

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

комиссии диссертационного совета 64.1.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора по кандидатской диссертации Дураковой Оксаны

Сергеевны на тему: «Совершенствование методических подходов для оценки специфической активности антигенов холерной химической вакцины», выполненной в Федеральном казенном учреждении науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям

1.5.11. Микробиология и 1.5.6. Биотехнология

**Соответствие соискателя ученой степени требованиям, необходимым для допуска к защите.** Дуракова О.С. соответствует требованиям, изложенным в п. 3 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г.: имеет высшее образование, подтвержденное дипломом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» с присуждением квалификации «Эколог» по специальности «Экология», выполнила диссертационную работу на базе Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» давшего положительное заключение по данной диссертации; сдала кандидатские экзамены, о чем предоставлена справка.

**Соответствие диссертации специальности, по которой совету предоставлено право защиты.** Диссертация Дураковой О.С. выполнена под руководством кандидата медицинских наук, доцента Громовой Ольги Викторовны (специальность 1.5.4. Биохимия) и кандидата биологических наук Волох Оксаны Александровны (специальность 1.5.11. Микробиология), на современном научно-методическом уровне с использованием микробиологических, биотехнологических, биологических, иммунохимических, биохимических, молекулярно-генетических и статистических методов исследования. Члены комиссии считают, что диссертация Дураковой О.С. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, отрасли науки «Биологические науки», паспорту специальности 1.5.11. Микробиология по пунктам 5 – «Физиология и метаболизм микроорганизмов, в том числе физиология и физико-химические параметры роста

микроорганизмов»; 6 – «Продукция биологически активных веществ микроорганизмами»; 12 – «Патогенные микроорганизмы, факторы вирулентности и патогенности» и паспорту специальности 1.5.6. Биотехнология по пунктам 2 – «Генетические, селекционные и иммунологические исследования в прикладной микробиологии, вирусологии и цитологии. Технологии культивирования микроорганизмов-продуцентов, культур тканей и клеток растений и животных»; 9 – «Медицинские биотехнологии. Создание лекарственных форм, комбинированных препаратов и биологически активных препаратов. Технологии производства вакцин. Средства диагностики вирусных, бактериальных и грибных болезней».

**Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных автором. Выполнение требований к публикации основных научных результатов диссертации.** По теме диссертации опубликовано 26 научных работ, из которых 9 статей в изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Минобрнауки», 1 патент и 16 публикаций в сборниках и материалах конференций и иных изданиях, что является вполне достаточным для проведения защиты.

Личное участие автора заключалось в определении цели и задач работы, нахождении эффективных решений поставленных задач, планировании с последующей постановкой экспериментов и интерпретации результатов, оформлении научных статей, разработке методических документов. Некоторые экспериментальные исследования проведены совместно с сотрудниками других отделов: к.б.н. Кузнецовым О.С. (трансмиссионная электронная микроскопия); к.ф.-м.н. Ерохиным П.С. (атомно-силовая микроскопия); к.х.н. Красновым Я.М. (полногеномное секвенирование); к.б.н. Генераловым С.В. (подготовка клеточных линий). Автор выражает благодарность сотрудникам отделов профилактических препаратов, микробиологии, диагностических препаратов, питательных сред, биологического и технологического контроля, экспериментальных животных с виварием ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора за консультативно-методическую помощь при выполнении отдельных этапов диссертационной работы.

На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль автора была определяющей. Присвоения авторства чужого научного труда (плагиата), результатом которого может быть нарушение авторско-правового и патентного законодательства, в данной диссертации не обнаружено.

Диссертация изложена на 177 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы, состоящего из

235 источников, из которых 99 отечественных и 136 зарубежных. Диссертация иллюстрирована 26 рисунками и 21 таблицей.

**Актуальность** выбранной темы исследования обусловлена тем, что в настоящее время заболеваемость холерой в мире представляет серьезную угрозу общественному здравоохранению. В 2022 г. зарегистрировано более 1,2 млн случаев холеры в 36 странах мира. По мнению экспертов в 2023 г. сохранятся риски завоза инфекции на территорию РФ, связанные с активацией эпидемического процесса в странах Азии и Африки. Официальная стратегия ВОЗ предполагает использование оральных холерных вакцин в качестве дополнительной меры предотвращения возникновения эпидемий холеры.

