

Не вызывает сомнения, что успех проводимой постэкспозиционной профилактики бешенства у людей во многом зависит от качества антирабических

препаратов, соответствия показателей качества требованиям к тому или иному показателю, методам и методикам их определения.

Одним из основных показателей качества применяемого с целью создания пассивного иммунитета антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади является специфическая активность, определяемая высокочувствительным методом в реакции нейтрализации на белых мышах в течение 14 суток и требующая особых условий содержания животных. Это, безусловно, создает определенные сложности производителям антирабического иммуноглобулина.

Принятая в 1986 году Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых в научных целях (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, Страсбург, 18 марта 1986 г.), рекомендовала, по возможности, использовать вместо животных методы *in vitro*. Задача достаточно сложная по доказательству сопоставимости методов *in vivo* и *in vitro*, специфичности, воспроизводимости.

Применяемые в настоящее время методы *in vitro* определения вируснейтрализующих антител основаны на различных принципах – иммуноферментном анализе и его модификациях, обнаружении вируса бешенства в культуре клеток с использованием флуоресцирующих антител (RFIIT и FAVN), отличающимися используемыми клеточными культурами, штаммами вируса, схемой проведения анализа и т.д.

Все эти методы используются для выявления вируснейтрализующих антител в сыворотках крови животных и людей.

Поставленная Гавриловой Ю.К. задача разработки метода контроля содержания антирабических антител методом *in vitro* при производстве и контроле антирабического иммуноглобулина (показатель «специфическая активность») позволит сократить сроки испытания по данному показателю с 14 до 3 суток, отказаться от использования животных, сократить сроки выпуска в гражданский оборот крайне необходимого препарата.

Все эти факторы свидетельствуют об актуальности выполненной диссертационной работы.

2. Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертационной работе Ю.К. Гавриловой, обусловлены, прежде всего, поставленными соискателем задачами.

Проведенный анализ современных методов определения вируснейтрализующих антител в сыворотках крови животных и людей позволил автору оценить возможность разработки метода *in vitro* с использованием клеточных культур и вируса бешенства штамм «Москва 3253_{vero}» с целью внедрения его для контрольных испытаний по показателю «Специфическая активность» на производстве и в готовом препарате антирабического иммуноглобулина. Соискателем последовательно были проведены исследования по выделению рибонуклеопротеина из цитоплазмы культуры клеток Vero, инфицированных вирусом бешенства штамм «Москва 3253_{vero}», с последующей его модификацией. С целью максимального выхода рибонуклеопротеина для культивирования вируса на клетках Vero Ю.К. Гавриловой обосновано использование питательной среды на основе ферментативного гидролиза фибрина.

Одной из важных задач исследования являлось получение флуоресцирующих конъюгатов на основе антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства штамм «Москва 3253_{vero}», для чего необходимо было получение сывороток с высоким содержанием антител к рибонуклеопротеину. Соискателем была отработана схема иммунизации кроликов раствором рибонуклеопротеина с применением в качестве адъюванта коллоидного золота, позволившая получить сыворотки с высоким содержанием антител. На основе полученных сывороток с высоким содержанием антител к рибонуклеопротеину Ю.К. Гавриловой были получены флуоресцирующие конъюгаты, предназначенные для обнаружения вируса бешенства в клеточных культурах с пределом чувствительности от 1:80 до 1:250.

В процессе выполняемых исследований автором были установлены условия использования клеточных культур Vero и ВНК-21 с целью детекции антигена вируса бешенства с применением люминесцентной микроскопии, при этом был сделан вывод о том, что предпочтительной для применения в реакции нейтрализации

вируса бешенства *in vitro* является культура клеток Vero. Было показано, что оптимальная доза вируса для определения антирабических антител в реакции вируснейтрализации *in vitro* должна находиться в интервале 100–300 ID₅₀/0,05 мл, а период нейтрализации (появление фокусов флуоресценции), не влияющий на результат реакции нейтрализации *in vitro*, составлял 40 мин.

Внедрение в практику контроля качества нового метода *in vitro* предполагает проведение испытания со стандартным образцом, отсутствие которого требует разработки и аттестации стандартного образца предприятия. Проведенные автором исследования позволили определить одну из серий антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади в качестве стандартного образца предприятия, провести его аттестацию в сравнении с антирабическим иммуноглобулином из сыворотки крови человека, соответствующим требованиям Европейской фармакопеи, для применения в исследованиях *in vitro*.

Автором работы было установлено значение специфической активности для кандидата в стандартный образец предприятия активности антирабического иммуноглобулина, показана стабильность разработанного стандартного образца предприятия специфической активности в течение всего срока годности – 1,5 года. Разработанный стандартный образец внесен в реестр разрешенных к применению при контроле качества ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Важным доказательством возможности использования разработанного метода *in vitro* при определении показателя «Специфическая активность» явился проведенный Ю.К. Гавриловой сравнительный анализ этого показателя в антирабических сыворотках и антирабическом иммуноглобулине методами *in vivo* и *in vitro*, показавший наличие высокой корреляции между результатами обоих тестов при уровне значимости > 95%.

3. Обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием широкого спектра современных методов исследования и

материалов: клеточных культур, штаммов вируса бешенства, антирабических сывороток и антирабического иммуноглобулина, выделенного рибонуклеопротеина, флуоресцирующих конъюгатов и др.

Достоверность результатов подтверждается значительным объемом исследований и полученных результатов в ходе исследования, их статистической обработкой.

