

## ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора Девдариани Зураба Левановича на диссертационную работу Гаркуша Юлии Юрьевны «Биотехнология производства композиционных органокремнеземных магноиммуносорбентов и их применение для детекции возбудителей особо опасных инфекций», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

### *Актуальность темы диссертационной работы*

От быстрого и достоверного обнаружения возбудителя инфекционной болезни в биологических пробах от человека или от переносчиков и носителей в природных резервуарах инфекции, а также зараженных объектах внешней среды напрямую зависит своевременность и эффективность проведения лечебных и санитарно-противоэпидемических и профилактических мероприятий. Особенно важны адекватные высокочувствительные и специфичные методы лабораторной экспресс-диагностики при обследовании территорий природно-очаговых инфекций, в том числе, особо опасных, или заражении патогенными микроорганизмами в случае актов биотерроризма, когда приходится работать с обильно контаминированным посторонней микрофлорой материалом или с небольшими концентрациями ПБА, например, в образцах воды природных водоемов. Этим требованиям индикации возбудителей опасных инфекционных болезней в наибольшей степени отвечает применение иммуносорбентов, где в качестве сорбционной матрицы предпочтение следует справедливо отдать органокремнеземам с магнитными свойствами.

Исследованиям по их изучению как метода лабораторной диагностики инфекционных заболеваний уже более 50 лет. За это время были

апробированы различные сорбенты, способы фиксации и сепарации объектов исследования, доказана высокая разрешающая способность иммуносорбентов с использованием специфических для патогена иммуноглобулинов. При этом следует отметить, что в Российской Федерации Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт является одним из пионеров в изучении возможностей диагностических магноиммуносорбентов в качестве метода индикации возбудителей особо опасных инфекций и имеет большой опыт проведения исследований в указанном направлении, располагая к тому же производственной базой для их практической реализации. Исходя из вышеизложенного, тема диссертационной работы Ю.Ю. Гаркуша, посвященная научно-обоснованной разработке биотехнологии производства магноиммуносорбентов для индикации возбудителей особо опасных инфекций, несомненно, является актуальной и имеет важное значение для практического здравоохранения.

### ***Научная новизна диссертационного исследования***

Научная новизна диссертации состоит в том, что впервые в результате проведенных исследований были оптимизированы структурные характеристики магносорбентов, определены контрольные и критические точки их производства, стандартизированы биотехнологические процессы промышленного изготовления препарата.

Впервые создан универсальный стандартный образец композиционного органокремнеземного магносорбента, обеспечивающий унификацию производства и контроль качества магноиммуносорбентных диагностических МИБП. Разработана оригинальная технология десорбции антигенов патогенных микроорганизмов с поверхности магнитоуправляемых микроразмерных частиц с последующим их выявлением методами иммуно- и генодиагностики инфекционных болезней (патент РФ на изобретение № 2535070 от 08.10.2014 г. «Способ элюции патогена с иммобилизованной магнитной матрицы»).

Сконструировано новое техническое устройство, способное пропускать большие объемы воды через магноиммуносорбент, тем самым улавливая и масштабируя небольшие количества патогена до определяемых магноиммуносорбентом концентраций, в отличие от разовых отборов проб ограниченного объема порядка 100 – 200 мл. (патент РФ на полезную модель № 133834 от 27.10.2013 г. «Радиоуправляемая самоходная плавающая портативная установка для экологического, эпидемиологического и микробиологического мониторинга объектов внешней среды»). Получен также патент РФ на ещё одну полезную модель № 129976 от 20.03.2012 г. «Универсальная укладка для забора и транспортировки материала от людей, животных и из объектов окружающей среды для исследования на особо опасные инфекционные болезни».

Кроме этого, научная новизна диссертационного исследования подтверждена ещё двумя патентами РФ на изобретения, связанными с биотехнологией производства магноиммуносорбентов для лабораторной диагностики особо опасных инфекций:

- Патент РФ на изобретение № 2652231 от 25.04.2018 г. «Способ получения стандартного образца магнитного сорбента для конструирования медицинских иммунобиологических препаратов»

- Патент РФ на изобретение № 2549971 от 03.04.2015 г. «Способ консервации иммунопероксидазного конъюгата».

