

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУ «Федеральный центр охраны
здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Лозовой Д. А.

20/18 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

Диссертация «Комплекс средств и методов диагностики и борьбы с бешенством» выполнена в референтной лаборатории по бешенству и BSE ФГБУ «ВНИИЗЖ».

В период подготовки диссертации соискатель Метлин Артем Евгеньевич работал в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в референтной лаборатории по бешенству и BSE в должности заведующего лабораторией. В настоящее время работает в ФГБУ «ВНИИЗЖ» в должности заместителя директора по НИР и развитию.

В 2001 г. Метлин А.Е. окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ивановская государственная сельскохозяйственная академия» по специальности «Ветеринария».

В 2005 году защитил кандидатскую диссертацию на тему «Молекулярно-биологические характеристики полевых изолятов и аттенуированных штаммов вируса бешенства» по специальности 16.00.03 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с

микотоксикологией и иммунология» в совете, созданном при ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Научный консультант – доктор биологических наук, профессор Груздев Константин Николаевич главный научный сотрудник Информационно-аналитического центра Управления ветнадзора ФГБУ «ВНИИЗЖ».

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Актуальность работы. Диссертация Метлина А.Е. является законченной научно-квалификационной работой, самостоятельно выполненной на современном научно-методическом уровне, в которой на основании выполненных автором исследований предложены: комплекс методов лабораторной диагностики, система мониторинга бешенства и эффективности применения антирабических вакцин, система межлабораторных сличительных испытаний, имеющие важное экономическое и хозяйственное значение для ветеринарии. В диссертации изложены новые научные результаты об филогенетических связях полевых изолятов вируса бешенства, выделенных в ряде регионов РФ, а также за рубежом, изучены молекулярно-биологические свойства вакциновых штаммов вируса бешенства, реализован ряд международных проектов по борьбе и профилактике бешенства. Внедрение результатов проделанной работы вносит значительный вклад в развитие ветеринарной отрасли страны.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации. Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении исследований по разработке комплекса средств и методов диагностики и борьбы с бешенством, а также в апробации и анализе полученных данных и подготовке публикаций по результатам выполненной работы.

Предлагаемая в работе Метлина А.Е. схема лабораторной диагностики представляет собой наглядную пошаговую инструкцию по принятию решения о применении методов лабораторной диагностики бешенства. Ранее предложенная схема (Назаров с соавт., 2003) предполагала использование

более современных методов, таких как ИФА, вирусовыделение в культуре клеток. Однако, она требовала серьезной доработки, так как не включала в себя другие доступные диагностические методы, а также не предполагала их ранжирования на уровнях.

В рамках данной работы адаптирован метод агглютинации латекса (РАЛ) для диагностики бешенства с использованием проб головного мозга и применением латексных частиц отечественного производства. Основной положительной характеристикой РАЛ является его простота и отсутствие необходимости инструментального учета результатов реакции. Разработанный метод успешно прошел комиссионные испытания.

Разработанный иммуногистохимический метод позволяет идентифицировать антигены вируса бешенства, в том числе их локализацию в клетках ткани головного мозга инфицированных животных. Метод может быть использован в качестве дополнительного при диагностике бешенства, а также при проведении исследований по определению локализации участков накопления вируса бешенства у инфицированных животных.

Исследование консервированных формалином материялов проводится с помощью гистологического метода, методов иммуногистохимии и адаптированных вариантов реакции иммунофлуоресценции (Palmer et al. 1985; Sinchaisri et al. 1992; Zimmer et al. 1990). Реализация этих методов довольно трудоемка, занимает много времени, требуют использования специального оборудования, приборов, дорогостоящих материалов и реагентов, некоторые из которых токсичны.

Постановка прямого твердофазного варианта РИФ (ПТ РИФ) является более простым и менее трудоемким методом выявления антигена вируса бешенства в консервированных формалином тканях головного мозга (Barnard & Voges 1982). По литературным данным, на чувствительность ПТ РИФ большое влияние оказывает концентрация формалина в консервирующем растворе и срок консервирования (Umoh, Blenden, 1981, Meslin et al., 1996).

