

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Замариной Татьяны Валерьевны «Характеристика и применение моноклональных антител к антигену 200 кДа возбудителя мелиоидоза», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Хотя мелиоидоз не является эндемичной для Российской Федерации особо опасной инфекцией, однако, все увеличивающаяся с годами степень миграции населения в планетарном масштабе не исключает вероятность её завоза на нашу территорию. При этом близкое антигенные родство с сапным микробом создает значительные трудности в индикации возбудителей вызываемых ими особо опасных инфекционных болезней. Кроме того, возбудители сапа и мелиоидоза, относящиеся ко II группе патогенности микроорганизмов, имеют высокую степень гомологии с некоторыми непатогенными буркхольдериями, что в значительной мере затрудняет их дифференциацию в процессе идентификации чистых культур особо опасных микроорганизмов.

На протяжении многих лет специалисты Волгоградского НИПЧИ проводят исследования в области изучения антигенной структуры возбудителей сапа и мелиоидоза с целью выявления специфических антигенных комплексов, которые можно напрямую или опосредованно использовать для конструирования диагностических препаратов. Возможности ученых в этой области исследований значительно возросли с появлением в конце семидесятых годов прошлого столетия гибридомной технологии. За прошедшие после её появления годы в результате работы группы ученых Волгоградского НИПЧИ, возглавляемой профессором Храповой Н.П., была создана уникальная коллекция, состоящая из панели моноклональных антител к диагностически значимому антигену (Аг-8) возбудителя мелиоидоза с молекулярной массой 200 кДа. Именно с наличием этого антигена в капсуле мелиоидозного микробы исследователи последнее время связывают возможность выявления вирулентных штаммов возбудителя, дифференцируя их от авирулентных вариантов, не имеющих эпидемического значения. В связи с этим актуальность диссертационной работы Т.В.Замариной, посвященная изучению эффективности использования отобранных ею из коллекции моноклональных антител с учетом биотехнологических особенностей

производства моноклональных диагностических препаратов, является несомненно актуальной и своевременной.

Диссертация изложена в традиционном стиле на 124 страницах и состоит из всех необходимых разделов - введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, завершающихся кратким обсуждением обобщенных результатов и выводами. Фактические данные иллюстрированы 6 наглядными рисунками и 17 таблицами. Список использованной литературы включает 162 источника, из них 43 отечественных и 119 зарубежных авторов.

В первой части обзора литературы в полном соответствии с оглавлением диссертации дается обзорный, в основном современный научный литературный материал, свидетельствующий о несомненной актуальности изучения возбудителя мелиоидоза мировым профильным научным сообществом, в том числе, в странах, в которых отсутствуют эндемичные очаги этой инфекции и регистрируются лишь отдельные завозные случаи мелиоидоза. К этому обязывают как международные, так и национальные медико-санитарные правила охраны территории государств, действующие также и в Российской Федерации. Нужно подчеркнуть, что в Советском Союзе, а затем в России в течение продолжительного времени Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт является ведущим научно-исследовательским учреждением по этой проблеме. Насколько мне известно отдельные исследования по этой актуальной инфекции ведутся в ФБУН ГНЦ ПМБ (п.Оболенск) и «48 ЦНИИ МО»(г.Киров). При характеристике антигенной структуры возбудителя мелиоидоза диссертант вполне закономерно наиболее подробно рассматривает антигены, ассоциированные с вирулентными свойствами микроорганизма, имеющие поверхностную локализацию и характерные, или, если быть точным, специфические для *B.pseudomallei*. То есть те антигенные структуры, которые обеспечивают специфический иммунный ответ и доступны для взаимодействия со специфическими иммунокомpetентными клетками и антителами, а именно с теми из них, которые имеют диагностическое значение. Трудность индикации и идентификации *B.pseudomallei*, равно как и *B.mallei*, заключается, прежде всего, как в дифференциации их между собой, так и с близкими по антигенной структуре условнопатогенными буркхольдериями. Поэтому в этой главе литературного обзора также закономерно обсуждаются

вопросы перекрестной реактивности с антигенами близкородственных микроорганизмов. Их большое число создает серьёзные препятствия в разработке видоспецифического иммуноглобулинового препарата для индикации *B.pseudomallei*

Во второй части литературного обзора, посвященной современному состоянию лабораторной диагностики мелиоидоза, наибольший интерес, конечно, представляет иммунодиагностика, имеющая прямое отношение к рассматриваемой диссертации. Судя по представленным в ней литературным данным, сложность как ретроспективной иммунодиагностики мелиоидоза, так и индикации в биологических пробах и объектах внешней среды возбудителя обусловлена, прежде всего, необходимостью наличия в диагностических тест-системах видоспецифических иммунореактивных компонентов, исключающих перекрестные неспецифические реакции. В настоящее время в распоряжении практических работников находится лишь один зарегистрированный в Росздраве РФ моноклональный препарат, разработанный в ВолгНИПЧИ – «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие мелиоидозные моноклональные мышиные сухие», который все же обладает перекрестной реактивностью с *B.thailandensis*.

