

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Панфёрова Василия Геннадьевича

«Изучение взаимодействия антител с вирусными и бактериальными антигенами для создания экспрессных методов определения фитопатогенов»,
представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности
03.01.04 – Биохимия

Актуальность исследований. Фитопатогенные микроорганизмы представляют собой значительную угрозу сельскому хозяйству и продовольственной безопасности населения планеты. Связанные с ними потери урожая могут достигать существенных объемов. В связи с этим исследования, связанные с контролем этих патогенов, включая их своевременное выявление и идентификацию, имеют большое практическое значение.

Иммунохроматографические методы анализа (ИХА) относятся к наиболее распространенной группе технологий обнаружения фитопатогенных вирусов и бактерий, отличаются быстротой получения результата, нетрудоемкостью, нетребовательностью к квалификации оператора и наличию специальной техники и являются оптимальными средствами для полевой экспресс-диагностики. Однако чувствительность ИХА до сих пор уступает прочим иммуноферментным методам и методам, основанным на полимеразной цепной реакции; кроме того, коммерческие аналитические системы, основанные на данном методе, позволяют проводить определение только одного целевого патогена. Следовательно, разработка высокочувствительных мультиплексных форматов ИХА является весьма актуальной, а ее реализация требует дополнительных исследований биорецепторных взаимодействий внутри аналитической системы с разделением в пространстве и времени.

Определенная соискателем **цель исследований** заключается в изучении взаимодействий антител с вирусными и бактериальными поливалентными антигенами с целью разработки высокочувствительных методов детекции фитопатогенов.

Научная новизна исследований заключается в том, что впервые была установлена связь между соотношением реагентов и структурой и составом комплексов вирионов вируса картофеля X с моноклональными антителами, показана агрегативная устойчивость коллоидных растворов конъюгатов наночастиц золота с антителами и охарактеризованы частицы, образующиеся при восстановлении золотохлористоводородной кислоты на затравочных наночастицах золота, разработаны методические подходы для снижения предела обнаружения (LOD) ИХА в разрабатываемых аналитических системах и установлено влияние кинетических параметров иммунных взаимодействий на LOD разработанного мультипорогового ИХА, охарактеризованы состав и таргетная активность конъюгатов наночастиц золота, полученных при одновременной иммобилизации пяти антител разной специфичности и реализован мультиплексный формат ИХА для выявления пяти основных вирусов картофеля без их дифференцировки.

Практическая значимость полученных результатов заключается в создании высокочувствительных мультиплексных тест-систем для определения вирусных и бактериальных патогенов картофеля с возможностью расширения использованных подходов и на другие практически значимые патогены сельскохозяйственных культур. Разработанные тест-системы могут быть использованы для контроля качества семенного и посадочного материала, а также внелабораторного скрининга значительного количества проб растительного материала.

Автор диссертации показал агрегативную устойчивость высококонцентрированных растворов созданных им конъюгатов наночастиц золота с антителами и сохранение их функциональной активности в течение длительного периода, что обеспечивает их пригодность для использования в иммунохроматографических тест-системах. Были реализованы три новых методических подхода, позволяющих значительно (в 0-240 раз) снизить LOD разрабатываемых тест-систем, что очень важно при анализе на наличие скрытых инфекций. Очень интересным результатом диссертационного исследования стали тест-системы с мультипороговой детекцией, обеспечивающие возможность оценки степени

инфицированности растения патогенами без необходимости использования оборудования для количественного анализа полученного результата. Подобные тест-системы могут быть весьма востребованы при анализе качества семенного материала картофеля.

Проблема создания мультиплексных тест-систем для ИХА была решена в двух форматах, один – для первичного скрининга (выявление присутствия до пяти вирусов картофеля без их дифференцировки) и второй – для видоспецифичной детекции до 10 вирусных и бактериальных патогенов одновременно с уровнем чувствительности 2-8 нг/мл для вирусов и $10^3 - 10^5$ клеток/мл для бактерий. Следует отметить, что, насколько нам известно, в последнем случае достигнутый уровень мультиплексности и чувствительности превосходит все другие мировые разработки в области ИХА-анализа.

Работа отличается высоким уровнем новизны и грамотными и современными методическими подходами. Разработанные тест-системы прошли необходимую апробацию на репрезентативной панели проб с привлечением двух научно-исследовательских организаций и проведением параллельного ИФА-анализа проб, показавшего 100% корреляцию результатов, полученных обоими методами. Все полученные в исследовании результаты были надлежащим образом статистически обработаны и являются достоверными. Выводы соответствуют проведенным исследованиям.

Результаты выполненного исследования были представлены 13 тезисами на 11 российских и международных конференциях и опубликованы в 11 статьях в высокорейтинговых международных журналах.

В целом, работа В.Г. Панфёрова представляет научный и практический интерес как для специалистов, занимающихся селекцией и защитой картофеля, так и для специалистов, работающих с другими сельскохозяйственными культурами, а ее результаты в перспективе будут высоко востребованы на практике. Исследование отвечает квалификационным требованиям ВАК РФ, а его автор - Панфёров Василий Геннадьевич безусловно заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Зав. Отделом болезней картофеля и овощных культур
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский
Институт фитопатологии», кандидат биол. наук

 М.А. Кузнецова

Старший научный сотрудник
Отдела болезней картофеля и овощных культур
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский
Институт фитопатологии», кандидат биол. наук

 Н.В. Стацюк

Подписи М.А. Кузнецовой и Н.В. Стацюк заверяю.

Зам. директора по науке
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский
Институт фитопатологии», доктор с/х наук, профессор



Адрес ВНИИФ: 143080, Московская обл., Большие Вяземы, ул. Институт, вл. 5.
Тел. 8(495) 597-42-28, факс 8(498) 694-11-24; email: vniif@vniif.ru