



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ  
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

Федеральное казенное учреждение здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного  
Знамени научно-исследовательский  
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»  
**ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт Роспотребнадзора**  
664047 Иркутск, Трилисера, 78  
Тел. 22-01-35, факс 22-01-40  
E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru  
<http://www.irkutsk.ru/chumin>  
ОКПО 01898090, ОГРН 1023801543017  
ИНН/КПП 3811015807/381101001

**УТВЕРЖДАЮ:**

директор института  
докт. мед. наук, профессор  
Балахонов С.В.



**ОТЗЫВ**

ведущей организации о научно-практической значимости диссертационной работы Евдокимовой Вероники Вячеславовны “Разработка препаратов моноклональных антител для идентификации и дифференциации холерных вибрионов O1, O139 серогрупп иммуноферментными методами”, представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03-микробиология

**Актуальность темы исследования.** Международная практика борьбы с холерой показала, что периодически имеют место трансконтинентальные и межгосударственные завозы инфекции, нередко с развитием местных вспышек на новых территориях. Важное значение имеет изменчивость возбудителя – появление в 90-х годах прошлого столетия высокопатогенных генетически изменённых вариантов вибриона Эль Тор, содержащих гены классического холерного токсина и обладающих высокой адаптацией во внешней среде.

Риск завоза возбудителя и возможное накопление его в поверхностных водоёмах с развитием острых вспышек обуславливают неблагоприятный прогноз по холере в России, что определяет необходимость постоянного мониторинга и требует совершенствования методов экспресс-диагностики возбудителя холеры. Здесь внимание привлекает обнаружение в объектах окружающей среды на фоне эпидблагополучия патогенных вариантов возбудителя холеры, а также нетоксигенных штаммов, содержащих токсинорегулируемые пили адгезии.

Актуальным направлением иммунодиагностики инфекций является использование тест-систем с визуальным учётом результатов (иммунохроматография, твердофазный иммуноферментный анализ, дот-иммуноанализ, иммуносенсорные устройства). При этом вопросы специфичности тест-систем решаются при использовании иммуноглобулинов моноклонального типа. Работы по получению МКА к поверхностным антигенам холерного

вибриона и холерному токсину с конструированием на их основе иммунологических тест-систем зарубежными исследователями (Gustafsson B., 1984; Pengsur C.etal., 2011, 2013) проводятся с 80-х годов XX века и в настоящее время выпускаются тест-системы для экспресс-диагностики холерных вибрионов (иммунохроматографические “дипстики” и биочипы).

Получение гибридом-продуцентов МКА к антигенам холерного вибриона в нашей стране началось в конце 80-х годов XX века. В Ростовском противочумном институте получены МКА к О-антигену холерного вибриона О1 серогруппы, на основе которых сконструированы коаггулинирующий диагностикум, агглютинирующие и флуоресцирующие антитела (Алекеева Л.П., Бурлакова О.С. с соавт., 1988; 1993 и др.). Позднее (Алекеева Л.П., Сальникова О.И., Маркина О.В., Чемисова О.С., 2000, 2002) получены и охарактеризованы МКА к ЛПС *V. cholerae* О139 и с их помощью выделены поверхностные полисахаридные антигены штаммов *V. cholerae* О139 разного происхождения (Чемисова О.С., 2007). На основе МКА-О1 и МКА О139 сконструированы экспериментальные серии диагностических препаратов для постановки реакции слайд-агглютинации и прямой иммунофлуоресценции (Алексеева Л.П. с соавт., 2002; 2003; 2014).

Вместе с тем в последнее десятилетие внимание авторов сосредоточено на использовании МКА для конструирования иммуноферментных и иммунохроматографических тест-систем. В институте “Микроб” на основе разноэпитопных МКА созданы экспериментальные иммуноферментные тест-системы для детекции возбудителя холеры О1 и О139 (Сырова Н.А., 2005; Терёшкина Н.Е., 2004; Фёдорова В.А., 2004). Предложено использовать специфичные к В-субъединице холерного токсина МКА в дот-иммуноанализе для экспресс-диагностики токсигенных штаммов холерного вибриона (Девдариани З.Л. с соавт. 1997, 1999; Михеева Е.А. с соавт. 2012, 2017). Отработан и оптимизирован на основе МКА к холерному токсину иммуноферментный анализ двойных антител (ИФА-2АТ), позволяющий оценить токсинопродукцию штаммов холерного вибриона О1 и О139 серогрупп (Маркина О.В., 2007; Сальникова О.И., соавт., 1998, 1999). Описано создание тест-системы на основе специфических к холерному токсину МКА в формате микрочипа и в планшетном варианте иммуноферментного анализа (Петрова Е.С. с соавт., 2009).

В Росздравнадзоре зарегистрировано пять тест-систем на основе МКА для экспресс-диагностики холеры (выявляющие холерный вибрион О1, О139 в реакции слайд-агглютинации, прямой флуоресценции, иммунохроматографическим методом и определением продукции холерного токсина в иммуноферментном анализе), которые могут быть использованы в практическом здравоохранении.

В связи с тем, что в настоящее время зарегистрированные коммерческие иммуноферментные тест-системы для выявления специфических О1- и О139-антигенов холерного вибриона отсутствуют, перспективным является разработка и внедрение их в лабораторную практику.

