МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»
141142, Московская обл., Щелковский р-н,пос. Биокомбината
Тел/ Факс 8 (49656)7-32-63e-mail: vnitibp@mail.ru
ИНН 5050007071 КПП 505001001ОГРН 1035010214436

«6» февраля 2019г. № 01/15
На № _____ от «____»_____

ОТЗЫВ

официального оппонента Клюкиной Валентины Ивановнына диссертационную работу Метлина Артема Евгеньевича «Комплекс средств и методов диагностики и борьбы с бешенством», представленную на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук по специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Актуальность темы. Бешенство в настоящее время остается важной и доминирующей социально-экономической проблемой, разрешение которой требует фундаментальных знаний о факторах, оказывающих влияние на эпизоотическую и эпидемиологическую ситуацию в Российской Федерации и странах мира. Несмотря на достижения науки в вопросах диагностики, профилактики и контроля бешенства, проблема остается не решенной.

Эпизоотическая ситуация по бешенству животных в отдельных регионах России остается напряженной, активизируются природные очаги, отмечается рост заболеваемости диких плотоядных животных, в эпизоотический процесс интенсивно вовлекаются домашние животные, создавая угрозу людям.

Объектом исследований рассматриваемой диссертационной работы – А.Е. Метлина избрал совершенствование методов лабораторной диагностики бешенства с требованиями международной гармонизации, разработки алгоритма и стратегии борьбы с болезнью, разработки национальных

программ по ликвидации бешенства, повышения эффективности вакцин против бешенства на территории Российской Федерации. При этом сделан акцент на исследование молекулярно-биологических, антигенных характеристик, филогенетических связей, полевых изолятов вируса бешенства, выделенных на территории России и ряда зарубежных стран, дифференциации вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых для изготовления антирабических вакцин.

Возможность постановки достоверного диагноза на бешенство и определения иммунного статуса вакцинированных против бешенства диких и домашних животных с помощью разработанных методов позволит разработать алгоритм и стратегию борьбы с бешенством, оценить и прогнозировать эпизоотическую ситуацию в России, является важной составляющей для организации профилактических мероприятий. В этой связи актуальность диссертационной работы не вызывает сомнений.

Научная новизна. При выполнении диссертационной работы автором проведены широкомасштабные научные исследования и получены результаты, представляющие большой научный и практический интерес.

Научная новизна полученных автором результатов заключается в расширении и углублении научных знаний в области молекулярной эпизоотологии бешенства, изучении молекулярно-биологических характеристик и филогенетических связей полевых изолятов вируса бешенства, выделенных на территории РФ, молекулярной эпизоотологии бешенства в Королевстве Камбоджи и государствах Юго-Восточной Азии, вакцинных штаммов вируса бешенства, используемых в России и за рубежом.

Научную новизну результатов исследований, полученных автором, представляют : разработка комплекса методов лабораторной диагностики бешенства и алгоритм их применения; впервые разработана и внедрена на территории РФ система межлабораторных сличительных испытаний по

диагностике бешенства; разработана и внедрена на территории России программа активного мониторинга бешенства с применением методов оценки эффективности профилактической вакцинации различных видов животных.

Установлено с использованием панели МКА наличие пяти антигенных вариантов среди изолятов, циркулирующих на территории России, Финляндии и Эстонии; впервые получены полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов «РВ-97», и «Eth_PV»; адаптированы и внедрены в практику ОТ-ПЦР и ПЦР в реальном времени для диагностики бешенства и дифференциации полевых изолятов и вакцинных штаммов.

Автором дано научное обоснование и разработана национальная программа международного сотрудничества по профилактике и борьбе с бешенством в России, Финляндии и стран ЕС, Эфиопии.

Научная новизна и приоритет разработок автора подтверждена 2 патентами: патент RU №2266755 от 20.04.2004г. «Способ выявления антигена вируса бешенства в формалинизированных пробах головного мозга»; патент RU № 2533802 от 30.08.2013г. «Тримеризованное однодоменное антитело, специфически связывающееся с гликопротеином G вируса бешенства, нейтрализующее вирус бешенства».

Значение для теории и практики. Теоретическая значимость работы заключается в научном обосновании и методологическом решении диагностики бешенства, эпизоотологического мониторинга и оценки эффективности специфической профилактики бешенства. Программно-целевое решение предложенное автором, позволяет оценить современное состояние проблемы бешенства в России и других регионах мира с позиций молекулярной эпизоотологии.

По результатам работы в международной базе данных GenBank депонированы нуклеотидные последовательности генома изолятов и

вакцинных штаммов вируса бешенства, которые могут служить базой для конструирования праймеров для тест-систем диагностики бешенства.

Практическая значимость выполненной работы заключается в использовании научных выводов и методических решений в практике ветеринарных лабораторий по диагностике бешенства животных, в разработке перспективных программ по эпизоотологическому и иммунологическому мониторингу эффективности специфической профилактики бешенства и дальнейшего совершенствования антирабических мероприятий.

Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. На основе полученных автором результатов адаптированы, разработаны и внедрены в практику современные методы диагностики бешенства и дана оценка поствакцинального антирабического иммунитета животных, определена программа международного сотрудничества по профилактике и борьбе с бешенством.

Во ФГБУ «ВНИИЗЖ» разработаны, утверждены и внедрены в практику 13 методических рекомендаций и указаний по диагностике бешенства животных. Утвержден главами правительств и введен в действие «Комплекс совместных действий государств - участников СНГ на период до 2025 г.». Результаты исследований рекомендуется использовать при чтении лекций и проведении практических занятий со студентами биологических и ветеринарных факультетов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе, их достоверность. Научные положения обоснованы, сформулированы на основе анализа отечественной и зарубежной литературы и результатов собственных исследований, подтверждены актами испытаний и внедрений, а также научной документацией, патентами РФ. Достоверность масштабных исследований обеспечивается применением диссертантом современных

молекулярно-генетических, эпизоотологических, вирусологических, морфологических и иммунологических методов, выполненных на оборудовании высокого класса точности. Полученные результаты корректно обработаны стандартными статистическими методами и интерпретированы, что свидетельствует о высоком уровне профессиональной подготовки соискателя. Научные положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации научно обоснованы, апробированы и одобрены на Международных и Всероссийских научных и научно-практических конгрессах, конференциях, семинарах.

Достоверность выполненных результатов не вызывает сомнений.

Содержание диссертационной работы и степень ее завершенности.

Диссертационная работа А.Е. Метлина изложена на 445 страницах компьютерного текста, включает введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Источники, цитируемые в диссертационной работе, всего 481 источника, 347 - зарубежные, 134 - отечественные - отражают современную точку зрения автора на исследуемую проблему. Диссертационная работа иллюстрирована 59 таблицами, 77 рисунками и дополнена 25 приложениями.

Соискателем опубликовано по теме диссертации 65 научных работ в ведущих Российских и международных изданиях с высоким импакт-фактором, что является подтверждением высокой методологической зрелости и компетентности автора, ценности и достоверности его результатов исследований, полученных в ходе подготовки диссертации.

Все работы по теме диссертации, в том числе 16 – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации («Ветеринария»-7; «Вопросы вирусологии»-2; «Ветеринария сегодня»-2; «Ветеринария Кубани»-2; «Ветеринария и кормление»-1; «Ветеринарный врач»-1; «Аграрная наука Евро-Северо-Востока»-1 и 9 публикаций в изданиях, включенных в международные базы данных

научного цитирования (Scopus-8; PubMed-1), 36 публикаций в других научных изданиях.

Основные результаты работы доложены, обсуждены и одобрены на заседаниях ученого совета ФГБУ «ВНИИЗЖ», Международных и Всероссийских научных и научно-практических конгрессах, конференциях, семинарах: г.Осло, Норвегия 2006; г.Париж, Франция 2007; г.Атланта, США 2008; г. Пущино,2008; г. Москва, 2009, 2010, 2018; г.Санкт-Петербург, 2010; г.Чебоксары, 2011; г.Гданьск, Польша, 2012,2013; г.Ашхабад, Туркмения, 2013; г.Ставрополь, Россия 2017; г.Калгари, Канада, 2017; г.Казань, Россия 2018.

Во введении диссертант обосновывает выбор темы и ее актуальность, определяет цели и задачи работы, формулирует ее новизну и практическую значимость.

В разделе « Обзор литературы» дана характеристика возбудителя бешенства, его антигенные и молекулярно-биологические свойства, представлены особенности современной эпизоотологии бешенства в России, Европе и Азии. Диссертант анализирует методы лабораторной диагностики бешенства, научно обосновывает необходимость разработки и внедрения в ветеринарную практику дополнительных методов диагностики и оценки поствакцинального антирабического иммунитета, изучение молекулярно-генетической характеристики изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства. Приведенный обзор отражает современное состояние вопроса о методах диагностики и применении антирабических вакцин для профилактической вакцинации домашних и диких животных, мерах борьбы с бешенством в России и сопредельных странах.

Глубокий анализ данных литературы по изучаемой проблеме, свидетельствует о высоком методологическом уровне диссертанта, что позволило научно обосновать адекватность выбора цели исследования и методически корректного решения поставленных задач.

Раздел диссертационной работы **«Основная часть собственных исследований»**, изложен на 157 страницах текста диссертации и посвящен описанию материалов, методов и результатов исследований, которые представлены в 59 таблицах и 77 рисунках, дополнен 25 приложениями. В разделе «Материалы и методы» диссертант представляет штаммы вируса бешенства, культуры клеток, иммунологические реагенты, методологию применения различных диагностических тест-систем для исследования проб ткани мозга и сыворотки крови животных, приводит список реактивов и оборудования, количество экспериментальных животных.

