

- Fedorova O.E., Alatorseva G.I., Pavlov N.N., Borzykh O.A., Tlenkopachev R.S., Sukhanova L.L. et al. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among residents of different climate and geographic zones of Russia Federation. *Voprosy virusologii*. 2004; 49 (2): 4–7. (in Russian)
- Mikhaylov M.I., Zamyatina M.A., Poleschchuk V.F. Viral hepatitis E. Problems of study. *Voprosy virusologii*. 2005; 50 (3): 20–2. (in Russian)
- Korzaya L.I., Lapin B.A., Keburiya V.V., Lazareva I.Ya. Hepatitis E virus antibodies in the macaques and in the personnel serving the macaques of the Adler apery. *Voprosy virusologii*. 2007; 52 (1): 36–40. (in Russian)
- Bystrova T.N., Polyanina A.V., Knyagina O.N. Qualitative and quantitative parameters of epidemic process of hepatitis E infection in the territory of the Central European region of Russia. *Mir virusnykh gepatitov*. 2010; (1): 15–9. (in Russian)
- Potemkin I.A., Lopatkina M.A., Gadzhieva O.A., Prokhorova E.L., D'yarrassuba A., Isaeva O.V. et al. Prevalence of hepatitis E markers in children. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; (2): 38–46. (in Russian)
- Meng X.J. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet. Microbiol.* 2010; 140 (3–4): 256–65.
- Arankalle V.A., Goverdhan M.K., Banerjee K. Antibodies against hepatitis E virus in Old World monkeys. *J. Viral. Hepat.* 1994; 1 (2): 125–9.
- Purcell R.H., Emerson S.U. Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J.* 2001; 42 (2): 161–77.
- Hirano M., Ding X., Tran H.T., Li T.C., Takeda N., Sata T. et al. Prevalence of antibody against Hepatitis E virus in various species of non-human primates: Widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn. J. Infect. Dis.* 2003; 56 (1): 8–11.
- Yamamoto H., Li T.C., Koshimoto C., Ito K., Kita M., Miyashita N. et al. Serological evidence for hepatitis E virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp. Anim.* 2008; 57 (4): 367–76.
- Huang F., Yu W., Hua X., Jing S., Zeng W., He Z. Seroepidemiology and molecular characterization of hepatitis E virus in Macaca mulatta from a village in Yunnan, China, where infection with this virus is endemic. *Hepat. Mon.* 2011; 11 (9): 745–9.
- Dastgerdi E.S., Amini-Bavil-Olyae S. Hepatitis E virus infection in macaca mulatta. *Hepat. Mon.* 2011; 11 (10): 852–3.
- Nakamura S., Tsuchiya H., Okahara N., Nakagawa T., Ohara N., Yamamoto H. et al. Epidemiology of hepatitis E virus in indoor-captive cynomolgus monkey colony. Epidemiology of hepatitis E virus in indoor-captive cynomolgus monkey colony. *J. Vet. Med. Sci.* 2012; 74 (3): 279–83.
- Kyuregyan K.K., Mikhaylov M.I. *Molecular-biological Bases of Control of Viral Hepatitis [Molekulyarno-biologicheskie osnovy kontrolya virusnykh gepatitov]*. Moscow: Izdatel'stvo Ikar, 2013. (in Russian)

Поступила 13.07.15

Принята в печать 19.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.824.11:578.51.083.2

Щелканов М.Ю.^{1,2,13}, Девяткин А.А.³, Ананьев В.Ю.², Фролов Е.В.⁴, Домбровская И.Э.⁴, Дедков В.Г.³, Ардашев А.В.², Коломеец С.А.⁵, Короткова И.П.⁶, Любченко Е.Н.⁶, Бандеев В.В.⁷, Просяникова М.Н.², Галкина И.В.¹, Иванушко Е.С.⁸, Емельянова Н.П.⁸, Баранов Н.И.², Ульянова С.А.², Арамилев С.В.⁹, Фоменко П.В.¹⁰, Суровый А.Л.¹¹, Порошин Н.А.⁴, Сокол Н.Н.⁴, Маслов Д.В.⁵, Махиня Е.Е.¹², Шипулин Г.А.³

ИЗОЛЯЦИЯ И СЕКВЕНИРОВАНИЕ ПОЛНОРАЗМЕРНОГО ГЕНОМА ШТАММА ВИРУСА БЕШЕНСТВА, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ БУРОГО МЕДВЕДЯ (*URSUS ARCTOS*), НАПАВШЕГО НА ЧЕЛОВЕКА В ПРИМОРСКОМ КРАЕ (НОЯБРЬ 2014 г.)

¹ГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», 690091, г. Владивосток; ²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае», 690091, г. Владивосток; ³ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва; ⁴ФГБУ «Приморская межобластная ветеринарная лаборатория» Россельхознадзора, 692502, г. Уссурийск, Приморский край; ⁵Управление Роспотребнадзора по Приморскому краю, 690087, г. Владивосток; ⁶Приморская государственная сельскохозяйственная академия, 692510, г. Уссурийск, Приморский край; ⁷Хасанская станция по борьбе с болезнями животных, 692701, пос. Славянка, Приморский край; ⁸ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет», 690002, г. Владивосток; ⁹Приморский филиал АНО «Центр «Амурский тигр»», 690091, г. Владивосток; ¹⁰Амурский филиал Всемирного фонда дикой природы, 690003, г. Владивосток; ¹¹Департамент по охране, контролю и регулированию использования объектов животного мира администрации Приморского края, 690091, г. Владивосток; ¹²КГБУЗ «Хасанская центральная районная больница», 692701, пос. Славянка, Приморский край; ¹³ФГБУН «Биолого-почвенный институт» ДВО РАН, 690022, г. Владивосток

