

На правах рукописи



Зайковская Анна Владимировна

**РЕЗЕРВУАРЫ ЛИССАВИРУСОВ
НА ТЕРРИТОРИЯХ, СТАЦИОНАРНО НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ
ПО БЕШЕНСТВУ**

*16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология.*

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

14 МАЯ 2009

Новосибирск – 2009

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Минздравсоцразвития России.

Научный руководитель

*кандидат биологических наук
Шестопалов Александр Михайлович*

Официальные оппоненты:

*доктор биологических наук,
старший научный сотрудник
Глотова Татьяна Ивановна,*

*доктор медицинских наук,
профессор
Грибенча Сергей Васильевич*

Ведущая организация:

*ФГУ Всероссийский научно-исследовательский
институт защиты животных (ФГУ ВНИИЗЖ)*

Защита состоится « 26 » мая 2009 г. в « 13-00 » часов на заседании диссертационного совета Д.006.045.01 при ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО Россельхозакадемии по адресу: 630501, Новосибирская область, Новосибирский р-н, п. Краснообск, СО Россельхозакадемии, ИЭВСидВ, а/я 8, тел.-факс (8-383) 348-44-62.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ Россельхозакадемии.

Автореферат разослан « 21 » апреля 2009 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета



Стеблева Г.М.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Лиссавирусные инфекции распространены практически повсеместно и поражают широкий круг хозяев, включая человека. Род *Lyssavirus* объединяет семь генотипов. Наиболее известным представителем лиссавирусов является вирус бешенства (*Rabies virus*).

Бешенство (*Rabies*) – инфекционная болезнь природно-очагового типа, опасная для человека и многих видов диких и домашних животных. Для него характерно циклическое течение и наличие резервуаров в дикой природе (М.А. Величко, 1994; К.Н. Груздев и др., 2001). По оценке Всемирной Организации Здравоохранения, бешенство входит в пятерку инфекционных болезней, общих для человека и животных, наносящих наибольший социальный и экономический ущерб. Ежегодно в мире после укусов животными, больными бешенством, погибает от 55000 до 70000 человек, половина из которых приходится на детей (А. Smith et al., 2005; Y.T. Arai et al., 2005).

Несмотря на достижения современной науки в вопросах контроля бешенства, эту проблему нельзя считать решенной. Активизируются природные очаги, увеличивается заболеваемость диких плотоядных, в эпизоотический процесс интенсивно вовлекаются домашние животные, создавая угрозу людям (В.А. Ведерников и др., 2005; Б.Л. Черкасский и др., 2005). Необходимо более полное понимание механизма поддержания и передачи различных вариантов вируса бешенства внутри популяций животных, что будет способствовать выявлению и прогнозированию возникновения новых резервуаров этой инфекции.

В последнее время большое внимание исследователей во всем мире обращено на изучение проблемы лиссавирусных инфекций у летучих мышей. В Западной Сибири обитает около 10 видов летучих мышей. Хотя лиссавирусы у рукокрылых в Западной Сибири обнаруживали (А.Д. Ботвинкин, 1988; И.В. Кузьмин, 2002), их роль в эпизоотологическом процессе при бешенстве до настоящего времени изучена недостаточно.

Территория юга Западной Сибири является стационарно неблагополучной по рабической инфекции, она характеризуется регулярным проявлением эпизоотий бешенства в популяциях диких и домашних животных (Л.Я. Грибанова и др., 1977; А.М. Шестопалов и др., 1998, 1999; В.И. Аксенов и др. 2000, 2002). Оценивая современное состояние проблемы бешенства, следует комплексно рассмотреть закономерности эпизоотического процесса и его особенностей в конкретных условиях.

Цель исследований – изучить эпизоотологическое значение различных резервуаров лиссавирусов на территории, стационарно неблагополучной по бешенству.

Задачи исследований:

- Изучить особенности проявления эпизоотического процесса бешенства на одной из стационарно неблагополучных территорий с учетом разнообразия

возможных резервуаров возбудителя и проводимых антирабических мероприятий.

- Исследовать популяции летучих мышей, обитающих на стационарно неблагополучных по бешенству территориях, на наличие лиссавирусов.

- Определить молекулярно-генетические характеристики лиссавирусов, циркулирующих у различных видов животных на стационарно неблагополучных по бешенству территориях, с позиции их эпизоотологической значимости.

Научная новизна. Получены современные данные об эпизоотической ситуации по бешенству на территории юга Западной Сибири. Подтверждена зависимость эпизоотологической роли основных резервуаров вируса бешенства от направленности и интенсивности антирабических мероприятий.

На стационарно неблагополучных по бешенству территориях юга Западной Сибири у насекомых летучих мышей с помощью ОТ–ПЦР выявлено наличие фрагмента гена нуклеопротеина лиссавирусов, которые были отнесены к генотипу 1. При помощи молекулярно-генетических методов доказано близкое родство всех лиссавирусов, выявленных у животных различных видов, внутри генотипа 1, на указанной территории. Выявлена зависимость кластеризации лиссавирусов от времени выделения изолята, а также тенденция к родству вирусов в зависимости от вида хозяина изолята.

