

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный научный центр исследований и разработки
иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН»

На правах рукописи

Девяткин Андрей Андреевич

**Молекулярная эпидемиология вируса бешенства на территории
Российской Федерации и оптимизация лабораторной диагностики
рабической инфекции на основе методов амплификации
нуклеиновых кислот**

03.02.02 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой
степени
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в лаборатории молекулярной биологии вирусов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН».

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор РАН,

Лукашев Александр Николаевич.

Официальные оппоненты:

Борисевич Сергей Владимирович, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, кандидат медицинских наук, профессор, начальник Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации»;

Баринский Игорь Феликсович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией сравнительной вирусологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

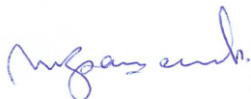
Зверев Виталий Васильевич, академик РАН, доктор биологических наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова».

Защита диссертации состоится 29 июня 2017 г. в 13 часов на заседании совета МГУ.03.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальностям 03.01.03 – молекулярная биология (биологические науки); 03.02.02 – вирусология (биологические науки) Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М1.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский проспект, д. 27, отдел диссертаций), на сайте <http://www.bio.msu.ru> и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru>

Автореферат разослан ___ мая 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук, профессор



И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Бешенство – вирусное заболевание зоонозной природы с контактным механизмом передачи возбудителя, протекающее по типу энцефаломиелита и заканчивающееся летально.

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в сфере эпидемиологического надзора и профилактики заболеваемости бешенством, а также в области создания антирабических вакцин, ежегодно в мире от болезни умирает более 55000 человек, что делает бешенство самым смертоносным зоонозом.

Основное число смертей приходится на страны Азии и Африки, причём предполагается, что вследствие отсутствия должного эпидемиологического надзора и развитой инфраструктуры клинико-диагностических лабораторий значительная часть случаев заболеваемости бешенством 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 2 000 000 человеко-лет.

Сведения о современной эпидемической ситуации по бешенству в Российской Федерации свидетельствуют о серьёзном социальном и экономическом значении рабической инфекции. Так, в 2007-2011 гг. зарегистрировано 22 264 случаев бешенства у животных (из них 10916 диких, 6669 домашних, 4431 сельскохозяйственных животных) и 67 случаев у людей. Ежегодно вследствие травмирования животными порядка 200-400 тысяч людей обращаются за антирабической помощью.

В настоящее время в Российской Федерации для посмертной лабораторной диагностики бешенства животных преимущественно применяют метод флуоресцирующих антител (МФА), биологическую пробу на белых мышах, иммуоферментный анализ (ИФА).

Лабораторная диагностика бешенства требует как можно более скорого, ясного и недвусмысленного результата экспертизы и основана на обязательном использовании нескольких методов, регламентированных на международном уровне. В случае отрицательного или сомнительного результата МФА проводят постановку биологической пробы на белых мышах. Вспомогательным методом диагностики бешенства является иммуоферментный анализ.

Всё большее применение в диагностике бешенства получают молекулярно-генетические методы, рекомендуемые ВОЗ к использованию в качестве дополнительных. На территории Российской Федерации имели место случаи, когда молекулярно-генетические методы явились основными. В 2009 году в Приморском крае из

головного мозга пациентки, умершей от менингоэнцефалита неясной этиологии, на мышцах-сосунках выделили вирус, который идентифицировали только через год благодаря использованию молекулярно-биологических методов.

Одним из наиболее интенсивно развивающихся направлений молекулярно-биологической диагностики инфекций является метод полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. На момент начала выполнения представленной работы в литературе не было описано отечественных разработок, позволяющих детектировать РНК вируса бешенства методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время в Российской Федерации при лабораторной диагностике бешенства аутопсийный материал исследуют преимущественно методом флуоресцирующих антител (МФА). В случае отрицательного или сомнительного результата МФА используют вспомогательные способы диагностики заболевания: метод выделения вируса бешенства на животных (белые мыши) или в культуре клеток, иммуноферментный анализ (ИФА), реакцию диффузионной преципитации. Прижизненная диагностика бешенства не практикуется.

В рамках рекомендаций ВОЗ молекулярные методы диагностики бешенства играют вспомогательную роль, однако успешное использование данных методов является многообещающей практикой, внедрённой в ряде стран. В литературе описаны случаи, когда молекулярно-генетические методы являлись основными в диагностике у людей летальных инфекций, вызванных лиссавирусами. Ретроспективная диагностика двух случаев бешенства у пациентов из Астраханской области, погибших в 2003 г. от энцефалита неясной этиологии, проводимая в рамках работы по расшифровке случаев нейроинфекций, стала возможна в первую очередь благодаря применению молекулярно-биологических методов.

В настоящее время технология ПЦР в реальном времени получила широкое применение в молекулярной диагностике, что обусловлено высокими показателями специфичности и чувствительности метода, а также высокой скоростью проведения анализа. Несмотря на то, что описан ряд разработок, успешно внедренных в практику диагностики бешенства, ранее не было опубликовано работ, проверяющих работоспособность имеющихся методов на выборке российских геновариантов вируса бешенства. Более того, информация о генетическом разнообразии вируса бешенства на территории РФ могла быть недостаточно полной.

Первая работа, описывающая генетическое разнообразие вируса бешенства на основании анализа 39 последовательностей N-гена (1353

оснований) и 55 фрагментов G-гена (405 оснований) штаммов, выделенных на территории бывшего СССР, была опубликована в 2004 г. Авторы определили 5 филогрупп вируса бешенства, циркулирующего на территории бывшего Советского Союза.

В исследовании, опубликованном в 2007 г., подтверждаются и дополняются результаты предыдущей работы о молекулярной эпидемиологии бешенства в Российской Федерации. Авторы дополнительно выделили подгруппу вируса бешенства, распространённую на Северном Кавказе.

Благодаря развитию байесовых методов молекулярных часов стало возможно воспроизводить хронологию основных событий в эволюции вируса бешенства. Были проведены исследования для вирусов, изолированных в разных регионах мира, однако до выполнения текущей работы целостная картина динамики распространения бешенства на территории Российской Федерации не была охарактеризована.

Цель исследования

Усовершенствование и стандартизация методов лабораторной молекулярной диагностики бешенства на территории Российской Федерации на основе актуальных данных о циркулирующих геновариантах вируса.

Задачи исследования

1. Описать филогенетические группы вируса бешенства, циркулирующие на территории Российской Федерации.
2. Провести филогенетический анализ фрагментов генома вируса бешенства.
3. Определить динамику распространения различных геновариантов вируса бешенства, циркулирующих на территории Российской Федерации и сопредельных стран.
4. Разработать и апробировать набор реагентов для определения РНК вируса бешенства (*Rabies virus*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени.
5. Провести сравнительные испытания разработанного набора реагентов с существующими методами лабораторной диагностики бешенства.

Научная новизна

Впервые была воспроизведена хронология основных событий в эволюции вируса бешенства на территории Российской Федерации.

