



Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека

«УТВЕРЖДАЮ»

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



Директор ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт
Роспотребнадзора

А.Н. Куличенко

2023 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального казённого учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической ценности диссертации ДУРАКОВОЙ Оксаны Сергеевны на тему: «Совершенствование методических подходов для оценки специфической активности антигенов холерной химической вакцины», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология, 1.5.6. Биотехнология

Актуальность избранной темы. Холера остается одной из серьезных проблем мирового здравоохранения в связи с эпидемиями на различных континентах, затрагивающих в основном страны Азии, Африки и Америки. Неблагоприятный прогноз по холере в мире, обусловленный продолжающимися масштабными эпидемиями и крупными вспышками, определяет неблагоприятный прогноз по холере для Российской Федерации в плане угрозы заносов инфекции в результате интенсивной миграции населения, в том числе из стран, неблагополучных по холере. В системе противозидемических мероприятий по борьбе с холерой большое значение придается профилактической вакцинации.

В Российской Федерации зарегистрирована и выпускается вакцина холерная бивалентная химическая производства ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Ее специфическими компонентами являются: холероген-анатоксин (ХА) и О-антигены (О-АГ), полученные из инактивированных формалином бульонных культур *Vibrio (V.) cholerae* O1 классического биовара серовара Инаба и *V. cholerae* серовара Огава. В настоящее время вакцина включена в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям (приказ



Минздрава России от 21.03.2014 № 125н (ред. от 03.02.2021) «Об утверждении национального календаря профилактических прививок и календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям»). Отмечается, что российская холерная вакцина не уступает по эффективности зарубежным, кроме того, является уникальным по составу действующих веществ, форме выпуска и кратности иммунизации современным профилактическим препаратом против холеры.

Современный уровень биотехнологических производств лекарственных препаратов требует использования методов контроля, позволяющих получать достоверную характеристику вакцин. При производстве холерной вакцины используют методы проверки специфической активности компонентов на лабораторных животных. Активность холерного токсина тестируется методом кожной пробы по Крейгу, количество холерогена-анатоксина в готовой лекарственной форме определяется по специфической активности антигена в реакции анатоксинсвязывания на кроликах. Эксперименты с использованием животных являются трудоемкими и дорогостоящими. Всемирная организация здравоохранения, международное медико-биологическое общество настоятельно рекомендуют и поддерживают использование альтернативных моделей и методов. Использование при контроле вакцины методов *in vitro* снимает целый ряд этических проблем, возникающих при использовании большой группы животных. Кроме того, что эксперименты на животных не всегда обеспечивают результаты, которые можно экстраполировать на людей.

В соответствии с нормативно-технической документацией на производство вакцины холерной бивалентной контроль специфической активности О-антигена осуществляют с помощью реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и реакции диффузионной преципитации (РДП). Однако эти реакции не отвечает требованиям экспрессности и высокой чувствительности, а также обеспечивают оценку активности общей фракции О-антигена независимо от серовара.

Важную роль в получении качественного продукта микробного синтеза играют питательные среды, эффективность которых оценивается по выходу биомассы. Вопрос стабильно высокой продукции антигенов на используемых питательных средах чрезвычайно важен и требует дополнительных критериев оценки эффективности культивирования, таких как выход «целевого продукта» – антигенных компонентов.

Поскольку в настоящее время актуально стремление к минимизации времени, упрощению методики и повышению чувствительности анализа при контроле показателей, являются актуальными усовершенствование методов контроля стабильности штаммов-продуцентов и специфической активности антигенов *V. cholerae* при производстве холерной химической вакцины, направленные на максимальное сокращение количества животных и замену их альтернативными моделями и тест-системами в условиях *in vitro*, удовлетворяющими требованиям международных стандартов и позволяющими получать вакцину высокого качества.



Связь работы с планами соответствующих отраслей науки. Работа выполнена в рамках отраслевых НИР: 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов» (номер госрегистрации 01201457722); 70-2-17 «Разработка и совершенствование биотехнологий промышленного выпуска иммунобиологических средств профилактики и диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы» (номер госрегистрации АААА-А16-116112810063-4), 83-2-20 «Совершенствование этапов производства и методов контроля лечебно-профилактических и диагностических препаратов» (номер госрегистрации АААА-А20-120012090035-1); 89-2-21 «Научно-прикладные аспекты производства и совершенствования препаратов для иммунопрофилактики и диагностики опасных бактериальных и вирусных инфекций» (номер госрегистрации АААА-А21-121012090066-4).

Новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Результаты диссертационного исследования, выводы и рекомендации характеризуются существенной новизной. Автором экспериментально обоснована возможность замены методов контроля холерного токсина с использованием лабораторных животных на информативные иммунохимические методы *in vitro* (иммуноферментный анализ с использованием GM₁-ганглиозидов, дот-иммуноанализ с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом, радиальный пассивный иммунный гемолиз) и установлена корреляция между результатами определения активности холерного токсина и О-антигена *in vitro* и *in vivo* (коэффициент корреляции от 0,8 до 0,96). Опытным путем доказана возможность использования перевиваемой клеточной линии СНО-К1 для определения специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина в производстве холерной химической вакцины (коэффициент корреляции между методами контроля *in vitro* и *in vivo* от 0,82 до 0,93).

Доказана стабильность культурально-морфологических свойств штаммов-продуцентов *V. cholerae* 569В и М-41 с применением методов атомно-силовой и трансмиссионной электронной микроскопии. Методом полногеномного секвенирования показана стабильность нуклеотидных последовательностей полного генома штаммов-продуцентов на всех стадиях производственного цикла.

Установлена стабильность повышенной продукции протективных антигенов *V. cholerae* при культивировании на питательной среде на основе сухого ферментативного гидролизата казеина. Впервые разработана оригинальная методика последовательного применения методов ультрафильтрации, ЛПС-адсорбции и гель-хроматографии, которая позволяет получать препарат холерного токсина, соответствующий требованиям к СОП «Тест-токсин холерный». Приоритет исследований подтвержден патентом РФ



2799574 «Способ получения холерного токсина для контроля производства холерной химической вакцины» (опубликован 06.07.2023, бюл. № 19).

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором диссертации. Полученные знания открывают перспективу для исследования научных и практических направлений совершенствования этапов производства и замены методов контроля *in vitro* на альтернативные методы *in vivo* при производстве других вакцин.

Усовершенствованы методы и алгоритм их применения для определения стабильности биологических свойств вакцинного штамма холерного вибриона, а так же контроля холерного токсина, холерогена-анатоксина и О-антигена на этапах производства холерной химической вакцины (дот-иммуноанализ с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом; тестов на перевиваемой клеточной линии СНО-К1, методы полимеразной цепной реакции, радиального пассивного иммунного гемолиза, иммуноферментного анализа с использованием GM₁-ганглиозидов).

Стандартизирован этап культивирования штаммов *V. cholerae* – продуцентов протективных антигенов за счет перехода на использование сухих компонентов питательных сред.

В Государственную коллекцию патогенных бактерий (ГКПБ) ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора депонированы два штамма *V. cholerae* O1 классического биовара KM2129 (569В) серовара Инаба и *V. cholerae* O1 классического биовара KM2130 (M-41) серовара Огава, как производственные линии природных штаммов, используемых для изготовления иммунобиологического лекарственного препарата «Вакцина холерная бивалентная химическая» (05.07.2022) – федеральный уровень внедрения.

Результаты исследований использовались при разработке промышленных регламентов № ПР 01898109-65-22/1000, № ПР 01898109-65-22/10000 на производство «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой» и внедрены в производство – федеральный уровень внедрения.

Разработаны методические рекомендации учрежденческого уровня внедрения: «Методические рекомендации по определению активности холерного токсина в процессе производства холерной химической вакцины методами иммуноферментного анализа и радиального пассивного иммунного гемолиза» (утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 6 от 22.12.2016); «Методические рекомендации по применению ДОТ-иммуноанализа для определения специфической активности антигенов в производстве холерной вакцины» (утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 5 от 19.12.2017); «Методические рекомендации по использованию культуры клеток для анализа активности холерного токсина на этапах производства компонентов холерной химической вакцины»



(утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 8 от 7.12.2018); «Методические рекомендации по определению специфической активности компонентов холерной вакцины с использованием культуры клеток» (утверждены директором РосНИПЧИ «Микроб», протокол № 4 от 8.11.2019) (акт внедрения от 14.06.2023).

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений. Основные положения диссертации и выводы соответствуют задачам исследования и базируются на авторских данных, изложенных в контексте современных представлений о биотехнологии вакцинных препаратов, вводимых людям, и методов их контроля, предъявляемых к ним.

