

- 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.Р. 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

Key words: rabies; oral immunization; sequencing; molecular-genetic research; phylogenetic analysis of the genomes fragments of the rabies virus.

For citation: Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Elakov A.L., Kochergin-Nikitsky K.S., Aliper T.I., Chuchalin S.F., Gulyukin A.M. Monitoring of rabies in wild animals in the Kirov region after oral immunization. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(4):186-192. (In Russ.).

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

For correspondence: Tatyana V. Grebennikova, PhD., professor, head of the laboratory of molecular diagnostics D.I. Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: t_grebennikova@mail.ru

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

Funding. Support for the research was carried out with the help of the state budget.

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

Received 15 January 2016

Accepted 26 January 2016

Введение

Бешенство – инфекционное заболевание, вызываемое вирусом бешенства *Rabies virus* рода *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. По оценке ВОЗ, бешенство входит в пятерку инфекционных болезней, общих для человека и животных, наносящих наибольший социальный и экономический ущерб. В Российской Федерации обстановка по бешенству остается неблагоприятной. Так, в течение 2014 г. зафиксировано 2096 очагов бешенства, заболело 2315 животных. Наибольшее число неблагоприятных пунктов зарегистрировано в Белгородской (125), Липецкой (119), Саратовской (124) областях и Республике Татарстан (118). В первом квартале 2015 г. зафиксировано 1008 вспышек бешенства, во время которых заболело и пало 1201 животное. Бешенство животных установлено на территориях 58 субъектов РФ [1, 2].

Вирус бешенства вызывает специфический энцефалит (воспаление головного мозга) и является единственным из царства *Vira*, поражающим всех теплокровных животных, в том числе человека, с летальностью 100%. Вирионы имеют пулевидную форму, их длина составляет в среднем 180 нм, диаметр – 75 нм. Вирион состоит из несегментированного генома, представленного одной молекулой спиралеобразно скрученной негативной РНК, и 5 структурных белков: нуклеопротеина (N), фосфопротеина (P), матричного белка (M), гликопротеина (G) и РНК-зависимой РНК-полимеразы или большого белка (L – large protein). Геномная РНК неинфекционна [3, 4].

Вирус передается главным образом со слюной при укусе больным животным. Основными переносчиками бешенства являются дикие плотоядные. Диагностика бешенства, как правило, проводится посмертно. Прижизненное и посмертное подтверждение диагноза бешенства может осуществляться путем применения различных диагностических методов, направленных на выявление целого вируса, вирусных антигенов или нуклеиновых кислот в инфицированных тканях (мозге, коже, моче или слюне) [3, 4].

Предупреждение распространения бешенства включает контроль численности основных носителей вируса в природе и бездомных домашних животных, а также их иммунизацию с целью создания зоны, свободной от вируса [5, 6].

Программа оральной вакцинации должна длиться минимум 5 лет. Приманки с вакциной распределяют 2 раза в год, весной и осенью, из расчета 20 приманок на 1 км², используя вертолеты или небольшие самолеты с приборами GPS-навигации. Затем проводят контрольный отстрел животных. Методом флюоресцирующих антител (МФА) исследуют пробы мозга животных на наличие вируса бешенства. Напряженность иммунитета оценивают с использованием иммуноферментного анализа, реакции нейтрализации и других методов, рекомендованных ВОЗ.

Ранее в странах Европы и Канаде были выявлены случаи бешенства диких плотоядных, ассоциированного с ревертировавшим вакцинным штаммом. В 2012 г. в нашей стране

появилась оральная вакцина Рабивак-О/333 из авирулентного штамма ERAG333 [7–9].

Для контроля антирабических мероприятий и профилактики бешенства необходимо исследовать случаи этого заболевания на неблагоприятных по нему территориях и на территориях, где проводилась оральная иммунизация, исследовать первичную структуру геномов полевых изолятов вируса бешенства [10]. Данная работа посвящена молекулярно-генетическим исследованиям полевых изолятов, циркулирующих в Кировской области. Работа велась в двух направлениях и включала:

1) филогенетический анализ полевых изолятов, а именно сравнение первичной структуры фрагментов геномов полевых изолятов вируса бешенства и изолятов, выделенных в других областях, с референсными штаммами вируса бешенства, представленными в Национальном центре биотехнологической информации (NCBI);

2) молекулярно-генетическое исследование полевых изолятов в Кировской области, полученных после оральной вакцинации, с целью проследить появление маркерных мутаций, связанных с реверсией вакцинного штамма к вирулентному.