При постановке ПТ РИФ, после фиксации в ацетоне при минус 20°C в течение 45-60 мин часть препаратов отслаивалась во время промывания, а интенсивность флуоресценции, с увеличением срока консервирования снижалась, что затрудняло проведение исследований. Для устранения этих недостатков нами был разработан жидкофазный вариант РИФ (ПЖ РИФ).

При анализе консервированных формалином проб головного мозга мышей результаты ПЖ РИФ показал 100%-ную чувствительность на протяжении всего эксперимента.

Начиная с 2011 г. Россельхознадзор РФ требует проведения ежегодного эпизоотологического мониторинга на ряд инфекционных болезней животных, в том числе и на бешенство, для обеспечения выполнения требований Соглашения ВТО по СФС при вступлении России в ВТО. В связи с этим предстояло разработать и внедрить в ряде субъектов РФ систему активного эпизоотологического мониторинга бешенства. Разработанное техническое задание включает исчерпывающую информацию о проводимом мероприятии, способы отбора, консервирования и доставки проб для исследований. Благодаря проведенному в 2011 г. мониторингу был подтвержден статус Ленинградской, Магаданской областей и Камчатского края как благополучных по бешенству регионов, уточнена эпизоотологическая обстановка по бешенству собак в 8 регионах России.

Практика проведения межлабораторных сличительных испытаний по бешенству широко распространена по всему миру и осуществляется для повышения достоверности и воспроизводимости лабораторной диагностики бешенства (Servat et al., 2008; Clavijo et al., 2017). Разработанная ФГБУ «ВНИИЗЖ» и внедренная система межлабораторных сличительных испытаний позволяет на протяжении 7 лет регулярно подтверждать компетентность проверяемых лабораторий, выявлять ошибки специалистов, повышать их квалификацию (решение Европейской комиссии 2010/591/EU).

В ходе изучения молекулярно-биологических характеристики изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории РФ, автором было установлено существование 2 основных филогенетических групп: «Пан-Евразийской» и «Кавказской». Предложенная ранее для использования на территории РФ классификация с использованием латинских букв (Kuzmin et al. 2004) не отражает географического происхождения изучаемых изолятов, предпочтительнее классификация, предложенная в рамках данной работы.

Проведенные ранее исследования изолятов вируса бешенства, циркулирующих в Юго-Восточной Азии, выявили первые доказательства существования Азиатской филогенетической группы (Bourhy et al., 2008). Проведенное в рамках данной работы исследование представляет собой первую широкомасштабную научную работу по изучению молекулярной эпидемиологии бешенства в Королевстве Камбоджа.

В ходе выполнения данной работы были впервые получены полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов «PB-97» и «Eth_PV». Реализовывались программы Российско-Финского сотрудничества по профилактике бешенства в граничащих с Финляндией регионах РФ, а также сотрудничества Россия-ЕС по искоренению бешенства в Калининградской области. Оказана помощь Эфиопии в освоении технологии производства культуральных инактивированных антирабических вакцин. В Королевстве Камбоджа проведено изучение молекулярно-биологических характеристик полевых изолятов вируса бешенства.

Степень достоверности результатов проведенных исследований.

Результаты проведенных исследований достоверны, получены с использованием корректных методик исследования и большого объема экспериментального материала, обработаны статистическими методами. Выводы и практические предложения обоснованы и вытекают из результатов исследований, изложенных в диссертации.

Научная новизна. Научная новизна диссертационного исследования представлена следующими положениями:

- В результате проведенных исследований впервые разработана расширенная схема применения методов лабораторной диагностики бешенства, позволяющая исследовать патологический материал любого качества.
- Разработана и внедрена на территории России программа активного мониторинга бешенства в условиях ограниченности финансовых ресурсов, проанализированы результаты ее применения. Разработана расширенная схема применения лабораторных методов, позволяющих проводить оценку эффективности применения антирабической вакцинации.
- Проведен мониторинг эффективности применения инактивированных антирабических вакцин на различных видах животных на территории РФ.
- Впервые разработана и внедрена на территории РФ система межлабораторных сличительных испытаний диагностики бешенства.
- Изучены молекулярно-биологические и антигенные характеристики полевых изолятов вируса бешенства, а также молекулярная эпизоотология бешенства на территории РФ, Камбоджи и стран Юго-Восточной Азии.
- Изучены молекулярно-биологические и антигенные характеристики вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых в России и за рубежом, изучены их филогенетические связи.
- Разработаны и представлены к утверждению методические рекомендации по борьбе с бешенством, утвержден и введен в действие «Комплекс совместных действий государств – участников СНГ по профилактике и борьбе с бешенством на период до 2025 г.».
- Успешно реализованы программы международного сотрудничества между Россией, Финляндией и другими странами ЕС, Эфиопией в области борьбы и профилактики бешенства, проанализированы их результаты.