Теоретическая и практическая значимость. Получены современные данные об эпизоотологическом значении различных резервуаров лиссавирусов на стационарно неблагополучных по бешенству территориях, которые могут быть использованы для дальнейшего совершенствования антирабических мероприятий. Результаты исследований вносят вклад в развитие молекулярной эпизоотологии.

Создана рабочая коллекция изолятов вирусов бешенства, циркулирующих на территории Новосибирской области, подготовлены паспорта для депонирования в коллекции культур микроорганизмов ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». По результатам работы в международной базе данных GenBank зарегистрированы 12 нуклеотидных последовательностей, которые в дальнейшем могут служить базой для конструирования праймеров для диагностики бешенства.

Апробация полученных результатов. Материалы исследований были представлены на международной научной конференции «Современные проблемы эпизоотологии», (Новосибирск, 2004), Сибирской международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ветеринарной медицины» (Новосибирск, 2004), международной научно-практической конференции «Современные проблемы охотничьего собаководства», (Киров, 2004), Всероссийской конференции «Сибирская зоологическая конференция» (Новосибирск, 2004), межрегиональном совещании по вопросам профилактики особо опасных инфекций и дезинфектологии (11-15 октября 2004 года, г.Новосибирск), межрегиональной научно-практической конференции с

международным участием «Актуальные проблемы здоровья населения Сибири: гигиенические и эпидемиологические аспекты» (Омск, 2004), Сибирской международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ветеринарной медицины» (Новосибирск, 2005), 3-ей Российской научной конференции с международным участием «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера» (Новосибирск, 2006).

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 17 работ, 4 из них в ведущих научных журналах рекомендованных ВАК Минобразования и науки Российской Федерации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение, выводы, практические предложения, литература, приложения. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 12 рисунками. Список литературы содержит 209 источников, в том числе 122 работы иностранных авторов.

Внедрение результатов исследований. Результаты исследований использованы в методических рекомендациях «Система противоэпизоотических и профилактических мероприятий при бешенстве в Новосибирской области», утвержденных подсекцией «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол №4 от 14 октября 2008 г.), а также в учебном пособии для ВУЗов «Современные проблемы бешенства животных (М.; КолосС, 2007). Создан набор олигонуклеотидных праймеров для идентификации РНК вируса бешенства в биологических образцах (патент на изобретение № 2340673 от 10 декабря 2008г.).

Основные положения, выносимые на защиту:

- Проявление эпизоотического процесса бешенства в современных условиях на территории юга Западной Сибири, стационарно неблагополучной по рабической инфекции, с учетом разнообразия возможных резервуаров возбудителя и проводимых антирабических мероприятий.
- Результаты молекулярно-генетического анализа лиссавирусов, циркулирующих у различных видов животных на территории юга Западной Сибири, с позиции их эпизоотологической значимости.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа была выполнена в 2002-2008 годах в отделе зоонозных инфекций и гриппа Федерального государственного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Минздрава России. Ретроспективный анализ эпизоотической

ситуации бешенства на стационарно неблагополучных территориях с учетом разнообразия возможных резервуаров возбудителя и проводимых антирабических мероприятий был проведен на основе статистических данных медицинских и ветеринарных учреждений.

Для лабораторной диагностики бешенства использовали образцы головного мозга диких, домашних и сельскохозяйственных животных из различных регионов Сибири.

Для сбора материала от летучих мышей было проведено 12 экспедиционных выездов на территории юга Западной Сибири. В зимний период летучих мышей, находившихся в состоянии спячки в укрытиях, собирали вручную. Все манипуляции проводили максимально бережно, чтобы не травмировать животных и не навредить популяции.

Для поимки рукокрылых в летний период пользовались стандартными методиками: отловы над руслами рек и на лесных полянах с помощью паутинных сетей (5x12 м), и активный отлов с использованием мобильной ловушки Борисенко (А.В. Борисенко, 1999). Для обнаружения рукокрылых и первичной видовой идентификации использовался ультразвуковой детектор Pettersson Elektronik D-100. Всего было собрано 225 образцов головного мозга от летучих мышей 7 видов: водяная ночница (*Myotis daubentonii*), прудовая ночница (*Myotis dasycneme*), ночница Брандта (*Myotis brandtii*), бурый ушан (*Plecotus auritus*) сибирский трубконос (*Murina leucogaster*), двуцветный кожан (*Vespertilio murinus*), рыжая вечерница (*Nyctalus noctula*).

Исследования проводили согласно ГОСТ 26075-84. Выборочные пробы материала тестировали в ОТ-ПЦР с использованием праймеров на районы генов нуклеопротеина и гликопротеина вируса бешенства. Для 31 образца у полученных ПЦР-продуктов были определены нуклеотидные последовательности и выведены аминокислотные последовательности фрагмента гена нуклеопротеина. Определение нуклеотидной последовательности выделенного ПЦР фрагмента проводили на «Beckman CEQ2000XL DNA Analysis System» («Beckman Coulter, Inc.») согласно инструкции к «Beckman sequencing Kit». Нуклеотидные и выведенные аминокислотные последовательности были анализированы с использованием программы MEGA (PSU, США) и DNASTAR (DNASar Inc., США).