С учётом изложенного тема диссертационной работы Евдокимовой Вероники Вячеславовны “Разработка препаратов моноклональных антител для идентификации и дифференциации холерных вибрионов О1, О139 серогрупп иммуноферментными методами”, цель которой заключается в создании набора пероксидазных конъюгатов на основе видоспецифических моноклональных антител, направленных к О-антигену холерного вибриона О1 и О139 серогрупп для их идентификации и дифференциации методами прямого планшетного ИФА и дот-иммуноанализа, актуальна и своевременна. В соответствии с целью исследования определены задачи по выявлению разных сторон вопроса.

**Новизна полученных результатов и выводов диссертации** заключается в получении автором новых гибридом, продуцирующих МКА, направленные к эпитомам поверхностных антигенов холерного вибриона O1, O139 серогрупп и их характеристике методом иммуноблоттинга – выявление белков с молекулярной массой 38-42 кДа, входящих в состав общей мембранной фракции. Приоритетность способа подтверждена заявкой №2017127677 от 1.08.2017 на изобретение “Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus Musculus* – продуцент моноклонального антитела к мембранному белку, общему *tcp*<sup>+</sup> штаммов холерного вибриона O1 и O139 серогрупп”. Полученные диссертантом МКА при помощи иммунохимического анализа разделены на две группы: одна – выявляет штаммы холерного вибриона O1 и O139 с генотипом *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup> и *ctxA*<sup>-</sup>*tcpA*<sup>+</sup>, другая выявляет все штаммы холерного вибриона O1 и O139, независимо от наличия генов *ctxA* и *tcpA*. Сформирована панель МКА, включающая видоспецифические моноклональные антитела к O-антигену холерного вибриона O1 и O139 и антитела к белкам наружной мембраны (для точного эпитопного анализа поверхностных антигенов холерного вибриона и оценки их свойств).

Впервые на основе видоспецифических МКА получены пероксидазные конъюгаты, предназначенные для обнаружения и дифференциации штаммов *V. cholerae* O1 и O139. С помощью конъюгатов в прямых методах ИФА возможно обнаружение холерных вибрионов с генотипом *tcpA*<sup>+</sup>. Диссертантом установлена сопоставимая диагностическая ценность дот-ИФА и классической иммуноферментной реакции на пластике. При этом препараты предназначены для обнаружения и дифференциации штаммов холерного вибриона O1 и O139 (прямым методом планшетного ИФА и дот-ИФА), как в стационарных, так и полевых условиях (без приборного оснащения). Вместе с тем их применение исключает возможность перекрестных реакций с близкородственными микроорганизмами, необходимость использования дорогостоящих антивидовых конъюгатов и сокращает время анализа до 70 минут. Всё это позволяет расширить спектр применения моноклональных диагностических препаратов в мониторинге за холерой.

**Значимость для науки и практики полученных автором диссертации результатов.** Автором получен патент на гибридому, стабильно продуцирующую МКА к видоспецифическим эпитомам холерного вибриона O1 серогруппы №2425874 “Штамм культивируемых гибридных клеток животных *Mus. Musculus* L-продуцент моноклональных антител, специфичных к O-антигену холерного вибриона O1 серогруппы (13.04.2010). Депонированы (“ГКПМ-Оболенск”) две гибридомы-продуценты МКА: ГХ-Н2F6/Omp (№179 от 12.12.2016) и ГХ А508/Omp (№180 от 12.12.2016), синтезирующие МКА к эпитомам мембранных белков холерного вибриона O1 и O139, которые могут быть использованы при создании иммуноферментных диагностических тест-систем для идентификации холерного вибриона O1, O139 серогрупп, содержащего пили адгезии (*tcpA*) и иммунохимического анализа белков наружной мембраны.

Оформлены нормативные документы (ТУ и Инструкция по применению) на набор реагентов “Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченые пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *Vibrio cholerae* O1 и O139 (in vitro) методом ИФА и дот-ИФА” (одобренны Учёным советом института, протокол №10 от 5.12.2016). По результатам лабораторных испытаний составлен и утверждён директором института Акт внедрения “Набора реагентов” №1041/1-16-10 от 2.09.2016. Применение диагностических препаратов на основе МКА позволяет повысить специфичность серологических методов и исключить перекрестные реакции с представителями близкородственных и гетерологичных микроорганизмов.

### **Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений.**

Положения, выносимые на защиту, выводы и заключение диссертации обоснованы, отражают результаты проделанной работы и соответствуют поставленным целям и задачам. О достоверности результатов работы говорит достаточное количество наблюдений, большой фактический материал, полученный в повторяющихся экспериментах на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании с помощью современных методов исследования, обобщённый в таблицах и качественно выполненных рисунках, обработанный с использованием методов статистического анализа и личный вклад автора в разработку проблемы. Личный вклад автора состоит в анализе литературных данных и информационного материала при планировании, определении цели работы, в постановке и выполнении всех исследовательских задач, проведении экспериментальных работ, участии в обсуждении и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций, депонировании гибридных клеточных линий, оформлении патента на изобретение, подготовке нормативно-технической документации.

**Оценка содержания диссертации, её завершённости в целом, предложения по оформлению.** Диссертационная работа В.В. Евдокимовой выполнена в лаборатории гибридом ФКУЗ “Ростовский-на-Дону противочумный институт” Роспотребнадзора в рамках плановой НИР №152-4-12 “Создание видо-и серовароспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации холерных вибрионов O1, O139 серогрупп в реакции дот-иммуноанализа” (2012-2016 гг., № Гос. регистрации 01201252078).

