

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Игнатъева Георгия Михайловича на диссертацию Шамсутдиновой Ольги Анатольевны «Изучение специфической безопасности вакцинных штаммов вируса краснухи» представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. - вирусология.

Актуальность диссертационной работы.

Краснуха является контагиозным заболеванием средней тяжести и характеризуется невысоким подъёмом температуры, кореподобной сыпью и лимфаденопатией. Вирус краснухи, вызывающий данное заболевание, относится к роду Rubivirus, семейству Togaviridae. По нуклеотидной последовательности вирус краснухи разделен на две клады, включающие в себя 13 генотипов. К первой кладе относятся 10 генотипов (1a-1J), ко второй кладе – три (2A-2C). Генотипирование вируса краснухи проводится по нуклеотидной последовательности фрагмента кДНК области кодирующей белок оболочки E1 (позиция референсной последовательности генома: 8731-9469) длиной не менее 739 п.н.

Эффективным средством профилактики заболевания является вакцинация. Dr. Stanley Plotkin в «Vaccines» указывает, что на основе аттенуированных штаммов вируса краснухи было разработано девять вакцин. Пять вакцин разработаны и производятся в Японии с использованием штаммов Matsuba, Matsuura, TCRB19, TO-336, KRT. В КНР используется штамм BRD-2. Штаммы HPV-77 и Cendehill использовались для производства вакцин в США. Штамм RA-27/3, в выделении и исследовании которого принимал участие S. Plotkin, используется многими производителями вакцины против краснухи, такими как, Merck & Co. Inc (США), GSK Biologicals (Нидерланды), АО «НПО «Микроген» (Россия), Serum Institute of India (Индия). Наиболее массовое применение имели вакцины разных производителей именно на основе штамма RA-27/3. Современные требования к производству вакцинных препаратов, содержащих живые вакцинные

штаммы вирусов, в том числе вируса краснухи, определяют контроль генетической стабильности и нейровирулентности производственных штаммов, что рекомендовано Международным советом по гармонизации ICH и отражено в Государственной Фармакопее Российской Федерации и «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (иммунобиологические лекарственные препараты, часть вторая). В части касающейся генетической стабильности все производители вакцин для профилактики краснухи, включая АО «НПО «Микроген», сделали доступной информацию о нуклеотидной структуре производственных штаммов RA-27/3 (за исключением Serum Institute of India). Сравнение нуклеотидных последовательностей штамма RA-27/3 разных производителей свидетельствует о его идентичности, независимо от предприятия. Государственная Фармакопея Российской Федерации начиная с XIII издания содержит «ОФС.1.7.2.0010.15 Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи» и «ФС.3.3.1.0024.15 Вакцина против краснухи культуральная живая» в которых указаны четкие требования к безопасности данной вакцины, критерии и методы ее оценки. Основных критериев два – отсутствие нейровирулентности штамма и его генетическая стабильность производственного и посевного штаммов. Используемый АО «НПО «Микроген» штамм RA-27/3 (как производственный, так и посевной) полностью охарактеризован в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи. Вакцина против краснухи культуральная живая достаточно эффективна, но имеет ряд противопоказаний к применению в соответствии с инструкциями производителей, одним из которых является беременность и период грудного вскармливания.

Заявленная соискателем цель исследования «изучить критерии специфической безопасности штаммов для живой аттенуированной вакцины против краснухи» уже отражена в Государственной Фармакопее и не является актуальной. Соискателю следовало бы обосновать, что имеющиеся критерии

специфической безопасности недостаточны, некорректны и/или требуют изменения.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения, выводы, практические рекомендации и предложения по дальнейшим исследованиям сделаны без учета имеющегося опыта, как международного, так и отечественно, а также опубликованных результатов по теме проведенного исследования и требований Государственной Фармакопеи.

Диссертация построена по традиционной схеме, изложена на 155 страницах, состоит из введения, четырех глав, состоящих из: глава обзор литературы, глава материалы и методы, глава результаты собственных исследований, глава обсуждение полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы исследования, перечня условных обозначений, символов, единиц и терминов, списка литературы и 6 приложений.

