



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ГНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко,
профессор, академик РАН
М.И.Гулюкин
июня 2014 г.

О Т З Ы В

ведущей организации – ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им.Я.Р. Коваленко (ВИЭВ) на диссертационную работу **Лосич Миланы Анатольевны** на тему: «Иммунобиологические свойства штамма ERA-SB 20M и разработка на его основе антирабической вакцины», представленной в Диссертационный совет Д 208.131.01 при ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского» Минздрава России, на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02.- вирусология

Актуальность темы. Бешенство – это нейроинфекция, при которой мишенью вируса (ВБ) является центральная нервная система. Заражение, главным образом, происходит через укус со слюной больного животного. Природным резервуаром бешенства служат плотоядные млекопитающие и летучие мыши. По оценке ВОЗ, бешенство входит в пятерку инфекционных болезней, общих для человека и животных, наносящих наибольший социальный и экономический ущерб. В нашей стране сохраняющаяся интенсивность эпизоотии бешенства природного типа, а также высокая концентрация бродячих собак и кошек в городах, привели к распространению бешенства и ухудшению эпизоотической ситуации на территории 63 субъектов.

Для профилактики бешенства человека и домашних животных используются инактивированные культуральные антирабические вакцины, для профилактики бешенства в популяции дикой фауны применяют живые оральные препараты. При этом одним из показателей эффективности вакцин является уровень вируснейтрализующих сывороточных антител. Поэтому решающим условием разработки вакцин является подбор такого сочетания штамма вируса и адъюванта, который позволит стимулировать у вакцинированных животных напряженный и длительный антирабический иммунитет. В этой свя-

зи диссертационная работа Лосич М.А, посвященная изучению иммуно-биологических свойств штамма ERA-CB 20M ВВ и разработке технологии приготовления антирабических вакцин с использованием адъювантов нового поколения, является весьма актуальной и представляет значительный интерес, как в научном, так и в практическом аспектах.

Оценка содержания работы. Рецензируемая диссертация изложена на 137 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических предложений и списка литературы. Материалы диссертации иллюстрированы 26 таблицами и 15 рисунками. Список литературы включает 132 источника (21 отечественный и 111 зарубежных авторов). В приложении представлены копии нормативных документов утвержденных в установленном порядке:

1. Регистрационное удостоверение лекарственного препарата для ветеринарного применения № 77-1-17.11-0484 №ПВР-1-17.11/02758, выданное Россельхознадзором 31.10. 2011 г.; Стандарт организации на Вакцину против бешенства собак инактивированную «РАБИКС» «СТО 76418883-0009-2011» от 31 октября 2011 г.; Инструкция по применению вакцины против бешенства собак инактивированной «РАБИКС», утвержденная Россельхознадзором 31 октября 2011 г.

2. Регистрационное удостоверение лекарственного препарата для ветеринарного применения № 77-1-17.11-0485 №ПВР-1-17.11/02759, выданное Россельхознадзором 31.10.2011 г.; Стандарт организации на Вакцину против бешенства кошек инактивированную «РАБИФЕЛ» «СТО 76418883-0008-2011» от 31 октября 2011 г.; Инструкция по применению вакцины против бешенства кошек инактивированной «РАБИФЕЛ», утвержденная Россельхознадзором 31 октября 2011 г.

В разделе «Введение» диссертант обосновывает выбор темы и ее актуальность, определяет цель и задачи исследований, формулирует научную новизну и практическую значимость работы. В обзоре литературы приведены

результаты отечественных и зарубежных исследователей касающихся этиологической структуры и распространенности бешенства, характеристика возбудителя вируса бешенства, описывается новая филогенетическая характеристика лиссавирусов, согласно последним данным Международного Комитета по Таксономии вирусов (2013 г.) Подробно описывается вирусы бешенства, которые циркулируют на территории РФ, а также вакцинные штаммы, из которых получают антирабические вакцины, применяемые как в России, так и за рубежом. Обоснованы теоретические предпосылки проведения исследований, изложенных в соответствующих разделах.