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

Достоверность полученных диссертантом результатов и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций определяется:

- большим объёмом проведенных экспериментальных исследований в лабораторных условиях, а также в условиях серийного производства магноиммуносорбентов;

- использованием комплексного методического подхода для достижения поставленной цели и решения задач диссертационной работы с помощью современных биотехнологических, микробиологических, иммунологических, иммунохимических, физико-химических, биофизических методов исследования;

- применением статистических методов анализа полученных результатов с их математической компьютерной обработкой по специальной программе с расчетом значения средней квадратичной ошибки отдельного измерения, выборочной дисперсии, вероятного среднеарифметического квадратичного отклонения с достоверностью 95 %.

### *Теоретическая и практическая значимость*

В диссертации разработана унифицированная схема получения в промышленных условиях магносорбента, являющегося одним из базовых компонентов диагностических иммуносорбентов с магнитными свойствами, которая может быть использована при конструировании магноиммуносорбентных тест-систем для индикации возбудителей не только особо опасных, но и других инфекционных болезней. При этом все условия процессов и параметров производства магносорбента были стандартизированы, что позволило создать его стандартный образец (СО МС), разработать соответствующую нормативную документацию и зарегистрировать СО МС после проведения испытаний в реестре стандартных образцов учреждения разработчика и изготовителя – ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора – под регистрационным номером 007-9388-2015.

Кроме этого, разработаны условия десорбции туляремийного антигена с магноиммуносорбента, позволяющие не только использовать элюированный антиген для постановки иммуноферментного анализа, но и, как показали лабораторные испытания, проведенные в Ставропольском НИПЧИ, осуществлять его идентификацию с применением других методов

иммунодиагностики, а также рекомендовать для этих целей высокоэффективные генодиагностические методы, в частности, полимеразную цепную реакцию.

Помимо внедрения в практику результатов диссертационного исследования на учрежденческом уровне значительная часть из них внедрена на федеральном уровне. Так, получены регистрационные удостоверения Росздравнадзора и допущены к обращению на территории Российской Федерации два медицинских изделия:

- Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе «ИФА-Тул-СтавНИПЧИ» по (ТУ 9388-010-01897080-2009, № ФСР 2010 06744 от 26.12.2012 г.)

- Набор реагентов тест-система иммуноферментная магноиммуносорбентная для выявления возбудителя туляремии «ИФА-МИС-Тул-СтавНИПЧИ» по (ТУ 9388-006-01897080-2012, № РЗН 213 429 от 04.04.2013 г.).

#### *Апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях*

Материалы диссертации Ю.Ю.Гаркуши были представлены на одной Международной научно-практической конференции, трех Всероссийских научно-практических конференциях и трех Всероссийских научно-практических конференциях молодых ученых и специалистов.

Диссертация обсуждена на межлабораторной научной конференции сотрудников ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (протокол № 1 от 15.05.2019 г.)

Результаты проведенных Ю.Ю. Гаркуша исследований по теме диссертации достаточно полно отражены в научной печати. Всего опубликовано 25 научных работ, из них 5 статей, во входящих в перечень рекомендованных ВАК РФ научно-практических изданиях, 3 статьи в других

изданиях, 5 патентов на изобретение и полезную модель, а также 12 публикаций в материалах научно-практических конференций.

### *Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации*

Диссертация Ю.Ю. Гаркуша соответствует классическому плану построения и состоит из введения, обзора литературы, трех глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, а также приложения со сканированными документами, подтверждающими научную новизну и практическую значимость диссертационной работы. Диссертация изложена на 197 страницах компьютерного текста, содержит 17 таблиц и 37 рисунков. Список литературы включает 237 источников. Из них отечественных – 178 и зарубежных – 59.

