

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы *Евдокимовой Вероники Вячеславовны*  
**«Разработка препаратов моноклональных антител для идентификации и  
дифференциации холерных вибрионов O1, O139 серогрупп  
иммуноферментными методами»,**  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 03.02.03 – микробиология

Актуальность диссертационной работы В. В. Евдокимовой обусловлена тем, что одним из современных направлений совершенствования лабораторной диагностики холеры, является использование иммунологических тест-систем с визуальным учетом результатов. К ним относятся иммунохроматография, иммуносенсорные устройства и другие. Решение проблемы специфичности и чувствительности иммунологических тест-систем может быть достигнута путем использования иммуноглобулинов моноклонального типа, которые характеризуются высокой степенью гомогенности как по изотипам антител, так и по эпитопной направленности и аффинитету, что особенно важно при использовании иммунодиагностических тестов для детекции холерных вибрионов и их отдельных антигенов. К их числу относится твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) и его дот-вариант (ДИА). Созданию набора видоспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации и дифференциации холерных вибрионов O1, O139 серогрупп методом прямого планшетного ИФА и дот-иммуноанализа посвящена цель настоящей работы.

Задачи исследования представлены четко и последовательно. Положения, выносимые на защиту, согласуются с целью и задачами диссертационной работы.

Научная новизна и теоретическая значимость работы, которые не вызывают сомнений, обосновываются получением новых гибридом, продуцирующие МКА, направленные к эпитопам поверхностных антигенов холерных вибрионов O1, O139 серогрупп, выявляющие белки, входящие в состав общей мембранной фракции; разделением вновь полученных специфичных МКА, на две группы, выявляющие штаммы *V. cholerae* El Tor и O139 с различными генотипами по наличию/отсутствию генов *ctx* и *tcp*; созданием панели, включающей видоспецифические МКА и антитела к белкам наружной мембраны; оптимизацией методологических приемов изготовления моноклональных пероксидазных конъюгатов к антигенам штаммов *V. cholerae* O1 и O139 для выявления холерных вибрионов разных генотипических характеристик с помощью прямых методов ИФА; установлением диагностической сопоставимости дот-ИФА и ИФА на пластике; отработкой режимов постановки прямого планшетного ИФА и дот-ИФА с применением моноклональных пероксидазных конъюгатов для экспресс-диагностики холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп без приборного оснащения, что позволяет расширить спектр моноклональных

диагностических препаратов, способствующих повышению эффективности лабораторной диагностики холеры.

Научно-практическая ценность работы заключается в депонировании в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» двух гибридом-продуцентов МКА: ГХ-Н2F6/Omp и ГХ-А5D8/Omp, синтезирующие диагностически значимые МКА к эпитопам мембранного белка (м.м. 38 и 40 кДа) холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, для создания иммуноферментных диагностических тест-систем для идентификации *V. cholerae* O1/O139 (tcp+) и иммунохимического анализа белков наружных мембран.

Примененная современная методология полностью соответствует решению поставленных задач. Статистически обработка полученных данных не вызывает сомнений в достоверности результатов.

В процессе объемной практической работы доказано, что гибридомы-продуценты видоспецифических МКА отвечают диагностическим требованиям и их можно использовать как стабильный источник антител в больших количествах для конструирования диагностических препаратов. Осуществлена наработка экспериментальных серий холерных видоспецифических пероксидазных конъюгатов и сформирован Набор реагентов «Имуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *Vibrio cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА», на который оформлены и утверждены нормативные документы (ТУ и Инструкция по применению). В ходе лабораторных испытаний данного набора было показано отсутствие перекрестной активности с представителями близкородственных и гетерологичных микроорганизмов, что свидетельствует о специфичности МКА в отношении холерных вибрионов O1/ O139 серогрупп. Составлен и утвержден Акт внедрения Набора реагентов. Показано преимущество прямого варианта dot-ИФА, т.е. уменьшение количества этапов, сокращение время проведения анализа. Установлено, что дот-ИФА возможно проводить в различных условиях и для различного числа исследуемых образцов. Метод отличается экономичным расходом реагентов, не требуют приборов с электропитанием, наборы компактны. Также получены экспериментальные образцы пероксидазных конъюгатов на основе МКА к эпитопам белков наружных мембран, которые позволяют выявлять холерные вибрионы O1/O139 серогрупп с генотипом *tcpA*<sup>+</sup> в прямых методах иммуноферментного анализа.

Разработка новых высокочувствительных и специфичных экспресс-тестов для быстрого выявления *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп будет способствовать совершенствованию лабораторной диагностики холеры, сохраняющей высокую социальную значимость опасной инфекционной болезни, способной наносить значительный экономический ущерб, а



всестороннее изучение антигенной структуры возбудителя холеры остается одним из приоритетных направлений в медицинской микробиологии.

Выводы изложены корректно, резюмируя все основные результаты проведенного исследования. Работа полностью соответствует заявленной специальности.

По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, из них 3 в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК РФ. Результаты исследований были представлены на научных конференциях (всероссийских и институтских).

По актуальности и новизне проблемы, методическим подходам к её разрешению, научно-практическому значению результатов представленная работа является завершённым научно-прикладным исследованием, решившим важную проблему, связанную с расширением современных доступных методов, что имеет важное значение в аспекте совершенствования микробиологической составляющей мониторинговых исследований на холеру на территории России. Диссертационная работа соответствует требованиям п. 9. Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 «О порядке присуждения ученых степеней» (в редакции Постановления № 335 от 21.04.2016 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор Евдокимова Вероника Вячеславовна достойна присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология.

Зав. Бактериологической лабораторией  
ФКУЗ «Северо-Кавказская ПЧС»  
Роспотребнадзора, к.м.н.



Балахнова В.В.

Подпись Балахновой В.В. удостоверению  
Ответственный за кадровую работу  
ФКУЗ «Северо-Кавказская ПЧС»  
Роспотребнадзора

Аванесова К.С.

344022 г. Ростов-на-Дону, пер.Нахичеванский д.30/197