

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Михеевой Елены Александровны «Конструирование диагностической иммуноферментной тест-системы для идентификации токсигенных штаммов холерного вибриона», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Как в мире, так и в нашей стране сохраняется сложная эпидемическая ситуация по холере. Это обусловлено постоянной угрозой завоза возбудителя на территорию нашей страны, возникновение и распространение новых вариантов *Vibrio cholerae*, имеющих эпидемическую значимость и обладающих способностью к синтезу холерного токсина, играющего основную роль в развитии патогенеза холеры. Используемые в настоящее время высокочувствительные иммунологические методы для детекции холерного токсина основаны на применении поликлональных антител, что определяет ряд недостатков тест-систем на их основе, одним из основных которых является специфичность и подходы к её повышению.

Известно, что гибридная биотехнология позволяет получать высокоаффинные антитела к детерминантам диагностически значимых антигенов возбудителя холеры. Моноклональные антитела обладают уникальными преимуществами перед поликлональными сыворотками: высокая специфичность и активность, стандартность, стабильность, возможность получения в неограниченном количестве. Очевидно, что моноклональные антитела в силу своей уникальной направленности к индивидуальным антигенным детерминантам позволяют разработать на их основе препараты для серологической идентификации и дифференциации холерных вибрионов, отвечающие современным требованиям. Процесс замены поликлональных антител в диагностических наборах на моноклональные начался еще в начале 80-х годов и активно продолжается в

настоящее время в направлении создания новых препаратов на их основе. Несомненно, такие препараты эффективны и полезны как в случае ранней диагностики холеры, так и на различных этапах исследования.

Задачи исследования вытекают из цели работы, сформулированы весьма четко, компактно и последовательно отражают решение поставленных в диссертации вопросов, вплоть до конечных научно-практических результатов.

Пять положений, вынесенные на защиту, дают четкое представление об экспериментальном характере проводимого исследования и открывают перспективы по использованию полученных результатов в клинической лабораторной диагностике, а также при эпидемиологическом мониторинге.

Диссертация небольшая по объему (112 страниц), построена по традиционному плану, включает все необходимые разделы. Библиография включает 205 источников литературы, из них 75 отечественных.

Обзор литературы изложен кратко, но содержательно, написан в хорошем стиле и дает возможность составить достаточно полное представление о методах определения токсинов бактериальной природы, и в частности, холерного токсина.

В первой главе диссертационной работы (обзоре литературы) представлены данные научных публикаций, касающиеся токсических продуктов микроорганизмов, которые являются источниками биологической опасности и создают угрозу для здоровья человека, а также хорошо известные и современные методы их диагностики. Отдельно освещен вопрос по методам обнаружения и мониторинга холерного токсина.

Во второй главе «Материалы и методы» представлены сведения об использованных штаммах микроорганизмов, антигенах, реактивах, клеточных линиях, лабораторных животных, условиях их культивирования и содержания.

Описаны методы получения, условия содержания и хранения антителопродуцирующих гибридом и моноклональных антител, дана краткая

их характеристика. В достаточном объеме отражены микробиологические, культуральные, иммунохимические методы исследования.

Третья глава диссертации посвящена подбору эффективной схемы иммунизации мышей линии BALB/c для проведения процедуры гибридизации миеломных клеток и спленоцитов сингенных мышей с целью получения стабильных антителопродуцирующих гибридом, дана характеристика главных свойств гибридом. После тщательной оценки полученных моноклональных антител, были отобраны моноклональные антитела специфически взаимодействующие с препаратом холерного токсина и не дающие перекрестной реакции с термолабильным токсином кишечной палочки.

В четвертой главе собственных исследований диссертант представил материалы по подбору оптимальных условий для проведения иммуноферментного анализа: сорбционная емкость составила – 10 мкг/мл, а концентрация детектирующих моноклональных антител – 0,28 мкг/мл, что позволило сконструировать высокочувствительную иммуноферментную тест-систему. Отдельно заслуживает внимание раздел посвященный специальному культивированию штаммов *V.cholerae*, позволяющему повысить экспрессию холерного токсина I и II типов за более короткий срок и снизить биологическую опасность процесса культивирования микроорганизмов II группы патогенности.

Пятая глава отражает логичное завершение научной работы проведением регламентированных, в том числе клинических испытаний и, в конечном итоге, государственной регистрацией разработанной «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)».

В заключении диссертант в краткой форме представила и обсудила результаты проведенных исследований, подчеркнула необходимость своевременного выявления возбудителя холеры специфичными, высокочувствительными и доступными по технике исполнения методами,

отразила все важные этапы предшествующие регистрации «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)».

Диссертация выполнена с привлечением большого объема экспериментального материала, Выводы основаны на результатах собственных исследований диссертанта и логично вытекают из представленных в работе данных, а их достоверность подтверждена результатами статистической обработки. Несмотря на краткость формулировок в них содержится вся основная полученная в процессе работы научная информация.

Автореферат в полной мере отражает структуру оформления и содержания диссертации, а её результаты опубликованы в 10 научных работах, 4 из которых – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России для опубликования основных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата или доктора наук.

Материалы диссертации представлялись на ежегодных научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в РосНИПЧИ «Микроб»; межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера»; ежегодных всероссийских конгрессах по инфекционным болезням; проблемной комиссии координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации «Холера и патогенные для человека вибрионы».