Глава 2 (Материалы и методы) содержит все необходимые сведения, касающиеся методического обеспечения диссертационной работы. Надо отметить, что специалисты все чаще используют для проведения научных исследований отечественные материалы, которые не уступают по качеству зарубежным аналогам. Это особенно важно в современных непростых экономических условиях, которые переживает Российская Федерация. Характерно, что источником гликопротеина капсульного вещества возбудителя мелиоидоза, содержащего видоспецифические антигенные детерминанты, был выбран штамм, обладающий высокими вирулентными свойствами. Это логически обоснованный методический подход, с точки зрения, перспектив конструирования иммунодиагностических препаратов, обладающих избирательной специфичностью по отношению к эпидемически значимым вариантам мелиоидозного микробы. Несмотря на довольно большой и разнообразный спектр методического обеспечения диссертационной работы 2 глава изложена весьма лаконично без излишнего описания общеизвестных методов, которые доступны в соответствующих литературных источниках, на

которые ссылается диссертант. Там, где имеют место оригинальные методические приемы – эти разделы описаны подробнее (например, выведение гибридом из замороженного состояния). Это технически, казалось бы простой, но очень важный, с точки зрения минимальной потери жизнеспособности гибридных клеток самый первый этап их «реабилитации». Впрочем, как и этап первичного культивирования размороженных клеток *in vitro*. Хотя все этапы гибридомной технологии описаны во многих руководствах и монографиях, всегда есть, казалось бы, незначительные авторские нюансы, которые представляют наибольший интерес для специалистов, работающих в этой области.

Функциональная активность антителопродуцирующих гибридом после длительного хранения во многом зависит от создания оптимальных условий для их криоконсервации. Судя по представленным в начале 3 главы данным собственных исследований, один из основных показателей состояния гибридных клеток после замораживания – жизнеспособность – находился на очень высоком уровне (более 75- 85%) у всех 10 «реанимированных» клонов. Тем не менее надо отдать должное Татьяне Валерьевне, что для устойчивого синтеза МКА ею было дополнительно проведено реклонирование хранившихся несколько лет в жидким азоте отобранных клонов гибридом. Дальнейшая работа по накоплению МКА как *in vitro*, так и, особенно, *in vivo* свидетельствовала о высокой прививаемости гибридом и не выходящему за рамки усредненных по данным литературы показателей объема специфического сырья. Поскольку в перспективе штаммы отобранных в процессе исследования гибридом планируется использовать для создания диагностических тест-систем я на будущее порекомендовал бы Татьяне Валерьевне позаимствовать описанный нами метод неоднократного прижизненного забора асцитической жидкости у зараженных гибридомами мышей, позволяющий почти в 3 раза увеличить её количество по сравнению с однократным забором, который получают при вскрытии животных в предтерминальной стадии. Это позволит, в первую очередь, снизить экономические затраты на содержание животных, продуцентов специфического сырья. Хочу отметить, что в результате выполнения исследований, отраженных в 3 главе диссертации, Замариной Т.В. удалось убедительно доказать, что сами моноклональные иммуноглобулины и их источники по своим функциональным характеристикам пригодны для конструирования мелиоидозных

иммунофлуоресцентных и иммуноферментных диагностических препаратов, а также для использования в различных методах по изучению антигенной структуры *B.pseudomallei*.