В начале **литературного обзора** (глава 1) Ю.Ю.Гаркуша дает краткий анализ различных групп сорбентов и затем, опираясь на него, переходит к характеристике наиболее перспективных для решения поставленных задач кремнеземных материалов. Подчеркнут особый интерес исследователей и разработчиков к сорбентам с магнитными свойствами. При этом принцип иммуномагнитной сепарации проиллюстрирован наглядным и понятным цветным рисунком.

Очень важно, что в литературном обзоре (главы 1.1, 1.2 и 1.3) хорошо отражены биотехнологические аспекты проблем, которые могут возникнуть при конструировании диагностических иммуносорбентов и с которыми может столкнуться диссертант в процессе выполнения диссертационной работы. Четко и убедительно показаны основные преимущества применения магноиммуносорбентов в комбинации с ИФА в сравнении с использованием только одного иммуноферментного анализа. Это касается, прежде всего, исследования проб окружающей среды, в том числе, очень больших объемов с высокой степенью загрязненности и низкой концентрацией ПБА. Описаны

также принципы неспецифической десорбции антигена и сам процесс, эффективность которого, судя по представленным литературным данным, зависит от разнообразных параметров, влияющих на конечный результат.

В главе 1.4 обзора литературы, на мой взгляд, слишком подробно обосновывается выбор в качестве экспериментальной модели возбудителя туляремии – природно-очаговой особо опасной инфекции, широко распространенной на территории Российской Федерации.

Несколько необычно, что только во 2 главе в отличие от других глав собственных исследований сформулирована цель и перечислены задачи, которые предстояло решить в её рамках. Вне всяких сомнений следует согласиться с диссертантом, что стандартизация технологии производства и системы контроля качества магносорбента, являющегося базисным компонентом диагностических магноиммуносорбентов, то есть фактически использование в производстве аттестованного универсального стандартного образца МС, позволит производить стандартные серии магноиммуносорбентных препаратов для лабораторной диагностики как особо опасных, так и других опасных инфекционных болезней.

На первом этапе **собственных исследований** (гл.2.1) по разработке технологической схемы производства с учетом анализа данных литературы был определен оптимальный вариант сорбента и его магнитного компонента, а затем отработаны условия синтеза алюмосиликатного МС. Все основные стадии в технологической схеме производства стандартного образца МС - от подбора и обработки составляющих его компонентов до фасовки и упаковки конечного продукта - были обоснованы результатами проведенных автором экспериментальных исследований и сопровождаются наглядным иллюстративным материалом.

На следующем этапе (гл.2.2) был разработан алгоритм производственных процессов стандартного образца МС, определены контрольные точки для ключевых технологических операций изготовления

СО МС и его аттестуемые характеристики с описанием способов оценки заложенных в них значений.

В последнем разделе второй главы собственных исследований (гл.2.3) представлены разработанные автором нормативные документы на стандартный образец магносорбента с описанием назначения каждого из них.

В соответствии с принятой процедурой внедрения в практику результатов научных исследований нормативные документы на разработанный Ю.Ю.Гаркуша стандартный образец магносорбента были рассмотрены и одобрены ученым советом Ставропольского НИПЧИ (протокол №5 от 18.06.2015 г.) и утверждены директором института. Сам же стандартный образец был зарегистрирован в реестрестандартных образцов Ставропольского НИПЧИ под № 007-9388-2015.

В **3 главе** с логической последовательностью представлены материалы по разработке Ю.Ю.Гаркуша технологии производства туляремийной диагностической магноиммуносорбентной тест-системы. Как и следовало ожидать, на первом этапе (гл.3.1) усилия диссертанта были направлены на получение комплексного антигена *F.tularensis*, в котором содержался набор белковых фракций из известных подвидов этого возбудителя. На основе анализа протеинограмм водорастворимых антигенов 7 штаммов *F.tularensis* диссертантом были отобраны 3 штамма разных подвидов туляремийного микроба. Надо отметить, что полигрупповой водорастворимый антиген и кроличьи антисыворотки Ю.Ю.Гаркуша получала по наиболее адекватным для поставленной задачи схемам, ранее разработанными сотрудниками Ставропольского НИПЧИ, которые приведены в диссертации со ссылками на литературный источник. Удачным оказалось использование автором для гипериммунизации кроликов избирательного иммуномодулятора антителообразования и классического иммуносупрессора Т-лимфоцитов для получения антисывороток с высоким титром антител. Следует также отметить, что для удаления в кроличьей гипериммунной сыворотке перекрестно-реагирующих антител с бруцеллами была проведена



