

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 Беклемишев А.Б.

Заверяю

Начальник ОК НИИ биохимии

Логонова Н.И.

«03» 04 20 15 г.

А.Б. Беклемишев

Учёный секретарь
ФГБНУ «НИИ биохимии»



Гольцова Т.В.