Впервые в Российской Федерации определена первичная нуклеотидная последовательность геномов вирусов бешенства,

выделенных из мозговой ткани человека (*Homo Sapiens*), медведя (*Ursus Arctos*), песца (*Vulpes Lagopus*).

Впервые разработан отечественный набор реагентов для диагностики бешенства путём постановки ОТ-ПЦР в реальном времени, для которого описаны основные аналитические характеристики. Проведено сравнение предлагаемого подхода в диагностике бешенства с «золотым стандартом» — методом биологической пробы на белых мышах.

Теоретическая и практическая значимость.

Использование разработанного набора реагентов позволило выявить присутствие РНК вируса бешенства в мозговой ткани двух пациентов, погибших в результате развития энцефалита неясной этиологии в Астраханской областной инфекционной больнице в 2003 году. Внедрение в лабораторную диагностику бешенства метода ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией повышает эффективность диагностики рабической инфекции.

В ходе работы были проанализированы все нуклеотидные последовательности N-гена вируса бешенства, находящиеся в открытом доступе на момент выполнения исследования и описанные как выделенные на территории Российской Федерации. На основании филогенетического анализа описаны молекулярные механизмы популяционных перестроек, определены временные интервалы основных эволюционных событий. Было показано сравнительно низкое генетическое разнообразие популяции вируса бешенства. Выдвинуто предположение, что популяция вируса бешенства, находясь под давлением стохастических факторов окружающей среды, является нестабильной и может исчезать по естественным причинам. Добавление фактора оральной вакцинации диких плотоядных животных способно привести к искоренению вируса. Результаты проведённого филогенетического анализа свидетельствуют о том, что при условии проведения регламентированных мероприятий по оральной вакцинации диких плотоядных в отдельных регионах Российской Федерации возможна элиминация вируса бешенства. Тем не менее, дальнейшие полевые исследования необходимы для разработки стратегии эффективной элиминации бешенства на федеральном уровне.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием общенаучных и специальных методов исследования (молекулярно-биологические, биоинформатические методы).

Основной объем исследований проведен автором самостоятельно, отдельные этапы работы выполнены с участием коллабораторов и сотрудников лаборатории.

Положения, выносимые на защиту

Разработанная диагностическая система в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК штаммов классического вируса бешенства RABV применима как в рамках надзорных мероприятий, так и для диагностики бешенства у животных и человека.

При помощи предлагаемого подхода проведена ретроспективная диагностика бешенства у пациентов, погибших в результате развития энцефалита неясной этиологии.

Распространение вируса бешенства на Российской Федерации происходило в течение последних 500 лет, причем преобладающая группа степного бешенства возникла в середине 20 века. Показана передача вирусов бешенства арктической группы между континентами в течение последних десятилетий. Показана возможность антропогенного распространения вируса бешенства, выделяемого от диких животных.

Личный вклад соискателя

Диссертация Девяткина А.А. является научной работой, написанной самостоятельно. Личный вклад соискателя состоит в определении целей и задач исследования, поиске источников информации, выборе объекта и предмета исследования. Теоретические и методические положения, выводы, содержащиеся в диссертации, являются результатом самостоятельного исследования соискателя

Основной объем исследований проведен автором самостоятельно (молекулярно-биологические исследования, биоинформатический анализ), отдельные этапы работы выполнены с участием сотрудников Омского НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора (работа с исходным вирус-содержащим материалом) и сотрудников Центрального НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (разработка компонентов диагностического набора реагентов).

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов определяется комплексным подходом к проведению исследований, выполненных с использованием современных методов. При проведении филогенетических исследований были использованы стандартные методы оценки статистической значимости результатов.

Апробация результатов исследования.

Результаты диссертационной работы были представлены на научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней» (Новосибирск, 26-28 сентября 2013 года), на VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2014» (Москва, 18-20 марта 2014 года), на конференции молодых учёных «Фундаментальная и прикладная микробиология» (Москва, 28 апреля 2014 года).

По теме диссертации опубликовано десять научных статей, в том числе шесть статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, четыре в зарубежных журналах, индексируемых в международных системах цитирования (библиографических базах – Web of Science, Scopus, PubMed); пять публикаций в материалах научно-практических конференций.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 123 страницах. Список литературы включает 26 отечественных и 90 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 7 Таблицами и 22 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Материалы исследования. Для определения первичной нуклеотидной последовательности вируса бешенства с целью дизайна диагностических олигонуклеотидов в работе использовали материал 28 штаммов RABV. С целью оценки диагностической чувствительности метода ОТ-ПЦР в реальном времени в работе использовали 23 образца первичного положительного по бешенству материала, для 8 из которых была известна концентрация вируса в LD₅₀.

Для определения диагностической специфичности метода ОТ-ПЦР в реальном времени использовали 22 образца, охарактеризованных методом биологической пробы на белых мышах как не содержащие вирус бешенства.

Для оценки аналитической специфичности метода ОТ-ПЦР в реальном времени использовали нуклеиновые кислоты следующих вирусов и млекопитающих: сем. Rhabdoviridae (вирус Араван, вирус Худжанд), сем. Bunyaviridae (вирус Тягина, вирус Батаи, вирус Дхори, вирус крымской геморрагической лихорадки, вирус Инкоо); сем. Reoviridae (вирус Кемерово, ротавирус); сем. Togaviridae (вирус Чикунгунья, вирус Синдбис, вирус краснухи); сем. Flaviviridae (вирус жёлтой лихорадки, вирус лихорадки западного Нила, вирус клещевого энцефалита); сем. Picornaviridae (энтеровирус ЕСНО-71); сем.

Retroviridae (вирус иммунодефицита человека); ДНК из тканей головного мозга мыши, собаки, кошки, человека.

Дизайн олигонуклеотидов. На основании выравнивания известных на момент начала выполнения работы нуклеопротеин-кодирующих нуклеотидных последовательностей штаммов, циркулирующих на территории Российской Федерации, с целью разработки набора реагентов для детекции РНК вируса бешенства путём постановки ОТ-ПЦР в реальном времени был определён консервативный участок N-гена, для которого выбрали праймеры и зонд: Rt Rab-2f_Neuer (AAGAАСТТТGAGGAAGAGATAAGAAG); Rt_Rab-2r_Neu (AACACATGACCAACRGCATTCGAT); Rt_Rab-z2_neu (R6G-AGGAGACAGCTGTTCCCTCACTCCTAT-BHQ1). Структурно зонд представляет собой пробу с инвертированным концевым повтором («молекулярный маячок»).

Для возможности проведения секвенирования полного генома вируса бешенства было синтезировано 50 олигонуклеотидов. Дизайн олигонуклеотидов проводили, следуя общим требованиям, предъявляемым к выбору олигонуклеотидов, используемых при проведении ПЦР.