Для статистической обработки данных были использованы общепринятые методы описательной статистики с использованием пакета программ для статобработки Microsoft Excel (Microsoft Office Professional Edition, 2007) и STATISTICA 6,0.

Для создания коллекции изолятов вируса бешенства с территории Новосибирской области вирусы культивировали на беспородных белых мышках массой 6-8 г. Получено 12 штаммов вируса бешенства, которые были лиофильно высушены. Титр вируса определяли на лабораторных животных. Вычисление значений титра вируса (LD_{50}) проводили по методу Рида-Менча. Подготовлены паспорта для депонирования в коллекции культур микроорганизмов ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор».

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Особенности проявления эпизоотического процесса бешенства на стационарно неблагополучной территории с учетом разнообразия возможных резервуаров возбудителя и проводимых антирабических мероприятий

С конца 1997 года в Новосибирской области произошло резкое обострение эпизоотической обстановки по бешенству. За период с 1997 по 2008 год было зарегистрировано 1439 случаев бешенства у разных видов диких и домашних животных. За этот период эпизоотическая ситуация бешенства имела пики напряженности в 1998, 2002-2004 и 2007 годах. Угасание эпизоотий, по официальным данным, наблюдали в 2000 и 2005-2006 годы (рис. 1). Таким образом, для эпизоотического процесса бешенства в области было выявлено волнообразное изменение количества случаев болезни с 3-5-ти летней периодичностью.

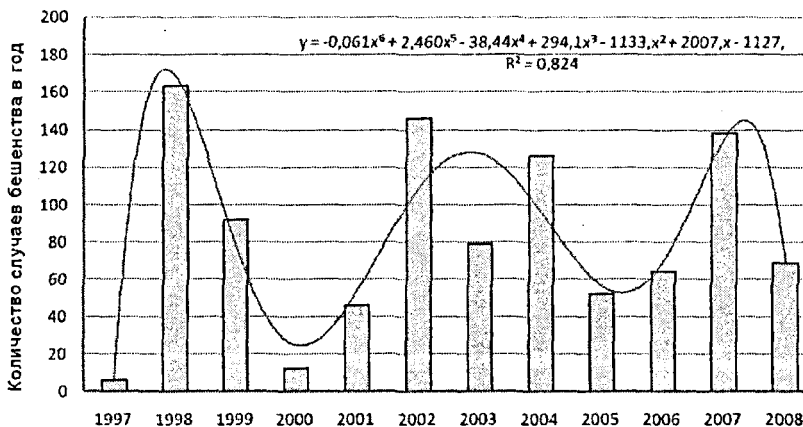


Рисунок 1 – Динамика случаев бешенства животных в Новосибирской области.

По результатам эпизоотологического анализа всех случаев заболевания бешенством животных разных видов в Новосибирской области за период 1997-2008 годов, на долю диких плотоядных приходится 53%. На втором месте по количеству случаев заболевания после диких хищников находятся мелкие домашние животные (30%). Доля сельскохозяйственных животных (в основном это крупный рогатый скот) составила 17%.

Несмотря на обширный круг видов животных, вовлеченных в эпизоотический процесс рабической инфекции в Новосибирской области, лисицы играют главную роль в резервации и распространении инфекции. Была выявлена высокая положительная корреляционная зависимость между случаями бешенства лисиц и сельскохозяйственных животных ($R_{s, 12} = 0,98$; $p < 0,05$). В отношении мелких домашних животных корреляционная зависимость – умеренная ($R_{s, 12} = 0,45$; $p < 0,05$).

При анализе видовой структуры заболеваемости бешенством среди диких животных на долю диких плотоядных за период 1997 – 2008 гг. приходится 92,6% (из них 89,8% составляют лисы, 2,8% - корсаки, волк, енотовидная собака). Полученные результаты корреляционного анализа указывают на наличие высокой положительной корреляционной связи между годовой численностью лисиц и количеством всех случаев бешенства за год ($R_{s, 12} = 0,71$; $p < 0,05$), между годовой численностью лисиц и количеством случаев бешенства среди лисиц за год ($R_{s, 12} = 0,83$; $p < 0,05$). Таким образом, можно утверждать, что увеличение численности лисиц влечет за собой подъем эпизоотии бешенства.

Как правило, на неблагополучных территориях в период подъема эпизоотии в эпизоотические цепи вовлекаются многие виды диких животных. В частности, в Новосибирской области бешенство диагностировано у барсуков (13 случаев), хорька (1 случай), колонка (1 случай), рыси (1 случай), диких травоядных (5 случаев). Интересными представляются случаи лабораторной диагностики бешенства у мышевидных грызунов (9 случаев), зайцев (5 случаев), сурка (1 случай), бобра (1 случай).