В ноябре 2014 г. в с. Барабаш (Хасанский район Приморского края), расположенном в непосредственной близости к национальному парку «Земля леопарда», произошло нападение бурого медведя (*Ursus arctos*) на человека. Девиантное поведение медведя позволило предположить бешенство, которое было подтверждено после его отстрела с помощью лабораторных методов. Из головного мозга медведя был изолирован штамм RABV/*Ursus arctos/Russia/Primorye/PO-01/2014* (далее – PO-01). Штамм PO-01 является первым полностью секвенированным дальневосточным штаммом вируса бешенства и может считаться топотипным. PO-01 значительно отличается от вакцинного штамма RV-97 (GeneBank EF542830), на основе которого выпускается живая аттенуированная вакцина, применявшаяся для профилактики бешенства в «Земле леопарда». Вместе с тем иммунодоминантные сайты в белках PO-01 и RV-97 отличаются незначительно, и применение вакцины может быть рекомендовано к продолжению. Анализ генома PO-01 (GeneBank KR997032) выявил его принадлежность к евразийской генетической подгруппе генотипа 1 (уличного бешенства). Таким образом, эта генетическая подгруппа распространяется на восток вплоть до окраины материка. Расширение трансграничных охраняемых территорий России и Китая на Дальнем Востоке требует корректного учета циркуляции лиссавиринов.

Ключевые слова: вирус бешенства; *Rhabdoviridae*; *Lyssavirus*; генотип 1; генетические группы; бурый медведь; Приморский край.

Для корреспонденции: Щелканов Михаил Юрьевич, зав. науч. лаб. экологии микроорганизмов ДВФУ, вед. науч. сотр. БПИ ДВО РАН, эксперт ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае», 690091, г. Владивосток, E-mail: adorob@mail.ru

Для цитирования: Щелканов М.Ю., Девиаткин А.А., Ананьев В.Ю., Фролов Е.В., Домбровская И.Э., Дедков В.Г., Ардашев А.В., Коломеец С.А., Короткова И.П., Любченко Е.Н., Бандеев В.В., Просянникова М.Н., Галкина И.В., Иванушко Е.С., Емельянова Н.П., Баранов Н.И., Ульянова С.А., Арамилев С.В., Фоменко П.В., Суворый А.Л., Порошин Н.А., Сокол Н.Н., Маслов Д.В., Махиня Е.Е., Шипулин Г.А. Изоляция и секвенирование полноразмерного генома штамма вируса бешенства, изолированного от бурого медведя (*Ursus arctos*), напавшего на человека в Приморском крае (ноябрь 2014 г.). *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (4): 180-186. DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-180-186

Shchelkanov M.Yu.^{1,2,13}, Deviatkin A.A.³, Ananiev V.Yu.², Frolov E.V.⁴, Dombrovskaya I.E.⁴, Dedkov V.G.³, Ardashev A.V.², Kolomeets S.A.⁵, Korotkova I.P.⁶, Lyubchenko E.N.⁶, Bandedev V.V.⁷, Prosyannikova M.N.², Galkina I.V.¹, Ivanushko E.S.⁸, Emelyanova N.P.⁸, Baranov N.I.², Ulyanova S.A.², Aramilev S.V.⁹, Fomenko P.V.¹⁰, Surovy A.L.¹¹, Poroshin N.A.⁴, Sokol N.N.⁴, Maslov D.V.⁵, Makhinya E.E.¹², Shipulin G.A.³

ISOLATION AND COMPLETE GENOME SEQUENCING OF RABIES VIRUS STRAIN ISOLATED FROM A BROWN BEAR (*URSUS ARCTOS*) THAT ATTACKED A HUMAN IN PRIMORSKI KRAI (NOVEMBER, 2014)

¹Far Eastern Federal University, Vladivostok, 690091, Russian Federation; ²Hygienic and Epidemiological Center in Primorsky krai, Vladivostok, 690091, Russian Federation; ³Central Scientific-Research Institute for Epidemiology, Moscow, 111123, Russian Federation; ⁴Inter-regional Veterinary Laboratory in Primorsky krai, Ussuriisk, Primorsky krai, 692502, Russian Federation; ⁵Regional offices of Rospotrebnadzor in Primorsky krai, Vladivostok, 690087, Russian Federation; ⁶Primorskaya State Academy of Agriculture, Ussuriisk, Primorsky krai, 692510, Russian Federation; ⁷Khasan Station for Animal Disease Control, Slavyanka, Primorsky krai, 692701, Russian Federation; ⁸Pacific State Medical University, Vladivostok, 690002, Russian Federation; ⁹Primorsky branch of Non-Commercial Organization "Amur tiger", Vladivostok, 690091, Russian Federation; ¹⁰Amur branch of «World Wide Fund for Nature», Vladivostok, 690003, Russian Federation; ¹¹Department on Protection, Control and Regulation of Fauna Use of the Administration of Primorsky krai, Vladivostok, 690091, Russian Federation; ¹²Khasan Central Regional Hospital, Slavyanka, Primorsky krai, 692701, Russian Federation; ¹³Institute of Biological and Soil Science, Vladivostok, 690022, Russian Federation

An attack of a brown bear (*Ursus arctos*) on human was detected in November, 2014 in the Barabash village (Khasan region of the Primorski krai) located in close proximity to the national park Land of the Leopard. The bear was shot. The deviant behavior of the bear indicated the possibility of rabies. The diagnosis was confirmed by means of laboratory methods. The strain RABV/*Ursus arctos*/Russia/Primorye/PO 01/2014 (further PO 01) was isolated from the brain of the bear. PO 01 is the first completely sequenced Far Eastern strain of RABV. It can be considered as topotypic. PO 01 considerably differs from the vaccine strain RV 97 (GenBank EF542830) that is the basis of attenuated vaccine applied in the Land of the Leopard. At the same time, the immunodominant sites in PO 01 and RV 97 proteins differ slightly. It can be recommended to continue application of the vaccine. The analysis of the PO 01 genome (GenBank KP997032) revealed its belonging to the Eurasian genetic subgroup of the genotype 1 (street rage). Thus, this genetic subgroup stretches to the East. Expansion of the cross-border protected territories of Russia and China in the Far East demands the correct statistics of circulation of the lyssaviruses to be kept.

Key words: rabies virus; *Rhabdoviridae*; *Lyssavirus*; genotype 1; genetic groups; brown bear; Primorski krai.

