

ОТЗЫВ

официального оппонента 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 темы диссертационного исследования

В настоящее время сохраняется высокая потенциальная опасность заболеваемости туляремией, связанная с сохранением природных очагов на территории Российской Федерации, высокой контагиозностью возбудителя, возможностью применения в качестве агента биотерроризма. В 2022 году отмечен рост рейтинга экономического ущерба от туляремии, рост заболеваемости на 14% по сравнению с многолетним показателем, рост в 2,5 раза среди сельского населения. Осложнение эпидемиологической ситуации связано с активизацией природного очага туляремии степного типа, произошедшей на фоне увеличения численности мелких млекопитающих в луго-полевых стациях и возникновения эпизоотии среди грызунов. В связи с этим необходима ранняя лабораторная диагностика туляремии, так как своевременное выявление источника инфекции занимает основное место в системе противоэпидемических мероприятий. Поскольку выделение возбудителя туляремии является трудоемким процессом, а обнаружение ДНК возбудителя обычно требует использования инфицированных тканей, серологические методы чаще всего применяются для подтверждения диагноза.

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора выпускает жидкие эритроцитарные препараты для диагностики туляремии со сроком годности 1 год и определенного температурного режима хранения и транспортирования, находящегося в пределах (5 ± 3) °С, нарушение которого приводит к потере их биологической активности. В связи с этим возникает необходимость в разработке условий стабилизации эритроцитарных препаратов. В данном аспекте одним из решений проблемы является разработка лиофилизированных форм, так как в сухих препаратах резко замедляются или вовсе прекращаются биохимические процессы, в результате чего они становятся более устойчивыми к факторам внешнего воздействия и сохраняют первоначальные свойства в течение длительного периода хранения.

В связи с этим, работа по совершенствованию технологии производства эритроцитарных препаратов для диагностики туляремии и индикации ее возбудителя является несомненно актуальной.

Структура и содержание диссертации

Диссертация А.Г. Кошкидько занимает 175 страниц текста, включает 226 источников, проиллюстрирована 24 рисунками, 24 таблицами, имеет 13 приложений (патенты, утвержденные нормативные документы). Раздел «Введение» включает все необходимые подразделы, включая актуальность исследования, цели и задачи, новизну и значимость, положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов и другие формальные пункты.

Обзор литературы достаточно компактен, состоит из 3 разделов, посвященных различным методологическим аспектам конструирования диагностических препаратов для серологической диагностики туляремии и индикации возбудителя, повышения

стабилизации биологических препаратов, а также вопросам менеджмента рисков при производстве и использовании диагностических препаратов. В целом, обзор литературы содержит достаточный объем информации и предвещает необходимость разработки методического, технологического и нормативного совершенствования технологии производства эритроцитарных препаратов для диагностики туляремии, являющегося целью настоящей работы.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» перечислены используемые в работе штаммы микроорганизмов, иммунобиологические препараты, источники полевых и клинических образцов. Детальное описание биохимических и иммунологических методов свидетельствует о том, что все эксперименты выполнены А.Г. Кошкидько самостоятельно.

Главы 3 – 5 посвящены полученным автором результатам и их обсуждению.

Глава 3 посвящена разработке компонентов сред высушивания, схем лиофилизации диагностикумов эритроцитарных туляремиальных антигенных; определению физико-химических показателей, аналитической чувствительности и специфичности полученных препаратов. Наилучшая аналитическая чувствительность выявлена у диагностикумов лиофилизированных с вариантами сред 2/1 (на основе декстрана) и 15/1 (на основе желатина, тиомочевины, сахарозы). Эффективный подбор композиционной среды высушивания, соблюдение вышеописанных параметров различных стадий процесса сублимационной сушки и герметизации диагностикумов туляремиальных и 50 % формализированных эритроцитов гарантировало высокое качество высушенных диагностических препаратов, сохраняя исходные физико-химические и иммунобиологические показатели, а также позволяя осуществлять постановку реакции без применения специальной разводящей жидкости.