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит введение, обзор литературы, описание материала и методов исследования, трёх глав собственных исследований, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Библиография включает 233 источника, в том числе 144-зарубежных. Работа иллюстрирована 21 рисунком и 15 таблицами.

Раздел “Введение” содержит основную информацию о проделанной работе. В нём представлены обоснование актуальности выполнения работы, цели и задачи исследования, научная новизна и практическая ценность работы, данные о публикациях, структуре и объёме диссертации, выносимых на защиту основных положениях.

В главе “Обзор литературы”, состоящий из двух разделов представлено описание основных поверхностных антигенов холерного вибриона O1 и O139 серогрупп и состояние диагностики холеры на основе современных иммунодиагностических методов.

Один из компонентов наружной мембраны холерного вибриона ЛПС или O-антиген (эндотоксин), играющий основную роль в формировании антибактериального иммунитета при холере, выделяется в окружающую среду в форме мембранных везикул. Такой механизм отщепления является общим для всех грамотрицательных микроорганизмов [Chatterjee S.N., Das J., 1967.]. Удаление ЛПС из наружной мембраны приводит к снижению иммуногенности и повышению токсичности препарата. Все три области ЛПС, т.е. O-цепь, кор и липидА иммуногенны для животных (Яровая Л.М., Алёшкин В.А., 1991). У холерных вибрионов O1 и O139 имеются отличия в строении O-антигена и как следствие отсутствие агглютинации штаммов *V. cholerae* O139 антисывороткой O1. С помощью панели моноклональных антител в ИФА и иммуноблоттинга (Терешкина Н.Е., 2004) выявлено четыре общих эпитопа гликопептидной природы у *V. cholerae* O1, O22 и O139. В неблагоприятных условиях окружающей среды изменению подвергаются прежде всего боковые полисахаридные цепи ЛПС, отвечающие за серологическую специфичность холерного вибриона. Ещё один поверхностный антиген полисахаридной природы – капсула, характерная только для возбудителя холеры O139.

Показана достоверно более высокая протективная активность капсульного полисахарида в сравнении с ЛПС *V. cholerae* O139 при заражении мышей (Фёдорова В.А., 2004). Утрата капсулы холерным вибрионом O139 приводит к снижению вирулентности почти в 100 раз. Капсула способствует адгезии вибрионов к эпителиальным клеткам [Waldor M.K., Colwell R., Mekalanos J.J. et al., 1994].

В состав клеточной стенки, кроме ЛПС, входят белки. Основные из них, участвующие в патогенезе холерной инфекции – пили адгезии и колонизации, являющиеся как факторами адгезии, так и поверхностными антигенами [Смирнов Г.Б., 1988]. Основную роль в колонизации возбудителя холеры играют токсин-корегулируемые пили (TCP). Экспрессия ХТ, TCP и ряда белков корегулируется ToxR-регуляторной системой, которая включает белок ToxT. Другой белок-ToxR является трансмембранным белком с цитоплазматическим ДНК-связывающим доменом, воспринимающим сигналы окружающей среды. Tcp-пили обнаруживаются у классических и Эль Тор вибрионов, изолированных от больных, но часто отсутствуют у штаммов из окружающей среды, что объясняется различиями в регуляторных системах вибриона, позволяющим бактериям варьировать экспрессию его генов в зависимости от пребывания в среде обитания. При этом Sengupta T.K. et al., 1994 установлено, что холерные вибрионы O139 экспрессируют антигенно отличные от O1 серогруппы типы пилей адгезии. Как известно, TCP являются не только фактором колонизации вибрионов к слизистой тонкого кишечника, но и рецептором для умеренного филаментозного фага CTXφ, в составе которого находится CTX генетический элемент. Поэтому наличие подобных пилей у нетоксигенных штаммов создаёт возможность адсорбции на них фага CTXφ, в результате чего может произойти формирование нового патогенного клона (Faruque S.M. et al., 1998). Существенно, что гены, кодирующие синтез O-антигена, могут передаваться горизонтально (Beltran P. et al., 1999). Нарушения в составе O-антигена ЛПС ведут к прекращению синтеза на поверхности вибрионов пилей, причём этот процесс связан не с нарушениями в структуре генов tcp, а его способностями транспорта белка через изменённую наружную мембрану (Chiang S.L., Mekalanos J.J., 1999 и др.). Таким образом, на молекулярном уровне доказано, что одной из причин отсутствия важнейших детерминант патогенности у холерного вибриона могут быть изменения в антигенной структуре, связанные с нарушением синтеза O-антигена.

У холерного вибриона описано несколько типов пилей, одни из которых это маннозочувствительный гемагглютинин. В последние годы MSHA-пили считаются фактором персистенции вибриона (Балахонов С.В. с соавт., 2014). MSHA-пили принимают участие в связывании лактоферрина, чем обуславливают пребывание холерного вибриона в организме человека (Коршенко В.А. с соавт., 2015). При переходе холерного вибриона из организма человека в водную среду снижается продукция факторов вирулентности и начинают экспрессироваться факторы адаптации, способствующие его выживанию в среде обитания (Плеханов Н.А., Заднова С.П., 2016). Указанные пили располагаются на поверхности бактериальной клетки и участвуют в первом этапе формирования биоплёнки - прикреплении к субстрату.