иммуносорбция с использованием алюмосиликатного бруцеллезного антигенного магноиммуносорбента. При этом удалось сохранить их исходную первоначальную активность. Этот факт лишний раз подтверждает широкие возможности и полезные свойства магноиммуносорбентов.

В главе 3.1.2, посвященной получению диагностических иммуноглобулинов для иммуноферментного анализа, наряду с известным методом мечения пероксидазой хрена антител по Наканэ и Коваои автором диссертации использован оригинальный способ консервации иммунопероксидазного конъюгата (патент РФ на изобретение № 2549971, в котором Ю.Ю.Гаркуша является одним из соавторов). Далее представлена характеристика 5 серий иммунопероксидазного туляремийного конъюгата и подробная схема технологического процесса по стадиям производства коммерческого набора реагентов «ИФА-Тул-СтавНИПЧИ».

При лабораторных испытаниях сконструированной магноиммуносорбентной тест-системы для обнаружения возбудителя туляремии (гл.3.1.3) удалось достичь высокой специфичности и особенно чувствительности, которая на 3 порядка (!) превышала этот показатель при постановке только традиционного сэндвич-варианта иммуноферментного анализа. Особенно важно то, что эти результаты были подтверждены в реальных условиях практического применения при проведении полевых сравнительных испытаний в природных очагах туляремии Ставропольского края (гл.3.2).

Кроме этого, Ю.Ю.Гаркуша является соавтором модели плавающей установки для отбора проб воды открытых водоемов с использованием ловушек с магноиммуносорбентами для конкретного патогена, а также усовершенствованной укладки для транспортировки проб объектов для лабораторного исследования, описание устройства которых представлено в гл. 3.3.

Универсальность селективного концентрирования микроорганизмов состоит в том, что с целью индикации ПБА помимо постановки ИФА, когда

магноиммуносорбент выступает в качестве твердой фазы, можно использовать другие иммунодиагностические методы, такие как РНГА, реакция коаггутинации и латексной агглютинации или иммунохроматографические тест-системы и ряд других, а также применять генодиагностические методы, в частности, ПЦР. Для этого необходимо было отработать технологию десорбции антигена с поверхности магнитной иммобилизованной матрицы. Ю.Ю.Гаркуша, судя по представленным в гл.4 результатам, успешно справилась с этой задачей. Разработанный ею способ элюции с магноиммуносорбента оказался эффективным для обнаружения туляремийного микроба с помощью иммунодиагностических реакций и генодиагностической ПЦР. Параллельно с этим был решен важный с экономической точки зрения вопрос о повторном многократном использовании магнитного иммуноглобулинового сорбента для селективного концентрирования возбудителя из объектов внешней среды. На основании результатов описанных в гл.4 исследований был создан «Набор реагентов магноиммуносорбент туляремийный с элюирующим буфером», технология изготовления которого представлена в конце указанной главы диссертации в виде схемы технологического производственного процесса по стадиям.

**В заключении** автор приводит сжатое описание наиболее значимых достигнутых результатов диссертационного исследования.

**Выводы** согласуются с поставленными задачами и положениями, вынесенными на защиту, отражают суть проведенной работы и свидетельствуют о достижении цели диссертационного исследования.

В диссертации отмечен личный вклад автора на всех этапах выполнения диссертационной работы и помощь отдельных сотрудников Ставропольского НИПЧИ в получении и исследовании полевого материала, а также в проведении генетических исследований и сотрудников Северо-Кавказского федерального университета в физико-химической характеристике и определении магнитных свойств магносорбента.