For citation: Shchelkanov M.Yu., Deviatkin A.A., Ananiev V.Yu., Frolov E.V., Dombrovskaya I.E., Dedkov V.G., Ardashev A.V., Kolomeets S.A., Korotkova I.P., Lyubchenko E.N., Bandedev V.V., Prosyannikova M.N., Galkina I.V., Ivanushko E.S., Emelyanova N.P., Baranov N.I., Ulyanova S.A., Aramilev S.V., Fomenko P.V., Surovy A.L., Poroshin N.A., Sokol N.N., Maslov D.V., Makhinya E.E., Shipulin G.A. Isolation and complete genome sequencing of rabies virus strain isolated from a brown bear (*Ursus Arctos*) that attacked a human in Primorski krai (November, 2014). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(4):180-186. (In Russ.).

DOI 10.18821/0507-4088-2016-61-4-180-186

For correspondence: Mikhail Yu. Shchelkanov, head of scientific laboratory for microorganism ecology of FEFU, head of laboratory for virological investigations of Hygienic and Epidemiological Center in Primorsky krai Vladivostok, 690091, Russian Federation, E-mail: adorob@mail.ru

Information about authors: Shchelkanov M.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-8610-7623>

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 1 November 2015

Accepted 19 November 2015

Бешенство – абсолютно летальное в отсутствие вакцинации природно-очаговое зоонозное заболевание, этиологически связанное с вирусами рода *Lyssavirus* (семейство *Rhabdoviridae*, отряд *Mononegavirales*): бешенства (RABV – rabies virus rhabdovirus) (прототипный), Араван (ARAV – Aravan virus), вирусом западнокавказских летучих мышей (WCBV – West Caucasian bat virus), Иркут (IRKV – Irkut virus), Худжанд (KHUV – Khujand virus). Для RABV выявлено 7 генотипов, 6 из которых ранее считались самостоятельными вирусами и до сих пор сохранили собственные названия: вирус уличного бешенства, Лагос-бат (LBV – Lagos bat virus), Моккола (MOKV – Mokola virus), Дувенхаге (DUVV – Duvenhage virus), лиссавирус европейских летучих мышей типа 1 (EBLV 1 – European bat lyssavirus type 1), лиссавирус европейских летучих мышей типа 2 (EBLV 2 – European bat lyssavirus type

2), лиссавирус австралийских летучих мышей (ABLV – Australian bat lyssavirus) [1–3].

В Российской Федерации в начале XXI века ситуация по бешенству остается напряженной: ежегодная смертность составляет 3–22 человека (рис. 1) и 250–450 тыс. ежегодно получают антирабическую вакцинацию для предотвращения заболевания [2, 4–7]. Дальний Восток относится к территориям с низким риском заражения бешенством людей и домашних животных [3–8]. Однако интенсификация освоения природных ресурсов и рекреационного потенциала этого региона приводит к закономерному усилению антропогенного воздействия на природные биоценозы, что приводит к изменению характера популяционных взаимодействий и увеличивает риск активации природных очагов. Кроме того, помимо широко распространенного в Северной Евразии уличного бешенства, на Дальнем Востоке [3, 9,

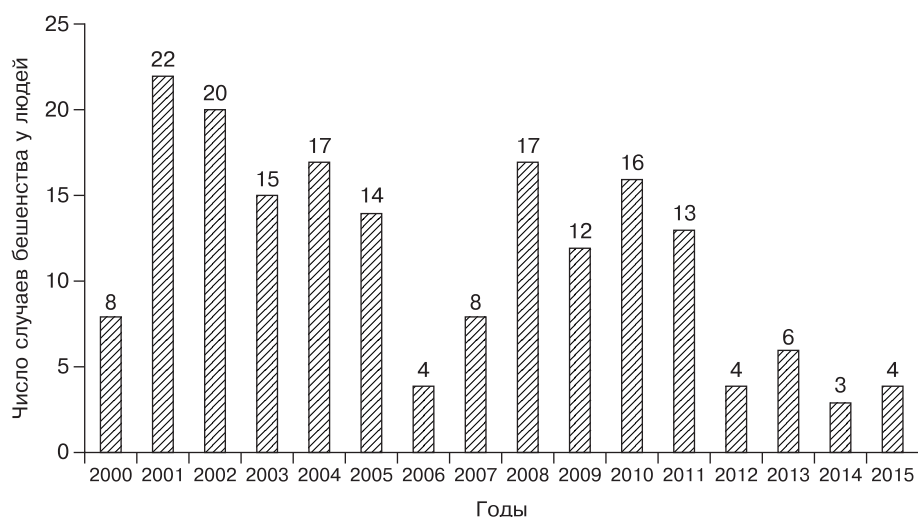


Рис. 1. Заболеваемость и смертность от бешенства в Российской Федерации за период 2000–2015 гг. (данные 2015 гг. – за период с января по сентябрь).

10] и в сопредельных провинциях КНР [3, 10] встречается IRKV (топотипный штамм Озерное), экология которого здесь изучена недостаточно. Поэтому исследование дальневосточных лисса-вирусов имеет важное значение для корректного планирования мероприятий по профилактике бешенства у людей, домашних, сельскохозяйственных и охраняемых диких животных.

В настоящей работе представлены результаты молекулярно-генетической идентификации на основе полноразмерного секвенирования генома RABV от бурого медведя (*Ursus arctos*), напавшего на человека в с. Барабаш (Хасанский район Приморского края) в непосредственной близости к национальному парку «Земля леопарда».

Работа выполнена в рамках проекта ДВФУ «Мониторинг природно-очаговых инфекций Дальнего Востока в интересах обеспечения биологической безопасности Российской Федерации» при поддержке Всемирного фонда дикой природы.

Материал и методы

Оперативные мероприятия проводились сотрудниками уполномоченных подразделений департаментов по охране, контролю и регулированию использования объектов животного мира, природных ресурсов и охраны окружающей среды, здравоохранения Приморского края, Государственной ветеринарной инспекции Приморского края, Федеральных служб Россельхознадзора и Роспотребнадзора, Министерства здравоохранения и Министерства внутренних дел Российской Федерации в соответствии с действующими служебными инструкциями.