К числу поверхностных компонентов *V. cholerae* относятся белки наружной мембраны. Белки-порины наружной мембраны *V. cholerae* составляют почти 2% от всех белков, синтезируемых клеткой. Они определяют адгезию холерных вибрионов, колонизацию ими слизистых оболочек, рецепцию фагов клеткой, поступление необходимых для жизнедеятельности клетки веществ, устойчивость к антибиотикам, гидролитическим ферментам, солям желчных кислот и др. стрессовым воздействиям (Николаев В.Б. с соавт., 2007). В формировании пор во внешней мембране принимают участие белки OmpU, OmpT и

OmpS, экспрессией которых управляет трансмембранный белок ToxR, который активирует экспрессию потенциального фактора адгезии – белка OmpU (Chakrabarti S.R. et al., 1996 и др.) и репрессирует экспрессию другого белка наружной мембраны OmpT (Miller V.L., Mekalanos J.J., 1998). OmpU синтезируется холерными вибрионами не только O1, но и *V. cholerae* O139 серогруппы (Speradio V. et al., 1996). Показано, что белок с молекулярной массой 38 кДа является протективным антигеном у *V. cholerae* O139 (Pal S. et al., 1996). Считается, что белок внешней мембраны OmpU синтезируется *V. cholerae* в организме человека, а при обитании во внешней среде бактерии синтезируют OmpT.

Другой раздел литературного обзора – диагностика холеры на основе современных иммунологических методов – включает работы, связанные с взаимодействием специфических антигенов холерного вибриона и гомологичных антител и направлена на выявление поверхностных антигенов и факторов патогенности возбудителя, участвующих в формировании иммунного ответа. Методическими указаниями по лабораторной диагностике холеры регламентирована РА на стекле или развёрнутая РА в пробирках для определения принадлежности холерных вибрионов к серогруппе и сероварианту. Применяется также реакция коагглютиации (РкоА), для постановки которой не требуется специального оборудования и дорогостоящих материалов. Повысить чувствительность и специфичность указанных серологических методов возможно с помощью МКА, характеризующихся строгой специфичностью и высокой активностью. В настоящее время зарегистрированным является диагностический набор “ИГ-*V. cholerae* O1/O139-РА”, разработанный в Ростовском-на-Дону противочумном институте, основу которого составляют препараты МКА (направлены к эпитомам ЛПС-O1 и ЛПС-O139), позволяющие выявлять холерные вибрионы O1 и O139 методом слайд-агглютинации. Большое внимание уделяется конструированию иммунодиагностикомов, которые позволяют за короткое время обнаружить в пробе ХТ (Белая Ю.А. с соавт. 1984; и др.). Одно из ведущих мест в экспресс-диагностике холеры занимает метод флуоресцирующих антител (МФА). Сотрудниками Ростовского-на-Дону противочумного института показана возможность применения МКА к O1 антигену и ЛПС-O139 в реакции прямой иммунофлуоресценции (РИФ) для обнаружения холерных вибрионов (Алексеева Л.П. с соавт, 2002; Маркина О.В., с соавт, 2003). Оптимизирована биотехнологическая схема изготовления противохолерных моноклональных ФИТЦ-конъюгатов (Кретенчук О.Ф., 2014), отличающихся строгой специфичностью и чувствительностью на уровне  $10^5$  м.к./мл. На набор реагентов “ИГ-*V. cholerae* O1/O139-РИФ” получено свидетельство о государственной регистрации. Иммунофлуоресцентный метод был применен для выявления холерного энтеротоксина (Владимцева И.В. с соавт., 1986), используя ганглиозидсодержащую DASS-систему и люминесцирующую холерную антитоксическую сыворотку. Для обнаружения холерного вибриона хорошо зарекомендовал себя иммуноферментный анализ (ИФА) или ELISA. Зарубежные исследователи (Mousavi S.L. et al. 2008) разработали комбинированную ПЦР-ИФА тест-систему, выявляющую 0,5 пг геномной ДНК и 5 клеток холерного вибриона, которая эффективна при диагностике изменённых по антигенной структуре штаммов холерного вибриона.

Экономически оправданным является использование простого и дешёвого варианта ИФА-дот-иммуноанализа (ДИА, дот-ИФА, dot-ELISA-точечный твёрдофазный иммуноферментный анализ), постановка которого не требует наличия дорогого оборудования и реактивов. Чувствительность и специфичность дот-ИФА и ИФА равноценна. Наибольший практический интерес представляет прямой вариант ИФА, когда используется конъюгат пероксидазы со специфическими антителами, что приводит к сокращению этапов реакции и срока анализа. На основе МКА к ЛПС холерного вибриона O139 предложен