На долю городского бешенства приходится 14 % от общего количества случаев, зарегистрированных в Новосибирской области за указанный период. В пределах города бешенство было диагностировано у кошек, собак и грызунов.

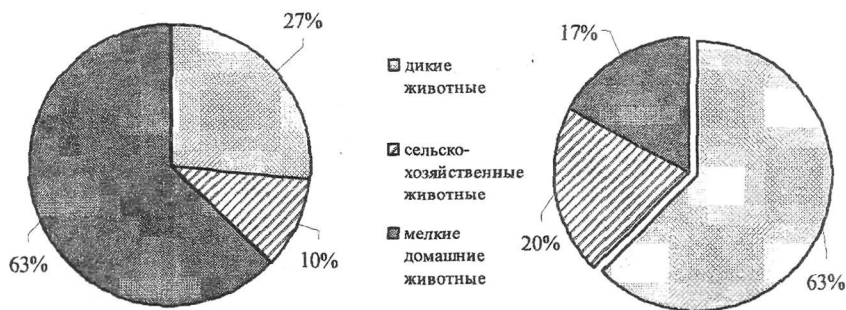
Борьба с эпизоотией бешенства в Новосибирской области включала следующие основные мероприятия: контроль режима содержания домашних животных, отлов бродячих животных, массовую профилактическую иммунизацию собак и кошек, сельскохозяйственных животных (по эпизоотологическим показаниям), регуляцию численности диких плотоядных и оральную вакцинацию диких лисиц.

Подъем эпизоотии бешенства с 1998 года в Новосибирской области сопровождался значительным ростом количества людей, пострадавших от укусов животными. В изучаемый период из числа лиц, укушенных животными, которым было назначено профилактическое лечение, отказались от прививок или самовольно прекратили курс лечения в целом 15,6%. При этом был зарегистрирован только один случай заболевания бешенством человека в мае 2001 года. Пострадавший был инфицирован в результате укуса дикой лисой.

Следует отметить, что в Новосибирской области в 1998-1999 годах практически во всех неблагополучных районах была применена пероральная вакцина против бешенства диких плотоядных. Анализируя видовую структуру заболевания бешенством животных за два периода: 1997-2000 годы и 2001-2008 годы (рис. 2), было выявлено, что в первый период удельная доля диких животных составила 27%, а во второй – 63%. При проведении мероприятий по снижению численности популяции диких хищников, иммунизация лисиц в период с 2000 по 2008 год проводилась ограниченно, только в отдельных районах. Очевидна необходимость ежегодного проведения пероральной иммунизации диких плотоядных не только на областном, но и на региональном уровне.

В то же время на долю мелких домашних животных в период первого подъема эпизоотии приходится 63% всех случаев бешенства, а во второй –

только 17%. Именно во второй период были проведены эффективные противозoonотические мероприятия среди этой группы животных. Объемы иммунизации мелких домашних животных, начиная с 1998 года, были увеличены в среднем в 3 раза по сравнению с 1997 г.



а) Видовая структура заболевания животным в период 1997 – 2000 годы

б) Видовая структура заболевания животных в период 2001 – 2008 годы

Рисунок 2 – Видовая структура заболевания бешенством животных в Новосибирской области в периоды 1997-2000 и 2001-2008 годов.

Интересными являются данные о спонтанной зараженности лисиц вирусом бешенства. Известно, что в связи с возможностью длительного инкубационного периода болезни вирус может определенное время циркулировать среди животных без видимых проявлений болезни.

В результате исследования методом флюоресцирующих антител (МФА) 302 образцов головного мозга от диких лисиц было выявлено 3 образца с положительным результатом, свидетельствующим о наличии антигена вируса бешенства, и 44 – с сомнительным результатом.

При проведении биологической пробы с материалом, положительным в МФА, для 2 образцов был получен положительный результат. Погибло 30 % подопытных мышей в период с 10 по 21 сутки. Специфичность результата была подтверждена МФА.

Затем, методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров на район гена нуклеопротеина были проведены исследования проб, положительных в МФА, и 16 образцов материала, при исследовании которых был получен сомнительный результат МФА. Наличие РНК вируса бешенства было подтверждено в 3-х положительных и в 5-ти сомнительных образцах.

Однако, при проведении биологической пробы материала образцов, сомнительных в МФА, получен отрицательный результат. Гибели инфицированных мышей в течение 30 суток наблюдения зарегистрировано не было; на 10 сутки после заражения у 2 мышей из каждой группы был взят головной мозг и исследован в МФА и ОТ-ПЦР. Было проведено 3 слепых пассажа. Доказать наличие инфекционного вируса бешенства в исследуемом

материале не удалось. Наличие вируса бешенства в исследуемом материале считали подтвержденным при получении положительного результата хотя бы в двух из использованных тестов.

Сложности выделения вируса бешенства на лабораторных животных могут быть связаны с рядом факторов (потеря инфекционности вируса за счет нарушений правил отбора, хранения и транспортировки материала; его низкая концентрация в тканях головного мозга животных в инкубационный период).