Положения и выводы обоснованы выполненными поставленными задачами, важнейшей из которых явилась разработка метода контроля уровня вируснейтрализующих антител в клеточных культурах и внедрение метода *in vitro* на производстве и контроле качества антирабического иммуноглобулина.

Поставленные задачи выполнены полностью. Научные положения и выводы аргументированы и достоверны. Научно-практические рекомендации заслуживают положительной оценки.

4. Теоретическая и практическая значимость полученных результатов

Полученные в ходе выполнения диссертационной работы результаты имеют теоретическое и практическое значение.

Прежде всего, это определяется тем, что использованы и обоснованы новые методические приемы определения показателя «Специфическая активность», направленные на совершенствование методов контроля качества антирабического иммуноглобулина на этапах производства и выпуска готового продукта в гражданский оборот.

Главным практическим результатом диссертационной работы следует признать разработку метода *in vitro* контроля специфической активности как антирабических сывороток, так и готового препарата антирабического иммуноглобулина, что значительно уменьшает сроки контроля по данному показателю с 14 до 3 суток и позволяет отказаться от использования метода *in vivo* на лабораторных животных.

Сравнительные исследования методов определения специфической активности *in vitro* и *in vivo* подтвердили высокую корреляцию обоих методов, что позволяет в дальнейшем использовать при контроле качества готового препарата метод *in vitro*.

Использование питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина дает практические возможности для культивирования различных клеточных культур с целью получения рибонуклеопротеина и применения его в технологиях получения диагностических конъюгатов.

Впервые разработан и аттестован стандартный образец предприятия специфической активности антирабического иммуноглобулина для применения в реакции нейтрализации вируса бешенства на клеточной культуре, что способствует внедрению разработанного метода *in vitro* в процессе производства антирабического иммуноглобулина и получения достоверных результатов.

На основании полученных результатов составлены и утверждены 3 методические рекомендации учрежденческого уровня, опубликовано 16 научных работ, из них 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК, получен 1 патент на изобретение.

Материалы диссертации представлялись на международных и всероссийских научных конференциях.

5. Личный вклад автора

Диссертационная работа и автореферат являются самостоятельным научным трудом Ю.К. Гавриловой. Ей лично выполнен обзор имеющихся данных литературы отечественных и зарубежных источников по теме диссертации в соответствии с целью и поставленными задачами, проведение экспериментов и интерпретация полученных результатов.

Диссертация и автореферат написаны лично соискателем, полученные результаты и их анализ свидетельствуют о решении поставленных задач и достижении заявленной цели.

6. Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные результаты и выводы диссертационной работы Ю.К. Гавриловой могут быть использованы на производстве антирабического иммуноглобулина и в контрольных лабораториях при испытании антирабического иммуноглобулина по показателю «Специфическая активность» методом *in vitro*.

Для выявления антигена вируса бешенства доказана возможность использования флуоресцирующих конъюгатов антител к рибонуклеопротеину вируса бешенства.

Доказана возможность использования разработанного метода *in vitro* и разработанного стандартного образца предприятия для определения вируснейтрализующих антител в антирабических сыворотках и антирабическом иммуноглобулине.

7. Оформление работы

Диссертационная работа выполнена в традиционном изложении на высоком научном и методическом уровне.

Структура работы содержит все необходимые разделы и главы, позволяющие представить четкую логику проведенных исследований.

Цели и задачи диссертационной работы четко сформулированы и соответствуют объему проведенных исследований. Таблицы и рисунки, приведенные в работе, полностью отображают результаты проведенных исследований.

Выводы работы обоснованы и в полной мере отражают результаты проведенных исследований.

Основные положения, выдвинутые на защиту, аргументированы, научно доказаны и соответствуют целям и задачам работы.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе нет, имеющиеся отдельные замечаний не оказывают существенного влияния на общую положительную оценку выполненного научного исследования.

8. Заключение

Диссертационная работа Юлии Кирилловны Гавриловой «Разработка метода контроля уровня вируснейтрализующих антител на модели клеточных культур в производстве антирабического иммуноглобулина», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология, является законченной и самостоятельной научной работой.

В результате проведенных исследований разработан и предложен метод *in vitro* на модели клеточных культур определения уровня вируснейтрализующих антител в антирабических сыворотках и препарате антирабического иммуноглобулина. Основные этапы работы, выводы и результаты представлены в автореферате. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

По актуальности темы, новизне полученных результатов, научной и практической значимости, диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Гаврилова Юлия Кирилловна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Отзыв на диссертационную работу Гавриловой Ю.К. «Разработка метода контроля уровня вируснейтрализующих антител на модели клеточных культур в производстве антирабического иммуноглобулина» обсужден и утвержден на заседании секции № 3 Ученого совета (Протокол № 2 от 21 марта 2022 г.).

Начальник Испытательного центра
экспертизы качества МИБП ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздрава России, доктор медицинских наук
по специальностям 03.02.02 – вирусология,
14.02.02 – эпидемиология
профессор

Мовсесянц Арташес Авакович

«21» марта 2022 г.

Подпись доктора мед. наук, профессора А.А. Мовсисянца заверяю

Ученый секретарь Ученого совета

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России,

кандидат медицинских наук

(специальность 03.02.03 – микробиология),

старший научный сотрудник

«21» марта 2022



В.И. Климов

Контактные данные:

федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Адрес: 127051, г. Москва, Петровский б-р, д. 8, стр. 2.

Тел: (499) 190-18-18, (495) 625-43-48, (495) 625-43-42

E-mail: Movsesyant@expmed.ru.

Сайт: [http:// www.regmed.ru](http://www.regmed.ru).