

На правах рукописи

МИХЕЕВА Елена Александровна

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ
ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ
ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА**

03.02.03 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Саратов – 2017

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: **Девдариани Зураб Леванович**, доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты: **Храпова Наталья Петровна**, доктор медицинских наук, профессор, ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, заведующая отделом диагностики инфекционных болезней и лаборатории иммунодиагностики

Щербаков Анатолий Анисимович, доктор биологических наук, профессор, ГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «24» мая 2017 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук при ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert> ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук,
старший научный сотрудник

А.А. Слудский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

На основании анализа эпидемиологической обстановки по холере в мире, странах СНГ и России прогноз по этой инфекции на ближайшие годы остается неблагоприятным. Это связано, прежде всего, с существующей реальной возможностью завоза инфекции из эндемичных по холере стран [Онищенко Г.Г., 2005, 2013; Москвитина Э.А., 2012, 2013, 2014, 2015; Титова С.В., 2016].

Холерный токсин (ХТ) занимает ведущее место в патогенезе холеры, являясь основным фактором развития двух ключевых этапов инфекционного процесса – колонизации холерными вибрионами тонкого кишечника и возникновения профузной диареи. Поэтому для проведения противоэпидемических мероприятий важно определить в кратчайшие сроки токсигенные, эпидемически значимые варианты *Vibrio cholerae* в том числе с использованием методов исследования, направленных на обнаружение холерного энтеротоксина [Онищенко Г.Г. с соавт., 2009; Kaper J.B. *et al.*, 1995; Faruque S.M. *et al.*, 1998; De Haan L. *et al.*, 2004].

Согласно принятой схеме лабораторной диагностики холеры заключение о токсигенности и эпидемической значимости *V.cholerae* основывается на результатах определения гемолитической активности в пробе Грейга, изучении чувствительности к диагностическим холерным бактериофагам, а также на основании данных биологической пробы на крольчатах-сосунках и выявления *ctxAB* и *tcpA* генов методом полимеразной цепной реакции [МУК 4.2.2218 – 07; Лаб. диагн. опасных инфекционных болезней, 2013]. Проба Грейга и определение чувствительности к фагам дают ориентировочную оценку эпидемической значимости. Биологическая модель наиболее объективный, но трудоемкий и продолжительный по времени способ, а определение генов, кодирующих синтез энтеротоксина, не всегда указывает на наличие экспрессии самого токсина. Обнаружение токсинов в лабораторных условиях осуществляют не только с помощью биологических тестов на животных и клеточных перевиваемых культур, но и с использованием различных вариантов иммунофлуоресцентного и иммуноферментного анализов, иммунопреципитации, а также мультиплексных иммуно- и генодиагностических тест-систем.

В настоящее время иммунологические методы диагностики холеры используются как в рамках бактериологического исследования (ускоренные методы обнаружения возбудителя и идентификация культур), так и самостоятельно – для индикации *V.cholerae* в материале, зараженном этим возбудителем [МУК 4.2.2218 – 07; Kaper J.B. *et al.* 1995].

Поскольку концентрация холерного энтеротоксина, вызывающего клинический симптомокомплекс, незначительна наиболее перспективным подходом в данном направлении является определение его продукции с помощью обладающего высокой чувствительностью иммуноферментного анализа [Scarlatos A. *et al.*, 2005]. Лабораториями ВОЗ и CDC предложена методика проведения такого анализа с использованием GM1 ганглиозидов [CDC, 1994]. Все это указывает на актуальность работ по созданию препаратов для выявления *V.cholerae* эпидемически значимых по продукции ими ХТ с помощью иммуноферментного анализа (ИФА).

Степень разработанности.

Большинство выпускаемых в России холерных диагностических иммуноглобулиновых препаратов, имеющих государственную регистрацию, основаны на применении поликлональных антител, однако, биотехнологические особенности их приготовления имеют ряд недостатков, связанных со снижением активности после проведения адсорбции, с определенным количеством фоновых неспецифических реакций при использовании адсорбированных диагностических иммуноглобулинов в высокочувствительных цитометрических методах анализа, с высокими экономическими затратами по содержанию животных – продуцентов антител и т.д.

Были предприняты ряд удачных попыток конструирования экспериментальных иммунодиагностических препаратов для определения токсигенных штаммов холерных вибрионов [Аленкина Т.В., 1996; Девдариани З.Л. с соавт., 1999; Заднова С.П. с соавт., 2010], однако, до практического применения они так и не были доведены. Таким образом, вопрос о научно-технологической разработке и внедрении в практику иммуноферментной моноклональной диагностической тест-системы для определения холерного токсина остается открытым.

Цель работы – разработка и оценка диагностической эффективности моноклональной иммуноферментной тест-системы для выявления эпидемически значимых штаммов *V.cholerae*.

Задачи исследования:

1. Получить и охарактеризовать стабильные гибридные клеточные линии, продуцирующие моноклональные антитела к холерному токсину.
2. Выделить и изучить свойства холерных мышинных моноклональных антитоксических антител.
3. Определить чувствительность и специфичность полученных моноклональных антител в ИФА при исследовании препаратов токсина.

4. Подобрать более экономичные условия культивирования токсигенных штаммов *V.cholerae* при сохранении продукции ими не менее 100 нг/мл холерного токсина с разработкой дополнительных мер снижения биологической опасности процесса.

