

На правах рукописи

**САМЕРХАНОВ ИЛЬНУР ИРШАТОВИЧ**

**ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И КОНТРОЛЬ  
ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКИ БЕШЕНСТВА  
ЖИВОТНЫХ В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН**

06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Уфа – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), г. Казань.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук  
**Ефимова Марина Анатольевна.**

**Официальные оппоненты:** **Сочнев Василий Васильевич,**  
доктор ветеринарных наук, профессор, член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, заслуженный санитарный врач РФ, ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия», кафедра эпизоотологии, паразитологии и ветсанэкспертизы, заведующий;  
**Тынь Ярослав Ярославович,**  
кандидат биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», кафедра зоологии, экологии и охраны природы имени А.Г. Банникова.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ ВНИИЗЖ), г. Владимир.

Защита диссертации состоится «18» мая 2018 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.003.03 при ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ по адресу: 450001, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34 (325/2). Тел./факс: +7(347)228-08-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ <http://www.bsau.ru>, а с авторефератом в сети Интернет на официальном сайте Министерства образования и науки Российской Федерации <http://www.vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Гиниятуллин Марат Гиндуллинович

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Бешенство (*Rabies*) – острая вирусная инфекция природно-очагового характера, относится к группе особо опасных болезней, общих для человека и животных. Несмотря на определенные достижения в изучении бешенства, тенденция роста распространения данной инфекции в различных регионах Российской Федерации и стран СНГ остается важной проблемой ветеринарии и медицины во всем мире (Полещук Е.М. с соавт., 2012).

В большинстве регионов Российской Федерации осложнение эпизоотической ситуации по бешенству обусловлено резкой активизацией природных очагов этой инфекции, приведших к увеличению заболеваемости диких плотоядных и домашних животных, а в отдельных регионах и регистрации случаев заболевания людей с летальным исходом (Ботвинкин А.Д. с соавт., 1998; Метлин А.Е. с соавт., 2009; Арутюнова И.П. с соавт., 2010).

Наиболее эффективным и гуманным методом борьбы с природным бешенством, обеспечивающим устойчивость животных к заражению является оральная вакцинация (Макаров В.В., 2010; Елаков А.Л., 2013). Эффективность оральной иммунизации диких животных в борьбе с этой болезнью подтверждена в Европейских странах (Метлин А.Е., 2004; Müller T. et al., 2012). В настоящее время в странах Евросоюза в результате проведения широкомасштабных кампаний оральной вакцинации регистрируются только спорадические случаи заболевания бешенством среди диких животных (Чернышова Е.В. с соавт., 2013).

В условиях России проведение полномасштабных кампаний по оральной вакцинации затруднительно, как по техническим причинам, так и по финансовым соображениям. Оценка современного эпизоотического состояния по бешенству диктует необходимость комплексного рассмотрения закономерностей эпизоотии и его особенностей в конкретных условиях. Поэтому научно подтвержденные противоэпизоотические мероприятия должны основываться на изучении биологических свойств возбудителя бешенства, циркулирующего в регионе и особенностей краевой эпизоотологии этого зооноза.

**Степень разработанности темы исследования.** Республика Татарстан (РТ) относится к разряду неблагополучных регионов по бешенству в Приволжском Федеральном округе Российской Федерации и характеризуется

регулярным проявлением эпизоотий бешенства в популяции домашних и диких животных.

Изучением эпидемиологии и эпизоотологии бешенства на территории РТ в разные годы занимались, А.М. Гулюкин (2012), А.Н. Чернов (2013), Н.А. Хисматуллина (2016).

Ухудшение обстановки по заболеваемости бешенством животных в РТ за последние годы обусловлено снижением изучения эпизоотологических процессов в республике. Эффективность вакцинопрофилактики животных дикой фауны диктует необходимость продолжения изучения эпизоотической ситуации по бешенству на территории Республики Татарстан, выявление факторов, способствующих распространению инфекции среди диких, домашних и сельскохозяйственных животных и определение прогноза заболеваемости на основе выявленных особенностей эпизоотических процессов.

**Цель и задачи исследования.** Целью исследований явилось изучение эпизоотической ситуации и оценка эффективности профилактики бешенства у сельскохозяйственных, домашних и диких плотоядных животных в Республике Татарстан.

Поставленная цель решалась следующими задачами:

1. Проанализировать эпизоотическую ситуацию по бешенству и профилактические мероприятия в Республике Татарстан с учетом климатических и географических особенностей;
2. Изучить иммунобиологические свойства изолятов уличного вируса бешенства, выделенных в Республике Татарстан;
3. Оценить напряженность иммунитета к бешенству у сельскохозяйственных, домашних и диких плотоядных животных в Республике Татарстан в период с 2012 по 2016 гг.;
4. Разработать синтетические олигонуклеотидные праймеры и способ полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для выявления и идентификации вируса бешенства.

**Научная новизна.** Впервые изучена эпизоотическая ситуация по бешенству в Республике Татарстан за 2010-2016 гг., при этом установлена распространенность и уровень заболеваемости среди сельскохозяйственных домашних и диких животных, сезонность и периодичность проявления инфекции и составлена карта эпизоотической ситуации по бешенству Республики Татарстан. Изучены биологические и антигенные свойства изолятов вируса бешенства, выделенных от разных видов животных на территории РТ.

Проведена оценка поствакцинального иммунитета у сельскохозяйственных, домашних и диких плотоядных животных на территории РТ за 2012-2016 гг.

Впервые разработаны и предложены для внедрения в ветеринарную практику синтетические олигонуклеотидные праймеры для молекулярно-генетических исследований по индикации вируса бешенства методом ОТ-ПЦР. Новизна проведенных исследований подтверждена патентом РФ на изобретение (патент РФ № 2575088 от 02.10.2014 г.).

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Полученные данные дают возможность оценить и прогнозировать современную эпизоотическую ситуацию по бешенству в Республике Татарстан. Картографирование неблагополучных районов позволит выявить потенциальных переносчиков по численности и плотности их расселения в природных очагах, организовать противоэпизоотические, ветеринарно-санитарные мероприятия, используя различные средства специфической профилактики.

Изучение биологических свойств изолятов вируса бешенства и определение их патогенности, вирулентности, антигенности имеет важнейшее эпизоотическое значение.

Практическая значимость работы определяется тем, что в результате проведенных исследований разработаны: «Рекомендации по купированию первичных очагов бешенства» (19.11.2014 г.), «Методические указания по индикации возбудителя бешенства с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)» (01.08.2016 г.), информационное научно-популярное издание «Защити себя от бешенства» (26.04.2013 г.), издана памятка по профилактике бешенства для населения, которые рассмотрены и одобрены научно-методическим и ученым советом ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». В ветеринарную практику РТ внедрен способ выявления РНК вируса бешенства с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в ОТ-ПЦР.

