружение антигена вируса бешенства в роговице пациента Г. методом флюоресцирующих антител.

Объектив 100, гомаль 1,7.

больная Б., поступили сообщения из Азнакаевского района, что в трех селах (Боланлы Буляк, Масыгутово, Тархан), граничащих с Муслимовским районом, бешеный волк покусал еще 8 человек и 8 человек имели ослонения при контакте с данным животным. Таким образом, число пострадавших составило 16. Всем им был назначен лечебно-профилактический курс антирабической прививок с использованием культуральной антирабической вакцины из штамма «Внуково-32» (производство ИПВЭ им. М.П.Чумакова РАМН, Москва). По истечении полного курса лечебно-профилактических прививок 12 сывороток крови от пострадавших были исследованы на определение уровня специфических антител методом ИФА и в реакции нейтрализации (РН).

Сыворотки крови были титрованы в РН на белых мышцах с использованием стандартного вируса бешенства, штамм CVS, взятого в концентрации от 15 до 500 LD<sub>50</sub>/0,03 мл.

Установили прямую корреляцию результатов ИФА и РН ( $r = 0,9$ ;  $p < 0,05$ ). При этом по чувствительности и скорости получения результатов ИФА (6–7 ч) превосходит РН на мышцах (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 защите пострадавших от бешенства. О перспективности

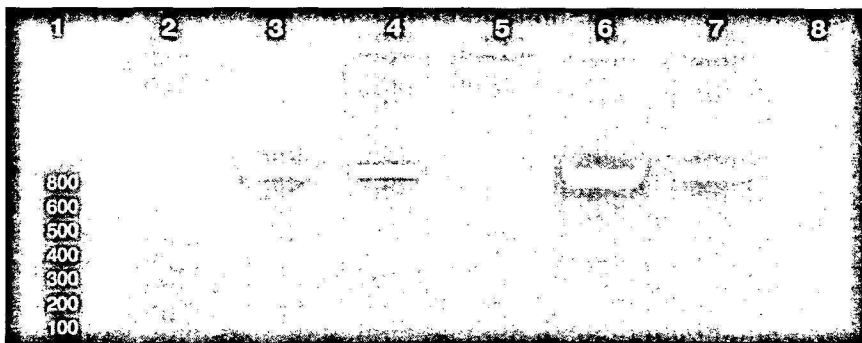


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов первичной амплификации (фрагмент 755 п.н.).

1 – маркер молекулярного веса 100–1000 пар оснований (Fragments); 2 – слезная жидкость здорового человека; 3 – слезная жидкость больного Г. с клиническими проявлениями гидрофобии; 4 – вирус бешенства, производственный штамм «Овечий» ГНКИ; 5 – слюна здорового человека; 6 – стандартный вирус бешенства CVS; 7 – слюна больного Г. с клиническими проявлениями гидрофобии; 8 – отрицательный контрольный образец.

применения метода ИФА для контроля эффективности вакцинопрофилактики бешенства людей и животных указывают многие отечественные и зарубежные авторы [16–21].

Таким образом, гидрофобия у больной Б., укушенной волком, подтверждена результатами лабораторных исследований: обнаружением специфического антигена вируса бешенства в отпечатках с роговицы глаза пострадавшей по МФА за 6 сут до ее смерти и постмортально в различных отделах головного мозга и слонных железах по МФА, ИФА и световой микроскопией, а также выделением возбудителя болезни биопробой на белых мышцах. Заболевание и смерть от гидрофобии больной Б. стали следствием множественных, глубоких укусов опасной локализации (голова, лицо, шея, кисть руки), нанесенных бешеным волком.

В 2013 г. в Зеленодольском районе РТ зарегистрирован случай гидрофобии. Больной Г. поступил в Республиканскую клиническую инфекционную больницу 26.12.2013 на 9-е сутки болезни с признаками гидрофобии: нарушением поведения, возбуждением, чувством беспокойства, затрудненным дыханием. Находясь в Индии на о. Гоа, был укушен бездомной собакой в правую голень 25.10.2013, за антирабической помощью не обратился.

27.12.2013 провели лабораторные исследования проб, взятых от больного Г., на наличие антигена вируса бешенства прямым МФА по ГОСТу 26075-84, а также сэндвич-вариантом ИФА с использованием диагностических наборов препаратов, разработанных в ФГБУ «ФЦТРБ – ВНИВИ» (Казань), а также гнездовой ОТ-ПЦР.

