

## ОТЗЫВ

Официального оппонента профессора Уласова В.И. на диссертацию ЛОСИЧ Миланы Анатольевны выполненную на тему: «Иммунобиологические свойства штамма ERA-SB 20M вируса бешенства и разработка на его основе антирабической вакцины», представленную в диссертационный совет Д 208.131.01 при ФГБУ «Научно-Исследовательский институт вирусологии имени Д.И. Ивановского» Минздрава РФ, на соискание ученой степени кандидата биологических наук, по специальности 03.02.02.-вирусология.

### Актуальность темы.

Бешенство остается актуальной проблемой в глобальном смысле и представляет опасность для человека и животных. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ), эпидемиологическая ситуация по этому заболеванию в России неблагоприятная и свидетельствует о ежегодном возрастании количества новых очагов инфекции не только среди диких, но также и среди домашних животных.

Для создания относительного благополучия регионов страны по бешенству требуется решение ряда проблем, основными из которых являются:

1. Разработка и принятие на федеральном уровне Национальной программы и ряда нормативно-правовых актов по вакцинации против бешенства домашних и диких животных.
2. Разработка новых и совершенствование существующих вакцин, особенно, для собак и кошек по показателям безвредности и иммуногенности.
3. Повсеместное проведение мониторинга по оценке эффективности применения зарегистрированных биопрепаратов и контроль за изменчивостью полевых и вакцинных штаммов вируса бешенства.

Во всех странах мира регулярная профилактическая вакцинация против бешенства собак и кошек является жизненно необходимой не только для

безопасного существования питомцев, но и для самих владельцев животных. Для этих целей предпочтение отдается инактивированным культуральным вакцинам.

Диссертационная работа Лосич М.А. посвящена дальнейшему изучению биологических свойств штамма ERA –СВ 20М вируса бешенства и разработке на его основе новых, более совершенных иммунобиологических и диагностических препаратов для практического применения.

Научная новизна состоит в том, что в результате проведенных исследований диссертантом показан новый принцип селекции штамма ERA –СВ 20М вируса бешенства, основанный на определении количественного уровня экспрессии гликопротеина вируса бешенства, отработаны оптимальные параметры культивирования и дана биологическая характеристика нового вакцинного штамма ERA –СВ 20М вируса бешенства.

На высоком научно-методическом уровне выполнены молекулярно-генетические исследования штаммов вируса и представлен филогенетический анализ фрагментов наиболее значимых протективных генов.

#### Практическая значимость.

Полученные результаты исследований диссертанта носят законченный характер и выражаются разработкой, согласованием и утверждением в установленном порядке необходимых нормативных документов для производства, выпуска и применения двух новых более совершенных вакцин для собак и кошек, а также флуоресцирующего нейтрализующего теста для оценки поствакцинального антирабического иммунитета.

### Оценка содержания работы.

Диссертация изложена по традиционному типу на 139 стр. печатного текста. Практическая ценность проведенных исследований подтверждена копиями утвержденных документов.

В разделе «Введение» дается обоснование актуальности темы диссертации, сформулированы цель и задачи, научная новизна, практическая значимость, проведение апробации результатов исследований, основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту и другие необходимые сведения. Материалы диссертации были представлены, доложены и одобрены на Международных научно-практических конференциях и производственных совещаниях. Приведен список опубликованных работ, среди которых 5 статей в журналах ВАК.

В главе «Обзор литературы» обобщены данные специальной литературы по рассматриваемым и смежным вопросам. Заслуживает положительной оценки вывод диссертанта о имеющихся проблемах при вакцинации собак и кошек, приведена некоторая характеристика производственных штаммов вируса бешенства.

В разделе «Собственные исследования» излагается описание методов, материалов и необходимого оборудования, которые обеспечили качественное выполнение поставленных перед диссертантом задач.

Несомненный интерес представляют материалы диссертации по поиску наиболее чувствительных перевиваемых культур клеток для крупномасштабного культивирования вакцинного штамма ERA-CВ 20М вируса бешенства, и установлено, что наиболее подходящими (чувствительными) оказались культуры клеток : ВНК-21, BSR и ПС. Поскольку размножение вируса не приводит к развитию цитопатического действия, автор провела работу по индикации в зараженных культурах клеток количество гликопротеина вируса бешенства с помощью

отечественной и зарубежных ИФА тест-систем. Было установлено, что накопление G-белка не зависит от титра вирус, но зависит от использования разных видов культур клеток, множественности заражения и числа проведенных пассажей, как при роллерном заражении, так и стационарном культивировании.

