На правах рукописи

МЕТЛИН АРТЕМ ЕВГЕНЬЕВИЧ

КОМПЛЕКС СРЕДСТВ И МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ И БОРЬБЫ С БЕШЕНСТВОМ

06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора ветеринарных наук

Казань – 2018 г.

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), г. Владимир.

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор, **Груздев Константин Николаевич**

Официальные оппоненты: **Клюкина Валентина Ивановна**, доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом иммунологии ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»

Кузьмин Владимир Александрович, доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры эпизоотологии им. В.П. Урбана ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Сидорчук Александр Андреевич, доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры эпизоотологии и организации ветеринарного дела ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина»

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина».

Защита диссертации состоится «28» февраля 2019 года в 14^{30} часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте http://www.казветакадемия.рф.

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г. и размещен на сайтах: http://www.vak.ed.dov.ru и http://www.казветакадемия.рф.

Ученый секретарь
диссертационного совета Юсупова Галия Расыховна

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследований. Бешенство (*Rabies*) – широко распространенное инфекционное заболевание теплокровных животных и человека. Оно проявляется нарушением функции центральной нервной системы, сопровождается параличами и энцефаломиелитом, летальность практически неизбежна (Груздев, Недосеков, 2001). Бешенство наземных млекопитающих регистрируется на всех континентах земного шара, кроме Австралии и Антарктиды. Несмотря на успешное искоренение этого заболевания в некоторых европейских странах, ситуация на территории многих государств Евразии, Африки и Америки остается сложной. Ежегодно от бешенства в мире умирают около 70 000 человек, главным образом это дети из развивающихся стран (Hampson et al., 2015).

Эпизоотическая обстановка по бешенству в России резко обострилась в последнее десятилетие XX века. Чаще всего заболевание регистрируется среди диких плотоядных животных, которые являются основными его переносчиками. Распределение эпизоотических очагов по регионам России и по годам отличается выраженной неравномерностью (Пашкина, Сочнев, 2005). При этом между заболеваемостью людей и животных существует достоверная коррелятивная связь (Макаров, 2017). Неблагополучны по бешенству многие граничащие с Россией страны, такие как Беларусь, Азербайджан, Абхазия, Казахстан, Монголия, Китай, Украина (Недосеков с соавт., 2014; Аншба с соавт., 2010; Zeynalova et al., 2015; Абдрахманов с соавт., 2017; Ботвинкин, Отгонбаатар, 2006; Zhou et al., 2016). Прибалтийские страны сумели элиминировать бешенство благодаря интенсивной и широкомасштабной кампании по оральной вакцинации лишь несколько лет назад (Cliquet et al., 2012). Первенство же по числу случаев бешенства среди людей и животных занимают Азиатские страны, с которыми Россия интенсифицирует торговые отношения и туристические связи. Так, в Камбодже в период с 1998 по 2007 г. 124 749 пациентов обратились за постэкспозиционной профилактикой бешенства, кроме того, официально было отмечено 63 смертельных случая.

В рамках глобальной инициативы ФАО, ВОЗ и МЭБ об элиминации переносимого собаками бешенства среди людей к 2030 г., России, как члену этих международных организаций, предстоит предпринять ряд шагов в научно-исследовательском, информационно-методическом, законодательном и практическом направлениях. Существенную поддержку данное направление приобрело благодаря решению Межправительственного совета по сотрудничеству в области ветеринарии СНГ от 12 мая 2016 г., в котором ФГБУ «ВНИИЗЖ» было поручено подготовить проект «Комплекса совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.».

Для достижения стойкого благополучия по бешенству и снижения экономического ущерба, наносимого этим заболеванием, необходим комплексный подход. Он включает в себя разработку системы методов лабораторной диагностики, оценку эффективности антирабической иммунизации, проведение комплекса масштабных молекулярно-биологических исследований в нашей и ряде других стран, с которыми Россия поддерживает экономические и культурные отношения, имеет общие границы, а также изучение генетических и антигенных свойств вакцинных штаммов, применяемых для профилактики этого заболевания. Перечисленный комплекс задач невозможно реализовать без активного международного сотрудничества, включающего обмен опытом, знаниями, проведение совместных научно-исследовательских работ.

Таким образом, актуальность выбранного направления исследований очевидна. Она связана с необходимостью совершенствований средств диагностики и борьбы с бешенством, углубленного изучения молекулярно-биологических характеристик и вакцинных штаммов вируса бешенства.

Степень разработанности темы. Лабораторная диагностика бешенства начала развиваться с середины прошлого века. Различные варианты методов лабораторной диагностики и схем их применения разрабатывали Barnard, Voges (1982), Meslin et al. (1996), Bourhy et al. (1996), Kasempimolporn et al. (2000),

Назаров с соавт. (2003), Мукаптаев (2006), Иванов с соавт. (2006, 2007), Dacheux et al. (2010), Хисматуллина с соавт. (2014), Дяченко с соавт. (2015), Дедков с соавт. (2016). Вместе с развитием лабораторной диагностики бешенства, усилиями Ведерникова с соавт., (1998, 2002, 2008), Седова с соавт., (2008), Гулюкина (2011), Чернова (2013) и многих других ученых развивался эпизоотологический мониторинг, изучались закономерности развития эпизоотического процесса этого заболевания (Макаров с соавт., 2002, 2004, 2010, 2015; Сочнев с соавт., 2015, 2017; Гулюкин с соавт., 2017; Фогель с соавт., 2018). Принимая во внимание важность вакцинопрофилактики при бешенстве и контроля эффективности применения как парентеральных, так и оральных вакцин, разрабатывались методы и схемы оценки иммуногенности антирабических биопрепаратов (Хисматуллина с соавт., 2000, 2001, 2004, 2012, 2013, 2014; Иванов с соавт., 2007, 2010; Гулюкин, 2011, 2014; Клюкина с соавт., 2012; Недосеков, 2013; Ведерников, 2014; Сухарьков, 2014; Анисина, 2016; Чернышова, 2018; Фогель с соавт., 2018). Контроль качества проводимой лабораторной диагностики заболевания в мировой практике сводится к проведению межлабораторных сличительных испытаний (Servat et al., 2008; Clavijo et al., 2017). В области изучения молекулярно-биологических и антигенных характеристик масштабные научные изыскания проводили Селимов с соавт. (1969), Nyberg et al. (1992), Kulonen et al. (1993), Bourhy et al. (1999), Nadin-Davis et al. (2003), Kuzmin et al. (2004), Ботвинкин с соавт. (2004), Зайкова с соавт. (2016), в том числе в Юго-Восточной Азии – Ito et al. (1999), Yamagata et al. (2007), Bourhy et al. (2008), Nguyen et al. (2011), Adelshin et al. (2015). В реализацию международных программ по борьбе с бешенством на территории РФ, в частности в Калининградской обл., внесли вклад Хисматуллина с соавт. (2012), Сухарьков, 2014. Подходы к подготовке и реализации национальных и международных программ по борьбе с бешенством разрабатывали ранее Пашкина, Сочнев (2005), Алиев с соавт. (2005), Саввин с соавт. (2005), Макаров (2010), Лосич с соавт. (2012), Романенко с соавт. (2014), Сочнев с соавт. (2015), Сливко с соавт. (2015), Гулюкин, Шебейкин (2016). Однако, опубликованные

работы авторов имеют в большей мере проблемно-аналитический характер и отражают частные методологические аспекты существующей задачи, многое в этой области остается недостаточно изученным.

Цель и задачи исследований. Целью исследований является совершенствование средств и методов диагностики, борьбы с бешенством животных и оптимизация их применения в ветеринарной практике.

Достижение поставленной цели предполагает решение следующих задач:

1. Разработать комплекс методов лабораторной диагностики на основе существующих адаптированных, усовершенствованных и вновь разработанных методов лабораторной диагностики бешенства и схему их применения.

2. Разработать и внедрить на территории РФ программу мониторинга бешенства, проанализировать результаты её реализации.

3. Разработать комплекс методов оценки эффективности применения антирабической вакцинации на основе использования усовершенствованных лабораторных методов, а также схему их применения.

4. Провести мониторинг эффективности вакцинации различных видов животных с применением инактивированных антирабических вакцин.

5. Разработать и внедрить на территории РФ систему межлабораторных сличительных испытаний по диагностике бешенства, проанализировать результаты проведения сличительных испытаний.

6. Изучить молекулярно-биологические, антигенные характеристики, филогенетические связи полевых изолятов вируса бешенства, а также молекулярную эпизоотологию бешенства на территории России и ряда зарубежных стран.

7. Изучить молекулярно-биологические, антигенные характеристики и происхождение на основе филогенетических связей вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых в России и за рубежом.

8. Реализовать программы международного сотрудничества в области борьбы и профилактики бешенства, действующие между Россией и Финляндией, Россией и странами ЕС, а также Россией и Эфиопией.

9. Разработать комплекс мер по профилактике бешенства в России, а также в странах СНГ.

Научная новизна работы. В результате проведенных исследований на основе существующих, адаптированных, усовершенствованных и разработанных нами диагностических реакций предложен комплекс методов лабораторной диагностики бешенства и расширенная схема их применения, позволяющая исследовать патологический материал любого качества.

Впервые разработана и внедрена на территории РФ система межлабораторных сличительных испытаний по диагностике бешенства.

Разработана и внедрена на территории России программа активного мониторинга бешенства. Предложена схема применения лабораторных методов, позволяющих проводить оценку эффективности применения антирабической вакцинации.

Изучены молекулярно-биологические и антигенные характеристики полевых изолятов вируса бешенства, а также молекулярная эпизоотология бешенства на территории РФ, Камбоджи других и стран Юго-Восточной Азии.

Изучены молекулярно-биологические и антигенные характеристики вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых в России и за рубежом, установлены их филогенетические связи.

Все полученные в рамках данной работы последовательности генома изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства депонированы в международной базе данных GeneBank. Предложены подходы к разработке национальных и международных программ по борьбе и профилактике бешенства включая «Комплекс совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.».

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты обосновывают новые идеи и методические подходы к комплексному решению проблем диагностики, активного мониторинга, оценки эффективности специфической профилактики бешенства, программно-целевого подхода к решению проблем по разработке комплекса средств и методов диагностики и

борьбы с бешенством, позволяют глубже оценить ситуацию с бешенством в России и других регионах мира с позиций молекулярной эпизоотологии. Молекулярно-генетические характеристики изученных изолятов и штаммов вируса бешенства дополняют научные знания о их свойствах.

Практическая значимость выполненной работы заключается в том, что научные выводы и методические рекомендации можно использовать в практике ветеринарных лабораторий, оценке их деятельности, при разработке перспективных программ и планов по профилактике и борьбе с бешенством, мониторинга и оценке эффективности специфической профилактики заболевания.

На основе полученных результатов адаптированы, разработаны и внедрены в лабораторную практику современные методы лабораторной диагностики бешенства, подготовлены и утверждены:

- Методические указания по отбору и пересылке проб головного мозга, сывороток крови и костной ткани с целью диагностики бешенства животных и оценки эффективности оральных антирабических вакцин.
- Методические рекомендации для диагностики бешенства животных методом иммунофлуоресценции.
- Методические рекомендации по выделению вируса бешенства в культуре клеток нейробластомы мыши.
- Методические рекомендации по выявлению антигенов вируса бешенства в головном мозге животных в твердофазном прямом сэндвич-варианте иммуноферментного анализа.
- Методические рекомендации по выявлению фрагментов генома вируса бешенства в обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).
- Методические указания по выявлению генома вируса бешенства и дифференциации вакцинного штамма «РВ-97» от полевых изолятов с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.
- Методические указания по разработке метода диагностики бешенства животных в реакции агглютинации латекса.

- Методические указания по выявлению антигена вируса бешенства в ткани головного мозга животных иммуногистохимическим методом.

Внедрена система активного мониторинга бешенства на территории России с применением разработанного комплекса методов лабораторной диагностики бешенства, позволившая уточнить эпизоотологическую ситуацию по бешенству в ряде регионов РФ. Разработана схема оценки эффективности антирабической иммунизации диких и домашних видов животных в зависимости от вида и качества поступающего для проведения исследований биологического материала. По результатам проведенных исследований подготовлены и утверждены:

- Методические указания по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (FAVN).
- Методические указания по определению вируснейтрализующих антител к вирусу бешенства в сыворотках крови диких плотоядных животных в реакции нейтрализации в культуре клеток ВНК-21 (RFFIT).
- Методические указания по ускоренному определению антирабических вируснейтрализующих антител в сыворотках крови диких плотоядных животных в реакции микронейтрализации.
- Методические указания по определению антител к гликопротеину вируса бешенства в сыворотках крови животных в иммуноферментном анализе.
- Методические рекомендации по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в тканях зубов и костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин.

С применением разработанных методов проведен мониторинг эффективности антирабической вакцинации различных видов животных на территории РФ, иммунизированных инактивированными антирабическими вакцинами.

Впервые разработана, внедрена на территории РФ программа межлабораторных сличительных испытаний по диагностике бешенства,

позволившая установить реальный уровень подготовки специалистов ряда региональных ветеринарных лабораторий, а также реализовать корректирующие мероприятия по снижению количества диагностических ошибок.