В России вакцинация против холеры включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям. Единственным препаратом для профилактики холеры в РФ является «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой», производства ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, в состав которой входит холероген-анатоксин, полученный в результате формоловой детоксикации холерного токсина, и О-антиген. В соответствии с Промышленным Регламентом, определение специфической активности холерного токсина и холерогена-анатоксина проводится методами *in vivo* с использованием лабораторных животных.

Определяющую роль в получении качественного продукта микробного синтеза играют питательные среды, эффективность которых оценивается по выходу биомассы. Вопрос стабильно высокой продукции антигенов чрезвычайно важен и требует дополнительных критериев оценки эффективности культивирования, таких как выход «целевого продукта» – антигенных компонентов. Одним из ключевых требований к штаммам-продуцентам, используемым в производстве иммунобиологических препаратов, является их стабильность, которая заключается в сохранении основных культурально-морфологических, физиологических и продуктивных свойств в условиях производственного цикла. В соответствии с рекомендациями ВОЗ, на современном этапе развития производства иммунобиологических лекарственных препаратов актуальной задачей является разработка стандартных, воспроизводимых методов контроля специфической активности антигенов *in vitro*, сопоставимых по чувствительности с методами *in vivo* для контроля компонентов вакцин.

Актуальной задачей совершенствования контролей в производстве холерной химической вакцины является замена методов определения специфической активности антигенов с использованием лабораторных животных на высокочувствительные, воспроизводимые методы *in vitro* и разработка способов контроля стабильности штаммов-

продуцентов. К настоящему времени отсутствуют сведения о применимости иммуноферментных и молекулярно-генетических тест-систем для контроля стабильности штаммов-продуцентов и специфической активности антигенов *V. cholerae* в условиях цикла производства холерной химической вакцины.

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

**Научная новизна полученных результатов** заключается в том, что в работе экспериментально обоснована возможность замены методов контроля холерного токсина с использованием лабораторных животных на информативные иммунохимические методы *in vitro* (иммуноферментный анализ с использованием GM<sub>1</sub>-ганглиозидов, dot-иммуноанализ с использованием конъюгата на основе стафилококкового белка А, меченного коллоидным золотом, радиальный пассивный иммунный гемолиз). 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. Установлена корреляция между результатами определения активности холерного токсина и холерогена-анатоксина *in vitro* и *in vivo*, коэффициент корреляции от 0,82 до 0,93.

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

Установлена стабильность повышенной продукции протективных антигенов *Vibrio cholerae* при культивировании на питательной среде на основе сухого ферментативного гидролизата казеина. Проведен ретроспективный анализ эффективности питательной среды для глубинного культивирования производственных штаммов холерного вибриона и оценена стабильность показателей количества биомассы и выхода специфических антигенов.

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». Получено положительное решение о выдаче патента на изобретение «Способ получения холерного токсина для контроля производства холерной химической вакцины» заявка от 21.10.2022 г. № 2022127498.

На основании анализа поступившей работы комиссия пришла к заключению о возможности защиты кандидатской диссертации Дураковой Оксаны Сергеевны на тему: «Совершенствование методических подходов для оценки специфической активности антигенов холерной химической вакцины» в диссертационном совете 64.1.002.01 при ФБУН ГНЦ ПМБ.

Члены комиссии:

доктор мед. наук Дентовская Светлана Владимировна (председатель)

(подпись)

доктор биол. наук Игнатов Сергей Георгиевич

(подпись)

доктор биол. наук, доцент Хохлова Ольга Евгеньевна

(подпись)

доктор биол. наук Коломбет Любовь Васильевна

(подпись)

доктор тех. наук, с.н.с., Похиленко Виктор Данилович

(подпись)

доктор мед. наук Мокриевич Александр Николаевич

(подпись)

**Председатель диссертационного совета  
академик РАН, доктор медицинских наук,  
профессор**



И.А. Дятлов

**Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук**

Н.К. Фурсова