**Методология и методы исследований.** Для выполнения поставленных задач и достижения цели диссертационной работы применяли эпизоотологические, клинические, серологические, вирусологические, культуральные, молекулярно-генетические методы исследования и метод экспериментального заражения восприимчивых животных.

**Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Особенности эпизоотического состояния по бешенству в Республике Татарстан в период с 2010 г. по 2016 г. Картографирование территории республики по интенсивности распространения заболевания;
2. Иммунобиологические и антигенные свойства эпизоотических штаммов вируса бешенства;

3. Результаты изучения эффективности вакцинопрофилактики бешенства животных;

4. Разработка синтетических олигонуклеотидных праймеров для индикации возбудителя бешенства методом ОТ-ПЦР.

**Степень достоверности и апробация результатов исследований** подтверждается многократными экспериментами, проведенными с применением стандартизированных методик и сертифицированного оборудования, анализа результатов с использованием методов статистической обработки данных. Результаты материалов диссертации опубликованы в статьях и обсуждались на научных конференциях с ведущими специалистами в данной области.

Основные результаты диссертации представлены и доложены на ежегодных отчетных научных сессиях ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» по итогам НИР за 2012-2017 гг.; Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных» (Покров, 2014); II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения ветеринарной медицины и биологии – в сельскохозяйственное производство» (Уфа, 2014); XII Межгосударственной научно-практической конференции «Вклад государств-участников содружества независимых государств в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях» (Саратов, 2014); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных» (Покров, 2014); конференции молодых ученых и специалистов (Казань, 2014); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика -2017» (Москва, 2017).

**Публикации результатов исследований.** По материалам диссертационной работы опубликовано 13 научных работ, в том числе 5 статей входящих в перечень журналов, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. По результатам исследований получен 1 патент РФ на изобретение.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований, заключения, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 124 страницах, содержит 13 таблиц и 13 рисунков. Список литературы включает 210 ссылок, в том числе 88 иностранных.

## 2 ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 2.1 Материалы и методы исследований

Работа выполнена в 2012 – 2016 гг. в лаборатории иммунологии ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» согласно плану прикладных и научных исследований отдела биологической безопасности и в неблагополучных по бешенству очагах Республики Татарстан.

Исследования проводили с использованием производственного штамма вируса бешенства «Овечий» ГНКИ, стандартного штамма вируса бешенства «CVS» и эпизоотических изолятов вируса бешенства, выделенных в процессе выполнения диссертационной работы.

В экспериментах использовали естественно восприимчивых и лабораторных животных: 415 белых мышей, 211 новорожденных белых мышат, 14 морских свинок, 19 кроликов, 5 ягнят 3 месячного возраста.

Для изучения распространения, сезонности, источников и факторов передачи возбудителя инфекции использовали различные методы, изложенные в методических рекомендациях под редакцией И.А. Бакулова (1975). Напряженность эпизоотической ситуации и картографирование неблагополучных районов Республики Татарстан проводили на основе методик М.Г. Таршиса и В.А. Константинова (1975). Анализ эпизоотологической ситуации заболеваемости бешенством в республике осуществляли, используя статистические данные Главного управления ветеринарии КМ РТ.

Обнаружение вируса бешенства проводили методом флуоресцирующих антител (МФА) в прямом варианте по ГОСТу 26075-13 с использованием «Флуоресцирующего антирабического глобулина» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань), в прямом варианте ИФА с использованием «Набора препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом ИФА» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань) согласно инструкции по применению.

Реакцию нейтрализации вируса (РН) проводили на белых мышах массой 14-16 г, с использованием стандартного штамма вируса бешенства «CVS» по Atanasiu P. (1975). Выделение вируса бешенства проводили на белых мышах по ГОСТу 26075-13 и в клеточной культуре ВНК-21 (перевиваемая линия клеток почки новорожденного сирийского хомячка) – согласно Методическим рекомендациям по лабораторной диагностике бешенства (1997).

Эффективность вакцинации животных против бешенства контролировали по эпизоотологическим показателям, по поедаемости антирабической вакцины согласно «Методическим указаниям по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в ткани зубов и костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин»,

(ВНИИЗЖ, 2010) и уровню антител к бешенству у животных в непрямом ИФА (Методические рекомендации по лабораторной диагностике бешенства, 1997) и в реакции нейтрализации вируса бешенства.

Конструирование праймеров осуществляли путем сравнения нуклеотидных последовательностей различных штаммов лиссавирусов, депонированных в международной базе данных GeneBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/GeneBank/GeneBankSearch.html>) при помощи пакета программного обеспечения «Vector NTI 9.1». Синтез олигонуклеотидных праймеров производился в ЗАО «Синтол» (Москва).

РНК вируса бешенства из проб патологического материала выделяли набором реагентов «Рибо-сорб» (ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Москва), реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов для выделения к-ДНК на основе «РЕВЕРТА-L» (ФГУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, г. Москва).

Продукты ОТ-ПЦР исследовались с помощью метода электрофореза в агарозном геле (1,7%) в трис-боратном буфере, рН 8,0. Результаты электрофореза учитывали на приборе «Трансиллюминатор» при длине волны 254 нм. Маркер молекулярного веса Fermentas 100-3000 пар оснований.

Экспериментальные данные анализировали с применением программ Microsoft Excel. Для получения достоверных результатов опыты проводили в трех повторностях.

Общая схема научных исследований по теме диссертационной работы приведена на рисунке 1.



