

Молекулярная эпидемиология вируса бешенства на территории Российской Федерации¹

А.А. Девяткин¹⁻³ (andreideviatkin@gmail.com),
 А.Н. Лукашев² (alexander_lukashev@hotmail.com),
 Е.М. Поляшук⁴ (e-poleschuk@yandex.ru), С.Е. Ткачев⁶ (tkachev@niboch.nsc.ru),
 В.Г. Дедков^{1,2} (vgdedkov@yandex.ru), Г.Н. Сидоров^{4,7} (g.n.sidorov@ompgu.ru),
 М.Ю. Щелканов⁵ (adorob@mail.ru), И.В. Галкина⁵ (galkina333@mail.ru),
 Г.Г. Карганова² (karganova@bk.ru), М.В. Гаврило⁸ (m_gavrilo@mail.ru),
 Г.А. Шипулин¹ (shipulin@cmd.su)

¹ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва

²ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», Москва

³ФГБНУ «НИИ медицины труда», Москва

⁴ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора

⁵ГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», Владивосток

⁶Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

⁷ФГБОУ ВПО «Омский государственный педагогический университет»

⁸ФГБУ «Национальный парк «Русская Арктика», Архангельск

Резюме

Определена нуклеотидная последовательность N-гена 81 штамма вируса бешенства, изолированных на территории Российской Федерации в период с 2008 по 2016 гг. Для реконструкции филогенетических событий были проанализированы 100 последовательностей N-генов вируса бешенства. Также была проведена временная датировка появления геновариантов вируса бешенства. Установлено, что вирусы-«космополиты» степного типа подразделяются на две филогенетически дискретные подгруппы с характерной географической локализацией.

В работе впервые описана циркуляция вирусов подгруппы A2 (Канада, Аляска, Якутия) на территории севера Европейской части Российской Федерации и архипелага Земля Франца-Иосифа. Присутствие геноварианта вируса бешенства степного типа было зарегистрировано на территории Приморского края и, по всей видимости, является результатом антропогенного переноса вируса.

Ключевые слова: Бешенство, филогенетика

Molecular Epidemiology of Rabies Virus in the Territory of the Russian Federation

A.A. Deviatkin¹⁻³ (andreideviatkin@gmail.com), A.N. Lukashev² (alexander_lukashev@hotmail.com),
 E.M. Poleshchuk⁴ (e-poleschuk@yandex.ru), V.G. Dedkov^{1,3} (vgdedkov@yandex.ru), S.E. Tkachev⁶ (tkachev@niboch.nsc.ru),
 G.N.Sidorov^{4,7} (g.n.sidorov@ompgu.ru), I.V.Galkina⁵ (galkina333@mail.ru), M.Yu. Shchelkanov⁵ (adorob@mail.ru),
 G.G. Karganova² (karganova@bk.ru), M.V. Gavrilo⁸ (m_gavrilo@mail.ru), G.A. Shipulin¹ (shipulin@cmd.su)

¹Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute of Epidemiology», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow

²Federal State Budget Institute of Science «Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis», Moscow

³Federal State Budget Institute of Science «Research Institute of Occupational Health», Moscow

⁴Federal Budget Institution of Science «Institute for Natural Foci Infections», Omsk, Russian Federation

⁵State Autonomous Educational Institution of Higher Professional Education «Far Eastern Federal University», Vladivostok, Russian Federation

⁶Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

⁷Federal Budget Institution of Science «Omsk State Pedagogical University, Omsk», Russian Federation

⁸Federal State Budget Institute «National Park «Russian Arctic», Archangelsk, Russian Federation

¹ Доложено на научно-практической конференции, посвященной 95-летию ФБУН «Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора: Актуальные проблемы эпидемиологии, микробиологии, природной очаговости болезни человека. Омск, 15 – 16 ноября 2016 г.

Abstract

In this study, we report the phylogenetic relationship of RABV circulating in Russia. A total of 81 new isolates obtained from different regions of Russia in 2008 – 2016 were partially sequenced. Evolutionary analysis based on 100 representative sequences of rabies virus N-gene fragments (1110 nt) with sample time span ranging from 1977 to 2016 was made by the Bayesian coalescent analysis. Temporal estimates for major evolutionary events were done.

The division of steppe rabies virus group C to discrete subgroups was revealed. According to our data, this most widespread in the Russian Federation group emerged in the beginning of the 1940th.

