

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 N _____
решение диссертационного совета от 24 мая 2017 г. N 7

О присуждении Михеевой Елене Александровне, гр. России, ученой степени кандидата медицинских наук.

Диссертация «Конструирование диагностической иммуноферментной тест-системы для идентификации токсигенных штаммов холерного вибриона» по специальности 03.02.03 – микробиология, принята к защите 23 марта 2017 г., протокол N 3 диссертационным советом 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, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46. Создан Приказом Минобрнауки России № 903/нк от 6 августа 2015 г.

Соискатель Михеева Елена Александровна 1983 года рождения.

В 2006 году соискатель окончила Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный медицинский университет» Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию.

Диссертация выполнена в лабораториях иммунодиагностики и молекулярной диагностики Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научный руководитель - доктор медицинских наук, профессор,

Девдариани Зураб Леванович, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, сектор информационного обеспечения научных исследований информационно-аналитического отдела, главный научный сотрудник.

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 ВО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии, дали положительные отзывы на диссертацию.

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, г. Ростов-на-Дону в своем положительном заключении, подписанном Алексеевой Людмилой Павловной, доктором биологических наук, профессором, лаборатория гибридом, заведующая лабораторией указала, что очевидна актуальность и перспективность диссертационной работы, она имеет научное и практическое значение, вносит существенный вклад в лабораторную диагностику холеры. Работа Е.А. Михеевой по актуальности, объему, новизне и практической значимости полученных результатов соответствует п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор заслуживает искомой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология.

Соискатель имеет 23 опубликованные работы, в том числе по теме диссертации 10 работ, 2 патента на изобретения, опубликованных в рецензируемых научных изданиях 4 работы. Авторский вклад составляет 70%, объем научных изданий 2,0 п.л.

Опубликованные работы отражают все разделы диссертационной работы, включая разработку методик получения линий гибридных клеток, вырабатываемых ими специфических к холерному токсину моноклональных антител, разработку на их основе тест-системы для выявления токсигенных штаммов *Vibrio cholerae*, а также экспериментальные исследования по апробации предложенной тест-системы. Приоритетность полученных результатов подтверждается двумя патентами РФ.

1. 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.

2. 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.

3. 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.

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.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы: **Урбанович Людмила Яковлевна**, доктор медицинских наук, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, старший научный сотрудник лаборатории холеры. Положительный, без замечаний. **Тюменцева Ирина Степановна**, доктор медицинских наук, профессор, ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, главный научный сотрудник научно-

производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных инфекций и других инфекций. Положительный, без замечаний. **Захарова Наталия Борисовна**, доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Минздрава России. Положительный, без замечаний. **Прохватилова Елена Валерьевна**, кандидат медицинских наук, доцент, ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, заведующая отделом биологического и технологического контроля. Положительный, без замечаний. **Печенкин Денис Валерьевич**, кандидат медицинских наук, начальник научно-исследовательского отдела и **Куклина Галина Викторовна**, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» (г. Киров) Минобороны России. Положительный, без замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что основные разработки Храповой Н.П. и Щербакова А.А. посвящены конструированию тест-систем для индикации, идентификации, типирования возбудителей инфекционных болезней; Ростовский-на-Дону противочумный институт – референс-центр по проблеме холеры в Российской Федерации, в том числе, специалисты института с успехом занимаются разработкой методик для идентификации, дифференциации холерных вибрионов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Разработана «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *V.cholerae* (ИФАХолХТ-М)», основанная на использовании разноэпитопных связывающих и детектирующих МКА, позволяющая выявлять холерный токсин *V.cholerae* классического и эльтор биоваров, в том числе генетически измененных по *ctxB1* аллели, с пороговой чувствительностью 0,1 нг/мл.

Показана способность тест-системы ИФАХолХТ-М выявлять холерный токсин I и II типов как в пробах клинического материала, так и в чистых культурах холерных вибрионов, а также дифференцировать токсигенные штаммы *V.cholerae* от нетоксигенных.

