



Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека

**Федеральное казённое учреждение
здравоохранения «Ставропольский научно-
исследовательский противочумный
институт» Федеральной службы по надзору
в сфере защиты прав потребителей
и благополучия человека**

(ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора)

355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д.13-15

Тел/факс: (865-2) 26-03-12

E-mail: snipchi@mail.stv.ru

ОКПО 01897080 ОГРН 1022601949930

ИНН 2636000641 КПП 263601001

12.05.2014 № 931

на № _____ от _____

[О направлении отзыва официального
оппонента на диссертацию]

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Ульяновой Онеги Владимировны «Методология повышения безопасности бактериальных вакцин на модели вакцинных штаммов *Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Вакцины – препараты, предназначенные для создания иммунитета в организме привитых людей или животных. Вакцины изготавливаются из ослабленных или убитых микроорганизмов, продуктов их жизнедеятельности, или из их антигенов, полученных химическим или генно-инженерным путём. Экспертами международных организаций по контролю за вакцинацией разработан ряд критериев эффективных вакцин, некоторые из них: безопасность, протективность, поддержание протективного иммунитета и т.д. При реализации любых программ массовых иммунизаций важным является соотношение между безопасностью вакцин и их эффективностью. К сожалению, на сегодняшний день в большинстве случаев частота осложнений вакцинации тем выше, чем выше ее эффективность. Задачей современной вакцинологии является постоянное совершенствование вакцинных препаратов. В связи с чем, **актуальность** избранной темы диссертационной работы Ульяновой О.В. не вызывает сомнений.

Цель диссертационной работы Ульяновой О.В., «теоретико-экспериментальное обоснование методологии повышения безопасности вакцинных штаммов *Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ», с успехом достигнута.

Задачи исследования адекватны поставленной цели и включают всесторонний анализ безопасности живых вакцин, инактивации бактерий методом фотодинамического воздействия, взаимодействия бактериальных взвесей *E. coli* и *P. aeruginosa* разных штаммов с оптическим излучением, влияния синглетного кислорода на свойства бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *Y. pestis* EV НИИЭГ до и после фотодинамического воздействия, безвредности, остаточной вирулентности и реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, а также реактогенности на тканевом и организменном уровнях вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ до и после фотодинамического воздействия. В последнем случае применены методы спекл-микроскопии и спекл-имиджинга. Задачи исследований раскрыты в основных положениях, выносимых на защиту.

Диссертация построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов, списка принятых в работе сокращений и списка литературы, включающего 337 источников. Работа иллюстрирована 15 таблицами и 111 рисунками. Исследования диссертанта выполнены в рамках НИР, грантов РФФИ и госконтрактов (2001-2014 гг.).

Во введении автором представлена актуальность, степень разработанности проблемы, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, апробация результатов исследования, личный вклад автора, публикации, структура и объем диссертации.

Обзор литературы состоит из четырех разделов, в которых достаточно подробно освещены вопросы современного состояния вакцинопрофилактики бруцеллеза, туляремии, чумы. Достаточно полно представлен материал по способам повышения и оценке безопасности вакцин против бруцеллеза, туляремии и чумы.

В главе 2 диссертантом описаны объекты, материалы и методы исследования, примененные в работе. Основными являлись: методы оценки жизнеспособности, культурально-морфологических и серологических свойств бак-

терий, методы по определению остаточной вирулентности, безвредности и реактогенности *in vivo* вакцинных штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА, а также статистические.

В главе 3 представлен выбор бактериальных штаммов *E. coli* В6, *E. coli* К 12, *E. coli* О 1, *P. aeruginosa* 27533 и *P. aeruginosa* 27853 с типичными микробиологическими свойствами, фотосенсибилизатора - метиленовый синий в концентрациях 0,05 %; 0,005 % и 0,0005 % и лазерные диоды с длиной волны излучаемого света $\lambda = 650$ нм, световые диоды, с такой же длиной волны и шириной полосы излучения $\lambda_{\Delta} = 10$ нм, лазер ($\lambda = 630$ нм) для модельных экспериментов по инактивации бактерий методом ФДВ.