В результате исследований прямым МФА отпечатков с роговицы глаза пострадавшего в нескольких полях зрения обнаружили специфический антиген вируса бешенства в виде типичных, отчетливо выраженных ярких желто-зеленых гранул разной формы и величины с интенсивностью свечения в три креста (рис. 3).

В контрольных препаратах подобных образований не обнаружили. При исследовании пробы слюны больного Г. методом ИФА выявили антиген вируса бешенства с титром 1:16,  $K_{ст} = 2,2$ . Методом гнездовой ОТ-ПЦР в пробах слюны и слезы пациента Г. определили геном вируса бешенства (рис. 4, 5).

Таким образом, лабораторными методами прижизненно был поставлен диагноз гидрофобии.

04.01.2014 больной Г. в коме скончался. Инкубационный период у заболевшего составил 55 дней. Смерть больного наступила на 18-е сутки болезни.

Постмортальный анализ различных отделов головного мозга (аммонов рог, продолговатый мозг, мозжечок и кора больших полушарий) прямым МФА дал положительный результат по обнаружению специфического антигена вируса бешенства, оцениваемый в три креста (рис. 6).

Таким образом, проведенными лабораторными исследованиями по МФА, ИФА и гнездовой ОТ-ПЦР, а также биопробой на белых мышцах получены положительные результаты по обнаружению специфического, антигена вируса бешенства в отпечатках с роговицы глаза пострадавшего, а также различных отделах головного мозга. При этом исследованиями отпечатков с роговицы глаза больного Г. по МФА, слюны по

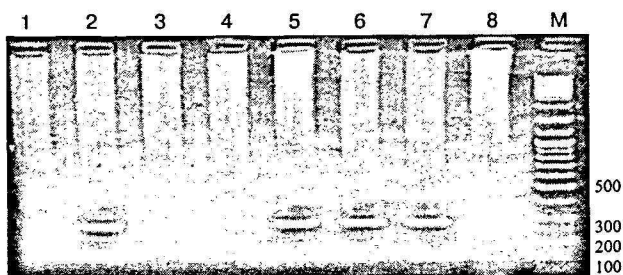


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов второго этапа амплификации (фрагмент 259 п.н.).

1 – отрицательный контрольный образец; 2 – слезная жидкость больного Г. с клиническими проявлениями гидрофобии; 3 – слезная жидкость здорового человека; 4 – слюна здорового человека; 5 – вирус бешенства, производственный штамм «Овечий» ГНКИ; 6 – стандартный вирус бешенства CVS; 7 – слюна больного Г. с клиническими проявлениями гидрофобии; 8 – слюна здорового человека; М – маркер молекулярного веса 100–3000 пар оснований (Ferments)

ИФА, а также слюны и слезы методом ОТ-ПЦР положительный диагноз поставлен за 9 сут до смерти пострадавшего. Полученные результаты подтверждают клинически поставленный диагноз гидрофобии.

Необходимо отметить, что второй случай гидрофобии, зарегистрированный в РТ, являлся завозным. Заражение человека произошло в Индии на о. Гоа.

Смерть пострадавшего Г. от укуса бездомной собаки была следствием необращения больного за антирабической помощью. В связи с этим необходимо усилить работу по пропаганде населения об опасности гидрофобии и профилактике этого заболевания. Как известно из практики рабиологи, своевременно начатые и правильно проведенные прививки практически гарантируют то, что даже укушенный явно бешеным животным не заболит бешенством [22].

Возникновению случаев гидрофобии способствуют объективные (неправильная или несвоевременная обработка укушенной раны, несообщение медицинским работником о случае укуса в органы Госсанэпиднадзора, неназначение лечения, дефекты в назначении, неправильное хранение и транспортировка антирабических препаратов и т. п.) и субъективные (скрытие укусов животными, несвоевременное обращение за медицинской помощью, отказы от антирабического лечения, нарушение режима труда и отдыха в процессе вакцинации и т. п.) факторы [23].

По данным Роспотребнадзора, только за 2007–2011 гг.