5. Оценить эффективность пробоподготовки и иммуноферментного анализа с использованием разноэпитопных моноклональных антител для определения холерного токсина в биологическом материале, искусственно инфицированном токсигенными штаммами холерных вибрионов.

6. Разработать моноклональную иммуноферментную тест-систему для определения токсигенных штаммов *V.cholerae* классического, эльтор биоваров и оценить ее диагностическую значимость в регламентированных испытаниях.

Научная новизна и теоретическая значимость работы

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

Получены клеточные линии гибридом 2E5, 3E5 и 1D5, 3D3, 3C4, стабильно продуцирующие МКА соответственно к ХТ и ХТ/ЛТ. 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 2E5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 1 к В-субъединице холерного токсина и штамм гибридомы ХТ 3E5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 2a 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-системы иммуноферментной 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-систему иммуноферментную 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 испытания «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» (акт оценки результатов технических испытаний № 05-28/15 от 29.05.2015 г.).

Проведены клинические испытания «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» (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* (ИФАХолХТ-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.

Методология и методы исследования.

В работе использовались различные методы исследования: микробиологические (культивирование штаммов микроорганизмов), гибридная технология (инженерия), методы иммунохимии (ИФА), биохимические и микроскопические.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Гибридомы 2E5 и 3E5, полученные с помощью иммунологической инженерии, стабильно продуцируют моноклональные антитела к холерному энтеротоксину в течение IX пассажей на сингенных линейных мышах BALB/c с сохранением исходной активности.

2. Моноклональные антитела 2E5, 3E5 в иммуноферментном анализе выявляют холерный токсин при исследовании чистых культур *V.cholerae* и контаминированного биологического материала в концентрации не менее чем 0,1 нг/мл.

3. Моноклональные антитела 2E5, 3E5 специфически реагируют только с холерным токсином. Моноклональные антитела 1D5, 3D3, 3C4 обладают перекрестной реактивностью, взаимодействуя, кроме холерного с термолабильным токсином *E.coli*.

4. Усовершенствованный способ культивирования токсигенных штаммов *V.cholerae* позволяет снизить уровень биологической опасности процесса за счет существенного уменьшения объема выращиваемого патогена и исключения постоянного встряхивания, а также сократить сроки пробоподготовки материала для исследования и количество используемой при этом питательной среды.

5. Иммуноферментная диагностическая тест-система на основе разноэпитопных моноклональных антител с высокой чувствительностью и специфичностью выявляет токсигенные штаммы *V.cholerae* при исследовании чистых культур патогена и в биологическом материале.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе целям и задачам. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации,

подкреплены убедительными фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах. Результаты экспериментальных исследований обработаны с использованием методов статистического анализа. Работа выполнена на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании.

Материалы диссертации представлены на ежегодных научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2009, 2010, 2012, 2014 гг.); Проблемной комиссии Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации «Холера и патогенные для человека вибрионы» (Ростов-на-Дону, 2009 г.); II, VI и VII Ежегодных Всероссийских Конгрессах по инфекционным болезням (Москва, 2010, 2014, 2015 гг.); XI Межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» (Саратов, 2012 г.); Всероссийской научно-практической конференции «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения» (Нижний-Новгород, 2014 г.).

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, 4 из них в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ. Получены 2 патента на изобретение №2583306 опубл. 10.05.2016 г. бюл.№13 и №2590587 опубл. 10.07.2016 г. бюл.№19.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования

Работа выполнена в отделе диагностики инфекционных болезней ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в рамках плановых научно-исследовательских тем: «Получение мышинных монорецепторных поликлональных и моноклональных антител и разработка на их основе препаратов для иммунодиагностики бактериальных особо опасных инфекций» 2008-2012 гг. (шифр темы 30-2-08, № гос.регистрации 0120.0804520), «Усовершенствование и разработка иммуноферментных тест-систем для лабораторной диагностики чумы и холеры» 2013-2016 гг. (шифр 42-2-13, № гос.регистрации 0120.1354365).

Основные разделы диссертационной работы выполнены лично Михеевой Е.А. на базе лабораторий иммунодиагностики и молекулярной диагностики ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Клинические испытания (глава 5.4) проведены совместно с сотрудниками клинико-диагностической лаборатории ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» (г. Москва).

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 112 страницах компьютерного текста и состоит из перечня сокращений, введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы. Диссертация иллюстрирована 1 рисунком и 27 таблицами. Библиография включает 205 источников литературы, в том числе 75 отечественных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований. Материалом для исследования служили: бульонные культуры микроорганизмов, пробы биологического материала, искусственно контаминированные возбудителями холеры и гетерологичными микроорганизмами.

Работу осуществляли с использованием 99 штаммов микроорганизмов, из них: 48 – *V.cholerae* эльтор (*ctxAB*⁺), 20 – *V.cholerae* эльтор (*ctxAB*⁻), 2 – *V.cholerae* классического биовара (*ctxAB*⁺), 6 – *V.cholerae* O139 (*ctxAB*⁺), 1 – *V.cholerae* O139 (*ctxAB*⁻), 2 – *V.cholerae* non O1/O139 (*ctxAB*⁺), 8 – *V.cholerae* non O1/O139 (*ctxAB*⁻), а также 4 – *Escherichia coli*; 1 – *Salmonella paratyphi* A, 1 – *Salmonella paratyphi* B, 1 – *Salmonella typhi*; 1 – *Salmonella typhimurium*, 2 – *Shigella dysenteriae sonnei*, 1 – *Shigella dysenteriae flexneri*, 1 – *Yersinia enterocolitica*. Используемые в работе штаммы были типичными по культуральным, морфологическим, биохимическим, серологическим свойствам.