Работа иллюстрирована 22 таблицами, 18 рисунками (в тексте диссертации, без материалов Приложений). Список литературы включает 146 источников, из которых 48 публикаций на русском языке и 98 на английском.

Во введении соискательница обосновывает актуальность темы диссертационной работы указывая, «...что в настоящее время единственным методом оценки специфической безопасности вакцинных штаммов в тесте интрацеребрального заражения обезьян является патоморфологическое исследование ЦНС инокулированных животных». Поскольку вирус краснухи обладает выраженными тератогенными свойствами, важным этапом доклинического изучения вакцинного штамма, «...является контроль утраты тератогенности, присущей «диким» штаммам вируса». По мнению соискателя, об этом говорится в Руководстве по проведению доклинического исследования лекарственных средств, часть первая. Данный пассаж в Руководстве отсутствует. Также по мнению автора, весьма актуальным

представляется разработка дополнительных, подтверждающих стабильность аттенуации, тестов, основанных на современных методах лабораторной диагностики. Таковым автор считает метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Целью исследования автор определила изучение критериев специфической безопасности штаммов для живой аттенуированной вакцины против краснухи.

В задачи исследования входило:

1. Провести комплексное изучение тератогенных свойств вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В» в сравнении с вакцинным штаммом RA27/3 в опыте на обезьянах вида *Macaca mulatta*.

2. Оценить возможность использования метода ПЦР в качестве дополнительного теста при изучении тератогенных свойств аттенуированного вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В».

3. Изучить остаточную нейровирулентность вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В» в опыте на обезьянах вида *Macaca mulatta*.

4. Провести клиническое наблюдение и оценку морфологических изменений в ЦНС и периферических органах обезьян при интрацеребральном введении вариантов штамма вируса краснухи «Орлов» с разным уровнем аттенуации.

5. Изучить возможность выявления РНК вируса краснухи из ЦНС и периферических органов обезьян методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) при интрацеребральной инокуляции штаммов вируса краснухи.

Судя из заявленной цели исследования и поставленных задач, работа является экспериментальной, выполнялась с использованием животных (обезьян вида *Macaca mulatta*) и предполагала использование как уже рекомендованных методов исследования безопасности штаммов для производства краснушной вакцины, так и новых, более информативных примененных автором.

Глава «Обзор литературы» имеет 4 подраздела.

В подразделе 1.1. молекулярно-биологические характеристики вируса краснухи автор приводит данные о истории выделения вируса, его таксономии, структурной организации, структуре генома, современной номенклатуре и генотипах, роли белков вируса.

В подразделе 1.2. Патогенетические особенности и клинические проявления постнатальной и врожденной краснухи подробно и доступно описана клиника заболевания, синдром врожденной краснухи, иммунный ответ.

В подразделе 1.3. Лабораторные методы индукции вируса краснухи и краснушной инфекции представлены литературные данные о методах, применяемых для определения специфических антител (ИФА, РН, иммунофлуоресценция), выделение вируса на культуре клеток, или определение РНК вируса методом полимеразной цепной реакции при заболевании человека.

Подраздел 1.4. посвящен анализу литературы о вакцинопрофилактике краснухи. В подразделе представлена информация о истории разработки вакцин, начиная со второй половины 20 века. Уделено внимание штаммам, применявшимся и применяемым для производства вакцин, субстратам накопления. Представлена история выделения и пассирования штамма «Орлов». Указывается, что штамм «Орлов-В» был ранее рекомендован для производства на его основе краснушной вакцины (стр.41), а субстратом для его накопления ГИСК им. Л.А. Тарасевича рекомендовал линию диплоидных клеток кожи и мышц человека М-22. В подразделе приводится информация о штаммовом составе моно- и комбинированных вакцин корь-краснуха – паротит разных производителей.