Впервые изучены молекулярно-биологические и антигенные характеристики полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории ряда регионов России, а также вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых в России и за рубежом, их филогенетические связи. Установлены филогенетические связи изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Камбоджи и других стран Юго-Восточной Азии, имеющих с РФ активные туристические и торговые связи.

Разработаны и представлены к утверждению методические рекомендации по борьбе с бешенством, разработан и утвержден «Комплекс совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.».

Успешно реализованы программы международного сотрудничества в области борьбы и профилактики бешенства между Россией и рядом зарубежных стран (Финляндия, ЕС, Эфиопия), проанализированы их результаты. В результате проделанной работы сохранено благополучие по бешенству Финляндии и Республики Карелия, полностью искоренено бешенство на территории Калининградской области, на основе роллерного культивирования внедрена технология производства инактивированной антирабической вакцины в Эфиопии, проведены ее предварительные испытания.

Методология и методы исследований. Для проведения исследований использовались вирусологические, серологические, молекулярно-биологические, гистологические методы, а также филогенетический анализ, применялись различные способы культивирования культур клеток и вирусов, что нашло отражение в подготовленных и утвержденных методических указаниях и рекомендациях.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Комплекс методов лабораторной диагностики бешенства и схема их

применения.

- Метод лабораторной диагностики бешенства на основе агглютинации латекса и рекомендации по его применению.

- Метод лабораторной диагностики бешенства на основе иммуногистохимического исследования и рекомендации по его применению.

- Прямой жидкофазный вариант реакции иммунофлуоресценции для диагностики бешенства с использованием консервированных формалином проб.

- Программа мониторинга бешенства на территории России и результаты ее применения.

- Комплекс методов оценки эффективности применения антирабической вакцинации и схема их применения.

- Результаты мониторинга эффективности антирабической вакцинации различных видов животных с применением инактивированных антирабических вакцин в России.

- Результаты разработки и внедрения на территории России системы межлабораторных сличительных испытаний по диагностике бешенства.

- Результаты изучения молекулярно-биологических и антигенных характеристики полевых изолятов вируса бешенства, а также молекулярной эпизоотологии бешенства на территории России.

- Результаты изучения молекулярно-биологических характеристик и филогенетических связей полевых изолятов вируса бешенства, выделенных на территории Камбоджи и государств Юго-Восточной Азии.

- Результаты изучения молекулярно-биологических и антигенных характеристик вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых в России и за рубежом.

- Комплекс мер по профилактике бешенства в России и странах СНГ и дорожная карта по его реализации.

- Результаты реализации программ международного сотрудничества в области борьбы и профилактики бешенства, действующие между РФ, Финляндией и другими странами ЕС, а также Россией и Эфиопией.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты работы опубликованы в ведущих российских и международных изданиях с высоким импакт-фактором, что также является подтверждением высокой научной ценности и достоверности результатов исследований, полученных в ходе подготовки диссертации. По материалам диссертации были представлены доклады на заседаниях ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ», а также российских, международных научно-практических конференциях, семинарах и совещаниях.

Личный вклад соискателя. В ходе выполнения научно-исследовательских работ по теме диссертации автором самостоятельно проведен комплекс вирусологических, серологических, гистологических, молекулярно-биологических и филогенетических исследований, полевые исследования по применению антирабических биопрепаратов, анализ российской и зарубежной научной литературы и нормативной документации. Автор лично принимал участие в работе международных программ по сотрудничеству в области профилактики бешенства, начиная с этапов их планирования и заканчивая подведением итогов.

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 65 научных работах, в том числе 16 – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, и в 9 изданиях, включенных в международные базы данных научного цитирования (Scopus, PubMed). По материалам диссертации подготовлены и утверждены 13 методических рекомендаций и указаний, комплекс мер по профилактике бешенства в России и государствах - участниках СНГ, получено 2 патента РФ.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 445 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение, заключение. Список литературы включает 481 источников, в том числе 134 опубликованных в отечественных и 347 – в зарубежных научных изданиях. Диссертационная работа иллюстрирована 59 таблицами, 77 рисунками и дополнена 25 приложениями.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

В работе использовались фиксированные штаммы вируса бешенства: «CVS-11», «SAD B19», «ВНИИЗЖ», «PB-97», «Овечий», «Eth_PV», «ERA», перевиваемые культуры клеток: нейробластомы мыши (MNA), почки сирийского хомяка (BHK-21), культура клеток почки африканской зеленой мартышки (Vero). Для постановки вирусовыделения и для изучения иммуногенности антирабических вакцин использовались мыши белые беспородные массой 6-8 г, кролики массой 0,7-3,0 кг и собаки в возрасте 4-5 мес. Для постановки диагностических реакций использовали: поликлональные ФИТЦ-иммуноглобулины «Bio-Rad» (Франция), «ВНИИЗЖ» (Россия); «DAKO», (Дания); антирабический лиофилизированный стандарт МЭБ, сыворотка крови собаки, активность – 6,7 МЕ/мл и отрицательный стандарт МЭБ, сыворотка крови собаки (ANSES, Нанси, Франция); антивидовые биотинилированные антитела (клон RG-16, № B3275, Sigma), полученные против полной молекулы IgG кролика. Для изучения антигенных характеристик полевых изолятов вируса бешенства использовали панель из 5 мышиных антинуклеокапсидных МКА: W-239.17, W-187.5, W-187.11.2, MW-187.6.1 и P-41, полученные из Федерального научно-исследовательского центра вирусных болезней животных, Тюбинген, Германия.

В работе использовали следующее основное оборудование: термостат суховоздушный «ТС-80», pH-метр «pH-121», CO_2-инкубатор «FORMA SCIENTIFIC» и «SANYO» MCO-15AC, магнитная мешалка марки Biosan, гомогенизатор марки «QIAGEN», флуоресцентный микроскоп «LEITZ LABORLUX D» и «OLYMPUS CX41», световой инвертированный микроскоп «OPTON», бокс ламинарный «CLEAN AIR CB/C», центрифуга настольная «EPPENDORF», ультрацентрифуга «MSE SUPERSPEED 65», амплификатор «PTC-100», пипетки автоматические одно- и многоканальные «FINPIPET» и «PLASTOMED», весы аналитические «OHAUS», амплификатор «BIO-RAD C1000 THERMAL CYCLER», вортекс, спектрофотометр «BIO-RAD

SMARTSPEC PLUS», источник питания для электрофореза «БИОКОМ», камера для электрофореза «EASY-CAST», трансиллюминатор «VILBER LOURMAT», гель-документирующая система «BIO-RAD», автоматический счетчик клеток марки «INVITROGEN COUNTESS», гомогенизатор «QIAGEN TISSUE LYSER LT», многоканальный спектрофотометр «TECAN INFINITE F 50».

Отбор проб проводили в соответствии с «Методическими указаниями по отбору и пересылке проб головного мозга, сывороток крови и костной ткани с целью диагностики бешенства животных и оценки эффективности оральных антирабических вакцин». Постановку прямого варианта реакции иммунофлуоресценции (РИФ) осуществляли в соответствии с ГОСТ 26075-2013. Для постановки непрямого варианта РИФ при использовании МКА в качестве антивидовых антител использовали меченные ФИТЦ кроличьи антимышиные антитела. Постановку реакции проводили в соответствии с «Методическими указаниями по диагностике бешенства животных в реакции агглютинации латекса». Постановку иммуногистохимического метода проводили в соответствии с «Методическими указаниями по выявлению антигена вируса бешенства в ткани головного мозга животных иммуногистохимическим методом». Постановку биопробы на мышах проводили в соответствии с ГОСТ 26075-2013. В работе использовали методы выделения вируса бешенства в культуре клеток, опубликованные ранее K. Kulonen et al. (1991) и OIE Manual (2017). Выделение вируса проводили в культуре клеток нейробластомы мыши (MNA, Denmark) с добавлением DEAE-декстрана (Sigma, молекулярный вес 500 000).

Консервированные формалином пробы головного мозга исследовали в прямом твердофазном варианте РИФ (ПТ РИФ) по методике, предложенной Barnard B., Voges S. (1982), с использованием ацетона для фиксации препаратов, а также в ПЖ РИФ по разработанной схеме. Уровень антирабических вируснейтрализующих антител (ВНА) в сыворотках крови определяли в реакции подавления иммунофлуоресценции в культуре клеток BHK-21 в соответствии с ранее опубликованными протоколами (Чернышова с соавт., 2011, 2016). Для

молекулярной диагностики использовали ОТ-ПЦР в соответствии с «Методическими рекомендациями по выявлению фрагментов генома вируса бешенства в обратно-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) или полугнездовую ПЦР (Dacheux et al., 2008). Выравнивание и обработка нуклеотидных последовательностей проводилась с использованием онлайн сервиса Clustal Omega и пакетов программ Jalview 2.8. (Waterhouse et al., 2009), BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999) и GeneDoc 2.6.002 (Nicholas et al., 1997). Филогенетический и эволюционный анализы проводились с использованием пакетов программ MEGA 6.0 (Tamura et al., 2013) и BEAST (Drummond and Rambaut, 2007).

2.2 Разработка схемы лабораторной диагностики бешенства

Схема лабораторной диагностики бешенства направлена на упорядочивание практики применения используемых методов и включает 3 уровня. ***Первый уровень*** – методы лабораторной диагностики, позволяющие в большинстве случаев устанавливать окончательный диагноз на бешенство: РИФ и выделение вируса на лабораторных животных или в культуре клеток. ***Второй уровень*** включает методы, позволяющие исследовать большое количество проб при проведении мониторинга бешенства (ИФА, РАЛ), а также проводить подтверждение диагноза на бешенство в случаях, когда применение методов первого уровня не представляется возможным (ИФА, ПЦР, ПЦР-РВ). Методы ***третьего уровня*** рассчитаны на исследование проб головного мозга, консервированных формалином. Эти методы разрабатывались для дифференциации бешенства и ГЭ КРС, а также в перспективе для проведения научно-исследовательских работ в области патогенеза (рис. 1).

Методы лабораторной диагностики первого, и частично второго уровня (за исключением реакции агглютинации латекса), включая набор для диагностики бешенства в РИФ, разрабатывались нами ранее (Метлин, 2004; Сухарьков, 2014; Чернышова, 2018).

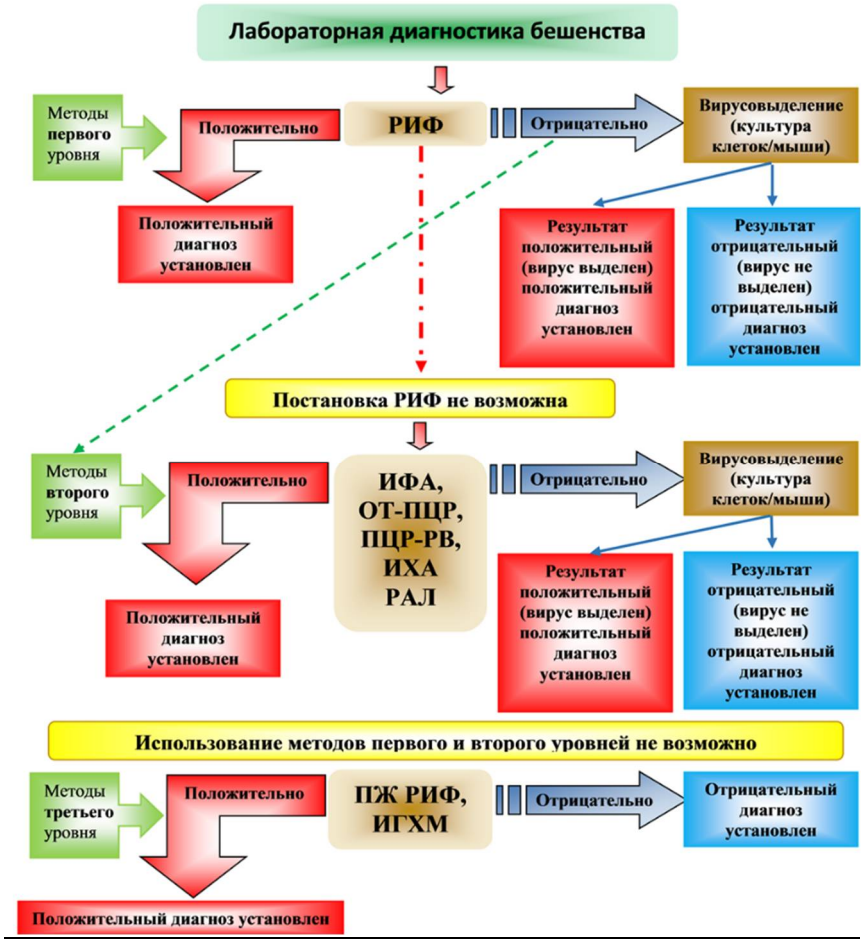


Рисунок 1 – Схема лабораторной диагностики бешенства с учетом градации на уровни. *РИФ – реакция иммунофлуоресценции, ИФА – иммуноферментный анализ, ОТ-ПЦР – обратно-транскриптазная полимеразная цепная реакция ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени, РАЛ – реакция агглютинации латекса, ПЖ РИФ – прямой жидкофазный вариант РИФ, ИГХМ – иммуногистохимический метод, ИХА – иммунохроматографический анализ.