Выращивание вибрионов проводили на агаре Хоттингера, pH 7,6±0,1 (МУК 4.2.2218 – 07), при температуре (37±1) °С в течение 18-20 ч. Остальные микроорганизмы культивировали на той же среде при pH 7,2±0,1 (МУК 4.1/4.2.588-96) и температуре (37±1) °С в течение 18-20 ч.

Работу проводили с учетом требований СП 1.3.3118 – 13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» в боксе микробиологической безопасности II класса в противочумном костюме IV типа с резиновыми перчатками и в соответствии с руководством CDC [1994] по определению холерного токсина у штаммов холерных вибрионов.

Микробную взвесь *V.cholerae* готовили по отраслевому стандартному образцу мутности 5 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (ОСО 42-28-86-2015), что соответствует $1,1 \times 10^9$ м.к./мл, а бактериальные взвеси клеток гетерологичных микроорганизмов готовили в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц (ОСО 42-28-85-2015).

Для иммунизации мышей и первичного скрининга культуральной жидкости гибридом был использован препарат ХТ, выделенный из штамма *V.cholerae* 569В

по методу Mekalanos J.J. *et al.* [1978] и любезно предоставленный к.б.н. Захаровой Т.Л., а также коммерческие препараты холерного токсина и его субъединицы В (Sigma, США). В качестве адьюванта при отработке схем иммунизации биопродуцентов применяли полный адьювант Фрейнда (Sigma, США).

Донорами иммунных спленоцитов и иммуноасцитической жидкости служили мыши инбредной линии BALB/c, сингенные по отношению к плазмацитоме *Sp.2/0-Ag.8*, в возрасте 8-12-недель весом 18-20 г. Для приготовления фидерных плат спленоциты изолировали из селезенок интактных аутбредных белых мышей 8-12-недельного возраста весом 25-30 г [Северин С.Е., Соловьева Г.А., 1989].

Основой для культивирования миеломных и гибридомных клеток служила среда Hybridoma Express Plus (РАА, Австрия), содержащая 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (РАА, Австрия) – при выращивании гибридом или 5 % нормальной лошадиной сыворотки (Flow Laboratories, Великобритания) – при культивировании миелом. С целью предотвращения бактериального и грибкового загрязнения в среду добавляли антибиотики: 0,2 % гентамицина, 1 % пенициллина (5000 IU/ml)/стрептомицина (5000 мкг/мл) и 2 % амфотерицина. Селекцию гибридных клеток осуществляли на среде с добавлением гипоксантина, аминоптерина, тимидина. Клонирование и реклонирование гибридом проводили методом лимитирующих разведений. Миеломные и гибридомные клетки культивировали в CO₂ – инкубаторе (Sanyo Electric, Япония) при температуре (37±1) °С, влажности не менее 80% и содержании в атмосфере CO₂ 5 %, а хранили в сосудах Дьюара в жидком азоте при температуре минус 196°С в 1,8 мл пробирках для криоконсервации (Thermoscientific, Дания). Клетки культивировали в 96-луночных планшетах для культуры клеток (Costar, США) и в 50 мл культуральных пластиковых матрасах (Costar, США). Все работы, связанные с культивированием клеток, проводили в ламинарном боксе (Ламинар-с 1,5, Россия) с горизонтальным потоком воздуха. Для просмотра клеток использовали микроскоп (Nikon eclipse TS 100, Япония).

Скрининг МКА, секретируемых гибридомами, определение специфичности, чувствительности и активности МКА, а также поликлональных антител в сыворотке крови иммунных животных проводили в различных вариантах твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) в пластиковых 96-луночных планшетах (Медполимер, Россия). Результаты учитывали с помощью 8-ми канального спектрофотометра (Titertek Multiskan, Финляндия) при длине волны 405 нм.

Выделение иммуноглобулинов из культуральной среды и асцитической жидкости осуществляли двукратным осаждением сульфатом аммония при насыщении 45 % и 50 %. Освобождение иммуноглобулиновой фракции от сернокислого аммония проводили с помощью диализа против фосфатно-солевого буфера.

Полученные иммуноглобулины оценивали электрофоретически по методу Laemmly U.K. [1970] в 12,5 % полиакриламидном геле (PAAG) с SDS.

Определение концентрации белка осуществляли по Варбургу и Кристиану [Досон Р. с соавт., 1991].

Изотипирование иммуноглобулинов проводили с помощью набора «Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Reagents» (Sigma, США). Работу выполняли в соответствии с инструкцией к набору.

Константу аффинности МКА определяли по методу Битти [Beatty B.G. *et al.*, 1987].

Эпитопную направленность МКА определяли по Зайденову В.А. с соавт. [1991] с определением индекса аддитивности (ИА) пары МКА [Friquet V. *et al.*, 1983].