высококочувствительный и специфичный тест для постановки дот-блот ИФА: система выявляет 0,48 нг ЛПС O139 и 30 клеток ( $10^4$  КОЕ/мл) вибрионов O139 (Chaicumpa W. et al., 1998). Таиландские исследователи (Pengsur C et al., 2011) создали панель МКА для обнаружения и дифференциации *V. cholerae* O1, O139 и O141 методом дот-блоттинга с чувствительностью  $10^5$ - $10^7$  КОЕ/мл. В отечественной практике также имеются разработки экспериментальных тест-систем для проведения дот-иммуноанализа (Захарова Г.Л. с соавт., 2008). Большое количество работ касается разработки иммуноферментных тест-систем для обнаружения ХТ (Бабицын С.Н., 1991; Девдариани З.Л. с соавт., 1997, 1999; Сальникова О.И. с соавт. 1998; Маркина О.В., 2008; Петрова Е.Э. с соавт., 2009 и др.). Предел обнаружения токсина достигает 0,2 нг/мл в планшетном формате ИФА и 0,44 нг/мл в формате микрочипа (Петрова Е.Э., 2009). Разработаны специфические МКА для обнаружения ХТ в дот-ИФА на ацетатцеллюлозной мембране и зарегистрирована диагностическая тест-система (ИФАХолХТ-М (Михеева Е.А. с соавт., 2012, 2017). Таким образом, имеющиеся сегодня данные в отношении прямых и непрямых вариантов ТИФА и дот-ИФА свидетельствуют об их перспективности и целесообразности включения в схему лабораторной диагностики холеры.

Перспективным методом экспресс-диагностики холеры является иммунохроматографический анализ, позволяющий в течение 15 минут обнаружить патоген в пробе. За рубежом сконструировано достаточное количество иммунохроматографических “тест-полосок” для выявления холерных вибрионов O1, O139 серогрупп и ХТ (Kallury P. et al., 2006; Wang X.Y. et al., 2006). Исследователи продолжают применять метод вертикальной иммунохроматографии, используя конъюгированные с частицами коллоидного золота высокоспецифичные МКА. Созданы тест-системы, позволяющие дифференцировать серовары *V. cholerae* O1, обнаруживать холерный вибрион O139 в образцах морепродуктов. В обзоре в виде таблицы дана информация о разработанных и имеющихся в продаже тест-системах для экспресс-диагностики холеры. Во ФБУН ГНЦ ПМБ (пос. Оболенск) сконструированы ИХ-полоски на основе МКА, синтезируемых гибридами, полученными в Ростовском ПЧИ. Испытание “Тест-полоски *V. cholerae* O1” показало, что холерный вибрион можно выявлять при концентрации в исследуемом материале не ниже  $10^8$  м.к./мл. На основе МКА, специфичных к холерному токсину, разработан диагностикум «Тест-полоска *V. cholerae tox*<sup>+</sup>» для обнаружения токсигенных штаммов холерного вибриона. Следует заметить, что производство ИХ-полосок экономически затратно, чувствительность и специфичность метода не всегда удовлетворительны. Высокотехнологичным и перспективным направлением в иммунодиагностике ООИ является разработка иммуносенсоров (биосенсоров).

Проведённый анализ литературы позволил сформулировать актуальность, цель и задачи диссертационной работы.

**Собственные исследования диссертанта** выполнены с применением описанных в главе “Материалы и методы” микробиологических, биохимических, биотехнологических (гибридизация, клонирование, культивирование и криоконсервирование гибридом), иммунохимических (иммунофлуоресценция, иммуноферментный, иммуноблоттинг) методов и статистической обработки результатов. Для получения иммунных спленоцитов, накопления МКА *in vivo* и приготовления подкормочного слоя клеток использованы самки инбредных мышей линии BALB/c и беспородных белых мышей (массой 16-20 грамм в возрасте 6-10 недель). Продуцентом видоспецифических МКА холерного вибриона O1 служила гибридома ГХ-F8/01, депонированная ранее в коллекции Института Цитологии (г. Санкт-Петербург). Для накопления МКА- O139 использована гибридома РККК (II) 674D, депонированная также

в Институте Цитологии. Коллекция гибридом получена в лаборатории гибридом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт и хранится в сосудах Дьюара с жидким азотом.

В работу взято 94 штамма *V. cholerae* O1, 34 *V. cholerae* O139, 18 *V. cholerae* не O1/не O139, 7 *V. cholerae* RO. Для контроля специфичности препаратов МКА использован целый набор штаммов (5 штаммов *V. parahaemolyticus*, 2–*E. coli*, 2–*Brucella spp.*, 2–*Salmonella spp.*, 4– *Aeromonas*). Все культуры получены из коллекции МЖК ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Исследованы препараты ЛПС *V. cholerae* O1 5879 (ЛПС O1) и *V. cholerae* O139 P-16064 (ЛПС O139), полученные по Westphal et al., (1965). В качестве отрицательного контроля-коммерческий препарат ЛПС *E. coli*:O55:B5 (Fluka, Израиль). Исследованию эпитопной направленности МКА в иммуноблоттинге подвергнуты суммарные фракции белков наружной мембраны, выделенные из бактериальной массы штаммов холерного вибриона O1 и O139 серогрупп по методу Lohia et al., (1984) и Chakrabarti S.R. et al. (1996).