Разработка реакции агглютинации латекса (РАЛ). В работе использовали латексные препараты производства ООО «Диафарм» (г. Санкт-Петербург). Для сенсибилизации латексных частиц использовали поликлональные антитела кролика класса G, полученные против рибонуклеопротеина (РНП) вируса бешенства. Аналитическая чувствительность диагностикума составила 0,1-0,125 мкг/мл. Результаты, полученные в РАЛ, полностью совпали с результатами, полученными в РИФ.

Методы лабораторной диагностики бешенства третьего уровня применимы, когда невозможно использовать методики первого и второго уровней по причине низкого качества поступившего патологического материала

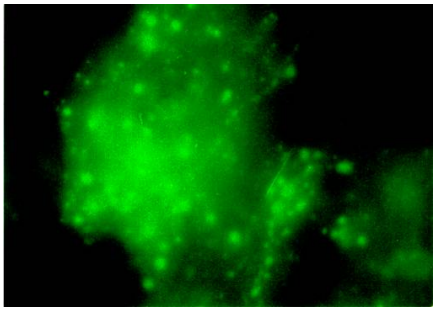
либо применения способов консервирования материала, не позволяющих выделить живой вирус бешенства (формалин). С этой целью, и для дифференциальной диагностики бешенства и ГЭ КРС, в рамках проведения мониторинга последней на территории России с применением консервированных формалином проб, необходимо было разработать соответствующие методы лабораторной диагностики.

Разработка метода выявления антигена вируса бешенства в ткани головного мозга животных иммуногистохимическим методом. Для исследования иммуногистохимическим методом были взяты препараты ткани головного мозга животных, подозреваемых в заболевании бешенством. В результате иммуногистохимического окрашивания структуры мозга исследуемых животных, не содержащие антигены вируса бешенства, окрашивались в сине-лиловый цвет различной интенсивности (ядра клеток окрашиваются интенсивно, цитоплазма – менее интенсивно), скопления вирусного белка окрашивались в интенсивный золотисто-коричневый или темно-коричневый цвет в зависимости от их концентрации.

При использовании разработанного иммуногистохимического метода, в сравнении с золотым стандартом диагностики бешенства – РИФ, ложноположительных результатов выявлено не было. В результате проведенных исследований подтверждена пригодность разработанного метода ИГХМ для применения в составе общей схемы лабораторной диагностики бешенства в качестве диагностического метода третьего уровня.

Разработка и испытание прямого жидкофазного варианта РИФ для диагностики бешенства с использованием консервированных формалином проб. Существующий прямой твердофазный вариант РИФ (ПТ РИФ) для исследования консервированных формалином проб головного мозга (Barnard, Voges, 1982) не обладает достаточной чувствительностью при длительной консервации проб формалином. В связи с этим был разработан прямой жидкофазный вариант РИФ (ПЖ РИФ), в котором исключается стадия фиксации препаратов в ацетоне, исследуемый материал обрабатывался трипсином, а контакт «антиген-антитело»

проходит в жидкой фазе. Чувствительность сравниваемых методов была одинакова на пятые и десятые сут после начала консервирования проб мозга в растворе формалина, затем чувствительность ПТ РИФ резко снижалась, тогда как чувствительность ПЖ РИФ сохранялась на прежнем уровне. Специфическая флуоресценция регистрировалась в виде ярко светящихся изумрудно-зеленых включений в нейронах, а также за пределами клеток (рис. 2). Установлено, что на постановку ПЖ РИФ необходимо времени приблизительно на 56% меньше, чем при использовании ПТ РИФ.



А.

В.

Рисунок 2 – Микрофотографии результатов постановки прямой жидкофазной реакции иммунофлуоресценции при диагностике бешенства с использованием консервированных формалином проб головного мозга. А – положительная реакция при использовании ПЖ РИФ, В – отрицательная реакция.

По результатам проделанной работы получен Патент на изобретение Российской Федерации №2266755 «Способ выявления антигена вируса бешенства в формалинизированных пробах головного мозга».

Система эпизоотологического мониторинга бешенства в России. Предстояло разработать и внедрить в ряде субъектов РФ систему активного эпизоотологического мониторинга бешенства. До этого времени действовал исключительно пассивный мониторинг, т.е. пробы на бешенство целенаправленно не собирались, а исследования проводились только при подозрении на бешенство (инцидентная диагностика).

В рамках эпизоотологического мониторинга в 2011 г. всего для исследований поступило 2607 проб, из них 2587 – от собак и 20 – от лисиц. Было выявлено 23 (0,89%) положительные пробы. В ходе мониторинга бешенства в

ранее благополучных по заболеванию регионах выявлено не было.

В 2012 г. исследованию подлежали пробы от бездомных собак и кошек (не менее 30% от общего числа проб, собираемых в регионе) возрастом старше 1 мес., диких плотоядных животных (лисицы, енотовидные собаки, шакалы, песцы, волки, барсуки). Исследованию подлежали пробы головного мозга животных, отобранные на территории Республики Карелия, Ставропольского края, Владимирской, Калужской, Ивановской и Псковской обл. Результаты исследований всех проб головного мозга указанными методами оказались отрицательными. В других регионах России в рамках мониторинга было проведено 3521 исследование с использованием следующих методов лабораторной диагностики: световая микроскопия, РИФ, ИФА, биопроба на мышах. В 173 исследованиях был получен положительный результат. В 2012 г. ответственность по проведению мониторинга была разделена между ФГБУ «ВНИИЗЖ» и региональными межобластными ветеринарными лабораториями Россельхознадзора. Во всех случаях были получены отрицательные результаты, даже при исследовании проб из регионов, неблагополучных по данному заболеванию. В связи с тем, что в регионах проводился отстрел клинически здоровых животных, с признаками поражения центральной нервной системы, мониторинг на бешенство, проходящий по такому принципу, является малоинформативным. Однако отстрел (отлов) клинически здоровых как диких, так и домашних животных является важным и необходимым мероприятием при мониторинге эффективности антирабической оральной вакцинации в местах ее проведения. В 2013 г. исследовано на бешенство 195 проб головного мозга безнадзорных и диких животных из Владимирской, Ивановской, Костромской, Ленинградской, Новгородской, Рязанской, Самарской обл. и Республики Карелия. В результате проведенных исследований было выявлено 5 изолятов вируса бешенства: 1 изолят от кошки из Ивановской области, 2 изолята от кошек из Рязанской области, 2 изолята из Самарской области (один от собаки и один от лисицы).

Разработанное в рамках данной работы техническое задание для

проведения мониторинга бешенства включало исчерпывающую информацию о проводимом мероприятии, а также способы отбора, консервирования и доставки проб для проведения исследований.

В связи с тем, что бешенство является смертельным зоонозным заболеванием, дополнительное выявление даже нескольких случаев бешенства у животных потенциально влечет за собой сохранение человеческих жизней. Разработанная и внедренная в 2011-2013 гг. система мониторинга бешенства используется в России по настоящее время (2018 г.).

Схема и методы оценки эффективности антирабической вакцинации животных. Оценка поствакцинального антирабического иммунитета основана на определении уровней антирабических ВНА в биологическом материале (сыворотке крови, крови, трупная жидкости) и изучении поедаемости оральных антирабических вакцин (рис. 3). Предлагаемая схема мониторинга охватывает как диких, так и домашних животных, с применением различных вариантов реакции нейтрализации, в зависимости от качества поступившего для проведения исследований материала, и ИФА, а также предполагает оценку поедаемости оральных антирабических вакцин.

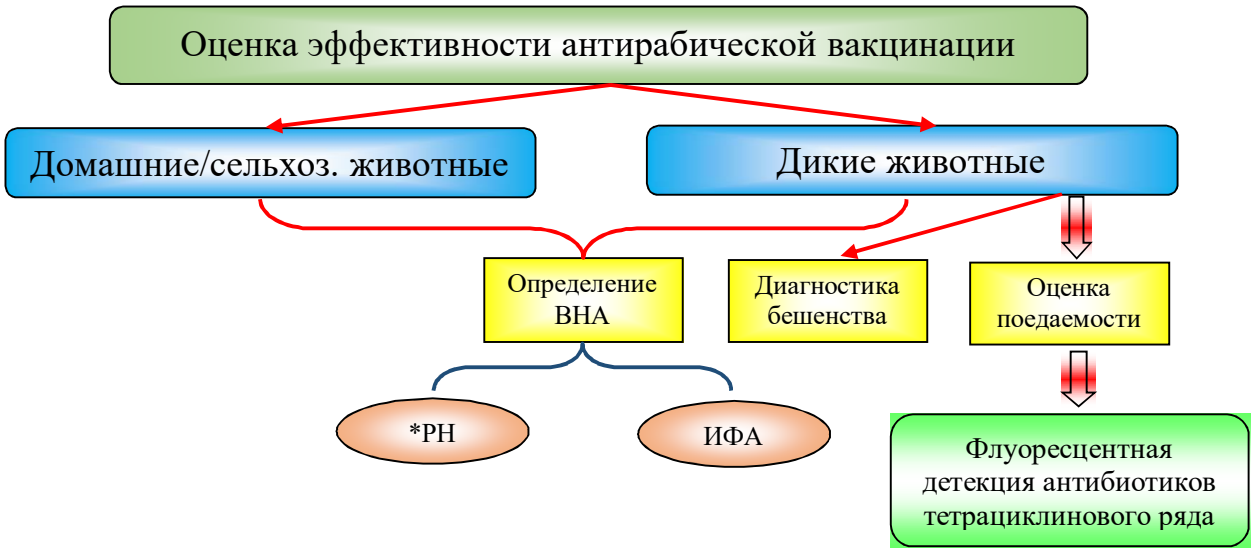


Рисунок 3 – Схема оценки эффективности антирабической вакцинации, применяемой домашним/сельскохозяйственным и диким животным. *Реакция нейтрализации в культуре клеток.

Разработанные и адаптированные методы лабораторной диагностики составляют комплекс лабораторных исследований, позволяющий оценивать эффективность применения тех или иных антирабических вакцин вне зависимости от вида вакцины и производителя биопрепарата, а также проводить оценку эффективности ветеринарных мероприятий, направленных на профилактику и элиминацию бешенства среди домашних и сельскохозяйственных животных.

Результаты мониторинга эффективности антирабической вакцинации домашних животных в РФ. При оценке иммуногенной активности инактивированной антирабической вакцины «Рабиков» из штамма «Щелково - 51» в полевых условиях в среднем по результатам исследования 129 проб сывороток крови, полученных от КРС из Нижегородской, Тверской обл. и Алтайского края, уровень сероконверсии у КРС составил порядка 90,3%. Четкой зависимости уровней антирабических ВНА от возраста животных не прослеживается.

Для сравнительного испытания иммуногенной активности антирабических вакцин «Рабикан» и «Nobivac Rabies» в полевых условиях были сформированы 2 группы собак в возрасте 1-4 года. Вакцину «Рабикан» применяли на собаках в Нижегородской обл., вакцину «Nobivac Rabies» - г. Санкт-Петербурге. При использовании вакцины «Рабикан» достаточный для защиты от бешенства уровень антирабических ВНА выработался у 84,9% животных, а при использовании вакцины «Nobivac Rabies» – у 87,9%. При этом средний уровень антител при использовании вакцины «Рабикан» составил 6,68±1,43 МЕ/мл, у вакцины «Nobivac Rabies» – 4,53±0,79 МЕ/мл.

Исследования, проведенные в г. Москве и г. Зеленограде Московской обл., где применяли инактивированные антирабические вакцины либо вакцины, содержащие антирабический компонент, показали, что из 75 исследованных проб в 58 (77,3%) удалось выявить достаточный для защиты от заражения бешенством уровень антирабических ВНА (0,5 МЕ/мл и более).

В г. Саратове и ряде близлежащих городов Саратовской обл. было собрано

25 проб сывороток крови собак, иммунизированных инактивированными антирабическими вакцинами. В 23 пробах (92%) удалось выявить достаточный для защиты от заражения бешенством уровень антирабических ВНА.

Применение вакцины «Рабикан» для антирабической иммунизации собак и кошек на территории г. Ставрополя, а также городов Ставропольского края: Кисловодск, Невинномысск, Лермонтов, Ессентуки – показало, что из 28 проб сывороток крови животных (23 от собак и 5 от кошек) в 20 (71,4%) удалось выявить протективный уровень антирабических ВНА.

Применение этой же вакцины в популяции собак и кошек на территории г. Владимира и некоторых городов Владимирской обл. показало, что из 77 исследованных сывороток крови (72 от собак и 5 от кошек), в 60 (77,9%) удалось выявить протективный уровень антирабических ВНА.

На территории г. Нижний Новгород было собрано 62 пробы сывороток крови собак, иммунизированных инактивированными антирабическими вакцинами «Рабикан», «Nobivac Rabies», «Мультикан-8», в г. Дзержинске Нижегородской области – 39 проб сывороток крови собак. В 52 пробах, поступивших из г. Нижний Новгород (83,9%) удалось выявить достаточный для защиты от заражения бешенством уровень антител, в г. Дзержинске этот показатель составил 37 (94,9%).