Конъюгирование иммуноглобулинов с пероксидазой хрена (AppliChem, Германия) проводили по методу Wilson M.B. [1978]. В непрямом варианте ТИФА использовали диагностические антитела против иммуноглобулинов G мыши, меченные пероксидазой хрена (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Россия).

Препараты и среды хранили в бытовых холодильниках при 4 °С, выделенные МКА и конъюгаты с пероксидазой – в морозильниках при минус 20 °С.

Процент неспецифических и специфических реакций, а также средние ошибки к ним вычисляли по формуле, представленной в работе Ашмарина И. П., Воробьева А. А. [1962].

Результаты и обсуждение

При получении гибридом одним из ключевых моментов является подбор оптимальной схемы иммунизации животных, обеспечивающей пролиферацию максимального количества иммунокомпетентных спленоцитов, вследствие чего повышается вероятность выделения гибридомы, продуцирующей специфические МКА, и стимулируется процесс дифференциации В-клеток, которые, в свою очередь, более активно участвуют в гибридизации. О степени иммунокомпетентности лимфоцитов при получении гибридом, как правило, судят по величине титров специфических антител в сыворотке крови иммунизированных мышей.

В результате специально проведенных исследований из четырех апробированных вариантов была выбрана схема, включающая 5-кратную иммунизацию ХТ в дозе 2 мкг/мл внутрибрюшинно с интервалом в 3 дня, при которой удалось индуцировать достаточно высокий антительный ответ в течение 2 недель.

Одним из важнейших этапов получения гибридом-продуцентов МКА является гибридизация спленоцитов гипериммунных мышей BALB/c с миеломными клетками Sp.2/0-Ag.8, дефектными по синтезу фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазе (ГГФРТ⁻) [Пол У., 1987-1989]. Важно учитывать, что в процессе слияния принимают участие клетки, находящиеся в стадии экспоненциального роста. Для этого миеломные клетки выращивают в среде с повышенным содержанием фетальной сыворотки, либо гибридизацию осуществляют в день выделения миеломных клеток из асцитической жидкости, что позволяет избежать дрожжевой контаминации, сохранив при этом необходимую фазу роста миелом.

Для стимуляции роста максимального количества клонов В-лимфоцитов – продуцентов специфических антител за два дня до слияния осуществляли бустерную прививку, а также подготавливали 96-луночные планшеты с фидерным слоем клеток, обеспечивающих повышение жизнеспособности гибридом и стимуляцию образования колоний за счет синтеза факторов, увеличивающих пролиферативную активность гибридных клеток. Количество жизнеспособных гибридом после фузии зависит от соотношения клеток-партнеров при проведении гибридизации, которое может варьировать от 1:1 до 1:10 [Фримель Г., 1987; Пол У., 1987-1989; Алексеева Л.П., 1993]. В ходе ряда проведенных нами экспериментов установлено наиболее оптимальное соотношение миеломных клеток и спленоцитов, равное 1:5.

Как более эффективный, химически чистый и безопасный индуктор слияния был использован ПЭГ с молекулярной массой 4000 Да. В качестве доноров иммунных спленоцитов и для культивирования гибридом *in vivo* использовали самок 8-12-недельных мышей BALB/c. На начальном этапе после слияния клеток *in vitro* применяли селективную НАТ-среду [Рингерц Н., Сэвидж Р., 1979; Кеннет Р.Г. с соавт., 1983; Пол У., 1987-1989; Д.Кэтти, 1991].

В результате проведенного исследования установлена эффективность гибридизации, которая составила $84 \pm 0,5\%$. Через 5-7 дней в инвертированном микроскопе наблюдали сформированные клоны гибридных клеток. Начиная с 14 дня после слияния, культивирование гибридом осуществляли на среде с гипоксантином, тимидином, а через 5-7 дней их переводили на ростовую среду без

селективных компонентов. Для отбора гибридом-продуцентов МКА к специфическим эпитомам на 14-й день после проведения гибридизации культуральную жидкость лунок с пролиферирующими клонами тестировали на наличие антителопродуцирующих гибридом.

По результатам первичного скрининга гибридом было отобрано 30 % лунок, в культуральной жидкости которых регистрировалась детектируемая позитивная реакция (ОП превышала отрицательный контроль в 2 и более раз). Гибридомы в лунках с максимальными и стабильно регистрируемыми в процессе роста значениями ОП культуральной среды использовали для проведения клонирования методом лимитирующих разведений. После нескольких реклонирований в качестве перспективных отобрано 5 клонов: 1D5, 2E5, 3E5, 3D3, 3C4. Гибридомы обеспечивали образование иммуноасцитической жидкости у мышей BALB/c в количестве от $6,5 \pm 0,7$ мл до $7,5 \pm 0,5$ мл на 9 – 10 день (таблица 1).

