



Сравнительная молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства (*Rabies lyssavirus*, *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*), циркулировавших на территории Российской Федерации в период с 1985 по 2016 год

Зайкова О.Н.^{1,2}, Гребенникова Т.В.^{1,2}, Лосич М.А.¹, Елаков А.Л.¹, Гулюкин А.М.³, Метлин А.Е.⁴

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

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия;

³ ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко Российской академии наук». 109428, г. Москва, Россия;

⁴ ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», 123022, г. Москва, Россия

Бешенство – древнейшая инфекция, вызываемая нейротропным вирусом рода *Lyssavirus*, семейства *Rhabdoviridae*, который поражает всех теплокровных позвоночных. Гомология последовательностей аминокислот нуклеопротеина среди лиссавирусов 78–93%.

Целью данного исследования было изучение генетического разнообразия и молекулярной эпидемиологии лиссавирусов, циркулировавших на территории РФ с 1985 по 2016 г.

Материал и методы. Исследовано 54 изолята вируса бешенства, выделенных от животных, 2 изолята, выделенных от людей, и 4 вакцинных штамма вируса бешенства: RV-97, ERA, Shchelkovo 51, ERAG333. Филогенетический анализ проводили с использованием данных GenBank о фрагментах геномов 73 изолятов вируса бешенства и 9 изолятов EBLV-1. Для исследования использовали программы DNASTAR V.3.12, Bio Edit 7.0.4.1 и MEGA v. 10.0.5, Primer Premier 5.

Результаты. Сравнительный молекулярно-генетический анализ фрагментов геномов 130 лиссавирусов, выделенных на территории РФ и Украины, а также вакцинных штаммов вируса бешенства показал их распределение по географическому признаку. Сравнение фрагментов нуклеопротеина изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории РФ и Украины, с вакцинными штаммами выявило 4 маркерных мутации: V56I (для Евразийской группы), LV95W (для Центральной группы), D101N/S/T, N/G106D. Филогенетический анализ изолята «Julii», выделенного в 1985 г. от человека, укушенного летучей мышью, и опisanного М.А. Селимовым и С.В. Грибенча, доказал его принадлежность к европейскому лиссавирусу летучих мышей (подгруппе 1a).

Обсуждение. Изучение молекулярной эпидемиологии бешенства в пределах РФ позволяет проводить генотипирование вируса (распределение по группам, выявление маркерных мутаций, генотипирование изолята «Julii»). Это помогает изучать скрытые механизмы рабической инфекции в популяции животных и человека, а также характеризовать вакцинные штаммы, в том числе при оральной вакцинации.

Заключение. Необходимо дальнейшее изучение молекулярной эпидемиологии бешенства в пределах РФ и граничащих с ней стран.

Ключевые слова: бешенство; лиссавирусы; филогенетический анализ; секвенирование; эпизоотический процесс.

Для цитирования: Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Лосич М.А., Елаков А.Л., Гулюкин А.М., Метлин А.Е. Сравнительная молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства (*Rabies lyssavirus*, *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*), циркулировавших на территории Российской Федерации в период с 1985 по 2016 год. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(1): 41-48.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-41-48>

Для корреспонденции: Зайкова Ольга Николаевна, науч. сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», мл. науч. сотрудник ФГАОУ ВО «РUDН», 117198, г. Москва.

E-mail: zaykova_o_n@mail.ru

Финансирование. Публикация подготовлена при поддержке Программы «5-100» ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гребенникова Т.В.; сбор и обработка материалов – Зайкова О.Н., Гулюкин А.М., Елаков А.Л.; статистическая обработка – Зайкова О.Н.; написание текста – Зайкова О.Н., Лосич М.А.; редактирование – Гребенникова Т.В., Гулюкин А.М., Метлин А.Е.

Поступила 19.01.20

Принята в печать 29.01.20

Comparative molecular and genetic characterization of rabies viruses (*Rabies lyssavirus*, *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*) circulated in the Russian Federation in 1985–2016

Zaykova O.N.^{1,2}, Grebennikova T.V.^{1,2}, Losich M.A.¹, Elakov A.L.¹, Gulyukin A.M.³, Metlin A.E.⁴

¹ National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russia;

³ All-Russian Scientific and Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 109428, Russia;

⁴ All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed, Moscow, 123022, Russia

Introduction. Rabies caused by the neurotropic virus of the genus *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae* family, which infects all warm-blooded vertebrates including human beings. The homology level of the amino acid sequences for *Lyssaviruses* nucleoprotein reaches 78–93%.

Aim – study the genetic diversity and molecular epidemiology of *Lyssaviruses* circulated in the Russian Federation in 1985–2016.

Material and methods. 54 isolates of rabies virus isolated from animals, and 2 isolates from humans, 4 vaccine strains of rabies virus: RV-97, ERA, Shchelkovo 51, ERAG333 used in phylogenetic study. Phylogenetic analysis was performed using Genbank data on genome fragments of 73 rabies virus isolates and 9 EBLV-1 isolates. DNASTAR V.3.12, Bio Edit 7.0.4.1 and MEGA v.10.0.5, Primer Premier 5 programs have been used.