Экспериментальная часть работы традиционно включает в себя несколько разделов. В разделе «Материалы и методы» описаны использованные в работе вирусологические, иммунологические, серологические и молекулярно-биологические методы исследований. Приведено подробное описание используемых методик и диагностических наборов, а также схем опытов на лабораторных и естественно-восприимчивых животных. В первых главах раздела «Результаты исследований» приведены результаты собственных исследований, касающиеся изучения спектра чувствительности различных линий клеток и условий культивирования штамма ERA-CВ 20М вируса бешенства, изучения его нейровирулентных и патогенных свойств для животных при различных способах введения. Дальнейшие разделы работы посвящены описанию экспериментов по молекулярно-генетическому анализу штамма ERA-CВ 20М вируса бешенства, изучению его антигенных и иммуногенных свойств в опытах на лабораторных и естественно-восприимчивых животных. Далее исследования были сфокусированы на проведении сравнительных опытов по изготовлению культуральных инактивированных вакцин на основе штамма ERA-CВ 20М ВБ в комбинации с различными адъювантами и разработке иммуноферментной тест-системы (ИФА) на основе моноклональных антител (МкА) 1С5 для оценки содержания гликопротеина (G-белка) ВБ в вируссодержащей культуральной жидкости.

В заключительных разделах работы диссертант обобщил полученные результаты исследований, провел сравнительный анализ собственных результатов с результатами подобных исследований, проведенных рядом отечественных и зарубежных авторов, и сделал соответствующие выводы и заключение.

Рецензируемая работа выполнена на современном научно-методическом уровне с использованием широкого спектра современных методов, включая вирусологические, молекулярно-биологические, иммунохимические и серологические. При оптимизации схемы применения вакцин с целью формирования выраженного антирабического иммунитета в производственных условиях проведены многочисленные эксперименты на собаках и кошках.

Диссертация хорошо иллюстрирована: приведены информативные рисунки, фотографии и таблицы, наглядно демонстрирующие содержание выполненной работы.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна.

Диссертант научно обосновал и экспериментально подтвердил эффективность нового принципа селекции для получения вакцинного вируса бешенства с наиболее высоким уровнем синтеза G-белка – главного иммуногена ВБ. Новыми являются положения работы, связанные с получением ВБ штамм ERA-CВ 20М на основе количественного определения уровня синтеза гликопротеина. Впервые дана характеристика биологических свойств штамма ERA-CВ 20М вируса бешенства: определен спектр чувствительных культур клеток для его репликации, разработаны оптимальные условия культивирования вируса, изучены его антигенные и иммуногенные свойства на мышах, песцах, собаках и кошках. Так было установлено, что при стационарном и роллерном способах культивирования ВБ штамм ERA-CВ 20М концентрация клеток перевиваемой линии ВНК-21-13С, наиболее чувствительной к ВБ, должна составлять не менее 2×10^6 клеток/мл при множественности инфицирования клеток 0,1-0,01 ТЦД₅₀/мл. Данный штамм оказался па-

тогенным для белых мышей при интрацеребральном способе введения, слабopатогенным для мышей, белых крыс и морских свинок при внутримышечном и подкожном способах заражения и непатогенным для кроликов, собак, кошек и песцов. Автор впервые провел филогенетический анализ фрагментов генов N и G вакцинного штамма ERA-CB 20M вируса бешенства и установил их отличие от референтного штамма SAD1 по первичной структуре РНК на 10% и 15% соответственно.

Диссертантом разработана технология изготовления антирабической вакцины из ВБ штамм ERA-CB 20M с использованием нового иммуностимулирующего комплекса Abisco R-100 в качестве адъюванта. Экспериментально доказано, что разработанная на основе МкА 1С5 иммуноферментная тест-система пригодна для контроля G-белка ВБ при производстве антирабических вакцин. В экспериментальных и производственных условиях установлено, что вакцинация разработанными препаратами индуцирует выработку вируснейтрализующих антител у мышей, белых крыс, песцов, кошек и собак в титрах, значительно превосходящих защитный, пороговый уровень (0,5 МЕ/см³), обеспечивая тем самым выраженный протективный эффект у животных. В опытах на белых мышах с использованием метода НИИ было установлено, что разработанные антирабические препараты сохраняли свои иммуногенные свойства (иммуногенность образцов составила 1,5–2,2 МЕ/см³) на протяжении 18 месяцев при хранении при температуре от 2 до 8⁰С.