Таблица 1 Характеристика гибридом при культивировании *in vivo*

Параметр	Клон гибридомы				
	1D5	2E5	3E5	3D3	3C4
Сроки забора ИАЖ, день	10 \pm 0,5	9 \pm 0,6	10 \pm 0,5	10 \pm 0,5	9 \pm 0,6
Объем ИАЖ, мл	7,5 \pm 0,5	6,5 \pm 0,7	7,5 \pm 0,4	7,0 \pm 0,2	6,6 \pm 0,5
Количество клеток в 1 мл ИАЖ, $n \cdot 10^6$	7,0 \pm 0,6	7,6 \pm 0,4	7,0 \pm 0,4	8,2 \pm 0,6	7,8 \pm 0,2
Специфическая активность к ХТ	1:25600	1:51200	1:51200	1:25600	1:25600
Примечание: ИАЖ – иммуноасцитическая жидкость					

Для оценки стабильности полученных гибридом при хранении, их подвергали замораживанию и содержали в сосудах Дьюара в жидком азоте при температуре минус 196 °С в течение 3-6 месяцев. Установлено, что концентрация МКА в ИАЖ, зараженных гибридомами мышей BALB/c, после размораживания сохранялась на прежнем уровне в течение IX пассажей, а также в процессе их культивирования в гибридомной среде в условиях *in vitro*.

Наибольшее количество МКА продуцировали гибридомы 2E5 и 3E5, которые как уже было показано ранее, обеспечивали образование асцитической жидкости с высокой активностью в отношении ХТ.

Выделенные моноклональные антитела оценивали по изотипу, аффинности, специфичности, аддитивности (эпитопный анализ).

В ходе ряда экспериментов установлено, что все изученные МКА относились к классу IgG трех субклассов. Два клона продуцировали IgG1, 2 клона – IgG2a, 1 клон – IgG3. Значения константы аффинности варьировало от $0,53 \times 10^9$ до $2,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, что указывает на высокую степень связывания антител с ХТ.

При исследовании ХТ, продуцирующего штаммами *V.cholerae* O1 классического и эльтор биоваров, в непрямом варианте ИФА с выделенными иммуноглобулинами во всех случаях наблюдался положительный результат (таблица 2).

Таблица 2 Идентификация токсигенных штаммов *V.cholerae* с использованием МКА в ИФА

Штаммы	Тип холерного токсина	МКА				
		1D5	2E5	3E5	3D3	3C4
<i>V. cholerae cholerae</i> 569 В, токсигенный	I	+	+	+	+	+
<i>V.cholerae cholerae</i> М-41, токсигенный	I	+	+	+	+	+
<i>V.cholerae eltor</i> М-1509, токсигенный, генетически измененный по <i>ctxB</i> гену	I	+	+	+	+	+
<i>V.cholerae eltor</i> М-1463, токсигенный, генетически измененный по <i>ctxB</i> гену	I	+	+	+	+	+
<i>V.cholerae eltor</i> Р-3122, токсигенный	II	+	+	+	+	+
<i>V.cholerae eltor</i> М-879, токсигенный	II	+	+	+	+	+
<i>V.cholerae eltor</i> М-1436, нетоксигенный		-	-	-	-	-
<i>V.cholerae eltor</i> М-1460, нетоксигенный		-	-	-	-	-
Примечание: “-” отрицательная реакция “+” положительная реакция						

При изучении бульонных культур нетоксигенных холерных вибрионов со всеми МКА в ИФА зарегистрирован отрицательный ответ.

Полученные результаты указывали на специфичность МКА к ХТ I и II типов и перспективность их использования для разработки универсальной иммуноферментной тест-системы для обнаружения эпидемически значимых штаммов, продуцирующих ХТ обоих типов.

Кроме того, для оценки специфичности полученных МКА использовали бульонные культуры *E.coli* O111 и других серогрупп, *Sh.flexneri*, *Sh.sonnei spp.*,

Salmonella spp., *Y. enterocolitica*, а также В-субъединицу ХТ и термолабильный токсин (LT) кишечной палочки, любезно предоставленный сотрудниками ФГБУН Институт биорганической химии им. академиков Шемякина М.М. и Овчинникова Ю.А. РАН г. Москва, имеющего более 80 % идентичность по аминокислотному составу с ХТ [Dallas W.D. *et al.*, 1980].

Бульонный супернатант указанных выше микроорганизмов, В-субъединицу ХТ и LT сорбировали в лунки планшета, затем добавляли после заполнения лактальбумином несвязавшихся сайтов лунок полученные нами МКА, которые проявляли антивидовым пероксидазным конъюгатом (таблица 3).

Таблица 3 Специфичность МКА в ИФА

Штаммы	МКА				
	1D5	2E5	3E5	3D3	3C4
<i>Escherichia coli</i> O111-BH-3133	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 18	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 1180	-	-	-	-	-
<i>Salmonella paratyphi</i> A 27	-	-	-	-	-
<i>Salmonella paratyphi</i> B 61951	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i> 503	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> 20	-	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae sonnei</i> 59097	-	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae sonnei</i> 58008	-	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae flexneri</i> 58848	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 96	-	-	-	-	-
Термолабильный токсин <i>E. coli</i> (LT)	+	-	-	+	+
В – субъединица ХТ	+	+	+	+	+
Примечание: “-” отрицательная реакция “+” положительная реакция					

При исследовании бульонных культур гетерологичных микроорганизмов в непрямом варианте ИФА с полученными МКА во всех случаях отмечен отрицательный результат.

В тоже время при взаимодействии с препаратом LT наблюдался положительный ответ с МКА, продуцируемыми гибридами 1D5, 3D3, 3C4, что указывает на перекрестную реактивность данных антител в отношении ХТ и LT.