В данной главе представлена разработка установки для инактивации бактерий методом фотодинамического воздействия *in vitro* двух вариантов и описаны преимущества данной установки: возможность получения за один сеанс ФДВ препаративного количества (38,4 мл) инаktivированной бактериальной взвеси, достаточной для проведения экспериментальных микробиологических, серологических и биологических исследований, а также компактность установки и сохранение стерильных условий во время проведения ФДВ.

Ульяновой О.В. установлено, что на колониеобразующую способность бактерий *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp. при проведении инактивации влияют различные параметры ФДВ, которые подобрать эмпирическим путем чрезвычайно сложно. Поэтому, было принято решение провести анализ взаимодействия бактериальных клеток и лазерного излучения (ЛИ), построить математическую модель их взаимодействия для определения оптимальных параметров ФДВ, при которых будет происходить 100 % инактивация бактерий.

В работе было установлено, что все специфические механизмы взаимодействия ЛИ с живыми бактериями в первую очередь следует связывать не со спектральными характеристиками биообъекта и длиной волны лазера, а именно с динамикой короткоживущих биоспеклов.

Ульяновой О.В. проведено экспериментальное исследование процессов формирования биоспеклов внутри бактериальных взвесей различной концентрации. Для этого использованы модельные образцы. Движущиеся бактерии имитировали водной суспензией интралипида, которую добавляли в агар. В результате определено характерное среднее время флуктуаций спеклов, при котором происходит наиболее эффективное ФДВ на бактериальные клетки. Экспериментальные данные находятся в хорошем соответствии с теоретическими результатами, расхождение составляет менее 3 %.

При определении влияния концентрации клеток *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp. на размер биоспеклов, Ульяновой О.В. установлено, что корреляционная функция пространственного распределения интенсивности имеет вид дельта-функции. Это означает, что спекл-микроскопия не позволяет произвести точные измерения размеров спеклов, а позволяет провести лишь приближенную оценку. Средние размеры спеклов, образующихся в бактериальных взвесах концентрацией 10^7 – 10^9 м.к./мл, меньше или равны длине волны когерентного излучения, использованного в микроскопе, и составляют порядка 650 нм. Очевидно, что с ростом концентрации клеток в бактериальной взвеси увеличивается контраст и размеры спекл-полей, формирующихся внутри бактериальных взвесей при облучении.

Как показали проведенные Ульяновой О.В. исследования, результат инактивации клеток *E. coli* spp. и *P. aeruginosa* spp. под ФДВ зависит от комбинации таких параметров как концентрация клеток в бактериальной взвеси, концентрации фотосенсибилизатора, плотности мощности облучения и времени облучения. Для поиска оптимального их сочетания, необходимо провести математическое моделирование. Согласно проведенным предварительным экспериментам по инактивации бактерий *E. coli* spp., *P. aeruginosa* spp. методом ФДВ и математическому моделированию установлены оптимальные параметры фотовоздействия: использование бактериальных взвесей в концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./мл, раствора метиленового синего в концентрации 0,005 %, применение световых диодов в лабораторной установке для инактивации бактерий с плотностью мощности излучения 1 мВт/см^2 .

В главе 4 представлена характеристика бактерий вакцинных штаммов *Brucella abortus* 19 ВА, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Yersinia pestis* EV НИИЭГ после инактивации методом фотодинамического воздействия.