Система мониторинга эффективности антирабической вакцинации диких животных в РФ. В рамках данной работы предстояло определить наличие и уровни антирабических ВНА у больных бешенством животных в природных условиях, сравнить их с таковыми у вакцинированных животных и предложить пути исключения искажающего влияния данного фактора при оценке эффективности оральной иммунизации диких животных против бешенства. С этой целью в зонах оральной антирабической вакцинации у отстреленных диких плотоядных животных, главным образом у лисиц и енотовидных собак, отбирали пробы головного мозга для диагностики бешенства и пробы крови/трупной жидкости для определения содержания антирабических вируснейтрализующих антител. Исследование проводилось на территории

Владимирской и Ярославской обл. Пробы отбирали в зоне вакцинации не менее чем через 30 сут после раскладки оральной антирабической вакцины. Результаты исследования проб крови, полученных от больных бешенством лисиц, показали содержание антирабических ВНА от 0,5 до 8,0 МЕ/мл.

Вакцинированные в природных условиях (из зоны оральной вакцинации Владимирской и Ярославской обл.), но не больные бешенством животные (установлено по результатам лабораторной диагностики) показывали уровни антирабических ВНА 0,5-32 МЕ/мл, чаще в диапазоне 1,0-8,0 МЕ/мл. Таким образом подтверждена необходимость исключения проб сывороток крови, полученных от больных бешенством животных, из выборки при оценке эффективности оральной антирабической иммунизации на основании исследования пробы головного мозга от каждого животного, включенного в мониторинг. Полноценная система мониторинга включает также исследование пробы костной ткани для оценки содержания тетрациклина.

Система межлабораторных сличительных испытаний. Система межлабораторных сличительных испытаний (МСИ) разрабатывалась с целью повышения качества и достоверности проводимой лабораторной диагностики бешенства. Для этого разработана проверочная панель, в состав которой вошли 10 замороженных проб головного мозга животных, диагноз по которым установлен. Первые МСИ были проведены в 2005 г. в Московской обл. С 2010 г. МСИ в России начали проводиться ежегодно. В 2010-2017 гг. при проведении МСИ выявлялись ошибки при постановке диагноза на бешенство. Корректирующие мероприятия при этом включали обучение специалистов в формате индивидуальной стажировки на базе ФГБУ «ВНИИЗЖ». ФГБУ «ВНИИЗЖ» с 2009 по 2017 г. успешно ежегодно проходит международный квалификационный тест по определению антирабических вируснейтрализующих антител в сыворотках крови животных, а с 2015 г. – по диагностике бешенства и определению содержания скоплений тетрациклина в тканях костей и зубов флуоресцентным методом.

2.3 Изучение молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства и их дифференциации

Антигенное разнообразие и молекулярная эпизоотология бешенства в РФ и ряде сопредельных государств изучалась с использованием панели МКА, а также посредством проведения филогенетических исследований фрагментов нуклеотидных последовательностей геномов полевых изолятов вируса бешенства, выделенных в различных регионах РФ, в сравнении с опубликованными в базе данных GeneBank. Проведенные с использованием панели МКА исследования позволили установить наличие пяти антигенных вариантов среди 233 исследованных изолятов, циркулировавших на территории России, Финляндии и Эстонии. С целью изучения филогенетических связей изолятов вируса бешенства и их распространения на территории РФ было собрано 35 изолятов вируса в 14 субъектах России (рис. 4).

В ходе проведения филогенетических исследований установлено существование двух основных филогенетических групп – «Пан-Евразийской» и «Кавказской», а также ряда филогенетических подгрупп. «Пан-Евразийская» группа включает 4 подгруппы – «Евразийскую», «Северо-Европейскую», «Центральную-российскую», а также четвертую группу, включающую изоляты, выделенные ранее в Европе и классифицированные Bourhy et al. (1999) как члены филогенетических групп «Западная Европа» («Western Europe», WE) и «Центральная Европа» («Central Europe», CE). Также показано отличие полевых изолятов ВБ, циркулирующих на территории РФ от вакцинных штаммов, в том числе применяемых в составе живых аттенуированных вакцин для оральной антирабической вакцинации диких плотоядных животных.

Полученные результаты позволили расширить знания о филогенетическом разнообразии полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории России и легли в основу дальнейших работ по изучению филогенетических связей циркулирующих на территории РФ полевых изолятов вируса бешенства, опубликованных в работах Чупина С.А. (2013), Зайковой О.Н. (2016), Чернышовой Е.В. (2018).

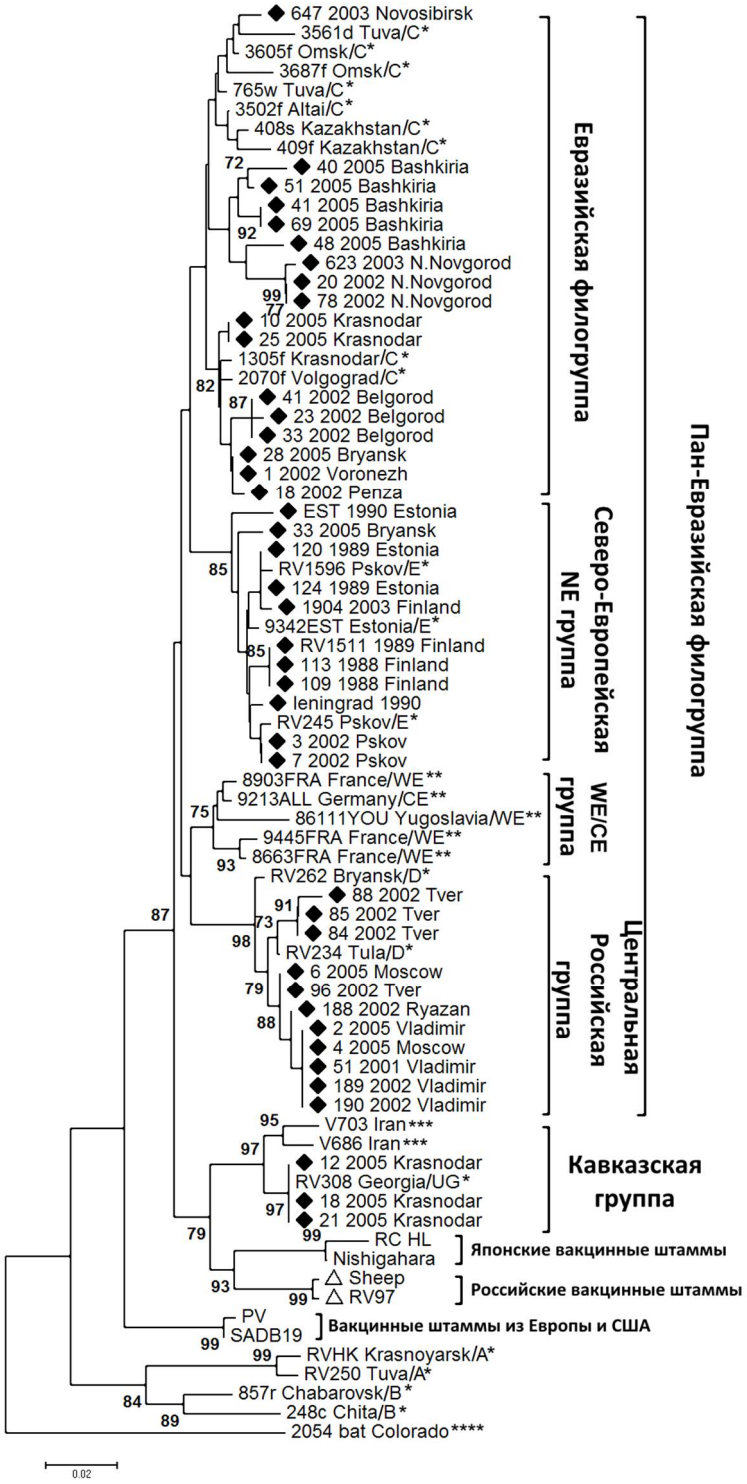


Рисунок 4 – Филогенетическое дерево 69 полевых изолятов и 6 вакцинных штаммов, построенное по алгоритму «Minimum Evolution» с использованием нуклеотидных последовательностей фрагмента гена нуклеопротеина. Вакцинные штаммы из РФ обозначены значком Δ, полевые изоляты из России, Финляндии и Эстонии, полученные в ходе данной научно-исследовательской работы, обозначены ♦. Референтные последовательности: *Kuzmin et al., 2004; **Bourhy et al., 1999; ***Nadin-Davis et al., 2003; ****Smith et al., 2002.

В связи с активизацией туристических связей и товарооборота между Россией и странами Азии изучена молекулярная эпизоотология бешенства в Камбодже, а также ряде сопредельных государств. Получены нуклеотидные последовательности N-гена 149 изолятов вируса бешенства, выделенных в 20 провинциях Камбоджи. Установлено, что филогенетическую группу «SEA1» составляют изоляты, выделенные в Камбодже, Таиланде, Вьетнаме и Лаосе. Эта группа впервые обозначена Yamagata et al. (2007) и, по нашим данным, соответствует группе «1» подгруппе «1a», предложенной ранее Nguyen et al. (2011), в то время как филогенетические группы «SEA2» и «SEA3» отличаются от ранее обозначенных групп «1a» и «1b», но все же входят в группу «1», ранее описанную Nguyen et al. (2011). В пределах этой филогенетической группы выявлено существование трех подгрупп. Филогенетическую группу «SEA2» составляют два изолята вируса бешенства, выделенных в Камбодже, и группа изолятов, выделенных в Лаосе. Один из камбоджийских изолятов был выделен от собаки в г. Пномпене в 2005 г., второй – выделил доктор Bourhy в 1997 г. в камбоджийском населенном пункте Банлунг (Banlung), районном центре провинции Ратанакири (Ratanakiri) на северо-западе Камбоджи, также от собаки. Данная провинция граничит с Лаосом и Вьетнамом. Эти изоляты группируются с изолятами, выделенными ранее в Лаосе в 1999-2002 гг. (Bourhy et al., 2008) и в 2011-2012 гг. (Ahmed et al., 2015). Изоляты вируса бешенства, выделенные в Мьянме, формируют отдельную филогенетическую группу, обозначенную как «SEA3». Установлено, что филогенетическая группа «Юго-Восточная Азия» («SEA») распространена на территории как минимум 5 стран Юго-Восточной Азии, включая Камбоджу, Вьетнам, Таиланд, Лаос и Мьянму. Полученные данные согласуются с данными, полученными Bourhy et al. (2008), и значительно расширяют их. Все изоляты, выделенные в Камбодже, за исключением двух (EU086170 и P0709509), группируются вместе с изолятами, выделенными ранее в Таиланде, Вьетнаме и Лаосе, в пределах филогенетической группы «SEA1», по-видимому, самой распространенной в Юго-Восточной Азии (рис. 5).

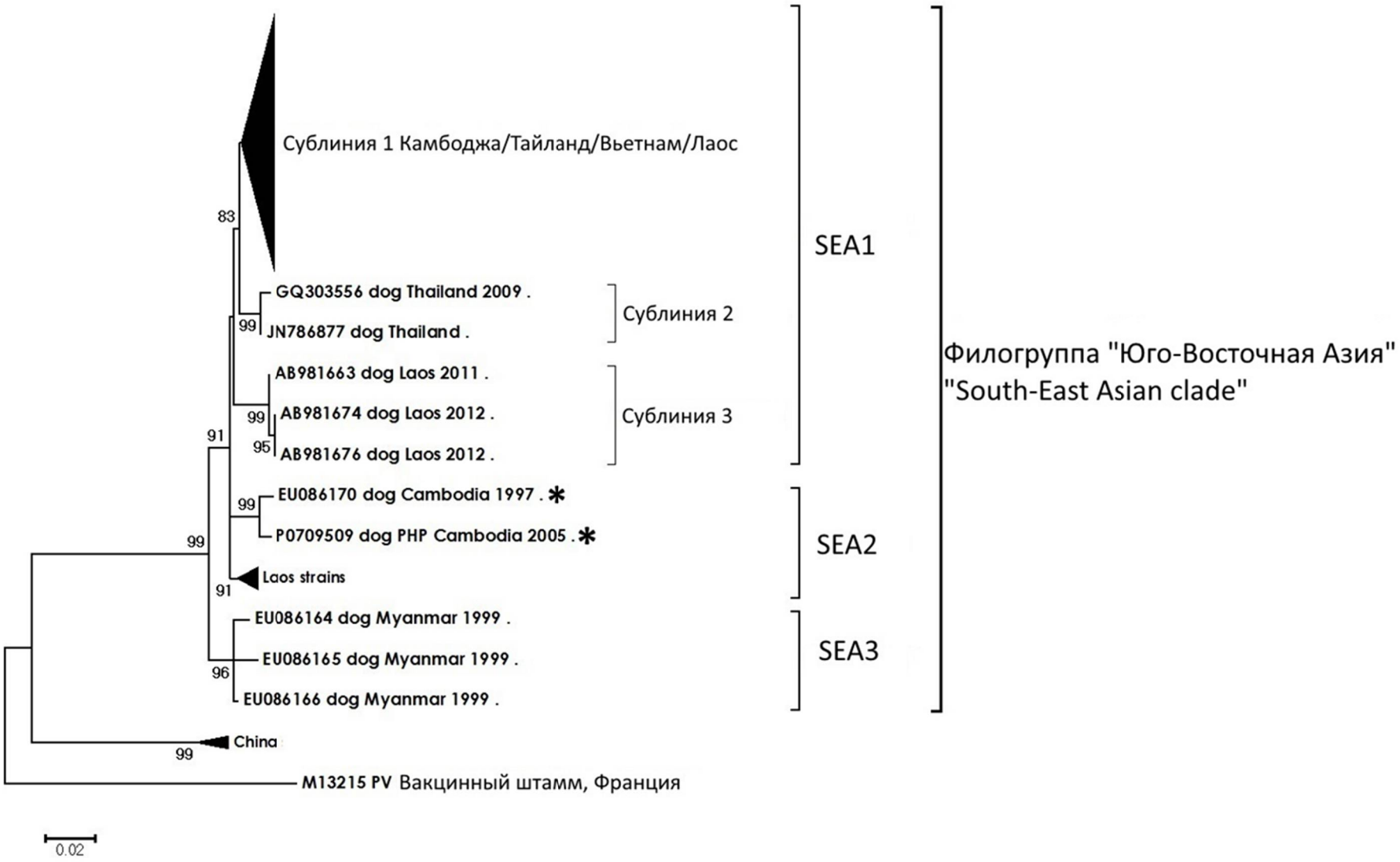


Рисунок 5 – Филогенетические связи вирусов бешенства выделенных в Юго-Восточной Азии. Процент повторяющихся деревьев, в которых ассоциированные таксоны группировались вместе при проведении бутстрап-теста (1000 повторений), показан около ветвей. Бутстрап значения менее 70 скрыты.