В главе 2 «Материалы и методы» представлены схема исследования, материалы исследования, включающие информацию: об использованных штаммах, характеристику животных, использованных культурах клеток и средах, сбор клинического материала, культивирования штаммов на

культурах клеток, определение инфекционного титра вируса, манипуляции с животными, серологические методы (РТГА и иммуноферментный анализ), данные о наборах реагентов, использованных для выделения РНК и проведения ПЦР с электрофоретической детекцией и в реальном времени, гистологическом исследовании, описание методов статистического анализа.

Глава 3. Результаты собственных исследований.

В разделе 3.1. представлены результаты изучения тератогенных свойств «вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В» в сравнении с вакцинным штаммом RA-27/3 в опыте на обезьянах вида *Macaca mulatta*. Всего было проиммунизировано 13 обезьян указанного вида на первой трети беременности. При этом 9 обезьян иммунизировали препаратами из штамма «Орлов-В», 3 обезьян – штаммом RA-27/3 и одну обезьяну – растворителем для лиофилизированной коммерческой вакцины против краснухи. По итогам наблюдения беременность 11 из 13 самок завершились нормальными, срочными родами (как указано автором на странице 65). В двух случаях – один при иммунизации штаммом «Орлов-В» и один – при иммунизации штаммом RA-27/3 – беременность завершилась мертворождением вследствие родовой травмы. Морфологические и гистологические исследования тканей и органов погибших детенышей и исследование органов на наличие/отсутствие РНК вируса краснухи позволили автору сделать заключение, что смерть при родах не ассоциируется с вирусом краснухи. Результаты наблюдения за родившимися детенышей обезьян по показателям веса, сохранения рефлексов (приложение 2), рентгенологического исследования, отсутствия IgM в сыворотке крови на 30 сутки после родов позволили автору сделать вывод (вывод 1) об отсутствии тератогенных свойств у штамма «Орлов-В» и штамма RA-27/3.

Результаты данного раздела вызывают ряд замечаний и вопросов, изложенных в разделе «Замечания и вопросы» отзыва.

В разделе 3.2. представлены результаты изучения остаточной нейровирулентности вакцинного штамма вируса краснухи «Орлов-В» в опыте

на обезьянах вида *Macaca mulatta* в сравнительном аспекте с вакцинным штаммом RA-27/3 вируса краснухи. Всего было использовано 14 здоровых серонегативных к вирусу краснухи животных. 10 животных использовали для заражения штаммом «Орлов-В», двух – штаммом «РА-27/3» и двух – плацебо, растворитель для вакцины краснухи. В этом разделе приводится информация, что использованный в эксперименте штамм «Орлов-В» прошел 39 пассажей в культуре клеток ППК (первично трипсинизированной почки кролика) и три пассажа в культуре клеток М-22. О пассажах штамма RA-27/3 информации нет. Указано, что вирусосодержащий материал вводили в таламическую область правого и левого полушарий головного мозга в объеме 0.25 мл, при этом доза обоих штаммов соответствовала 10 минимальным прививочным дозам человека и составляла не менее 10000 ТЦД₅₀/0.5 мл. Клиническое наблюдение за животными проводили в течение 28 суток, периодически измеряя температуру тела (результаты представлены в таблице 13) после введения вируса, но не до. Из раздела 3.2.4. следует, что у всех обезьян до введения вируса и на 28 сутки была взята кровь для получения сыворотки, которую тестировали на наличие специфических антител методами РТГА и ИФА. На 28 сутки после заражения все животные были выведены из эксперимента и от них были получены ткани головного и спинного мозга, лимфатические узлы и внутренние органы (легкое, поджелудочная железа, печень и селезенка) для проведения гистологического и молекулярно-генетического исследования. Безусловно, при выполнении данного исследования была проведена большая работа.

