

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Павлович Натальи Владимировны на диссертационную работу Кошкидько Александры Геннадьевны на тему: «Совершенствование технологии производства эритроцитарных препаратов для диагностики туляремии и индикации её возбудителя», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. биотехнология

### **Актуальность диссертационного исследования**

Широкое распространение природных очагов туляремии на территории РФ, достаточно высокая эпидемическая опасность заболевания и возможность использования возбудителя в качестве биоагента при террористических актах обосновывает актуальность всестороннего исследования проблемы. Решение данных вопросов зависит, в первую очередь, от создания методологической базы для проведения подобных работ. При этом наиболее приоритетными направлениями остаются как разработка новых высокочувствительных и специфических методов индикации и идентификации туляремийного микроба, так и совершенствование традиционных методов диагностики инфекции.

В настоящее время арсенал диагностических приемов постоянно расширяется, в частности, благодаря внедрению молекулярно-биологических методов (ПЦР-анализ, VNTR-типирование, полногеномный сиквенс, белковое профилирование MALDI-TOF и т.д.). Тем не менее, серологические методы лабораторной диагностики туляремии и на сегодняшний день сохраняют свою ценность, что связано с их доступностью и простотой выполнения исследований в лабораториях различного уровня. Как известно, организм человека мало обсеменен возбудителем, что существенно снижает информативность ПЦР-анализа или белкового профилирования. Поэтому, ведущее место в диагностике заболевания у людей занимают именно серологические методы, точность результатов которых во многом определяет адекватность ведения больного и грамотность проведения противоэпидемических мероприятий.

Наиболее часто врачи-бактериологи и иммунологи используют иммунологические реакции (реакция непрямой гемагглютинации – РНГА) с эритроцитарными диагностикумами, сенсibilизированными либо специфическими антигенами, либо специфическими иммуноглобулинами. В то же время применяемые в настоящее время жидкие диагностикумы (производства СтавНИПЧИ) не лишены некоторых недостатков: ограниченный срок хранения (1 год), необходимость соблюдения холодовой цепочки при транспортировке и разводящей жидкости для постановки реакции и др. Поэтому выбранное

диссертантом направление исследования безусловно актуально и посвящено совершенствованию эритроцитарных диагностических препаратов для серодиагностики туляремии.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 175 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы, включающего 160 работ отечественных и 66 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 24 рисунками и 24 таблицами, включает 13 приложений.

### **Цель исследования и обоснованность научных положений и выводов**

Цель, задачи исследования и положения, выносимые на защиту, четко сформулированы и отражают суть выбранного направления. Для реализации поставленных задач автор использует широкий арсенал современных методов – микробиологических, биохимических, биотехнологических, иммунологических, физико-химических. Достоверность результатов подтверждена методами статистической обработки и убедительным наглядным материалом (рисунки, таблицы).

**Положения, выносимые на защиту,** обоснованы полученным фактическим материалом и четко сформулированы.

### **Научная новизна**

Безусловным достоинством работы является использование высоко технологичных методов, что позволило получить новые данные по ряду вопросов. Так, научно обосновано и подтверждено экспериментально включение в состав среды высушивания различных компонентов (сахароза, желатин, тиомочевина, азид натрия, твин 80), которые обеспечивают сохранность эритроцитов при замораживании, лиофилизации и регидратации.

Впервые проведен анализ рисков (идентификация рисков в технологических процессах, разработка «Матрицы последствий и вероятностей», проведения корректирующих действий) при конструировании, производстве и применении наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных туляремийных сухих.

Приоритетность выполненных исследований подтверждена 3 патентами РФ на изобретения.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Практическая значимость диссертационной работы несомненна. На

основании большого и трудоемкого процесса работы автору удалось подобрать оптимальные параметры (композиция сред для высушивания, режим лиофилизации, температура конденсатора и подвода тепла) для получения сухих эритроцитарных антигенных и антигенов диагностикомов. В результате разработанные соискателем диагностикомы имеют ряд преимуществ по сравнению с широко используемыми жидкими препаратами:

- их транспортировка не требует соблюдения холодовой цепи;
- увеличен срок годности до 2-х лет;
- постановка РНГА не требует специальной разводящей жидкости;
- по показателям специфичности и чувствительности разработанные диагностикомы не уступают жидким препаратам, имеющим госрегистрацию.

Впервые А.Г. Кошкидько разработаны и внедрены в практику методические приёмы по менеджменту рисков и их коррекции, что повышает гарантию качества выпускаемых препаратов.