Эволюционный анализ позволил изучить в сравнительном аспекте динамику эволюции изолятов вируса бешенства, выделенных в Камбодже. Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что изоляты, принадлежащие к филогенетической группе «SEA1», имеют общего предка с изолятами группы «SEA2». Эти две филогенетические группы разделились примерно в 1950 г. Следует отметить, что камбоджийские изоляты – представители этой филогенетической группы – имели общего предка с изолятами из Лаоса приблизительно в 1953 г.

Возможно, изоляты этой филогенетической группы были занесены в Лаос из Камбоджи и затем практически вытеснены изолятами – представителями филогенетической группы «SEA1», либо спорадический занос изолятов филогенетической группы «SEA2» произошел из Лаоса в Камбоджу в 60-х годах прошлого века. Вероятнее всего, изоляты – представители этой филогенетической группы более широко распространены на территории Камбоджи, но для подтверждения этой гипотезы необходимо провести более широкомасштабные исследования.

Поскольку филогенетическая подгруппа «SEA1» оказалась наиболее распространенной на территории Камбоджи, выявление филогенетической подгруппы «SEA2» в этой стране могло быть результатом заноса изолятов вируса бешенства этой филогенетической подгруппы из-за границы (например, из Лаоса) либо является результатом идентификации менее превалентной группы изолятов, циркулирующей на территории этой страны. Широкое распространение филогенетической подгруппы «SEA1» в Юго-Восточной Азии предполагает относительно частое перемещение и «смешивание» популяций собак на территории региона.

2.4 Молекулярно-биологические и антигенные характеристики российских и зарубежных вакцинных штаммов вируса бешенства

Изучение молекулярно-биологических характеристик вакцинных штаммов в первую очередь включало получение нуклеотидных

последовательностей генома российского вакцинного штамма «РВ-97» и вакцинного штамма «Eth_PV» из Эфиопии.

Проведенный филогенетический анализ показал существование шести филогенетических групп вакцинных/аттенуированных штаммов вируса бешенства, три из которых («USA1», «USA2» и «USA3») имеют американское, а две («China» и «Japan») – азиатское происхождение (Китай и Япония соответственно) (рис. 6).

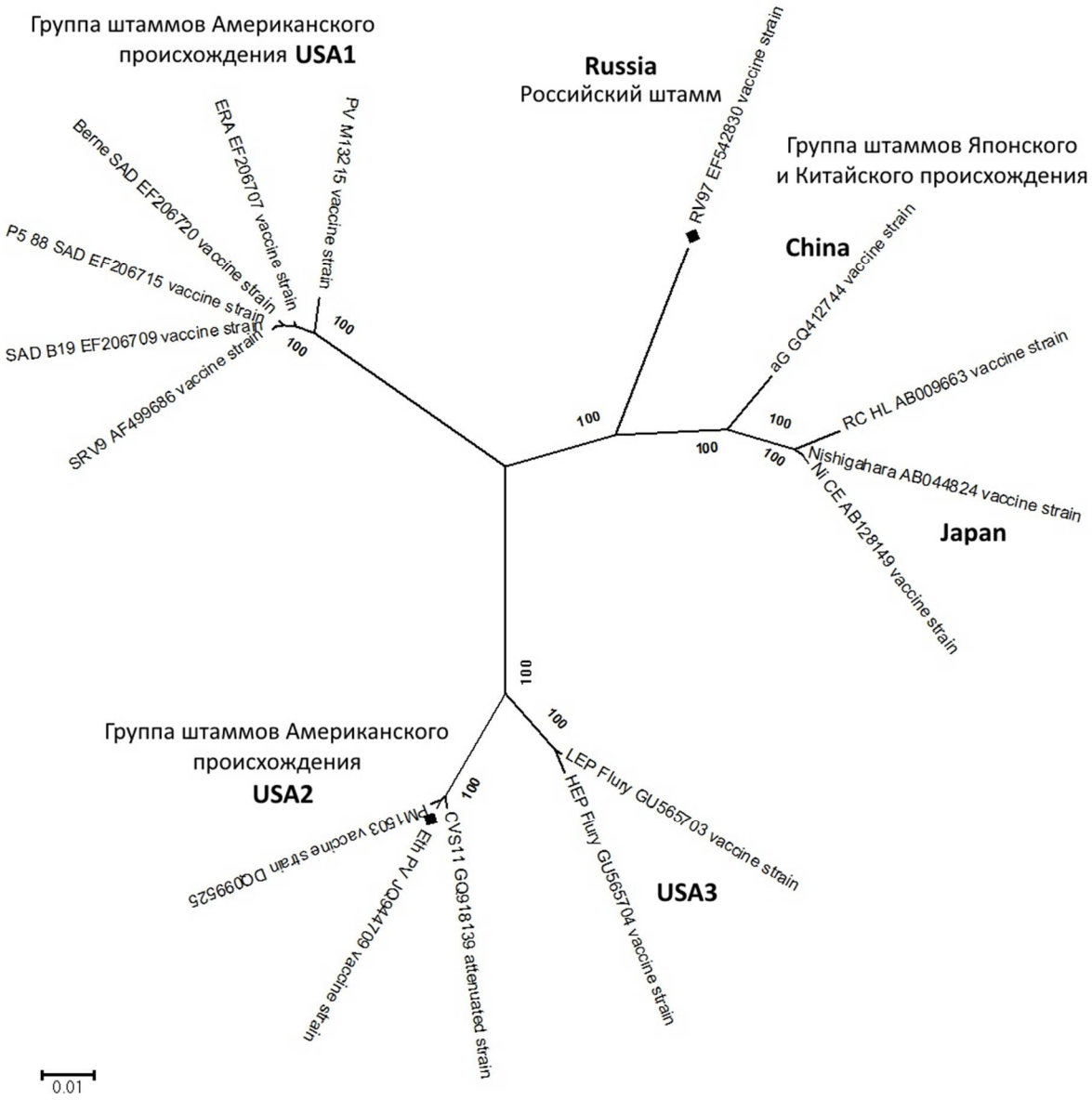


Рисунок 6 – Филогенетическое дерево, отражающее родство наиболее распространенных вакцинных штаммов вируса бешенства. Вновь секвенированные полногеномные нуклеотидные последовательности штаммов «РВ-97» и «Eth_PV» отмечены значком ■.

В ходе выполнения данной работы были впервые получены полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов «PB-97», и «Eth_PV». Установлено, что штамм из Эфиопии «Eth_PV» группируется со штаммами «PM1503» и «CVS-11» (филогенетическая группа «USA2»). Штамм «PB-97» формирует отдельную филогенетическую ветвь. Штамм «PV» попадает в группу «USA1». Скорректированная история происхождения вакцинных штаммов представлена на рисунке 7.

Считалось, что и «PB-97» и «Eth_PV» являются дериватами оригинального Пастеровского штамма «PV», выделенного от больной бешенством коровы во Франции в 1882 г. (Pasteur, 1885). Этот штамм после 1500 пассажей на кроликах был передан в США и Аргентину, откуда он вновь попал во Францию в 1965 г. В США из штамма «PV», после пассажей на кроликах и мышах и адаптации к культивированию в культурах клеток, были получены штаммы «PM» и «CVS» (Sacromento et al., 1992). Однако высокий уровень филогенетического родства штамма «PV» с представителями филогенетической группы «USA1» ставит под сомнение официальную версию. Известно, что штаммы группы «USA1» происходят от полевого изолята, выделенного от собаки в американском штате Алабама, и, очевидно, должны иметь весьма существенные филогенетические отличия от штамма «PV». Возможно именно штамм «PB-97» является прямым потомком оригинального Пастеровского штамма, однако окончательный ответ на этот вопрос может быть получен только путем секвенирования остатков вируса из знаменитой «Пастеровской склянки» с высушенным спинным мозгом кролика из музея Института Пастера в Париже. Используемый в рамках данной диссертационной работы подход позволяет восстанавливать историю происхождения ряда российских и зарубежных вакцинных штаммов вируса бешенства, изучать их родство на и филогенетические связи. Выявленные несоответствия в истории происхождения вакцинных штаммов, не оказывают влияния на качество производимых из них антирабических препаратов при условии соблюдения технологии их приготовления.

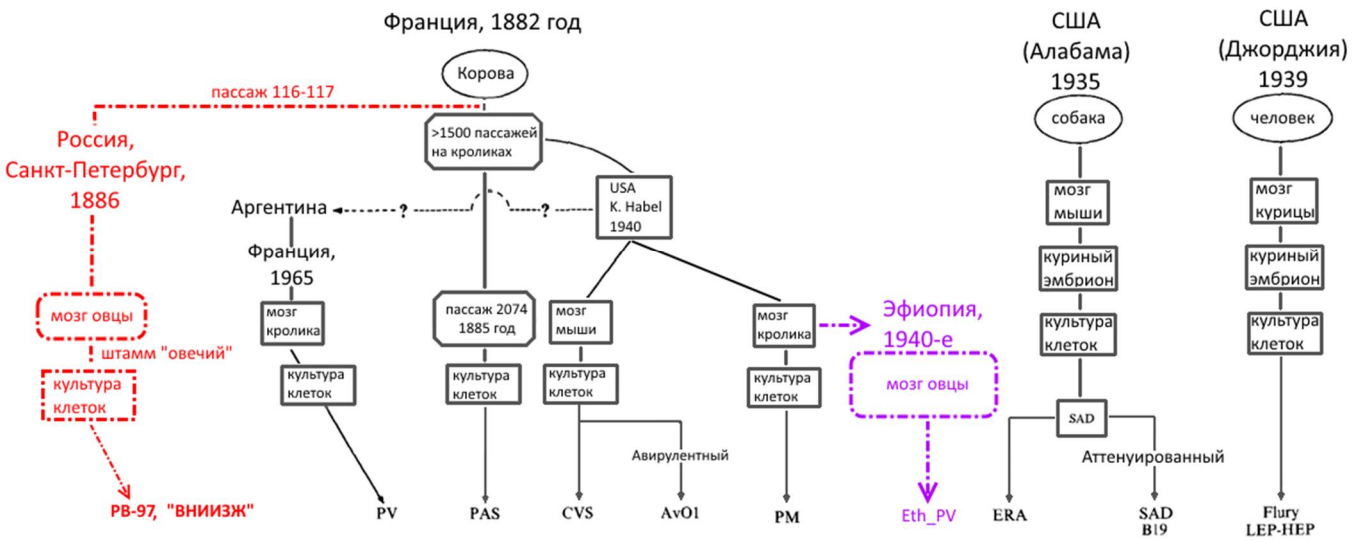


Рисунок 7 – Современная история происхождения наиболее распространенных вакцинных штаммов вируса бешенства

2.5 Результаты выполнения программы российско-финского сотрудничества по профилактике бешенства

Оральная вакцинация диких животных впервые была проведена в мае 2003 г. в Ленинградской обл. и Республике Карелия. Всего было применено 78 925 доз вакцины «FUCHSORAL» (рис. 8).