Научная новизна работы заключается в том, что созданы гибридомы 2Е5 и 3Е5, стабильно продуцирующие моноклональные антитела к холерному энтеротоксину, пригодные для конструирования

диагностического препарата и его серийного изготовления. Получены патенты на «Штамм гибридных культивированных клеток животных *Mus musculus* ХТ 2Е5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 1 к В-субъединице холерного токсина» (№2583306 опубл. 10.05.2016 г. бюл.№13) на «Штамм гибридных культивированных клеток животных *Mus musculus* ХТ 3Е5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 2А к В-субъединице холерного токсина» (№2590587 опубл. 10.07.2016 г. бюл.№19). Разработана и адаптирована к серийному изготовлению универсальная отечественная моноклональная иммуноферментная тест-система, способная выявлять с чувствительностью 0,1 нг/мл холерный токсин как I-ого типа, продуцируемый классическим биоваром *V.cholerae*, так и II-ого типа, продуцируемый биоваром эльтор *V.cholerae*. Усовершенствован способ культивирования токсигенных штаммов *V.cholerae*, обеспечивающий пониженную биологическую опасность процесса и высокую продукцию холерного токсина в концентрации не менее 100 нг/мл. Оформлена заявка № 2016109320 (приоритет 15.03.2016 г.) на изобретение «Способ выявления эпидемически значимых штаммов *V.cholerae* по продукции холерного токсина методом ИФА и набор для его осуществления». Новыми являются сведения о возможности использования разработанной холерной диагностической тест-системы моноклональной не только для идентификации чистых культур токсигенных штаммов *V.cholerae*, но и индикации контаминированного ими биологического материала.

Практическая значимость работы заключается в получении клеточных линий гибридом 2Е5, 3Е5 и 1D5, 3D3, 3С4, стабильно продуцирующих МКА соответственно к ХТ и ХТ/LT. Проведены межлабораторные испытания с целью определения основных свойств полученных клонов гибридных клеток и оценки перспективности их дальнейшего использования (акт комиссионных испытаний № 210 от 02.12.2013 г. утвержден директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора). Депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных

культур «ГКПМ-Оболенск» (ФБУН ГНЦ ПМБ п. Оболенск): штамм гибридомы ХТ 2Е5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 1 к В-субъединице холерного токсина и штамм гибридомы ХТ 3Е5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 2а к В-субъединице холерного токсина (свидетельства о депонировании №№ 196 и 197 от 01.10.2014 г.). Разработаны методические рекомендации «Способ определения продукции холерного токсина в иммуноферментном анализе с применением моноклональных антител», одобренные Ученым советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 6 от 08.12.2015 г.) и утвержденные директором РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Изготовлены экспериментальные серии «Тест-система иммуноферментная для определения токсигенных штаммов холерных вибрионов по продукции холерного токсина моноклональной» и проведены межлабораторные испытания их диагностической ценности (акт комиссионных испытаний № 115-П от 20.06.2014 г. утвержден директором РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора). Подготовлены и утверждены нормативно-методические документы на «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)»: ТУ 9388-052-01898109-2015 от 05.11.2015 г. и инструкция по применению от 01.07.2016 г. Проведены технические и клинические испытания «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» (акт оценки результатов технических испытаний № 05-28/15 от 29.05.2015 г. и акт клинических испытаний № ВМ-пр-06-14/16-КИ от 03.10.2016 г.). Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения выдано регистрационное удостоверение на медицинское изделие «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФА ХолХТ-М)» от 15.11.2016 г., № РЗН 2016/5013, которое приказом Росздравнадзора от 15.11.2016 г. № 12672 допущено к обращению на территории Российской Федерации.

Позвольте остановиться на вопросах, которые возникли при ознакомлении с диссертацией.

Вопросы:

1. Какие этапы Вы считаете ключевыми при разработке созданной Вами моноклональной диагностической тест-системы?

2. Чем отличается и в чем преимущество разработанной Вами иммуноферментной тест-системы от экспериментальной тест-системы Татьяной Владимировной Аленкиной и соавторов, разработанной в конце 90-х годов?

В качестве замечания: в тексте автореферата диссертации перечисляются нормативные документы, в которых происходит падежное склонение, которого не должно быть («Тест-система», но не «Тест-системы»).

В целом диссертационная работа Елены Александровны заслуживает положительной оценки.

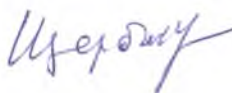
Таким образом, диссертация Михеевой Елены Александровны является самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой в результате выполненных автором исследований содержится новое решение актуальной проблемы связанной, с научно-технологической разработкой иммунодиагностического препарата для определения эпидемической значимости *Vibrio cholerae*.

Считаю, что по актуальности темы, методическому уровню и объему проведенных исследований, научной новизне, практической значимости, полноте изложения основных научных результатов, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, в том числе, рекомендованных ВАК РФ, диссертационная работа Михеевой Елены Александровны на тему: «Конструирование диагностической иммуноферментной тест-системы для идентификации токсигенных штаммов холерного вибриона» соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Утверждено постановлением Правительства Российской Федерации №842

от 24.09.2013 г.), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присвоения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Профессор кафедры микробиологии,
биотехнологии и химии ФГБОУ ВО
«Саратовский государственный аграрный
университет им. Н.И. Вавилова»

доктор биологических наук, профессор



А.А. Щербаков

Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» 410012 г. Саратов, Театральная пл., 1 тел.: (8452) 69-24-41, e-mail: Scherbakov.2014@yandex.ru

Подпись д.б.н., проф. А.А. Щербакова заверяю:

Ученый секретарь ученого совета
ФГБОУ ВО «Саратовский
государственный аграрный
университет им. Н.И. Вавилова»



А.П. Муравлев