Диссертация написана понятным литературным языком, достаточно легко читается, несмотря на большой объем представленного материала.

Автореферат диссертации соответствует её содержанию, полученным результатам и выводам.

Тем не менее, хочу остановиться на отдельных **вопросах** и замечаниях по диссертационной работе Ю.Ю. Гаркуша:

1. В последнем абзаце на стр. 85 утверждается, что цит. «...результаты проведенных исследований по сохранению стабильности аттестуемых характеристик в процессе хранения позволяют рекомендовать гарантийный срок хранения СО МС 3 года». Этот же срок приводится автором в заключении к 2 главе (стр.89). В то же время в итоговом заключении по диссертации рекомендуемый срок хранения равен 1 году (стр. 138), а по данным экспериментальных исследований стабильности аттестуемых показателей срок изучения ограничен 18 месяцами (табл.5 на стр.83). Так каков всё же срок хранения СО МС - весьма важный с практической точки зрения показатель качества препарата?

2. На мой взгляд, объём диссертации без особого ущерба для её содержания можно было бы сократить, В частности, как я ранее отмечал, слишком растянута гл.1.4 литературного обзора. Не обязательно было писать заключение к каждой главе диссертации, поскольку все материалы по главам обобщены в общем заключении диссертационной работы.

3. Заголовок к гл. 3 сформулирован таким образом, что подразумевает применение магноиммуносорбентов в лабораторной диагностике, по крайней мере, нескольких особо опасных инфекций. На самом же деле, МИС применены в лабораторной диагностике одной из бактериальных особо опасных инфекций – туляремии. Другое дело, что успешное использование МИС для разработки и внедрения в практику туляремиального диагностического магноиммуносорбентного препарата дает право автору обоснованно рекомендовать их для лабораторной диагностики других и не только особо опасных инфекций.

4. В списке литературы под № 121, где авторами патента (если ориентироваться на фамилии), насколько мне известно, являются сотрудники Ставропольского НИПЧИ, то почему заявитель и патентообладатель – Иркутский НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока?

5. На стр. 21 и 22 небольшая путаница с рисунками 2А и 2Б. Во-первых, нужно было их пронумеровать, как положено по ГОСТ Р 7.0.11, последовательно - рис.2 и рис.3 - и, во-вторых, под рис.2 и рис.3 разместить соответствующий текст с обозначением различных материалов или устройств.

Отмеченные замечания и вопросы не влияют на общую высокую положительную оценку диссертационной работы Ю.Ю.Гаркуша, имеющую важное прикладное значение для практического здравоохранения.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Юлии Юрьевны Гаркуша на тему «Биотехнология производства композиционных органомкремнеземных магноиммуносорбентов и их применение для детекции возбудителей особо опасных инфекций», является законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством доктора медицинских наук, профессора Ирины Степановны Тюменцевой, в которой изложены новые научно-обоснованные технологические решения, связанные с разработкой биотехнологии производства диагностических кремнеземных магноиммуносорбентов, имеющих важное значение для санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации от особо опасных бактериальных инфекций.


Диссертационная работа Юлии Юрьевны Гаркуша, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) по актуальности, научной новизне и практической значимости результатов, объему проведенных исследований соответствует требованиям пункта 9 «Положения

о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 24.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор Юлия Юрьевна Гаркуша заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

### Официальный оппонент

Доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник отдела информационного обеспечения научных исследований Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 410005 г.Саратов, ул. Университетская, д.46; тел.: +7(845-2) 26-21-31 E-mail: rusrapi@microbe.ru


доктор медицинских наук,  
профессор

 Девдариани Зураб Леванович  
25.12.2020 г.

Подпись доктора медицинских наук, профессора  
Девдариани Зураба Левановича заверяю:  
Ученый секретарь

Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

кандидат медицинских наук

 Кедрова Ольга Викторовна