

ОТЗЫВ

официального оппонента Локтева В.Б. на диссертационную работу
Акиншиной Юлии Александровны «Разработка и характеристика ИФА тест-
систем для серологической диагностики лихорадки денге», представленную
на соискание учёной степени кандидата биологических наук по
специальностям: 03.02.02 – вирусология и 14.03.10 клиническая
лабораторная диагностика.

В настоящее время в России существует необходимость создания тест-систем для специфической диагностики лихорадки денге и других вирусных инфекций. Алгоритм такой диагностики должен включать применение генетических и иммунологических методов, которые являются принципиально важными инструментами специфической диагностики вирусных заболеваний. Оба подхода взаимно дополняют друг друга, позволяют выполнить точную диагностику вирусной лихорадки денге в течение всего периода заболевания и выздоровления пациента. Важно отметить, что эффективность генетической диагностики ограничена необходимостью проведения диагностики в сроки достаточно высокой концентрации вирусной РНК в тканях пациента. При флавивирусных инфекциях концентрация вирусной РНК в крови и ликворе может быть относительно небольшой и непродолжительной по времени. Иммунологические тесты, основанные на определении антител, позволяют выявлять вирусспецифические антитела в течение длительного времени. Это даже позволяет проводить ретроспективную диагностику заболевания. Очень важно при этом иметь тесты, которые позволяют регистрировать наличие антивирусных антител класса IgM. Это обеспечивает повышение чувствительности и специфичности диагностики, особенно при острых случаях вирусных заболеваний.

Представляется, что создание новых отечественных иммунологических тест-систем, их сертификация и внедрение в практику является обязательным шагом к обеспечению качественной верификации завозных

случаев лихорадки денге. Именно с этим связана актуальность и новизна диссертационной работы.

Диссертация Акиншиной Ю.А. написана по традиционному плану и состоит из двух основных частей. Часть 1 включает обзор литературы, а часть 2 включает 3 главы с описанием материалов и методов (глава 1) и две главы с описанием собственно результатов и их обсуждением (главы 2 и 3). Данные разделы дополнены введением, заключением, выводами, списком использованной литературы. Во введении определены актуальность проблемы, цели и задачи работы, научная новизна, теоретическая и практическая ценность полученных результатов, а также положения, выносимые автором на защиту. Обзор написан подробно, ясно и логично. Раздел материалы и методы свидетельствует о том, что работа выполнена с использованием самых современных методов молекулярной биологии и не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов и адекватности их анализа. Результаты собственных исследований изложены в главах 2 и 3 разбитых на ряд подразделов. Результаты представлены четко и последовательно, хорошо иллюстрированы, что убеждает в полноте проведенного исследования и достоверности полученных результатов.

Цель настоящей работы, в формулировке автора работы, состояла в «разработке ИФА тест-систем для серологической диагностики лихорадки денге, их характеристика, апробация на клиническом материале с целью совершенствования качества диагностики лихорадки денге».

В процессе выполнения диссертационной работы автором были сформулированы и решались следующие основные задачи:

- Конструирование ИФА наборов реагентов для серологической диагностики лихорадки денге: четыре моновалентные тест-системы (MAC-ELISA) для выявления антител класса M к каждому из четырёх типов вирусов денге и две поливалентные тест-системы для выявления группоспецифических IgG и IgM.
- Оценка эффективности применения разработанной тест-системы для выявления M антител к вирусу денге в сыворотке крови больных.
- Исследование применимости ИФА-IgG тест-систем для дифференциальной диагностики лихорадки денге.
- Определение области применения тест-систем для выявления G антител к вирусу денге в сыворотках крови больных.

В рамках настоящей работы разработаны и апробированы иммуноферментные тест-системы для обнаружения антител класса M и G к вирусам денге, которые позволяет идентифицировать четыре основных

субтипа вируса денге. Показано, что IgM тест позволяет обнаруживать антитела с 5 дня заболевания. Определена область применения иммуноферментного анализа для серологической диагностики лихорадки денге и критерии учета результатов ИФА для выявления IgM и IgG к вирусу денге при серологической диагностике.

Это позволило создать пакет документов для реализации стандартных операционных процедур предприятия ЗАО «ЭКОлаб» (СОП-251), на основании которых созданы экспериментальные серии наборов «ИФА-IgM-полиденге», «ИФА-IgG-полиденге», «ИФА-IgM-денгеС1», «ИФА-IgM-денгеС2», «ИФА-IgM-денгеС3», «ИФА-IgM-денгеС4». Также результаты проведенных исследований легли в основу разработанного нормативно регламентирующего документа: Методические рекомендации МР 4.2.0108-16 «Организация и проведение лабораторной диагностики лихорадки денге» и учебно-методического пособия «Новые и возвращающиеся вирусные инфекции в системе биобезопасности Российской Федерации». С учётом выполненных в работе исследований с применением поливалентной ИФА-IgM тест-системы был разработан «набор реагентов для дифференциального определения IgM антител к вирусам Зика, денге, Западного Нила и Чикунгуны в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа». РУ от 26.11.2018 г. № РЗН 2018/7810.