Секвенирование фрагментов генома вируса бешенства. В ходе выполнения работы были отсекуены 8 полных геномов штаммов вируса бешенства, выделенных из мозговой ткани человека (*Homo sapiens*), бурого медведя (*Ursus arctos*), песца (*Vulpes lagopus*), обыкновенной лисицы (*Vulpes vulpes*), кошки (*Felis silvestris catus*). В рамках совместной работы с Омским НИИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора и института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН отсекуены фрагмент N-гена (1110 нуклеотидов) для 81 штамма вируса бешенства.

Разработка набора реагентов для определения РНК вируса бешенства (Rabies virus) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. Для осуществления поэтапного контроля проведения анализа синтезировали рекомбинантные положительные контрольные образцы: кДНК положительный контрольный образец (К+), РНК-защищённый положительный контрольный образец (ПКО).

Реакцию обратной транскрипции РНК и амплификации участка кДНК вируса бешенства (RABV) проводили в одношаговом формате.

амплификаторах планшетного типа (iCycler iQ5 (BioRad, США), «ДТ-96» («ДНК-Технология», Россия)).

Пороговую линию флуоресценции устанавливали в середине линейного участка прироста значения флуоресценции положительного контроля, выраженного в логарифмических единицах. Результаты амплификации интерпретировали как положительные, если наблюдали пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Для оценки аналитической чувствительности готовили с десятикратным шагом разведения положительного контрольного образца (ПКО) известной концентрации на плазме от здоровых людей. С помощью разработанной диагностической системы выявили минимальное пороговое разведение, при котором образец идентифицируется как положительный. Порог чувствительности устанавливали по минимальному разведению, детектированному в трех повторях.

Также аналитическую чувствительность оценивали с помощью 8 штаммов RABV (8202, 8247, 8300, 8313, 8315, 8317, 8318, 1п8202) с известной концентрацией, рассчитанной по методу Рида и Менча в единицах LD50/мл. Порог чувствительности устанавливали по минимальному разведению, детектированному в трех повторях.

Филогенетический анализ. Из международной базы данных ГенБанк получили все доступные на 4-е июля 2016 года последовательности, содержащиеся в своём названии ключевые слова «gabies» и «nucleoprotein» (n=12 051). Затем все последовательности короче 1110 нуклеотидов исключили из выборки. Для идентификации целевых (российских) последовательностей в рассмотрении оставили только последовательности, имеющие не менее 94% идентичных нуклеотидов в сравнении с KC538853 (штамм изолирован в Липецке в 2012 году) – линия вирусов-космополитов, а также последовательности, имеющие не менее 91% идентичных нуклеотидов в сравнении с KY002890 (штамм изолирован в Ненецком АО в 2008 году) — линия вирусов арктического и арктически-подобного типов. Последовательности, не содержащие информации о периоде изолирования штаммов, были исключены из выборки. Последовательности, относящиеся к филогруппам, представители которых не циркулируют на территории Российской Федерации, были исключены из выборки. Для удаления практически идентичных последовательностей в выборке оставили только последовательности, различающиеся между собой на не менее, чем 0,1% идентичных нуклеотидов. В качестве внешней группы использовали JQ685915 (штамм изолирован в США в 2002 году). Последовательности #FJ424484, U43433, U22475, U22840, JF973787, JF973796, KU198463, KU198471, KU198469 и U11375 искусственно добавили в выборку с целью её расширения. Финальный размер выборки составил 108 последовательностей.

Филогенетический анализ провели методом Байесовского моделирования. В качестве модели нуклеотидных замен выбрали модель «обратного прыжка», автоматически подбирающую наиболее подходящее для выборки количество параметров в процессе перебора дендрограмм. Разные временные и популяционные модели сравнили на основании сравнения Байесовых факторов. Наивысший показатель достоверности наблюдали при использовании комбинации

некоррелированных логнормальных расслабленных молекулярных часов и постоянной популяционной модели. Филогенетический анализ выполнялся в ходе 100 миллионов генераций марковских цепей Монте-Карло (модель «обратимых прыжков»).

Результаты исследования и их обсуждение

Разработка набора реагентов для диагностики бешенства методом ПЦР в реальном времени. В результате работы был создан набор реагентов для выявления РНК вируса бешенства в мозговой ткани методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентной детекцией, позволяющий проводить анализ как в одношаговом формате (реверсия и амплификация происходят в одной пробирке), так и в двухшаговом формате (реверсия и амплификация происходят в разных пробирках). Для возможности контроля качества всех этапов проведения анализа был разработан положительный контрольный образец (ПКО) на основе защищенной РНК.

При проверке аналитической специфичности перекрёстных реакций для тестируемых организмов и вирусов не было зарегистрировано.

Аналитическая чувствительность системы, оцененная с помощью разведений препарата ПКО, составила $2,5 \times 10^3$ копий РНК в мл (при выделении из 100 мкл образца) (Рисунок 1).

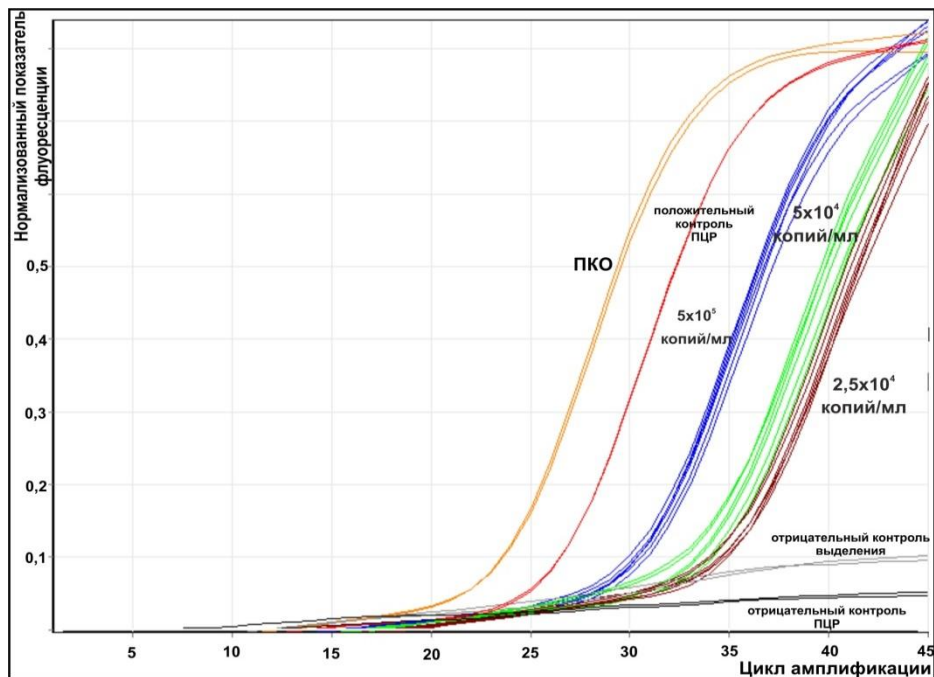


Рисунок 1. Определение аналитической чувствительности системы.