Важный этап определения холерного токсина включает в себя не только проведение ИФА для обнаружения токсина, но и предварительный этап его индукции у штаммов *V. cholerae* в условиях *in vitro*, который предусматривает культивирование вибрионов во флаконах, содержащих 200 мл среды АК1, при постоянном покачивании. Выполнение такой процедуры трудоемко и

продолжительно, а также связано с высоким риском образования аэрозоля в случае возникновения аварийной ситуации.

В связи с этим нами была разработана более безопасная, экономичная и занимающая меньше времени схема индукции ХТ вибрионами *in vitro*: посев агаровой культуры в стеклянную пробирку с 10 мл АКІ на 2,5 часа при температуре 37 °С (первичное подращивание), далее пересев 1 или 2 мл подращенной культуры в пластиковую центрифужную пробирку с 5 или 10 мл АКІ, соответственно, расположив её в практически горизонтальном положении под углом 5-10° (без касания жидкости крышки пробирки) и инкубации в термостате при температуре 37 °С в течение 16 часов (вторичное подращивание).

Для конструирования «сэндвич»-варианта иммуноферментной тест-системы, предназначенной для определения продукции холерного токсина, были использованы разноэпитопные МКА гибридом 2Е5 и 3Е5, которые продуцируют *in vitro* до 40 мкг/мл МКА с высокой аффинностью в отношении ХТ.

Поскольку сорбционная емкость полистироловых планшетов может существенно влиять на эффективность иммуноферментного анализа была оценена чувствительность созданной нами диагностической тест-системы с применением планшетов и стрипов Costar (США) и Greiner bio-one (Германия) с повышенной сорбционной емкостью в сравнении с планшетами Медполимер (Россия), в тестируемых разведениях ХТ от 1 мкг/мл до 0,01 нг/мл.

При использовании планшетов Costar (США) аналитическая чувствительность ИФА составила 0,1 нг/мл, что в 2 раза выше по сравнению с таковой на планшетах Greiner bio-one (Германия) и в 10-20 раз выше, чем на планшетах Медполимер (Россия). Поэтому для проведения последующих исследований были выбраны планшеты фирмы Costar (США).

Следует отметить, что чувствительность предложенной нами ИФА тест-системы (0,1 нг/мл) была значительно выше, чем у коммерческого препарата VET-RPLA detection kit (Oxoid) [Bennet R.W. *et al.*, 2007], используемого для выявления ХТ методом непрямой пассивной латексной агглютинации и обеспечивающий детекцию 1-2 нг/мл токсина. В то же время этот показатель был сопоставим с чувствительностью магноиммуноферментного анализа с применением МКА для определения ХТ и термостабильного токсина *E.coli* [Honda T. *et al.* 1984; Doyle M.P., 2008] и способом обнаружения данных токсинов (0,1 и 0,2 нг/мл, соответственно) с помощью «сэндвич» иммуноэнзимного анализа, предложенным Гришиным Е.В. и Валякиной Т.И. [2013]. Полученные нами результаты послужили основанием для проведения следующего этапа работы по оценке эффективности

сконструированной диагностической иммуноферментной тест-системы для выявления ХТ, индуцированного штаммами *V.cholerae* в бульонную среду АКІ.

В качестве тест-штаммов вибрионов были выбраны: токсигенные *V.cholerae* классического биовара 569В и М-41, токсигенные *V.cholerae* биовара эльтор Р-3122, М-879, М-1509, нетоксигенные *V.cholerae* биовара эльтор КМ-26 и *E.coli* О157. При этом штаммы *V.cholerae* биовара эльтор Р-3122 и М-879 относились к типичным представителям данного биовара и содержали *ctxB3* аллель, а штамм М-1509 – к генетически измененному варианту, несущему *ctxB1* аллель.

Индукцию ХТ при культивировании указанных штаммов *V.cholerae* и постановку ИФА с GM1-ганглиозидом осуществляли в соответствии с рекомендациями ВОЗ [1994] в сравнении с усовершенствованной нами пробоподготовкой и постановкой ИФА с использованием холерных антитоксических моноклональных антител.

При исследовании бактериальных суспензий токсигенных штаммов *V.cholerae* 569В, М-41, Р-3122, М-879, М-1509 во всех случаях получен положительный ответ, что указывает на наличие у данных штаммов холерного токсина (таблица 4).

Таблица 4 Результаты оценки эффективности выявления ХТ, индуцированного штаммами *V.cholerae in vitro*, с помощью разработанного варианта ИФА с применением МКА 2Е5 и 3Е5

Штаммы	Тип холерного токсина	ИФА экспер.	ELISA-GM1
		ОПср	
<i>V. cholerae cholerae</i> 569 В	I	0,688	0,684
<i>V. cholerae cholerae</i> М-41	I	0,120	0,181
<i>V. cholerae eltor</i> М-1509	I	0,757	0,800
<i>V. cholerae eltor</i> Р-3122	II	0,308	0,268
<i>V. cholerae</i> М-879	II	0,258	0,258
<i>V. cholerae</i> КМ-26	-	0,055	0,056
<i>E.coli</i> О157	-	0,057	0,054
ОПср(К+)		0,656	0,662
ОПср(К-)		0,055	0,055
Примечание: ОПср – оптическая плотность, среднее значение ОПср(К+) – оптическая плотность положительного контроля, среднее значение ОПср(К-) – оптическая плотность отрицательного контроля, среднее значение			

Таким образом, нами разработан «сэндвич»-вариант ИФА для определения ХТ с применением МКА 2Е5 и 3Е5, который обеспечивает высокую

аналитическую чувствительность анализа – до 0,1 нг/мл при исследовании препарата чистого токсина и бульонных культур токсигенных штаммов холерных вибрионов. Он позволяет с одинаковой эффективностью детектировать ХТ у штаммов *V.cholerae* классического биовара и генетически измененных вариантов эльтор, продуцирующих в условиях *in vitro* высокое количество токсина I типа, а также типичных штаммов *V.cholerae eltor*, индукция токсина II типа у которых незначительна.

В соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» в пробах фекалий наиболее вероятно наличие холерного токсина, продуцируемого штаммами холерного вибриона в условиях *in vivo*. В материале от больных алгидной формой холеры концентрация возбудителя достигает 1×10^6 - 1×10^9 м.к./мл. В испражнениях же пациентов легкой формой и леченных антибиотиками, а также реконвалесцентов и вибрионосителей количество холерных вибрионов обычно не превышает 1×10^2 - 1×10^4 м.к./мл [МУК 4.2.2218-07, 2007].

Для оценки диагностической чувствительности и специфичности холерной моноклональной ИФА тест-системы были проведены клинические испытания на 20 токсигенных и нетоксигенных штаммах холерного вибриона и 6 штаммах гетерологичных микроорганизмов кишечной группы. Были сформированы 4 группы проб, в первую из которых вошли бульонные культуры токсигенных штаммов холерных вибрионов (*ctx AB⁺*), выращенные в среде АКІ по предложенному нами более безопасному, экономичному, с меньшими временными затратами способу, в отличие от используемого за рубежом иммуноферментного анализа с применением GM1-ганглиозидов [CDC, 1994], а во-вторую – выращенные тем же, рекомендованным нами способом, бульонные культуры нетоксигенных штаммов *V.cholerae*. Третью и четвертую группы представляли пробы клинического материала (испражнения), контаминированного в одном случае токсигенными культурами холерного вибриона в концентрации 1×10^2 м.к./мл и 1×10^9 м.к./мл и во-втором случае культурами в той же концентрации нетоксигенных штаммов *V.cholerae* и гетерогенных микроорганизмов, исследованные с подрачиванием и без него.

В результате проведенных клинических испытаний в пробах бульонных культур и контаминированного биологического материала, содержащих токсигенные штаммы *V.cholerae*, продукция холерного токсина определена в 100% случаев. С аналогичными образцами бульонных культур и биологического материала, контаминированного нетоксигенными штаммами холерного вибриона и

гетерологичными микроорганизмами кишечной группы, получен 100% отрицательный результат.

Доказана диагностическая эффективность медицинского изделия «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae*» по ТУ 9398-052-01898109-2015: диагностическая чувствительность – не менее 99,1% с доверительной вероятностью 90%; диагностическая специфичность – не менее 99,5% с доверительной вероятностью 90%.

Таким образом, разработана диагностическая холерная антитоксическая моноклональная иммуноферментная тест-система, в комплектацию которой вошли планшет или стрип с активированной МКА поверхностью дна лунок и конъюгат, представляющий собой моноклональные антитоксические холерные иммуноглобулины, меченные пероксидазой хрена, а также реагенты для буферных растворов и субстратной смеси с целью проявления комплекса антиген-антитело. Кроме того, исходя из оптимальных условий подращивания вибрионов в бульоне АКІ, в комплект тест-системы включена сухая навеска указанной питательной среды.

Схема проведения анализа при использовании указанной выше тест-системы включает несколько основных этапов:

- приготовление среды для культивирования *V.cholerae*;
- приготовление рабочих растворов для проведения иммуноферментного анализа;
- проведение анализа;
- учет и интерпретация результатов.

Регистрацию результатов анализа осуществляют с использованием мультифокального фотометра при длине волны 405 нм.

Оценка результатов клинических испытаний медицинского изделия для диагностики *in vitro* «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» отражена в соответствующем акте № ВМ-пр-06-14/16-КИ от 03.10.2016 г.

Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения выдано Регистрационное удостоверение № РЗН 2016/5013 от 15.11.2016 г., на медицинское изделие «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)», которое приказом Росздравнадзора от 15.11.2016 г. № 12672 допущено к обращению на территории Российской Федерации.

ВЫВОДЫ

1. Получена панель из пяти гибридов, две из которых (2Е5 и 3Е5) стабильно продуцируют МКА специфичные к ХТ, а три (1D5, 3D3, 3C4) – МКА, специфичные к ХТ и LT *E.coli*, характеризующиеся высокой стабильностью с сохранением исходной активности в течение IX пассажей *in vivo*.

2. Подобрана пара разноэпитопных связывающих и детектирующих МКА и определены их оптимальные (10 мкг/мл и 0,28 мкг/мл соответственно) концентрации для антигенспецифического взаимодействия, позволяющие выявлять холерный токсин штаммов *V. cholerae* классического и эльтор биоваров, в том числе генетически измененных по *ctxB1* аллели, с пороговой чувствительностью – 0,1 нг/мл в «сэндвич»-варианте иммуноферментного анализа.