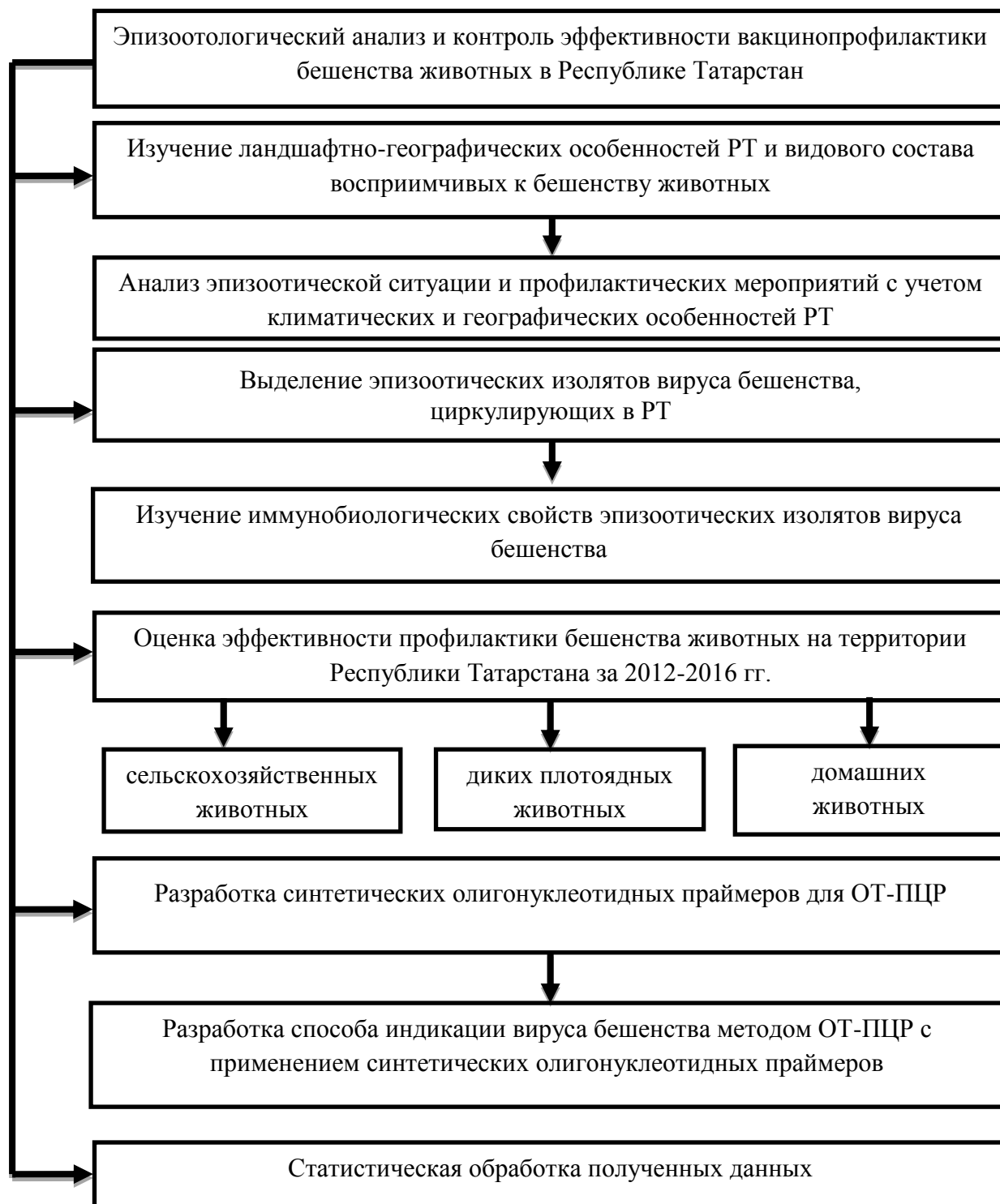


Рисунок 1 – Общая схема научных исследований

## 2.2 Результаты собственных исследований

### 2.2.1 Географические и климатические особенности Республики Татарстан

Республика Татарстан, площадью 67838 км<sup>2</sup>, расположена в восточной части Восточно-Европейской равнины у слияния рек Волги и Камы. Границы Республики Татарстан извилисты, к ней прилегает Республика Чувашия на западе, Республика Марий-Эл - на северо-западе, Кировская область - на севере, Республика Удмуртия - на северо-востоке, Республика Башкортостан - на востоке, Оренбургская область - на юго-востоке, Самарская и Ульяновская области - на юге. На территории республики обитает 73 вида млекопитающих, 289 - птиц, 52 - рыб, 8 - пресмыкающихся, 11 - земноводных.

Изучение видового состава животных, пораженных бешенством, на территории Татарстана указывает на возрастающее участие различных видов диких животных в эпизоотическом процессе. В течение 37 лет заболевание установлено у 11 видов диких животных – лисиц, волков, лосей, косуль, рыси, барсука, енотовидной собаки, кабана, медведя, ондатры, хомяка, среди которых лисица – главный резервуар и распространитель бешенства в республике.

### 2.2.2 Анализ эпизоотической ситуации и усовершенствование системы профилактики бешенства в Республике Татарстан

Эпизоотический анализ ситуации по бешенству за период 2012-2016 гг. показал, что Республика Татарстан остается неблагополучной. Так, за этот период выявлено и подтверждено лабораторными методами 1385 случаев бешенства среди животных, в том числе 737 (53%) у диких животных, 301 (22%) у сельскохозяйственных животных, 347 (25%) у домашних животных.

Максимальная заболеваемость среди диких животных установлена у лисиц (52%), среди сельскохозяйственных животных – у крупного рогатого скота (20%), среди домашних – у кошек (14%). Единичные случаи заболевания регистрировали в различные годы у медведя (0,1%), волка, куницы, ондатры, крысы и мыши.

**Характеристика эпизоотической ситуации по заболеваемости бешенством в РТ по периодичности и сезонам года.** По статистическим данным заболеваемости животных бешенством в РТ, цикличность возникновения эпизоотии характеризуется подъемом и спадом в отдельные годы с 2-3-х летней периодичностью. Установленная закономерность заболеваемости присуща как в отношении многих диких, так и домашних животных. Анализ данных по заболеваемости бешенством

сельскохозяйственных, диких и домашних животных в республике за период 2010-2016 гг., представленный на рисунке 2, демонстрирует периодичность проявления эпизоотий, выраженное повышение заболеваемости среди животных установлено в 2010, 2012, 2013, 2015 годах. В 2014 году регистрировали снижение заболеваемости бешенством до 132 случаев. В 2016 году произошел спад заболеваемости по сравнению с 2015 г. в 16 раз.