Лосич М.А. одной из первых в отечественной практике показана корреляционная связь между титром инфекционной активности штамма ERA-CВ 20М вируса бешенства для белых мышей, морских свинок, крыс и кроликов при внутримозговом и подкожном способах заражения и уровнем экспрессии G-белка - главного иммуногена вируса бешенства, что представляет интерес для теории и практики вакцинопрофилактики.

При разработке инактивированных вакцин для собак и кошек диссертант использовал два варианта с содержанием количества гликопротеина 200 нг/мл и 1400 нг/мл соответственно, правда объяснений этому не дает.

В опытах на лабораторных животных и песцах автор проводила исследования антигенных свойств опытных вариантов разрабатываемой вакцины с различным содержанием гликопротеина в комбинации с двумя адьювантами : ГОА и Abisco R-100 ( иммуномодулирующий комплекс ISCOM), установила, что препараты индуцировали образование вируснейтрализующих антител выше 1 МЕ/мл.

Значительный объем исследований проведен по анализу фрагментов N-,G-белка нуклеотидных последовательностей штамма ERA-CВ 20М вируса бешенства в сравнении с другими штаммами вируса бешенства (из Генбанка). Автор установил отличие от референтного штамма SAD1 по первичной структуре на 10% и 15% соответственно.

Опытные серии вакцин по показателям качества, изложенным в нормативных документах на вакцину с положительным результатом были испытаны на собаках и кошках в сравнении с одной из коммерческих

вакцин. Диссертантом показано, что разрабатываемые вакцины обладают стабильным антигенными свойствами в течение срока годности препаратов – 18 месяцев. Безвредность и антигенная активность вакцины были подтверждены в экспериментах на 32 собаках и 26 кошках (в питомниках Москвы, Московской обл., Башкирии), а также в опытах на песцах на протяжении 5 лет были происследованы около 350 сывороток крови песцов на наличие антирабических вируснейтрализующих антител (звероферма «Раисино» Московской обл., и звероферма «Вятка» Кировского р-на).

Разработанная тест-система ИФА на основе мкА 1С5 для определения уровня гликопротеина в вакцинных полуфабрикатах оказалась пригодной для первичного контроля G- белка и соответствовала по чувствительности и специфичности с зарубежными тест-системами ИФА для определения гликопротеина. Установлена положительная корреляция результатов ИФА и НИИ ( $r=0,89$ ;  $p<0,05$ ). Препараты с титром в ИФА  $\geq 1:160$  обладали пороговой защитной иммуногенной активностью.

В разделе «Обсуждение» автором весьма убедительно интерпретированы полученные результаты, проведено сопоставление с их аналогичными данными, представленными в других публикациях. Сформулированные промежуточные и окончательные выводы и заключения достоверны и в полной мере соответствуют представленным экспериментальным данным.

Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и дает наглядное представление о ней.

Положительно оценивая результаты проведенных исследований, хотелось бы обратить внимание диссертанта на следующие моменты, не нашедшие достаточного освещения в работе:

1. Какова система поддержания Master seed и Working seed посевных расплодок вакцинного штамма?
2. Требуют уточнения данные, представленные в протоколе испытания иммуногенности вакцинного штамма (табл. 16) в плане расчета заражающей дозы и определения индекса иммуногенности вакцины.
3. Каково процентное соотношение компонентов, входящих в состав вакцин для собак и для кошек?

Указанные недостатки не снижают общей положительной оценки диссертации Лосич М.А.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В Результате всестороннего анализа представленной работы считаю, что диссертация Лосич Миланы Анатольевны на тему «Иммунобиологические свойства штамма ERA-CV 20M вируса бешенства и разработка на его основе антирабической вакцины», являются законченной научно-исследовательской работой, которую можно охарактеризовать, как решение важной, актуальной задачи, предъявляемой к кандидатским диссертациям. Положительно оценивая диссертационную работу Лосич М.А., считаю, что она заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02. «вирусология».

### **Официальный оппонент:**

Главный научный сотрудник отдела

«Всероссийская коллекция штаммов микроорганизмов» ФГБУ «ВГНКИ»

Доктор ветеринарных наук, профессор

В.И.Уласов

123022, г. Москва, Звенигородское шоссе д.5

Тел. 8 (495) 253 14 91

Подпись профессора Уласова В.И. заверяю

Ученый секретарь, д.б.н., профессор

Н.К. Букова

