

ОТЗЫВ
ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
Кафтыревой Лидии Алексеевны
на диссертацию Дураковой Оксаны Сергеевны
**«СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ
ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИГЕНОВ
ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ»**
представленную на соискание степени кандидата биологических наук по
специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы исследования

Холера – острая диарейная инфекция, способная к широкому эпидемическому распространению. В настоящее время в мире наблюдается активный рост заболеваемости холерой, затрагивающий даже те страны, в которых эта болезнь не встречалась десятилетиями. По данным ВОЗ с начала 2023 г. массовые вспышки холеры зафиксированы в 25 странах: и «учитывая растущее число вспышек и их географическое распространение, а также нехватку вакцин и других ресурсов, ВОЗ продолжает расценивать риск на глобальном уровне как очень высокий». Глобальная целевая группа по борьбе с холерой в рамках деятельности ВОЗ в 2017 г. представила стратегию «Ликвидация холеры: дорожная карта до 2030 г.», которая предусматривает сокращение летальности от этого заболевания на 90 % и устранение холеры не менее чем в 20 странах к 2030 г. Важным аспектом в комплексном подходе в борьбе с холерой является применение холерных вакцин.

В Российской Федерации вакцинация против холеры включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям (Приказ Министерства здравоохранения РФ от 6 декабря 2021 г. N 1122н). Единственным препаратом для профилактики холеры, зарегистрированным на территории РФ, является «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой», производства ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора. Совершенствование биотехнологии производства, в том числе, методических приемов оценки качества компонентов и готовой лекарственной формы является важным и

актуальным направлением научных исследований. В соответствии с рекомендациями ВОЗ, при производстве иммунобиологических лекарственных препаратов актуальной задачей является разработка стандартных методов контроля специфической активности антигенов *in vitro*, сопоставимых с методами *in vivo*, которые используются для контроля компонентов вакцин.

Диссертационная работа Дураковой Оксаны Сергеевны посвящена разработке методических подходов для оценки специфической активности антигенов *Vibrio cholerae* в условиях цикла производства холерной химической вакцины.

Целью работы является формирование методических подходов к разработке и применению методов *in vitro* для контроля специфической активности основных антигенов и поиск дополнительных информативных критериев доказательства стабильного сохранения исходных параметров штаммами-продуцентами.

Научная новизна диссертационной работы состоит в экспериментальном обосновании возможности замены методов контроля холерного токсина на лабораторных животных на информативные современные иммунохимические методы *in vitro* (иммуноферментный анализ с использованием GM₁-ганглиозидов, дот-иммуноанализ, используя конъюгат на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом, радиальный пассивный иммунный гемолиз); установлении возможности использования перевиваемой клеточной линии СНО-К1 для определения специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина в производстве холерной химической вакцины; выявления стабильности культурально-морфологических свойств штаммов вакцинных штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 методами атомно-силовой и трансмиссионной электронной микроскопии, а также стабильности нуклеотидных последовательностей геномов вакцинных штаммов *V. cholerae* 569В и *V. cholerae* М-41 на всех стадиях производственного цикла методом полногеномного секвенирования; установлении высокой стабильности продукции протективных антигенов

вакцинных штаммов *V. cholerae* при культивировании на питательной среде на основе сухого ферментативного гидролизата казеина; разработке оригинальной методики последовательного применения методов ультрафильтрации, ЛПС-адсорбции и гель-хроматографии, которая позволяет получать препарат холерного токсина, соответствующий требованиям СОП «Тест-токсин холерный».

Приоритет исследований подтвержден патентом РФ 2799574 «Способ получения холерного токсина для контроля производства холерной химической вакцины» (опубликован 06.07.2023 г., бюллетень № 19).

Практическая значимость исследования подтверждается внедрением результатов работы в практику производства холерной химической вакцины (промышленные регламенты № ПР 01898109-65-22/1000, № ПР 01898109-65-22/10000), разработкой четырех методических рекомендаций, одобренных Ученым Советом и утвержденных директором ФКУН противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Оценка содержания, степени завершенности диссертационной работы и качества её оформления. Диссертация написана по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений, условных обозначений и цитируемой литературы. Диссертация изложена на 177 страницах компьютерного текста. Список литературы содержит 235 источника, из которых 136 зарубежных.

Диссертация иллюстрирована 26 рисунками и 21 таблицей.

Во введении диссертации четко обоснованы актуальность исследований; научная новизна; теоритическая и практическая значимость; положения, выносимые на защиту; сведения об апробации и публикациях. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах, отвечающих цели и задачам исследования.

Глава «Обзор литературы» состоит из двух разделов, в которых освещены современные холерные вакцины, их активные компоненты и методы контроля,

требования к стабильности штаммов-продуцентов. Изучен вопрос о необходимости разработки новых методов контроля специфической активности антигенов и стабильности штаммов-продуцентов. Критический анализ литературных источников свидетельствует о широком кругозоре и компетентности Дураковой О.С. в изучаемых вопросах.