Гибридизация клеток проводилась по методике Fazekas de St. et al. (1980) с помощью сшивающего агента-полиэтиленгликоля 1500 (Fluka, “Sigma-Aldrich”, США). Мышинные спленоциты получали трёхкратной внутрибрюшинной иммунизацией прогретой бактериальной взвесью холерных вибрионов (ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>). Для слияния использована мышьяная миеломная линия, дефектная по ферменту (ГГФРТ) из коллекции клеточных линий позвоночных Института Цитологии (г. Санкт-Петербург). Культивирование клеточных линий и гибридом-продуцентов *in vitro* проводилось в специальных жидких питательных средах RPMI-1640 и DMEM (“Gibco”) с добавлением сыворотки плода коровы, глутамина (“Serva”) и гентамицина. Для скрининга гибридом отбиралась культуральная жидкость из лунок 96-луночных планшетов с хорошо выросшими клонами (≈10-14 день от начала гибридизации) и тестировалась в ИФА. Культивирование гибридом продуцентов *in vivo* проводилось в организме мышей, предварительно праймированных пристаном (“Sigma-Aldrich”, США). Гибридомы вводились внутрибрюшинно в виде культуральной среды в количестве 10<sup>7</sup> клеток на мыш. Асцитическая жидкость отбиралась по мере формирования опухолей через 2-4 недели.

Источником специфических МКА служили культуральные супернатанты гибридом и асцитическая жидкость мышей, из которых выделялась иммуноглобулиновая фракция преципитацией сульфатом аммония. Свойства полученных МКА исследовались в целом ряде серологических методов: твёрдофазный иммунный анализ (ТИФА), дот-иммуноанализ (ДИА, дот-ИФА), реакция агглютинации (РА), реакция непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ), реакция преципитации (РП). Эпитопная направленность панели МКА исследовалась в электрофорезе бактериальных взвесей по методу Laemmli U.K. (1970) на приборе Tetra Mini Protean (BioRad), иммуноблоттинг осуществлялся по методу Towbin M. et al (1984).

В главе 3 представлены материалы получения гибридом, продуцирующих МКА к поверхностным антигенным детерминантам *V. cholerae* O1 и O139, изучения эпитопной направленности МКА методом ИФА и иммуноблоттинга, накопления и очистки специфических иммуноглобулинов.

В задачи исследования входило расширение панели МКА, поэтому начальный этап работы был направлен на получение гибридом-продуцентов МКА, узнающих поверхностные антигенные детерминанты холерного вибриона O1, и отобрано 9 гибридных клонов, которые на протяжении 6-8 недель сохраняли стабильную антителопродукцию и хорошие ростовые свойства. С помощью методов ИФА, дот-ИФА, электрофореза и иммуноблоттинга показана специфичность полученной панели МКА и локализация узнаваемых иммуноглобулинами



антигенных детерминант в составе набора штаммов холерного вибриона O1, O139 разного происхождения, различающихся по наличию генов *ctxA* и *tcpA*. По результатам ИФА, условно разделяющего МКА на группы, учитывалось наличие или отсутствие у вибрионов только гена *tcpA*. В первую группу вошли МКА пяти гибридом (H2F6, F11M2, G3F5, E5F5, A5B6), реагирующих со штаммами холерного вибриона O1 и O139 с генотипом *tcpA*<sup>+</sup> независимо от источника выделения. Эти МКА не реагируют с холерным вибрионом, лишённым гена *tcpA*. Во вторую группу входят МКА четырёх гибридом (A5D8, B3A5, D6, 4F5), у которых отмечаются положительная реакция со штаммами *V. cholerae* O1, O139, независимо от наличия гена *tcpA*. Установленное диссертантом отсутствие перекрестной активности с представителями близкородственных и гетерологичных микроорганизмов говорит о специфичности МКА в отношении холерного вибриона O1, O139 серогрупп. Определение с помощью ИФА и иммуноблоттинга химической природы эпитопов, к которым направлены МКА, показало, что эти антигенные детерминанты не принадлежат ЛПС и образуют у штаммов с генотипом *tcpA*<sup>+</sup> интенсивную полосу на уровне маркерных белков 38-42 кДа. Основываясь на исследованиях отечественных (Николаев В.Б. с соавт., 2007) и зарубежных авторов в отношении полипептидного профиля наружных мембран вирулентных и авирулентных штаммов холерного вибриона O1, O139 серогрупп и пилей адгезии, диссертант приходит к выводу, что в имеющемся наборе есть МКА, направленные к эпитопам мембранных белков, среди которых наибольший интерес представляют OmpT и OmpU с молекулярной массой 40 кДа и 38 кДа (Chakrabarti S.R. et al., 1996; Kelley J.T., Parker C.D., 1981). Это протеины, участвующие в образовании пор во внешней мембране вибриона, способствующих поступлению питательных веществ, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам, гидролитическим ферментам, солям желчных кислот и другим стрессорным воздействиям. Кроме того, OmpU является протективным антигеном, обладает свойствами адгезина (Provenzano D., Klose K.E., 2000). OmpT наделён протеолитической активностью, расщепляет протамин, фибрин, желатин, казеин, коллаген и активирует плазминоген человека в плазмин, что обеспечивает вибриону во время пребывания в кишечнике известные преимущества. Особого внимания заслуживают гибридомы первой группы, так как они позволяют выявлять *tcpA*<sup>+</sup> штаммы *V. cholerae* O1, O139. В работе диссертантом использована гибридома -продуцент H2F6, синтезирующая МКА, взаимодействующие со всеми взятыми в исследование штаммами холерного вибриона O1 и O139 серогрупп с генотипом *tcpA*<sup>+</sup>. Эпитопная направленность МКА H2F6 исследовалась в иммуноблоттинге и в отношении общей мембранной фракции, выделенной из штаммов холерного вибриона O1, O139 с различной генетической характеристикой. Установлено, что они выявляют белковую полосу в районе маркеров 40 кДа у штаммов, имеющих ген *ompT*. У штаммов, которых ген *ompT* отсутствовал, подобная белковая полоса не выявлялась. Таким образом, диссертант полагает, что гибридома H2F6 продуцирует МКА, направленные к эпитопам мембранного белка OmpT. С другой стороны, поскольку МКА первой группы дифференцируют *tcpA*<sup>+</sup> и *tcpA*<sup>-</sup> холерные вибрионы, казалось бы, можно предположить, что МКА направлены к эпитопам белка TSP. Однако, по данным литературы, молекулярная масса основной структурной субъединицы пилей TspA-20,5 кДа [Colwell R.R. et al., 1992], а различия между штаммами холерного вибриона *tcpA*<sup>+</sup> и *tcpA*<sup>-</sup> составляет 38-42 кДа. С учётом этих и других данных сделан вывод, что МКА первой группы направлены не к белкам, кодируемым генами *tcp* оперона.