The presence of steppe rabies virus was detected in the Far East (Primorsky Krai). The most likely cause of this event is anthropogenic introduction. . For the first time, representatives of arctic rabies subgroup A2 were isolated in the north of European Russia and Franz-Josef Land.

Evolutionary analysis suggested relatively recent emergence of all rabies virus groups currently circulating in the territory of the Russian Federation.

Key words: Rabies, phylogenetics

Введение

Бешенство – вирусный зооноз с контактным механизмом передачи возбудителя, протекающий по типу энцефаломиелита и заканчивающийся летально. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в сфере эпидемиологического надзора и профилактики, ежегодно в мире от бешенства умирает более 55 000 человек, что делает бешенство самым смертоносным зоонозом [1].

Основное число смертей приходится на страны Азии и Африки, причём предполагается, что вследствие отсутствия должного эпидемиологического надзора и диагностики значительная часть случаев остаётся не выявленной. По причине нехватки достоверных статистических данных о заболеваемости бешенством в мире сложно подсчитать суммарный экономический ущерб от рабической инфекции, но по приблизительным оценкам бешенство приводит к ежегодной потере более чем 2 млн человеко-лет [2].

Современные методы анализа нуклеотидных последовательностей позволяют выяснить эволюционную историю разных вариантов вируса бешенства, циркулирующих на территории Российской Федерации, выделить основные геноварианты патогена, определить время расхождения разных эволюционных ветвей вируса бешенства. Подобный подход способен усовершенствовать эпидемиологический надзор за рабической инфекцией, обеспечить лучшее понимание динамики распространения бешенства и дать чёткое представление о генетическом разнообразии патогена на исследуемой территории.

Цель работы. Изучить актуальное распространение филогенетических групп вируса бешенства на территории Российской Федерации и их исторический филогенез.

Материалы и методы

Первичные нуклеотидные последовательности фрагментов N-гена (1110 нуклеотидов, $n = 81$) были получены в результате секвенирования сэнгеровским методом продукта амплификации

кДНК вируса бешенства с использованием олигонуклеотидов N1-F (ATGGATGCCGACAAGATTG)/N1-R (ATAGATGCTCAATCCGGGAG) и N2-F (ATGACAACTCACARAATGTGTGC)/N2-R (CCTCCATTCATCATGATTCCG).

Для реконструкции филогенетических событий использовали репрезентативную выборку нуклеотидных последовательностей N-генов штаммов вируса бешенства ($n = 100$), изолированных на территории Российской Федерации и сопредельных стран в 1977 – 2016 гг. Филогенетические взаимоотношения реконструировали при помощи методов байесовского моделирования, позволяющего проводить датирование эволюционных событий.

Статистическую обработку данных осуществляли при помощи программного обеспечения BEAST2.4.2 [3].

Результаты и обсуждение

По литературным и собственным данным известно, что на территории Российской Федерации и сопредельных стран циркулируют 6 групп вируса бешенства [4 – 9]:

- A.** Арктическая (северная часть Красноярского края, северная часть Республики Якутия, Республика Коми, земля Франца Иосифа, Аляска, северная часть Канады, Гренландия);
- B.** Арктически-подобная (Хабаровский край, Читинская область, Приморский край, Манчжурия).
- C.** Степная (Белгородская, Тульская, Волгоградская, Оренбургская, Пензенская, Воронежская, Липецкая, Нижегородская, Новосибирская, Астраханская, Омская области; Республики Тыва, Дагестан и Башкортостан, Алтайский, Краснодарский и Красноярский края, Украина, Казахстан, Монголия, провинция КНР Внутренняя Монголия и Синьцзян-Уйгурский автономный район КНР);
- D.** Центрально-Российская (Московская, Владимирская, Тверская, Тульская, Рязанская, Нижегородская области, Венгрия);
- E.** Северо-восточно-европейская (Псковская, Новгородская, Брянская, Ленинградская области,

Эстония, Финляндия, Литва, Словакия, Польша, Германия, Украина);

F. Кавказская (Республика Дагестан, Краснодарский край, Грузия, Азербайджан, Ирак, Иран).

Согласно результатам филогенетического анализа, так называемый Последний общий предок [ПОП] всех штаммов вируса (нуклеотидная последовательность которых известна), представленных на территории Российской Федерации, существовал в 1660 году [95% Байесовский доверительный интервал [БДИ] = 1538 – 1769].