Подготовлен пакет документов НТД (технические условия, инструкция по применению, маркировка первичная и вторичная, пусковой регламент (ПУР) на препараты: набор реагентов «Диагностиком эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый сухой» («ДЭТ-Иг») ТУ 21.20.23-056-01897080-2020, ПУР № 01897080-38-20; набор реагентов «Диагностиком эритроцитарный туляремийный антигенный сухой» («ДЭТ-Аг») ТУ 21.20.23-055-01897080- 2020, ПУР № 01897080-37-20 для регистрации в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзор).

Полученные результаты демонстрируют тот факт, что соискатель профессионально владеет экспериментальными методами исследования. Полученные диагностикомы успешно апробированы при исследовании полевого материала (на наличие специфических антигенов) и исследовании клинического материала от больных, вакцинированных и не иммунизированных людей (на наличие специфических иммуноглобулинов).

Выводы, сделанные диссертантом на основании полученных результатов, корректно сформулированы, научно обоснованы и доказаны.

Результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на международных и Российских конференциях.

По материалам диссертационной работы опубликовано 17 научных работ, в том числе 6 статей в журналах из списка изданий, рекомендованных ВАК РФ, получены 3 патента на изобретения, утверждены директором института 2 методических рекомендаций.

В автореферате достаточно полно представлен материал диссертации с отражением всех аспектов проведенного исследования.

## **Достоинства и недостатки в содержании и оформлении диссертации, мнение о научной работе в целом**

Диссертация А.Г. Кошкидько заслуживает положительной оценки, так как содержит богатый экспериментальный материал, характеризующийся актуальностью, научной новизной, теоретической и практической значимостью.

Тем не менее, у оппонента в процессе рецензирования возникли некоторые замечания и вопросы, требующие уточнения.

1. При безусловной значимости прикладного аспекта работы, автором не совсем четко сформулирована научная обоснованность предлагаемого методического подхода. Может быть необходимо привести обоснование включения того или иного компонента среды высушивания в зависимости от их действия.

2. Как известно, туляремийный микроб содержит перекрестно реагирующие антигены с бруцеллами, которые в некоторых случаях создают трудности при проведении дифференциальной диагностики. В диссертации на рисунке 13 и в таблицах 7,8,13 приводятся отрицательные данные по взаимодействию исследуемых диагностикумов с бруцеллами (при достаточно большой микробной нагрузке  $10^8$  м.кл./мл) или коммерческими бруцеллезными сыворотками. Эти данные требуют уточнения.

3. Вызывает вопрос и также требует уточнения обнаружение в 2-х сыворотках здоровых людей, не вакцинированных и не болевших ранее туляремией, достаточно высоких титров противотуляремийных антител (Табл.16). При этом специфичность выявленных иммуноглобулинов подтверждена положительными результатами РТНГА. Поэтому остается не совсем понятным их включение в данную группу исследуемых, причем без изменения смысла результатов они безболезненно могут быть исключены.

4. В таблице 24 во 2-ой графе не совсем удачным представляется выражение «неквалифицированный персонал». К работе с ПБА I-II группы допускаются только вакцинированные сотрудники, прошедшие курсы специализации, сдавшие режим работы с ПБА и практические навыки работы с возбудителями ООИ. По-видимому, более уместно выражение «человеческий фактор», когда и профессионал может допустить ошибку.

Основываясь на изложенных в диссертации материалах, считаю, что диссертация Кошкидько Александры Геннадьевны на тему: «Совершенствование технологии производства эритроцитарных препаратов для диагностики туляремии и индикации её возбудителя», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. биотехнология является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение

актуальных задач, имеющих важное научное и практическое значение. Диссертационная работа Кошкидько Александры Геннадьевны соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 года № 335, от 02 августа 2016 года № 748, от 29 мая 2017 года № 650, от 28 августа 2017 № 1024, от 01 октября 2018 года № 1168, от 11.09.2021 г. № 1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Кошкидько Александра Геннадьевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. биотехнология.

### **Официальный оппонент**

Главный научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора),

доктор медицинских наук  
Павлович



Наталья Владимировна

Адрес: 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40  
Телефон: 8 (863) 240-27-03  
E-mail: [plague@aaanet.ru](mailto:plague@aaanet.ru)

Подпись Н.В. Павлович заверяю  
Начальник отдела кадров  
ФКУЗ Ростовский-на-Дону  
противочумный институт  
Роспотребнадзора



Е.Е. Стоян