Сравнение предлагаемого подхода в диагностике бешенства путём постановки ОТ-ПЦР в реальном времени с «золотым стандартом» — методом биологической пробы на белых мышах проводили, используя материал 8 изолятов вируса бешенства (8202, 8247, 8300, 8313, 8315, 8317, 8318, 1п8202) с известной концентрацией вируса в исходной суспензии (измеренной в LD50/мл). Каждый образец разводили до концентраций 10 LD50/1 мл, 1 LD50/1 мл, 0.1 LD50/1 мл, выделяли РНК, затем проводили постановку ОТ-ПЦР в реальном времени в трёх повторах.

При проведении анализа методом биологической пробы детекция патогена возможна при концентрации вирусных частиц не ниже 10 LD50/мл (согласно экспериментальным данным, полученным в результате совместной работы с Омским НИИПОИ природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора); в то время как при постановке ОТ-ПЦР в реальном времени во всех образцах, в которых концентрация вируса бешенства превышала 1 LD50/мл результат анализа был положительным. Таким образом набор реагентов для выявления РНК вируса бешенства методом постановки ОТ-ПЦР в реальном времени имеет более низкий предел обнаружения и, следовательно, более высокую аналитическую чувствительность.

При исследовании диагностической чувствительности метода ОТ-ПЦР в реальном времени РНК вируса бешенства детектировали во всех образцах, которые ранее были охарактеризованы методом постановки биологической пробы на мышах как содержащие вирус бешенства.

При исследовании диагностической специфичности метода ОТ-ПЦР в реальном времени РНК вируса бешенства не обнаружили ни в одном из образцов, которые ранее были охарактеризованы методом постановки биологической пробы на мышах как не содержащие вирус бешенства.

В ходе работы при помощи набора реагентов был идентифицирован 28 штаммов вируса бешенства, последующее секвенирование кодирующих нуклеопротеин фрагментов генома которых выявило принадлежность изолятов к 5 из 6 подгрупп вируса, циркулирующих на территории Российской Федерации. Работоспособность набора реагентов не была проверена на вирусах бешенства, принадлежащих группе арктически-подобных вирусов, по причине их отсутствия в нашей выборке. Следует отметить, что единственные (среди опубликованных в международной базе данных ГенБанк на момент написания представленной работы) «российские» представители этой группы (AY352502, AY352459, AY352460, AY352502) были изолированы не менее чем 20 лет назад на территории Хабаровского края и Читинской области. Процент идентичных нуклеотидов в N гене в использованной выборке штаммов варьируется от 100,00% до 88.40%. Несмотря на это, все вирусы были успешно детектированы при помощи диагностического набора.

Таким образом, разработанный набор реагентов позволяет детектировать штаммы вируса бешенства, принадлежащие разным филогенетическим подгруппам, циркулирующим на территории РФ.

Разработанный набор реагентов был апробирован на биологическом материале разного происхождения. С помощью предлагаемого метода идентифицированы вирусы бешенства в образце мозговой ткани медведя из Приморского края и песка с Земли Франца-Иосифа, проведена ретроспективная диагностика двух случаев бешенства у пациентов из Астраханской области.

Точный диагноз бешенства может быть установлен только на основании проведения лабораторных исследований, и его постановка часто требует применения комплекса методов. Разработка стандартизированного набора реагентов для выявления РНК вируса бешенства методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени позволяет использовать дополнительный диагностический метод и совершенствовать диагностику в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Это, в свою очередь, улучшает эффективность мероприятий по эпидемиологическому надзору за рабической инфекцией.

Вирус бешенства как возможный этиологический агент энцефалитов неясной этиологии. Известны две возможные формы течения бешенства: буйная (2/3 случаев) и паралитическая (тихая) (1/3 случаев). Классические симптомы заболевания (непроизвольные, болезненные сокращения диафрагмы и глоточных мышц в ответ на глотание жидкости; обильное слюноотделение; аэрофобия; изменённое сознание) проявляются лишь при развитии буйного бешенства [81].

В случае развития паралитического бешенства клиническая картина схожа с синдромом Гийена — Барре (острая аутоиммунная воспалительная полирадикулоневропатия), что может привести к неверной диагностике заболевания. Кроме того, бешенство, вызванное геновариантами вируса, циркулирующими у летучих мышей, протекает в атипичной форме и приводит к развитию очагового неврологического дефицита, миоклонуса, хорей, признаков синдрома Горнера.

Дополнительные трудности в выявлении болезни вызывает длительный инкубационный период (описан случай, в котором между заражением человека инфекцией и проявлением клинических симптомов бешенства прошло не менее 8 лет).

В силу приведённых черт особо опасная инфекция может быть идентифицирована медицинским работником неверно.

Согласно официальной статистике, ежегодно в мире от бешенства умирает от 26 400 (95% доверительный интервал 15 200 – 45 200) до 61 000 (95% доверительный интервал 37 000 -86 000) человек. В то же время, приведённые данные могут быть существенно занижены. Например, при проверке информации о количестве случаев бешенства у людей в Объединённой Республике Танзания выявили, что реальные

числа вероятнее всего превышают официально зарегистрированные не менее, чем в 10 раз.

В случае: 1) несвоевременного обращения пациента за помощью; 2) слабой выраженности классических симптомов бешенства; 3) отсутствия классических симптомов бешенства; 4) низкой квалификации медицинского персонала возможна постановка диагноза «энцефалит неясной этиологии». Также состояние больного, вызванное бешенством, может быть описано как неврологическое нарушение неинфекционной этиологии. Частным случаем описанной проблемы является трансплантация тканей и органов от доноров, погибших в результате неврологических нарушений, природа которых на момент пересадки трансплантата была неясна.

Ряд отечественных авторов описывает, что примерно в половине случаев бешенства могут иметься затруднения в постановке диагноза.

Таким образом, представляется необходимым проводить проверку биологического материала пациентов, для которых был поставлен диагноз «энцефалит неясной этиологии», и потенциальных доноров, умерших в результате неизвестных неврологических нарушений, на предмет присутствия генетического материала вируса бешенства.

В ходе выполнения представленной работы были выявлены неустановленные ранее случаи заболеваемости бешенством среди людей.

Филогенетический анализ штаммов вируса бешенства на основании выравнивания N-генов. На территории Российской Федерации циркулируют 2 основных линии вируса бешенства: Арктическое/Арктически-подобное бешенство (группы А и В согласно ранее предложенной классификации) и космополитическое бешенство (группы С, D, E, F) (Рисунок 2).

Согласно результатам проведённого филогенетического анализа последний общий предок (ПОП) (англ. The most recent common ancestor (TMRCA)) всех циркулирующих на территории Российской Федерации геновариантов вируса бешенства существовал в 1670 году (95% БДИ = 1560-1782). Группы С, D, E и F («вирусы-космополиты») являются потомками предковой формы, существовавшей в 1849 году [95% БДИ = 1796-1894]. Следует отметить, что эти группы были представлены в исследуемой выборке неравномерно.