В главе 4 описано изучение стабильности и определение диагностической ценности полученных эритроцитарных препаратов. На основании данных, полученных в ускоренных испытаниях, рекомендован срок годности наборов реагентов в течение двух лет, что подтверждено в дальнейшем учетом регламентированной температуры (5 ± 3) °С. Диагностическая ценность иммуноглобулинового эритроцитарного диагностикума была установлена на 73 пробах полевого материала. В результате диагностическая чувствительность препарата составила 90%, диагностическая специфичность – 96%. Диагностическая ценность антигенного эритроцитарного диагностикума определена на панели 49 сывороток людей, включая 29 образцов вакцинированных и больных. В результате диагностическая чувствительность препарата составила 93%, диагностическая специфичность – 90%. Были оформлены нормативные документы: лабораторные регламенты на наборы реагентов «ДЭТ-Иг» и «ДЭТ-Аг», проекты технических условий, инструкций по применению и маркировок первичных и вторичных упаковок.

Глава 5 посвящена разработке системы менеджмента рисков при производстве и использовании наборов реагентов диагностикумов эритроцитарных туляремиальных лиофилизированных. В результате анализа производства были выделены 12 критических контрольных точек для «ДЭТ-Аг» и 13 критических контрольных точек для «ДЭТ-Иг» по каждому отдельно учитываемому опасному фактору. В результате мониторинга данных было выявлено шесть уровней вероятных опасностей возникновения риска, рассмотрены возможные причины их возникновения и возможные последствия воздействия риска. Для визуального воспроизведения выделенных рисков автором предложена «Матрица последствий и вероятностей».

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертация посвящена совершенствованию технологии производства эритроцитарных препаратов для лабораторной диагностики туляремии. Автором постулировано 4 положения, выносимых на защиту, каждое из которых характеризует отдельную часть работы, подкрепленную фактическим экспериментальным материалом. Немаловажно, что положения включают как методологическую составляющую, так и конкретные количественные характеристики созданных подходов. Перечисленные положения далее раскрываются и обсуждаются в тексте диссертации. Сделанные выводы обоснованы и полностью отражают результаты работы. В результате проведенных исследований автором предложены рекомендации по совершенствованию получения эритроцитарных препаратов, их применению и проведению менеджмента технологии производства.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций

Достоверность и научная новизна проведенных исследований сомнений не вызывают. А.Г. Кошкидько разработаны и сконструированы лиофилизированные формы диагностических эритроцитарных туляремиальных наборов с оригинальным составом сред высушивания и режимов лиофилизации, обеспечивающие сохранение физико-химических и иммунобиологических свойств, увеличение срока годности, а также осуществление постановки реакции без применения специальной разводящей жидкости. Приоритетность выполненных исследований подтверждена 3 патентами РФ на изобретения на универсальную среду высушивания, способ приготовления эритроцитарного диагностикума и способ лиофилизации эритроцитарного диагностикума.

Впервые внедрены методические приемы по менеджменту рисков (идентификация рисков в технологических процессах, разработка «Матрицы последствий и вероятностей», проведения корректирующих действий) при конструировании, производстве и применении наборов реагентов, дающей информацию об остаточном риске, учтенном при оформлении технической и эксплуатационной документации.

Практическая значимость результатов

А.Г. Кошкидько на основании проведенного масштабного исследования сконструированы экспериментально-производственные серии лиофилизированных наборов реагентов диагностических эритроцитарных для выявления антигенов возбудителя туляремии и антител к ним; разработана эффективная среда высушивания и схема лиофилизации эритроцитарных препаратов, сохраняющие аналитическую чувствительность сопоставимую с коммерческими жидкими препаратами и увеличивающие срок годности препаратов с 1 года до 2-х лет. Диагностическая эффективность сконструированных препаратов подтверждена на клиническом и полевом материале. Подобранные режимы высушивания и состав компонентов препаратов позволяет транспортировать их в широком температурном диапазоне (от минус 37 °С до 37 °С), проводить постановку РНГА, используя в качестве разводящей жидкости 0,9 % раствор натрия хлорида. Проведены межлабораторные испытания экспериментально-производственных серий препаратов, разработана нормативная документация для последующего проведения технических и клинических испытаний и регистрации препаратов в Росздравнадзоре.