Филогруппы C, D, E, F (современные российские представители линии вирусов-космополитов) являются потомками вируса бешенства, существовавшего приблизительно в 1850 году [95% БДИ = 1797 – 1901]. Линии A (арктическое бешенство) и B (арктически-подобное бешенство) разделились ориентировочно в 1801 году [95% БДИ = 1723 – 1865].

Предок представителей филогруппы F, зарегистрированных на территории республики Дагестан и Краснодарского края, скорее всего, появился примерно в 1996 году [95% БДИ = 1987 – 2003].

ПОП филогруппы E (русские представители северо-восточно-европейской линии) существовал ориентировочно в 1971 году [95% БДИ = 1957 – 1982]. Российские представители филогруппы D (центрально-европейско-русская линия) являются потомками вируса, циркулировавшего примерно в 1967 году [95% БДИ = 1948 – 1983]. ПОП филогруппы C («степная» линия) вероятнее всего появился в 1944 году [95% БДИ = 1924 – 1962]. ПОП группы A (арктическое бешенство) существовал приблизительно в 1952 году [БДИ = 1934 – 1968].

Филогруппа C, представители которой циркулируют в степной и лесостепной природных зонах Евразии, наиболее широко представлена в исследованной выборке. В первой половине XX века бешенство регистрировали преимущественно среди волков, собак и кошек. В 1942 г. в Астраханской области (один из эндемичных по бешенству районов, в котором циркулируют вирусы-космополиты) зафиксировали первые случаи бешенства енотовидных собак, а осенью 1945 – зимой 1946 годов зарегистрировали первую на территории СССР в XX веке вспышку заболеваемости бешенством среди лисиц. Существует теория – что именно из этого региона инфекция мелких псовых впоследствии распространилась в пределах Великой Степи (обширный степной экорегион, расположенный в центре Евразии) со скоростью 40-60 км/год [10]. Гипотеза поддерживается результатами современных методов молекулярно-филогенетического анализа – ПОП циркулирующих на сегодняшний день на территории Российской Федерации вирусов-космополитов степного типа существовал ориентировочно в 1944 году [95% БДИ = 1924 – 1962]. Таким образом, результат

байесовского моделирования совпадает с историческими данными.

Практически сразу после своего возникновения филогруппа C разделилась на подгруппы C1 и C2. Вероятность того, что подгруппы C1 и C2 являются самостоятельными подгруппами внутри группы C (значения апостериорной вероятности – АВ) составляет 0,62 и 0,95 соответственно. Подгруппа C1 состоит из линии C1A [AB = 1,0] (степные и лесостепные регионы Российской Федерации (Липецкая, Воронежская, Белгородская, Волгоградская, Владимирская, Брянская, Саратовская, Нижегородская области Краснодарский край, республика Дагестан), Западно-Казахстанская область республики Казахстан, центральные и восточные регионы Украины) и C1B [AB = 1,0] (субъекты Российской Федерации (Омская, Астраханская, Оренбургская области, республика Башкортостан); Актюбинская, Алматинская, Восточно-Казахстанская области Казахстана, Синцзян-Уйгурский АР КНР). Линии C1A и C1B имеют дискретные географические паттерны распространения. Общий предок подгруппы C1 существовал приблизительно в 1952 году [95% БДИ = 1931 – 1971]. Подгруппы C1A и C1B возникли ориентировочно в 1971 [95% БДИ = 1948 – 1971] и 1966 [95% БДИ = 1955 – 1986] годах соответственно.

На основании филогенетического анализа подгруппа C2 может быть разделена на 3 линии: представители C2A [AB = 0,84] распространены на территории южной Сибири (республики Бурятия, Хакасия, Тыва, Красноярский край), Алматинской области Казахстана, автономного региона КНР Внутренняя Монголия, аймаков Монголии Завахан, Говь-Алтай, Хувсгел; линия C2B [AB = 0,91] представлена на территории Российской Федерации (Алтайский край, Омская область), Монголии (аймак Хувсгел), Казахстана (Алматинская, Восточно-Казахстанская область); представители C2C [AB = 1,0] обнаружены в Омской области Российской Федерации и Алматинской области Казахстана. Общий предок подгруппы C2 существовал ориентировочно в 1952 году [95% БДИ = 1934 – 1967]. Подгруппы C2A, C2B и C2C возникли ориентировочно в 1958 [95% БДИ = 1943 – 1972], 1960 [95% БДИ = 1944 – 1974] и 1983 [95% БДИ = 1977 – 1988] годах соответственно.

