

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента на диссертацию Замариной Т.В. «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**

В соответствии с приказом Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на базе Волгоградского противочумного института в 2008 году был создан Референс-центр по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза. В круг вопросов, которые решает центр, входит разработка новых диагностических препаратов и методов лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза. Иммунодиагностические тесты в общей схеме лабораторной диагностики мелиоидоза занимают значимое место, так как их выполнение требует меньше времени по сравнению с бактериологическими исследованиями. Однако список препаратов, используемых для иммунодиагностики мелиоидоза в схеме индикации и идентификации не так широк, поэтому безусловно важным является их совершенствование и разработка новых. Основным среди них остается метод флуоресцирующих антител (МФА), с помощью которого можно быстро обнаружить *B. pseudomallei* в пробах из объектов внешней среды и в материале от людей и животных. Повысить качество препарата для постановки МФА в плане специфичности удалось путем замены в технологическом процессе поликлонального сырья на моноклональное.

Иммуноферментные методы в настоящее время в виде коммерческих тест-систем не входят в схему лабораторной диагностики мелиоидоза. Однако их чувствительность, удобство постановки, возможность анализа одномоментно большого числа проб, визуализация реакции предполагают в перспективе их практическое использование наряду с традиционными методами лабораторной диагностики. В Волгоградском

противочумном институте была разработана технология изготовления тест-системы иммуноферментной для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза на основе поликлональных иммуноглобулинов из гипериммунных мелиоидозных сывороток лабораторных животных. Получение МКА против определенных молекул-маркеров позволяют с большей гибкостью подходить к разработке и применению систем иммуноанализа, создавать иммунные комплексы сложного состава и использовать их для визуализации, при этом иммунофлуоресцентные и имmunопероксидазные методы детекции антигенов относятся к числу наиболее надежно работающих (Самойлович М.П., 2006). Современные подходы к разработке и совершенствованию иммунодиагностических средств базируются на широком использовании МКА заданной специфичности, т.е. важен выбор антигена, к которому получаются антитела. Возбудитель мелиоидоза имеет общие антигены не только с близкородственными, но и гетерологичными микроорганизмами. В этой связи принципиально важное значение имеет создание гибридом-продуцентов МКА, узнающих индивидуальные антигены *B. pseudomallei*. В работах отечественных и зарубежных исследователей показано, какие антигены играют существенную роль при идентификации возбудителя мелиоидоза. Один из них гликопротеин с м.м. 200 кДа, локализованный на поверхности *B. pseudomallei*, причем его вирулентных вариантов. Отечественная коллекция гибридом-продуцентов МКА против данного антигена была создана в Волгоградском ПЧИ и поэтому актуальность и своевременность работы, цель которой – оценить эффективность использования имеющейся панели МКА к гликопротеину 200 кДа *B. pseudomallei* для изготовления иммунодиагностических препаратов и тест-систем, предназначенных для обнаружения и идентификации патогенных буркхольдерий, не вызывает сомнений.

Для достижения поставленной цели Замарина Т.В. широко использовала современные методы исследования (гибридомная технология, иммунохимические, микроскопические, биохимические и другие), что позволило успешно реализовать все

задачи работы. Диссертационная работа построена по традиционному плану. Материалы изложены на 124 страницах, включая список литературы, состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, заключения и выводов. Диссертация проиллюстрирована 6 рисунками и 17 таблицами. Библиография включает 162 источника, из них зарубежных – 120.

**Во введении** автором представлена актуальность проблемы, изложены цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, положения, выносимые на защиту.

**Обзор литературы** представлен двумя разделами, в первом из них приводятся общие сведения об антигенах возбудителя мелиоидоза, включая перекрестнореагирующие и общие для представителей буркхольдерий, отмечается важная роль капсулы, наличие которой коррелирует с его вирулентностью. В разделе, касающемся лабораторной диагностики мелиоидоза, автор проводит анализ методов, применяемых на сегодняшний день для обнаружения *B. pseudomallei*, завершая его констатацией, что дальнейшее совершенствование лабораторной диагностики мелиоидоза на основе МКА к наиболее значимым антигенам является одним из перспективных направлений. Надо сказать, что литературный обзор базируется на большом объеме материала, демонстрирует хорошую осведомленность автора по предмету исследований, включая большое число зарубежных публикаций, написан четко и последовательно.