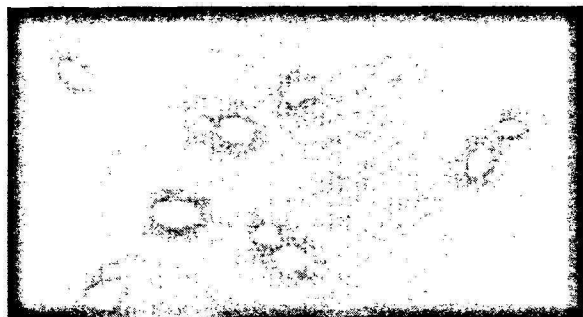


Рис. 6. Постморальное обнаружение антигена вируса бешенства в отпечатке головного мозга у пациента Г. методом флуоресцирующих антител.

Объектив 100, гомаль 1,7.

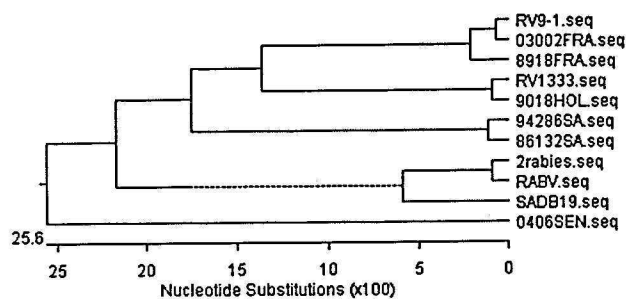


Рис. 7. Филогенетическое древо, полученное методами NJ и ML для изолята (2 rabies), который выделен от человека, укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии, и штаммов генотипов: 1-й генотип – RABV, SADB19, 2-й генотип – 0406SEN, 4-й генотип – 86132SA, 94286SA, 5-й генотип – 03002FRA, 8918FRA, RV9-1; 6-й генотип – 9018HOL, RV1333.

в стране зарегистрировано 64 случая гидрофобии, среди которых 74% людей погибли из-за необращения за медицинской помощью, 14% самовольно прекратили лечение или нарушили схему вакцинации, 4% погибли по вине медицинских работников, в 6% смерть наступила на фоне правильно назначенного лечения, в 2% лечение оказалось неэффективным. Факты необращения людей за антирабической помощью даже при опасной локализации укусов свидетельствуют о снижении уровня санпросветработы с населением.

Если виной объективных факторов являются медицинские работники, и их устранение должно решаться путем подготовки и контроля работы лечебно-профилактических учреждений со стороны Госсанэпиднадзора, то субъективные могут быть устранены только при наличии санитарной грамотности всего населения, и в первую очередь потенциально уязвимых контингентов. Санитарной пропагандой вопросов профилактики бешенства должны заниматься все медицинские работники как в очагах бешенства, так и при их отсутствии, поскольку вне зависимости от бешенства укусы людей животными отмечаются всегда [23].

Международным таксономическим комитетом вирус бешенства отнесен к семейству *Rabdoviridae*, рода *Lyssavirus*. Род *Lissavirus* включает вирус бешенства и подобные вирусу бешенства (лиссаподобные) вирусы. На основе различий гликопротеидного компонента, выявляемых в РН, а также современными исследованиями, в группе вируса бешенства выделяют 12 генотипов [24]. 1-й генотип представлен абсолютным большинством уличных и фиксированных штаммов вируса бешенства из разных частей света (rabies virus), в том числе классическим стандартным – CVS. 2–7-й генотипы включают лиссаподобные rabies-related (non-rabies) вирусы: Lagos bat virus (2-й генотип), Mokola virus (3-й генотип), Davenhage virus (4-й генотип), European bat lyssavirus 1 (EBLV1) и 2 (EBLV2) (5-й и 6-й генотипы соответственно) и Australian bat lyssavirus (ABLV-pb и ABLV-ib) (7-й генотип). К последующим генотипам отнесли следующие вирусы: Aravan Virus – Kyrgystan (ARAV-KG); Irkut virus – Russia (IRKV-RU); Khujand virus – Tajikistan (KHUV-T); West Caucasian bat virus – Russia (WCBV-RU) и Shimoni bat virus (SHIBV).

В антигенном отношении представители различных генотипов имеют отличия. При классическом бешенстве выделяют штаммы усиленные, ослабленные, географические варианты и др. [25].