Материал и методы

Для исследования Кировской ветеринарной службой были предоставлены 24 образца мозга диких животных (23 от лисиц и 1 от енотовидной собаки) и приманка с вакциной Рабивак-О/333. Из ткани мозга этих животных готовили мазки на предметных стеклах и исследовали с помощью МФА с использованием антирабического моноклонального ФИТЦ-иммуноглобулина фирмы «Fujirebio» (США) и набора антирабического флюоресцирующего иммуноглобулина (Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности, Щелковский район) согласно ГОСТу 26075-2013. Окрашенные препараты просматривали микроскопированием.

Выделение РНК. РНК выделяли из 200 мкл 10% суспензии мозга с применением коммерческого препарата TRI® Reagent («Sigma Aldrich») по методике производителя и ресуспендировали в 30–50 мкл деионизированной воды при 55°C, периодически перемешивая пробы пипетированием. РНК (5 мкл) использовали для обратной транскрипции и получения кДНК.

Проведение обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции (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 Tris HCl; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 1% Triton x100; по 10 pM каждого праймера; 2,5 mM dNTPs; 2 ед. Taq-полимеразы. В нее вносили 5 мкл кДНК. Нуклеотидные последовательности праймеров для ПЦР и секвенирования участка гена *N* были взяты из работы Heaton и соавт. (1997).