Группа D включала в себя семь штаммов вируса бешенства, изолированных в центральном федеральном округе Российской Федерации. Общий предок этих штаммов существовал в 1969 году [95% БДИ = 1950-1986]. Вирус, изолированный в Венгрии в 1991 году, являлся близкородственным с российскими представителями группы D. ПОП группы D существовал в 1941 [95% БДИ = 1915-1966], поэтому вероятнее всего эта группа появилась в Российской Федерации в промежутке между 1915 и 1986 годами (крайние значения БДИ).

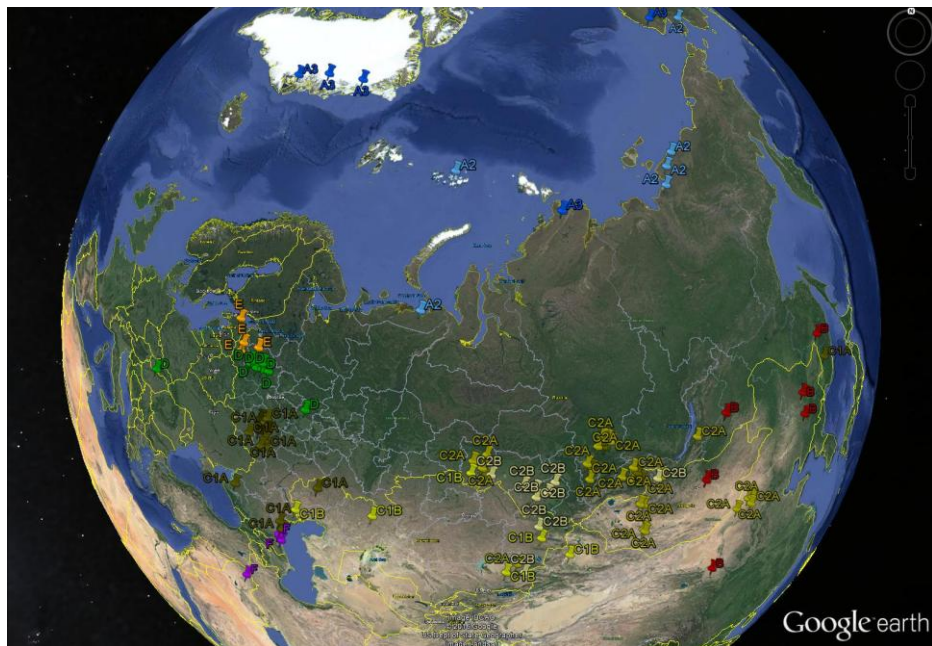


Рисунок 2. Распространение геновариантов вируса бешенства на территории Российской Федерации и соседних стран. Точность обозначений ограничена на уровне административных образований первого уровня (области и т.п.).

Большинство российских изолятов, представленных в репрезентативной выборке (44/64), принадлежали группе С (см. Рисунок 3). Один штамм вируса, выделенный из кошки в Белгородской области в 1991 (AY352456), являлся внешней группой относительно других представителей группы С, на основании чего этот штамм следует рассматривать как представителя независимой подгруппы С0. Другие вирусы группы С группировались вместе с апостериорной вероятностью (АВ) 1,0 и подразделялись на две подгруппы (С1 и С2). ПОП этих подгрупп существовал приблизительно в 1948 [95% БДИ = 1929-1964].

Подгруппа С1 не имела значимой статистической поддержки (АВ 0.55) и может быть обозначена как «все представители группы С, которые не входят в состав подгрупп С0 и С2». Подгруппа С1 включала в себя 23 штамма вируса, преимущественно изолированных к западу от горных хребтов Тяньшаня и Алтая. Подгруппа С1 состояла из линии С1а [АВ=1.0] (степные и лесостепные регионы Российской Федерации, Западно-Казахстанская область республики Казахстан, центральные и восточные регионы Украины и С1b [АВ=1.0] (субъекты Российской Федерации (Омская, Астраханская, Оренбургская области, республика Башкортостан); Актюбинская, Алматинская, Восточно-Казахстанская

области Казахстана, Синцзян-Уйгурский АР КНР). Линии С1а и С1б имеют дискретные географические паттерны распространения.

На основании филогенетического анализа подгруппа С2 может быть разделена на 3 линии: представители С2а [АВ=0.83] распространены на территории южной Сибири (республики Бурятия, Хакасия, Тыва, Красноярский край), Алматинской области Казахстана, автономного региона КНР Внутренняя Монголия, аймаков Монголии Завхан, Говь-Алтай, Хувсгел. Линия С2b [АВ=0.91] представлена на территории Российской Федерации (Алтайский край, Омская область), Монголии (аймак Хувсгел), Казахстана (Алматинская, Восточно-Казахстанская область); представители С2с [АВ=1.0] обнаружены в Омской области Российской Федерации и Алматинской области Казахстана.

ПОП группы Е (русские представители северо-восточно-европейской линии) существовал ориентировочно в 1974 [95% БДИ=1962–1983].

В группу Е вошли три штамма вируса бешенства, изолированных в северо-западной части Российской Федерации. Эти штаммы являлись близкородственными с вирусом, выделенным в Эстонии в 1991 году.

ПОП группы Е (русские представители северо-восточно-европейской линии) существовал ориентировочно в 1971 году [95% БДИ=1962–1983]. ПОП этих вирусов и эстонского штамма существовал в 1920 году [95% БДИ=1889–1950].

Группа Е являлась родственной по отношению к ранее описанным западноевропейской, восточноевропейской и центральноевропейской (WE, EE, SE, соответственно) группами. ПОП этих групп существовал приблизительно в 1889 году [95% БДИ=1858-1924].

Предок представителей группы F, зарегистрированных на территории республики Дагестан и Краснодарского края, скорее всего, появился примерно в 1992 году [95% БДИ=1979–2004]. Другие вирусы этой группы были ранее описаны на Ближнем Востоке (Ирак, Иран, Турция). Иранские представители были ранее охарактеризованы как принадлежащие к филогруппе Iran-1a. ПОП группы F существовал примерно в 1966 году [95% БДИ=1947–1983].

Группы А (арктическое бешенство) и В (арктически-подобное бешенство) разделились ориентировочно в 1806 году [95% БДИ=1732–1871]. Ранее было описано разделение группы арктического бешенства на четыре подгруппы: Arctic-1 (A1), Arctic-2 (A2), Arctic-3 (A3) и Arctic-4 (A4). Подгруппа А1 состояла из штаммов, циркулирующих только в канадской провинции Онтарио. Представителей подгруппы А4 обнаруживали только на территории штата Аляска (США). Подгруппы А2 и А3 широко распространены на обширных полярных территориях: северная часть Якутии и штат Аляска (А2), северные части Красноярского края, Канады и Гренландия (А3). Исходя из собственных результатов, подгруппы А2 и А3 возникли примерно в 1979 [95% БДИ=1973–1985] и 1971 [95% БДИ=1962–1979] годах. ПОП подгрупп А2

и А3 существовал ориентировочно в 1960 году [95% БДИ=1946–1972]. Подобные результаты находятся в соответствии с ранее полученными оценками [87].