В разделе **«Результаты собственных исследований и их обсуждение»** приведены данные разработки оригинальной концепции и алгоритма лабораторной диагностики бешенства, основанной на использовании адаптированных классических методов и разработанных методов индикации антигена, генома, выделения вируса и схемы их применения с учетом качества поступившего патологического материала и способа его консервирования.

Диссертантом разработаны и апробированы методы для индикации антигена вируса бешенства в реакции латекс-агглютинации (РАЛ) с чувствительностью 0,1 – 0,125 мкг/мл, «сэндвич»-вариантом иммуноферментного анализа, ПЦР и ПЦР-РВ. Иммуногистохимический (ИГХМ), прямой жидкофазный вариант реакции иммунофлуоресценции (ПТ РИФ) разработаны для исследования проб головного мозга, консервированных формалином и в целях дифференциации бешенства и губкообразной энцефалопатии КРС.

Несомненным достоинством представленной диссертационной работы является разработка и внедрение системы постоянного активного эпизоотологического мониторинга бешенства в регионах России и анализ результатов исследования проб головного мозга различных видов животных. Мониторинговые исследования за период 2011-2018 гг. позволили уточнить

эпизоотическую ситуацию по бешенству и своевременно проводить антирабические ветеринарные мероприятия, увеличить количество обследованных регионов РФ.

Автор на основе большого фактического материала убедительно анализирует эффективность 3-х вариантов реакции нейтрализации: FAVN, RFFIT и микронейтрализации для оценки уровня вируснейтрализующих антирабических антител в сыворотке крови диких, домашних и сельскохозяйственных животных, вакцинированных отечественными и импортными вакцинами, которые адаптированы и внедрены в практику работы референтной лаборатории по бешенству ФГБУ «ВНИИЗЖ»; флюоресцентного метода обнаружения тетрациклина в тканях костей и зубов для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин. Установлено, что в большинстве случаев мероприятия по иммунизации эффективны, а уровень сероконверсии превышает 70%.

Особое внимание заслуживают исследования автора по разработке и внедрению в ветеринарную практику РФ системы межлабораторных сличительных испытаний (МСИ) для подтверждения профессиональной компетентности лабораторий, квалификации специалистов, достоверности лабораторной диагностики бешенства и необходимости проведения корректирующих мероприятий.

С 2009г. по настоящее время ФГБНУ «ВНИИЗЖ» успешно проходит ежегодный международный квалификационный тест по определению антирабических вируснейтрализующих антител, а с 2015г. по диагностике бешенства животных и определению содержания тетрациклина в пробах костной ткани животных.

Значительные результаты получены при изучении молекулярно-биологической характеристики российских и зарубежных полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства и их дифференциации с помощью разработанного метода ОТ-ПЦР и ПЦР-РВ; изучении антигенного

разнообразия полевых изолятов и вакцинных штаммов вируса бешенства с помощью панели моноклональных антител к нуклеокапсиду вируса бешенства. Полученные нуклеотидные последовательности фрагментов гена нуклеопротеина штаммов «RV1904» и «RV1511» депонированы в базу данных GeneBank под номером AY705415 и DQ269940.

В результате изучения 233 полевых изолятов вируса бешенства, выделенных в России, Финляндии и Эстонии, выявлено существование 5-ти антигенных вариантов. Установлено, что 4 варианта определены только на территории РФ, из антигенных вариантов один ранее не выявлялся. Определена молекулярно-биологическая характеристика, филогенетические и эволюционные связи полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории 14 регионов РФ; установлено существование двух основных филогенетических групп (Пан-Евразийской и Кавказской, разделенных Кавказской горной грядой), а также ряда подгрупп, имеющих строгую географическую приуроченность.

По результатам изучения изолятов вируса бешенства из 20 провинций Королевства Камбоджа подтверждено существование репрезентативой филогенетической группы «SEA1», в которую входят изоляты вируса из Камбоджи, Вьетнама, Таиланда и Лаоса, сформированной в 1970-х годах прошлого века. Установлена связь филогенетической группировки вирусов, входящих в сублинию 2-й филогруппы «SEA1» с их уникальными биологическими характеристиками.

С помощью ПЦР-РВ впервые изучены полные нуклеотидные последовательности геномов вакцинных штаммов «РВ-97» (Россия) и «Eth_PV» (Эфиопия), установлены их филогенетические связи и антигенные характеристики, подтверждено отсутствие реверсии аттенуированного вакцинного штамма «РВ-97», используемого для оральной иммунизации диких плотоядных животных против бешенства. Предполагается, что штамм «РВ-97» является прямым потомком оригинального Пастеровского штамма.