В разделе 3.3. представлены результаты сравнительной оценки нейровирулентности вариантов штамма вируса краснухи «Орлов» с разным уровнем аттенуации в опыте на обезьянах вида *Macaca mulatta*. Всего было использовано 10 здоровых серонегативных к вирусу краснухи животных. Двух животных использовали для заражения штаммом «Орлов-14» в дозе 4.7 lg ТЦД₅₀/0.5 мл, двух для заражения штаммом «Орлов-14» в дозе 3.8 lg ТЦД₅₀/0.5 мл, четырех животных использовали для заражения штаммом «Орлов-В»

в дозе $4.7 \lg \text{TЦД}_{50}/0.5$ мл и двух - штаммом «РА-27/3» в дозе $4.0 \lg \text{TЦД}_{50}/0.5$ мл.

На 2, 12, 21 и 28 сутки по одному животному, инфицированному штаммами «Орлов-14» и «Орлов-В» и на 21 и 28-е сутки инфицированным штаммом РА-27/3 подвергали эвтаназии и проводили забор органов для морфологического исследования и определения наличия вируса методами выделения на культуре клеток и методом ПЦР-РВ.

Результаты данного раздела вызывают ряд замечаний и вопросов, изложенных в разделе «Замечания и вопросы» отзыва.

Замечания и вопросы

Представленная в Главе «Обзор литературы» информация не полностью соответствует теме работы и не позволяет оценить уровень проработанности этой темы и ее актуальности.

Учитывая цель исследования и поставленные соискателем задачи в литературном обзоре следовало отразить:

- информацию о распространенности генотипов вируса краснухи в разных регионах мира и в России;
- информацию о генотипах производственных штаммов;
- информацию об используемых в настоящий момент методов контроля специфической безопасности аттенуированных штаммов, применяемых разными производителями для производства вакцины краснухи, в том числе, конечно, и отечественный опыт.
- автору следовало бы указать, почему описанные в Государственной Фармакопее РФ метод нейровирулентности и генетической стабильности недостаточны, и почему их следовало дополнить методом оценки тератогенности;
- дать определение тератогенности в целом и для вируса краснухи в частности, описать методы исследования тератогенности (фармакопейные и не фармакопейные), для каких вакцин применяется, а так же указать критерии оценки тератогенности вирусных штаммов;

- информацию об использовании животных для моделирования экспериментальной инфекции, вызванной вирусом краснухи, и отражающую возможность использования обезьян для оценки тератогенности вируса краснухи (какие критерии, как интерпретируются результаты).

Глава «Материалы и методы». Представленная в данной главе информация не полная. Так, в разделе 2.1.1. «Штаммы вируса краснухи» указывается, что были использованы три штамма: два из них - «Орлов-В», «Орлов-14» полученные из ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера и RA-27/3 входящий в состав коммерческой живой аттенуированной вакцины производства АО «НПО «Микроген». При этом указано, что «Вирусные образцы получены в лиофилизированной форме и хранились при температуре не выше минус 68 °С» (стр. 51). Из текста диссертации не ясно, в каком виде был получен образец штамма RA-27/3. Это был образец «производственного штамма» или коммерческая серия. Не представлена информация о номере коммерческой серии вакцины против краснухи культуральной живой аттенуированной, годе ее выпуска и способа получения для исследований. Вакцина, как известно, имеет ограниченный срок годности и ее использование по его окончанию запрещено. Так же не корректно выбрана температура хранения - «не выше минус 68 °С». У вакцины температура хранения плюс +2⁰- +8⁰С. Если это был образец производственного или посевного штамма вируса краснухи RA-27/3, следовало приложить копию паспорта производителя с характеристикой штамма и его биологическим титром.

Также в этом разделе должна присутствовать конкретная пассажная история каждого из использованных в работе штаммах вируса краснухи, а именно – сколько пассажей и на каких клетках было проведено до использования в эксперименте. Если штамм «Орлов-В», как было указано на странице 41, был ранее рекомендован для производства краснушной вакцины, следовало приложить паспорт этого штамма. Так же следовало указать генотип, к которому этот штамм относится (в целом информация о

генотипе штамма «Орлов-В» и штамма «Орлов-14» в диссертации отсутствует). Из текста диссертации, но не из характеристики штаммов, можно предположить, что все использованные автором штаммы в условиях проведения данной работы прошли пассажи на клетках Vero (страница 54).

