

## **Отзыв**

официального оппонента на диссертацию Ерш Анны Васильевны «Разработка диагностического набора для выявления антител к возбудителям кори, краснухи и эпидемического паротита методом мультиплексного дот-анализа», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

Среди детских болезней, управляемых средствами активной иммунизации, видное место занимают корь, краснуха и эпидемический паротит. Это острые высококонтагиозные инфекционные заболевания, способные вызывать масштабные эпидемии, высокую смертность и множество опасных осложнений. Основным методом борьбы с ними является плановая и масштабная вакцинация. Эти мероприятия проводятся в рамках программ ВОЗ, а также национальных проектов с целью снижения заболеваемости и последующей элиминации указанных инфекций. Одним из основных способов оценки эффективности вакцинопрофилактики является серомониторинг населения с целью выявления и вакцинации лиц, не имеющих защитного иммунитета. Используемые в настоящее время методы серомониторинга сложны, могут выполняться только в специализированных лабораториях и малодоступны для людей, проживающих в отдаленных населенных пунктах. Существующие серологические тесты моноспецифичны, и выявление с их помощью антител к перечисленным инфекциям представляет собой длительную и дорогую процедуру, а результаты разных анализов трудно свести в единую систему для формирования персональных иммунологических профилей.

В этой связи, диссертационная работа А.В. Ерш посвящённая решению созданию автономного, простого в использовании и недорогого диагностического набора, позволяющего осуществлять одновременное выявление антител к возбудителям кори, краснухи и эпидемического паротита в препаратах крови с целью комплексной оценки поствакцинального иммунитета, является, несомненно, актуальным исследованием. Особую значимость эта работа приобретает в настоящее время – в период реализации национальной программы по снижению и элиминации кори, краснухи и эпидемического паротита.

### **Соответствие содержания и оформления диссертации требованиям ВАК**

Диссертационная работа написана в традиционной форме и изложена на 154 страницах текста, включает 13 таблиц и 24 рисунка. Состоит из

введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, выводов, списка источников информации и 5 приложений. Список литературы включает в себя 187 источников, из них – 120 иностранных.

Во "Введении" раскрывается актуальность работы, изложены цели и задачи исследования, научно-практическая значимость работы, научные положения, выносимые на защиту, отмечен личный вклад соискателя в диссертационную работу и указаны фрагменты работы, выполненные в соавторстве другими исследователями.

Обзор литературы содержит описание эпидемиологических особенностей кори, краснухи и эпидемического паротита; характеристик их возбудителей, программ и средств вакцинопрофилактики, способов оценки поствакцинального иммунитета. Большой раздел обзора посвящен подходам к созданию набора для мультиплексного анализа: используемым материалам, методам иммобилизации биомолекул на белковой матрице, способам регистрации иммунологического связывания и сложностям мультиплексного тестирования. В целом в обзоре литературы нашли отражение все вопросы, имеющие отношение к диссертационной работе соискателя. Анализ научной литературы позволил обосновать выбор подхода для выполнения диссертационного исследования.

В главе «Материалы и методы» приводятся методы и процессы, использованные в работе, в частности, при исследовании структуры поверхности образцов синтетической бумаги применялась световая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия и атомно-силовая микроскопия. Описаны процедуры изготовления белковых матриц, проведения дот-иммуноанализа и иммуноферментного анализа. Описанные методы и процедуры адекватны цели и задачам исследования.

В третьей главе изложены результаты собственных исследований автора по выбору использованных в дальнейшем материалов, отработке условий иммобилизации антигенов, оптимизации способа выполнения анализа. Обоснованы и детально описаны технологические приемы на стадиях изготовления набора для мультиплексного анализа. Работа завершена созданием и успешными испытаниями экспериментальных образцов набора. Собственные разработки автора описаны достаточно подробно, Исследования всех компонентов и подходов проведены тщательно, с научно-практическим обоснованием сделанного выбора.

В заключении обобщены основные результаты исследований. Выводы достаточно лаконичны, конкретны и логически вытекают из полученных результатов. Текст диссертации написан хорошим литературным языком,

работа иллюстрирована графиками и таблицами, демонстрирующими результаты исследования.

В приложениях приведены утвержденные документы: инструкция по применению набора, методика приготовления его основных компонентов, отзыв и результаты испытаний набора в сторонних организациях и акт внедрения результатов исследований.

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

Целью исследования диссертант определил «разработку диагностического набора, позволяющего осуществлять мультиплексное выявление антител в препаратах крови к возбудителям кори, краснухи и эпидемического паротита». Для достижения этой цели автор выдвинула перед собой ряд задач по подбору материалов для создания набора, отработке приёмов его изготовления и применения, выпуску и испытаниям экспериментальных образцов набора.

Поставленные задачи успешно решены: экспериментально обоснован выбор материала и отработаны способы изготовления из него подложек белковых матриц; подобраны антигены вирусов кори, краснухи и паротита и оптимальные режимы их иммобилизации на поверхности твердой фазы; в сравнительных экспериментах обосновано применение хромогенной системы визуализации результатов анализа на основе коллоидного золота и осуществлен выбор вторичных иммунореагентов для ее изготовления; разработаны состав набора и дизайн входящих в него аксессуаров; отработана процедура применения набора; изготовлены его экспериментальные образцы и успешно проведены их испытания. Экспериментально доказано, что набор позволяет визуально регистрировать защитные уровни антител к вирусам кори и краснухи и может использоваться для комплексной оценки гуморального иммунитета, в том числе и в условиях недостаточно оснащенных медицинских учреждений.