Метод флуоресцирующих антител (МФА) применяли для индикации антигенов RABV в отпечатках фрагментов мозга (аммонова рога, продолговатого мозга, мозжечка, коры больших полушарий) убитого медведя с подозрением на бешенство, а также лабораторных мышей, погибших после интрацеребральной инокуляции биоматериала, потенциально содержащего RABV. В работе использовали лиофилизированные анти-RABV-антитела, меченные флуоресцеинизотиоцианатом (ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ВНИИЗЖ), Россия). МФА осуществляли согласно инструкции производителя и ГОСТу 26075-2013 [12, 13].

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили в сэндвич-варианте. Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом ИФА (ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности – Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт» (ФЦТРБ – ВНИВИ), Россия) использовали для индикации антигенов RABV согласно инструкции производителя [13, 14].

Выделение вируса методом биопробы [4, 13] выполняли на двух моделях: интрацеребрально инокулированных (по 20 мкл/особь) 3- и 21-дневных лабораторных белых мышей. Гибель животных в первые 48 ч после инокуляции считалась неспецифической (посттравматической). RABV идентифицировали с помощью МФА.

Метод Риду–Менча [15] с линейно-логарифмической интерполяцией использовали для оценки инфекционного титра изолированного штамма (количества 50% инфекционных доз) на модели 3-дневных мышей. Титрование проводили в диапазоне 10⁻ⁿ, n = 5, 6, ..., 10 по 3 гнезда × 6 особей/разведение. За инокулированными животными наблюдали в течение 30 сут.

Выделение РНК из мозговой ткани мышей проводили с помощью набора для выделения РНК RNeasy Lipid Tissue Mini Kit («Qiagen», Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. РНК элюировали в 100 мкл H₂O Rnase-free («Qiagen», Германия) и хранили при –70°C.

Накопление кДНК осуществляли с помощью реакции обратной транскрипции и последующей полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Реакцию ОТ проводили с применением набора Реверта-L (ЦНИИЭ, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Полученную кДНК разводили в 5 раз с помощью H₂O Rnase-free («Qiagen», Германия) и хранили при –70°C. ПЦР проводили с использованием «горячего старта» в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 2 мкл кДНК, по 0,4 мМ прямого и обратного праймеров, 2,5 мкл (1,76 мМ) дНТФ (ЦНИИЭ, Россия) и 10 мкл ПЦР-буфера blue-2 (ЦНИИЭ, Россия). Параметры термоциклирования (n = 40): 94°C – 1 мин, 55–65°C – 15 с, 7°C – 60 с; финальная элонгация 5 мин. Реакцию выполняли на приборе МахуGene («Ахуген», США). Результаты амплификации контролировали электрофоретическим методом в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Секвенирование полноразмерного генома RABV выполняли с помощью набора праймеров, описанного ранее [16], на автоматическом капиллярном секвенаторе ABI Prism 3500 XL («Applied Biosystems», США).

Результаты титрования штамма RABV/*Ursus arctos*/Russia/Primorye/PO-01/2014 на модели интрацеребрально инокулированных 3-дневных лабораторных мышей и определения инфекционного титра по Риду–Менчу [15]

Отрицательный десятичный логарифм разведения вирусосодержащей жидкости	Количество животных в эксперименте		Данные, пересчитанные по Риду–Менчу		
	выжили	погибли	выжили	погибли	летальность
5	0	18	0	63	100,0
6	0	18	0	45	100,0
7	4	14	4	27	87,1
8	12	6	16	13	44,8
9	13	5	29	7	19,4
10	16	2	45	2	4,3

Примечание. Серым фоном обозначены разведения, между которыми заключена LD₅₀.

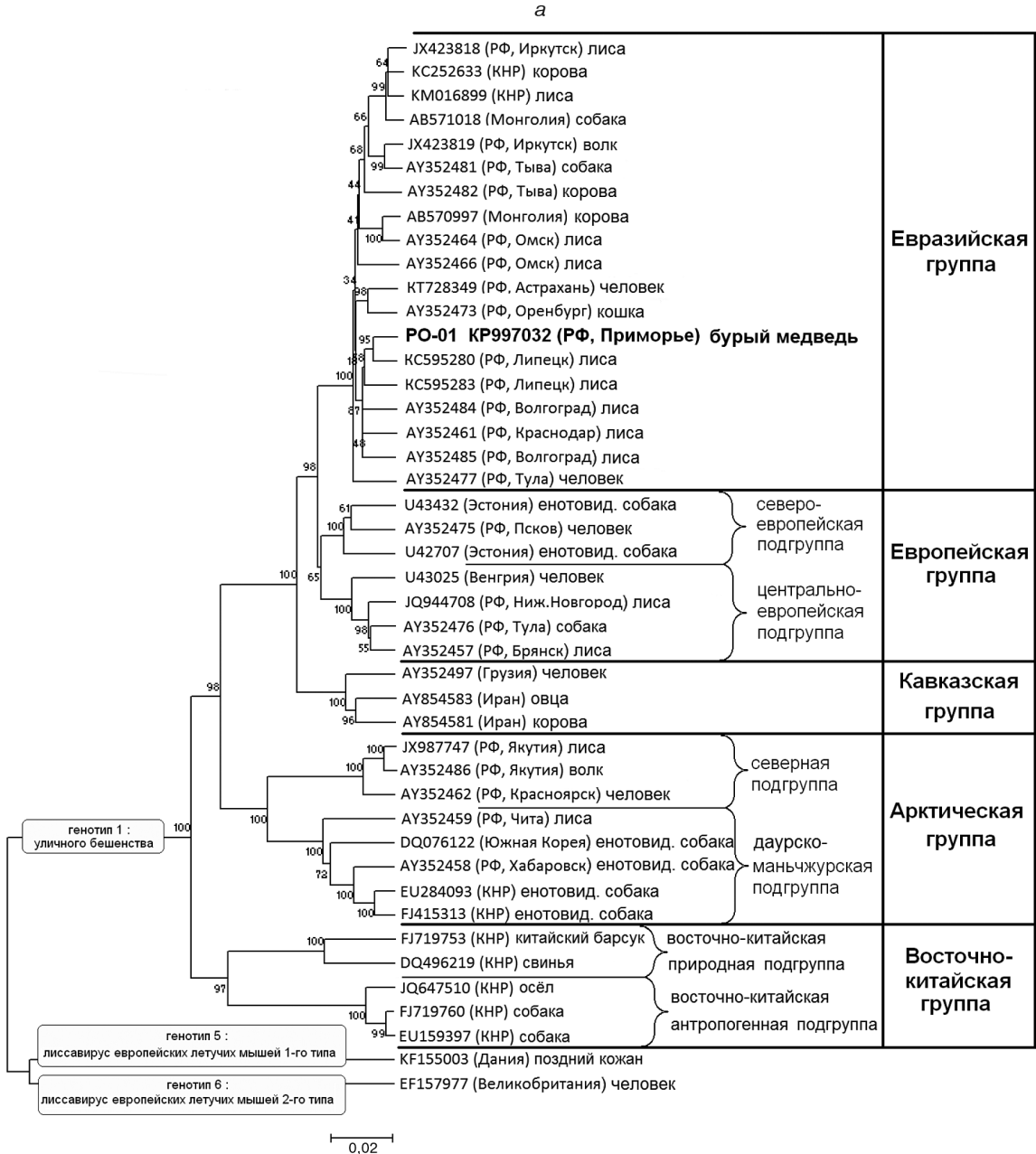
Статистический анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программного пакета Mega 6.06 [17]: множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью алгоритма ClustalW, кластер-анализ – NJ (neighbor-joining – «ближайшего соседа»), bootstrap-анализ – 1000-кратным повторением.