Полученные результаты существенно расширяют научные знания в области антигенной вариабельности полевых изолятов вируса бешенства, позволяют восстанавливать происхождение ряда российских и зарубежных вакцинных штаммов вируса бешенства, изучить их родство и филогенетические связи.

К важным научно-практическим результатам следует отнести разработку и внедрение национальных и международных программ по формированию буферной зоны между Россией и Финляндией, странами ЕС. В результате выполнения программы Россия-страны ЕС впервые в Российской Федерации был освоен метод авиационного распространения вакцинных приманок с применением GIS технологий для контроля их распространения, проведен мониторинг эффективности антирабических мероприятий и достигнуто стойкое благополучие по бешенству в Калининградской области.

В результате сотрудничества и оказании научно-технической помощи Эфиопии по внедрению метода роллерного культивирования клеток и вируса бешенства, получен прототип вакцины, отвечающий требованиям МЭБ/ВОЗ и предназначенный для замены тканевого антирабического препарата, применяемого в этой стране.

Автором разработаны критерии планирования, проведения и оценки антирабических мероприятий в хозяйствах различных форм собственности; 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.».

В разделе **«Заключение»** диссертант обобщил основные результаты исследований по изучаемой проблеме. Работа завершается научно обоснованными 14 выводами, которые логически вытекают из результатов проведенных исследований и практических предложений. Автореферат отражает основное содержание работы.

В приложениях к диссертации представлены титульные листы патентов, методических указаний и рекомендаций, утвержденных в установленном порядке.

Принципиальных замечаний по работе нет. Оценивая в целом диссертационную работу А.Е. Метлина положительно, как высокопрофессиональное, методически зрелое научное исследование, в качестве пожеланий отмечаем:

- ✓ Утверждение автора о том, что (стр.313 дис.) в РФ «…не применялись ряд методов лабораторной диагностики бешенства, оценки антирабического иммунитета, оценки поедаемости оральных антирабических вакцин, или требовали на момент проведения исследований по теме данной диссертации адаптации и усовершенствования» не является корректным и в определенной мере носит декларативный характер.
- ✓ Заключение автора о том, что «…методы лабораторной диагностики позволяют поставить окончательный диагноз на бешенство вне зависимости от качества поступившего патологического материала и способа его консервирования» (стр313. дис.) или «….материал любого качества..» носит общий характер, что не подтверждается в полной мере результатами собственных исследований. Автором установлено, что результаты РАЛ зависят от качества проб, срока и условий их хранения (стр.131 дис.), результаты иммуногистохимии - от кратности замораживания и оттаивания проб консервированных формалином (стр.143, табл.24 дис.), результаты прямого жидкофазного варианта реакции иммунофлюоресценции зависят от «……сроков консервирования проб патологического материала….» (стр.148,149 дис.).

- ✓ На рис.15 (стр.42 дис.) автор представляет динамику изменений количества лабораторно подтвержденных случаев бешенства у собак в Камбодже по годам, что не согласуется с текстом работы «…. В Камбодже имело место не менее 810 случаев бешенства человека».
- ✓ В разделе 3.2.1.6. не приведены результаты разработки метода «.. ИФА для определения антител к ВБ…» (стр.162 дис.), применение которого «…позволяет исследовать пробы сывороток крови /трупной жидкости любого качества», а имеется ссылка на приложение 15, представленное только титульной страницей (стр.339 дис.).

Указанные замечания не снижают общей положительной оценки диссертационной работы.

Заключение. Диссертационная работа Артема Евгеньевича Метлина «Комплекс средств и методов диагностики и борьбы с бешенством», является законченной научно-квалификационной работой, выполненной самостоятельно, в которой содержится решение важной проблемы по обеспечению эпизоотологического благополучия по бешенству в Российской Федерации, странах СНГ и других странах мира и имеющей важное социальное, экономическое и практическое значение.

Диссертационная работа имеет внутреннее единство, представляет законченное научное исследование, которое по актуальности выбранной темы, уровню выполненных исследований, полученным результатам соответствует специальности 06.02.02 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология.

Диссертационная работа Артема Евгеньевича Метлина по актуальности, методическому решению поставленных задач, объему экспериментальных исследований, теоретической и практической значимости полученных

результатов полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ №842 от 29.09.2013г., предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора ветеринарных наук.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук, профессор,
Лауреат премии правительства РФ в области науки и техники,
заведующая отделом иммунологии Клюкина Валентина Ивановна
«ФГБНУ ВНИТИБП»
141142, Московская обл., Щелковский р- н,
пос. Биокомбината, «ФГБНУ ВНИТИБП»
Тел.(факс): 8(496) 56-7-32-63 e-mail:
vnitibp@mail.ru

Подпись Клюкиной В.И. заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ«ВНИТИБП», Фролов Юрий Дмитриевич
кандидат биологических наук

6 февраля 2019 года