Таким образом, поставленные в диссертации задачи решены, а цель достигнута. Работа выполнена на хорошем методическом уровне с применением современных материалов и оборудования. Выводы и рекомендации обоснованы и не вызывают сомнения.

### **Научная новизна и достоверность результатов**

Автором экспериментально оценены целевые свойства новых материалов для изготовления подложки белковой матрицы, произведен отбор антигенов, пригодных для использования в мультиплексном тесте и подобраны условия их иммобилизации, в том числе при нанесении антигенов

автоматическим устройством. Проведена сравнительная оценка наиболее перспективных вариантов хромогенной визуализации и усиления сигнала; отработана общая схема и оптимизированы условия выполнения мультиплексного теста. Разработана и запатентована оригинальная конструкция аналитической ванны и отработаны условия её заполнения рабочими растворами с помощью автоматического устройства, определён и запатентован состав набора для мультиплексного выявления антител. Итогом исследований явилось конструирование и испытание экспериментальных образцов для одновременного выявления антител класса IgG к 3 возбудителям детских инфекций. Достоверность результатов лабораторных испытаний экспериментальных образцов набора подтверждена итогами их апробации в двух сторонних учреждениях. Несомненным достоинством созданного набора является его пластичность – способность заменять и дополнять антигены в зависимости от санитарно-эпидемиологической ситуации и нужд органов здравоохранения.

Научная новизна подходов и полученных результатов подтверждена двумя Патентами РФ. Полученные соискателем результаты были многократно апробированы на различных конференциях и их достоверность не вызывает сомнений. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах перечня ВАК.

#### **Ценность для науки и практики выводов и рекомендаций диссертанта.**

Практическая значимость диссертации А.В. Ерш состоит в том, что автором предлагается новая методология комплексной оценки гуморального иммунитета, которая может использоваться в проведении скрининговых серологических исследований с целью выявления и дополнительного вакцинирования лиц, не имеющих защитного уровня антител. Описание способа применения набора позволяет предположить возможность его использования в медицинских учреждениях, не имеющих специализированных лабораторных подразделений, что особенно важно для амбулаторной службы.

Практическая направленность диссертационной работы выражена также в том, что для всех этапов изготовления набора отработаны технологические приемы, в том числе с использованием уникальных высокопроизводительных автоматических устройств. Разработаны инструкция по применению набора и методика приготовления его основных компонентов. Высокий уровень технологической проработки набора, о чем свидетельствует приложенный к диссертации акт внедрения, позволяет рекомендовать его для промышленного производства.

Выводы и практические рекомендации корректно сформулированы, соответствуют целям и задачам исследования. Автор предлагает внедрение простого в исполнении и информативного метода диагностики, который необходим медицинской службе и хорошо вписывается в решение Национальных проектов по снижению и элиминации кори, краснухи и эпидемического паротита. Основные результаты диссертации отражены в 2 патентах и 17 публикациях, 3 из которых напечатаны в изданиях ВАК. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

### **Общие замечания по диссертационной работе**

Принципиальных замечаний по существу диссертационной работы нет, хотя в тексте встречаются некоторые неточности, в частности на стр. 60, 85, 86, и 106 говорится о стафилококковых протеинах А и G, тогда как белок G продуцируется стрептококками групп С и G.

К сожалению, как в обзоре литературы, так и в обсуждении результатов, не рассматривается один из современных методов экспресс-диагностики, каковым является иммунохроматографический анализ (ИХА). Сравнение разработанного соискателем метода диагностики с ИХА существенно украсило бы работу.

В заключении диссертации желательно было бы указать на каком этапе разработки или внедрения в настоящее время находится диагностический набор.

Как пожелание автору в дальнейшей работе можно посоветовать дополнить номенклатуру набора другими важными вакциноуправляемыми инфекциями, такими как дифтерия, коклюш, полиомиелит и др., тем более, что емкость белковой матрицы это позволяет. Такой подход значительно увеличил бы практическую ценность набора и коммерческий спрос на него.

Целесообразным представляется и разработка в будущем метода диагностики стёртых или атипичных форм кори, краснухи и эпидемического паротита, основанного на наборе разработанном в настоящем исследовании, в котором вместо специфических антител IgG будут выявляться специфические антитела класса IgM.

### **Заключение**

Кандидатская диссертация Ерш Анны Васильевны «Разработка диагностического набора для выявления антител к возбудителям кори, краснухи и эпидемического паротита методом мультиплексного дот-анализа», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе

бионанотехнологии), является законченной научной квалификационной работой, в которой в результате выполненных автором исследований, направленных на решение важной медицинской проблемы борьбы с детскими инфекционными заболеваниями, создан простой в исполнении и информативный метод диагностики, предназначенный для использования в комплексной оценке поствакцинального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям.

Диссертационная работа по актуальности решаемой проблемы, степени научной новизны, теоретической и практической значимости, обоснованности научных положений и выводов, полноте публикаций материалов в научных печатных изданиях, соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (постановление Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г.), а ее автор Ерш Анна Васильевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заведующий лабораторией  
генной инженерии  
ФГБНУ «НИИ биохимии»  
доктор биологических наук,  
профессор

А.Б. Беклемишев



Личную подпись Беклемишева А.Б.

**Заверяю**

Начальник ОК НИИ биохимии

Логонова Н.И.

«03» 07 20 15 г.

А.Б. Беклемишев

Учёный секретарь  
ФГБНУ «НИИ биохимии»




Гольцова Т.В.