Рисунок 8 – Расположение зоны оральной вакцинации диких животных против бешенства на российско-финской границе

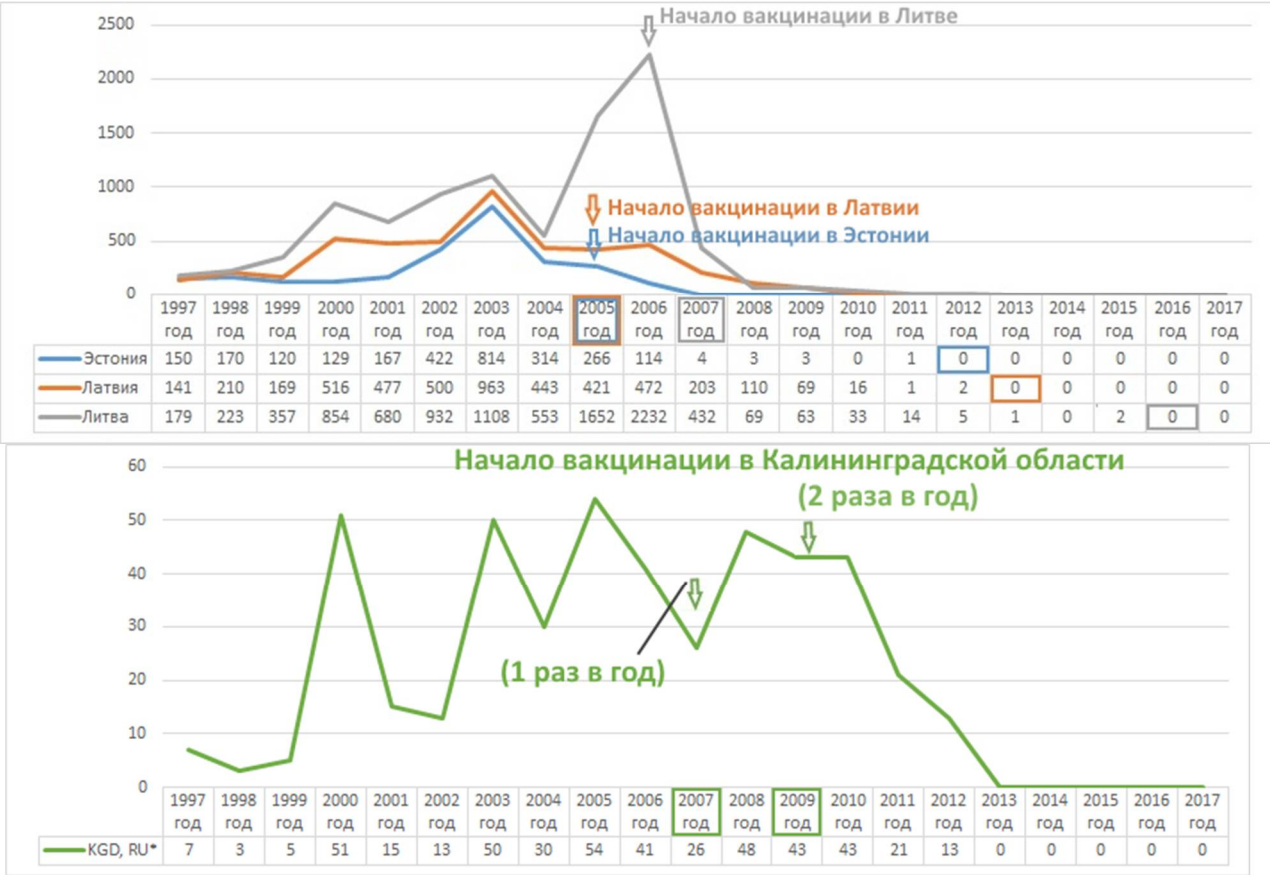
Для оценки иммунного статуса диких животных и мониторинга бешенства в зоне вакцинации был проведен отбор проб крови/трупной жидкости с целью определения уровня антирабических антител, и головного мозга для диагностики бешенства. Контрольные пробы собирали на территории Мурманской обл. Всего в период с 2001 по 2006 г. было собрано и исследовано 156 проб головного мозга и 129 проб крови/трупной жидкости. При исследовании данных проб установлен отрицательный на бешенство диагноз, что подтверждает как благополучность данных регионов по бешенству, так и отсутствие реверсии используемых живых аттенуированных вакцинных штаммов «РВ-97» и «SAD B19». В 8 из 129 собранных и исследованных пробах сывороток крови были обнаружены антирабические ВНА с уровнем ≥0,5 МЕ/мл. В 2008 г. в результате лабораторного исследования сывороток крови от диких плотоядных животных, отстрелянных в период с ноября по декабрь 2007 г. и в феврале 2008 г. в районах Ленинградской обл., животных с защитным уровнем антител выявлено не было. Из 6 образцов сывороток, полученных из Республики Карелия, в двух были выявлены защитные уровни ВНА, что составило 33,33% от исследованных. В 2009 г. в ходе выполнения государственного мониторинга бешенства было выявлено 5 случаев бешенства енотовидных собак в Ленинградской обл.: 4 случая в Лужском районе и 1 случай в Бокситогорском районе. В Республике Карелия количество положительных проб (≥0,5 МЕ/мл) составило более 80%, в Ленинградской обл. – 48,8%. Среди отстрелянных в 2010 г. животных больных бешенством в Республике Карелия выявлено не было. При этом количество серопозитивных животных в разные сезоны колебалось в районе 50-60%. В 2011 г. положительных по бешенству проб выявлено не было ни в Республике Карелия, ни в Ленинградской обл. Процент проб ткани зубов, содержащих тетрациклин, составил соответственно 33,3% и 26,4%. Процент проб сывороток крови, содержащих защитный уровень антирабических ВНА (≥0,5 МЕ/мл), составил соответственно 65% и 14,7%. В 2012 г. среди проб, поступивших из Республике Карелия и Ленинградской обл., положительных по бешенству

выявлено не было. Процент проб крови с уровнем антирабических ВНА ≤0,5 МЕ/мл из Республики Карелия составил 67,9%. В 2013 г. было проведено исследование 27 проб головного мозга, поступивших из Карелии, и 24 проб – из Ленинградской обл., положительных по бешенству проб выявлено не было.

В результате сотрудничества между Россией и Финляндией, при участии референтных лабораторий МЭБ по бешенству из Франции (ANSES) и Германии (Friedrich-Loeffler Institut), были адаптированы и внедрены в практику современные методы лабораторной диагностики бешенства, оценки иммуногенности и поедаемости оральных антирабических вакцин, в том числе: ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени для диагностики бешенства и дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов, выделение вируса бешенства в культуре клеток, три варианта реакции нейтрализации в культуре клеток для оценки уровня поствакцинального иммунитета; методика выявления скоплений антибиотиков тетрациклинового ряда в тканях костей и зубов флуоресцентным методом. Данные методы включены в схему лабораторной диагностики бешенства, разработанной в рамках данного исследования.

2.6 Результаты сотрудничества Россия – страны ЕС

С 2007 г. в рамках сотрудничества Россия – страны ЕС осуществлялась международная программа по оздоровлению Калининградской обл. от бешенства. Основной упор при выполнении этой программы делался на оральную вакцинацию диких плотоядных животных с использованием отечественных оральных вакцин. Одним из наиболее важных показателей эффективности проводимой оральной вакцинации является снижение числа случаев бешенства в регионе в целом. Для проведения сравнительного анализа нами были собраны данные об эпизоотической обстановке по бешенству в Калининградской обл., Эстонии, Латвии и Литве за последние 20 лет и сроках начала оральной иммунизации в этих регионах (рис. 9).



	1997 год	1998 год	1999 год	2000 год	2001 год	2002 год	2003 год	2004 год	2005 год	2006 год	2007 год	2008 год	2009 год	2010 год	2011 год	2012 год	2013 год	2014 год	2015 год	2016 год	2017 год
Эстония	150	170	120	129	167	422	814	314	266	114	4	3	3	0	1	0	0	0	0	0	0
Латвия	141	210	169	516	477	500	963	443	421	472	203	110	69	16	1	2	0	0	0	0	0
Литва	179	223	357	854	680	932	1108	553	1652	2232	432	69	63	33	14	5	1	0	2	0	0

	1997 год	1998 год	1999 год	2000 год	2001 год	2002 год	2003 год	2004 год	2005 год	2006 год	2007 год	2008 год	2009 год	2010 год	2011 год	2012 год	2013 год	2014 год	2015 год	2016 год	2017 год
KGD, RU*	7	3	5	51	15	13	50	30	54	41	26	48	43	43	21	13	0	0	0	0	0

Рисунок 9 – Динамика изменения числа случаев бешенства в 1997-2017 гг. в Эстонии, Латвии, Литве и Калининградской обл. под влиянием проведения оральной вакцинации диких животных *KGD, RU – Калининградская обл., Россия.

Использование оральной антирабической вакцины на территории Калининградской обл. привело к снижению числа случаев бешенства в регионе. При этом применение вакцины дважды в год имело более очевидный эффект. Полученные результаты согласуются с результатами, достигнутыми в Эстонии, Латвии и Литве, которые, как и Калининградская обл., в настоящее время благополучны по бешенству. В результате выполнения этой программы впервые в РФ был освоен метод авиационного распространения вакцинных приманок с применением GIS-технологий, освоены методы мониторинга эффективности антирабических мероприятий и достигнуто стойкое благополучие по бешенству Калининградской обл.

2.7 Результаты сотрудничества с Эфиопией по внедрению метода культивирования вируса бешенства в культуре клеток

Большинство стран Африканского континента имеют стойкое неблагополучие по бешенству. Эфиопия не является исключением. В связи с обращением этой страны о содействии в борьбе с бешенством, ей была оказана научно-техническая помощь. Работа проводилась под руководством Минздрава РФ в рамках Братиславских соглашений президентов РФ и США.

На момент проведения работы производимая в этой организации вакцина представляла собой тканевой препарат, приготовленный из головного мозга овец, зараженных аттенуированным штаммом «Eth_PV». Остаточная вирулентность этой вакцины была установлена путем интрацеребрального введения белым мышам без предварительного разведения.

В результате реализации этого международного проекта в Эфиопии была внедрена технология культивирования аттенуированных штаммов вируса бешенства в культуре клеток Vero роллерным способом и получен прототип культуральной антирабической инактивированной вакцины, которая в настоящее время проходит клинические испытания. Кроме того, подготовлен проект законодательной базы по бешенству, а также проекты стандартов операционных процедур, регулирующих основные процессы производства антирабической вакцины.

2.8 Разработка программ по борьбе и профилактике бешенства

Программа по борьбе и профилактике бешенства должна включать следующие основные компоненты: нотификация заболевания на всей территории действия программы; постановка диагноза на бешенство только путем проведения лабораторных исследований в аттестованных для проведения таких исследований ветеринарных лабораториях с применением утвержденных в установленном порядке методов лабораторной диагностики; вакцинация и мониторинг бешенства и эффективности антирабической вакцинации в популяции диких и домашних животных; информационно-разъяснительная

работа; источники финансирования; определение ответственных исполнителей, форм отчетности и пути контроля эффективности реализации программных мероприятий.

Используя сформулированные требования, а также результаты анализа законодательных баз ряда стран, требований международного законодательства по бешенству, результаты исследований по иммуногенности антирабических вакцин и эффективности антирабических мероприятий, нами был разработан ряд документов рекомендательного характера, касающихся мероприятий по борьбе и профилактике бешенства:

- в интересах Министерства сельского хозяйства Российской Федерации был подготовлен проект «Методических рекомендаций по борьбе с бешенством»;
- подготовлен и утвержден главами правительств государств – участников СНГ «Комплекс совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.», являющийся программой согласованных действий государств – участников СНГ по борьбе с этим заболеванием.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении обобщены результаты проведенных исследований, которые позволили сделать следующие выводы:

1. В мировой практике используется ряд методов лабораторной диагностики бешенства, оценки антирабического иммунитета, оценки поедаемости оральных антирабических вакцин, многие из которых на момент проведения исследований по теме данной диссертации в РФ не применялись либо требовали адаптации и усовершенствования. Опыт проведения межлабораторных сличительных испытаний, используемых в мировой практике для контроля качества лабораторной диагностической деятельности, ранее не был реализован в РФ.

2. Схема диагностики бешенства разработана на основе 10 лабораторных методов, позволяющих проводить выявление антигена, генома, а также выделение живого вируса. Методы разделены на 3 уровня в зависимости от показаний по их применению, а также условий, которые должны быть соблюдены при принятии решения о постановке диагноза. Предложенная схема и методы лабораторной диагностики позволяют поставить окончательный диагноз на бешенство вне зависимости от качества поступившего патологического материала и способа его консервирования.

3. Экспресс-метод диагностики бешенства в РАЛ, разработанный в рамках данной диссертационной работы, обладает чувствительностью 0,1-0,125 мкг/мл и позволяет проводить исследования на бешенство без применения специального оборудования. Это выгодно отличает данный метод от других лабораторных методов и делает его перспективным в плане применения в ветеринарных лабораториях с низкой обеспеченностью оборудованием.

4. Разработанные иммуногистохимический метод исследования и прямой жидкофазный вариант реакции иммунофлуоресценции позволяют проводить исследования проб головного мозга, консервированных формалином, что отличает их от других методов лабораторной диагностики и позволяет

применять эти методы для постановки диагноза на бешенство с использованием проб головного мозга, поступающих в консервированном формалином виде в рамках мониторинга ГЭ КРС, а также проведения научно-исследовательских работ.

5. Разработана и внедрена в РФ система эпизоотологического мониторинга бешенства. В период с 2011 по 2013 г. количество регионов РФ, участвующих в мониторинге, возросло с 22 до 55. Это позволило уточнить эпизоотологическую ситуацию по бешенству в РФ, выявив большее количество случаев заболевания, а также своевременно провести антирабические ветеринарные мероприятия.

6. Разработан и внедрен комплекс из 4 методов определения антирабических антител у домашних, сельскохозяйственных и диких животных и схема применения этих методов. Проведен мониторинг эффективности парентеральной антирабической иммунизации животных по городам: Москва, Санкт-Петербург, Саратов, Волгоград, Ставрополь, Владимир, Нижний Новгород, а также некоторым другим городам, имеющим статус районных центров. Было установлено, что в большинстве случаев мероприятия по иммунизации эффективны, а уровень сероконверсии превышает 70%.