Геновариант вируса бешенства, принадлежащий к филогруппе C1A, изолировали в селе Барабаш Приморского края в 2014 году (КР997032) [11]. Стоит отметить, что ближайшие описанные родственники этого штамма циркулировали в степных регионах Европейской части Российской Федерации (Липецкая и Воронежская области) и Западно-Казахстанской области республики Казахстан. Например, КР997032 и КТ965737 (изолированный в 2014 году в Западно-Казахстанской области) имеют 99,67% идентичных нуклеотидов в фрагменте N-гена (1228 нуклеотидов). ПОП этих двух геновариантов вируса существовал ориентировочно

в 2001 году [95% БДИ = 1993 – 2008]. Расстояние между Уральском (столица Западно-Казахстанской области) и селом Барабаш Приморского края составляет 5817 км, при этом на территории Южной Сибири, Монголии, Казахстана и северо-западных провинций Китая обнаружены вирусы-космополиты степного типа, отличные от вирусов, циркулирующих в центрально-чернозёмном экономическом районе Российской Федерации. Поэтому наиболее вероятным механизмом возникновения новой филогруппы на Дальнем Востоке предполагается антропогенный занос геноварианта вируса бешенства из степных экорегионов европейской части России и западного Казахстана в Приморский край, произошедший не ранее 1993 года.

В ходе выполнения работы был охарактеризован ряд штаммов, подгруппы A2 вируса бешенства арктического типа (филогруппа A), изолированных на территории севера Европейской части Российской Федерации (Ненецкий АО, республика Коми) и архипелаге земля Франца-Иосифа. Несмотря на то, что представители этой линии распространены на обширной территории арктического региона (Аляска, север Якутии, север Европейской части Российской Федерации, земля Франца-Иосифа), генетическое разнообразие вирусов является

низким. Например, все известные представители филогруппы A2 имеют 99,1 – 100% идентичных нуклеотидов в исследуемом фрагменте N-гена. Вирусы, выделенные в Европейской части полярного региона РФ, были филогенетически ближе к вирусам, выделенным не в азиатской части полярного региона РФ, а к штаммам, выделенным в Северной Америке, причем ПОП этих вирусов существовал приблизительно в 1997 [95% БДИ = 1991 – 2004] г. Это указывает на чрезвычайно быстрое распространение вируса на территории Арктического региона, предположительно в результате активной миграции животных – носителей бешенства.

Выводы

1. В результате работы реконструировали филогенетические взаимоотношения дискретных штаммов вируса бешенства, а также выполнили датирование основных эволюционных событий. Описана целостная картина распространения вируса бешенства на территории Российской Федерации.
2. Показано, что занос и распространение современных штаммов вируса бешенства разных филогрупп на всей территории РФ происходили преимущественно в XX веке.

Литература

1. Knobel D.L., Cleaveland S., Coleman P.G., Fvre E.M., Meltzer M.I., Miranda M.E. et al. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Organ.* 2005; 83 (5): 360 – 368.
2. Fooks A.R., Banyard A.C., Horton D.L., Johnson N., McElhinney L.M., Jackson A.C. Current status of rabies and prospects for elimination. *Lancet.* 2014; 6736 (13):1 – 11. Доступно на: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24828901>
3. Bouckaert R., Heled J., K hner D., Vaughan T., Wu C.H., Xie D. et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis," *PLoS Comput. Biol.* 2014; 10 (4): 1 – 6. Доступно на: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24722319>
4. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., McElhinney L.M., Smith J.S., Orciari L.F., Hughes G.J. et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *J Wildl. Dis.* 2004 Oct.; 40 (4): 617 – 631. Доступно на: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15650080>
5. Metlin A.E., Rybakov S., Gruzdev K., Neuvonen E., Huovilainen A. Genetic heterogeneity of Russian, Estonian and Finnish field rabies viruses. *Arch. Virol.* 2007 Jan.;152 (9): 1645 – 54. Доступно на: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17558542>
6. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Грибенча С.В. Итоги изучения антигенного и генетического разнообразия вируса бешенства в популяциях наземных млекопитающих России. *Вопросы вирусологии.* 2013; 58 (3): 9 – 16.
7. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Ткачев С.Е., Девяткин А.А., Дедков В.Г., Очкасова Ю.В. и др. Эколого-вирусологические особенности эпизоотического процесса бешенства в центрально- чернозёмном районе России. *Ветеринарная патология.* 2013; 2: 101 – 108.
8. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Ткачев С.Е. Молекулярная эпидемиология бешенства на юге Восточной Сибири. *Инфекция и иммунитет.* 2013; 3 (2): 164 – 164.
9. 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 – 48.
10. Сидоров Г.Н. Аспекты исторического развития природных очагов бешенства в Европе и Северной Азии. *Ветеринарная патология.* 2002; 1: 21 – 25.
11. Shchelkanov M.Y., Deviatkin A.A., Ananiev V.Y., Dedkov V.G., Shipulin G.A., Sokol N.N. et al. Complete Genome Sequence of a Rabies Virus Strain Isolated from a Brown Bear (*Ursus arctos*) in Primorsky Krai, Russia (November 2014). *Genome Announc.* 2016 Aug 25 4 (4):e00642-16. Доступно на: <http://genomea.asm.org/lookup/doi/10.1128/genomeA.00642-16>.