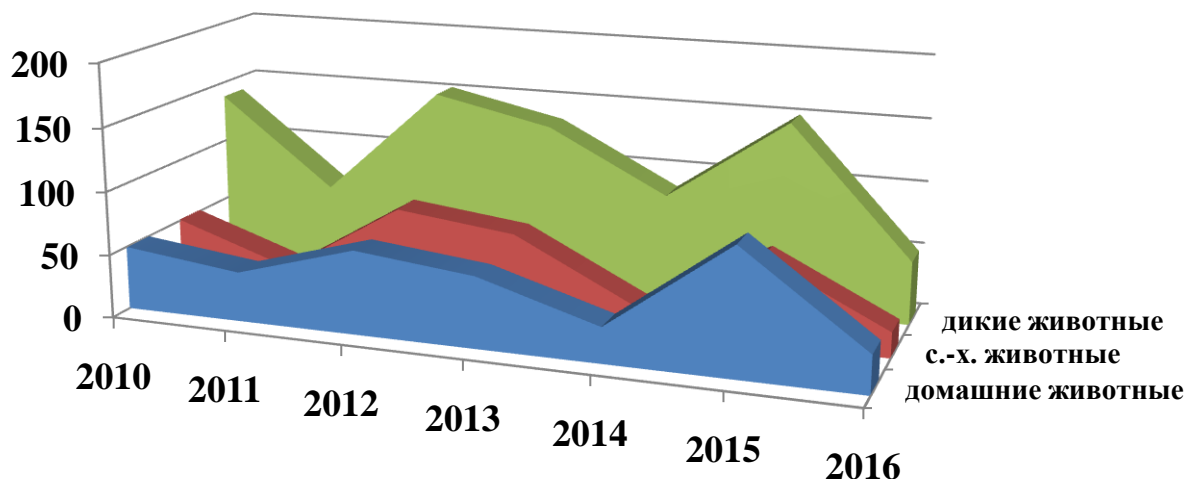


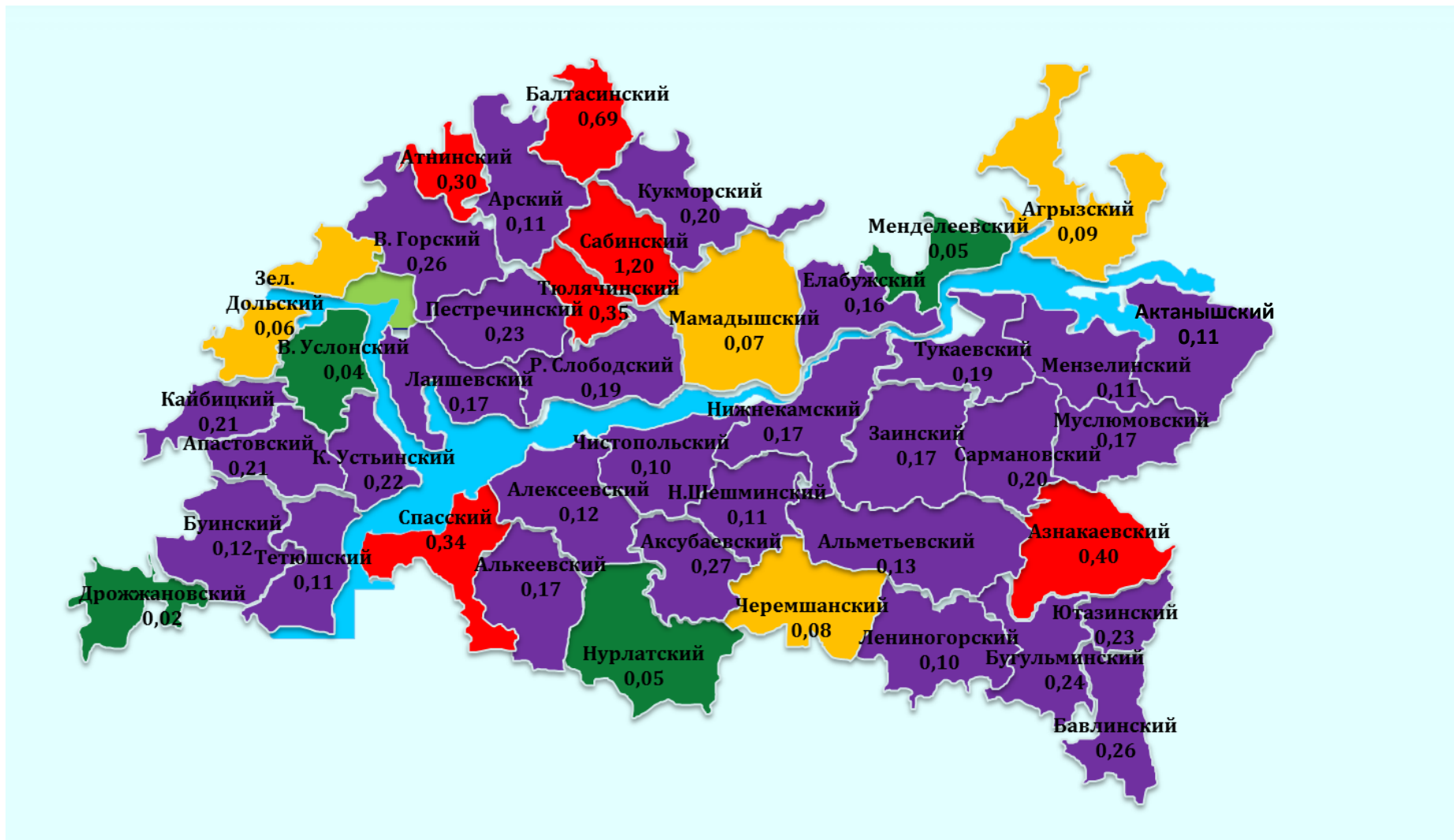
Рисунок 2 - Динамика заболеваемости бешенством животных в РТ за период 2010-2016 гг.

Наибольшее количество случаев бешенства среди разных видов животных приходится на зимние и весенние (66 – 63,1%), осенние и зимние (60,3 - 66%) соответственно месяцы года. Наименьшее количество заболеваемости животных бешенством регистрировали в летние месяцы (38%). Проявления количества случаев бешенства по сезонам года связана с биологией лисиц и еще раз доказывает то, что лисицы являются основным переносчиком этой болезни.

За период 2010-2016 гг., бешенство регистрировали в 43 административных районах и 18 городах РТ - Казани, Нижнекамске и Н. Челнах, и др. Проведено ранжирование территории республики на 4 условные зоны по количеству случаев бешенства на 10 км<sup>2</sup> (рис. 3).

Первая зона является наиболее опасной, в которой регистрировали высокие показатели степени напряженности эпизоотической ситуации от 0,40 до 1,24 случаев. В данной зоне за исследуемый период бешенство регистрировали в 6 административных районах и 1 городе РТ.

Вторая зона является средней, для которой напряженность эпизоотической ситуации была в пределах от 0,10 до 0,25 случаев. В этой зоне за изученный период, заболевание регистрировали в 29 административных районах РТ.



- █ зона наиболее опасная
- █ зона среднего риска
- █ зона низкого риска
- █ зона относительно благополучная

Рисунок 3 - Случаи бешенства среди животных в Республике Татарстан за 2010-2016 гг. на 10 км<sup>2</sup>

В третьей зоне показатель степени напряженности эпизоотической ситуации низкий - от 0,06 до 0,09 случаев. В этой зоне за указанный период заболевание регистрировали в 4 административных районах.

Четвертая зона относительно благополучная, в которой, показатель степени напряженности эпизоотической ситуации составлял от 0,02 до 0,05 случаев. В 4 административных районах этой зоны за последние 7 лет выявлено минимальное количество случаев бешенства среди диких, сельскохозяйственных и домашних животных.

Эпизоотические районы первой – третьей зоны характеризуются повышенным риском заражения животных и человека. Определение зон повышенного риска распространения рабического вируса дает возможность своевременно уточнять масштабы и сроки профилактической вакцинации животных и регулировать их численность.

### **2.2.3 Иммунобиологические свойства эпизоотических штаммов вируса бешенства**

При планировании карантинных, профилактических мероприятий, разработке антирабических лекарственных препаратов и диагностических тест-систем необходимо изучать и принимать во внимание биологические и антигенные свойства «местных» штаммов возбудителя бешенства.