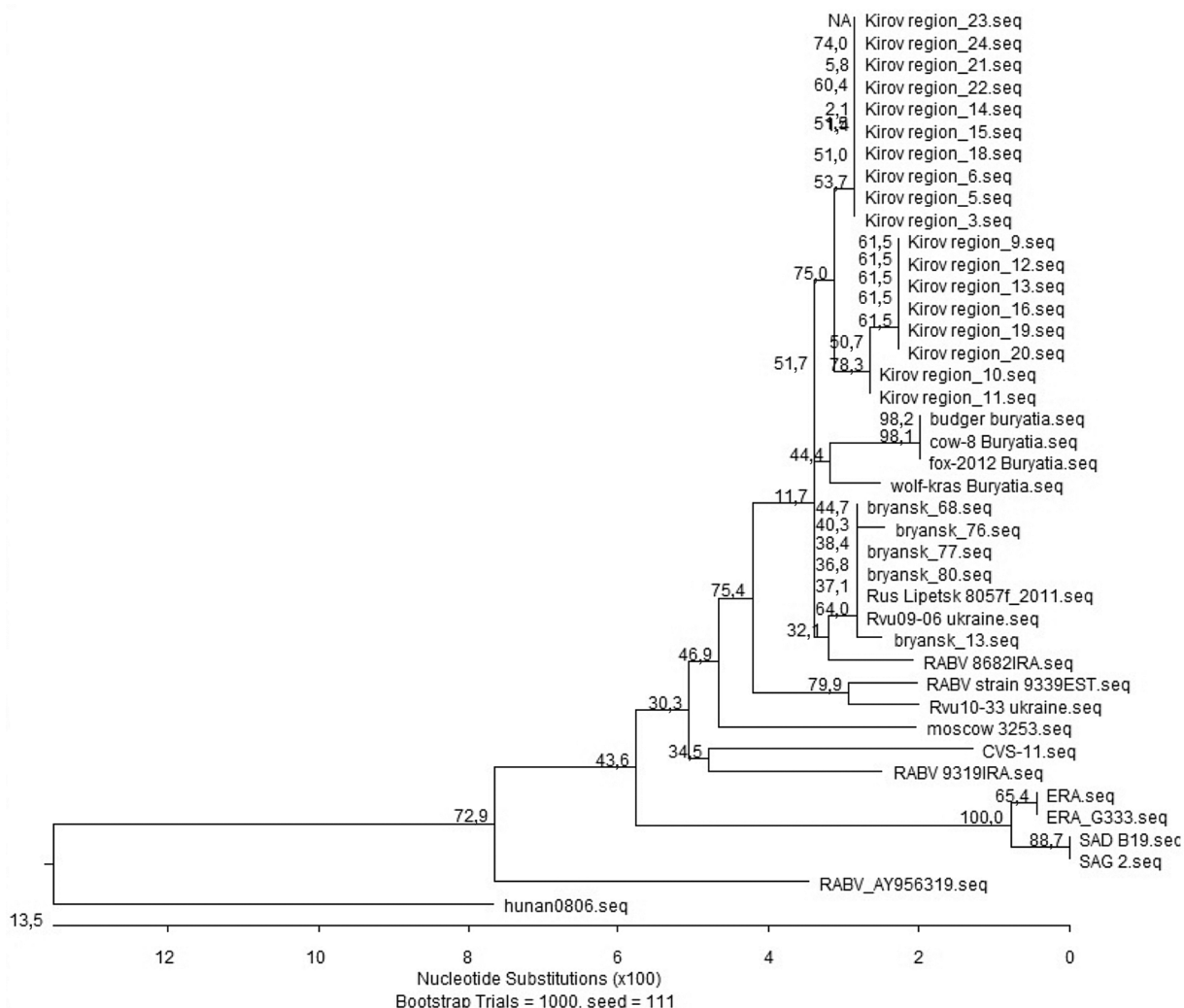


Рис. 1. Филогенетическая дендрограмма, полученная при сравнении фрагментов гена *N* исследуемых изолятов, вакцинного штамма ERA G333 и других вакцинных штаммов и полевых изолятов, представленных в NCBI.

Очистка ПЦР-фрагментов. 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 Big Dye® Terminator v. 3.1 Ready Reaction Kit («Applied Biosystems»), затем продукты амплификации переосаждали для последующего секвенирования с использованием автоматического секвенатора Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей применяли пакет программ DNASTAR v. 3.12 («Lasergene Inc.», США) и Bio Edit 7.0.1.

Результаты

Первым этапом было проведение исследований с применением МФА. Результаты показали, что все образцы содержат вирус бешенства. Результаты применения МФА были подтверждены в ОТ-ПЦР. ПЦР-продукты секвенировали и получили первичную структуру фрагментов генов *N* и *G* вируса бешенства.

Полученные последовательности фрагментов генов *N* и *G* полевых изолятов и образца вакцины сравнивали между собой, с последовательностями изолятов из других регионов и

с референсными штаммами, представленными в базе данных GeneBank NCBI. В результате были получены филогенетические дендрограммы (рис. 1, 2).

При анализе филогенетической дендрограммы, полученной на основании фрагментов гена *N* (см. рис. 1), установлено, что полевые изоляты, циркулирующие на территории Кировской области, образуют 1 группу, состоящую из 2 близких кластеров.

Анализ фрагментов гена *G* показал, что кировские изоляты образуют 2 отдельные группы, разделенные изолятом, выделенным в 2011 г. в Липецке, а также украинскими изолятами 2006 и 2010 гг. (см. рис. 2). Брянские изоляты по данному участку генома не были исследованы.

Следующим этапом исследования был молекулярно-генетический анализ полевых изолятов из Кировской области, полученных после оральной вакцинации, с целью проследить появление маркерных мутаций, связанных с реверсией вакцинного штамма к вирулентному.

Исследуемый участок гена *N* составил 270 нуклеотидов, кодирующих 90 аминокислот (аминокислотные остатки – а. о.). При сравнении последовательностей фрагмента гена *N* полевых изолятов и штамма ERA G333 было выявлено 5 аминокислотных отличий на сравнительно коротком участке.

