

## Отзыв

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

Диссертационная работа Михеевой Елены Александровны выполнена в отделе диагностики инфекционных болезней в лабораториях иммунодиагностики и молекулярной диагностики ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора по плановой тематике двух НИР.

Актуальность исследований обусловлена тем, что эпидемиологическая обстановка по холере в мире в последние годы остается достаточно напряженной и существует постоянная угроза её завоза в Российскую Федерацию из вновь возникающих очагов этой инфекции, а также из традиционно эндемичных по холере стран. Известно, что холерный токсин занимает ведущее место в патогенезе инфекционного процесса и вызывает основной симптомокомплекс заболевания. Поэтому для проведения профилактических мероприятий необходимо в сжатые сроки определить эпидемическую значимость (токсигенность) выделенных штаммов *V.cholerae*. Согласно схеме лабораторной диагностики холеры (МУК 4.2.2218-07) токсигенность холерных вибрионов определяют в биологической пробе на крольчатах-сосунках и методом ПЦР для выявления *ctxA* и *tcpA* генов. Биологическая модель наиболее объективный, но достаточно трудоемкий и продолжительный способ, а наличие генов, кодирующих синтез энтеротоксина, не всегда свидетельствует об его экспрессии. Наиболее перспективным современным высокочувствительным методом определения продукции холерного токсина является иммуноферментный анализ. За рубежом предложена методика проведения такого анализа с использованием дорогостоящих реагентов, в частности, GM1 ганглиозидов. В России также предприняты ряд удачных попыток создания экспериментальных иммунодиагностических препаратов для определения токсигенных штаммов холерных вибрионов, однако, до практического применения они так и не были доведены. Таким образом, вопрос о научно-технологической разработке и внедрении в практику иммуноферментной диагностической тест-системы для определения холерного токсина оставался открытым.

Обзор литературы посвящен традиционным и современным методам определения бактериальных токсинов. В заключительной её части более подробно освещены способы

идентификации холерного энтеротоксина, выделены наиболее перспективные направления совершенствования иммунодиагностики токсигенных эпидемически значимых вариантов возбудителя холеры.

Диссертационная работа проведена на достаточно большом количестве штаммов микроорганизмов(98). В том числе 87 токсигенных и нетоксигенных штаммов *V.cholerae* классического и эльтор биоваров, а также 11 штаммов гетерологичных микробов. В работе использованы микробиологические, иммунохимические, культуральные, биохимические, статистические методы исследования.

На начальном этапе приведения исследований была подобрана оптимальная схема иммунизации линейных мышей BALB/c, обеспечившая высокую антителопродуцирующую активность плазмочитом к холерному токсину. Были также подготовлены оптимальные условия для гибридизации клеток сингенной миеломы и иммунных спленочитов, в том числе, их оптимальное соотношение. В результате эффективность гибридизации составила более 80%. В ходе дальнейших экспериментов была создана клонотека из 5 штаммов гибридом, стабильно продуцирующих МКА к холерному токсину *in vitro* и в течение IX пассажей *in vivo*. Определены изотипы, аффинность и аддитивность МКА. 2 штамма гибридом продуцировали специфические антитела к В-субъединице холерного токсина, а 3 штамма – антитела, перекрестно реагирующие с термолабильным токсином *E.coli*.

Методика определения энтеротоксина у токсигенных штаммов холерного вибриона включает не только проведение ИФА для его обнаружения, но и создание условий культивирования для максимально возможной его продукции в культуральную среду. Особенно это актуально для штаммов *V.cholerae* биовара эльтор. В связи с этим Е.А.Михеевой предложен усовершенствованный вариант выращивания холерных вибрионов, отличающийся от предложенного зарубежными специалистами способа экономичностью, меньшими временными затратами и сниженной биологической опасностью процесса культивирования. При разработке сэндвич-варианта ИФА были подобраны планшеты с повышенной сорбционной емкостью, установлены оптимальные концентрации связывающих и детектирующих разноэпитопных моноклональных антител, обеспечивающих высокую до 0,1 нг/мл чувствительность анализа.

На последующем этапе экспериментальной части диссертационной работы был создан комплект моноклональной диагностической иммуноферментной тест – системы для идентификации токсигенных штаммов *V.cholerae*, включающий все необходимые ингредиенты, в том числе, сухую навеску питательной среды АКІ для пробоподготовки, активированные связывающими моноклональными антителами стрипованные планшеты,

дающие возможность проводить отдельные анализы при небольшом количестве исследуемых проб, высушенные меченые пероксидазой МКА, повышающие стабильность препарата при хранении.

В заключительной части работы были изготовлены экспериментальные серии разработанной тест-системы и последовательно проведены её регламентированные межлабораторные, технические и клинические испытания. В результате была подтверждена диагностическая ценность созданного препарата, установлена его высокая чувствительность и специфичность, позволяющая выявлять холерный токсин I и II типов не только в чистых культурах холерных вибрионов, но и в пробах клинического материала, содержащего токсигенные штаммы возбудителя холеры.

Научная новизна диссертации подтверждена двумя патентами и одной заявкой на изобретение.

Практическая значимость работы документально определена :

- Свидетельствами о депонировании в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ИКИМ-Оболенск» (ФБУН ГНЦ ИМБ п.Оболенск) двух штаммов гибридных клеток продуцентов моноклональных антител к В-субъединице холерного токсина;
- Двумя методическими рекомендациями, утвержденными директором РосНИПЧИ «Микроб»;
- Актами межлабораторных, технических и клинических испытаний
- Нормативно методическими документами на сконструированную диагностическую тест-систему (ТУ, инструкция по применению).

Основное содержание диссертации в полной мере отражено в автореферате и 10 научных работах, из которых четыре статьи опубликованы в научных журналах из рекомендованного ВАК РФ Перечня научных изданий для публикации материалов кандидатских и докторских диссертаций. Положения, вынесенные на защиту, подтверждены экспериментальными данными и отражены в выводах диссертации. Материалы диссертации достаточно полно представлены на научно-практических конференциях и конгрессах различного уровня.

Елена Александровна является опытным, зрелым специалистом, способным к решению как научных, так и оперативных вопросов, связанных с лабораторной диагностикой опасных инфекционных болезней.

Считаю, что диссертационная работа Михеевой Е.А. «Конструирование диагностической иммуноферментной тест-системы для идентификации токсигенных штаммов холерного вибриона» является законченным научным исследованием ,

выполненная лично соискателем, и по объему представленного материала, методическому уровню, научной новизне, практической значимости полученных результатов соответствует «Положению о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. № 842 и может быть представлена к защите в диссертационный совет по специальности 03.02.03 – микробиология.

Главный научный сотрудник  
информационно-аналитического отдела,  
доктор медицинских наук, профессор

З.Л.Девдариани

Подпись З.Л.Девдариани заверяю  
Начальник отдела кадров  
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»



Е.Ф.Шамшурина

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора), 410005, г.Саратов, ул. Университетская, д.46, тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12, e-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)