Объектом для вирусологических исследований служил патологический материал, доставленный из неблагополучных по бешенству районов Республики Татарстан. Индикацию и идентификацию антигена вируса бешенства проводили, используя методы ИФА, РИФ, РН, выделение – на белых мышах.

В результате исследования 212 образцов патологического материала от разных видов животных положительный диагноз поставлен методами флуоресцирующих антител, ИФА и ОТ-ПЦР в 11 случаях. При изучении иммунобиологических свойств указанных изолятов отмечено, что выделенные штаммы вируса бешенства были устойчивы к рН в диапазоне 5-10 при 40<sup>0</sup>С, чувствительны к низким концентрациям растворов формальдегида, гидроксида натрия, хлорной извести, нагревание до 60<sup>0</sup>С инактивировало изоляты за 5-10 минут. Выделенные изоляты в разной степени обладали преципитирующей и комплементфиксирующей активностью в пределах 1:4 – 1:16 и нейтрализовались сыворотками, содержащими антитела к вакцинному штамму «Щелково-51» и производственному штамму «Овечий» ГНКИ, что свидетельствовало об антигенном соответствии эпизоотических изолятов производственным штаммам.

Также возбудитель рабической инфекции был выделен от человека. Выделенный штамм вызывал заболевания белых мышей с летальным исходом при интрацеребральном и подкожном способах заражения. Клинические признаки проявления вируса бешенства (горбатость, тремор мышц туловища и конечностей, взъерошенность шерсти, нарушение координации движений, паралич задних конечностей), составляла не более 24 – 36 ч. Инфекционный титр вируса на белых мышках составил  $10^{-3,4}$  LD<sub>50</sub>/0,03мл.

Фрагмент гена G вируса бешенства, выделенного от человека, сравнивали со штаммами вируса бешенства, принадлежащих к разным генотипам: шт. RABV, SADB19 (1-й генотип); шт. 0406SEN (2-й генотип); шт. 86132SA, 94286SA (4-й генотип); шт. 03002FRA, 8918FRA, RV9-1 (5-й генотип); шт. 9018HOL, RV1333 (6-й генотип). При анализе участка гена гликопротеина G размером 238 н.о. относительно вируса бешенства 1-го генотипа выявлено четыре нуклеотидные замены шт. RABVAY956319, что составляет 1,68% отличий.

Исследуемый изолят отличался от вакцинных штаммов «Внуково-32» на 25 нуклеотидных замен (10,5% отличий) и SADB19 на 26 нуклеотидных замен (10,9% отличий). Нуклеотидная последовательность изучаемого изолята отличалась на 32,7% от штамма 0406SEN 2-го генотипа лиссаподобного вируса (*Lagos bat*), на 27,7% от штаммов 86132SA и 94286SA 4-го генотипа лиссаподобных вирусов (*Duvenhage*), на 21-21,8% от штаммов 03002FRA, 8918FRA, RV9-1 5-го генотипа летучих мышей лиссаподобных вирусов (EBLVI), на 23,5% от штаммов 9018HOL и RV1333 6-го генотипа летучих мышей лиссаподобных вирусов (EBLV2).

В результате сравнительного изучения последовательности нуклеотидов участка гена G (238 н.о.) выявили наименьшее отличие 1,68% выделенного изолята от штамма RABVAY956319.

Для подтверждения роли грызунов в эпизоотическом процессе проведены исследования 238 проб головного мозга от 6 видов мышевидных грызунов, доставленных из восьми неблагополучных по заболеванию бешенством районов РТ. Однако в результате проведенных комплексных исследований роль мышевидных грызунов в непрерывном цикле передачи вируса бешенства не установлена. Так как результаты лабораторных исследований во многом зависят от правильного отбора, хранения и транспортировки проб патологического материала, для окончательного установления роли грызунов в эпизоотическом процессе необходимо проведение многократных исследований с соблюдением всех требований лабораторного анализа и с использованием дополнительных методов лабораторной диагностики.

#### **2.2.4 Оценка эффективности профилактики бешенства сельскохозяйственных, домашних и диких плотоядных животных**

С целью наибольшего охвата поголовья животных государственная ветеринарная служба Республики Татарстан использует такие мероприятия, как выездные и подворные вакцинации. Анализ статистических данных вакцинации сельскохозяйственных, диких и домашних животных в РТ за 2010–2016 гг. показал, что ежегодно увеличивается поголовье вакцинированных животных.

Одним из наиболее важных показателей при проведении мониторинга антирабической вакцинации является уровень серопревалентности – доля в популяции животных, содержащих антирабические антитела в защитном количестве. Проведен анализ эффективности вакцинопрофилактики бешенства КРС инактивированной жидкой культуральной вакциной «Рабиков» из штамма «Щелково-51» за 2012 - 2016 гг. Всего исследовано 239 проб сывороток крови животных из неблагополучных по бешенству районов РТ. В результате проведенных исследований установлено, что применение антирабической вакцины приводит к адекватному иммунному ответу у КРС в виде появления и нарастания титров специфических антител. Через 9 и 11 мес после вакцинации антитела в титрах 1:100 - 1:6400 выявлялись у всех иммунизированных животных.

Для профилактики бешенства у собак в ветеринарной практике используются такие вакцины как «Рабикан» (ФГУП «Щелковский биокомбинат»), «Мультикан-8» (ЗАО «НПО Нарвак», Москва), «Нобивак-Рабиес» («Интервет Интернэшнэл»). Нами проведена оценка напряженности поствакцинального иммунитета у собак при применении разных вакцин против бешенства. Оценку формирования иммунного ответа при проведении вакцинации собак проводили также с использованием иммуноферментного анализа. Сравнительный анализ эффективности применяемых на практике вакцин показал, что все изучаемые вакцины оказались высокоиммуногенными и титры антител были сопоставимы. При этом максимальный уровень поствакцинальных антител отмечали у собак через 2 мес после иммунизации и через 30 дней после ревакцинации. Несмотря на то, что к концу года титры антител снижались, однако, обладали протективными свойствами.

Таким образом, установлено, что среди сельскохозяйственных и домашних животных формируется иммунная прослойка, препятствующая распространению бешенства.

Вакцинопрофилактика бешенства является основным методом позволяющим сохранять благополучие и контролировать эпизоотический процесс. В связи с этим, провели исследование лисиц, отстреленных на территории раскладки оральной вакцины «Рабивак-0/333». Раскладка вакцин проводилась вручную: в 2011 году – 600100 доз, в 2012 году – 900000 доз и в

2013 году – 900100 доз.

В 2013 году всего исследовано 258 проб головного мозга лисиц для диагностики бешенства, 252 пробы костной ткани для определения поедаемости вакцины, а также 252 пробы глазной жидкости для определения титра антирабических антител у лисиц, доставленных из 40 районов РТ после осенней вакцинации в 2012 году. В результате проведенных исследований получены следующие данные: из 258 проб головного мозга обнаружен антиген вируса бешенства в 9 случаях, из 252 проб костной ткани обнаружено наличие тетрациклина в 104 пробах (41,2%), из 104 особей антитела к вирусу бешенства выработали 83 особи (79,8%). Таким образом, 79,8% лисиц, вакцинированных антирабической вакциной, защищены от заражения бешенством.