Одним из критериев специфической безопасности штаммов краснухи в соответствии «ОФС.1.7.2.0010.15 Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи» является генетическая стабильность. При смене субстрата накопления (смене культуре клеток) следовало продемонстрировать генетическую стабильность штаммов (отсутствии нуклеотидных замен) при пассаже на клетках Vero.

Например, штамм RA-27/3, в соответствии с информацией производителя АО «НПО «Микроген» пассируется на аттестованных клетках MRC-5. Определена нуклеотидная последовательность производственного и посевного штаммов. Данные о структуре штамма RA-27/3 АО «НПО «Микроген» есть в открытом доступе (GenBank), а исследования – опубликованы. Сравнительные данные нуклеотидной последовательности производственного и посевного штаммов RA-27/3 вируса краснухи являются доказательством его генетической стабильности. Представленный в диссертации материал позволяет предположить, что автор, сделал 2-3 последовательных пассажа на клетках Vero и этот вирусный материал использовал для своих исследований. То есть автор использовал не вакцинный штамм RA-27/3, а некий вариант штамма, пассированный на Vero, RA-27/3-vero. Сравнение нуклеотидной последовательности штамма RA-27/3 – vero с последовательностью вакцинного штамма RA-27/3, что позволило бы сделать заключение об их идентичности, автором не проводилось. Во всяком случае таких данных в работе не представлено.

Описывая культуры клеток следовало указать, на каком пассаже были эти клетки, источник их получения с приложением копии паспорта.

При исследовании тератогенных свойств штамма «Орлов-В» (2.2.3.1., 2.2.4.1) отсутствует аргументация о выборе внутримышечного способа

иммунизации. Как известно, тератогенный потенциал вируса краснухи проявляется в развитии синдрома врожденной краснухи (СВК). Описаны и хорошо изучены симптомы СВК для человека. Внутриутробные поражения эмбриона человека зависят от периода гестации. Автором в разделе 1.2 приведены данные и описаны патогенетические признаки СВК у человека. В работе присутствует некорректно используемая ссылка №2 на работу А.Ю. Антиповой, в которой даны определения тератогенного свойства вируса краснухи и симптомы СВК у человека в зависимости от периода гестации. Также методология эпиднадзора за СВК, его лабораторного подтверждения и классификация имеется в документе ВОЗ 2018 года. Автор не использует критерии СВК для человека при оценке тератогенных свойств штаммов вируса краснухи в своем исследовании, как и не дает описания модели и критериев СВК у обезьян. В работе отсутствует информация о методе рентгенологического обследования, его стандартности у обезьян. Отсутствует аргументация однократности и сроках его проведения. Отсутствует описание методики оценки двигательной активности и рефлексов у детенышей иммунизированных обезьян. По какой шкале проводилась оценка и как обрабатывались результаты из текста диссертации непонятно.

При проведении серологических исследований были использованы наборы реагентов производства АО «Вектор-Бест» и НПО «Эколаб-диагностика». Эти наборы зарегистрированы для проведения исследований с образцами, полученными от человека. Отсутствует аргументация о возможности этих наборов для исследований сывороток крови обезьян, насколько конъюгат в использованных наборах специфичен для выявления IgM и IgG обезьян вида *Macaca mulatta*.

При проведении гистологического исследования (2.2.9) патоморфологические изменения в ЦНС оценивали по 4-бальной шкале. Автор указывает, «как описано в «ОФС.1.7.2.0010.15 Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита

и краснухи»». Не совсем корректное использование ссылки, так как фармакопейный метод использовался в авторской интерпретации.

Раздел 3.1.

Следует отметить, что необходимость исследования тератогенных свойств вакцинных штаммов отсутствует, так как применение вакцины против краснухи противопоказано беременным в соответствии с инструкциями производителей.