Results. Comparative molecular genetic analysis of genomes fragments of 130 *Lyssaviruses*, isolated on the territory of the RF, Ukraine in 1985–2016, vaccine strains of rabies virus, showed their distribution by geographical feature. Comparison of the nucleoprotein fragments of the rabies virus isolates with vaccine strains revealed 4 marker mutations: V56I (Eurasian group), L/V95W (Central group), D101N/S/T, and N/G106D. Phylogenetic analysis of the isolate «Juli», isolated from a human bitten by a bat proved his belonging to the European Bat *lyssavirus*-1a.

Discussion. Study of the molecular epidemiology of rabies within the Russian Federation allows for the genotyping of the viruses and helps to study the hidden mechanisms of rabies infection in animal and human populations, and to characterize vaccine strains, including during oral vaccination.

Conclusion. Further study of the molecular epidemiology of rabies within the Russian Federation and the countries bordering it is important.

Keywords: rabies; *lyssaviruses*; phylogenetic analysis; sequencing; epizootic process.

For citation: Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Losich M.A., Elakov A.L., Gulyukin A.M., Metlin A.E. Comparative molecular and genetic characterization of rabies viruses (*Rabies lyssavirus*, *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*) circulated in the Russian Federation in 1985–2016. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2020; 65(1): 41–48. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-41-48>

For correspondence: Olga N. Zaykova, Researcher at the Laboratory of Molecular Diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia; Junior Researcher at the Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russia. E-mail: zaykova_o_n@mail.ru

Information about authors:

Zaykova O.N., <http://orcid.org/0000-0003-4708-2069>

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

Losich M.A., <http://orcid.org/0000-0002-5618-1918>

Elakov A.L., <http://orcid.org/0000-0001-5798-6518>

Gulyukin A.M., <https://orcid.org/0000-0003-2160-4770>

Metlin A.E., <https://orcid.org/0000-0002-4283-0171>

Acknowledgments. The publication was prepared with the support of the « Peoples' Friendship University Program 5-100».

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

Contribution: research concept and design – Grebennikova T.V.; collection and processing of materials – Zaykova O.N., Gulyukin A.M., Elakov A.L.; statistical processing – Zaykova O.N.; spelling text – Zaykova O.N., Losich M.A.; editing – Grebennikova T.V., Gulyukin A.M., Metlin A.E.

Received 19 January 2020

Accepted 29 January 2020

Введение

Бешенство – одна из древнейших инфекций, возбудителем которой является нейротропный вирус рода *Lyssavirus*, семейства *Rhabdoviridae*. Вирус классического бешенства (*Rabies virus*) поражает всех теплокровных позвоночных. Геном вируса бешенства представлен молекулой РНК отрицательной полярности и имеет 5 открытых рамок считывания, располагающихся в геноме в следующем порядке: 3'-N-P-M-G-L-5' [1–3].

По данным Международного комитета по таксономии вирусов, род *Lyssavirus* в настоящее время насчи-

тывает 16 видов, переносчиками для 13 видов могут являться рукокрылые млекопитающие, 7 видов лиссавирусов были обнаружены у людей (*Rabies virus*, *European bat lyssavirus-1*, *European bat lyssavirus-2*, *Irkut lyssavirus*, *Duvenhage lyssavirus*, *Australian bat lyssavirus*, *Mokola lyssavirus*). Уровень гомологии последовательностей аминокислот нуклеопротеина среди лиссавирусов достигает 78–93%, что имеет важное значение при генотипировании [4–7].

Изучая изоляты вируса бешенства, выделенные на территории бывшего СССР, И.В. Кузьмин и соавт. раз-

делили их на несколько групп: А, В, С, D, UG. Позднее С.А. Чупин и соавт. предложили описать группы как Евразийскую, Северную Европейскую, Центральную Российскую и Кавказскую. Топология филогенетических дендрограмм предложенных классификаций совпадает [7–10].

Так, при исследовании фрагментов геномов изолятов из Республики Саха (Якутия), Аляски (США), Республики Коми в работе С.А. Чупина и соавт. было установлено, что эти изоляты относятся к Арктической группе, подгруппе Арктическая-2. За 20 лет на данном участке генома эта линия вируса, предком которой, предположительно, является штамм SG23, выделенный от песца в 1988 г., не претерпела изменений. В дальнейшем при более тщательных исследованиях молекулярной структуры гена N этого штамма установлена скорость фиксации замен: $1,4 \times 10^{-4}$ замен на сайт в год [7].

Бешенство широко распространено в мире, за исключением островных государств, осуществляющих строгие карантинные и профилактические мероприятия. Резервуаром и источником инфекции в природных очагах являются преимущественно дикие плотоядные, а в антропоургических очагах – обычно собаки и кошки. В свою очередь, бешенство собак является источником 99% случаев заражения человека и представляет потенциальную угрозу более чем для 3,3 млрд человек. В последнее время возросла роль кошки как потенциального звена в передаче вируса бешенства. В мире ежегодно от бешенства умирают 59 тыс. человек в более чем 150 странах. Наиболее распространено бешенство в странах Азии и Африки (95%) [11–14].

Основу профилактики распространения бешенства составляют оральная иммунизация диких плотоядных, вакцинация домашних и бродячих животных. Известно, что штаммы вируса бешенства, используемые для создания оральных вакцин, могут быть остаточными вирулентными по отношению к некоторым видам животных, поэтому важным этапом контроля антирабических мероприятий должен быть сравнительный молекулярно-генетический анализ штаммов вируса бешенства, используемых при создании оральных вакцин, и изолятов, выделенных на территориях, где проводят оральную иммунизацию [15–19].

Изучение молекулярной эпидемиологии бешенства позволяет охарактеризовать популяции вируса, циркулирующие на территории РФ [20].

Цель данного исследования – изучение генетического разнообразия и молекулярной эпидемиологии лиссавирусов, циркулирующих на территории РФ с 1985 по 2016 г.

Материал и методы

Исследуемые образцы. Было исследовано 54 изолята вируса бешенства, выделенных от животных:

- отстрелянных после проведения программы по оральной вакцинации в Брянской и Кировской областях, в том числе 13 изолятов, выделенных от лис, и два – от енота и енотовидной собаки соответственно;

- 39 изолятов, предоставленных лабораторией ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир, Россия) при поддержке лаборатории эпизоотологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, выделенных в Центральном и Приволжском федеральных округах от енотовидной собаки ($n = 7$), собаки ($n = 9$), кошки ($n = 1$), лисы ($n = 18$) и КРС ($n = 4$).

Два изолята: «Shuv» (2002 г., Центральная часть России) и «Juli» (1985 г., Белгород, Россия), выделенных от людей, были получены из коллекции НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского. Ранее они были описаны в работе С.В. Грибенча и соавт. [6] и в обзоре А.Д. Ботвинкина со ссылкой на исследования М.А. Селимова [8].

Для выравнивания нуклеотидных последовательностей и построения филогенетических деревьев использовали первичную структуру фрагментов геномов 73 лиссавирусов, содержащихся в базе данных GenBank (43 изолята выделены от лис, четыре – от собак, один – от енотовидной собаки, восемь – от крупного рогатого скота, четыре – от кошки, один – от барсука, пять – от волка, три – от человека, один – от верблюда, два – от песца, один – от лошади), а также 9 изолятов EBLV-1.

Для молекулярно-генетического анализа также использовали первичную структуру фрагментов геномов вакцинных штаммов: RV-97, ERA, Щёлково 51, ERA G333.

Контроли при проведении МФА и ОТ-ПЦР использовали в соответствии с методикой [21] и ГОСТ 26075-2013.

Специфические олигонуклеотиды. Нуклеотидные последовательности праймеров, фланкирующих фрагмент гена N, были взяты из работы Р. Heaton и соавт., 1997 г. [22], или разработаны в лаборатории (см. таблицу).

Приготовление препаратов. Для подтверждения наличия вируса бешенства в нативных образцах использовали МФА, согласно ГОСТ 26075-2013. Окрашенные препараты просматривали в поле зрения люминесцентного инвертированного микроскопа «Olympus CKX41» (Япония) при увеличении $\times 20$.

Выделение РНК. РНК выделяли из 200 мкл 10% суспензии мозга с применением коммерческого препарата TRI Reagent® (Sigma Aldrich, США) по методике, рекомендованной производителем.

Проведение ОТ-ПЦР. Первым этапом было получение кДНК из РНК, затем проводили ПЦР. Объём реакционной смеси в нашей модификации составил 40 мкл, вносили 10 мкл кДНК. Учёт реакции проводили методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле.

Секвенирование ПЦР-фрагментов. Образцы очищали из агарозного геля с помощью набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas, США) согласно инструкции производителя и секвенировали. Реакцию проводили на амплификаторе Mastercycler Gradient (Eppendorf, Германия) с применением BigDye® Terminator v 3.1 Ready Reaction kit (Applied Biosystems, США), затем продукты амплификации пересаждали для последующего секвенирования с использованием автоматического секвенатора Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer (США).

Олигонуклеотиды, фланкирующие фрагмент гена N вируса бешенства, используемые в исследовании

The nucleotide sequences of the primers flanking the N gene fragment of the Rabies virus using in this study

Источник Reference	Праймер Primer	Последовательность Sequence	Позиция в геноме Genome position
P. Heaton и соавт. [22]	JW12	5'-ATGTAACACC(C/T)CTACAATTG-3'	55–73
P. Heaton, et al. [22]	JW6 (DPL)	5'-CAATTCGCACACATTTTGTG-3'	660–641
	JW6 (E)	5'-CAGTTGGCACACATCTTGTG-3'	660–641
	JW6 (M)	5'-CAGTTAGCGCACATCTTATG-3'	660–641
	Разработаны в лаборатории Developed in the laboratory	F2	5'-ТААСАСС(С/Т)СТАСААТГГА-3'
	R1	3'-ТАСАСАСГТТААССТСАТГ-5'	647–666

Компьютерный анализ. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей и построения филогенетических деревьев применяли пакет программ DNASTAR V.3.12 (Lasergen Inc., США) и программы Bio Edit 7.0.4.1 [23], MEGA v.10.0.5 [24]; для подбора специфических олигонуклеотидов пользовались программным обеспечением Primer Premier 5 (Premier Biosoft int., США) [25].

Результаты

Проверка изолятов, выделенных от животных и человека, методами МФА и ПЦР выявила вирус бешенства и фрагменты его генома.

Далее сравнивали нуклеотидные и аминокислотные последовательности полученных фрагментов с использованием ранее полученных данных [26–28] и базы данных GenBank.

Сравнение полученных фрагментов нуклеопротеина изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории РФ и Украины, с вакцинными штаммами выявило 4 маркерных позиции: V56I, L/V95W, D101N/S/T, N/G106D. Размер исследуемого участка фрагмента гена N составил 439 нуклеотидных остатков (н.о., положение в гене 100–538 н.о.), кодирующих порядка 146 аминокислот.

Так, абсолютное большинство изолятов из республик Алтай, Хакасия, из Красноярска, Омска, республик Тыва и Бурятия имеют в 56-й позиции аминокислоту изолейцин вместо валина. Изоляты из Центральной части России (Центральной группы вирусов), а именно из Московской, Нижегородской, Владимирской, Тверской и Ярославской областей, в 95-й позиции содержат аминокислоту триптофан, как и изолят «Shuv».

Филогенетический анализ изолятов вируса бешенства, циркулировавших на территории РФ (рис. 1), показал, что «Shuv» относится к Центральной группе вирусов бешенства и по молекулярной структуре близок к изолятам из г. Владимир, Собинского района Владимирской области и Москвы. Все изоляты Центральной группы в 95-й позиции имеют аминокислоту триптофан. Изолят из Украины Rvu 09-06 по молекулярной структуре ближе к изолятам Евразийской группы.

Изоляты Центральной группы вирусов в позиции 101 имеют аспарагиновую аминокислоту, в то время как изоляты Евразийской группы вирусов в дан-

ной позиции могут содержать различные аминокислоты и подразделяются на 2 группы. Первую группу образуют изоляты из республик Алтай и Хакасия, из Красноярска, Омска, Республики Тыва, из Тулы и Кировской области. В 101-й позиции они содержат аминокислоту аспарагин либо серин. К 2-й группе относятся изоляты из Белгорода, Брянской и Нижегородской областей, а также один украинской изолят 09-06_Ukraine, содержащие в 101-й позиции аминокислоту треонин.

Изоляты Центральной группы в 106-й позиции имеют аминокислоту глицин, остальные изоляты, в том числе 4 изолята из Тверской и Владимирской областей, в данной позиции содержат аспарагиновую кислоту.

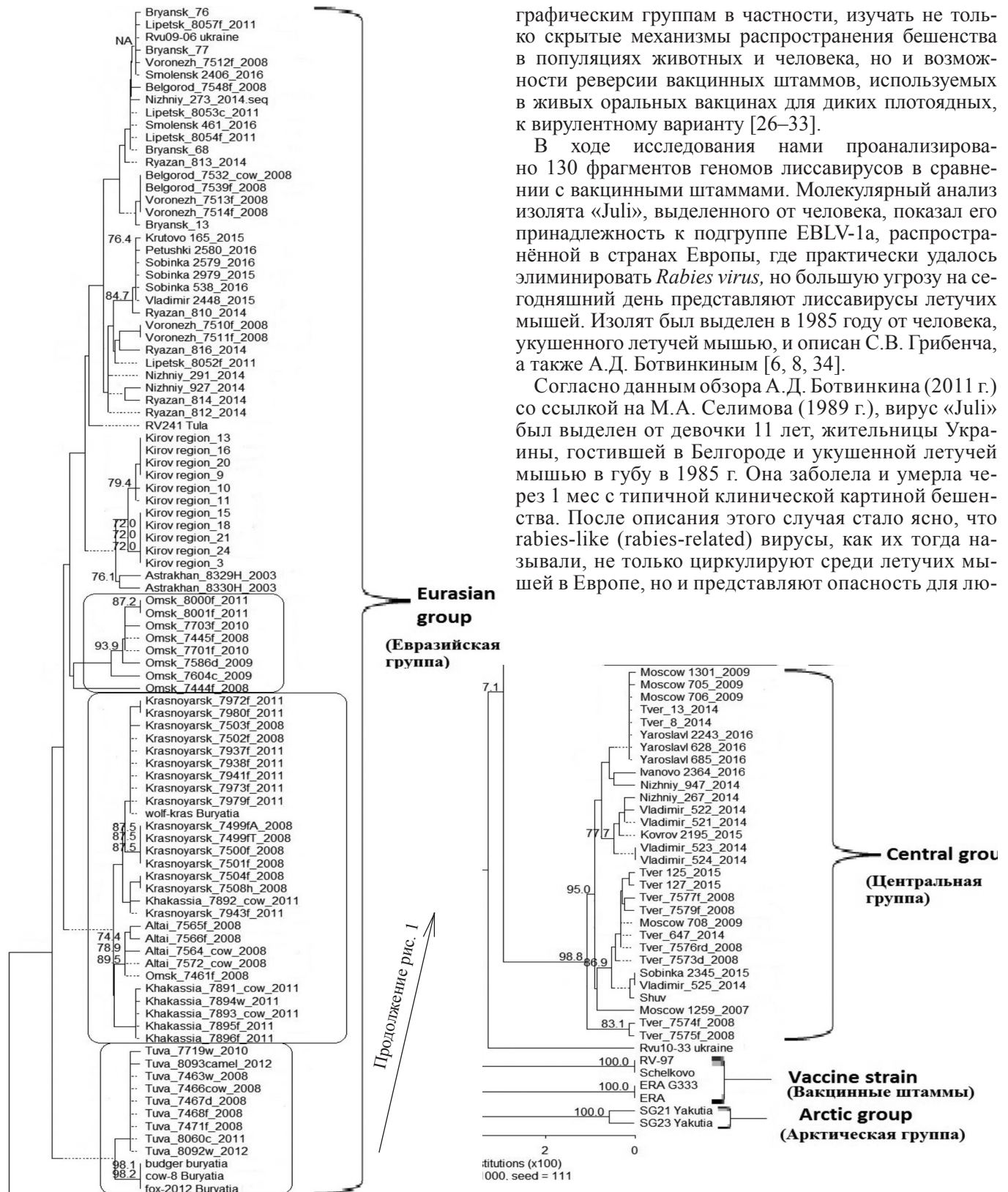
Изоляты Евразийской группы из республик Алтай и Хакасия, из Красноярска, Омска, республик Тыва и Бурятия образуют на филогенетической дендрограмме несколько подгрупп: Омская, группа Красноярск–Хакасия–Алтай, куда входит один изолят из Республики Бурятия и один из Омска, и группа Тыва–Бурятия (см. рис. 1). В целом внутри каждой группы по молекулярной структуре данного фрагмента генома изоляты между собой различаются примерно на 0–2%.

При исследовании изолята «Juli» было установлено, что он относится к европейскому лиссавирусу летучих мышей 1 (EBLV-1). Размер исследуемого фрагмента гена N составил 486 н.о. (положение в гене 100–585), кодирующих 161 аминокислоту. Филогенетический анализ (рис. 2) изолята «Juli» и 9 изолятов EBLV-1 показал, что данный изолят, вероятно, можно отнести к подгруппе EBLV-1a. По молекулярной структуре на заданном участке генома он отличается от других представителей этой подгруппы в 158-й позиции, где содержит аминокислоту лизин вместо аргинина. При этом изоляты подгруппы EBLV-1b имеют 2 маркерных позиции: R8K и H102N, отличающие их от представителей EBLV-1a.

Филогенетический анализ указывает на то, что выделенный в 1968 г. изолят NC 009527 может быть общим предком изолята «Juli» и изолятов, выделенных во Франции в 2003–2008 гг., относящихся к подгруппе EBLV-1a.

Обсуждение

Сравнительно низкая скорость изменчивости молекулярной структуры нуклеопротеина позволяет типировать лиссавирусы и вирус бешенства по гео-



графическим группам в частности, изучать не только скрытые механизмы распространения бешенства в популяциях животных и человека, но и возможности реверсии вакцинных штаммов, используемых в живых оральных вакцинах для диких плотоядных, к вирулентному варианту [26–33].

В ходе исследования нами проанализировано 130 фрагментов геномов лиссавирусов в сравнении с вакцинными штаммами. Молекулярный анализ изолята «Juli», выделенного от человека, показал его принадлежность к подгруппе EBLV-1a, распространённой в странах Европы, где практически удалось элиминировать *Rabies virus*, но большую угрозу на сегодняшний день представляют лиссавирусы летучих мышей. Изолят был выделен в 1985 году от человека, укушенного летучей мышью, и описан С.В. Грибенча, а также А.Д. Ботвинкиным [6, 8, 34].

Согласно данным обзора А.Д. Ботвинкина (2011 г.) со ссылкой на М.А. Селимова (1989 г.), вирус «Juli» был выделен от девочки 11 лет, жительницы Украины, гостившей в Белгороде и укушенной летучей мышью в губу в 1985 г. Она заболела и умерла через 1 мес с типичной клинической картиной бешенства. После описания этого случая стало ясно, что rabies-like (rabies-related) вирусы, как их тогда называли, не только циркулируют среди летучих мышей в Европе, но и представляют опасность для лю-

Рис. 1. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании данных о первичной структуре гена N с помощью MegAlign 7.1.0.

Fig. 1. Phylogenetic tree obtained from the primary structure of the based on partial sequences of N gene fragment of rabies virus isolates with MegAlign 7.1.0

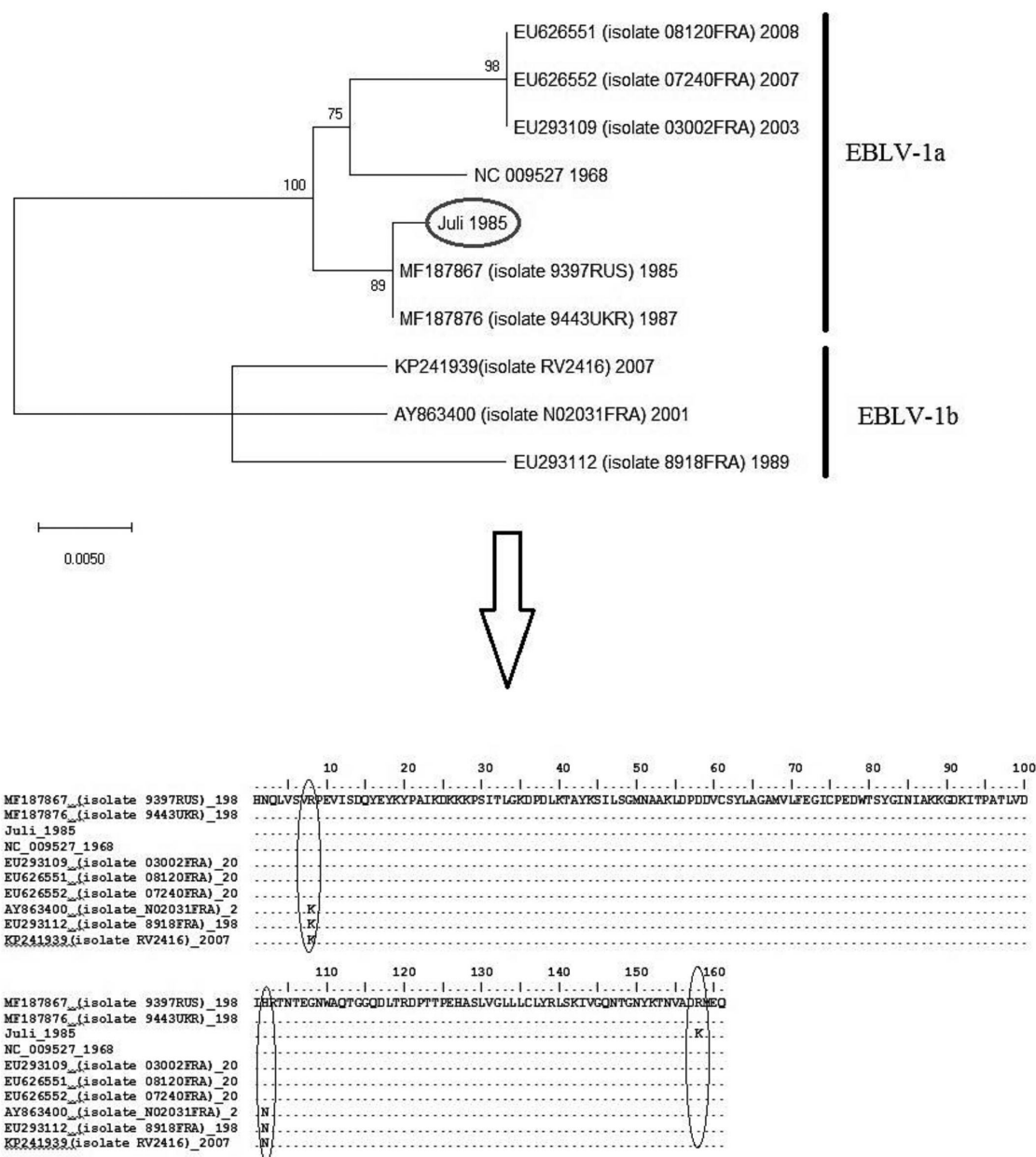


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма изолятов EBLV-1, полученная на основании данных о фрагменте гена N с помощью MEGA v. 10.0.5, и сравнение фрагментов нуклеопротеина EBLV-1.

Fig. 2. Phylogenetic tree obtained from the primary structure of the N gene fragment of EBLV-1 isolates with MEGA v. 10.0.5 and fragment comparison of nucleoprotein of EBLV-1

дей. Ранее был известен только один такой случай в Африке [8]. Интересно, что изучаемый нами изолят «Juli» попадает в одни и те же временные рамки с изолятами 9397RUS (1985 г.) и 9443UKR (1987 г.), которые описаны в работе С. Troupin и соавт. (2017 г.) [35].

Однако при изучении молекулярной структуры фрагментов нуклеопротеина выявлена одна аминокислотная замена, отличающая изолят «Juli» от других представителей EBLV-1. Наличие замены на сравнительно коротком участке (161 а.о.) может свидетельствовать либо о том, что ранее охарактер-

изованный изолят 9397RUS (1985 г.) или 9443UKR (1987 г.) претерпел изменения в серии пассажей через мозг белых мышей, либо о том, что молекулярная структура фрагмента генома вируса «Juli» описана нами впервые в рамках данной работы.

Ранее неоднократно было показано распределение вирусов бешенства, циркулирующих на территории РФ и сопредельных стран, на 6 групп [7, 30, 31]:

А. Арктическая: север Красноярского края, север Республики Саха (Якутия), Республика Коми, Земля Франца-Иосифа, Аляска, северная часть Канады, Гренландия.

В. Арктически-подобная: Хабаровский край, Читинская область, Приморский край, Маньчжурия (Китайская Народная Республика, КНР).

С. Степная (Евразийская): Белгородская, Тульская, Волгоградская, Оренбургская, Пензенская, Воронежская, Липецкая, Нижегородская, Новосибирская, Астраханская, Омская области, республики Тыва, Дагестан и Башкортостан, Алтайский, Краснодарский и Красноярский края, Украина, Республика Казахстан, Монголия, провинция КНР Внутренняя Монголия и Синьцзян-Уйгурский автономный район КНР.

Д. Центральная (Центрально-российская): Московская, Владимирская, Тверская, Тульская, Рязанская, Нижегородская области, Венгрия.

Е. Северо-восточно-европейская: Псковская, Новгородская, Брянская, Ленинградская области, Эстония, Финляндия, Литва, Словакия, Польша, Германия, Украина.

Ф. Кавказская: Республика Дагестан, Краснодарский край, Грузия, Азербайджанская Республика, Ирак, Иран.

Было отмечено, что эпизоотии бешенства циклически, носят сезонный характер и связаны с ареалом обитания и миграциями основных переносчиков возбудителя. Из представленной классификации видно, что некоторые области повторяются в разных группах, это можно проследить и при молекулярном анализе изолятов, выделенных в различных регионах. Так, ранее было показано, что изоляты из Московской, Тверской, Владимирской и Нижегородской областей образуют кластер и их молекулярная структура соответствует Центральной группе вирусов [28].

Изоляты из республик Тыва и Бурятия образуют подгруппу; вероятно, это объясняется тем, что данные регионы граничат друг с другом. Так же можно объяснить образование подгруппы Красноярск–Алтай–Хакасия, в которую, кроме того, попали изолят из Республики Бурятия и изолят из Омска. Однако большинство представленных изолятов из Омска образовали подгруппу, своим расположением указывая в направлении изолятов Центральной части России, входящих в Степную (Евразийскую) группу вирусов на дендрограмме.

Евразийская (Степная) группа – наиболее широко представленная группа вирусов, она имеет несколько ответвлений на филогенетической дендрограмме. Подобное наблюдение филогенетического и территориального распределения вирусов, особенности молекулярной структуры гена N лиссавирусов даёт нам право предположить, что эпизоотия бешенства движется с северо- и юго-востока на запад и юго-запад, концентрируясь в центральной части РФ. А с ростом городов и с увеличением числа бродячих невакцинированных животных эпизоотии природного типа переходят в городскую среду.

Следует отметить, что один изолят из Украины (Rvu 09-06), выделенный от кошки, по молекулярной структуре близок к Степной группе вирусов бешенства, а другой (Rvu 10-33) ранее был отнесён к Северо-восточно-европейской группе [32]. Необходимо

отметить, что пусковым механизмом распространения рабической инфекции являются не только миграции природных резервуарных хозяев вируса бешенства, немаловажную роль может играть и увеличение в последнее время трансграничных передвижений людей со своими животными. Таким образом, необходим не только тщательный контроль со стороны ветеринарных служб, но и ответственный подход самих хозяев, выезжающих со своими питомцами за границу.

Заключение

Бешенство – это природно-очаговый зооантропоноз, и для борьбы со смертельной инфекцией необходимы координация ветеринарных и медицинских служб, исследования в области эпидемиологии, мониторинг антирабических антител после вакцинации против бешенства, просветительская работа с населением, контроль программ по оральной иммунизации диких плотоядных.

Результаты проведённых исследований говорят о необходимости дальнейшего мониторинга случаев бешенства на территории РФ методами молекулярного анализа.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3-5, 9, 10, 12, 13, 15-17, 19, 21-25, 32-35 см. REFERENCES)

1. В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
2. Васильев Д.А., Луговцев В.Ю., ред. *Вирусы, вызывающие болезни обиче для многих видов сельскохозяйственных животных. Курс лекций по вирусологии. Часть вторая*. Ульяновск; 2004.
6. Грибенча С.В., Козлов А.Ю., Костина Л.В., Елаков А.Л., Лосич М.А., Цибецов В.В. и др. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(5): 38-43.
7. 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; 58(4): 44-9.
8. Ботвинкин А.Д. Смертельные случаи заболевания людей бешенством в Евразии после контактов с рукокрыльями. (Обзор литературы). *Plecotus et al.* 2011; (14): 75-86.
11. Всемирная организация здравоохранения. Available at: <http://www.who.int/ru>
14. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Зайкова О.Н. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации за период с 1991 по 2015 годы. *Ветеринария Кубани*. 2016; (4): 4-6.
18. Елаков А.Л., Уласов В.И., Баньковский Д.О., Сафонов Г.А. Изучение биологических свойств штамма ERA G333 вируса бешенства. *Ветеринария*. 2011; (2): 22-4.
20. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Нашатырева Д.Н., Градобоева Е.А., Пакскина Н.Д., Попова И.В. *Бешенство в Российской Федерации: информационно-аналитический бюллетень*. Омск: КАН; 2019.
26. 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.
27. Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Елаков А.Л., Кочергин-Никитский К.С., Алипер Т.И., Чучалин С.Ф. и др. Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 186-92. DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-186-192>
28. Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Полякова И.В., Метлин А.Е. Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(3): 101-8. DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-101-108>
29. Гулюкин А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(3): 5-10.

30. Поleshchuk E.M., Sidorov G.N., Gribencha S.V. Итоги изучения антигенного и генетического разнообразия вируса бешенства в популяциях наземных млекопитающих России. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(3): 9-16.
31. Ботвинкин А.Д., Кузьмин И.В., Хисматуллина Н.А. Итоги изучения антигенного разнообразия вируса бешенства на территории бывшего СССР. *Ветеринарная патология*. 2004; (3): 117-27.
- REFERENCES**
- L'vov D.K., ed. *Virology Guide. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
 - Vasil'ev D.A., Lugovtsev V.Yu., ed. *Disease-Causing Viruses are Common to Many Types of Farm Animals. Course of Lectures on Virology. Part Two [Virusy, vyzyvayushchie bolezni obshchie dlya mnogikh vidov sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh. Kurs lektsiy po virusologii. Chast' vtoraya]*. Ul'yankovsk; 2004. (in Russian)
 - Cai L., Tao X., Liu Y., Zhang H., Gao L., Hu S., et al. Molecular characteristics and phylogenetic analysis of N gene of human derived rabies virus. *Biomed. Environ. Sci.* 2011; 24(4): 431-7. DOI: <http://doi.org/10.3967/0895-3988.2011.04.015>.
 - International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. Available at: <http://www.ictvonline.org/>
 - Hayman D.T., Fooks A.R., Marston D.A., Garcia-R J.C. The global phylogeography of lyssaviruses – challenging the 'out of Africa' hypothesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(12): e0005266. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005266>
 - Gribencha S.V., Kozlov A.Yu., Kostina L.V., Elakov A.L., Losich M.A., Tsimbezov V.V., et al. Production of the monoclonal antibodies to the rabies virus nucleoprotein. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(5): 38-43. (in Russian)
 - 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)
 - Botvinkin A.D. Fatal human cases of rabies in Eurasia after contacts with bats. (Review of the literature). *Plecotus et al.* 2011; (14): 75-86. (in Russian)
 - Kuzmin I.V., Orciari L.A., Arai Y.T., Smith J.S., Hanlon C.A., Kameoka Y., et al. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res.* 2003; 97(2): 65-79. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0168-1702\(03\)00217-x](http://doi.org/10.1016/s0168-1702(03)00217-x)
 - Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Kuzmin I.V., Borisova T.I., Gazaryan S.V., Yager P., et al. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(12): 1623-5. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid0912.030374>
 - World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/>
 - Shulpin M.I., Nazarov N.A., Chupin S.A., Korennoy F.I., Metlin A.Y., Mischenko A.V. Rabies surveillance in the Russian Federation. *Rev. Sci. Tech.* 2018; 37(2): 483-95. DOI: <http://doi.org/10.20506/rst.37.2.2817>
 - Hampson K., Coudeville L., Limbo T., Sambo M., Kieffer A., Atltan M., et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(4): e0003709. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003709>
 - Shabeykin A.A., Gulyukin A.M., Zaykova O.N. Overview on epizootic situation on rabies in the Russian Federation for the period from 1991 to 2015. *Veterinariya Kubani*. 2016; (4): 4-6. (in Russian)
 - Fehlner-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. DOI: <http://doi.org/10.7589/0090-3558-44.1.71>
 - Müller T., Bätz 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. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00705-009-0408-7>
 - Forró B., Marton S., Kecskeméti S., Hornyák A., Bányai K. Vaccine-associated rabies in red fox. Hungary. *Vaccine*. 2019; 37(27): 3535-3538. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.014>
 - Elakov A.L., Ulasov V.I., Ban'kovskiy D.O., Safonov G.A. Studying of biological properties rabies virus strain ERA G333. *Veterinariya*. 2011; (2): 22-4. (in Russian)
 - 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. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.016>
 - Poleschuk E.M., Sidorov G.N., Nashatyreva D.N., Gradoboeva E.A., Pakschina N.D., Popova I.V. *Rabies in Russian Federation: Informational Analytical Bulletin [Beshenstvo v Rossiyskoy Federatsii: informatsionno-analiticheskiy byulleten']*. Omsk: KAN; 2019.
 - OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Available at: <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
 - Heaton P.R., Johnstone P., McElhinney L.M., Cowley R., O'Sullivan E., Whitby J.E. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(11): 2762-6.
 - Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* 1999; (41): 95-8.
 - Kumar S., Stecher G., Li M., Niyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547-9. DOI: <http://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 - Hall B.G. Building Phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(5): 1229-35. DOI: <http://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
 - Elakov A.L., Zaykova O.N., Kochergin-Nikitskiy K.S., Grebennikova T.V., Aliper T.I. Rabies monitoring in wildlife animals from Bryansk region after oral vaccination. *Veterinariya*. 2015; (1): 11-4. (in Russian)
 - Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Elakov A.L., Kochergin-Nikitskiy K.S., Aliper T.I., Chuchalin S.F., et al. Molecular genetic characteristics of the genomes of field isolates of rabies virus circulating in the Kirov region. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 186-92. DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-186-192> (in Russian)
 - Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Gulyukin A.M., Shabeykin A.A., Polyakova I.V., Metlin A.E. Molecular genetic characteristics of rabies virus field isolates detected in the territory Vladimir, Moscow, Tver, Nizhny Novgorod and Ryazan regions. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(3): 101-8. DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-101-108> (in Russian)
 - Gulyukin A.M. Significance of modern methods for laboratory detection of rabies agents and identification of the zoonose immunological survey. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(3): 5-10. (in Russian)
 - Poleschuk E.M., Sidorov G.N., Gribencha S.V. A summary of the data about antigenic and genetic diversity of rabies virus circulating in the terrestrial mammals in Russia. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(3): 9-16. (in Russian)
 - Botvinkin A.D., Kuz'min I.V., Khismatullina N.A. The results of the study of antigen diversity of rabies virus in the territory of the former USSR. *Veterinarnaya patologiya*. 2004; (3): 117-27. (in Russian)
 - 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. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00705-007-1001-6>
 - Deviatkin A.A., Lukashov A.N., Poleschuk E.M., Dedkov V.G., Tkachev S.E., Sidorov G.N., et al. The phylogenetics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS One*. 2017; 12(2): e0171855. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
 - Picard-Meyer E., Robardet E., Laurent A., Cliquet F., et al. Bat rabies in France: a 24-year retrospective epidemiological study. *PLoS One*. 2014; 9(6): e98622. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0098622>
 - Troupin C., Picard-Meyer E., Dellicour S., Casademont I., Kergoat L., Lepelletier A., et al. Host Genetic Variation Does Not Determine Spatio-Temporal Patterns of European Bat 1 Lyssavirus. *Genome Biol. Evol.* 2017; 9(11): 3202-13. DOI: <http://doi.org/10.1093/gbe/evx236>