Таким образом, наличие вируса бешенства в головном мозге диких лисиц, без видимых признаков болезни, отстрелянных на стационарно неблагополучной по бешенству территории, подтверждено различными методами более чем у 2,3% из числа исследованных.

2.2.2. Выявление лиссавирусов у летучих мышей, обитающих на территории юга Западной Сибири

Лиссавирусы, связанные с рукокрыльями, вызывают повышенный интерес исследователей во всем мире. На Американском континенте установлена их принадлежность к генотипу 1, с рядом устойчивых генетических и антигенных особенностей, отличающих от штаммов, циркулирующих среди других видов животных. На других континентах от насекомоядных летучих мышей ранее выделяли лиссавирусы генотипов 2, 4, 5, 7. Что касается Сибири, то к настоящему времени здесь от этих животных выявлены лиссавирусы генотипа 1 (И.В. Кузьмин и др., 2001; Л.П. Буцацкий, 2002).

Нами было проведено исследование популяций рукокрылых, обитающих на территориях юга Западной Сибири, на наличие у них лиссавирусов. Первичный анализ биоматериала на наличие антигена лиссавирусов проводили методом флюоресцирующих антител, с последующим ПЦР-анализом. Для четырех полученных ПЦР-продуктов (578 п.н.) были определены нуклеотидные последовательности и выведены аминокислотные последовательности.

Патогенность лиссавирусов, выявленных у летучих мышей, для лабораторных животных изучали методом биологической пробы. Были исследованы 7 образцов первичного материала, положительные в МФА и ОТ-ПЦР. Провели 3 пассажа на беспородных белых мышках массой 6-8 г. по 10 голов в каждой группе. На 5-21 день после инфицирования у подопытных животных появились признаки заболевания: снижение активности, отказ от корма, взъерошенность шерсти, нарушение координации движений. Однако все эти проявления с каждым пассажем были выражены слабее и наблюдались всего у 1-3 животных из группы. В некоторых группах клинические проявления болезни полностью отсутствовали. Таким образом, к третьему пассажиру остался материал только одного образца. На третьем пассаже у трех мышей мы наблюдали приступы тонических судорог в ответ на звуковые раздражения.

При сравнительном анализе аминокислотных последовательностей выявленных лиссавирусов и штаммов, депонированных в международной базе данных GenBank, мы обнаружили, что варианты, которые были получены от летучих мышей, отловленных в Алтайском крае, имели аминокислотные замены, отличающие их от лиссавирусов, выявленных у летучих мышей в

Новосибирской области. В то же время, несмотря на высокое сходство аминокислотных последовательностей обнаруженных вариантов лиссавирусов с вирусами, выделенными от других видов животных, они имеют аминокислотные замены, которые являются типичными только для этих штаммов. По причине того, что выявленные у рукокрылых лиссавирусы, не удалось изолировать на лабораторных животных, материал не сохранен.

Таким образом, с помощью ОТ-ПЦР нами доказано наличие лиссавирусов у летучих мышей, обитающих на территории юга Западной Сибири. Наибольшее количество положительных проб было получено от летучих мышей вида водяная ночница (*Myotis daubentonii*). Этот вид является самым распространенным в Новосибирской области. Нами для исследований было отобрано 80% летучих мышей именно этого вида.

2.2.3. Результаты изучения молекулярно-генетических характеристик лиссавирусов, циркулирующих у различных видов животных на стационарно неблагополучных по бешенству территориях, с позиций их эпизоотологической значимости

Для молекулярно-генетических исследований были выбраны образцы материала от различных видов диких и домашних животных, полученных в период 2002-2008 гг., а также от человека, умершего от бешенства. Длины секвенированных участков для разных штаммов составили 204-514 п.о.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена нуклеопротеина со штаммами, представленными в базе данных GenBank, показал, что в Новосибирской области циркулируют близкородственные генетические варианты вируса бешенства. Различие нуклеотидных последовательностей полученных нами фрагментов не превышает 7%. Большинство из выявленных аминокислотных замен, у вариантов, приведенных для сравнения, не встречаются.

При филогенетическом анализе было выявлено, что все вирусы бешенства, выделенные нами в Новосибирской области и Алтайском крае, принадлежат к одной филогенетической группе. На рисунке 3 представлено филогенетическое дерево, которое было построено методом объединения ближайших соседей на основании сравнения фрагмента гена нуклеопротеина (572-776 п.н.) выделенных нами изолятов лиссавирусов со штаммами, представленными в базе данных GenBank.

Среди полученных нами изолятов лиссавирусов можно выделить три группы.

Первый кластер формируют лиссавирусы от летучих мышей, барсука, лисицы и человека, которые были получены в 2001-2002 годах. В эту же группу входят фиксированные штаммы вирусов бешенства CVS и штамм НЕР-Flury (K. Morimoto et al, 2002; N. Tordo, et al, 1986). Близость, выделенных нами лиссавирусов к прототипным штаммам вируса бешенства, доказывает их принадлежность к генотипу 1. На территории России были выявлены вирусы только этого генотипа (М.А. Селимов и др., 1983, 1984; А.Е. Metlin et al., 2004; I.V. Kuzmin et al., 2004).