В связи с тем, что на результат инактивации бактерий влияет комбинация параметров ФДВ, автором проведено компьютерное моделирование взаимодействия бактериальной взвеси и светодиодного излучения. Как следует из результатов компьютерного моделирования при ФДВ на взвесь бактерий *B. abortus* 19 ВА, инактивация более 99 % клеток происходит после 6 мин облучения ($I = 1 \text{ мВт/см}^2$) в комбинации с 0,005 % МС. Однако эти данные потребовали проведения эксперимента *in vitro*, т.к. по результатам предварительных экспериментов, видно, что облучение даже в течение 1 ч не вызывает 100 % инактивации бактерий. Автором установлено, что клетки вакцинного штамма *B. abortus* 19 ВА после инактивации методом ФДВ ($I = 1 \text{ мВт/см}^2$;

МС = 0,005 %) в течение 3 ч полностью сохранили комплекс диагностически значимых специфических антигенов. Культура вакцинного штамма *F. tularensis* 15 после инактивации методом ФДВ ($I = 1 \text{ мВт/см}^2$; МС = 0,005 %) в течение 6 ч полностью утрачивает колониеобразующую способность, сохраняя при этом комплекс специфических антигенов.

Как показали результаты проведенных исследований по ФДВ ($I = 1 \text{ мВт/см}^2$, МС = 0,005 %; $t = 360$ мин) на бактерии вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, биохимическая активность после ФДВ сохранялась при применении вышеописанных параметров.

В главе 5 Ульяновой О.В. определялась безопасность вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полностью инактивированных методом ФДВ. Проведен сравнительный анализ безопасности указанных штаммов бактерий до и после фотоинактивации на морских свинках по показателям безвредности, остаточной вирулентности, реактогенности как регламентированными, так и когерентно-оптическими методами.

Автором сделано заключение, что культуры вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ оказались безопасными для лабораторных животных, поскольку после введения морским свинкам клеток вышеуказанных культур, инактивированных методом ФДВ в течение 3 ч (*B. abortus* 19 ВА) и 6 ч (*F. tularensis* 15 НИИЭГ) у животных отсутствовали специфические поражения, характерные для бруцеллезной и туляремийной инфекций.

Далее Ульяновой О.В. были проведены инструментальные исследования реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, до и после инактивации методом ФДВ. Автором разработаны научно-методические основы применения биосистем тканевого и организменного уровней для оценки реактогенности, разработаны и созданы экспериментальные диагностические биосистемы для определения реактогенности вакцинных штаммов на организменном уровне, основанной на спекл-имиджинге и на тканевом уровне, основанной на спекл-микроскопии. Экспериментально доказаны безвредность, отсутствие остаточной вирулентности и снижение реактогенности вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 после ФДВ на морских свинках.

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

Высокая степень достоверности и обоснованности полученных резуль-

татов и выводов диссертации не вызывает сомнений и показывает правильный выбор методических подходов.

По итогам всестороннего анализа полученных диссертантом данных представлены научные положения, выносимые на защиту и 9 выводов, которые в достаточной мере аргументированы, отражают содержание диссертации и отвечают цели и задачам исследования.

В автореферате и диссертации представлен информативный иллюстрационный материал. Автореферат полностью соответствует диссертационным исследованиям и отражает результаты работы.

В диссертационных исследованиях Ульяновой О.В. четко представлены степень разработанности проблемы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, методология и методы исследования.

Полученные Ульяновой О.В. данные вносят весомый вклад в разделы фундаментальной микробиологии, связанные с пониманием механизмов инактивации бактериальных клеток под действием оптического излучения, а также имеют значение для прикладной микробиологии в аспекте разработки методических подходов повышения безопасности вакцинных препаратов.

Теоретические и практические результаты, полученные при выполнении диссертационной работы, используются при чтении лекций по микробиологии студентам ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова».

Основные результаты диссертационной работы получены при личном участии диссертанта, что подтверждено научными публикациями, патентом и методическими документами.

Результаты диссертационных исследований представлены на конференциях различного уровня. По теме диссертации автором опубликовано 69 научных работ, в том числе 25 – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК РФ и 1 патент РФ.