В **Главе** «Материалы и методы» изложены методические приемы, с помощью которых решены поставленные задачи. В работе были использованы 15 штаммов *V. cholerae* с описанием основных материалов и условий проведения экспериментальных исследований. Используемые методические приемы (микробиологические, биотехнологические, биологические, иммунохимические, биохимические, молекулярно-генетические и статистические методы) соответствуют современному уровню.

Экспериментальные данные статистически обработаны и вместе с обсуждением представлены в 3-х главах собственных исследований. Полученные соискателем результаты основаны на доказательном фактическом материале, критически оценены на современном научном уровне и отвечают требованиям новизны, теоретической и практической значимости

В **Главе 3** изложены исследования по экспериментальному обоснованию применения комплекса методов «*in vitro*» для контроля специфической активности антигенов на этапах производства холерной химической вакцины. Показана возможность применения дот-иммуноанализа, с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом, радиального пассивного иммунного гемолиза, перевиваемой клеточной культуры для определения активности основных специфических антигенов, входящих в состав холерной химической вакцины; а также разработан алгоритм использования методов *in vitro* и *in vivo* для контроля специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина на этапах производства холерной вакцины.

Глава 4 посвящена разработке методического подхода к контролю стабильности свойств штаммов *Vibrio cholerae* – продуцентов активных

компонентов вакцины. С использованием комплекса методов (атомно-силовой и трансмиссионной электронной микроскопии, полногеномного секвенирования, дот-иммуноанализа, радиального пассивного иммунного гемолиза) доказана стабильность свойств штаммов *V.cholerae* М-41 и 569В на всех этапах культивирования и доказана стабильность повышенной продукции антигенов данных штаммов при культивировании на питательной среде на основе сухого гидролизата казеина.

В Главе 5 оптимизирован способ получения холерного токсина для контроля производства холерной химической вакцины. В результате проведенных исследований был разработан новый способ выделения холерного токсина, включающий применение ультрафильтрации, гель-хроматографии и определены условия максимальной продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* при культивировании в условиях биореактора.

В заключении обобщены собственные исследования, представлен анализ полученных экспериментальных данных и возможные пути их использования, а также перспективы дальнейших исследований.

Выводы соответствуют поставленным задачам, аргументированы и отражают результаты работы.

По теме диссертации опубликовано 26 научных работ, из которых 9 статей в изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки», 1 патент на изобретение, 16 публикаций в сборниках и материалах конференций и иных изданиях. Имеющиеся публикации с достаточной полнотой отражают содержание диссертации.

Ценность научных работ соискателя ученой степени, в которых достаточно полно изложены материалы диссертации, является несомненной для совершенствования технологии производства и развития системы контроля качества холерной химической вакцины.

Автореферат, изложенный на 24 страницах, полностью соответствует содержанию диссертации.

Замечаний по диссертационной работе нет.

При знакомстве с работой к Дураковой Оксане Сергеевне имеются следующие вопросы:

1) Результаты каких, проведенных Вами, исследований в настоящее время используют в производстве холерной вакцины?

2) Какие преимущества имеет разработанный алгоритм использования методов для контроля специфической активности холерного токсина и холероген-анатоксина по сравнению с тем, который использовался ранее?

3) Вами показана перспективность применения рекомбинантного штамма *V. cholerae* КМ68 для получения холерного токсина. В результате формоловой детоксикации из холерного токсина получают один из основных компонентов холерной вакцины – холероген-анатоксин. Вы изучали возможность использования этого рекомбинантного штамма в качестве производственного?

Заключение

Представленная диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой в результате проведенных исследований содержится решение научной задачи по разработке и применению методических подходов *in vitro* для контроля специфической активности основных антигенов и стабильности штаммов-продуцентов холерной химической вакцины, имеющей существенное значение для обеспечения специфической профилактики холеры в России.

Полученные автором результаты достоверны, выводы являются четкими, аргументированными и обоснованными. Работа базируется на достаточном числе исходных данных, написана грамотно, аккуратно оформлена. Диссертационная работа «Совершенствование методических подходов для оценки специфической активности антигенов холерной химической вакцины» отвечает критериям п. 9, 10, 11, 13, 14, 16 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от

24.09.2013 г., в редакции постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 1024 от 28.08.2017 г., № 1168 от 01.10.2018 г., № 751 от 26.05.2020 г., № 426 от 20.03.2021 г., № 1539 от 11.09.2021 г., № 1690 от 26.09.2022 г. и № 101 от 26.01.2023 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Дуракова Оксана Сергеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией кишечных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

доктор медицинских наук

Кафтырева Лидия Алексеевна

Подпись Кафтыревой Л.А. заверяю:

Начальник отдела кадров Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14, тел.: 8 (812) 644-63-21, email: ok@pasteurorg.ru)

Чебакова Лариса Владимировна