Для оценки поствакцинального антирабического иммунитета у животных внедрён флуоресцентный вируснейтрализующий тест (метод FAVN), рекомендованный ВОЗ.

Полученные результаты использованы при разработке нормативных документов, на основании которых осуществляется производство, биологический контроль и порядок применения вакцин «РАБИКС» и «РАБИФЕЛ».

Диссертационная работа М.А.Лосич выполнена на большом фактическом материале, полученные результаты представляют научный и большой практический интерес. Цифровой материал обработан статистически, что по-

зволило автору получить объективные данные и сделать научно-обоснованные выводы, логически вытекающие из содержания работы.

Таким образом, можно констатировать, что диссертант выполнил поставленную цель и задачи исследования.

Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 9 печатных работах, в том числе 5 - в реферируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ, и представлены в виде докладов на международной научной конференции, семинарах и конференциях ветеринарных специалистов.

Автореферат отражает основные положения диссертации. Диссертация соответствует указанной специальности.

Принципиальных замечаний по рецензируемой диссертационной работе нет, однако на ряд вопросов хотелось бы получить разъяснения от автора:

1) Существуют ли видовые особенности у животных при формировании антирабического иммунитета?

2) Возможно ли применение данного вакцинного штамма ERA-CB 20M вируса бешенства в медицинских целях, т.е. в производстве антирабической вакцины для человека?

3) Возможно ли применение флуоресцентного вируснейтрализующего теста (FAVN) для определения уровня антирабических антител у человека?

4) Какое минимальное количество гликопротеина является необходимым в вакцинных полуфабрикатах при производстве эффективных антирабических вакцин?

Указанные вопросы не касаются методической стороны диссертационной работы и не снижают ее научно-практической значимости.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации. Результаты и выводы диссертации, касающиеся разработки и оценки эффективности вакцин «РАБИКС» и «РАБИФЕЛ» могут быть использованы для создания средств специфической профилактики бешенства у домашних животных. Внедрение в ветеринарную практику таких биопрепаратов позво-

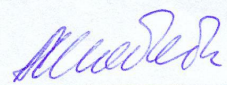
лит повысить эффективность оздоровительных и профилактических мероприятий по предотвращению, ликвидации и предупреждению данного заболевания. Результаты и выводы диссертации, касающиеся разработки ИФА для оценки содержания гликопротеина вируса бешенства могут быть использованы в практике производства антирабических вакцин на этапе промежуточного контроля культуральной вирусосодержащей жидкости, а также в дальнейшей научно-исследовательской работе, связанной с унификацией методов диагностики бешенства и изучением генетических вариантов вируса.

Заключение. Диссертация М.А. Лосич является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных экспериментальных исследований решена научно-практическая задача по разработке и внедрению в практику страны двух новых вакцин против бешенства, имеющая важное значение для ветеринарии и медицины.

Работа по своей актуальности, объему выполненных экспериментальных исследований, методическому решению поставленных задач, научной и практической значимости полученных результатов, соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в соответствии с п.9 «Постановления о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а ее автор **Лосич Милана Анатольевна** заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

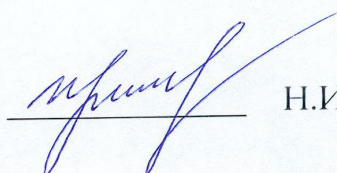
Отзыв обсужден и одобрен на заседании научных сотрудников лаб. эпизоотологии ГНУ ВИЭВ им. Я.Р.Коваленко 4 июня 2014 г.

И.о. заведующего лаборатории
эпизоотологии
кандидат ветеринарных наук



А.А. Шабейкин

подпись А.А. Шабейкина подтверждаю
Ученый секретарь Ученого Совета
ГНУ ВИЭВ Россельхозакадемии
кандидат биологических наук



Н.И. Ложкова.