В главе 2 Замарина Т.В. характеризует материалы, объекты, оборудование и описывает широкий спектр методов, позволяющих выполнить работу на высоком методическом уровне. Глава 3 посвящена изучению гибридом-продуцентов МКА к антигену 200 кДа возбудителя мелиоидоза. Выемка гибридом-продуцентов МКА из азота осуществлялась по мере необходимости. Следует подчеркнуть, что они были получены и заложены на хранение и теперь в распоряжении автора постоянно имеется стандартный, воспроизводимый источник антител. После размораживания гибридом была проведена

большая экспериментальная работа, требующая от автора тщательности, терпения, высокого профессионализма. Гибридомы-продуценты МКА были выведены в массовую культуру, оценены их ростовые свойства, антителопродуцирующая и пролиферативная активности. В последующих экспериментах МКА были накоплены в виде культуральных и асцитических жидкостей, проведена их очистка. Оценка специфической активности 10 МКА в твердофазном иммуноферментном методе (ТИФМ) позволила отобрать те, которые наиболее активно связываются с контрольным антигеном. Исследования в непрямом методе флуоресценции (НМФА) выявили МКА, обеспечивающие свечение клеток контрольного штамма на 3+ и 4+, что явилось перспективной основой для изготовления флуоресцирующих моноклональных иммуноглобулинов. Детальная характеристика МКА включала также определение класса иммуноглобулинов, констант аффинности МКА, конкурентных взаимоотношений пар МКА, частоты представленности эпитопов, узнаваемых соответствующими МКА на поверхности штаммов *B. pseudomallei* и в составе антигенных препаратов, выделенных из их клеток. Такие показатели крайне важны для установления МКА, в большей степени отвечающим диагностическим требованиям, на основе которых в последующем были изготовлены экспериментальные серии препаратов для МФА и ТИФМ. В главе 4 и нашли отражение материалы исследований, касающиеся получения иммуноглобулинов флуоресцирующих моноклональных для обнаружения антигена 200 кДа возбудителя мелиоидоза. Было установлено, что из 10 испытуемых типов МКА диагностически значимыми являлись только 4. При изготовлении 4-х препаратов МКА, меченных ФИТЦ, подобраны оптимальные технологические параметры. Сравнительная оценка их специфической активности на широком наборе музейных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза позволила отобрать один, отличавшийся наибольшей активностью в отношении *B. pseudomallei*. Три других проявили себя как группоспецифичные диагностические средства, но автору удалось установить, что они не вступают в реакцию с клетками *B.*

*thailandensis*, тогда как имеющиеся тест-системы, предназначенные для обнаружения возбудителя мелиоидоза, не дифференцируют эти два вида буркхольдерий. При изучении диагностических возможностей иммуноглобулинов флуоресцирующих мелиоидозных моноклональных было выявлено, что они пригодны как для работы с чистыми культурами буркхольдерий, так и с материалом биопробных животных.

Задачи работы предусматривали также оценку возможности изготовления экспериментальных иммуноферментных тест-систем на основе МКА к антигену 200 кДа возбудителя мелиоидоза и результаты этих исследований представлены в главе 5. Исследования автора в этом направлении заслуживают высокой оценки, так как предварительно была отработана достаточно сложная биотехнологическая схема, включающая два этапа: получение препаративных количеств очищенных МКА и непосредственно сама процедура конъюгации. Иммунопероксидазные конъюгаты приготовлены на основе 8 типов МКА и в прямом варианте ТИМФ путем шахматного титрования определены рабочие разведения каждого из них. Повышение чувствительности разрабатываемой тест-системы зарегистрировано в случае использования для сорбции на пластике смеси МКА с индексами аддитивности более 50 %, что явилось подтверждением важной роли коэффициента аффинности при выборе МКА. Оптимальная нагрузка смеси МКА для подготовки твердой фазы (подложки) равнялась 10-20 мкг/мл. Проверка диагностических возможностей экспериментальной ИФА тест-системы на музейных штаммах возбудителей сапа и мелиоидоза, обеззараженных автоклавированием, позволила констатировать, что она не соответствует рекомендуемым параметрам чувствительности для ТИФМ, так как положительная реакция зарегистрирована у 15 из 59 испытуемых штаммов *B. pseudomallei*. Можно согласиться с мнением автора работы, который объясняет низкую чувствительность тест-системы деградацией антигена 200 кДа, локализованного на поверхности клеток *B. pseudomallei* в процессе автоклавирования, что сопровождается нарушением его

эффективного связывания с комплементарными МКА. В то же время экспериментальная ИФА тест-система показала свою пригодность для качественного и количественного анализа водно-солевых экстрактов патогенных буркхольдерий с точки зрения содержания антигена 200 кДа. С помощью этой тест-системы представляется возможным контролировать количество антигена 200 кДа в клетках *B. pseudomallei* на этапах накопления бактериальной массы, её обеззараживания, в процессе экстракции его из микробных клеток. Очевидно, что возможность изготовление на основе детально охарактеризованных МКА к антигену 200 кДа медицинских иммунобиологических препаратов расширяют возможности специалистов в плане эффективного выявления *B. pseudomallei* и других патогенных буркхольдерий.

