

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ФКУЗ Ставропольский  
противочумный институт

Роспотребнадзора

Куличенко Александр Николаевич

«20» 06 20 19г.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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)

Диссертация «Биотехнология производства композиционных органокремнеземных магноиммуносорбентов и их применение для детекции возбудителей особо опасных инфекций» выполнена в научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

В период подготовки диссертации соискатель Гаркуша Юлия Юрьевна работала в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в должности биолога научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций.

В 2001 году окончила Ставропольский государственный университет по специальности «Биология».

Справка об обучении №1364 выдана 30.05.2018 году Федеральным государственным бюджетным образовательным учреждением высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет».

Дано разрешение выполнять диссертационные исследования в научно-производственной лаборатории ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора согласно Приказу № 175А от 02.09.2016 г.

Тема диссертационного исследования утверждена на заседании Ученого совета ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора от 02.09.2016 года, протокол № 8.

Научный руководитель:

– доктор медицинских наук, профессор Тюменцева Ирина Степановна, Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, научно-производственная лаборатория препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций, главный научный сотрудник.

По итогам обсуждения принято следующее заключение:

Диссертация Гаркуша Ю.Ю. является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена научная проблема по биотехнологии производства композиционных органокремнеземных магноиммуносорбентов и их применению для детекции возбудителей особо опасных инфекций, что имеет важное значение для усовершенствования лабораторной диагностики.

Диссертационная работа Гаркуша Ю.Ю. выполнена в соответствии с тематикой и планом научно-исследовательской работы ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора в рамках НИОКР: «Разработка стандартного образца предприятия (СО) магносорбента (МС)» (№ ГР 01201456169) и «Разработка

магноиммуносорбента туляремийного с элюирующими растворами для серологических и генетических исследований» (№ ГР 01201169579). Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в выборе темы диссертации, формулировке цели и задач, проведении биотехнологических, микробиологических, иммунологических, иммунохимических исследований, разработке алгоритмов, схем, анализе и интерпретации полученных данных, написании основных публикаций, диссертации и автореферата. Автором выполнен весь объем исследований по разработке биотехнологии производства композиционных магноиммуносорбентов. Совместно с коллективом сотрудников научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора: д.м.н., профессором Афанасьевым Е.Н., д.б.н. Жарниковой И.В., к.б.н. Ждановой Е.В., к.б.н. Старцевой О.Л. разработана нормативная документация, проведены межлабораторные, государственные и технические испытания диагностических препаратов для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе, налажен их производственный выпуск.

Помощь в получении и исследовании полевого материала оказывали: заведующий лабораторией природно-очаговых инфекций ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, к.б.н. Котенев Е.С., сотрудник лаборатории природно-очаговых инфекций ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, биолог Гнусарева О.А. Генетические исследования проведены совместно с заведующим лабораторией биохимии ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, к.х.н.

Ковалев Д.А. Удельную поверхность магносорбента, суммарный объем и радиус пор, количественную оценку магнитных свойств магносорбента проводили при содействии сотрудников Северо-Кавказского федерального университета на базе кафедры технологии наноматериалов Инженерного института: д.т.н., профессора Серова А.В., старшего преподавателя кафедры Блинова А.В.

Использование адекватных методов и методологических подходов для решения поставленных задач, объем проведенных исследований, достаточный для корректной статистической обработки данных, позволяют считать результаты исследований достоверными и не вызывающими сомнений. Сделанные автором выводы и рекомендации аргументированы и вытекают из результатов проведенных исследований.

Научная новизна исследований обусловлена тем, что впервые стандартизирован элементный состав микрогранулированного магносорбента на основе алюмосиликата и отработан процесс его производства, определены контрольные и критические точки, что позволяет получать продукт с постоянными заданными свойствами. На этой основе впервые разработан стандартный образец ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора композиционного органомеземного магносорбента (регистрационный номер 007-9388-2015) (патент РФ на изобретение № 2652231 от 25.04.2018 г.). Опираясь на технологическую схему изготовления стандартного образца магносорбента, определены основные параметры для иммобилизации специфических иммуноглобулинов на его поверхности для получения аффинного магносорбента (магноиммуносорбента). Впервые разработана магноиммуносорбентная тест-система для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе. Впервые разработана технология элюирования антигенов с иммобилизованной магнитной матрицы (органомеземного магноиммуносорбента) (патент РФ на изобретение № 2535070 от 10.12.2014 г.), оптимизированы параметры серологических реакций (РНГА и РАЛ).