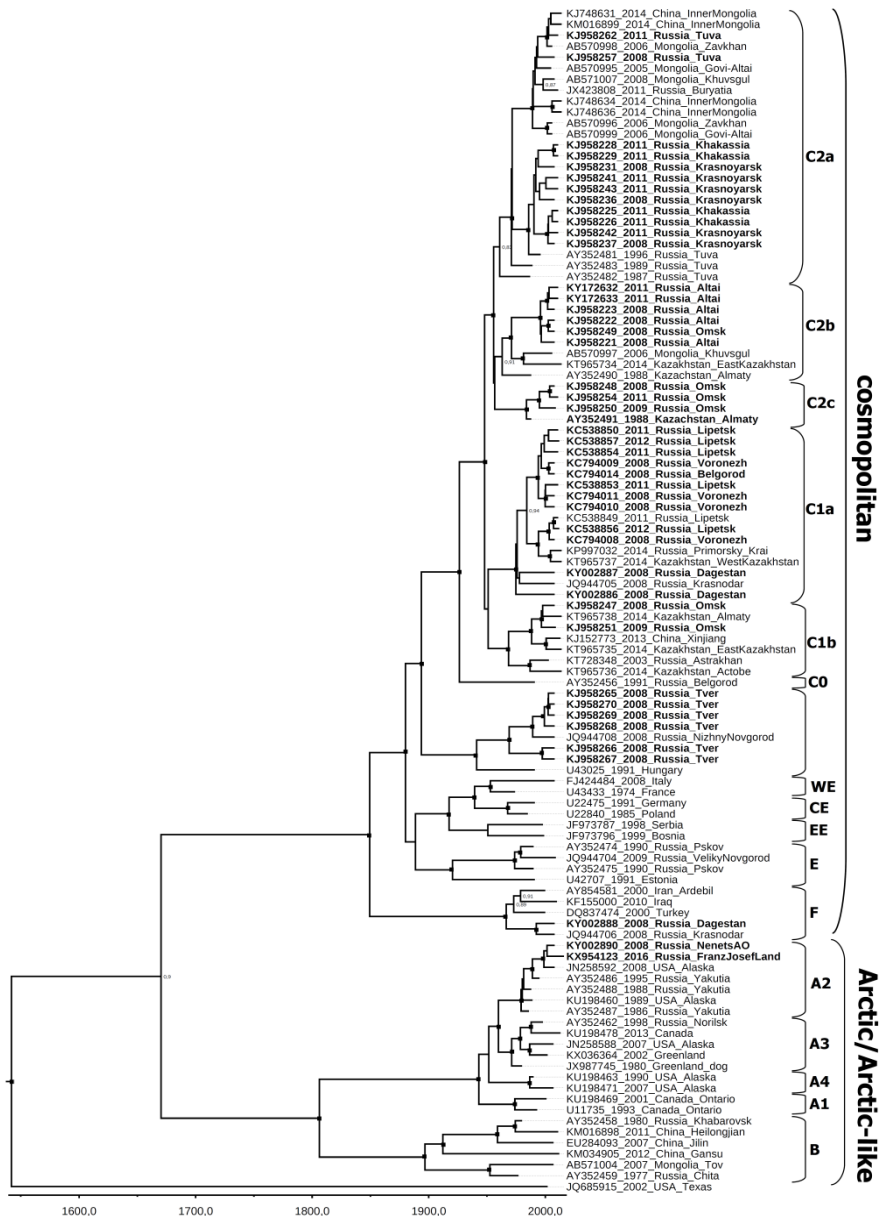


Рисунок 3. Филогенетическое древо, полученное байесовым методом для 108 изолятов вируса бешенства на основании

выравнивания нуклеотидной последовательности фрагмента N-гена (1110 нуклеотидов). Шкала отображает время (в годах). Узлы, апостериорные вероятности которых превышают 95%, обозначены чёрными квадратами. Узлы, апостериорные вероятности которых составляют 80-95%, обозначены соответствующими числами. Узлы, апостериорные вероятности которых меньше 80%, не обозначены. Названия последовательностей, полученных в текущем исследовании выделены жирным шрифтом.

Следует отметить, что в ходе выполнения текущей работы представители подгруппы А2 были впервые обнаружены в северной части европейской России (Ненецкий АО, республика Коми) и на земле Франца-Иосифа.

Филогенетическое разнообразие геновариантов вируса бешенства, циркулирующих на территории Российской Федерации. Одной из основных целей текущей работы являлось описание целостной картины распространения бешенства на территории Российской Федерации. Для исследования взаимоотношений между разными геновариантами вируса было использовано 64 последовательности фрагментов N-генов (1110 нуклеотидов) штаммов, выделенных на территории 21 административного региона Российской Федерации. Также в анализ были включены 44 последовательности, выделенных на территории 16 окружающих Российскую Федерацию стран.

Степное бешенство (группа С) – наиболее распространённый геновариант вируса в Российской Федерации. Группа циркулирует в степном и лесостепном экологических регионах Евразии; естественным резервуаром являются лисицы (*Vulpes vulpes* и *Vulpes corsac*). В используемой выборке группа С была представлена 61 штаммом, изолированным на огромной территории. ПОП степных штаммов существовал приблизительно в 1948 году. 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 (*Nyctereutes procyonoides*), а осенью 1945 — зимой 1946 годов зарегистрировали первую на территории СССР в XX веке вспышку заболеваемости бешенством среди лисиц. На основании исторических статистических данных ранее было предположено, что именно из этого региона инфекция мелких псовых впоследствии распространилась в пределах всей Великой Степи (обширный степной экорегион, расположенный в центре Евразии) со скоростью 40-60 км/год. В 1949 году было зарегистрировано бешенство среди лисиц в Казахстане. В южной Сибири (Новосибирск) первые случаи бешенства среди лисиц описали в 1958 году. Описанный путь распространения бешенства и гипотеза о возникновении подгрупп С1 и С2 в 1940-х годах были поддержаны

результатами молекулярно-филогенетического анализа - ПОП циркулирующих на сегодняшний день на территории Российской Федерации вирусов-космополитов степного типа подгрупп С1 и С2 существовал ориентировочно в 1948 году [95% БДИ=1929–1964]. Кроме того, описанная вспышка бешенства в Новосибирске в 1958 году соотносится с вычисленными временными промежутками существования ПОП подгруппы С2 – 1956 год [95% БДИ=1941–1970]. Эта подгруппа включает в себя вирусы, изолированные в Омской и Красноярской областях, которые граничат с Новосибирской областью с запада и востока. Таким образом, результат байесовского моделирования совпадает с историческими данными.