**Заключение** диссертации Т.В. Замариной отражает актуальность проблемы, подводит итоги проведенных исследований, выделяет наиболее значимые практические результаты и намечает возможности их применения.

Диссертационная работа несомненно обладает **научной новизной**. Панель МКА к антигену 200 кДа, являющегося маркером вирулентных штаммов *B. pseudomallei*, впервые охарактеризована по широкому спектру параметров, необходимых для установления диагностической ценности МКА. Впервые на основе МКА к антигену 200 кДа созданы иммунодиагностические препараты, с помощью которых представляется возможным обнаружение и идентификация патогенных буркхольдерий. Научная новизна подтверждена двумя заявками на изобретение, зарегистрированных в ФИПС под № 2014115304 и № 2014115305 от 18.04.2014. Диссертационная работа имеет **практическую значимость**. Набор гибридом-продуцентов МКА является источником стандартных моноклональных иммуноглобулинов, на основе которых сконструированы диагностические препараты нового поколения. Результаты лабораторных испытаний экспериментальных образцов иммуноферментной тест-системы на основе МКА к антигену 200 кДа возбудителя мелиоидоза для его выявления в различных объектах

исследования нашли отражение в соответствующем протоколе, утвержденном директором института от 30.04.2014 г. Итогом экспериментальных исследований явилось также оформление трех Методических рекомендаций учрежденческого уровня внедрения, предназначенных для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью диагностических МКА.

Высокая степень достоверности и обоснованности представленного материала и выводов диссертации не вызывает сомнений и свидетельствует о правильном выборе методических подходов. О значимости полученных результатов можно судить по публикациям по теме диссертации – из 13 статей 8 в ведущих рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК. **Личный вклад** диссертанта в разработку научной проблемы подтвержден числом публикаций по материалам диссертации. Основные результаты получены лично автором в ходе самостоятельных исследований, частично – при его личном участии.

В процессе ознакомления с работой мы сочли возможным высказать следующие замечания и положения:

1. В таблице 4 на стр. 61, судя по названию, должны быть сводные данные о наличии антигена 200 кДа в составе различных штаммов, однако приведены они недостаточно информативно.
2. В работе для характеристики МКА автор использовал метод иммуноблоттинга, но желательно было бы его результаты представить в виде блоттограмм, которые позволяют визуально оценить взаимодействие эпитопов, входящих в структуру антигена 200 кДа, с комплементарными им МКА на уровне маркеров с определенными м.м.
3. В разделе «Материалы и методы» подробно и детально описаны ряд стандартных методик, при изложении которых достаточно было ссылки на автора используемой методики.

Указанные замечания не умаляют достоинств рецензируемой работы, основанной на результатах экспериментальных исследований, она имеет несомненную новизну и практическое значение. Все вышеизложенное позволяет заключить что диссертация Т.В. Замариной выполнена на высоком методическом уровне, является законченной научно-исследовательской работой, в основу которой положен огромный оригинальный и актуальный материал, касающийся оценки возможности использования МКА к антигену 200 кДа возбудителя мелиоидоза для разработки новых препаратов. Представленная работа имеет теоретическое значение и вносит существенный вклад в лабораторную диагностику мелиоидоза, так как разработанные тест-системы позволяют эффективно выявлять *B. Pseudomallei* в реакциях МФА и ТИФМ.

В целом по содержанию и значимости, актуальности и новизне исследуемой проблемы, методическому подходу к её разрешению, научно-практическому значению результатов представленная работа соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК Министерства образования и науки РФ, а её автор Т.В. Замарина, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Официальный оппонент:  
доктор биологических наук,  
профессор,  
заведующая лабораторией гибридом ФКУЗ Ростовский  
противочумный институт Роспотребнадзора

Л.П. Алексеева

Подпись Л.П. Алексеевой заверяю:  
Начальник отдела кадров  
Федерального казённого учреждения  
Ростовский-на-Дону противочумный  
Федеральной службы по надзору в  
потребителей и благополучия челов

«07» апреля 2015г.

Е.Н. Бурик