Разработаны условия многократного использования МИС после десорбции антигена, что снижает материальные и трудовые затраты при проведении лабораторных исследований. Разработана биотехнология производства туляремийного иммунопероксидазного конъюгата, способ консервации конъюгата пероксидазы хрена (КПХ) (патент РФ на изобретение № 2549971 от 10.05.2015 г.). Разработаны технические устройства для забора проб из объектов окружающей среды с применением МИС (патент РФ на полезную модель «Универсальная укладка для забора и транспортировки материала от людей, животных и из объектов окружающей среды для исследования на особо опасные болезни» № 125976 от 20.03.2013 г., патент РФ на полезную модель «Радиоуправляемая самоходная и плавающая портативная установка для экологического, эпидемиологического и микробиологического мониторинга объектов водной среды» № 133834 от 27.10.2013 г.).

Практическая значимость исследования состоит в том, что разработанный алгоритм процессов и параметров биотехнологии производства магноиммуносорбента позволяет получить конечный продукт со стандартными элементным составом, физико-химическими и иммунобиологическими характеристиками. Разработан стандартный образец Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека композиционного микрогранулированного магносорбента (регистрационный № 007-9388-2015), применение которого предусматривается при конструировании и выпуске магноиммуносорбентных тест-систем на основе органокремнеземной матрицы. Разработан метод элюции антигена с поверхности магнитной иммобилизованной матрицы, который позволяет расширить возможности лабораторной диагностики инфекционных болезней и индикации их возбудителей. Разработанные методы регенерации магноиммуносорбента после проведения элюции позволяют использовать аффинный сорбент многократно, что значительно снижает материальные и

трудозатраты. Получены регистрационные удостоверения Росздравнадзора, и следующие препараты допущены к обращению на территории Российской Федерации: набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе (ИФА) (по ТУ 9388-010-01 897080-2009, № ФСР 2010/06744 от 26.12.2012 г.); набор реагентов тест-система иммуноферментная магноиммуносорбентная для выявления возбудителя туляремии (по ТУ 9388-006-01897080-2012, № ФЗН 2013/429 от 04.04.2013 г.). Разработана нормативная документация, включающая программу разработки, инструкцию по применению и свидетельство на стандартный образец магносорбента, одобренная Ученым советом и утвержденная директором института (протокол № 5 от 18.06.2015 г.). Стандартный образец магносорбента зарегистрирован в реестре стандартных образцов Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, регистрационный номер 007-9388-2015. На Ученом Совете Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека утверждена нормативная документация: технические условия (ТУ) 9388-039-01897080-2013 и пусковой регламент (ПУР) № 01897080-28-13 на «Набор реагентов магноиммуносорбент туляреминый с элюирующим буфером» (протокол № 8 от 03.09.2013 г.).

Ценность научных работ соискателя состоит в получении результатов, имеющих непосредственное значение для усовершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекций, в том числе туляремии: на основе разработанного стандартного образца композиционного органокремнеземного магносорбента и поликлональных туляреминых иммуноглобулинов сконструирован магноиммуносорбент для выявления *Francisella tularensis* (*F. tularensis*) в объектах окружающей среды.

Многочисленные лабораторные и полевые испытания этого аффинного магносорбента продемонстрировали его высокую диагностическую ценность, возможность исследования сильно загрязненного материала неограниченного объема. Разработана технология изготовления туляремийного иммунопероксидазного конъюгата для выявления *F. tularensis*. «Набор реагентов тест-системы диагностической для выявления возбудителя туляремии в ИФА» зарегистрирован в Росздравнадзоре (№ФСР 2010/06744) и допущен к обращению на территории РФ. Сконструирован «Набор реагентов тест-системы иммуноферментной магноиммуносорбентной для выявления возбудителя туляремии» (регистрационное удостоверение № РЗН 2013/429, сертификат соответствия Федерального Агентства по техническому регулированию и метрологии № 1405362), который обеспечивает повышение специфичности и чувствительности ИФА до 10 м.к./мл и достоверность получаемых результатов исследования. При постановке сочетанного метода ИФА+МИС функцию сенсibilизированных микропланшет, традиционно используемых в ИФА, выполняет аффинный магносорбент. Препарат допущен к обращению на территории РФ и используется в работе лабораторной службы Роспотребнадзора. Впервые разработана технология элюирования антигенов с сохранением их нативности после проведенного селективного концентрирования на аффинном магносорбенте, что дало возможность исследовать материал в таких серологических реакциях как РНГА и РАЛ, при этом используют один из растворов: 1 % раствор пепсина, рН 6,2; 2 % раствор твин 20, рН 5,6; 0,03 М раствор калия едкого, рН 11,4; 60 % раствор ацетонитрила, рН 8,5; ТРИС-ЭДТА буфер, рН 8,9. Разработаны условия многократного использования МИС после десорбции антигена. Разработаны технические устройства для забора проб из объектов окружающей среды с применением МИС: универсальная укладка для забора и транспортировки материала от людей, животных и из объектов окружающей среды для исследования на особо опасные болезни (патент № 125976 от 20.03.2013 г.) и радиоуправляемая самоходная и плавающая

портативная установка для экологического, эпидемиологического и микробиологического мониторинга объектов водной среды (патент № 133834 от 27.10.2013 г.).