Результаты

Расследование инцидента позволило установить, что четырехлетний бурый медведь (*Ursus arctos*; 3–4 года; ♂) впервые появился в окрестностях с. Барабаш (Хасанский район Приморского края) вечером 15.11.2014 и в тот же вечер загрыз собаку на окраине села. Вечером 17.11.2014 медведь загрыз еще одну собаку и напал на гражданку N. (69 лет), которая была доставлена в ОРИТ КГБУЗ «Хасанская ЦРБ» (пос. Славянка, Хасанский район Приморского края) с тяжелыми травмами: скальпированной раной волосистой части головы, множе-

ственными укушенно-рваными ранами левой половины грудной клетки с повреждением нижней доли легкого слева, открытым фрагментированным переломом ребер VI–XI слева, разрывом диафрагмы и гемопневмотораксом слева, отрывом селезенки, гемоперитонеумом, травматическим шоком III степени.

Учитывая девиантность поведения медведя – выход из сезонной спячки (хотя летом–осенью 2014 г. имела хорошая кормовая база), неровную походку с частыми лежками, отсутствие страха перед человеком, отсутствие характерных ударов по жертве лапами, нехарактерное разгрызание задранных собак со стороны хребта с разрыванием тела жертвы на части, – сделали предположение о заболевании хищника бешенством. Поэтому с первых часов госпитализации пострадавшей N. вводилась антирабическая вакцина КоКАВ по схеме 0–3–7–14–30–90, антирабический иммуноглобулин не вводился. Пациентка N. была выписана 18.12.2014 в удовлетворительном состоянии.