Полученные данные представляются убедительными, а научные положения и выводы, сформулированные в диссертации, являются вполне обоснованными. Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством экспериментов и проведением исследовательских работ современными методами, в том числе – статистическими.

Оценка структуры и содержания диссертации, её завершенность в целом, замечания по оформлению. Диссертация написана по традиционному плану и состоит из введения, трёх разделов обзора литературы, собственных исследований, включающих материалы и методы, три главы экспериментальных исследований, заключения, выводов, рекомендаций по использованию результатов диссертационного исследования, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, двух приложений и списка публикаций автора.

Рукопись диссертационной работы изложена на 177 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 26 рисунками и 21 таблицей. Следует отметить высокое качество рисунков. Список литературы включает 235 источников, в том числе 99 отечественных и 136 зарубежных, за последние 10 лет – 139 источников (59,1 %).

В целом, диссертация производит благоприятное впечатление своей завершенностью, поскольку все поставленные задачи решены, цель исследования достигнута, а также системностью подхода и логической последовательностью решения задач, информативностью содержания, хорошей иллюстрированностью рисунками и таблицами. Заключение диссертации подводит итоги работы и подтверждает достижение цели исследования. Выводы отражают полученные результаты, аргументированы и научны. Работа написана хорошим языком, текст достаточно выверен.

Автореферат диссертации полностью соответствует основным положениям диссертации.

Основные результаты диссертационных исследований изложены в 26 опубликованных печатных работах, из них 9 – в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных



ВАК Министерства образования и науки России», 1 – патент РФ на изобретение.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспортам специальностей 1.5.11. Микробиология, 1.5.6. Биотехнология.

Рекомендации по использованию результатов диссертационного исследования. Разработанные автором новые методические подходы для определения специфической активности основных активных компонентов вакцины и стабильного сохранения исходных параметров штаммами-продуцентами позволит оптимизировать процесс производства «Вакцины холерной бивалентной, таблеток, покрытых кишечнорастворимой оболочкой», уменьшить временные и материальные затраты. Предложенный комплекс методов *in vitro* может быть использован при разработке, производстве и контроле качества холерных вакцин.

Принципиальных замечаний, касающихся экспериментальной части диссертации и ее оформления, нет.

Заключение

о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

Диссертация ДУРАКОВОЙ Оксаны Сергеевны на тему: «Совершенствование методических подходов для оценки специфической активности антигенов холерной химической вакцины» выполнена на актуальную тему и является самостоятельной и завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится комплексное решение задачи совершенствования контроля качества холерной химической вакцины, соответствующим требованиям международных стандартов производства вакцинных препаратов.

Диссертационная работа «Совершенствование методических подходов для оценки специфической активности антигенов холерной химической вакцины» отвечает критериям п. 9, 10, 11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013, в редакции постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 № 1690, от 26.01.2023 № 101, от 18.03.2023 № 415 предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Дуракова Оксана Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология, 1.5.6. Биотехнология.

Отзыв обсужден на межлабораторной конференции научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и



других инфекций, научно-производственной лаборатории чумных вакцин и лаборатории питательных сред для культивирования микроорганизмов I-IV групп патогенности ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, 25.08.2023, протокол № 1.

Заведующий лабораторией подготовки специалистов Федерального казённого учреждения здравоохранения «Ставропольский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 355035, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15, Тел. /факс: (865 2) 26-40-05, e-mail: stavnipchi@mail.ru

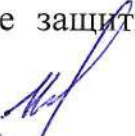
доктор медицинских наук  Татьяна Викторовна Таран

Заведующий научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Федерального казённого учреждения здравоохранения «Ставропольский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 355035, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15, Тел. /факс: (865 2) 23-01-73 (доб. 350), e-mail: stavnipchi@mail.ru

кандидат медицинских наук  Диана Владимировна Русанова

Подпись доктора медицинских наук Таран Татьяны Викторовны и кандидата медицинских наук Русановой Дианы Владимировны, заверяю:

Начальник отдела кадров Федерального казённого учреждения здравоохранения «Ставропольский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

 Садагет Мамед кызы Исмаилова
Адрес: 355035, Российская Федерация, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15,
Тел. /факс: (865 2) 26-40-05, e-mail: stavnipchi@mail.ru