В 2014 году всего исследовано 145 проб головного мозга лисиц для диагностики бешенства, 145 проб костной ткани для определения поедаемости вакцины, а также 145 проб глазной жидкости для определения титра антирабических антител у лисиц. В результате проведенных исследований в 145 пробах головного мозга вируса бешенства не обнаружено, из 145 проб костной ткани обнаружено наличие тетрациклина в 66 (45,5%) случаях, из 66 особей антитела к вирусу бешенства выработала 51 особь (77,2%). Таким образом, 77,2 % лисиц, вакцинированных антирабической вакциной, защищены от заражения бешенством. Полученные данные свидетельствуют об эффективности проводимых противозoonотических и профилактических мероприятий.

### **2.2.5 Разработка синтетических олигонуклеотидных праймеров для выявления генома вируса бешенства**

Наиболее чувствительным и достоверным методом диагностики бешенства в России является классическая биопроба на белых мышах с последующей идентификацией антигена вируса бешенства методом флуоресцирующих антител (МФА). Недостатками биопробы являются продолжительность исследования, потенциальная опасность манипуляций, а также недопустимость исследования разложившегося материала. Учитывая вышеизложенные недостатки, среди существующих методов диагностики наиболее приемлемыми являются молекулярно-генетические методы выявления вируса бешенства, в частности ОТ-ПЦР. Данный метод (с момента доставки материала) позволяет поставить диагноз за один рабочий день. Для выявления генома вируса бешенства нами были разработаны синтетические олигонуклеотидные праймеры, комплементарные консервативной области генома вируса района гена гликопротеина:



fp\_850\_gp\_rabv5'-TTAGACTTATGGATGGAACATGGGT-3',  
 rp\_850\_gp\_rabv5'-AGTGACTGACACCTCCCTCCCT-3',  
 fp\_350\_gp\_rabv 5'-TCAGACGAAATTGAGCACCTTGT-3',  
 rp\_350\_gp\_rabv 5'-ACCTCCCCCAACTCTTAAACA-3'

Праймеры фланкируют консервативный участок гена гликопротеина вируса бешенства, к-ДНК которого не обладает полиндромными повторами нуклеотидов и не формирует чётко выраженных вторичных структур, не имея и протяженных G-C участков. Расчетная температура плавления для пар праймеров составила  $T_m=58^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.6 Разработка способа выявления РНК вируса бешенства с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в ОТ-ПЦР

**Выделение РНК вируса бешенства.** Выделение РНК из образцов головного мозга животных и клинического материала осуществляли стандартным способом с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» (ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора).

**Аmplификация участка к-ДНК вируса бешенства, кодирующего ген гликопротеина.** Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием ПЦР-смеси 1, состоящей из: воды деионизированной 1,5 мкл; dNTP 2,5 мМ/мкл, 2 мкл; 10×ПЦР буфера 2 мкл;  $\text{MgCl}_2$  25 мМ/мкл 2 мкл; Taq полимеразы 5 Е/мкл 0,5 мкл; fp\_850\_rabv 10 пк М/мкл 1 мкл; rp\_850\_rabv 10 пкМ/мкл 1 мкл. В подготовленные для ПЦР пробирки под масло или на масло вносили по 10 мкл исследуемых к-ДНК.

После первого раунда ПЦР использовали ПЦР-смесь 2, состоящую из: воды деионизированной 1,5 мкл; dNTP 2,5 мМ/мкл, 2 мкл; 10×ПЦР буфера 2 мкл;  $\text{MgCl}_2$  25 мМ/мкл 2 мкл; Taq полимеразы 5 Е/мкл 0,5 мкл; fp\_350\_rabv 10 пкМ/мкл 1 мкл; rp\_350\_rabv 10 пкМ/мкл 1 мкл. Поверх ПЦР-смеси 2 добавляли по капле минеральное масло и вносили по 10 продуктов амплификации первого раунда ПЦР. В качестве контрольного образца использовали ТЕ-буфер, в качестве положительного – к-ДНК рабического вируса.

Программа амплификации состоит из температурных режимов, представленных в таблице 1.

Продукты ОТ-ПЦР анализировали методом электрофореза в 1,7%-ном агарозном геле в стандартном трис-боратном буфере, рН 8,0. Результат ОТ-ПЦР считали положительным, если продукт ОТ-ПЦР визуализировался на трансиллюминаторе в виде светящегося фрагмента соответствующего 755 п.н.

Таблица 1 – Программа амплификации

Температура, °С	Время	Количество циклов
95	Пауза	
95	15 мин	1
95	10 с	40
58	15 с	
72	30 с	
72	2 мин	1
10	Хранение	

Проведение второго этапа амплификации проводили аналогично первому этапу с применением ПЦР-смеси-1, а в качестве матрицы использовали продукты амплификации 1 этапа. Детекцию продуктов ПЦР-амплификации проводили методом электрофореза в агарозном геле аналогично вышеописанному. В положительных пробах визуализировался паттерн 259 п.н.

**Определение чувствительности и специфичности ОТ-ПЦР.** Для определения чувствительности реакции использовали контрольный штамм вируса бешенства «Овечий» ГНКИ, разведенный методом 10-кратных разведений до  $10^{-7}$  LD<sub>50</sub>/мл. Чувствительность разработанной ОТ-ПЦР составила 1,3 lgLD<sub>50</sub>/мл.

Аналитическую специфичность разработанной тест - системы определяли исследуя препараты нуклеиновых кислот различных образцов биологического материала, содержащего геном вируса бешенства, эпизоотические изоляты бешенства, гомо- и гетерологичных вирусов и бактерий.

По результатам ПЦР установлено, что положительная реакция имела место в двух раундах предлагаемого способа с применением внешних и внутренних праймеров к гену гликопротеина рабического вируса, с к-ДНК эпизоотических изолятов вируса бешенства (№№13991, 3001, 329, 925, 2228, 139), референтного вируса бешенства – «CVS», производственного штамма «Овечий» ГНКИ и вакцинных – «Внуково-32», «Щелково-51» и ERA 0/333 вируса бешенства. Результаты реакции были отрицательными с ДНК из мозговой ткани здоровых животных (лисицы, кошки, собаки, овцы и кролика), а также с ДНК различных микроорганизмов, что свидетельствует о специфичности разработанного метода ОТ-ПЦР и набора олигонуклеотидных праймеров к гену гликопротеина вируса бешенства.

Результаты электрофоретического анализа продуктов второго этапа амплификации выборочно представлены на рисунке 4.