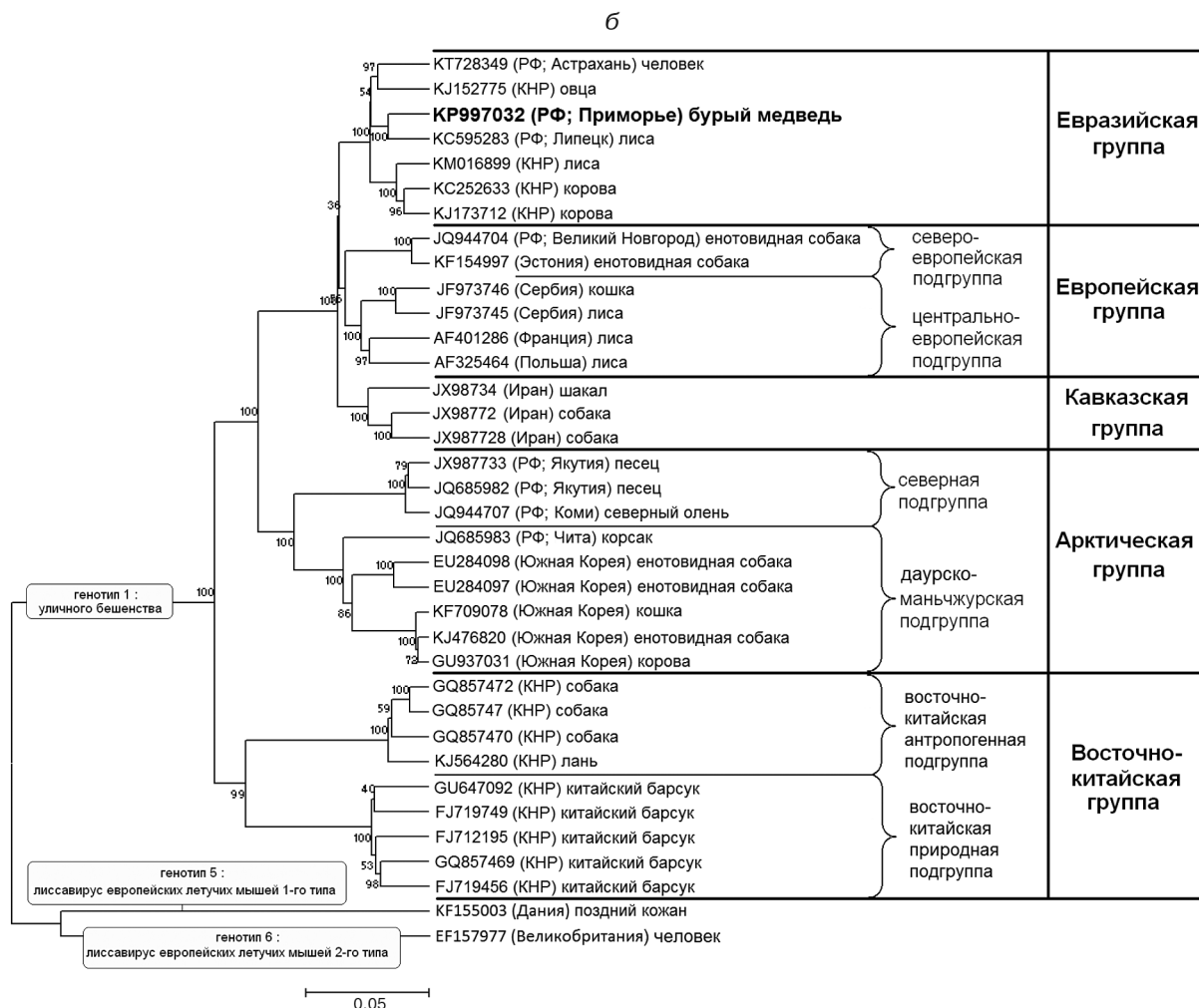


Рис. 2. Кластер-анализ нуклеотидных последовательностей полноразмерных генов N (1353 н. о.) (а) и G (1575 н. о.) (б) штаммов вируса бешенства, встречающихся на территории Северной Евразии. Алгоритм выравнивания – ClustalW; метрика – p-distance; алгоритм восходящей иерархической классификации – NJ («ближайшего соседа»). Штамм PO-01 выделен жирным шрифтом. Указаны идентификаторы GeneBank, место и источник изоляции штамма

Отбор образцов биологического материала медведя проводился 18.11.2014 в Центре диагностики болезней животных на базе Приморской государственной сельскохозяйственной академии, куда была доставлена туша животного после его отстрела. Голова медведя была передана в Приморскую межобластную ветеринарную лабораторию. 08.12.2014 фрагменты мозга медведя были доставлены в лабораторию вирусологических исследований Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае без нарушения холодной цепи.

Индикация антигенов RABV в тканях мозга медведя была проведена методами ИФА и МФА с положительным результатом.

Изоляцию вируса выполняли на двух биологических моделях: интрацеребрально инокулированных 3- и 21-дневных лабораторных белых мышей. В первом случае инкубационный период составил 11–12 сут при отсутствии неспецифического падежа в первые 48 ч после инокуляции, во втором – 14–15 сут и 3 (30%) соответственно. У инокулированных мышей развивалась классическая картина менингита с парезом сначала задних, а потом и передних конечностей. Штамм получил название RABV/Ursus arctos/Russia/Primorye/PO-01/2014 (далее – PO-01). Оценка LD₅₀ по данным титрования (см. таблицу) с помощью

линейно-логарифмической интерполяции: $8 - (50,0 - 44,8) / (87,1 - 44,8) = 7,9$. Оценка инфекционности штамма: $7,9 \lg (LD_{50}) / 20 \text{ мкл} = 9,6 \lg (LD_{50}) / \text{мл}$.

Идентификация штамма и его принадлежность к RABV были подтверждены с использованием ИФА, МФА, ОТ-ПЦР и секвенирования полноразмерного генома (GeneBank KP997032).

Обсуждение

Анализ полноразмерного генома выделенного штамма PO-01 показал его принадлежность к генотипу 1 RABV (уличного бешенства). Данный штамм является первым полностью секвенированным дальневосточным штаммом RABV и может считаться топотипным.

Отличие PO-01 от вакцинного штамма RV-97 (GeneBank EF542830), на основе которого выпускаются живые аттенуированные вакцины Синраб (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Россия) и Оралрабивак (Покровский завод биопрепаратов, Россия), применявшиеся для профилактики бешенства среди диких плотоядных в Приморском крае [18], составляет по N-гену 5,6% для нуклеотидной последовательности (2,7 % для аминокислотной последовательности), P-гену – 9,3% (9,4%), M-гену – 9,2% (7,4%), G-гену – 9,5% (9,5%), L-гену – 7,1% (2,8%). Таким образом, контамина-

ция биоматериала фиксированным штаммом исключается. Вместе с тем вакцины на основе RV-97 могут быть рекомендованы к дальнейшему применению, так как основные иммунодоминантные сайты [19] в белках PO-01 и RV-97 либо совпадают (G: 34–42 аминокислотных остатка (а. о.), 198–200, 231, 330–338, 342–343 а. о.; P: 75–90 а. о.; N: 313–337, 374–383 а. о.), либо отличаются незначительно (P: A197V и I202A в сайте 191–206 а. о.; N: A407T в сайте 404–418 а. о.).

Штаммы RABV, изолированные на территории Северной Евразии, на основании сравнительного анализа гена N (1353 нуклеотидных основания (н.о.)), кодирующего вирусный нуклеопротеин, классифицируются на несколько генетических групп, которые имеют определенную географическую приуроченность [5, 6, 20–23]. PO-01 принадлежит к евразийской генетической группе (рис. 2, а), которая широкой полосой охватывает умеренный пояс Евразии. Представители этой группы встречаются на территориях от Восточной Европы до Забайкальского края. Представленные данные свидетельствуют о том, что евразийская группа распространяется вплоть до восточной окраины материка. К этому же выводу приводит и анализ гена G (1575 н. о.) (рис. 2, б), который кодирует поверхностный гликопротеин, формирующий поверхностные пепломеры, связывающиеся с клеточными рецепторами и опосредующие слияние вирусной и клеточной мембран [1–3]. G-белок является более изменчивым по сравнению с нуклеопротеином, однако иерархия генетических групп и подгрупп для N- и G-генов в целом подобны.