Практическая значимость работы. Практическая значимость работы заключается в том, что разработаны и усовершенствованы методы лабораторной диагностики бешенства животных, составляющие в совокупности трехуровневый комплекс методов лабораторной диагностики, учитывающий условия их применения. Внедрена система активного мониторинга бешенства на территории России с применением разработанного комплекса методов лабораторной диагностики бешенства, позволившая уточнить эпизоотическую 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. На основе полученных результатов в соавторстве с коллективом лаборатории малоизученных болезней ФГБУ «ВНИИЗЖ» (в последствии референтной лаборатории бешенства и BSE) разработаны, утверждены и внедрены в лабораторную практику 14 методических указаний и рекомендаций.

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 в будущем.

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. Научный интерес представляло также установление филогенетических связей изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Камбоджи, некоторых стран Юго-Восточной Азии, и Эфиопии, не имеющих общей границы с Россией, но являющихся ее активными торговыми партнерами.

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.

Ценность научных работ соискателя. По материалам диссертации опубликовано 64 научных работ, из них 24 в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ. Наиболее значимые работы.

1. Метлин, А.Е. Жидкофазный вариант реакции иммунофлуоресценции для диагностики бешенства / А.Е. Метлин, С.С. Рыбаков, К.Н. Груздев, А.А. Егоров, А.В. Чепуркин // Ветеринария. - 2007. - № 7. - С. 56-59.
2. 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.
3. Метлин, А.Е. Современные аспекты классификации лиссавирусов / А.Е. Метлин // Ветеринария сегодня. - 2017. - № 3 (22). -С. 52-57.
4. Лозовой, Д.А. Международное сотрудничество ветеринарных служб стран СНГ / Д.А. Лозовой, А.Е. Метлин, А.М. Рахманов // Ветеринария. - 2018. - № 3. - С. 61-64.
5. Metlin A.E., Neuvonen E., Huovilainen A., Rybakov S., Gruzdev K. Genetic heterogeneity of Russian, Estonian and Finnish field rabies viruses. Archives of Virology. 2007. Т. 152. № 9. С. 1645-1654.

6. Metlin A., Neuvonen E., Huovilainen A., Rybakov S., Mikhališin V., Paulin L., Suomalainen S. Characterization of russian rabies virus vaccine strain RV-97. Virus Research. 2008. T. 132. № 1-2. C. 242-247.

7. Mey C, Metlin A, Duong V, Ong S, In S, Horwood PF, Reynes JM, Bourhy H, Tarantola A, Buchy P. Evidence of two distinct phylogenetic lineages of dog rabies virus circulating in Cambodia. Infect Genet Evol. 2016 Mar;38:55-61.

Специальность, которой соответствует диссертация.

Диссертация Метлина Артема Евгеньевича соответствует научной специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология а именно пунктам 3, 5, 7, 8, 9, 14, 15.

Текст диссертации был проверен в системе «Антиплагиат». Итоговая оригинальность текста диссертации составила 87,02%.

Диссертация «Совершенствование средств и методов диагностики, мер борьбы и профилактики бешенства» Метлина Артема Евгеньевича рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Заключение принято на расширенном заседании сотрудников референтной лаборатории по бешенству и BSE, с участием специалистов других лабораторий федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный центр охраны здоровья животных».

Присутствовало на заседании 27 человек.. Результаты голосования: «за» - 27 чел., «против» - нет, «воздержалось» - нет, протокол № 2 от «17» августа 2018 г.

Ученый секретарь ФГБУ «ВНИИЗЖ»
доктор ветеринарных наук, профессор



Владимир Сергеевич
Русалеев