Несмотря на то, что существуют коммерческие мелиоидозные моноклональные флуоресцирующие иммуноглобулины, разработанные и внедренные в практику специалистами Волгоградского НИПЧИ, автор диссертационной работы отдельную 4 главу посвятил изучению сконструированных ею экспериментальных образцов аналогичного препарата, основу которых составили подробно охарактеризованные ею в предыдущем разделе моноклональные антитела к гликопротеину *B.pseudomallei* с м.м. 200 кДа. Логика такого решения проста и закономерна. Дело в том, что коммерческий зарегистрированный в Росздраве препарат обладает перекрестной реaktivностью в отношении *B.thailandensis*, который не является патогенным для человека микроорганизмом. Очевидно, что в связи с этим специфичность указанного препарата не достигает необходимых 100 % и требует дополнительных дифференциально-диагностических процедур. Таблица 12 четвертой главы убедительно иллюстрирует этот факт, где показано, что коммерческий препарат, хотя и «не работает» ни с другими близкородственными в антигенном отношении буркхольдериями, ни даже с возбудителем сапа, но взаимодействует со всеми пятью штаммами *B.thailandensis*. Три же из четырех, меченых ФИТЦ моноклональных антител, испытанных Татьяной Валерьевной, не взаимодействуют с *B.thailandensis*, равно, как и со штаммами других непатогенных буркхольдерий. При этом все они в той или иной степени выявляют возбудителя сапа, то есть обладают групповой специфичностью. Полученные Татьяной Валерьевной результаты важны как с научной, так и с практической точки зрения, так как открывают перспективу как совершенствования коммерческого препарата, так и создания новых иммунофлуоресцентных тест-систем по унифицированному принципу, предусматривающему взаимоисключающее тестирование объектов исследования с использованием набора конъюгированных с ФИТЦ моноклональных антител.

Несомненный интерес с практической точки зрения представляет 5 глава диссертационной работы Т.В.Замариной, поскольку до сих пор отсутствует

зарегистрированная в Росздраве РФ иммуноферментная тест-система на основе мелиоидозных моноклональных антител. Тем более, что первый её раздел посвящен фактически биологической схеме производства, которая, скорее всего, мало чем будет отличаться от представленной в обсуждаемой работе биотехнологической схемы лабораторного изготовления экспериментального препарата. Условия получения одного из основных компонентов иммуноферментной тест-системы – пероксидазных моноклональных иммуноглобулиновых коньюгатов, предусматривающих использование лиофильно высушенных препаратов, также соответствуют принципам масштабируемой технологии. Четкая логика последовательности изучения различных комбинаций специфических реакционных компонентов в сэндвич-варианте ИФА позволила автору установить их оптимальные соотношения для выявления поверхностного антигена *B.pseudomallei* с мМ 200 кДа. К сожалению, диагностические возможности экспериментальной тест-системы оказались ограниченными. В частности, из 59 музеиных штаммов *B.pseudomallei* удалось обнаружить лишь 16 штаммов с низкой чувствительностью. Автор объясняет это слишком жесткими условиями обеззараживания методом автоклавирования взвесей мелиоидозного микробы. В связи с этим возникает вопрос: почему диссертант не использовал прописанный в СП 1.3.3118-13 режим обеззараживания бактериальных взвесей возбудителей сапа и мелиоидоза путем добавления 4% формалина с 12 ч. экспозицией, который, на мой взгляд, является значительно более щадящим для антигенной структуры микроорганизмов нежели автоклавирование? При тестировании водносолевых и формамидных экстрактов мелиоидозных бактерий эффективность выявления 200 кДа антигена была высокой, правда, имели место заметные поштаммовые различия и высокая перекрестная реакция с этим антигеном одного из штаммов *B.mallei*. Несмотря на кроссреактивность экспериментальной иммуноферментной тест-системы с близкородственным в антигеном отношении *B.seracis* она вполне может быть использована в качестве базовой модели при создании современных высокочувствительных иммунодиагностических конструкций, учитывая быстро развивающиеся инновационные технологии детектирования различных биологических объектов.

В заключении диссертации в краткой форме обобщены основные результаты проведенных исследований, проанализированы возможности подробно охарактеризованных автором моноклональных мелиоидозных иммуноглобулинов для разработки иммунодиагностических тест-систем, определены дальнейшие перспективы совершенствования иммунодетекции возбудителя мелиоидоза.

Выводы диссертации полностью соответствуют поставленной цели и задачам работы и отражают суть проведенных исследований. Они основаны на результатах собственных исследований диссертанта и логично вытекают из материалов диссертационной работы, а их достоверность подтверждена данными статистической обработки.