Нет сомнений, что полученные результаты станут основой для внедрения в практику

лиофильно высушенных эритроцитарных препаратов для диагностики туляремии, характеризующихся высокой стабильностью при хранении и транспортировке.

Личный вклад соискателя в разработку научной проблемы, полнота опубликования результатов

Детализация диссертации и автореферата свидетельствует о том, что автором лично и под его руководством проведен заявленный объем исследований и разработок. Личное участие автора выразилось в анализе литературных данных, выполнении всего объема микробиологических, физико-химических, иммунобиологических, иммунохимических, биофизических исследований; проведении лабораторных, межлабораторных и квалификационных испытаний, оформлении нормативной документации. Достоверность результатов сомнений не вызывает, они опубликованы в ведущих научных журналах, рекомендуемых ВАК РФ (6 статей). Автором получено 3 патента РФ на изобретения. Результаты работы доложены на 10 ведущих научных конференциях различного уровня.

Замечания по диссертационной работе

Принципиальных замечаний к диссертационной работе Кошкидько А.Г. нет.

Но имеются некоторые вопросы:

1. Наилучшие характеристики эритроцитарных диагностикумов были получены на средах высушивания 2/1 (на основе декстрана) и 15/1 (на основе желатина, тиомочевины, сахарозы). Для дальнейшей работы выбрана среда 15/1. Чем обусловлен выбор и отказ от среды 2/1?

2. В главе 2 отсутствует набор реагентов Диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый жидкий «РНГА-Тул-Иг-СтавНИПЧИ», хотя он использовался в качестве контроля диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого (с. 71).

3. Вы проводили исследования при имитации условий транспортирования разработанных препаратов в потребительской упаковке с учетом регламентированной температуры от минус (37 ± 1) °С до (37 ± 1) °С (с. 90). Чем был обусловлен выбор таких температур?

4. В главе по менеджменту рисков (с. 113) расписали корректирующие действия по значимым рискам (R_4, R_5), но присутствуют еще допустимые и контролируемые риски (R_1, R_2, R_3, R_6), которые тоже требуют ввести ряд корректирующих действий. Уточните, какие корректирующие действия были проведены?

Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней

Диссертационное исследование отличается актуальностью, новизной, высоким качеством выполненной экспериментальной работы, а также значимыми результатами, полученными при внедрении созданных методов в практику, что является закономерным следствием высокого профессионального уровня автора. Автореферат полностью отражает содержание диссертации, тщательно оформлен и хорошо проиллюстрирован. Диссертационная работа 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, самостоятельной научно-квалифицированной работой, в которой решена актуальная научная задача, имеющая прикладное значение в лабораторной диагностике

туляремийной инфекции, а именно совершенствованию технологии производства эритроцитарных препаратов для диагностики туляремии и индикации ее возбудителя; изложены новые научно обоснованные технические, технологические или иные решения производства и контроля. Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 1.5.6. «Биотехнология» (отрасль науки – биологические) (пп. 2, 9, 22, 24).

По объему и методологическому уровню выполненных исследований, научной новизне, практической значимости, достоверности полученных результатов и выводов диссертационная работа Кошкидько А.Г. полностью соответствует требованиям ВАК пп. 9-11, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 в действующей редакции, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Кошкидько Александра Геннадьевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

Официальный оппонент,
доктор биологических наук по специальности
1.5.11. (микробиология), профессор кафедры
микробиологии и физиологии растений
биологического факультета Федерального
государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего
образования «Саратовский национальный
исследовательский государственный
университет имени Н.Г. Чернышевского»

Уткин Денис Валерьевич

Почтовый адрес:

410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Телефон: +7(8452)511630. E-mail: biofac@info.sgu.ru

Подпись Уткина Дениса Валерьевича заверяю:

Ученый секретарь Ученого совета

СГУ, канд. хим. наук

«5» 09 2023 г.



Федусенко Ирина Валентиновна