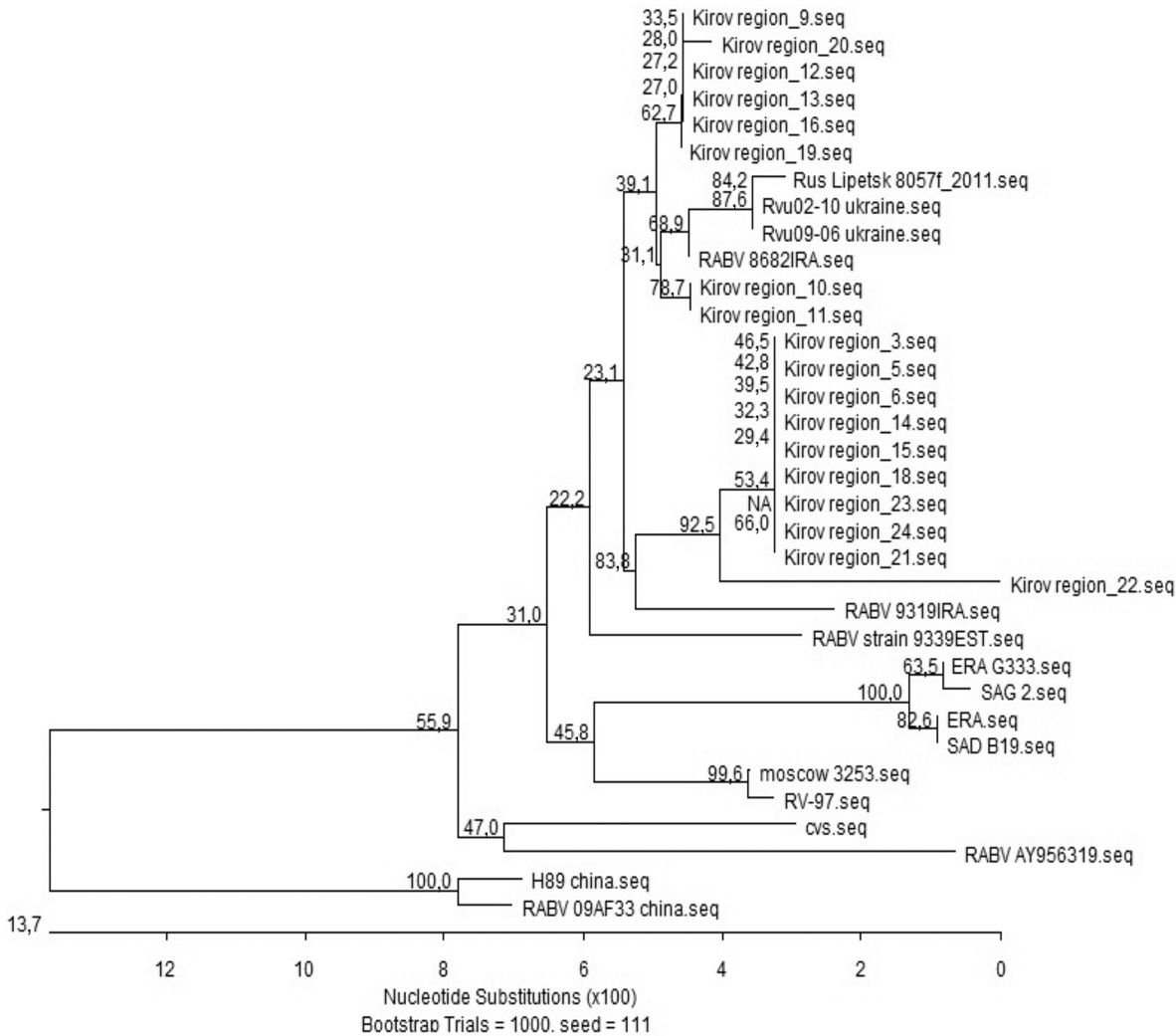


Рис. 2. Филогенетическая дендрогрaмма, полученная при сравнении фрагментов гена G исследуемых изолятов, вакцинного штамма ERA G333 и других вакцинных штаммов и полевых изолятов, представленных в NCBI.

Исследуемый участок гена G составил 235 нуклеотидов, кодирующих 78 аминокислот. При сравнении последовательностей фрагмента гена G полевых изолятов и штамма ERA G333 в большинстве образцов было выявлено 4 аминокислотных отличия, в пробах № 10 и 11 – по 2 идентичных замены.

По аминокислотному составу фрагмента гена N кировские изоляты абсолютно идентичны изоляту RABV 8682IRA, что подтверждает результаты филогенетического анализа (рис. 3).

Существует достаточно близкое сходство по аминокислотному составу фрагмента белка N с изолятами из Бурятии и Брянска. Аминокислотная последовательность фрагмента белка G на заданном участке исследуемых изолятов близка и к RABV AY956319, и к RABV 8682IRA. Проба № 22 имеет 3 аминокислотных отличия от остальных образцов и указанных выше изолятов (рис. 4). Исследование аминокислотной последовательности кировских изолятов подтверждает их филогенетическую близость к изолятам из Липецка и Украины.