В ходе исследований фрагмента гена G вируса бешенства, выделенного от человека Г. методом neighbor joining (NJ) и maximum likelihood (ML) программы MegAlign

CTCGGACGAGATCGAACATCTTGTGGAGGAGTTGGTCAAGAAAAGAGAGGAGTGT  
CTGGATGCACTGGAGTCCATCATGACCACCAAGTCGGTGGAGTTTCAGACGTCTCAGCC  
ACTTGAGAAAACCTGTCCCTGGGTTCCGAAAAGGCATACACCATATTCAACAAAACCTT  
GATGGAAGCAGATGCCATTACAAGTCAGTCCGAACCTGGAATGAGATCATCCCCTCC  
AAAGGG

Рис. 8. Нуклеотидная последовательность фрагмента гена G вируса бешенства размером 238 н.о. изолята, выделенного от человека, укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии.

из пакета программ Lasergene (version 7.1.0.(44) Copyright © 1993-2006), построена филогенетическая дендрограмма (рис. 7). Ген G изучаемого изолята (2 rabies) сравнивали со штаммами различных генотипов, взятых из базы данных GenBank: 1-й генотип – RABV, SAD B19; 2-й генотип 0406SEN; 4-й генотип 86132SA, 94286SA; 5-й генотип 03002FRA, 8918FRA, RV9-1; 6-й генотип 9018HOL, RV1333 (рис. 8).

Для выявления нуклеотидных замен использовали данные NCBI и программы BioEdit. При сравнении нуклеотидных последовательностей образца на заданном участке гена гликопротеина (G) размером 238 н.о. и вируса бешенства 1-го генотипа, RABV AY956319, установили четыре нуклеотидные замены, что соответствует 1,68% отличий.

При сравнении фрагмента гена изучаемого образца и вакцинного штамма SAD B19 выявили 26 нуклеотидных замен, что соответствует 10,9% отличий. Штамм SAD B19 используют при производстве антирабической вакцины «Фуксорал» для оральной иммунизации животных против бешенства.

При сравнении исследуемого образца со штаммом «Внуково-32» обнаружили 25 нуклеотидных замен, что соответствует 10,5% отличий. Штамм «Внуково-32» вируса бешенства используют при производстве антирабической вакцины «Рабивак» для иммунизации человека.

Кроме того, две замены нуклеотидов в позиции 890 (гуанина на аденин) и 1072 (цитозина на аденин) исследуемого образца в сравнении с вакцинными штаммами привели к двум заменам аминокислот: аргинина на лизин и лейцина на изолейцин соответственно. Те же замены наблюдали и в нуклеотидной последовательности штамма RABV AY956319 вируса бешенства, что свидетельствует о филогенетической близости изолята вируса бешенства, который выделен от человека, укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии с указанным штаммом.

Мы также установили, что нуклеотидная последовательность изучаемого изолята отличается на 32,7% от изолята 0406SEN лиссаподобного вируса, относящегося ко 2-му генотипу *Lagos bat*. При сравнении нуклеотидных последовательностей исследуемого образца и изолятов 94286SA и 86132SA лиссаподобных вирусов 4-го генотипа *Duvenhage* выявили примерно 27,7% отличий.

Исследуемый изолят по нуклеотидной последовательности от изолятов 03002FRA, RV 9-1 и 8918FRA летучих мышей лиссаподобных вирусов 5-го генотипа (*EBLV 1*) отличается на 21–21,8%, от изолятов RV1333 и 9018HOL летучих мышей лиссаподобных вирусов 6-го генотипа (*EBLV 2*) – примерно на 23,5%.

Таким образом, в результате анализа последовательности нуклеотидов фрагмента гена G вируса бешенства размером 238 н.о. установили незначительное отличие изучаемого изолята (2 rabies) от RABV AY956319, составляющее 1,68%; отличие от вакцинных штаммов «Внуково-32» на 10,5% и SAD B19 на 10,9%, они относятся к вирусам бешенства 1-го генотипа; значительное отличие от лиссаподобных вирусов 2, 4, 5 и 6-го геноти-

пов, составляющее 21–32,7%. Полученные результаты свидетельствуют о филогенетической близости изучаемого изолята (2 rabies) с штаммом RABV AY956319 вируса бешенства, относящегося к 1-му генотипу.