7. Разработаны и внедрены в ветеринарную практику РФ межлабораторные сличительные испытания по диагностике бешенства. Внедренные межлабораторные сличительные испытания проводятся в стране с 2010 г. по настоящее время. Они позволили подтверждать компетентность проверяемых лабораторий, выявлять ошибки специалистов и впоследствии проводить корректирующие мероприятия.

8. Разработаны методы дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства с применением ферментов рестрикции, а также ПЦР-РВ и нуклеотидного секвенирования. Применение данных методов позволило подтвердить отсутствие реверсии аттенуированного вакцинного штамма «РВ-97», используемого для оральной иммунизации диких плотоядных

животных против бешенства.

9. С помощью моноклональных антител изучены антигенные характеристики 233 полевых изолятов вируса бешенства, выделенных в России, Финляндии и Эстонии, установлено существование пяти антигенных вариантов, четыре из которых выявлялись на территории РФ, а один ранее не выявлялся. Эти результаты существенно расширяют научные знания в области антигенной вариабельности полевых изолятов вируса бешенства.

10. Получены 35 полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории 14 регионов РФ, изучены их молекулярно-биологические характеристики, установлены филогенетические и эволюционные связи. Выявлено существование двух филогенетических групп (Пан-Евразийской и Кавказской, разделенных Кавказской горной грядой), а также ряда подгрупп, имеющих строгую географическую приуроченность. С помощью методов молекулярной эпизоотологии проведено расследование причин возникновения бешенства в Финляндии в 1988-1989 гг., а также случая ввоза животного, инфицированного бешенством, в эту страну в 2003 г.

11. На основе изучения 149 полевых изолятов вируса бешенства из 20 провинций Королевства Камбоджа детально изучена молекулярная эпизоотология бешенства в этой стране, подтверждено существование двух филогенетических подгрупп. Изучены филогенетические и эволюционные связи изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территориях Камбоджи, Лаоса, Вьетнама, Мьянмы и Китая. Наиболее репрезентативная филогенетическая группа «SEA1» сформировалась в 1970-х годах прошлого века, в нее входят изоляты вируса из Камбоджи, Вьетнама, Таиланда и Лаоса, что связано с глобальными социальными потрясениями (война, голод) в данном регионе, а также с активным перемещением собак в более поздние годы. Установлена связь филогенетической группировки вирусов, входящих в сублинию 2-й филогруппы «SEA1» с их уникальными биологическими характеристиками, такими как ускоренная гибель зараженных лабораторных животных и необычное

клиническое проявление заболевания.

12. Получены последовательности полных геномов вакцинных штаммов «РВ-97» (Россия) и «Eth_PV» (Эфиопия), изучены их филогенетические связи и антигенные характеристики в сравнении с наиболее распространенными вакцинными штаммами вируса бешенства. Восстановлена история происхождения ряда вакцинных штаммов, в том числе «РВ-97» и «Eth_PV». Показано, что штамм «РВ-97» является прямым потомком оригинального Пастеровского штамма.

13. Успешно реализованы международные программы по организации буферной зоны с целью профилактики бешенства между Россией и Финляндией. В рамках сотрудничества России и стран ЕС достигнуто стойкое благополучие по бешенству территории Калининградской обл. В рамках Братиславских соглашений президентов России и США оказана научно-техническая помощь Эфиопии, внедрена технология роллерного культивирования клеток и вируса бешенства, получен прототип вакцины, отвечающий требованиям МЭБ/ВОЗ, предназначенный для замены тканевого антирабического препарата, применяемого в этой стране.

14. Разработаны критерии планирования, проведения и оценки антирабических мероприятий в хозяйствах различных форм собственности. В интересах Минсельхоза РФ подготовлен проект «Методических рекомендаций по борьбе с бешенством». Подготовлен, утвержден главами правительств и введен в действие «Комплекс совместных действий государств - участников СНГ на период до 2025 г.». Принятие этих документов позволит улучшить эпизоотологическую ситуацию по бешенству, снизить экономический ущерб, наносимый заболеванием, и обезопасить население от заражения бешенством в РФ и других странах.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК

1. **Метлин, А.Е.** Диагностика бешенства животных с использованием реакции иммунофлюоресценции / А.Е. Метлин, Н.А. Назаров, С.С. Рыбаков, Н.М. Михайлина, К.Н. Груздев, А.В. Чепуркин, А.А. Егоров // Ветеринария. – 2006. – № 2. – С. 20-23.

2. **Метлин, А.Е.** Жидкофазный вариант реакции иммунофлюоресценции для диагностики бешенства / А.Е. Метлин, С.С. Рыбаков, К.Н. Груздев, А.А. Егоров, А.В. Чепуркин // Ветеринария. – 2007. – № 7. – С. 56-59.

3. **Метлин, А.Е**. Оральная вакцинация диких плотоядных животных против бешенства / А.Е. Метлин, С.С. Рыбаков, В.В. Михалишин, T. Muller // Ветеринария. – 2009. – № 8. – С. 18-25.

4. Аншба, Э.А. Эпизоотическая обстановка в Республике Абхазия по сибирской язве, бешенству, ящуру и африканской чуме свиней / Э.А. Аншба, О.В. Теремков, В.Н. Герасимов, **А.Е. Метлин**, Э.Б. Кербабаев // Ветеринария Кубани. – 2010. –№ 1. – С. 20-22.

5. Рыбаков, С.С. Безопасность и иммуногенность оральных антирабических вакцин / С.С. Рыбаков, Е.В. Белик, **А.Е. Метлин**, В.В. Борисов, Н.А. Назаров, А.А. Егоров, Е.В. Чернышова, В.В. Михалишин // Ветеринария. – 2010. – № 8. – С. 18-22.

6. Сухарьков, А.Ю. Оценка поедаемости оральных антирабических вакцин / А.Ю. Сухарьков, Е.В. Чернышова, **А.Е. Метлин**, В.Д. Калишенко, Н.А. Назаров, А.А. Егоров, С.С. Рыбаков, В.Е. Кадочников, Д.О. Баньковский // Ветеринария. – 2011. – № 11. – С. 31-34.

7. Сухарьков, А.Ю. Диагностика бешенства животных методом иммуноферментного анализа, сравнение прямого и непрямого сэндвич-варианта / А.Ю. Сухарьков, Н.А. Назаров, **А.Е. Метлин** // Ветеринария Кубани. – 2011. – № 6. – С. 12-14.

8. Иовлева, А.Ю. Разработка метода ПЦР в реальном времени для обнаружения вируса бешенства и дифференциации полевых изолятов вируса от вакцинного штамма / А.Ю. Иовлева, С.А. Чупин, **А.Е. Метлин** // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2012. – № 5. – С. 62-65.

9. Назаров, Н.А. Латекс-агглютинационный тест для диагностики бешенства животных / Н.А. Назаров, С.С. Рыбаков, **А.Е. Метлин** // Ветеринария. – 2013. –№ 6. – С. 56-61.

10. Чупин, С.А. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Российской Федерации в период 2008-2011гг. / С.А. Чупин, Е.В. Чернышова, **А.Е. Метлин** // Вопр. вирусологии. –2013. – Т. 58. - № 4. – С. 44-49.

11. Зайкова, О.Н. Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов

вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей / О.Н. Зайкова, Т.В. Гребенникова, А.М. Гулюкин, А.А. Шабейкин, И.В. Полякова, **А.Е. Метлин** // Вопр. вирусологии. –2017. –Т. 62. - № 3. – С. 101-108.

12. **Метлин, А.Е.** Современные аспекты классификации лиссавирусов / А.Е. Метлин // Ветеринария сегодня. – 2017. – № 3 (22). – С. 52-57.

13. Парошин, А.В. Ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по бешенству животных в Московском регионе за 2010-2016 годы / А.В. Парошин, С.Б. Воскресенский, А.А. Муковнин, А.В. Еньшин, **А.Е. Метлин,** К.Н. Груздев // Ветеринария сегодня. – 2017. – № 4 (23). – С. 33-37.

14. Парошин, А.В. Эпизоотологические особенности проявления бешенства животных на территории московской области. / А.В. Парошин, В.А. Астраханцев, С.Б. Воскресенский, **А.Е. Метлин,** А.Н. Чернов, К.Н. Груздев // Ветеринарный врач.-2017.-№4.-с. 11-15.

15. Лозовой, Д.А. Международное сотрудничество ветеринарных служб стран СНГ / Д.А. Лозовой, **А.Е. Метлин**, А.М. Рахманов // Ветеринария. – 2018. – № 3. – С. 61-64.

16. Парошин, А.В. Поедаемость приманок для оральной вакцины против бешенства диких плотоядных животных / А.В. Парошин, С.Б. Воскресенский, **А.Е. Метлин**, К.Н. Груздев // Ветеринария и кормление. – 2018. – № 1. – С. 18-20.

<u>Публикации в изданиях, включенных в базу данных Scopus/Pubmed</u>

17. **Metlin, A.E.** Antigenic and molecular characterization of field and vaccine rabies virus strains in the Russian Federation / A.E. Metlin**,** S.S. Rybakov, K.N. Gruzdev, E. Neuvonen, A. Huovilainen, J. Cox // Developments in Biologicals. – 2006. – Vol. 125. – P. 33-37. (Scopus)

18. **Metlin, A.E.** Imported case of equine rabies in Finland: clinical course of the disease and the antigenic and genetic characterization of the virus / A.E. Metlin, R. Holopainen, C. Ek-Kommonen, A. Huovilainen, S. Tuura // J. Equine Veterinary Science. – 2006. –Vol. 26, No 12. – P. 584-587. (Scopus)

19. Egorov, A.A. Evolution of the rabies epidemic in the Vladimir and Nizhny-Novgorod regions in 1998-2004 / A.A. Egorov, S.S. Rybakov, **A.E. Metlin**, A.V. Chepurkin, E. Neuvonen // Developments in Biologicals. – 2006. – Vol. 125. – P. 299.

20. **Metlin, A.E.** Genetic heterogeneity of Russian, Estonian and Finnish field rabies viruses / A.E. Metlin, E. Neuvonen, A. Huovilainen, S. Rybakov, K. Gruzdev //Arch. Virology. – 2007. – Vol. 152, No 9. – P. 1645-1654. (Scopus)

21. **Metlin, A.** Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97 / A. Metlin, E. Neuvonen, A. Huovilainen, S. Rybakov, V. Mikhalishin, L. Paulin, S. Suomalainen // Virus Research. – 2008. – Vol.132, N 1-2. – P. 242-247. (Scopus)

22. **Metlin, A.** Finnish-Russian programme for the control of rabies (2005-2010) / A.

Metlin, S.S. Rybakov, K.N. Gruzdev, V.V. Mikhalishin, A. Huovilainen, E. Neuvonen // Developments in Biologicals. – 2008. – Vol. 131. – P. 233-238. (Scopus)

23. Hurisa, B. Safety and immunogenicity of Ethiorab rabies vaccine / B. Hurisa, B. Tegbaru, A. Mengesha, G. Kebede, S. Kerga, A. Adhanom, A. Godana, D. Nigussie, B. Newayesilasie, G. Gebrewold, K. Urga, D. Bankovskiy, **A. Metlin**, D. Nolkes // J. Vaccines and Vaccination. – 2013. – Vol. 4, N 6. – 5 p. (Scopus)

24. Mengesha, A. Safety and potency test for PV and ERA based cell culture anti-rabies vaccines produced in Ethiopia / A. Mengesha, B. Hurisa, B. Newayesilasie, M. Beyene, K. Urga, D. Bankovisky, **A. Metlin** // J. Vaccines and Vaccination. – 2014. – Vol. 5, No 4. P. 1000237. (Scopus)

25. Hampson, K. Global alliance for rabies control partners for rabies prevention. Estimating the global burden of endemic canine rabies / K. Hampson, L. Coudeville, T. Lembo. M. Sambo, A. Kieffer, M. Attlan, J. Barrat, J.D. Blanton, D.J. Briggs, S. Cleaveland, P. Costa, C.M. Freuling, E. Hiby, L. Knopf, F. Leanes, F.X. Meslin, **A. Metlin**, M.E. Miranda, T. Müller, L.H. Nel, S. Recuenco, C.E. Rupprecht, C. Schumacher, L. Taylor, M.A. Vigilato, J. Zinsstag, J. Dushoff // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2015. – Vol. 9, No 4. – P. e0003709. (Scopus)

26. Mey, C. Evidence of two distinct phylogenetic lineages of dog rabies virus circulating in Cambodia / C. Mey, **A. Metlin**, V. Duong, S. Ong, S. In, P.F. Horwood, J.M. Reynes, H. Bourhy, A. Tarantola, P. Buchy // Infect. Genet. Evol. – 2016. – Vol. 38.– P. 55-61.

Патенты

27. Пат. 2266755 Российская Федерация, МПК А61К 39/205. Способ выявления антигена вируса бешенства в формалинизированных пробах головного мозга животных / **А.Е. Метлин**, С.С. Рыбаков, А.В. Чепуркин, А.А. Егоров, К.Н. Груздев; ФГУ «ВНИИЗЖ». - № 2004112106/13; заявл. 20.04.04; опубл. 27.12.05, Бюл. № 36.

28. Пат. 2533802 Российская Федерация, МПК C07K16/10**.** Тримеризованное однодоменное антитело, специфически связывающееся с гликопротеином G вируса бешенства, нейтрализующее вирус бешенства / С.В. Тиллиб, Т.И. Иванова, Л.А. Васильев, **А.Е**. **Метлин**, М.М. Шмаров, Д.Ю. Логунов, И.Л. Тутыхина, С.В. Алексеева, Б.С. Народицкий, А.Л. Гинцбург; ФГБУ "Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. – Заявл. 30.08.13; опубл. 20.11.14.

Публикации в других изданиях и материалах конференций

29. Назаров, Н.А. Разработка твердофазного непрямого сэндвич-варианта иммуноферментного анализа для диагностики бешенства животных / Н.А. Назаров, Н.М. Михайлина, С.С. Рыбаков, **А.Е. Метлин**, А.В. Чепуркин, А.В. Молодкин, А.В. Борисов, К.Н. Груздев // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2006. – Т. 4. – С. 201-213.

30. **Метлин, А. Е.** Бешенство животных. Современные аспекты / А.Е. Метлин, С.С. Рыбаков // Ветеринарная жизнь. – 2006. – Спецвыпуск (ноябрь). – С. 7.

31. **Metlin**, **A.E.** Genetic characterization of Russian field and vaccine rabies virus strains / A.E. Metlin, E. Neuvonen, S.S. Rybakov, K.N. Gruzdev, A. Huovilainen // 4th Intern. Veterinary Vaccines and Diagnostic Conf.: Progr. and Abstr. - Oslo, 2006. - P. 76.

32. **Метлин**, **А.Е.** Диагностика бешенства животных с использованием реакции иммунофлюоресценции / А.Е. Метлин, Н.А. Назаров, С.С. Рыбаков, Н.М. Михайлина, К.Н. Груздев, А.В. Чепуркин, А.А. Егоров // Ветеринария с.-х. животных. – 2007. – № 3.– С. 29-33.

33. Rybakov, S.S. Rabies researche trends in the FGI “Federal Centre for Animal Health”/ S.S. Rybakov, **A.E. Metlin**, A.V, Borisov, A.N. Balashov, A.A. Egorov, K.N. Gruzdev // Towards the Elimination of Rabies in Eurasia: Joint OIE/WHO/EU Intern. Conf.: Abstr. Book. – Paris, 2007. – P. 84.

34. Бардина, Н.С. Бешенство в России. Оценка риска. Информационно-аналитический обзор / Н.С. Бардина, М.А. Титов, А.К. Караулов, Ф.И. Коренной, С.А. Дудников, **А.Е. Метлин**, Е.В. Яковлева, А.А. Шевцов. – Владимир, 2008. – 80 с.

35. **Metlin**, **A.** Restriction enzyme technique for rapid discrimination of attenuated and field rabies viruses in the Russian Federation // A. Metlin, S. Rybakov, E. Neuvonen, E. Bilik, E Iakovleva, A. Huovilainen // International Conference Rabies in the Americas: XIX Intern. Conf.: Prog. Abstr. Book. – Atlanta, 2008. – P. 48.

36. **Метлин, А.Е**. Меры борьбы с бешенством животных / А.Е. Метлин // Ветеринария Кубани. – 2008. – № 1. – С. 4-7.

37. Белик, Е.В. Ведомственная целевая программа борьбы с бешенством в Российской Федерации / Е.В. Белик, С.С. Рыбаков, К.Н. Груздев, А.А. Егоров, **А.Е. Метлин** // Рос. вет. журн. С.-х. животные. Спец. вып., посвящ. 50-летию ФГУ "ВНИИЗЖ". – Сент. 2008. – С. 4-5.

38. Назаров, Н.А. Получение моноклональных антител для диагностики бешенства животных / Н.А. Назаров, А.О. Шепеляковская, **А.Е. Метлин**, Х.М. Бозиев, Е.И. Сидина, С.С. Рыбаков, А.В. Молодкин, Н.М. Михайлина, Ф.А. Бровко // Наука и образование для целей биобезопасности: материалы пятой междунар. конф. – Пущино, 2008. – С. 81-85.

39. Чернышова, Е.В. Применение антибиотиков тетрациклинового ряда в качестве биомаркера для контроля поедаемости оральной антирабической вакцины / Е.В. Чернышова, В.В. Михалишин, С.С. Рыбаков, А.Н. Балашов, А.Ю. Сухарьков, А.В. Чепуркин, **А.Е. Метлин** // 29-й Междунар. конгр. биологов-охотоведов: сб. материалов. – М., 2009. - Ч. 2. - С. 35, 37.

40. **Метлин, А.Е**. Бешенство животных: эпизоотология, меры борьбы и перспективы / А.Е. Метлин, Е.В. Чернышова, С.С. Рыбаков // Ветеринария Кубани. – 2009. – № 6. – С. 2-4.

41. Молодкин, А.В. Перспектива использования моноклональных антител для диагностики бешенства животных / А.В. Молодкин, Н.А. Назаров, Н.М. Михайлина, А.О. Шепеляковская, Ф.А. Бровко, Х.М. Бозиев, Е.И. Сидина, С.С. Рыбаков, **А.Е. Метлин** // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2009. – Т. 7. – С. 43-50.

42. Сухарьков, А.Ю. Анализ эффективности оральной вакцинации против бешенства животных в дикой среде на примере некоторых регионов Российской Федерации / А.Ю. Сухарьков, Н.А. Назаров, **А.Е. Метлин**, С.С. Рыбаков, Е.В. Чернышова, А.Г. Еремина, А.Ю. Иовлева // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2010. – Т. 8. – С. 57-63.

43. **Метлин, А.Е.** Бешенство животных / А.Е. Метлин // Балтийский форум ветеринарной медицины: материалы Междунар. науч.-практ. конф. – СПб, 2010. – С. 134-136.

44. Чернышова, Е.В. Молекулярная диагностика бешенства животных / Е.В. Чернышова, **А.Е. Метлин,** С.А. Чупин, Л.Б. Прохватилова, С.С. Рыбаков, А.А. Егоров, В.В. Борисов // Молекулярная диагностика - 2010: сб. тр. VII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – М., 2010. – Т. 2. – С. 283-286.

45. Чернышова, Е.В. Анализ иммуногенности вакцин, применяемых для профилактики бешенства животных на территории Российской Федерации / Е.В. Чернышова, Н.А. Назаров, **А.Е. Метлин**, С.С. Рыбаков, А.В. Чепуркин, А.Ю. Сухарьков, А.Г. Еремина, А.Ю. Иовлева // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2010. – Т. 8. – С. 64-73.

46. Иовлева, А.Ю. Конструирование рекомбинантной плазмиды ptz57/gp со вставкой гена гликопротеина вируса бешенства штамма RV-97 / А.Ю. Иовлева, Н.П. Елаткин, **А.Е. Метлин,** С.С. Рыбаков // Тр. Федерального центра охраны здоровья животных. – Владимир, 2011. – Т. 9. – С. 47-54.

47. Иовлева, А.Ю. Получение мутантной плазмиды ptz57/gp3_mut, несущей ген гликопротеина вируса бешенства / А.Ю. Иовлева, Н.П. Елаткин, **А.Е. Метлин** // Ветеринарна медицина. – Харків, 2011. – № 95. – С. 61-63.

48. Сухарьков, А.Ю. Определение скоплений тетрациклина в тканях костей и зубов животных флуоресцентным методом для оценки поедаемости оральных антирабических вакцин / А.Ю. Сухарьков, Е.В. Чернышова, **А.Е. Метлин**, Н.А. Назаров, С.С. Рыбаков // Актуальные проблемы биологии: материалы Всерос. науч.-практ. конф. – Чебоксары, 2011. – С. 77-81.

49. **Метлин**, **А.Е.** Бешенство в Эфиопии: современная ситуация и перспективы / **А.Е. Метлин**, A. Deressa, M. Beyene, K. Urga, Д.О. Баньковский // Ветеринария сегодня. – 2012. – № 2. – С. 47-52.

50. **Метлин, А.Е.** Мифы оральной вакцинации / А.Е. Метлин // Ветеринарная жизнь. - 2012. - № 6. - С. 4.

51. Chernyshova, E.V. Comparison between analytical sensitivity of rabies virus

isolation in neuroblastoma cell culture with analytical sensitivity of mouse inoculation test / E.V. Chernyshova, N.A. Nazarov, **A.E. Metlin** // 2nd Congr. Europ. Assoc. Veterinary Lab. Diagnosticians (EAVLD 2012). – Kazimierz, Poland, 2012, S1-P-12.

52. **Метлин, А.Е.** Статус российской популяции крупного рогатого скота по риску губкообразной энцефалопатии, перспективы его оценки согласно критериям, принятым МЭБ / А.Е. Метлин, С.С. Рыбаков, А.А. Егоров // Ветеринария сегодня. – 2013. – № 2 (5). – С. 42-56.

53. Рыбаков, С.С. Эпизоотическая ситуация по бешенству в России / С.С. Рыбаков, **А.Е. Метлин**, Е.В. Чернышова // Основные направления совершенствования ветеринарных услуг в эпоху могущества и счастья: материалы Междунар. науч. конф. – Ашхабад, 2013. - С. 173-175.

54. Чернышова, Е.В. Эпизоотическая ситуация по бешенству в России и анализ эффективности антирабической вакцинации среди домашних животных, вывозимых за границу / Е.В. Чернышова, Н.А. Назаров, **А.Е. Метлин** // Ветеринария сегодня. – 2013. – № 4. – С. 49-51.

55. **Metlin**, **A.** Epidemic surveillance and control of infectious animal diseases in the Leningrad and Kaliningrad Oblasts of the Russian Federation / **A. Metlin**, K. Gruzdev, A. Shevtsov, S. Rybakov, A. Varentsova, A. Kononov // Wildlife and Infectious Animal Diseases The Proceedings of a Nordic –Baltic seminar on the role of the wildlife as reservoir and/or spread of infectious animal diseases in the coastal areas of countries bordering the Baltic Sea. – Gdansk, Poland, 2013, P. 21-22.

56. Hurisa, B. Production of Cell Culture Based Anti-rabies Vaccine in Ethiopia / B. Hurisa, A. Mengesha, B. Newayesilassie, S. Kerga, G. Kebede, D. Bankovisky, **A. Metlin**, K. Urga // Procedia in Vaccinology. – 2013. – Vol. 7. – P. 2-7.

57. Hurisa, B. Antibody response of dogs to Ethiorab rabies vaccine / B. Hurisa, A. Mengesha, H. Lemma, D. Nigussie, A. Godana, A. Adhanon, G. Kebede, S. Kerge, B. Newayesilasie, G. Gebrewold, D. Bankovskiy, **A. Metlin**, A. Kebede, K. Urga // Intern. J. Vaccines Vaccination. – 2015. – Vol. 1, N 2. – P. 00008.

58. Grigoryan, G. V. Global financial crisis as a challenge for prevention of human rabies in the former Soviet Republics / G.V. Grigoryan, A.Y. Metlin // Austi Virol. and Retrovirology. – 2016. – Vol. 3, N 1. – 4p.

59. Петрова, О.Н. Эпизоотическая ситуация и прогноз по бешенству животных на территории Российской Федерации / О.Н. Петрова, М.И. Шульпин, А.К. Караулов, **А.Е. Метлин**, Д.А. Лозовой // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы 2-й Всерос. научно-практ. конф. – Ставрополь, 2017. – С. 74-75.

60. Бешенство: сб. отечественных и зарубежных публикаций. 2010 - апрель 2017. Т. 1-15. Профилактика и терапия бешенства / ФГБУ «ВНИИЗЖ»; ред.: **А.Е. Метлин**, К. Н. Груздев. – Владимир, 2017. - 322 с.

61. Shulpin, M.I. Surveillance of rabies in wild animals in Russia / M.I. Shulpin, N.A.

Nazarov, **A.E. Metlin** // Intern. Conf. Rabies in the Americas: XXVIII Intern. Conf.: Prog. Abstr. Book. – Calgary, 2017. – P. 151.

62. **Метлин, А.Е**. О подготовке международного проекта "Комплекс совместных действий государств-участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 года" / А.Е Метлин // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 90-летию со дня рождения проф. В.А. Киршина. – Казань, 2018. – С. 236-238.

63. Парошин, А.В. Фотоловушки - новый подход при контроле результатов оральной вакцинации животных / А.В. Парошин, **А.Е. Метлин**, К.Н. Груздев // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 90-летию со дня рождения проф. В.А. Киршина. – Казань, 2018. – С. 243-246.

64. **Метлин, А.Е.** Эпизоотическая ситуация и меры борьбы с бешенством в России / А.Е. Метлин, А.В. Парошин, К.Н. Груздев // Материалы VIII Международного ветеринарного конгресса, М., 2018, с 264-267.

65. **Метлин**, **А.Е.** Ситуация по бешенству в различных регионах мира и разработка мероприятий по борьбе с бешенством / **А.Е. Метлин**, А.В. Парошин, А.В. Шишков, Е.О. Турбасова, А.Н. Балашов, А.Ю. Иовлева, В.В. Михалишин, К.Н. Груздев // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – М., 2018. – Т. 16: 60 лет ФГБУ «ВНИИЗЖ». - С. 72-94.

Подписано в печать 30.11.2018
Формат бумаги 60×90 1/16. Усл. печ. л. 1.
Тираж 100 экз.
Отпечатано на полиграфической базе
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных»
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)