Обсуждение

Проведено исследование образцов мозга животных, отстреленных на территории Кировской области после прове-

дения там антирабических мероприятий. С помощью МФА и ОТ-ПЦР было установлено, что во всех образцах присутствует вирус бешенства. Главной задачей нашей работы было определить появление маркерных мутаций, связанных с реверсией вакцинного штамма ERA G333 к вирулентному. В результате секвенирования ПЦР-продуктов была получена первичная структура фрагментов генов N и G вируса бешенства полевых изолятов и вакцинного штамма, проведен анализ последовательностей нуклеотидов и аминокислот в сравнении с референсными штаммами и изолятами, выделенными на других территориях.

Как известно, ген N, кодирующий нуклеопротеин, является более консервативным для всех представителей рода *Lyssavirus*, чем ген G, кодирующий белок оболочки гликопротеин [2]. Для некоторых образцов были получены фрагменты генов размером около 100 нуклеотидных пар (н. п.), что объясняется крайне малым количеством вируса в материале. Данные образцы впоследствии были исключены при построении филогенетической дендрогрaммы, поскольку нуклеотидная последовательность коротких участков не имела существенных отличий от таковой у фрагментов других образцов.

В ходе исследования было установлено, что практически все кировские изоляты генетически близки к изолятам, цир-