Арктическая генетическая группа первоначально включала штаммы, изолированные в Северо-Восточной Азии. Однако в процессе дальнейшего изучения RABV штаммы арктической группы были обнаружены в Читинской области, Хабаровском крае, КНР и Южной Корее, формируя даурско-маньчжурскую подгруппу (см. рис. 2), которая может встретиться и на территории Приморского края. Здесь также может быть обнаружена и восточно-китайская генетическая подгруппа RABV. Таким образом, на юге Дальнего Востока возможна одновременная циркуляция трех генетических групп RABV, что с учетом присутствия IRKV создает здесь сложный профиль циркуляции лиссавирусов.

В связи с планами расширения заповедной территории на юге Приморского края, включения в нее ряда трансграничных участков России и Китая, создания естественных пограничных проходов для животных, необходим корректный анализ циркуляции лиссавирусов RABV и IRKV. При этом следует иметь в виду не только возможность распространения смертельно опасной инфекции среди самих хищников, но и подрыв их кормовой базы [2, 3, 6, 21–23]. Для популяций малочисленных кошачьих – амурского тигра (*Panthera tigris altaica*) и дальневосточного леопарда (*Panthera pardus amurensis*) – реализация угрозы со стороны инфекционных заболеваний может иметь необратимые последствия. Необходимо интенсифицировать мониторинговые и профилактические мероприятия в отношении лиссавирусов на сопредельных российско-китайских территориях юга Дальнего Востока в популяциях диких, домашних и сельскохозяйственных животных.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**ЛИТЕРАТУРА (пп. 3, 5, 10, 11, 15–18, 20–23
см. REFERENCES)**

1. Львов Д.К., ред. *Медицинская вирусология*. М.: МИА; 2008.
2. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
4. Белик Е.В., Дудников С.А., Бельчихина А.В., Лядский М.М., Дудорова М.В. *Эпизоотическая ситуация по бешенству на территории Владимирской области (2005–2009)*. Информационно-аналитический обзор. Владимир: ВНИИЗЖ; 2010.

6. Чупин С.А., Чернышова Е.В., Метлин А.Е. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Российской Федерации в период 2008–2011 г. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58 (4): 44–9.
7. Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Иванов А.В., Сабирова В.В., Южаков А.Г. и др. Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: прижизненная и постмортальная лабораторная диагностика. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60 (2): 18–24.
8. Сидорова Д.Г., Сидоров Г.Н., Полещук Е.М., Кольчев Н.М. Бешенство в Восточной Сибири в XX – начале XXI веков. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАН*. 2007; (Приложение 3): 168–72.
9. Ботвинкин А.Д. Смертельные случаи заболевания людей бешенством в Евразии после контактов с рукокрылыми. *Plecotus et al.* 2011; (14): 75–86.
12. Инструкция по применению Антирабического лиофилизированного иммуноглобулина, меченного флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ-иммуноглобулин). Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2011.
13. ГОСТ 26075-2013. Методы лабораторной диагностики бешенства. Межгосударственный стандарт. М.: Стандартинформ; 2014.
14. Назаров Н.А., Михайлина Н.М., Рыбаков С.С., Метлин А.Е., Чепуркин А.В., Молодкин А.В. и др. Разработка твердофазного непрямоемкого сандвич-варианта иммуноферментного анализа для диагностики бешенства животных. *Труды Федерального центра охраны здоровья животных*. 2006; 4: 117–24.
19. Метлин А.Е. *Молекулярно-биологические характеристики полевых изолятов и аттенуированных штаммов вируса бешенства*. Дисс. ... канд. вет. наук. Владимир; 2004.

REFERENCES

1. L'vov D.K., ed. *Medical Virology [Meditsinskaya virusologiya]*. Moscow: MIA; 2008. (in Russian)
2. L'vov D.K., ed. *Handbook of Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
3. L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Alkhovsky S.V., Deryabin P.G. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology*. Elsevier Academic Press; 2015.
4. Belik E.V., Dudnikov S.A., Bel'chikhina A.V., Lyadskiy M.M., Dudorova M.V. *Epizootic Situation for Rabies on the Territory of Vladimir region (2005–2009). Information-analytic Review [Epizooticheskaya situatsiya po beshenstvu na territorii Vladimirskiy oblasti (2005–2009). Informatsionno-analiticheskiy obzor]*. Vladimir: VNIIZZh; 2010. (in Russian)
5. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., McElhinney L.M., Smith J.S., Orciari L.A., Hughes G.J. et al. Molecular Epidemiology of terrestrial Rabies in the former Soviet Union. *J. Wildl. Dis.* 2004; 40 (4): 617–31.
6. Chupin S.A., Chernyshova E.V., Metlin A.E. Genetic characterization of the rabies virus field isolates detected in Russian Federation within the period 2008–2011. *Voprosy virusologii*. 2013; 58 (4): 44–9. (in Russian)
7. Khismatullina N.A., Gulyukin A.M., Gulyukin M.I., Ivanov A.V., Sabirova V.V., Yuzhakov A.G. et al. Two cases of hydrophobia in the republic of Tatarstan: in vivo and postmortem laboratory diagnosis. *Voprosy virusologii*. 2015; 60 (2): 18–24. (in Russian)
8. Sidorova D.G., Sidorov G.N., Poleshchuk E.M., Kolychev N.M. Hydrophobia in the East Siberia in XX – the Beginning of XXI Century. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya RAMN*. 2007; (Suppl. 3): 168–72. (in Russian)
9. Botvinkin A.D. Fatal human cases of rabies in Eurasia after contacts with bats. *Plecotus et al.* 2011; (14): 75–86. (in Russian)
10. Leonova G.B., Belikov S.I., Kondratov I.G., Krylova N.V., Pavlenko E.V., Romanova E.V. et al. A fatal case of bat lyssavirus infection in Primorye Territory of the Russian Far East. *WHO Rabies Bulletin Europe*. 2009; 33 (4): 5–8.
11. Liu Y., Zhang S., Zhao J., Zhang F., Hu R. Isolation of Irkut Virus from a Murina leucogaster Bat in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7 (3): e2097.
12. Instruction on use of the anti-rabies lyophilized immunoglobulin labeled by fluorescein isothiocyanate (FITC-immunoglobulin). Vladimir: FGBU «ARRIAH»; 2011. (in Russian)
13. ГОСТ 26075-2013. Методы лабораторной диагностики бешенства. Interstate standard. Moscow: Standartinform; 2014. (in Russian)
14. Nazarov N.A., Mikhaylina N.M., Rybakov S.S., Metlin A.E., Chepurkin A.V., Molodkin A.V. et al. Development of indirect sandwich ELISA for the diagnostics of rabies. *Trudy Federal'nogo tsentra okhrany zdorov'ya zhivotnykh*. 2006; 4: 117–24. (in Russian)
15. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* 1938; 27: 493–7.
16. Poleshchuk E.M., Deviatkin A.A., Dedkov V.G., Sidorov G.N., Ochka-sova J.V., Hodjakova I.A. et al. Complete genome sequences of four virulent rabies virus strains isolated from rabid animals in Russia. *Genome Announc.* 2013; 1 (3): e00140–13.
17. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipki A., Kumar S. MEGA6:

- Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30 (12): 2725–9.
18. Lubchenko E. Rabies control in eastern Russian Ussuriysk region. *WHO Rabies Bulletin Europe*. 2008; 32 (1): 7–8.
 19. Metlin A.E. *Molecular and Biological Characteristics of Field Isolates and Attenuated Strains of Rabies Virus*: Diss. Vladimir; 2004. (in Russian)
 20. Liu Y., Zhang S., Zhao J., Zhang F., Li N., Lian H. et al. Fox- and raccoon-dog-associated rabies outbreaks in northern China. *Viol. Sin.* 2014; 29 (5): 308–10.
 21. Zhu H., Chen X., Shao X., Ba H., Wang F., Wang H. et al. Characterization of a virulent dog-originated rabies virus affecting more than twenty fallow deer (*Dama dama*) in Inner Mongolia, China. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 31: 127–34.
 22. Nadin-Davis S.A., Simani S., Armstrong J., Fayaz A., Wandeler A.I. Molecular and antigenic characterization of rabies viruses from Iran identifies variants with distinct epidemiological origins. *Epidemiol. Infect.* 2003; 131 (1): 777–90.
 23. Pant G.R., Lavenir R., Wong F.Y., Larrous F., Bhatta D.R., Bourhy H. et al. Recent emergence and spread of an Arctic-related phylogenetic lineage of rabies virus in Nepal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7 (11): e2560.

Поступила 1.11.15

Принята в печать 19.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 578.824.11:578.5]:577.21.08

Зайкова О.Н.¹, Гребенникова Т.В.¹, Елаков А.Л.¹, Кочергин-Никитский К.С.¹, Алипер Т.И.¹, Чучалин С.Ф.², Гулюкин А.М.³

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМОВ ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; ²Управление ветеринарии Кировской области, 610046, г. Киров; ³ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.П. Коваленко», 109428, г. Москва

Статья посвящена молекулярно-генетическому исследованию геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих среди диких животных на территории Кировской области, с целью проведения филогенетического анализа и определения возможной реверсии вакцинного штамма вируса бешенства, используемого при оральной вакцинации, к вирулентному варианту. Исследованы 24 образца мозга от диких плотоядных, отстреленных после проведения на этой территории оральной иммунизации вакциной Рабивак-О/333, а также приманка с вакциной, предоставленные Кировской ветеринарной службой. Методами флюоресцирующих антител и обратнотранскриптной полимеразной цепной реакции было установлено, что все предоставленные образцы содержат вирус бешенства. Филогенетический анализ фрагментов гена *N* показал генетическую близость кировских полевых изолятов к изолятам, выделенным в Бурятии, анализ фрагментов гена *G* продемонстрировал генетическую близость кировских полевых изолятов к изолятам, выделенным в 2011 г. в Липецке, а также к украинским изолятам 2006 и 2010 гг. В ходе молекулярно-биологического анализа фрагментов генов *N* и *G* полевых изолятов и генома вакцинного вируса бешенства установлено, что в данном случае реверсия вакцинного штамма к вирулентному варианту отсутствует.

Ключевые слова: бешенство; оральная иммунизация; секвенирование; молекулярно-генетический анализ; филогенетический анализ геномов вируса бешенства.

Для цитирования: Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Елаков А.Л., Кочергин-Никитский К.С., Алипер Т.И., Чучалин С.Ф., Гулюкин А.М. Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (4):186-192.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-186-192

Zaykova O.N.¹, Grebennikova T.V.¹, Elakov A.L.¹, Kochergin-Nikitsky K.S.¹, Aliper T.I.¹, Chuchalin S.F.², Gulyukin A.M.³

MONITORING OF RABIES IN WILD ANIMALS IN THE KIROV REGION AFTER ORAL IMMUNIZATION

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation; ²The Veterinary Department of the Kirov Region, Kirov, 610046, Russian Federation; ³Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary, Moscow, 109428, Russian Federation

This work presents the results of the molecular genetic research on genomes of field isolates of the rabies virus circulating in the territory of the Kirov region in order to analyze the phylogenetic relationship between the wild isolate genomes and to determine the possible reversion of the vaccine strain of the rabies virus used in the oral vaccine to virulent variant. We studied 24 brain samples from wild carnivores shot after oral immunization of the area with Rabivak–O/333. A bait with the vaccine provided by the Veterinary Service of the Kirov was also studied. All samples were found to be positive for the presence of the rabies virus as established by FAT and RT-PCR techniques. Phylogenetic analysis of *N* genome fragments of the rabies virus showed that the field isolates from the Kirov regions were genetically close to the field isolates from Buryatia 2012. Analysis of *G* genome fragments showed that the Kirov field isolates were close to the isolates from Lipetsk (2011), as well as to the Ukrainian isolates (2006 and 2010). Molecular genetic analysis of the gene fragments *N* and *G* for the field isolates and fragments of the genome of the rabies virus vaccine did not reveal any reversion to the virulent vaccine strain.

Для корреспонденции: Гребенникова Татьяна Владимировна, д-р биол. наук, проф., рук. лаб. молекулярной диагностики, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: t_grebennikova@mail.ru