

## 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**

Массовая вакцинация населения в ряде случаев способна практически полностью искоренить возбудитель заболевания. Именно таким образом была побеждена оспа. Сейчас на повестке дня стоит вопрос элиминирования кори, эпидемического паротита и краснухи. Необходимым инструментом контроля заболеваемости отмеченными инфекциями и состояния специфического иммунитета населения являются методы серомониторинга. Создание надёжных, дешёвых способов оценки поствакцинального иммунитета к детским вакциноуправляемым вирусным инфекциям (ДВВИ) является важной медицинской и социальной задачей. Поэтому актуальность работы А.В.Ерш по разработке диагностического набора для выявления антител к ДВВИ не вызывает сомнения.

Несмотря на большое количество форматов иммунологических тестов в настоящее время разрабатываются все новые и новые их варианты. Большую популярность приобретают дешёвые «point of care testing» - тесты прикроватной диагностики. Это тесты способны проводится малоквалифицированным персоналом и даже самими пациентами. Разработанный в квалификационной работе А.В.Ерш диагностический набор для определения антител к возбудителям кори, краснухи и эпидемического паротита формально не относится к тестам прикроватной диагностики, поскольку не содержит стадии иммунохроматографии, но приближается к ним по простоте проведения.

Диссертация Ерш А.В. построена по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 130 страницах, содержит 24 рисунка и 13 таблиц. Библиографический список включает 187 литературных источника.

В кратком введении сформулированы цели и задачи исследования, охарактеризовано современное состояние серомониторинга ДВВИ в России и актуальность поставленных задач работы.



В литературном обзоре, занимающем 49 страниц диссертации, рассмотрены особенности ДВВИ, характеристика вирусов возбудителей ДВВИ, проекты по борьбе и элиминации отмеченных вирусных инфекций, способы оценки гуморального поствакцинального иммунитета, типы и способы конструирования диагностикумов для мультиплексного иммуноанализа.

Экспериментальная часть, изложенная в главе 2 диссертации, содержит краткое описание использованных в работе материалов и методов.

Глава «Результаты и обсуждение» написана логично. Экспериментальные данные хорошо иллюстрированы. Полученные диссертантом данные достоверны, выводы корректны и обоснованы и соответствуют поставленным задачам. Работа представляет собой завершенное целостное исследование, посвященное разработке малобюджетного мультиплексного диагностикума серомониторинга ДВВИ.

Прежде всего, Ерш А.В. были проанализированы свойства различных носителей для иммобилизации белков на основе коммерческой синтетической бумаги. На основании проведенного тестирования автором установлено, что бумага Pentaprint PR-M480/09-07/8101-482D8 обладает лучшими характеристиками из всех исследованных диссертантом, поскольку не вызывает фоновых сигналов, связанных с трудностями отмывки остаточного золя золота.

Автором проделана большая работа по повышению производительности труда при изготовлении целевых наборов для диагностики (выкройка подложек для антигенов, нанесение антигенов на подложку, автоматизированное наполнение растворами аналитических ванн).

Ерш А.В. проведена значительная работа по нахождению оптимальной процедуры блокирования матрицы от неспецифического связывания с антителами образца и оптимизации условий выполнения дот-анализа.

В работе диссертанта усовершенствована ранее предложенная система визуализации конъюгатов, содержащих коллоидное золото. Ерш А.В. разработала двухкомпонентный проявитель и усилитель изображения (щелочной раствор тиомочевины), что существенно упрощает процедуру анализа образцов.

В целом диссертантом отработана общая схема и условия проведения дот-иммуноанализа антител. По результатам проведенной работы получено два патента РФ.

Экспериментальная серия разработанного набора был протестирована Ерш А.В. в лабораторных и межлабораторных испытаниях. Диссертантом установлено, что разработанный мультиплексный диагностикум имеет чувствительность, специфичность и воспроизводимость, не уступающую коммерческим иммуноферментным тестам.



Качество оформления диссертационной работы, в целом, - хорошее. Поводов для принципиальной критики работа Ерш А.В. не вызывает, однако есть ряд вопросов и замечаний.

1. Как уже отмечалось ранее литературный обзор занимает 40% объема диссертации, при этом, по-видимому, без ущерба для понимания логики работы, он мог бы быть значительно сокращен, по крайней мере, на 20 страниц. Например, описание вирусов, вызывающих ДВВИ и вакцин использующихся для их профилактики можно было бы не приводить. Собственно обзор литературы, необходимый для разработки диагностического набора, начинается с раздела 1.3 (стр 33).

2. Вызывает недоумение отсутствие при обсуждении результатов ссылок в диссертации на собственные работы диссертанта.

3. На стр 84 перепутаны номера рисунков 14 и 15. Динамический диапазон от 60 нг до 50 пг составляет не два, а три порядка (стр 84).

4. на стр. 62 в разделе Материалы и Методы упоминается специально разработанная программа оценки результатов дот-иммуноанализа. Использование такого рода программ позволяет исключить субъективизм при визуальной оценке результатов иммуноанализа. К сожалению, диссертант не приводит интерфейс и детальное описание программы. Кроме того, по-видимому, программа была использована автором только при получении данных таблицы 11. Оценка же стабильности биочипов, проявляющих растворов набора, чувствительности дот-иммуноанализа, по-видимому, проводили только визуально, поскольку в диссертации отсутствуют численные данные по этому поводу.

5. Несмотря на проведенную большую работу по автоматизации производства наборов не были решены должным образом несколько стадий изготовления диагностикумов. К ним относятся мало производительные стадии отмывки бумаги и особенно двухстадийная иммобилизация антигена.

Диссертационная работа Ерш А.В. по объему и полученным результатам представляет собой законченную научно-исследовательскую работу. Содержание автореферата полностью соответствует выводам диссертации. Результаты диссертационных исследований достаточно полно опубликованы в научных изданиях и прошли апробацию на конференциях.

Результаты работы могут быть использованы как в практической работе по комплексной оценке поствакцинального иммунитета к ДВВИ, так и для разработки новых мультиплексных диагностикумов, не использующих ферментативные реакции.

Эта диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», а автор работы Ерш А.В., несомненно,



заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология.

Официальный оппонент,

к.х.н., зав. лабораторией медицинской химии



А.Н.Синяков

Александр Николаевич Синяков, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8.  
Тел. 8(383)3635173. E-mail: [sinyakov@niboch.nsc.ru](mailto:sinyakov@niboch.nsc.ru)

Подпись зав. ЛМХ ИХБФМ СО РАН А.Н.Синякова удостоверяю:

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН к.х.н.

П.Е.Пестряков