Геновариант вируса бешенства, принадлежащий к филогруппе С1а, изолировали в селе Барабаш Приморского края в 2014 году (КР997032). 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 КР997032 и КТ965737 существовал ориентировочно в 2004 году [95% БДИ = 1997-2012]. 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 подгруппы С2, 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 1997 года.

Следует отметить, что согласно нашим результатам ПОП всех геновариантов вируса бешенства, циркулирующих на территории Российской Федерации, существовал ориентировочно 347 лет назад (95% БДИ = 235-457 лет назад). При этом минимальная нижняя граница БДИ среди всех отдельных групп вируса составила 158 лет назад, то есть все группы вируса бешенства, циркулирующие в настоящее время на территории Российской Федерации, возникли (были занесены) на территорию страны после 1858 года. Согласно литературным данным ПОП всех филогрупп вируса бешенства в мире существовал примерно 749 лет назад (95% БДИ = 363–1215 лет назад).

В то же время, первые случаи заражения человека бешенством описаны более 4 000 лет назад, что, на первый взгляд, противоречит результатам молекулярно-филогенетических анализов. Это возможно объяснить двумя вероятными причинами: 1) в ходе эволюционного

процесса неизбежно появляются геноварианты вируса, обладающие повышенной приспособляемостью к изменениям окружающей среды, и, как следствие, вытесняющие другие подгруппы вируса (происходит положительный отбор); 2) динамическая сеть взаимосвязанных мутантных форм вируса бешенства находится в состоянии шаткого равновесия, балансируя на грани вымирания, постоянно проходя через «бутылочные горлышки» (периоды резкого сокращения генетического разнообразия).

Анализ соотношения синонимичных и несинонимичных замен в геноме вируса бешенства позволяет считать, что положительный отбор не играет существенной роли в эволюции вируса бешенства. Поэтому предполагается наиболее вероятной гипотеза о том, что большая часть линий вируса периодически вымирает по стохастическим причинам, вследствие чего наблюдается сравнительно низкое генетическое разнообразие современных штаммов вируса бешенства. Это подтверждается литературными данными по истории эпизоотий бешенства в Европе – в первой половине XIX века бешенство у лисиц было распространено широко, начиная с 1850-х годов случаев заболеваемости людей бешенством в результате укусов лисицами практически не регистрировали. Впоследствии были описаны случаи бешенства среди лисиц на территории современной Польши лишь в 1940-х годах, откуда инфекция затем распространилась в другие государства Европы.

Следует отметить успешный опыт проведения оральной вакцинации диких плотоядных животных в странах Западной Европы. Мы предполагаем, что искоренение инфекции стало возможным в первую очередь по причине неустойчивости персистенции вируса в популяции диких плотоядных животных (отсутствовала необходимость охвата 100% особей популяции хищных животных). Низкий уровень генетического разнообразия является признаком неустойчивой популяции вируса. Хотя на территории Российской Федерации выделяют 6 филогенетически дискретных групп вируса бешенства, ареалы их распространения практически не пересекаются, то есть в каждом отдельно взятом экологическом регионе генетическое разнообразие патогена невелико. Бешенство передаётся преимущественно путём прямого физического контакта. Поэтому для эффективной трансмиссии необходима высокая плотность популяции животных-переносчиков. Этот параметр постоянно флуктуирует вследствие изменяющихся условий окружающей среды, что может приводить к вымиранию геновариантов вируса бешенства. Тем не менее после сокращения популяции животных-переносчиков до критического уровня и элиминации вируса популяция, как правило, быстро восстанавливается и становится восприимчивой для распространения новых геновариантов вируса. Проведённый анализ поддерживает эту модель, подразумевающую регулярные экспансии и элиминации вирусных популяций. Этот вывод имеет большое

практическое значение. Теоретически существует два способа элиминации бешенства. Этого можно достигнуть либо путём частичного истребления животных-переносчиков, приводящего к сокращению плотности популяции хозяев вируса, либо проведением оральной вакцинации животных, снижая плотность восприимчивых к инфекции особей. Попытки контролировать распространение бешенства в Европе путём истребления части популяции переносчиков были признаны неэффективными. В то же время проведение оральной вакцинации диких плотоядных животных в западноевропейских странах привели к положительному результату. Ранее в Российской Федерации проводили безуспешные кампании оральной вакцинации диких плотоядных животных, скомпрометировавшие возможность элиминации бешенства, хотя подобный исход мог быть вызван плохой организацией программы мероприятий.

Временная датировка основных эволюционных событий позволила предположить отсутствие долговременной циркуляции геновариантов вируса на территории Российской Федерации. Это означает, что популяция вируса бешенства находится под давлением стохастических факторов окружающей среды, является нестабильной и может исчезать по естественным причинам. В отсутствие дополнительного давления со стороны вакцинации сохранившиеся штаммы вируса способны стремительно заполнять экологические ниши. В странах Западной Европы проведение масштабной и чётко регламентированной кампании оральной вакцинации диких плотоядных привело к возникновению невосприимчивой к бешенству прослойке животных, повысив давление среды на популяцию вируса. В результате этих мер достигнуто искоренение бешенства в странах Западной Европы. Результаты проведённого филогенетического анализа свидетельствуют о том, что при условии проведения регламентированных мероприятий по оральной вакцинации диких плотоядных в отдельных регионах Российской Федерации возможна элиминация вируса бешенства. Тем не менее, для разработки стратегии эффективной элиминации бешенства на федеральном уровне необходимы дальнейшие полевые исследования.

ВЫВОДЫ

1. Разработана диагностическая система в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК штаммов классического вируса бешенства RABV.

2. Разработанная диагностическая система обладает высокими показателями аналитической и диагностической чувствительности и позволяет проводить выявление РНК любых геновариантов вируса бешенства, циркулирующих на территории Российской Федерации. Предлагаемый подход может применяться как в рамках надзорных

мероприятий, так и для расшифровки случаев бешенства у животных и человека.

3. При проведении работ по расшифровке случаев нейроинфекции неясной этиологии рекомендуется проводить проверку биологического материала на наличие РНК вируса бешенства.

4. С использованием метода молекулярных часов выполнено датирование появления разных геновариантов вируса бешенства на территории Российской Федерации. Показано, что все группы вируса бешенства, циркулирующие в настоящее время на территории Российской Федерации, возникли (были занесены) на территорию страны после 1858 года.