Научная новизна работы заключается в следующем:

разработана для каждого вакцинного штамма бактерий *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ математическая модель условий фотодинамического воздействия и предложена методология повышения безопасности живых вакцин; разработана установка для фотодинамической инактивации взвесей бактерий *E. coli* разных штаммов, *P. aeruginosa*, *B. abortus* 19 ВА, *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *Y. pestis* EV НИИЭГ; изучены закономерности взаимодействия взвесей бактерий *E. coli* и *P. aeruginosa* с оптическим излучением; оценена степень

инактивации взвесей бактериальных клеток путем построения статистической модели влияния синглетного кислорода, образованного в ходе фотодинамического воздействия; доказано, что эффективная инаktivация происходит при обработке бактериальных взвесей в концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к./мл световыми диодами с длиной волны $\lambda = 650$ нм, плотностью мощности излучения 1 мВт/см^2 , концентрацией фотосенсибилизатора метиленового синего $0,005 \%$ с полной потерей жизнеспособности клеток *E. coli* B6, *E. coli* O1, *E. coli* K12 после 60 мин ФДВ, вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА – после 180 мин и *F. tularensis* 15 НИИЭГ – после 360 мин, что подтверждено отсутствием колониеобразующей способности на питательных средах с сохранением комплекса антигенов; доказаны безвредность, отсутствие остаточной вирулентности и снижение реактогенности бактерий вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, инаktivированных методом фотодинамического воздействия в экспериментах на морских свинках, при 100% выживаемости животных (подкожное введение); разработана методология применения стандартной биосистемы для оценки реактогенности вакцинных штаммов на тканевом и организменном уровнях с помощью лазерных установок методами спекл-микроскопии и спекл-имиджинга, показана неинвазивность использованных когерентно-оптических методов. Автором доказана безопасность вакцинных штаммов *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ на морских свинках после фотодинамической инаktivации в результате применения регламентированных и когерентно-оптических методов.

В процессе рецензирования данной работы возникли некоторые замечания и пожелания:

1. В главе 1.4. «Оценка безопасности живых вакцин» описаны методические указания и другие нормативные документы, регламентирующие требования к живым вакцинам *B. abortus* 19 ВА и *F. tularensis* 15 НИИЭГ, но отсутствуют данные описания по живой вакцине *Y. pestis* EV НИИЭГ;
2. В главе 3.1, собственных исследований, подробно описаны культурально-морфологические, биохимические свойства штаммов *E. coli* и *P. aeruginosa*, спектральные характеристики красителя метиленового синего. Эти данные общеизвестны, поэтому целесообразно было бы их представить в главе «Объекты, материалы и методы»;
3. На стр. 182 описана серия экспериментов по воздействию на вакцинный штамм чумного микроба излучением. Автором определено максимальное, оно

же и оптимальное время воздействия – 60 мин. Нельзя говорить, что это оптимальное время, так как экспозицию больше указанного времени не проводили;

4. Желательно было бы представить в диссертации «практические рекомендации», которые, несомненно, были бы полезны микробиологам и биотехнологам, ведущим исследования в данном направлении.

Данные замечания и пожелания ни в коей мере не умаляют достоинств данной работы.

**Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным
Положением о порядке присуждения ученых степеней**

По актуальности, научной новизне полученных результатов, теоретической и практической значимости, содержанию диссертационная работа Ульяновой О.В. «Методология повышения безопасности бактериальных вакцин на модели вакцинных штаммов *Brucella abortus* 19 BA, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ» является научно-квалификационной работой, отвечающей требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, соответствует паспорту специальности 03.02.03 – микробиология, а её автор, Ульянова Онега Владимировна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по искомой специальности.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник научно - производственной
лаборатории препаратов для диагностики
особо опасных и других инфекций ФКУЗ
Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора

Жарникова Ирина Викторовна Жарникова

Адрес: 355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д. 13-15.
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.
Тел: (865-2)26-03-12. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Подпись Ирины Викторовны Жарниковой заверяю:
Ученый секретарь ФКУЗ Ставропольский
противочумный институт Роспотребнадзора



А.Ю. Газиева