В результате в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур “ГКПМ-Оболенск” депонированы две гибридомы-продуценты: ГХ-Н2F6/Omp (Свидетельство о депонировании №179 от 12.12.2016) и гибридома ГХ-A5D8/Omp

(№180 от 12.12.2016). Продуцируемые указанными гибридами антитела оказались востребованы для диагностических целей и эпитопного анализа белков наружной мембраны.

Поскольку одна из задач исследования заключается в разработке диагностических препаратов для идентификации и дифференциации холерных вибрионов O1/O139 серогрупп методом ИФА и дот-ИФА оценена специфичность и чувствительность видоспецифических МКА-O1 и МКА-O139 на расширенном наборе штаммов холерного вибриона в соответствующих серологических реакциях. Показано, что МКА гибридомы РККК (п) 386D дают положительную реакцию со всеми взятыми штаммами холерного вибриона O1 серогруппы, МКА гибридомы РККК(п) 674D выявляют все штаммы холерного вибриона O139. МКА-O1 и МКА-O139 не взаимодействуют с близкородственными микроорганизмами. В задачи работы также входило создание видоспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов (глава 4) для идентификации холерных вибрионов O1, O139 серогрупп в реакциях ИФА. Источником МКА служили уже упомянутые гибридомы - продуценты, полученные ранее и постоянно хранящиеся в жидком азоте: 1) РККК(п)386D-продуцирует иммуноглобулины класса G, узнающие видоспецифические эпитопы О-антигена *V. cholerae* O1 (МКА-O1); 2) РККК(п)674D-продуцирует иммуноглобулины класса M, направленные к детерминантам ЛПС *V. cholerae* O139 (МКА-O139). Были получены препаративные количества указанных иммуноглобулинов, которые после очистки конъюгировались с пероксидазой хрена. В работе подобраны оптимальные условия конъюгации, соотношения Ig и ПХ, апробировано 4 варианта этого соотношения, а также pH реакционной смеси. Установлено, что наиболее оптимальным является соотношение ПХ и Ig 1:2, так как в этом случае конъюгаты ПХ-O1 и ПХ-O139 имеют рабочий титр 1:128-1:256. По отработанной схеме были приготовлены экспериментальные образцы (3 серии) моноклональных пероксидазных конъюгатов для выявления холерного вибриона O1 и O139 в иммуноферментных методах. Определение чувствительности метода прямого ИФА с использованием пероксидазных конъюгатов показало, что она находится на уровне  $10^6$  м.к./лунку. Препараты конъюгированных антител подвергали лиофильному высушиванию, добавив БСА (0,1%). В диссертации представлена детальная схема получения моноклонального пероксидазного конъюгата.

Экспериментальные серии лиофильно высушенных пероксидазных конъюгатов были оформлены в набор реагентов “Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченые пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА”. На медицинское изделие разработаны нормативные документы (ТУ и Инструкция по применению), утверждённые Учёным Советом института (5.12.2016).

Лабораторные испытания диагностической значимости и специфической активности моноклональных конъюгатов на широком наборе музейных штаммов в ИФА показали, что все 100% штаммов O1 серогруппы в т.ч. и низкоагглютинабельные с нагрузкой  $10^8$  м.к. на лунку взаимодействуют с ПХ-МКА O1. При нагрузке антигена  $10^6$  м.к./лунку препарат ПХ-МКА O1 выявляет 80 % штаммов *V. cholerae* O1. Препарат ПХ-МКА O139 при взаимодействии со штаммами *V. cholerae* O139 с нагрузкой антигена  $10^8$  м.к. /лунку выявляет также 100 % штаммов и 88 % культур O139 при нагрузке антигена  $10^6$  м.к./лунку. Специфическая активность препаратов исследована в прямом варианте дот-ИФА: отсутствие окрашенных пятен на НЦМ у штаммов RO, *V. cholerae* не O1/не O139 и *V. cholerae* O22 – показатели отрицательной реакции дот-ИФА и свидетельство специфичности конъюгатов.

Диссертантом по отработанной схеме получены конъюгаты МКА, направленных к эпитопам мембранных белков H2F6, с пероксидазой хрена. Их специфичность была оценена

на наборе штаммов холерного вибриона с генотипами *tcpA*<sup>+</sup> и *tcpA*<sup>-</sup>, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов. В результате установлено, что независимо от наличия гена *ctxA*, моноклональный пероксидазный конъюгат в прямом ИФА и дот-ИФА обнаруживает среди исследуемых холерных вибрионов только штаммы *tcpA*<sup>+</sup>. В отношении *tcpA*<sup>-</sup> штаммов холерного вибриона O1, O139, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов зарегистрирована отрицательная реакция.