На предложенный набор синтетических олигонуклеотидных праймеров для выявления РНК вируса бешенства и способ выявления РНК вируса бешенства с помощью синтетических олигонуклеотидных прай-

меров в ОТ-ПЦР подана заявка на патентование изобретений в ФГБУ ФИПС [26].

## Выводы

1. Гидрофобия у больной Б., укушенной волком, установлена при жизни пострадавшей: обнаружением специфического антигена вируса бешенства в отпечатках с роговицы глаза по МФА за 6 сут до ее смерти и подтверждена постмортально: в различных отделах головного мозга и слюнных железах выявлен рабический антиген по МФА, ИФА и световой микроскопией, а также выделением возбудителя болезни биопробой на белых мышцах.

2. Инкубационный период у заболевшей Б. составил 27 дней. Смерть больной наступила на 7-е сутки болезни. Заболевание и смерть от гидрофобии больной Б. стали следствием множественных, глубоких укусов опасной локализации (голова, лицо, шея, кисть руки), нанесенных бешеным волком.

3. Гидрофобия у больного Г., укушенного бродячей собакой на о. Гоа в Индии, установлена при жизни пострадавшего обнаружением специфического антигена вируса бешенства в отпечатках с роговицы глаза по МФА, слюне по ИФА, а также генома вируса бешенства в слюне и слезной жидкости в ОТ-ПЦР за 9 сут до смерти больного и подтверждена постмортально – в различных отделах головного мозга по МФА, ИФА, а также выделением возбудителя болезни биопробой на белых мышцах. Полученные результаты подтверждают клинически поставленный диагноз гидрофобии.

3. Инкубационный период у заболевшего Г. составил 55 дней. Смерть больного наступила на 18-е сутки болезни. Заболевание и смерть от гидрофобии больного Г. стали следствием необращения пострадавшего за антирабической помощью. В связи с этим необходимо усилить в целом по стране санитарную пропаганду среди населения об опасности бешенства и мерах его профилактики.

4. Анализ последовательности нуклеотидов фрагмента гена G вируса бешенства размером 238 н.о. показал на незначительное отличие изучаемого изолята (2 rabies) от RABV AY956319, составляющее 1,68%, отличие от вакцинных штаммов «Внуково-32» на 10,5% и SAD B19 на 10,9%, они относятся к вирусам бешенства 1-го генотипа; значительное отличие от лиссаподобных вирусов 2, 4, 5 и 6-го генотипов, составляющее 21–32,7%. Полученные результаты свидетельствуют о филогенетической близости изучаемого изолята (2 rabies) со штаммом RABV AY956319 вируса бешенства, относящегося к 1-му генотипу.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Гулюкин М.И., Ведерников В.А. Ситуация уже кризисная. *Ветеринарная жизнь*. 2008; 12: 6–8.
2. Ведерников В.А., Гулюкин М.И., Рождественский И.К. и др. ред. *Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации в 2007 году и I полугодии 2008 г.* М.; 2008.
3. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: Медицинское информационное агентство., 2013.

- Gribencha S.V., Lvov D.K. Рабдовирусы. В кн.: *Медицинская вирусология*. М.: МИА, 2008: 586–94.
- Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика бешенства среди людей», утверждены постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 06.05.2010 г. № 54. М.; 2010.
- Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М. Эпизоотологический и иммунологический надзор за бешенством. *Ветеринарный врач*. 2010; 4 (17): 3–6.
- ИА Татар-информ Татарстан лидирует в ПФО по количеству случаев заболеваний бешенством животных – Росотребнадзор. 2014. Available at: <http://news.mail.ru/inregions/volgaregion/16/society/18435445/?frommail=1>
- Ковалев Н.А., Шашенко А.С. Иммунофлуоресцентное исследование отпечатков роговицы при бешенстве. *Ветеринария*. 1970; 9: 44–6.
- Zimmermann In. Zur Brauchbarkeit des Cornea testes bei der Tollwut diagnose. *Berl. Munch. Tierarztl. Eachr*. 1971; 84 (9): 172–4.
- Laurent D.A. et al. A Reliable Diagnosis of Human Rabies Based on Analysis of Skin Biopsy Specimens. *Clin. Infect. Dis*. 2008; 47: 1410–17.
- Баширова Д.К., Хисматуллина Н.А., Шафеев М.Ш., Шакиров Т.Н., Убасев А.Г. и др. Прижизненная клинико-лабораторная диагностика гидрофобии. *Казанский медицинский журнал*. 2007; 88 (5): 449–52.
- Тимиргалеев Р.В. Усовершенствование методов идентификации вируса бешенства и выявления антирабических антител: Автореф. дис. ... канд. вет. наук. Казань; 2006.
- Грибенча С.В., Козлов А.Ю., Костина Л.В., Елаков А.Л., Лосич М.А., Цибезов В.В., Забережный А.Д., Алппер Т.И. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2013; 5: 38–43.
- Wakeley P.R., Johnson N., McElhinney L.M. Development of a real-time, TaqMan reverse Transcription-PCR assay for detection and differentiation of Lyssavirus genotypes 1, 5 and 6. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43 (6): 2786–92.
- Мовсесянц А.А., Бектемиров Т.А. Гидрофобия у людей, леченных специфическими иммунопрепаратами. *Ветеринарная патология*. 2002; 1: 40.
- Ботвинкин А.Д., Селимов М.А., Згурская Т.Н. Обнаружение антител к вирусу бешенства в сыворотке крови людей с помощью иммуноферментного метода. *Вопросы вирусологии*. 1986; 31 (3): 333–4.
- Хисматуллина Н.А. Разработка и усовершенствование лабораторных методов диагностики бешенства: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Казань; 1989.
- Хисматуллина Н.А., Юсупов Р.Х., Селимов М.А., Янбарисова С.Р. Разработка средств и методов иммунологического мониторинга при бешенстве. *Вопросы вирусологии*. 2001; 5: 45–8.
- Гулюкин А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза. *Вопросы вирусологии*. 2014; 3: 5–10.
- Nicholson K.G., Prestage K. Enzyme-linked immunosorbent Assay: A Peaped Reproducible. Test for the Measurement of Rabies Antibody. *J. Med. Virol*. 1982: 43–9.
- Cliquet F., Sagne L., Schereffler J. L. & Aubert M.F.A.. ELISA tests for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine*. 2000; 18: 3272–9.
- Селимов М.А. *Бешенство*. М: Медицина. 1978.
- Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Юсупов Р.Х., Морозов В.В., Хисамутдинов Ф.Ф., Чернов А.Н. и др. Эпизоотолого-эпидемиологический надзор за бешенством. *Методическое руководство*. Казань: ФГУ «ФЦТРБ-ВНИИВ»; 2007.
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. International Union of Microbiological Societies. Virology Division*. Amsterdam: ELSEVIER ACADEMIC PRESS; 2011.
- Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Чернов А.Н., Гулюкин А.М. *Бешенство: Этиология, Эпизоотология. Диагностика. Учебно-методическое пособие в иллюстрациях*. М.: «Колос»; 2010.
- 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). Заявка на патентование изобретения в ФГУ ФИПС Per. № 2014139999.
- Vedernikov V.A., Gulyukin M.I., Rozhdstvenskiy I.K. et al. *A Rabies Epizooty Survey in the Russian Federation in 2007 and 1<sup>st</sup> half of 2008 [Obzor Epizooticheskoy Situatsii po Beshenstvu v Rossiyskoy Federatsii v 2007 godu i Pougodii 2008 g.]*. Moscow; 2008. (in Russian)
- L'vov D.K., ed. Guidelines on virology. *Viruses and Human and Animal Viral Infections*. Moscow: 2013. (in Russian)
- Gribencha S.V., Lvov D.K. The rabdoviruses. In: *Medical Virology [Meditsinskaya Virusologiya]*. Moscow: MIA; 2008: 586–94. (in Russian)
- Sanitation and epidemiological regulations «Human rabies prevention» approved by decree of the Russian Federation chief public health physician of 06.05.2010. № 54. Moscow; 2010. (in Russian)
- Ivanov A.V., Khismatullina N.A., Gulyukin A.M. Rabies epizootological and immunological survey. *Veterinarnyy Vrach*. 2010; 4 (17): 3–6. (in Russian)
- IA Tatar-inform. Tatarstan Leader in the PFD in the number of cases of Rabies in animals-CPS. 2014. Available at: <http://news.mail.ru/inregions/volgaregion/16/society/18435445/?frommail=1> (in Russian)
- Kovalev N.A., Shashenko A.S. Immunofluorescent studies of corneal imprints at rabies. *Veterinariya*. 1970; 9: 44–6. (in Russian)
- Zimmermann In. Zur Brauchbarkeit des Cornea testes bei der Tollwut diagnose. *Berl. Munch. Tierarztl. Eachr*. 1971; 84 (9): 172–4.
- Laurent D.A. et al. A Reliable Diagnosis of Human Rabies Based on Analysis of Skin Biopsy Specimens. *Clin. Infect. Dis*. 2008; 47: 1410–7.
- Bashirova D.K., Khismatullina N.A., Shafeev M.Sh., Shakirov T.N., Ubasev A.G. et al. In vivo clinical and laboratory diagnosis hydrophobia. *Kazanskiy Meditsinsky Zhurnal*. 2007; 88 (5): 449–52. (in Russian)
- Timirgaleev R.V. *Improving the methods for rabies virus and antibodies detection*: Diss. Kazan'; 2006. (in Russian)
- Gribencha S.V., Kozlov A.Yu., Kostina L.V., Yelakov A.L., Losich A.L., Tsibezov V.V. Zaberezhnyy A.D., Aliper T. I. Production of monoclonal antibodies against rabies virus nucleoprotein. *Voprosy Virusologii*. 2013, 5: 38–43. (in Russian)
- Wakeley P.R., Johnson N., McElhinney L.M. Development of a real-time, TaqMan reverse Transcription-PCR assay for detection and differentiation of Lyssavirus genotypes 1, 5 and 6. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43 (6): 2786–92.
- Movsesyants A.A., Bektemirov T.A. Rabies in human treated with specific immune drugs. *Veterinarnaya Patologiya*. 2002; 1: 40. (in Russian)
- Botvinkin A.D., Selimov M.A., Zgurskaya T.N. Detection of rabies virus antibodies in human blood serum using ELISA method. *Voprosy Virusologii*. 1986; 31 (3): 333–4. (in Russian)
- Khismatullina N.A. *Development and improvement of laboratory methods for diagnosis of rabies. Development and improvement of laboratory methods for diagnosis of rabies*: Diss. Kazan'; 1989. (in Russian)
- Khismatullina N.A., Yusupov R.Kh., Selimov M.A., Yanbarisova S.R. Developing methods and means for rabies immunological survey. *Voprosy Virusologii*. 2001; 5: 45–8. (in Russian)
- Gulyukin A.M. Significance of modern methods of rabies pathogen laboratory diagnosis and identification for rabies immunological monitoring. *Voprosy Virusologii*. 2014; 3: 5–10. (in Russian)
- Nicholson K.G., Prestage K. Enzyme-linked immunosorbent Assay: A Peaped Reproducible. Test for the Measurement of Rabies Antibody. *J. Med. Virol*. 1982: 43–9.
- Cliquet F., Sagne L., Schereffler J. L. & Aubert M.F.A.. ELISA tests for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine*. 2000; 18: 3272–9.
- Selimov M.A. *Rabies [Beshenstvo]*. Moscow: Meditsina; 1978. (in Russian)
- Ivanov A.V., Khismatullina N.A., Yusupov R.Kh., Morozov V.V., Khisamutdinov F.F., Chernov A.N. et al. *Rabies epizootological and epidemiological survey. Guidelines*. Kazan': FGU "FISTPB-VNI-VI"; 2007. (in Russian)
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. International Union of Microbiological Societies. Virology Division*. Amsterdam: ELSEVIER ACADEMIC PRESS; 2011.
- Ivanov A.V., Khismatullina N.A., Chernov A.N., Gulyukin A.M. *Rabies: Etiology, Epizootology. Diagnosis. Illustrated manual [Beshenstvo: Etiologiya, Epizootologiya. Diagnostika. Uchebno-metodicheskoe posobie v illustratsiyakh]*. Moscow: «Kolos»; 2010. (in Russian)
- A kit of synthetic oligonucleotid primers for detection of rabies virus RNA and RNA detection method of rabies virus using synthetic oligonucleotide primers in a polymerase chain reaction reverse transcription (RT-PCR). Application for patenting inventions in FIPS Identification N 2014139999. (in Russian)

## REFERENCES

- Gulyukin M.I., Vedernikov V.A. The situation is already critical. *Veterinarnaya zhizn*. 2008; 12: 6–8. (in Russian)

Поступила 25.09.14

Received 25.09.14