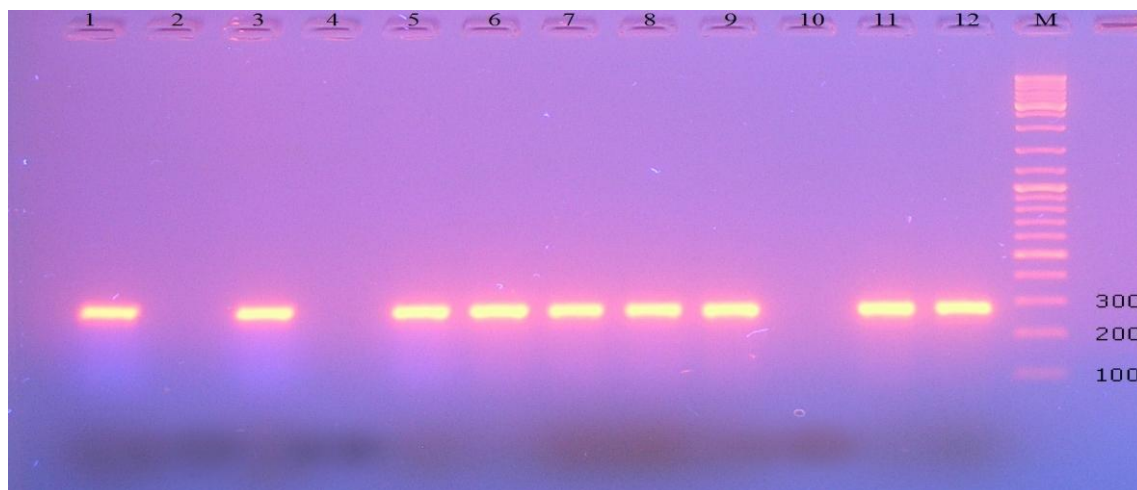


Рисунок 4 - Электрофореграмма продуктов второго этапа амплификации (праймеры 259 п.н.)

Обозначения: 1. Слезная жидкость больного человека с клиническими проявлениями гидрофобии; 2. Слезная жидкость здорового человека; 3. Слюна от больного человека с клиническими проявлениями гидрофобии; 4. Слюна здорового человека; 5. – 9. Эпизоотические штаммы (№№40, 258 и 5359), выделенные в РТ и Смоленской области (№36); 10. Отрицательный контрольный образец; 11. Вирус бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ; 12. референтный вирус бешенства, штамм «CVS»; 13. - М - Маркер молекулярного веса Fermentas 100-3000 пар оснований

Из данных рисунка видно, что исследуемые пробы: слезная жидкость и слюна больного человека с клиническими признаками гидрофобии, эпизоотические изоляты (№№40, 258 и 5359), выделенные в РТ и изолят №36, выделенный в Смоленской области, а также производственный штамм «Овечий» ГНКИ вируса бешенства и стандартный вирус бешенства, штамм «CVS», идентифицируются с помощью внутренних праймеров *fp\_350\_gp\_rabv* и *gp\_350\_gp\_rabv* на ген гликопротеина вируса бешенства, амплифицирующего участок гена гликопротеина в 259 п.н. В то же время реакция отсутствовала с пробами слюны и слезной жидкости от здорового человека и в отрицательном контрольном образце, что свидетельствует о специфичности метода ОТ-ПЦР.

Таким образом, разработанный способ обладает специфичностью при выявлении РНК штаммов и изолятов вируса бешенства. Указанный способ позволяет выявлять РНК вируса бешенства в исследуемых образцах (патологический материал от больных бешенством животных, культуральных жидкостях вакцинных штаммов вируса бешенства, клиническом материале - слезная жидкость и слюна больного гидрофобией). Апробацию праймеров проводили с использованием 11 изолятов вируса бешенства, выделенных от диких, домашних животных в Республике Татарстан и Смоленской области

Российской Федерации, 3-х вакцинных, производственного и стандартного штаммов вируса бешенства, а также клинического материала (2 пробы). Показано, что разработанные праймеры для индикации РНК вируса бешенства в патологическом и клиническом материале обеспечивают синтез фрагментов ДНК рассчитанных размеров (внешнего 755 п.н. и внутреннего 259 п.н.) в условиях разработанного ОТ-ПЦР. Преимущества разработанного метода перед классической биопробой на белых мышах представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Сравнительная оценка эффективности биопробы на белых мышах и предлагаемого ОТ-ПЦР при исследовании образцов на бешенство

Показатель	Выделение вируса на белых мышах	Предлагаемый ОТ-ПЦР
Продолжительность исследования одной пробы, сутки	от 7 до 30	0,4
Себестоимость одной пробы, рублей	6651	680
Необходимость подтверждения выявления вируса бешенства методом флуоресцирующих антител (МФА)	+	-

Таким образом, предлагаемый способ позволяет проводить эффективное выявление РНК штаммов и изолятов вируса бешенства в патологическом и клиническом материале, а также сократить сроки проведения исследований до 6 часов, снизить себестоимость диагностики в 9,8 раза, трудозатраты – в 40 раз.

Проведенные исследования позволили разработать методические указания и зарегистрировать изобретение в РФ (патент РФ № 2575088 от 02.10.2014г.).

### 3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований и их анализ позволяют сделать следующие выводы:

1. По результатам анализа эпизоотической ситуации по бешенству в Республике Татарстан за 2010-2016 гг. установлено, что бешенство в республике зарегистрировано во всех 43 муниципальных районах у 1385 животных, в том числе у 737 диких, 301 сельскохозяйственных и 347 домашних животных. Основное место в видовой структуре (52%) занимают дикие плотоядные животные – лисицы, которые являются резервуаром вируса бешенства.

2. Проведено картографирование районов Республики Татарстан,

неблагополучных по заболеваемости бешенством. По показателям степени напряженности эпизоотической ситуации проведено разделение районов на 4 зоны. При этом установлено, что наиболее неблагополучные по бешенству районы расположены в западной, северо-восточной и юго-восточной части республики.

3. Проведена оценка эффективности антирабической вакцинации у сельскохозяйственных и домашних животных в неблагополучных хозяйствах Республики Татарстан. Установлен высокий уровень сероконверсии у вакцинированных животных через 9 и 11 месяцев после вакцинации.

4. Результаты анализа эффективности вакцинопрофилактики рабической инфекции дикой фауны на территории Республики Татарстан позволяют сделать вывод, что поедаемость приманок с антирабической вакциной лисицами и уровень сероконверсии составляют 41,2 - 45,5% и 77,2 - 79,8%, соответственно.

5. Выделены и изучены иммунобиологические свойства 4 эпизоотических изолятов вируса бешенства, установлено их антигенное родство с производственными штаммами «Щелково-51» и «Овечий» ГНКИ рабического вируса. Эпизоотические изоляты паспортизированы и депонированы в лаборатории коллекции микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

6. Подобраны оригинальные синтетические олигонуклеотидные праймеры и разработан способ выявления РНК вируса бешенства в ОТ-ПЦР, позволяющий повысить эффективность выявления штаммов и изолятов рабического вируса в патологическом и клиническом материале, а также сократить сроки проведения диагностики до 6 часов и её себестоимость и трудозатраты в 9,8 и 40 раз, соответственно.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. Составлена карта эпизоотологического районирования территории Республики Татарстан по бешенству.

