

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 208.078.02  
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО КАЗЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «РОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ «МИКРОБ» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО  
НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ  
ЧЕЛОВЕКА ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
КАНДИДАТА НАУК**

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 20 сентября 2018 г. № 11

О присуждении Евдокимовой Веронике Вячеславовне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка препаратов моноклональных антител для идентификации и дифференциации холерных вибрионов O1, O139 серогрупп иммуноферментными методами» по специальности 03.02.03 – микробиология принята к защите 14 июня 2018 г. (протокол заседания № 9) диссертационным советом Д 208.078.02, созданным на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46, приказом Минобрнауки России № 903/нк от 6 августа 2015 г.

**Соискатель** Евдокимова Вероника Вячеславовна 1983 года рождения. В 2005 году соискатель окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ростовский государственный университет». Работает в должности научного сотрудника в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Диссертация выполнена в лаборатории гибридом Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного

Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель - доктор биологических наук, профессор, Алексеева Людмила Павловна, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория гибридом, заведующая лабораторией гибридом.

**Официальные оппоненты:** Храпова Наталья Петровна, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, отдел диагностики инфекционных болезней и лаборатория иммунодиагностики; заведующая отделом и лабораторией; Осина Наталья Александровна, кандидат биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая лабораторией молекулярной диагностики отдела диагностики инфекционных болезней, дали положительные отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** – Федеральное казенное учреждение 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, Иркутск, в своем положительном заключении, подписанном Урбанович Людмилой Яковлевной, доктором медицинских наук, лаборатория холеры, старший научный сотрудник, указала, что 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 Вероника Вячеславовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Соискатель имеет 26 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 16 работ общим объемом 58 страниц, из них в рецензируемых научных изданиях опубликовано 3 работы. Опубликованные работы отражают все разделы диссертации. Соискатель принимала непосредственное участие в подготовке всех работ, в большинстве из них является первым автором. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Наиболее значительные работы: 1) Евдокимова, В.В. Моноклональные антитела к термостабильным поверхностным антигенам холерных вибрионов O1- и O139-серогруппы / В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, О.С. Бурша // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015. - № 3. – С. 51-57. 2) Евдокимова В.В., Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры / В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, О.С. Бурша // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. - № 5. – С. 303-307. 3) Евдокимова, В.В. Изучение диагностических возможностей моноклональных антител, специфичных к мембранному белку возбудителя холеры, в иммуноферментном анализе / В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, В.П. Зюзина, О.Ф. Кретенчук, М.Э. Яговкин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. - № 3 - С. 45-48.

На диссертацию и автореферат дали положительные отзывы: 1. Савельев Вилорий Николаевич, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией диагностики холеры и других кишечных инфекций Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2. Балахнова Вероника Викторовна, кандидат медицинских наук, заведующая бактериологической лабораторией Федерального казенного учреждения здравоохранения «Северо-Кавказская противочумная станция» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 3. Печенкин Денис Валерьевич, кандидат медицинских наук, начальник научно-исследовательского отдела Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Горшков Антон Сергеевич, кандидат медицинских наук, научный сотрудник научно-

исследовательского отдела Федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. 4. Алешукина Анна Валентиновна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических исследований Федерального бюджетного учреждения науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 5. Гальцева Галина Васильевна, доктор медицинских наук, врач-бактериолог Федерального казенного учреждения здравоохранения «Причерноморская противочумная станция» » Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 6. Харсеева Галина Георгиевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой микробиологии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается, тем, что Храпова Наталья Петровна является ведущим специалистом в области разработки средств иммунодиагностики, Осина Наталья Александровна – специалист в области микробиологии, индикации и дифференциации возбудителей особо опасных инфекционных болезней, в том числе холерного вибриона. В ведущей организации функционирует лаборатория холеры, специалисты которой занимаются научно-прикладными исследованиями в области микробиологии и генетики холеры.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований: получены новые гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к поверхностным эпитомам белков наружной мембраны *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. Предложена оригинальная панель моноклональных антител, включающая антитела к белкам наружной мембраны и видоспецифичные антитела к О-антигену *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп. Использование авторской панели моноклональных антител позволяет проводить эпитопный анализ поверхностных антигенов с молекулярными массами в диапазоне от 10 до 65 кДа. Разработаны оригинальные подходы по оптимизации изготовления пероксидазных конъюгатов, предназначенных для обнаружения и дифференциации штаммов *V. cholerae* O1 и O139

серогрупп. В ходе лабораторных испытаний доказана диагностическая ценность разработанных видоспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов и основанного на их использовании дот-иммуноферментного анализа.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что предложены подходы к конструированию иммунодиагностических препаратов для выявления *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, позволяющие повысить их специфичность, что положительным образом отразится на качестве и достоверности лабораторного анализа при проведении мониторинга за холерой. Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс методов: микробиологических, иммунохимических, биотехнологических, биохимических и микроскопических, позволивших обосновать направление исследований и успешно реализовать задачи по разработке диагностического набора пероксидазных конъюгатов моноклональных антител, предназначенных для выявления в прямых методах иммуноферментного анализа штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, а также дать объективную оценку ценности данного диагностического набора для лабораторной диагностики холеры и идентификации холерных вибрионов. Доказано, что сформированная панель моноклональных антител, включающая антитела с различной специфической направленностью, перспективна для эпитопного анализа поверхностных антигенов холерных вибрионов. На основе моноклональных антител к белкам наружных мембран разработаны пероксидазные лиофильно высушенные конъюгаты, отличающиеся стабильностью при хранении и позволяющие осуществлять идентификацию холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в иммуноферментном анализе. Доказано, что использование полученных автором пероксидазных конъюгатов моноклональных антител исключает возможность возникновения перекрестных реакций с близкородственными микроорганизмами, сокращает общее время анализа и позволяет выявлять холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп с чувствительностью  $10^6$  микробных клеток/мл. Получен патент Российской Федерации № 2425874 «Штамм культивируемых гибридных клеток животных *Mus. musculus* L-продуцент моноклональных антител, специфичных к O-антигену холерных вибрионов O1 серогруппы» (опубликован 13.04.2010 г.).

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что получены клеточные линии гибридом, синтезирующие

диагностически значимые моноклональные антитела к эпитопам мембранных белков холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, перспективные в создании иммуноферментных диагностических тест-систем для идентификации *V. cholerae* O1/O139 (*tcpA*<sup>+</sup>) и проведении иммунохимического анализа белков наружных мембран. В Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск) депонированы две гибридомы-продуценты моноклональных антител: ГХ-Н2F6/Omp, ГХ-А5D8/Omp (свидетельства о депонировании № 179 и № 180 от 12.12.2016 г.). Разработаны нормативно-методические документы - технические условия 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», одобренные Ученым советом Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 10 от 5.12.2016 г.). Набор реагентов используется в работе референс-центра по мониторингу за холерой на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Акт внедрения набора реагентов № 1041/1-16-10 от 02.09.2016 г.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: экспериментальные данные получены на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании, показана их воспроизводимость в сериях опытов; конструирование иммунодиагностического препарата основано на обобщении современного опыта по разработке таких тест-систем и согласуется с опубликованными данными по теме диссертации; для объективной оценки разработанного набора реагентов диссертантом использовано 168 штаммов микроорганизмов, из них: 94 штамма *V. cholerae* O1, 34 штамма *V. cholerae* O139, 18 штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, 7 штаммов *V. cholerae* RO, а также 15 штаммов гетерологичных родов и видов (включая *V. parahaemolyticus*, *Escherichia*, *Brucella spp.*, *Salmonella spp.*, *Aeromonas*).