ORIGINAL RESEARCH

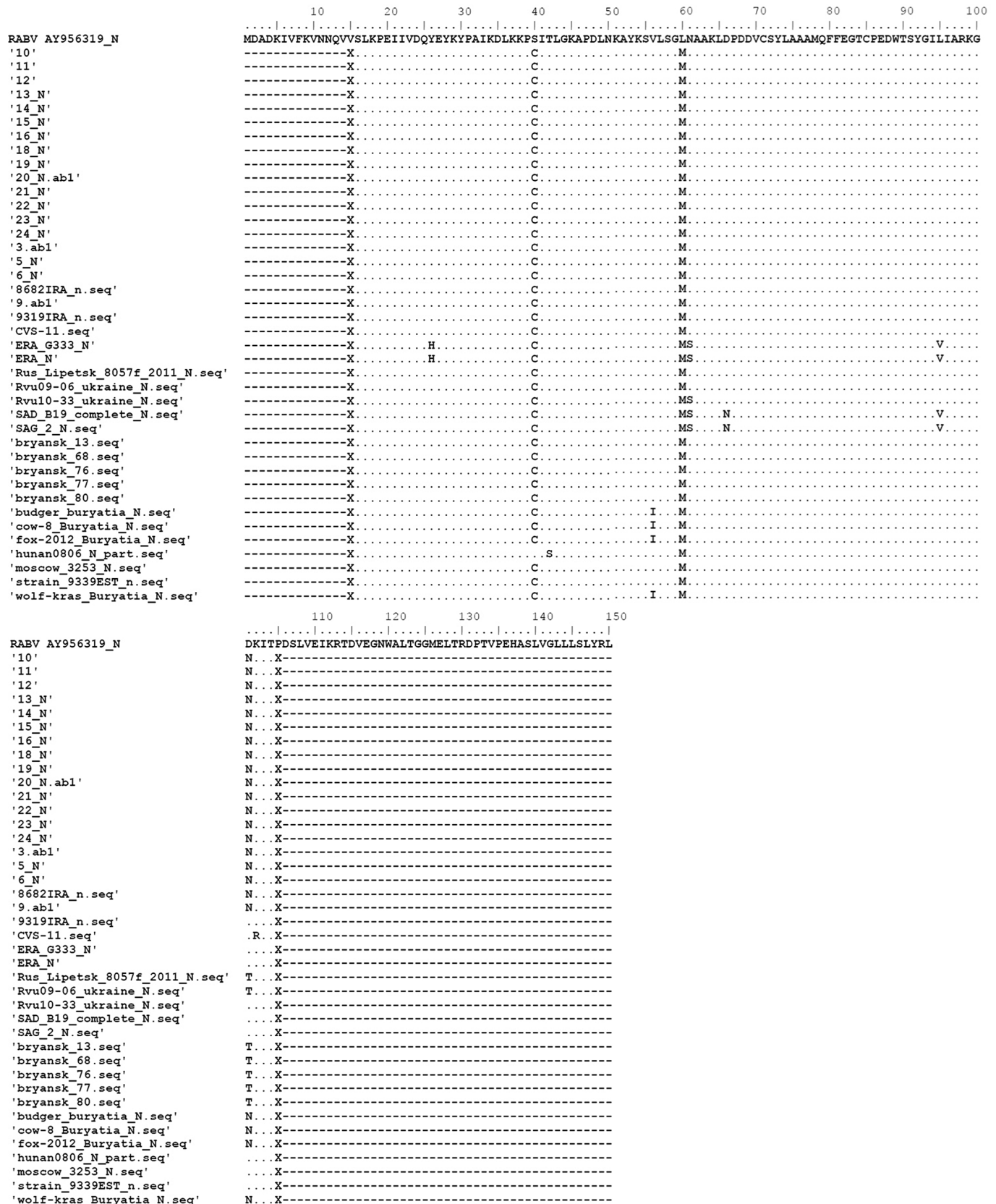


Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей фрагмента белка N изолятов из Кировской области с последовательностями референсных штаммов и полевых изолятов, представленных в NCBI.