Отсутствует информация:

- какие показатели/симптомы являются доказательством наличия тератогенных свойств вируса краснухи у обезьян вида *Macaca mulatta*;
- являются ли обезьяны вида *Macaca mulatta* животными, которые рекомендованы для моделирования краснушной инфекции и, в частности, синдрома врожденной краснухи;

Отсутствует аргументация:

- использования только «вакцинных» штаммов «Орлов-В» и RA-27/3 и отсутствия в эксперименте для сравнения «низкоаттенуированного» штамма «Орлов-14», доступного автору. Этот штамм мог быть «положительным» контролем, если бы его введение оказало тератогенное действие;
- разного размера групп (9 обезьян иммунизированы штаммом «Орлов-В», 3 – штамм RA-27/3, одна – плацебо). В Таблице 5 в 8 случаях отсутствуют данные о весе. Статистический анализ результатов при сравнении показателей между группами не корректен;
- однократного определения IgM в сыворотке детенышей лишь на 30 сутки после рождения.

Таким образом отсутствие вышеперечисленной информации и аргументации в разделе 3.1. не позволяют сделать вывод 1.

Если основанием для вывода 2 являются «результаты» представленные на странице 69 и рисунке 6, то надо отметить, что отсутствие детекции РНК вируса краснухи в органах мертворожденных детенышей не может иллюстрировать и доказывать отсутствие тератогенных свойств. Необходимо

отметить, что в целом отсутствие каких-либо критериев тератогенных свойств вируса краснухи, а так же отсутствие положительного контроля с доказанными тератогенными свойствами не позволяют сделать вывод об отсутствии тератогенности у изученных штаммов.

Необходимо также отметить, что использование ПЦР в данной работе никак не соответствует заявленным задачам исследования. Набор реагентов «АмплиСенс Rubella virus – Eph» не предназначен для определения участка генома вируса, связанного с тератогенными свойствами. Разработчик набора реагентов «АмплиСенс Rubella virus – Eph» вообще не открывает структуру праймеров и место их «посадки» - то есть не известно участок какого гена вируса краснухи амплифицируется. Это диагностическая система для определения РНК вируса, и не предполагается к использованию для других целей. Этот фактор также не позволяет сделать вывод 2.

Раздел 3.2.

Оценка нейровирулентности штаммов производственных и посевных штаммов краснухи является составной частью специфической безопасности и отражена в «ОФС.1.7.2.0010.15 Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи» Государственной Фармакопеи Российской Федерации. В ней четко сказано, что данная ОФС содержит подробное описание метода оценки специфической безопасности (остаточной нейровирулентности) производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи, используемых для изготовления живых вирусных вакцин. Проведение исследований в строгом соответствии с методами, регламентированными Государственной Фармакопеей позволяет в дальнейшем правильно интерпретировать и сопоставлять результаты. Автор ссылается на данную статью на странице 81 в части оценке морфологических поражений ЦНС обезьян. Однако автор воспроизвел метод не в соответствии с ОФС. В упомянутой «ОФС.1.7.2.0010.15» четко описаны условия проведения исследования и интерпретация результатов. На каждое испытание (штамма) должно

использоваться 10 серонегативных животных. Автор использовал другое количество животных для штамма RA-27/3 (две обезьяны). Также автором изменен объём введения вирусосодержащего материала. Вместо регламентированного ОФС объема 0.5 мл автор использовал 0.25 мл. Наблюдение за обезьянами, используемыми в тесте оценки остаточной нейровирулентности, согласно ОФС, проводят ежедневно в течение 17-21 суток, автор проводил наблюдение и оценивал результат на 28 сутки. В тексте диссертации причины изменений, внесенных в фармакопейный метод оценки нейровирулентности при оценке безопасности штаммов краснухи не объяснен и результат не проинтерпретирован.

Раздел 3.3.