5. Показано отсутствие долговременной циркуляции геновариантов вируса на территории Российской Федерации. Это означает, что популяция вируса бешенства находится под давлением стохастических факторов окружающей среды, является нестабильной и может исчезать по естественным причинам. При условии проведения чётко регламентированных мероприятий по оральной вакцинации диких плотоядных в отдельных регионах Российской Федерации возможна элиминация вируса бешенства.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК

1. Дедков В.Г. Разработка и апробация набора реагентов для определения РНК классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени / В. Г. Дедков, **А. А. Девяткин**, Е. М. Полещук, М. В. Сафонова, М. Л. Маркелов, Г. А. Шипулин // Вопросы вирусологии – 2016. – Т. 61 – № 5– с. 235–240
2. **Девяткин А.А.** Молекулярная эпидемиология вируса бешенства на территории Российской Федерации / **А. А. Девяткин**, А. Н. Лукашев, Е. М. Полещук, С. Е. Ткачёв, В. Г. Дедков, Г. Н. Сидоров, М. Ю. Щелканов, И. В. Галкина, Г. Г. Карганова, М. В. Гаврило, Г. А. Шипулин. // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика – 2017. – Т. 1 – № 92– с. 39–42
3. Полещук Е.М. Эколого-вирусологические особенности эпизоотического процесса бешенства в Центрально-Чернозёмном районе России / Е. М. Полещук, Г. Н. Сидоров, С. Е. Ткачёв, **А. А. Девяткин**, В. Г. Дедков, Ю. В. Очкасова, И. А. Ходякова, И. А. Щукина, С. И. Савельев, А. Г. Голенских, С. Б. Носков, Е. С. Бережная, Н. М. Чешева, Е. А. Колесников // Ветеринарная патология – 2013. – Т. 2– с. 101–108
4. Щелканов М.Ю. Изоляция и секвенирование полноразмерного генома штамма вируса бешенства, изолированного от бурого медведя (*Ursus arctos*), напавшего на человека в Приморском крае (ноябрь 2014 г.) / М. Ю. Щелканов, **А. А. Девяткин**, В. Ю. Ананьев, И. Домбровская, В.

Г. Дедков, А. В. Ардашев, С. А. Коломеец, Е. В. Фролов, Н. А. Порошин, И. П. Короткова, Е. Н. Любченко, В. В. Бандеев, М. Н. Просяникова, И. В. Галкина, Е. С. Иванушко, Н. П. Емельянова, Н. И. Баранов, С. А. Ульянова, С. В. Арамилев, П. В. Фоменко, А. Л. Суровый, Н. Н. Сокол, Д. В. Маслов, Е. Е. Махиня, Г. А. Шипулин // Вопросы вирусологии – 2016. – Т. 61 – № 4 – с. 180–186

5. **Девяткин А.А.** Характеристика набора реагентов для выявления РНК вируса бешенства (rabies virus) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени «Амплисенс® RABV-FL» / **А. А. Девяткин**, М. В. Бекова, В. Г. Дедков, Е. М. Полещук, Г. А. Шипулин // Инфекция и Иммунология – 2014. – Т. 17 – с. 191–195

6. Полещук Е.М. Пути совершенствования лабораторной диагностики бешенства на территории России / Е. М. Полещук, **А. А. Девяткин**, М. В. Бекова, В. Г. Дедков // Инфекция и Иммунология – 2014. – Т. 4 – № 1 – с. 85–86

Статьи в рецензируемых международных журналах

7. Dedkov V.G. Retrospective diagnosis of two rabies cases in humans by high throughput sequencing / V. G. Dedkov, A. N. Lukashov, **A. A. Deviatkin**, K. V. Kuleshov, M. V. Safonova, E. M. Poleshchuk, J. F. Drexler, G. A. Shipulin // J. Clin. Virol. – 2016. – V. 78 – p. 74–81.

8. Poleshchuk E.M. Complete Genome Sequences of Four Virulent Rabies Virus Strains Isolated from Rabid Animals in Russia / E. M. Poleshchuk, **A. A. Deviatkin**, V. G. Dedkov, G. N. Sidorov, J. V. Ochkasova, I. A. Hodjakova, I. A. Schukina, S. I. Savel'ev, A. G. Golenskih, G. A. Shipulin // Genome Announc. – 2013. – V. 1 – Issue 3 – e00140-13-e00140-13c.

9. Shchelkanov M.Y. Complete Genome Sequence of a Rabies Virus Strain Isolated from a Brown Bear (Ursus arctos) in Primorsky Krai, Russia (November 2014) / M. Y. Shchelkanov, **A. A. Deviatkin**, V. Y. Ananiev, V. G. Dedkov, G. A. Shipulin, N. N. Sokol, I. E. Dombrovskaya, I. V. Galkina, M. E. Shmelev, V. N. Gorelikov, V. N. Kozhan, M. N. Prosyannikova, S. V. Aramilev, P. V. Fomenko // Genome Announc. – 2016. – V. 4 – Issue 4 – e00642-16

10. **Deviatkin A.A.** The phylodynamics of the rabies virus in the Russian Federation / **A. A. Deviatkin**, A. N. Lukashov, E. M. Poleshchuk, V. G. Dedkov, S. E. Tkachev, G. N. Sidorov, G. G. Karganova, I. V. Galkina, M. Y. Shchelkanov, G. A. Shipulin // PLoS One – 2017. – V. 12 – Issue 2 – e0171855

Тезисы докладов и материалы конференций

11. **Девяткин А.А.** Полногеномное секвенирование вирусов бешенства, изолированных на территории России / **А. А. Девяткин**, В.

Г. Дедков, Е. М. Полещук, Г. Н. Сидоров, Ю. В. Очкасова, И. А. Ходякова, М. Л. Маркелов, Г. А. Шипулин // Материалы научно-практической конференции “Диагностика и профилактика инфекционных болезней” – Новосибирск. – 2013. – с. 127–128

12. Дедков В.Г. Ретроспективная диагностика двух случаев бешенства у пациентов из Астраханской области / В. Г. Дедков, М. В. Бекова, **А. А. Девяткин**, К. В. Кулешов, Е. М. Полещук, М. Л. Маркелов, Г. А. Шипулин // материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Молекулярная диагностика 2014”. - Москва. – 2014. – с. 453–454

13. **Девяткин А.А.** Разработка набора реагентов «Амплисенс® RABV-FL» для выявления РНК вируса бешенства (rabies virus) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией / **А. А. Девяткин**, М. В. Бекова, В. Г. Дедков, Е. М. Полещук, Г. А. Шипулин // материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Молекулярная диагностика 2014”. - Москва. – 2014. – с. 454–455

14. Очкасова Ю.В. Вирусологические особенности рабической инфекции на территории Липецкой области / Ю. В. Очкасова, И. А. Ходякова, И. А. Щукина, С. И. Савельев, Е. М. Полещук, Г. Н. Сидоров, С. Е. Ткачев, **А. А. Девяткин**, В. Г. Дедков, А. . Голенских // материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Молекулярная диагностика 2014”. - Москва. – 2014, с. 521-522

15. **Девяткин А.А.** Бешенство: древний зооноз или возникающая инфекция? / **А. А. Девяткин**, А.Н. Лукашев // материалы конференции молодых учёных “Фундаментальная и прикладная микробиология”. - Москва. – 2017. – с. 15