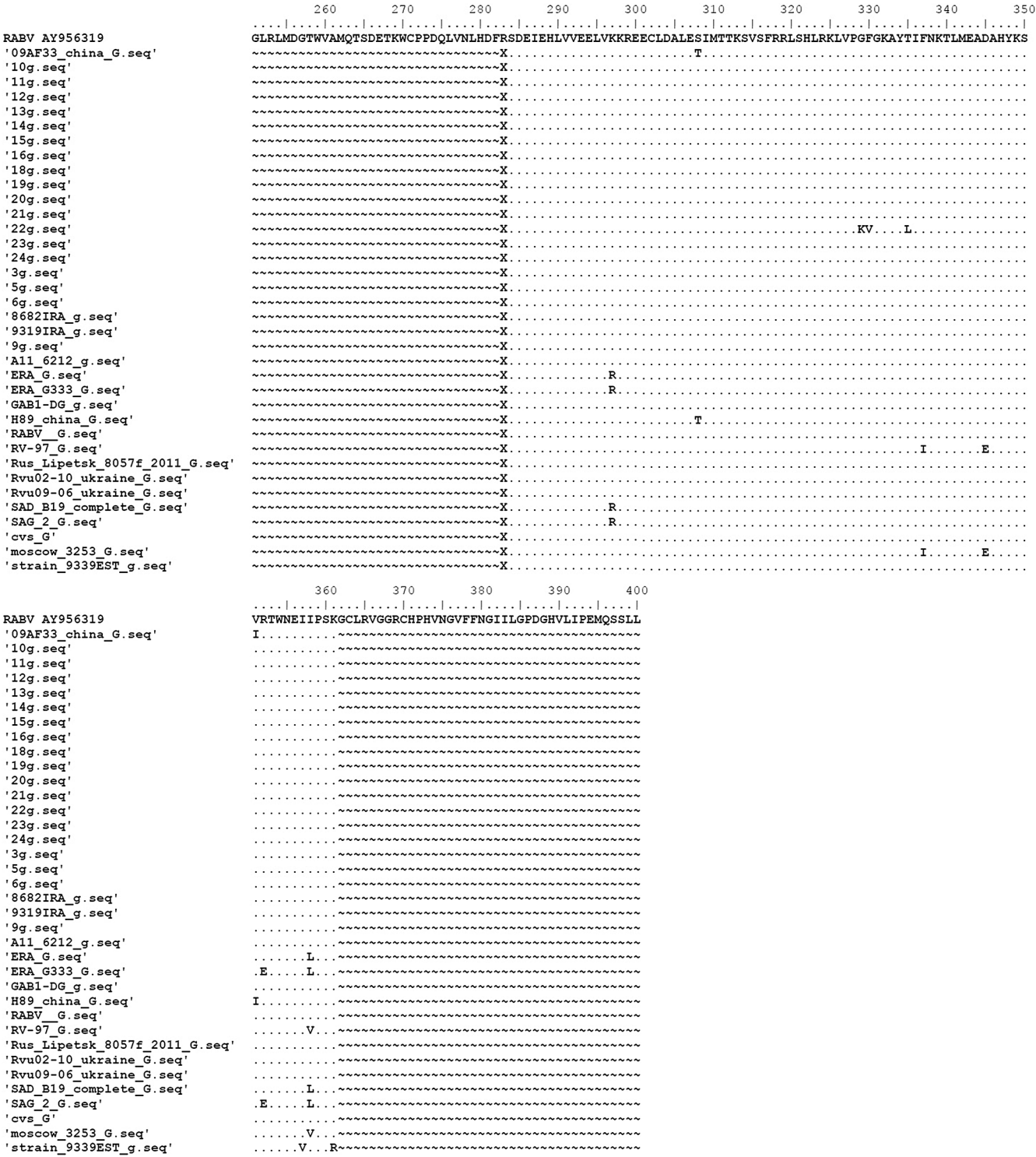


Рис. 4. Сравнение аминокислотных последовательностей фрагмента белка G изолятов из Кировской области с последовательностями референсных штаммов и полевых изолятов, представленных в NCBI.

кулировавшим в Бурятии в 2012 г. В 2014 г. были проведены исследования полевых изолятов, циркулирующих в Брянской области, где также проводилась оральная вакцинация [10]. Полевые изоляты из Брянской области образуют отдельную группу, генетически близкую к изолятам, выделенным в 2011 г. в Липецке, а также к украинскому изоляту 2009 г.

Ранее исследовали российские изоляты в сравнении с изолятами, циркулирующими в близлежащих европейских странах, и результаты подтверждают распределение изолятов по географическому принципу [11, 12]. Кроме того, представляется интересной идентичность аминокислотной последовательности на заданном участке кировских изолятов и изолята RABV 8682IRA, выделенного в Иране [13].

Ранее также проводились исследования вакцинных штаммов. Так, А. Метлин и соавт. [14] исследовали российский вакцинный штамм RV-97. Результаты исследования показали, что данный штамм образует отдельную филогенетическую ветвь на дендрограмме, имеет уникальные замены и не ревертирует к полевым изолятам.

В случае исследования нуклеотидной последовательности фрагментов генов *N* и *G* кировских изолятов соответствующие последовательности генов вакцинного штамма ERAG333 генетически достаточно далеко отстоят от таковых у полевых изолятов вируса бешенства (см. рис. 1 и 2).

При сравнении со штаммом ERAG333, выделенным из вакцины, выявлены замены в последовательностях аминокислот фрагментов генов *N* и *G*. Согласно данным предыдущих исследований, скорость мутирования составляет $1,4 \cdot 10^{-4}$ замены на сайт в год [15]. Это может означать, что штамм, выделенный из вакцины, не является родоначальником вирусов, выделенных из исследуемых образцов.

Накопление вирусных мутаций в геномах полевых изолятов, особенно на территориях проведения оральной вакцинации, может изменить структуру данных геномов. Несомненно, необходимо регулярно проводить молекулярно-генетические исследования как полевых изолятов, так и используемых живых вакцин. Исследование, выполненное нами в Кировской области, показало, что в данном случае реверсия вакцинного штамма отсутствует, так как выявлены существенные геномные различия между исследуемыми образцами и штаммом ERAG333, используемым в вакцине.

Финансирование. Поддержка исследования осуществлялась с помощью государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 8, 9, 12–14 см. REFERENCES)

1. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору. Available at: www.fsvps.ru.
2. Всемирная организация здравоохранения. Available at: <http://www.who.int/ru>.
3. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство»; 2013.
4. Васильев Д.А., Луговцев В. Ю., ред. *Вирусы вызывающие болезни обиче для многих видов сельскохозяйственных животных. Курс лекций по вирусологии. Часть вторая*. Ульяновск; 2004.
5. Сливко И.А., Сафонов Г.А., Хрипунов Е.М., Гогин А.Е., Жестерев В.И., Баньковский Д.О. Возможные причины неудачи оральной антирабической иммунизации диких плотоядных животных в Российской Федерации. *Ветеринария*. 2013; (10): 27–31.
6. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Цареградский П.Ю., Паршикова А.В., Южаков А.Г., Зайкова О.Н. Анализ текущей эпизоотической ситуации по бешенству на территории Российской федерации. *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2015; (4): 5–8.
7. Баньковский Д.О. *Иммунобиологические свойства штамма ERAG 333 вируса бешенства для изготовления оральной антирабической вакцины: Дисс. ... канд. вет. наук*. Щелково; 2010.
8. Елаков А.Л., Зайкова О.Н., Кочергин-Никитский К.С., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И. Мониторинг бешенства у диких животных в Брянской области. *Ветеринария*. 2015; (1): 11–4.
9. Метлин А.Е. *Молекулярно-биологические характеристики полевых изолятов и аттенуированных штаммов вируса бешенства: Дисс. ... канд. вет. наук*. Владимир; 2004.
10. Чупин С.А., Чернышова Е.В., Метлин А.Е. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Российской Федерации в период 2008–2011 гг. *Вопросы вирусологии*. 2013; (4): 44–9.
11. The Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance. Available at: www.fsvps.ru. (in Russian)
12. World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/ru>. (in Russian)
13. L'vov D.K., ed. *Guidelines for Virology: Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных]*. Moscow: ООО «Izdatel'stvo «Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo»; 2013. (in Russian)
14. Vasil'ev D.A., Lugovtsev V.Yu., eds. *The Virus Causes Disease Common to Many Species of Animals. Course of Lectures on Virology. Part II [Virussy vyzyvayushchie bolezni obshchie dlya mnogikh vidov sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh. Kurs lektсий po virusologii. Chast' vtoraya]*. Ul'yanovsk; 2004. (in Russian)
15. Slivko I.A., Safonov G.A., Khripunov E.M., Gogin A.E., Zhesteriev V.I., Ban'kovskiy D.O. Possible reasons for the failure of oral rabies immunization of wild carnivores in the Russian Federation. *Veterinariya*. 2013; (10): 27–31. (in Russian)
16. Shabaykin A.A., Gulyukin A.M., Tsaregradskiy P.Yu., Parshikova A.V., Yuzhakov A.G., Zaykova O.N. Analysis of the current epizootic situation of rabies in the territory of the Russian Federation. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Sel'skokhozyaystvennyye zhivotnyye*. 2015; (4): 5–8. (in Russian)
17. Ban'kovskiy D.O. *Immunobiological Properties ERAG 333 Strain of Rabies Virus for the Manufacture of an Oral Rabies Vaccine: Diss.* Shchelkovo; 2010. (in Russian)
18. Fehlnher-Gardiner C., Nardine-Davis S., Armstrong J., Muldoon F., Bachmann P., Wandeler A. Era vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989–2004. *J. Wildl. Dis.* 2008; 44 (1): 71–85.
19. Müller T., Bätza H.J., Beckert A., Bunzenthall C., Cox J.H., Freuling C.M. et al. Analysis of vaccine-virus-associated rabies cases in red foxes (*Vulpes vulpes*) after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria. *Arch. Virol.* 2009; 154 (7): 1081–91.
20. Elakov A.L., Zaykova O.N., Kochergin-Nikitskiy K.S., Grebennikova T.V., Aliper T.I. Monitoring of rabies Wild animals in the Bryansk region. *Veterinariya*. 2015; (1): 11–4. (in Russian)
21. Metlin A.E. *Molecular Biological Characteristics of Field Isolates and Attenuated Strains of Rabies Virus: Diss.* Vladimir; 2004. (in Russian)
22. Metlin A.E., Rybakov S., Gruzdev K., Neuvonen E., Huovilainen A. Genetic heterogeneity of Russian, Estonian and Finnish field rabies viruses. *Arch. Virol.* 2007; 152 (9): 1645–54.
23. Pant G.R., Lavenir R., Wong F.Y., Certoma A., Larrous F., Bhatta D.R. 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.
24. 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.
25. Chupin S.A., Chernyshova E.V., Metlin A.E. Genetic characterization of field isolates of rabies virus identified in the territory of the Russian Federation in 2008–2011. *Voprosy virusologii*. 2013; (4): 44–9. (in Russian)

Поступила 15.01.16

Принята в печать 26.01.16