2. Паспортизированы и депонированы в лаборатории коллекции микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» эпизоотические изоляты вируса бешенства.

3. Предложен способ выявления РНК вируса бешенства в ОТ-ПЦР для индикации и идентификации возбудителя бешенства на основе разработанных синтетических олигонуклеотидных праймеров (патент РФ № 2575088 «Набор синтетических праймеров для выявления РНК вируса бешенства и способ выявления РНК вируса бешенства с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)»).

4. Разработаны «Рекомендации по купированию первичных очагов бешенства», «Методические указания по индикации возбудителя бешенства с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)».

## ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективными направлениями для дальнейших научных исследований являются совершенствование и разработка новых методов индикации и идентификации вируса бешенства, проведение молекулярно-генетических исследований выделенных изолятов вируса бешенства циркулирующих на территории Республики Татарстан, характеристика первичной структуры фрагментов геномов полевых изолятов вируса бешенства в сравнении с референтными штаммами вируса бешенства.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Хисматуллина, Н.А. Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: прижизненная и постмортальная лабораторная диагностика / Н.А. Хисматуллина, А.М. Гулюкин, М.И. Гулюкин, А.В. Иванов, В.В. Сабирова, А.Г. Южаков, Н.М. Александрова, **И.И. Самерханов**, Т.И. Алипер // Вопросы вирусологии. - 2015. - №2. - С. 19-24.

2. Гулюкин, А.М. Особенности эпизоотического процесса и молекулярно-генетических характеристик изолятов вируса бешенства в Республике Татарстан / А.М. Гулюкин, А.А. Шабейкин, О.Н. Зайкова, И.В. Полякова, А.Д. Забережный, Н.А. Хисматуллина, **И.И. Самерханов** // Ветеринарный врач. - 2015. - №6. - С.3-11.

3. **Самерханов, И.И.** Цикличность заболеваемости бешенством животных в Республике Татарстан / **И.И. Самерханов**, Н.А. Хисматуллина // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. - 2015. - №2. - С.76-77.

4. **Самерханов, И.И.** Биологические особенности вируса бешенства выделенного от человека / **И.И. Самерханов** // Ветеринарный врач. - 2016. - №2. - С. 20-23.

5. Хисматуллина, Н.А. Эпизоотическая ситуация по бешенству животных в республике Татарстан за 2009-2015 гг. / А.Н Чернов, А.Ф. Авзалова, **И.И.**

**Самерханов, М.А.** Ефимова, Э.М., Плотникова Л.Р. Хазиев // Ветеринарная патология. - 2016. - №2. - С. 12-17.

### Патент

6. Пат. 2575088 Российская Федерация. МПК С12Q1/16, С12N15/11. Набор синтетических олигонуклеотидных праймеров для выявления РНК вируса бешенства и способ выявления вируса бешенства с помощью синтетических олигонуклеотидных праймеров в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) / Иванов А.В., Хисматуллина Н.А., Усольцев К.В. Гулюкин, Н.М. Александрова, А.Г Южаков, В.В. Сабирова, А.Н. Чернов, А.А. Иванов, А.Д. Забережный, **И.И. Самерханов**, А.В. Паршикова, Т.Х. Фаизов.; заявитель и патентообладатель: Федеральное бюджетное государственное учреждение «Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности животных». - № 2014139999/10; заявл. 02.10.2014; опубл. 10.02.2016 Бюл. №4.

### Публикации в других изданиях

7. Хисматуллина, Н.А. Прижизненная и постмортальная диагностика гидрофобии / Н.А. Хисматуллина, В.В. Сабирова, А.М. Гулюкин, **И.И. Самерханов**, Н.М. Александрова, Т.П. Петрова, А.Н. Чернов // Современные достижения ветеринарной медицины и биологии – в сельскохозяйственное производство: материалы II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РСФСР и Башкирской АССР, доктора ветеринарных наук, профессора Хамита Валеевича Аюпова. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2014. – С. 131-134.

8. Хисматуллина, Н.А. К вопросу поедаемости антирабической вакцины лисицами на территории проведения вакцинации Республики Татарстан / **И.И. Самерханов**, А.М. Гулюкин, В.В. Сабирова, Ш.М. Насыров // Материалы Всероссийской научно-практической конференции: «Биотехнология и качество жизни». – Казань, 2014. - С. 44.

9. Хисматуллина, Н.А. Получение пероксидазного конъюгата для оценки эффективности вакцинопрофилактики бешенства лисиц / **И.И. Самерханов**, А.М. Гулюкин, М.М. Каримов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции: «Биотехнология и качество жизни». – Казань, 2014.- С. 220-222.

10. Иванов, А.В. Разработка и применение средств иммунологического мониторинга бешенства / А.В. Иванов, Н.А. Хисматуллина, А.Н. Чернов, А.М. Гулюкин, Р.Х. Юсупов, М.М. Каримов, **И.И. Самерханов**, С.Г. Явкин // Матер. XII Межгосударственной научно-практической конференции: «Вклад государств-участников содружества независимых государств в обеспечение

санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях». – Саратов, 2014. - С. 92-94.

11. Хисматуллина, Н.А. Эпизоотическая ситуация и контроль эффективности вакцинопрофилактики бешенства животных в Республике Татарстан / Н.А. Хисматуллина, А.Г. Хисамутдинов, **И.И. Самерханов**, А.М. Гулюкин, А.Н. Чернов, М.М. Каримов, В.В. Сабирова, А.Ф. Авзалова // Матер. Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных», посвященной 55-летию ВНИИВВиМ. – Покров, 2014. - С.331-338.

12. **Самерханов, И.И.** Характеристика заболеваемости бешенством в Республике Татарстан за 2009-2013 годы / **И.И. Самерханов**, Н.А. Хисматуллина // Конференция молодых ученых и специалистов. – Казань, 2014. - С. 75-77.

13. Александрова, Н.М. Разработка способа выявления в биологическом материале РНК вируса бешенства методом полимеразной цепной реакцией/ Н.М. Александрова, **И.И. Самерханов** // IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием: «Молекулярная диагностика 2017». – Москва, 2017. - том I. - С. 298-299.

Подписано в печать \_\_\_\_\_. 2018. Формат бумаги 60×84 1/16.

Усл.печ.л. 1. Тираж 100 экз. Заказ № .

Отпечатано с готового оригинал – макета  
в типографии «Вестфалика»

420111, г. Казань, ул. Московская, 22. Тел.: 292-98-92

E-mail: westfalika@inbox.ru