Основные научные результаты диссертации отражены в 8 статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Научная новизна работы заключается в разносторонней иммунохимической характеристике панели мелиоидозных моноклональных антител с учетом особенностей конструирования иммунореагентов для проведения фундаментальных и прикладных исследований. Т.В.Замариной впервые подведена научно-обоснованная база под биологическую схему производства мелиоидозной диагностической моноклональной иммуноферментной тест-системы. Впервые выявлены и охарактеризованы мелиоидозные моноклональные антитела, не взаимодействующие с близкородственным в антигеном отношении, эпидемически инертным *B.thailandensis*. Научная новизна работы подтверждена двумя заявками на изобретение, касающихся двух уникальных штаммов гибридных клеток, производящих моноклональные иммуноглобулины к антигену 200 кДа возбудителя мелиоидоза, пригодных как для создания иммунодиагностических препаратов, так и для изучения антигенной структуры буркхольдерий.

Диссертация Т.В.Замариной имеет очевидную практическую ценность. Охарактеризованные ею три ФИТЦ-мечены моноклональных антитела, не вступающих в реакцию с *B.thailandensis*, весьма перспективны для совершенствования коммерческого препарата – моноклональных мелиоидозных диагностических флуоресцирующих иммуноглобулинов, которые обладают кросс-реактивностью по отношению к *B.thailandensis*, но в отличие от указанных выше трех МКА не взаимодействуют с *B.mallei*. Здесь можно пойти по пути создания набора ФИТЦ-меченых иммуноглобулинов с разной эпитопной специфичностью,

дающие в комплексе возможность дифференцировать не только патогенные буркхольдерии от непатогенных, но и возбудителей сапа и мелиоидоза между собой. Особенno привлекает перспектива применения таких моноклональных антител в активно развивающихся в настоящее время разработках, связанных с использованием мультипараметрических диагностических иммunoчипов. Возможность быстрого получения результата при одномоментном использовании достаточно большого количества анализов обеспечит надежный и объективный результат диагностического анализа.

По материалам диссертации подготовлены и утверждены 3 методических рекомендаций учрежденческого уровня, а 2 штамма гибридом-продуцентов моноклональных антител, имеющих значение для фундаментальной и прикладной микробиологии и биотехнологии, депонированы в Государственной коллекции микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск».

Позвольте остановиться на отдельных замечаниях и вопросах, которые возникли при ознакомлении с диссертацией:

- В 3 главе речь идет не только о свойствах антителопродуцирующих гибридом, но и о характеристики МКА, т. е. её название не совсем точно отражает содержание главы. Оно должно быть шире.

- Во введении в разделе «Степень достоверности и апробация результатов» говорится только об апробации работы. Отсутствует, хотя бы констатация подтверждения достоверности полученных результатов данными статистического анализа.

- По моему мнению, в практическую значимость работы стоило бы включить материалы второй части пятого вывода, обозначив, тем самым, перспективу совершенствования коммерческого моноклонального флуоресцирующего препарата.

Вопросы: 1. Скажите, пожалуйста, чем отличаются по своему целевому назначению два заявленных для патентования штамма гибридом?

2. Какова дальнейшая перспектива внедрения иммуноферментной тест-системы для выявления 200 кДа антигена возбудителя мелиоидоза, прошедшая год назад лабораторные испытания? Или она ограничивается учрежденческим уровнем внедрения ?

3. Не пытались ли Вы использовать охарактеризованные Вами моноклональные антитела в Дот-иммуноанализе или в

иммунохроматографическом тесте?

Хочу подчеркнуть, что высказанные мною замечания не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Т.В.Замариной.

Таким образом диссертация Замариной Татьяны Валерьевны является самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой в результате выполненных автором исследований содержится новое решение актуальной проблемы – научно-обоснованное совершенствование эффективности лабораторной иммунодиагностики мелиоидоза за счет использования охарактеризованных ею моноклональных антител к капсульному антигену *B.pseudomallei* с м.м. 200 кДа для повышения качества коммерческого мелиоидозного моноклонального флуоресцирующего препарата, разработки диагностической иммуноферментной тест-системы или иных иммунодиагностических конструкций

Считаю, что по актуальности темы, методическому уровню и объему проведенных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости, полноте изложения основных научных результатов, опубликованных в рецензируемых научных изданиях диссертационная работа Замариной Татьяны Валерьевны на тему: «Характеристика и применение моноклональных антител к антигену 200 кДа возбудителя мелиоидоза» соответствует «Положению о порядке присуждения ученых степеней» (Утверждено постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Главный научный сотрудник организационно-
методического отдела с научной частью
Российского научно-исследовательского
противочумного института «Микроб»
доктор медицинских наук, профессор

З.Л. Девдариани

Подпись З.Л. Девдариани
удостоверяю
начальник отдела кадров
РосНИПЧИ «Микроб»



К.В.Бычков