Для определения сроков пригодности лиофилизированных препаратов их рабочий титр проверялся через 6 месяцев, 1 и 1,5 года. Отмечено незначительное изменение специфической активности (снижение показателей оптической плотности в прямом ИФА в пределах 0,1-0,2 ед.).

В главе 5 представлены материалы по применению МКА, меченных пероксидазой хрена, для идентификации и дифференциации холерных вибрионов O1 и O139 в ИФА и дот-ИФА, включая подбор оптимальных режимов их постановки в стационарных и полевых условиях (без приборного обеспечения), использование конъюгатов для выявления штаммов с генотипом *tcpA*<sup>+</sup> использование препаратов в схеме лабораторной диагностики холеры (в условиях работы СПЭБ и в процессе мониторинга холеры).

Установлено, что при проведении прямого ИФА исследуемый антиген сенсибилизируется на планшете в течение 30 минут при температуре 37°C и 20-25°C. Время инкубации антигена с конъюгатом O1, O139 составляет 20 минут при 20-25°C. Такие показатели позволяют сократить время постановки ИФА до 70 минут с учётом проявления реакции. При этом чувствительность метода остаётся на уровне 10<sup>6</sup> м.к. Оценена возможность использования прямого дот-ИФА как экспресс-метода диагностики холеры. Сравнивались различные параметры инкубации мембраны с сенсиблизованным на ней антигеном в рабочем растворе конъюгатов. Определено, что для специфического связывания антигена с конъюгатом 20 минут, как в случае прямого планшетного ИФА недостаточно. Для ПХ-МКА O1 время инкубации составляет 40 минут (при комнатной температуре, 37°C, в условиях работы шейкера при комнатной температуре); для ПХ-МКА O139 – 40 минут (шейкер при комнатной температуре). Время проведения анализа, как и в случае ИФА, находится в пределах 70 минут. Чувствительность метода сохраняется на уровне 2×10<sup>6</sup> м.к.

В заключении диссертации кратко изложены основные результаты исследования и их обсуждение, сравнительный анализ с данными, полученными другими исследователями и перспективы применения препаратов.

Работа не лишена отдельных опечаток и пропусков букв. Это не снижает значимости и практической ценности выполненного диссертационного исследования.

**Соответствие автореферата основным положениям диссертации.** Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации и дает представление о проделанной работе.

**Подтверждение опубликованных основных результатов диссертации в научной печати.** Опубликовано 16 научных работ, из них 3 в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ и один патент. Материалы диссертации представлены на всероссийских научно-практических конференциях и конференциях молодых учёных и специалистов, заседаниях Проблемной комиссии “Холера и патогенные для человека вибрионы” Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории РФ (Ростов-на-Дону, 2014-2016 гг.)

**Заключение.** Диссертация Евдокимовой Вероники Вячеславовны выполнена на высоком методическом уровне, является завершённой научно-квалификационной работой, в

которой проведено исследование состояния иммунодиагностики холеры и предложено для этой цели использование сконструированных на основе МКА тест-систем с визуальным учетом результатов. Диссертантом оптимизированы общие принципы и методологические приемы изготовления пероксидазных конъюгатов на основе МКА к поверхностным антигенам холерного вибриона O1, O139. Конъюгаты пероксидазы МКА к ЛПС холерного вибриона O1, O139 серогрупп обеспечивают детекцию и дифференциацию холерного вибриона прямым методом планшетного ИФА и дот-ИФА не только в стационарных, но и в полевых условиях. При этом вопросы специфичности тест-систем решаются при использовании иммуноглобулинов моноклонального типа.

Особый интерес представляют полученные автором на основе МКА к эпитопам белков наружной мембраны (с мол. массой 38-42 кДа) пероксидазные конъюгаты, позволяющие диагностировать в прямых методах ИФА холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп с генотипом *tcpA*<sup>+</sup>, нередко обнаруживаемые в последние годы поверхностных водоемов страны и способные вызывать единичные случаи заболеваний и локальные вспышки.

Работа содержит новые научные результаты и вносит существенный вклад в практику. Все это, несомненно, способствует повышению эффективности лабораторной диагностики холеры.

В целом по содержанию и значимости, актуальности, новизне поставленных задач, методическому подходу к их разрешению, научно-практическому значению результатов работа соответствует критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24.09.2013 г., а ее автор Евдокимова В.В. заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – «микробиология».

Отзыв обсужден на ученом совете ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора протокол № 7 от 28.08.2018 г.

Д.м.н. старший научный сотрудник  
лаборатории холеры  
Федерального казенного учреждения здравоохранения  
«Иркутский ордена Трудового Красного  
Знамени научно-исследовательский  
противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»  
Федеральной службы по надзору в сфере защиты  
прав потребителей и благополучия человека

Урбанович Л.Я.

Подпись Урбанович Л.Я. заверяю  
Начальник отдела кадров и специальности  
того же института



Шангареева Н.И.

664047 Иркутская область, Иркутск, ул. Трилиссера, д.78;  
телефон + 7(3952) 22-01-39, Факс + 7(3952) 22-01-40, <http://www.irkutsk.ru/chumin>, E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru