



Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека
**Федеральное казённое учреждение
здравоохранения «Ставропольский научно-
исследовательский противочумный
институт» Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека**

(ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора)

355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д.13-15

Тел/факс: (865-2) 26-03-12

E-mail: stavnipchi@mail.ru

ОКПО 01897080 ОГРН 1022601949930

ИНН 2636000641 КПП 263601001

от 09.02.2021 № 16-30-09/12-1575-2021

на № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФКУЗ

Ставропольский противочумный

институт Роспотребнадзора,

доктор медицинских наук,

профессор, член-корр. РАН

А.Н. Куличенко

2021 г.



[Отзыв ведущей организации
на диссертацию]

Отзыв

ведущей организации на диссертацию Бибикова Дмитрия Николаевича «Разработка новых методических приемов, культивирования, концентрирования, лиофилизации и методов оценки качества вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.02.03-микробиология

Актуальность темы выполненной работы и ее связь с соответствующими отраслями науки и практической деятельности

Туляремия – зооноз, относится к природно-очаговым особо опасным инфекционным заболеваниям с широким распространением на всей территории Российской Федерации. Природные очаги туляремии обладают исключительной стойкостью, их периодическая активизация подтверждается обнаружением *F. tularensis* в естественных «урбанизированных» биоценозах. Согласно литературным данным за 2005-2019 гг., наибольшее число больных туляремией зарегистрировано в Центральном федеральном округе, на них приходилось 52% от заболеваемости в РФ, в ЮФО выявлено 11% больных, в СКФО более 65% территории занимают природные очаги туляремии. На долю Сибирского федерального округа приходится 10,2% заболевших, удельный вес заболеваемости туляремией в Северо-Западном федеральном округе составил 6,5%, в Дальневосточном – 0,3% от заболеваемости

туляремией в РФ. В 2019 г. эпизоотические проявления туляремийной инфекции выявлены в 51 субъекте Российской Федерации.

В настоящее время в РФ заболеваемость носит спорадический характер, однако можно отметить увеличение заболеваемости и повышение количества выделяемых штаммов *F. tularensis*, циркулирующих в природных очагах.

Благодаря проведению в стране с середины 40-х – начала 50-х годов прошлого века плановой иммунизации населения высокоэффективной вакциной, созданной Н.А. Гайским и Б.Я. Эльбертом, заболеваемость туляремией в России не отмечается высокими цифрами и болеют в основном не привитые люди. Ежегодно в России вакцинируют и ревакцинируют около одного миллиона человек. На сегодняшний день единственной разрешенной к применению в РФ вакциной является вакцина живая туляремийная сухая производства НПО «Микроген» (филиал в Омске). Однако, как указывают эксперты НЦЭСМП, вопрос производства туляремийной вакцины требует решения целого ряда проблем, в том числе введения новой производственной площадки для этого препарата.

В связи со сказанным, диссертационная работа Д.Н. Бибикова, посвященная разработке новых методических приемов культивирования, концентрирования, лиофилизации вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ, несомненно актуальна и имеет определенную практическую значимость.

Цель исследования, связанная с разработкой и совершенствованием биотехнологических этапов получения живой туляремийной вакцины, в полной мере соответствует специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) и 03.02.03-микробиология.

Задачи исследования адекватны поставленной цели и включают ряд этапов, касающихся разработки технологических параметров процедуры глубинного аппаратного культивирования на жидкой питательной среде, способствующих повышению эффективности процесса выращивания биомассы туляремийного микроба, а также комплекса методических приемов концентрирования и лиофилизации бактерий вакцинного штамма *F. tularensis*, а в конечном итоге - лабораторной технологии производства живой туляремийной вакцины.

Задачи работы отражены в положениях, выносимых на защиту, а результаты их решения представлены в заключении и выводах.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна заключается в следующем: экспериментально обоснован качественный и количественный состав жидкой питательной среды на основе гидролизата фибрина из сыворотки крови лошадей, являющегося отходом производства антирабического иммуноглобулина; впервые для производства живой туляремийной вакцины разработан комплекс технологических приемов концентрирования методом

тангенциальной микрофльтрации и сублимации во флаконах биомассы *F. tularensis* 15 НИИЭГ; впервые для определения показателя «жизнеспособности» вакцины применен электрооптический метод, а для определения показателя «подлинность» - иммунохимические и молекулярно-генетические методы контроля.

Результаты диссертационной работы Бибикова Д.Н., изложенные в научных положениях и выводах, являются достаточно обоснованными, достоверными и доказательными, что обеспечивается современным методическим уровнем выполненной работы и большим объемом исследованного материала, адекватной статистической обработкой.

Выводы и научные положения логично вытекают из результатов исследования и являются корректными.

Значимость для науки и практической деятельности полученных соискателем результатов

Диссертационная работа Бибикова Д.Н. несомненно имеет научно-практическое значение в связи получением новых и современных данных, касающихся совершенствования биотехнологии производства бактериальных живых вакцин, в частности, живой туляремийной вакцины.

Основным практически значимым итогом является создание лабораторной технологической линии по выпуску вакцины туляремийной живой сухой, биотехнология изготовления которой изложена в разработанном лабораторном регламенте на производство этого лекарственного препарата.

Кроме этого, диссертант является соавтором трех методических рекомендаций учрежденческого уровня внедрения.

Материалы диссертации используются при проведении занятий со студентами, обучающимися по специальности 19.04.01 – биотехнология в Саратовском ГАУ им. Н.И. Вавилова.

Структура и содержание работы

Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, заключения, выводов, предложений по использованию результатов диссертационного исследования, списка сокращений, списка цитированной литературы, включающего 173 источника, в том числе зарубежных – 46.

Диссертация изложена на 162 страницах компьютерного текста, иллюстрированного 24 рисунками и 30 таблицами. Работа оформлена согласно национальному стандарту РФ «Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления» (ГОСТ 7.0.11-2011).

Исследования выполнены в рамках НИР 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов»; 70-2-17 «Разработка и совершенствование биотехнологий

промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы»; 83-2-20 «Совершенствование этапов производства и методов контроля лечебно-профилактических и диагностических препаратов в РосНИПЧИ «Микроб».

Во введении представлена актуальность и степень разработанности темы исследования, цель и задачи работы, научная новизна, её теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, степень достоверности.

В обзоре литературы проведен обстоятельный анализ технологических аспектов культивирования, концентрирования, лиофилизации и методов контроля физиологического состояния живых культур микроорганизмов. В этой главе обсужден вопрос, касающийся культивирования туляремийного микроба. Обзор литературы написан хорошим литературным языком, содержит подробную информацию по исследуемой проблеме, в обзоре приводятся актуальные работы по данному направлению.

В разделе «Материалы и методы» отражены оборудование и приборы, материалы и биологические объекты, а также разнообразные методы исследования (микробиологические, физико-химические, иммунохимические биологические, молекулярно-генетические). Методы исследования, примененные в работе, подчеркивают ее достаточно высокий и современный методический уровень, а статистическая обработка полученных результатов – их достоверность.

Глава 3 посвящена оптимизации условий глубинного культивирования штамма-продуцента живой туляремийной вакцины *F. tularensis* 15 НИИЭГ и концентрирования биомассы туляремийного микроба. Автором показана возможность применения жидкой питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина, являющегося отходом производства антирабического иммуноглобулина, для глубинного аппаратного культивирования, при этом определены оптимальные технологические параметры реализации данного процесса. Одним из основных итогов исследования в рамках этой главы можно считать разработанную и апробированную в лабораторном производстве современную технологию концентрирования биомассы вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ методом тангенциальной микрофльтрации, позволяющую получать суспензию культуры туляремийного микроба в качестве полуфабриката для изготовления туляремийной вакцины.

В главе 4 изложены результаты экспериментов по совершенствованию режима лиофилизации вакцины, включая подбор защитной среды высушивания. Автором экспериментально обоснованы технологические параметры сублимации клеток туляремийного микроба вакцинного штамма 15 НИИЭГ, позволяющие получать лиофилизат во флаконах, при этом предложены новые вспомогательные вещества в составе ЖТВ.

Результатам апробации новых инструментальных методов контроля на промежуточных этапах производства туляремийной вакцины и ее готовой лекарственной формы посвящена 5 глава диссертации. Автор показал перспективность использования атомно-силовой микроскопии и электрооптического мониторинга жизненных показателей клеток вакцинного штамма туляремийного микроба в режиме реального времени на этапах культивирования, подготовки биомассы и получения лиофилизата. Показана возможность применения иммунохимических и молекулярно-генетических методов контроля культур для определения показателя «подлинность» клеток ЖТВ.