Замечания к проведению сравнительной оценки нейровирулентности вариантов штамма вируса краснухи «Орлов» с разным уровнем аттенуации в методической части те же, как и разделе 3.2. Автор воспроизвел метод не в соответствии с «ОФС.1.7.2.0010.15 Оценка специфической безопасности производственных штаммов и посевных вирусов кори, паротита и краснухи». Дополнительно, автор не объясняет, почему животные были инфицированы разными дозами штамма «Орлов-14»: 2 обезьяны были инфицированы дозой $4.7 \lg \text{ТЦД}_{50} / 0.5 \text{ мл}$, и еще 2 - дозой $3.8 \lg \text{ТЦД}_{50} / 0.5 \text{ мл}$. Также количество животных в группах не соответствовало ОФС и было разным (4 обезьяны инфицированы штаммом «Орлов-В», 4 обезьяны - штаммом «Орлов-14», и 2 – «штаммом» RA-27/3). Соискатель не объясняет, почему был выбран такой дизайн и как можно сопоставлять результаты, полученные на одном животном и на разных сроках наблюдения.

Отдельного замечания заслуживают результаты выделения вируса краснухи (каждого из использованных штаммов) на культуре клеток и детекции РНК вируса методом ПЦР-РВ в тех же органах и на те же сроки. Результаты представлены в таблицах 21 (биологический титр) и 22 (ПЦР-РВ по показателю C_t). Автору следовало оценить корреляцию между результатами детекции вируса двумя разными методами. Это позволило бы


сделать более убедительным вывод о большей чувствительности метода ПЦР-РВ.

В разделе 2.2.7.2. (страница 61) автор пишет, что при проведении ПЦР-РВ положительными считались образцы, у которых кривая флуоресценции имела типичный для ПЦР в «реальном времени» S-образный вид, однако пересекалась с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции и значения порогового цикла (Ct) не превышало значения 35. В этом случае результаты, полученные на 2 сутки с образцами шейного отдела спинного мозга и на 12-е сутки с поясничным отделом спинного мозга следует считать отрицательными (таблица 22). В тексте диссертации, а именно в таблице 22 указано, что в плазме крови обезьян, инфицированных штаммом «Орлов-14» на 12-е и 21-е сутки методом ПЦР-РВ определялась вирусная РНК. Но в таблице 21, в которой представлены результаты титрования на клетках, данные об определении вируса в плазме отсутствуют. В целом по разделу 3.3. не понятно, какие данные позволяют автору сделать заключение, что аналитическая чувствительность метода ПЦР-РВ превышает аналитическую чувствительность реакции ЦПД на 1,7 – 3,3 lg. В силу вышеизложенного вывод «Показана информативность метода ПЦР-РВ при контроле диссеминации аттенуированных штаммов и возможность использования ПЦР-РВ в качестве дополнительного теста при оценке специфической безопасности вакцинных штаммов для живых противовирусных вакцин» спорен и не подтвержден собственными данными автора.

Сделанные замечания носят принципиальный характер, касаются как актуальности темы исследования, так и анализа литературы по теме диссертации, методологии исследования, полученных результатов. Все выше сделанные замечания не позволяют однозначно утверждать, что диссертация и автореферат соответствуют критериям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016

№ 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539, от 26.09.2022 №1690, от 26.01.2023 №101 предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а сама автор, Шамсутдинова Ольга Анатольевна, по совокупности представленных ею материалов, актуальности темы выполненной диссертации, научно-практической значимости и ценности полученных результатов, личному вкладу, не достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Официальный оппонент: доктор медицинских наук, профессор
Руководитель лаборатории опасных и социально значимых инфекций
Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр
стратегического планирования и управления медико-биологическими
рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства

02. марта 2023 

Игнатьев Георгий Михайлович

Почтовый адрес: 119121, Москва, Погодинская д. 10с1.
+7 (499) 245-03-14, info@cspfmba.ru
<http://www.cspmz.ru/contacts/>

Подпись д.м.н., профессора Г.М. Игнатьева заверяю

Заместитель генерального директора





Никитин Николай Иванович