4. Разработана схема индукции ХТ *V.cholerae* в среде АКІ в пластиковых центрифужных пробирках в небольшом объеме (5-10 мл) питательной среды без термошейкера, что снижает биологическую опасность процесса, связанного с риском образования аэрозоля в случае аварийной ситуации, а также сокращает сроки исследования в сравнении с предложенным за рубежом методом определения холерного токсина *in vitro* с использованием GM1-ганглиозидов.

5. Диагностическая ценность разработанной «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» подтверждена результатами лабораторных, технических и клинических испытаний, в ходе которых установлена высокая специфичность (99,5%) и чувствительность (99,1%) разных серий препарата и отмечено полное соответствие его свойств критериям качества, заявленным в ТУ 9388-052-01898109-2015.

6. Применение разработанной «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)» позволяет выявлять холерный токсин I и II типов в пробах клинического материала и в чистых культурах холерных вибрионов, выделенных из клинического материала, а также дифференцировать токсигенные штаммы *V.cholerae* от нетоксигенных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Терешкина, Н.Е. Иммунодиагностика холеры: современное состояние проблемы. / Н.Е. Терешкина, Е.А. Михеева, З.Л. Девдариани, А.К. Адамов, Г.В. Григорьева //

Проблемы особо опасных инфекций. – 2010. – Вып.1(103). – С. 18-23 (из перечня ВАК).

2. Михеева, Е.А. Получение и характеристика антителопродуцирующих гибридом и моноклональных иммуноглобулинов к энтеротоксину *V.cholerae* / Е.А. Михеева, З.Л. Девдариани, Н.А. Осина, Т.Л. Захарова // Биотехнология. – 2014. – № 3. – С. 49-55 (из перечня ВАК).

3. Михеева, Е.А. Определение холерного токсина у штаммов *V.cholerae* в иммуноферментном анализе с использованием моноклональных антител / Е.А. Михеева, З.Л. Девдариани, Н.А. Осина, С.А. Щербакова // Биозащита и биобезопасность. – 2014. – № 4(21). – С. 38-43 (из перечня ВАК).

4. Захарова Т.Л. Новый эффективный способ получения очищенной В-субъединицы холерного токсина и моноклональных антител к ней. / Т.Л. Захарова, Е.А. Михеева, Н.А. Осина // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – Вып.2. – С. 79-82 (из перечня ВАК).

5. Михеева, Е.А. Особенности получения гибридом - продуцентов моноклональных антител к *Vibrio cholerae O1* / Е.А. Михеева, Н.Е. Терешкина, О.В. Громова, З.Л. Девдариани, М.Н. Киреев // Холера и патогенные для человека вибрионы. Матер. Проблемной комиссии Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации.- Ростов - на - Дону. – 2009. – С. 70.

6. Михеева, Е.А. Получение поли- и моноклональных антител к диагностически значимым антигенам холерного вибриона / Е.А. Михеева, Н.Е. Терешкина, О.В. Громова, З.Л. Девдариани, М.Н. Киреев, Т.Л. Захарова, Н.М. Ермаков, Г.В. Григорьева, Т.Ю. Красовская // Материалы II Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. – Москва – 2010. – С.207.

7. Михеева, Е.А. Получение и применение моноклональных антител для обнаружения холерного токсина / Е.А. Михеева, З.Л. Девдариани, Н.Е. Терешкина, Т.В. Аленкина, Т.Л. Захарова, М.Н. Киреев // Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера: материалы XI Межгосударственной научно-практической конференции. – Саратов. – 2012. – С. 162-164.

8. Захарова, Т.Л. Получение очищенной В-субъединицы холерного токсина новым способом и моноклональных антител к ней / Т.Л. Захарова, Е.А. Михеева, Н.А. Осина, Н.И. Смирнова // Материалы VI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. – Москва. – 2014. – С. 105.

9. Михеева, Е.А. Изучение стабильности антителопродуцирующих гибридом к холерному токсину *in vivo* / Е.А. Михеева, З.Л. Девдариани, Т.Л. Захарова, Н.А. Осина, С.А. Щербакова // Материалы VI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням - Москва. – 2014. – С. 205-206.
10. Михеева, Е.А. Перспективы использования иммуноферментного анализа с моноклональными антителами для выявления эпидемически значимых штаммов холерных вибрионов в биологическом материале от человека / Е.А. Михеева, Н.А. Осина, Е.С. Казакова, И.Н. Шарова, С.А. Щербакова // Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням – Москва. – 2015. – С. 228.
11. Пат. 2583306 Российская Федерация, МПК C12N 5/18. Штамм гибридных культивированных клеток животных *Mus musculus* ХТ 2Е5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 1 к В-субъединице холерного токсина / Е.А. Михеева, З.Л. Девдариани, Н.А. Осина, заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – №2015108499/10; заявл. 11.03.15; опубл.10.05.16, Бюл. №13 – 9 с.
12. Пат. 2590587 Российская Федерация, МПК C12N 5/18. Штамм гибридных культивированных клеток животных *Mus musculus* ХТ 3Е5 – продуцент моноклональных антител изотипа G 2А к В-субъединице холерного токсина / Е.А. Михеева, З.Л. Девдариани, Н.А. Осина, заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – №2015108498/10; заявл. 11.03.15; опубл.10.07.16, Бюл. №19 – 9 с.