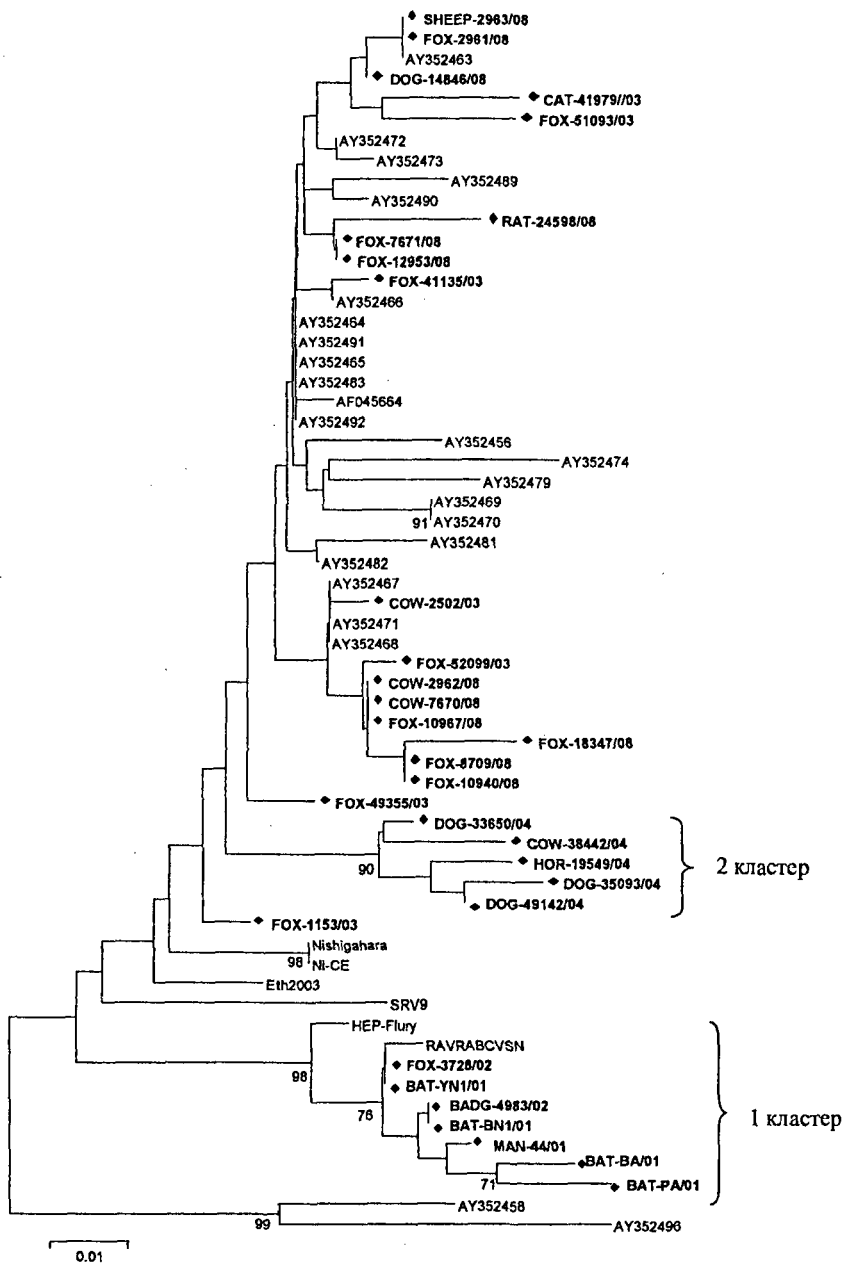


Рисунок 3 – Филогенетическое дерево, построенное на основании фрагмента гена нуклеопротеина (572-776 п.н.) лиссаивирусов (выделены жирным шрифтом) со штаммами, представленными в базе данных GenBank

Второй кластер представлен изолятами вирусов бешенства, выделенными только в Новосибирской области в течение 2004 года от трех собак, лошади и быка. Эти два кластера имеют достоверный индекс поддержки. На основании филогенетического анализа наиболее близкими к выделенным нами вирусам являются фиксированные вакцинные штаммы вирусов Ni-CE, SRV9, Nishigahara, поддерживаемые в культурах клеток, а также вирус, выделенный в Эфиопии (N. Ito, 2000; R. Hu, 2002; N. Minamoto, 2003; D.A. Randall, et al, 2004).

В третью группу можно отнести вирусы, которые были выделены от животных в 2003 и 2008 годах. Эта группа не имеет достоверного индекса поддержки. В нее также входят вирусы, анализированные Кузьминым И.В. (2004), имеющие происхождение из европейской части России и один вирусный штамм, автором которого является Bourhy H. (Франция), однако, изолят этого вируса был получен из России. Внутри этой большой группы вирусов можно выделить две подгруппы, которые разделяет значительное генетическое расстояние.

Филогенетических связей между вирусами в зависимости от происхождения с различных географических районов Новосибирской области не выявлено. Отсутствие эколого-географических барьеров на территории Новосибирской области для популяций животных-хозяев вируса бешенства, вероятно, является причиной распределения нескольких филогенетических групп на всей территории области.

У выделенных нами изолятов было проведено секвенирование фрагмента генома, кодирующего нуклеопротеидный белок (N). N ген кодирует внутренний белок, включенный в регуляцию транскрипции и репликации, и, следовательно, является важным фактором адаптации лиссавирусов к виду хозяина (B. Kissi, et al., 2005). При анализе зависимости кластеризации вирусов от вида хозяина, от которого был выделен изолят, можно заметить, что все лиссавирусы, выявленные у летучих мышей, располагаются в кластере 1, а изоляты вирусов бешенства, полученные от собак (за исключением DOG-14846), в кластере 2. В данном случае можно предположить наличие тенденции к родству в зависимости от вида хозяина изолята. Следует заметить, что вирусы, выделенные нами от диких хищников, представлены практически во всех ветвях дендрограммы – это еще одно подтверждение того, что именно лисы являются основным источником бешенства на изучаемой территории. Особое внимание следует обратить на видовой состав источников вирусов представленных во 2 кластере, в который вошли вирусы от трех собак, коровы и лошади, а лисиц – нет. В данном случае возможно наличие очагов бешенства, поддерживаемого собаками.

На филогенетическом дереве показано, что кластер 1 формируют вирусы, которые были анализированы в 2001-2002 гг., а кластер 2 – в 2004 г. Вирусы бешенства, имеющие происхождение 2003 и 2008 г., располагаются отдельно от них. Эти данные свидетельствуют о том, что группирование в кластеры лиссавирусов, которые циркулировали на территории юга Западной Сибири, зависит от времени выделения изолята.

3. ВЫВОДЫ

1. Подтверждена главная роль диких плотоядных (53%), в основном лисиц, в резервации и распространении рабической инфекции в природных очагах на юге Западной Сибири. Спонтанная зараженность лисиц составляет более 2,3%. Установлено наличие вируса бешенства у представителей следующих родов диких млекопитающих: барсуки, косули, зайцы, сурки, бобры, а также у мышевидных грызунов.
2. Периодичность эпизоотий бешенства на территории юга Западной Сибири в течение 1997–2008 годов составила 3 – 5 лет. Показана высокая положительная корреляционная зависимость между годовой численностью лисиц и количеством всех случаев бешенства за год.
3. Установлена зависимость эпизоотологической роли основных резервуаров вируса бешенства от направленности и интенсивности антирабических мероприятий. Увеличение в 3 раза объемов иммунизации мелких домашних животных в неблагополучных и угрожаемых зонах обеспечило снижение на 46% случаев бешенства у этой категории животных. Ежегодная пероральная иммунизация диких лисиц в природных эпизоотических очагах эффективно снижает проявление эпизоотии бешенства (на 36%).
4. С помощью ОТ–ПЦР выявлены фрагменты гена нуклеопротеина лиссавирусов генотипа 1 у насекомоядных летучих мышей, обитающих на территории юга Западной Сибири.
5. Доказано близкое генетическое родство лиссавирусов, циркулирующих на территории юга Западной Сибири в популяциях животных разных видов, которые формируют три филогенетические группы в пределах генотипа 1. Выявлено, что группирование вирусов в кластеры зависит от времени выделения изолята, а также отмечена тенденция к родству вирусов в зависимости от вида хозяина изолята.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основании результатов проведенных исследований очевидна целесообразность широкого использования молекулярно-генетических методов в изучении эпизоотологии бешенства с использованием набора олигонуклеотидных праймеров для идентификации РНК вируса бешенства в биологических образцах (патент на изобретение № 2340673 от 10 декабря 2008 г.). Эти материалы нашли отражение в методических рекомендациях «Система противозпизоотических и профилактических мероприятий при бешенстве в Новосибирской области», утвержденных подсекцией «Инфекционная патология животных в регионе Сибири и Дальнего Востока» отделения ветеринарной медицины Россельхозакадемии (протокол №4 от 14 октября 2008 г.), а также в учебном пособии для ВУЗов «Современные проблемы бешенства животных (М.; КолосС, 2007 г.).

5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства, выделенных на территории Западной Сибири / Соавт.: В.А. Терновой, В.И. Аксенов, Ю.Н. Рассадкин // Вестник РАМН. - № 2. - 2005. - С. 31-35.

2. Эпизоотическая обстановка по бешенству в Новосибирской области в период 1997-2003 гг / Соавт.: В.И. Аксенов, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопапов // ЖМЭИ. - № 4. - 2005. - С. 37-40.

3. Лиссавирусы у летучих мышей, обитающих на юге Западной Сибири / Соавт.: В.А. Терновой, А.А. Томиленко, Ю.Н. Рассадкин и др. // Вопросы вирусологии. - № 1. - 2005. - С. 31-35.

4. Зараженность вирусом бешенства лисиц без клинических признаков болезни на стационарно неблагополучных территориях / Соавт.: В.И. Аксенов, О.А. Меркушев, А.М. Шестопапов // Сиб. вестник с.-х. науки. - № 2. - 2009. - С. 117-119.

5. Патент РФ № 2340673 от 10.12.2008 г. Набор олигонуклеотидных праймеров для идентификации РНК вируса бешенства в образцах головного мозга / Соавт.: С.В. Нетесов, Ю.Н. Рассадкин, В.А. Терновой, А.М. Шестопапов // заявители и патентообладатели ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора по заявке № 2007113415/13 от 10.04.2007. – Бюл. № 34.

6. Вирус бешенства у летучих мышей Западной Сибири/Соавт.: Ю.Н. Рассадкин, В.А. Терновой, А.А. Томиленко и др. // Тез. междунар. конг. «Прогрессивные научные технологии для здоровья человека». - Кара-Даг, Феодосия. - Украина. - 2003. - С. 75.

7. Эпизоотическая ситуация по бешенству в Новосибирской области в 2001-2003 гг. / Соавт.: В.И. Аксенов, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопапов // Тез. междунар. науч. конф. «Современные проблемы эпизоотологии». - Новосибирск. - 2003. - С. 102-103.

8. Бешенство у промысловых животных в Новосибирской области / Соавт.: В.И. Аксенов, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопапов // Матер. междунар. науч.-произв. конф. «Современные проблемы охотничьего собаководства». - Киров. - 2004. - С. 72-73.

9. Летучие мыши – носители лиссавирусной инфекции в Новосибирской области и Алтайском крае / Соавт.: В.А. Терновой, А.А. Томиленко, А.М. Шестопапов // Тез. докладов всерос. конф. «Сибирская зоологическая конференция». - Новосибирск. - 2004. - С. 375.

10. Анализ заболеваемости бешенством диких животных в Новосибирской области в период 1997-2003 гг / Соавт.: В.И. Аксенов, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопапов // Тез. междунар.-практ. конф. «Болезни диких животных». - Покров. - 2004. - С. 73-77.

11. Мониторинг вируса бешенства на территории Новосибирской области / Соавт.: В.И. Аксенов, В.А. Терновой, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопапов

// Тез. межрег. науч.-практ. «Актуальные проблемы здоровья населения Сибири: гигиенические и эпидемиологические аспекты». - Омск. - 2004. - С. 310-325.

12. Молекулярно-генетическое разнообразие изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Новосибирской области / Соавт.: В.А. Терновой, В.И. Аксенов, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопалов // Тез. докл. междунар. науч.-практ. конгресса «Актуальные проблемы ветеринарной медицины». - СПб. - 2005. - С. 86-87.

13. Мониторинг лиссавирусов, связанных с рукокрылыми на территории Новосибирской области и Алтайского края / Соавт.: В.А. Терновой, В.И. Аксенов, Д.А. Васеньков и др. // Тез. докл. научн. конф. «Эпидемиология, лабораторная диагностика и профилактика вирусных инфекций». - СПб. - 2005. - С. 132-133.

14. Ситуация по бешенству среди домашних плотоядных в городе Новосибирске и Новосибирской области / Соавт.: В.И. Аксенов, В.А. Терновой, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопалов // Сибирская междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы ветеринарной медицины». - Новосибирск. - 2005. - С. 101-103.

15. Анализ эпизоотической ситуации по бешенству в Новосибирской области (1997-2004гг) / Соавт.: В.И. Аксенов, В.А. Терновой, Ю.Н. Рассадкин, А.М. Шестопалов // Тез. междунар. научн.-практ. конф. «Ветеринарная медицина 2005: современное состояние и актуальные проблемы обеспечения ветеринарного благополучия животноводства». - Ялта. - 2005. - С. 93-97.

16. Изучение участия рукокрылых (Mammalia, Chiroptera), обитающих в Западной Сибири, в циркуляции возбудителей зоонозов потенциально опасных для человека / Соавт.: Д.А. Васеньков, Н.Л. Першикова, В.А. Терновой и др. // Вестник КрасГУ, - 2006 - с. 98 – 104.

17. Анализ эпидемиологической ситуации по бешенству в Новосибирской области в 2005 г / Соавт.: В.И. Аксенов, Л.В. Понотова, А.П. Федянин и др. // III Российская научн. конф. с междунар. участием «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера». - Новосибирск. - 2006. - С. 191-192.

Зайковская Анна Владимировна

**РЕЗЕРВУАРЫ ЛИССАВИРУСОВ НА ТЕРРИТОРИЯХ,
СТАЦИОНАРНО НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ПО БЕШЕНСТВУ**

Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата биологических наук.

Подписано в печать 20.04.2009. Заказ № 32.

Формат 60x90/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.

Типография Института катализа им. Г.К. Борескова СО РАН