References

1. Knobel D.L., Cleaveland S., Coleman P.G., Fvre E.M., Meltzer M.I., Miranda MEG et al. Re-evaluating the burden of rabies in Africa and Asia. *Bull World Health Organ.* 2005; 83 (5): 360 – 368.
2. Fooks A.R., Banyard A.C., Horton D.L., Johnson N., McElhinney L.M., Jackson A.C. Current status of rabies and prospects for elimination. *Lancet.* 2014; 6736 (13): 1 – 11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24828901>
3. Bouckaert R., Heled J., K hner D., Vaughan T., Wu C.H., Xie D. et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis," *PLoS Comput. Biol.* 2014; 10 (4): 1 – 6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24722319>
4. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., McElhinney L.M., Smith J.S., Orciari L.A., Hughes G.J. et al. Molecular epidemiology of terrestrial rabies in the former Soviet Union. *J Wildl Dis.* 2004 Oct;40 (4): 617 – 631. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15650080>
5. Metlin A.E., Rybakov S., Gruzdev K., Neuvonen E., Huovilainen A. Genetic heterogeneity of Russian, Estonian and Finnish field rabies viruses. *Arch Virol.* 2007 Jan.; 152 (9):1645 – 54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17558542>
6. Polishchuk E.M., Sidorov G.N., Gribencha S.T. Results of the study of the antigenic and genetic diversity of the rabies virus in populations of Russia terrestrial mammals. *Problems of Virology. [Voprosi virusologii].* 2013; 58 (3): 9 – 16.
7. Polishchuk E.M., Sidorov G.N., Tkachev C.E., Devyatkin A.A., Dedkov S.H. Ochkasova S.E. et al. Environmental and virological features of rabies epizootic process in the Central Black Earth region of Russia. *Veterinary pathology. [Veterinarnaya patologija].* 2013; 2: 101 – 108.
8. Polishchuk E.M., Sidorov G.N., Tkachev S.E. Molecular epidemiology of rabies in the south of Eastern Siberia. *Infection and Immunity. [Infekcii i immunitet].* 2013; 3 (2): 164 – 164.
9. Chupin S.A., Chernyshova E.B., Metlin A.E., Genetic characterization of field isolates of rabies virus, identified in the Russian Federation in the 2008 - 2011. *Problems of Virology. [Voprosi virusologii].* 2013; 58 (4): 44 – 49.
10. Sidorov G.N. Aspects of the historical development of natural foci of rabies in Europe and North Asia. *Veterinary pathology. [Veterinarnaya patologija].* 2002; 1: 21 – 25.
11. Shchelkanov M.Y., Deviatkin A.A., Ananiev V.Y., Dedkov V.G., Shipulin G.A., Sokol N.N. et al. Complete Genome Sequence of a Rabies Virus Strain Isolated from a Brown Bear (*Ursus arctos*) in Primorsky Krai, Russia (November 2014). *Genome Announc.* 2016 Aug. 25; 4(4): e00642-16. Available at: <http://genomea.asm.org/lookup/doi/10.1128/genomeA.00642-16>