В главе 6 представлены результаты сравнительного изучения, согласно ФС.3.3.1.0019.15, физико-химических и микробиологических свойств ЖТВ, полученной по лабораторной технологии, и коммерческой вакцины. Диссертант убедительно показал одинаковую эффективность вакцин. При этом выявлены преимущества по таким процедурам как получение биомассы *F. tularensis* III генерации при глубинном культивировании, концентрирование культуры *F. tularensis* тангенциальной микрофилтрацией.

Следует отметить, что после каждой главы автор приводит краткое заключение по изложенным в главе материалам. В общем заключении на диссертацию приводятся и анализируются итоги всей работы в целом. В шести выводах автор выделяет наиболее значимые результаты и характеризует перспективы их практического использования, что подтверждает научное и практическое значение диссертации.

Основные результаты исследования представлены на научных конференциях разного уровня и отражены в 15 опубликованных работах, из них 4 – в научных журналах, рекомендуемых ВАК, а также одном патенте РФ на изобретение.

Автореферат диссертации и опубликованные статьи полностью соответствуют содержанию диссертационной работы. Основные результаты диссертации получены лично автором, что подтверждено научными публикациями, методическими указаниями и нормативной документацией.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Материалы диссертации имеют большое практическое значение, так как посвящены разработке и совершенствованию биотехнологии получения живой туляремийной вакцины. Произведенные экспериментальные серии вакцины по разработанному регламенту на производство показали их соответствие требованиям нормативной документации, что позволяет перейти к этапу доклинических испытаний, а затем наладить коммерческий выпуск ЖТВ, в которой нуждается практическое здравоохранение РФ для проведения профилактических прививок по эпидемическим показаниям.

Можно с большой вероятностью утверждать, что многие технические решения, предложенные автором, могут быть использованы в производстве других живых бактериальных вакцин.

Замечания к работе

Принципиальных замечаний, касающихся экспериментальной части диссертации, нет. Однако считаем необходимым сделать уточнения по некоторым позициям, высказанным диссертантом.

Так, задачей 3, по нашему мнению, является не «разработка технологии сублимационного высушивания бактерий вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ», а собственно разработка условий и параметров лиофилизации этой вакцины, так как эта технология разработана давно и широко применяется при производстве бактериальных вакцин.

Вряд ли можно согласиться с автором в том, что им разработан «новый биофармацевтический состав живой туляремийной вакцины» (научная новизна, глава 4, вывод 4), так как новыми в этой композиции являются вспомогательные вещества, а биокомпонент используется с сороковых годов: аттенуированный штамм *F. tularensis* предложен Н.А. Гайским в 1942 г. и после введения в производственный цикл этапа лиофилизации М.М. Файбич и Т.С. Тамариной (1944, 1946) препарат получил название «Сухая живая туляремийная вакцины НИИЭГ».

Приходится отметить, что по тексту диссертации встречаются досадные пунктуационные погрешности.

Однако высказанное не влияет на общую положительную оценку диссертационной работы Д.Н. Бибикова, имеющую важное прикладное значение для практического здравоохранения.

Заключение

Диссертация Бибикова Дмитрия Николаевича «Разработка новых методических приемов культивирования, концентрирования, лиофилизации и методов оценки качества вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ» является законченной научно-квалификационной работой, в которой изложены новые научно-обоснованные технологические решения, связанные с разработкой биотехнологии производства живой туляремийной вакцины – единственного в России препарата для специфической профилактики туляремии, который включен в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям.

По актуальности выбранной темы, объему и методическому уровню проведенных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов данная диссертация и автореферат соответствуют требованиям ВАК РФ «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства РФ от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г.

№ 1024, от 01 октября 2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Дмитрий Николаевич Бибииков заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.02.03-микробиология.

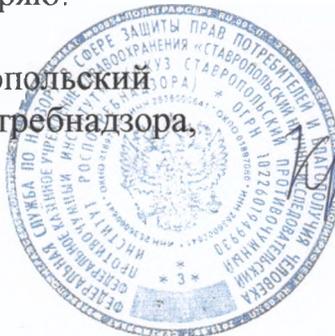
Отзыв обсужден и одобрен на межлабораторной конференции ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, протокол № 7 от 20 августа 2021 года.

Главный научный сотрудник
научно-производственной лаборатории препаратов
для диагностики особо опасных и других инфекций
Федерального казенного учреждения
здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский
противочумный институт» Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека
доктор медицинских наук,
профессор

Ирина Степановна Тюменцева

Подпись Тюменцевой И.С. заверяю:

Ученый секретарь ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт Роспотребнадзора,
кандидат медицинских наук



Т.Л. Красовская

30.08.2021 г.