К важнейшим достижениям диссертационной работы следует отнести:

- Создание шести видов оригинальных иммуноферментных наборов реагентов для серологической диагностики лихорадки денге с помощью выявления антивирусных антител класса G и M.
- Определение высокой эффективности тест-системы «ИФА-IgM-денге» для диагностики лихорадки денге в ранние сроки заболевания с 100% диагностической значимостью.
- Проведение исследования возможных перекрестных серологических реакций для различных flavivирусных инфекций и их диагностической значимости.
- Исследование возможности использования разработанных тест систем для дифференциации различных субтипов вируса денге.

Рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Акиншиной Юлии Александровны является самостоятельным законченным исследованием, посвященным разработке и характеристики ИФА тест-систем для серологической диагностики лихорадки денге у человека.

Представленная работа не лишена определенных недостатков. К ним следует отнести:

- На мой взгляд, значительно бы усилило работу создание раздела «Приложение». В данный раздел стоило бы включить, как минимум, титульные страницы разработанных нормативных документов.
- Несогласен с отнесением статьи в журнале «Emerg Infect Dis, 2018 г» в список публикаций в других изданиях (автореферат, стр. 28). Статью по теме диссертации в журнале Q1 и с импакт фактором 7,42 (2018г.) следует оценивать, как важный успех докторанта. Это также касается описания материалов статьи «Two Cases of Dengue Fever Imported from Egypt to Russia, 2017» в тексте диссертации. Тем более, что иммунологическая диагностика была активно использована в качестве доказательной базы для данной статьи.
- В некоторых рисунках и таблицах (рис 1, 2, 3 и табл. 4 автореферата и рис.7-8, табл. 10 диссертации) не приведены данные статистической обработки результатов исследования.
- Количество неточностей и опечаток в работе минимальное. Некоторые редакционные замечания связаны с возможным улучшением диссертационной работы. Например, в разделе «структура и объем диссертации» указывается, что работа включает 110 стр. машинописного текста. Однако реальный объем диссертации составляет 114 страниц. В целом, должен признать, что количество неточностей в работе минимально и это ее выгодно отличает от многих других работ.

Эти недостатки не снижают научной значимости диссертационной работы и, оценивая работу в целом, можно сказать, что проведенные исследования принесли интересные научно-практические результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений.

На мой взгляд, для достижения основных результатов диссертационной работы был использован адекватный набор иммунологических методов для детекции антивирусных антител против лихорадки денге и других флавивирусов.

Это позволило автору успешно решить задачи диссертационной работы. Диссертация представляет законченное исследование, выполненное на современном методическом уровне. Выводы сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам.

Основные положения автореферата полноценно отражают материалы диссертационной работы.

Диссертационная работа выполнена в классическом стиле, она изложена на 114 страницах, содержит 12 рисунков, 20 таблиц. Список литературы содержит 171 ссылку на работы отечественных и зарубежных авторов.

Полученные результаты были апробированы на ряде российских, в том числе с международным участием, конференций. По теме диссертации опубликовано 8 научных статей в рецензируемых журналах перечня ВАК.

Заключение

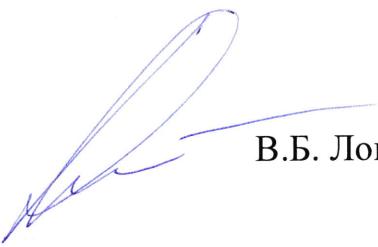
Оценивая работу в целом, можно твердо сказать, что проведенные исследования принесли интересные научно-практическим результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Автором созданы ИФА наборы реагентов для серологической диагностики лихорадки денге: четыре моновалентные тест-системы (MAC-ELISA) для выявления антител класса M к каждому из четырёх типов вирусов денге и две поливалентные тест-системы для выявления группоспецифических IgG и IgM. Проведено определение их чувствительности и специфичности с использованием панелей сывороток крови больных. Это позволило определить область применения тест-систем для выявления антивирусных антител к вирусу денге в сыворотках крови больных и подготовить ряд нормативных документов по тест системам и особенностям их использования в лечебной практике.

Представляется, что диссертационная работа закладывает новые возможности для развития иммунологической диагностики лихорадки денге и дальнейших исследований в области исследования иммунологии flavivирусных инфекций, оценки особенностей формирования иммунитета после вакцинации и перенесенной вирусной инфекции, что может существенно расширить наши знания и представления в этой области науки.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что, несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и редакционный характер, большая научная и практическая важность работы Акиншиной Ю. А. «Разработка и характеристика ИФА тест-систем для серологической диагностики лихорадки денге», дает все основания считать, что диссертационная работа соответствует паспортам специальностей 03.02.02 – вирусология и 14.03.10 - клиническая лабораторная диагностика является законченным самостоятельным научно-квалификационным исследованием, выполненным на высоком научном уровне, и соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842,

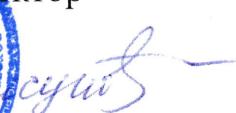
предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор диссертации, Акиншина Юлия Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология и 14.03.10 - клиническая лабораторная диагностика.

Зав. отделом
молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов,
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора,
д.б.н., проф.



В.Б. Локтев

Подпись Локтева В.Б. заверяю:
Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора
к.б.н., доцент



О.А. Плясунова

Локтев Валерий Борисович
630559, Новосибирская обл., п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора
Тел (383) 3367400 доп.2453
loktev@vector.nsc.ru

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора.
Д.б.н., профессор, заведующий отделом молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов.