По тематике, метода исследования, предложенным новым научным положениям и выводам диссертационная работы соответствует паспорту специальности научных работников 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) (биологические науки) и области исследования: пункты 3 – «Изучение и разработка технологических режимов микроорганизмов-продуцентов, ... создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их решения», 4 – «Изучение и разработка процессов и аппаратов, ... экстракции, выделения, фракционирования, очистки, ... контроля и хранения конечных целевых продуктов».

Разработанные автором диссертации «Набор реагентов тест-система иммуноферментная магноиммуносорбентная для выявления возбудителя туляремии» и «Набор реагентов тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе» используются в работе лабораторной службы Роспотребнадзора на территории России.

Основное содержание диссертации отражено в 25 опубликованных работах, в том числе 5 статей в рецензируемых научных изданиях и 5 патентов РФ на изобретения. Опубликованные работы отвечают тематике диссертационного исследования и полностью раскрывают его содержание.

Наиболее значительные научные работы по теме диссертации:

1. Тюменцева, И.С. Антигены и антисыворотки *Francisella tularensis*: к вопросу иммунодиагностики туляремии / И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, Е.В. Алиева, С.А. Курчева, Ю.Ю. Гаркуша // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2012. – № 1(25). – С. 49-52 (**из перечня ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий**).
2. Гаркуша, Ю.Ю. Разработка методов десорбции антигенов инфекционных патогенов с поверхности магнитоуправляемых микроразмерных частиц для их детекции в серологических и генетических исследованиях / Ю.Ю.



Гаркуша, Е.Н. Афанасьев, И.С. Тюменцева, И.В. Жарникова, С.А. Курчева, Е.В. Жданова, О.Л. Старцева // Технологии живых систем. – 2013. – Т. 10, № 5. – С. 51-54 (из перечня ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий).

3. Тюменцева, И.С. Оптимизация системы контроля биотехнологии медицинских иммунобиологических препаратов, выпускаемы ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора [Электронный ресурс] / И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, С.А. Курчева, Ю.Ю. Гаркуша, А.А. Семирчева, О.Л. Старцева, Е.В. Жданова // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – №6. – С. 14-23 – Режим доступа: <http://www/science-education.ru/rules/120-16655> (дата обращения: 23.12.2014) (из перечня ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий).

4. Тюменцева, И.С. Разработка стандартных условий биотехнологии производства иммуномагнитного сорбента для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний / И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, О.Л. Старцева, С.А. Курчева, И.В. Жарникова, Ю.Ю. Гаркуша, Е.В. Жданова, С.М. Кальной // Технологии живых систем. – 2017. – Т. 14, № 2. – С. 52-54 (из перечня ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий).

5. Гаркуша, Ю.Ю. Определение стабильности основных показателей качества стандартного образца магносорбента / Ю.Ю. Гаркуша, И.С. Тюменцева, С.А. Курчева, О.Л. Старцева, И.В. Жарникова, А.Г. Кошкидько, А.С. Геогджаян // Здоровье населения и среда обитания. – 2018. – № 7 (304). – С. 48-51 (из перечня ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий).

Диссертация «Биотехнология производства композиционных органокремнеземных магноиммуносорбентов и их применение для детекции возбудителей особо опасных инфекций» рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заключение принято на заседании Ученого совета ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

Присутствовало на заседании 47 человек Результаты голосования: «за» – 47 чел.; «против» – 0 чел., «воздержалось» – 0 чел., протокол № 1 от «15» мая 2019 г.

Председатель Ученого совета,  
директор ФКУЗ Ставропольский  
противочумный институт Роспотребнадзора  
член-корреспондент РАН,  
доктор медицинских наук,  
профессор



Куличенко А. Н.

Ученый секретарь  
ФКУЗ Ставропольский противочумный  
институт Роспотребнадзора,  
к.б.н.

 Красовская Т.Л.

355035, г. Ставрополь, ул. Советская, д.13-15  
Тел.: (865-2) 26-03-12  
E-mail: stavnipchi@mail.ru