Усовершенствован способ культивирования токсигенных штаммов *V.cholerae* в среде АКІ, позволяющий снизить биологическую опасность процесса в случае возникновения аварийной ситуации и сократить сроки проведения исследования.

Из пяти линий полученных гибридом, две из которых (2Е5 и 3Е5) продуцируют моноклональные антитела (МКА), специфичные к холерному токсину, отличаются высокой стабильностью при пассажах на сингенных мышцах BALB/с с сохранением исходной активности.

Доказана перспективность использования разработанной тест-системы в лабораторной практике, в том числе в ходе технических и клинических испытаний. Установлена ее специфичность (99,5 %) и чувствительность (99,1 %). Показано полное соответствие тест-системы ИФАХолХТ-М критериям ТУ 9388-052-01898109-2015.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: доказана высокая активность и специфичность разноэпитопных моноклональных антител, продуцируемых полученными гибридомами (2Е5 и 3Е5) в составе тест-системы ИФАХолХТ-М, обеспечивающей выявление холерного токсина I и II типов в клиническом материале и в чистых культурах холерных вибрионов с высокой пороговой чувствительностью.

Доказана эффективность использования усовершенствованного способа культивирования штаммов *V.cholerae* для снижения биологической опасности процесса диагностики, его ускорения и высокой продукции холерного токсина в концентрации не менее 100 нг/мл.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс методов микробиологии, биохимии, иммунохимии, клеточной инженерии, позволивших успешно решить задачи по разработке

методических подходов к определению токсигенности холерных вибрионов, на основе использования разработанной тест-системы ИФАХолХТ-М; дать объективную оценку ее качества для целей лабораторной диагностики холеры и выявления эпидемически значимых штаммов *V.cholerae*.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

Получены клеточные линии гибридом 2Е5, 3Е5 и 1D5, 3D3, 3С4, 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 РосНИПЧИ «Микроб»).

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 института.

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»).

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 (акт оценки результатов технических испытаний № 05-28/15 от 29.05.2015 г.) и клинические (акт клинических испытаний № ВМ-пр-06-14/16-КИ от 03.10.2016 г.) испытания «Тест-системы иммуноферментной для определения продукции холерного токсина штаммами *Vibrio cholerae* (ИФАХолХТ-М)».

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.

Оценка достоверности результатов исследования выявила: результаты экспериментальных исследований получены на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании, показана воспроизводимость результатов исследования в сериях опытов;

идея использования разноэпитопных моноклональных антител в ИФА базируется на анализе литературных данных о структуре холерного токсина и высокой чувствительности и достоверности иммунохимических методов для целей его выявления в сравнении с другими методическими подходами;

получение моноклональных антител к холерному токсину, последующее создание тест-системы для выявления холерного токсина, а также использование усовершенствованной пробоподготовки с целью индукции продукции холерного токсина построены на анализе и обобщении современного опыта по разработке таких тест-систем и на известных проверяемых фактах (использованы сведения, опубликованные отечественными и зарубежными авторами, а также сведения, содержащиеся в

утвержденных методических рекомендациях и указаниях) и согласуется с опубликованными данными по теме диссертации;

установлено, что чувствительность разработанной соискателем тест-системы выше, чем у коммерческого препарата VET-RPLA detection kit (Oxoid) для выявления холерного токсина и сопоставима с чувствительностью метода определения холерного токсина с GM-1 ганглиозидом, рекомендуемом ВОЗ, при этом, время исследования, в сравнении с последним методом, сокращается на 6 часов;

использованы современные методы сбора и обработки исходной информации;

для объективной оценки разработанной тест-системы использовали 99 штаммов микроорганизмов, из них: 87 штаммов *V.cholerae* различных биоваров как ctxAB⁺, так и ctxAB⁻, а также 12 штаммов гетерологичных микроорганизмов (*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*);

использованы современные методы микробиологических, биохимических, иммунохимических, исследований и методы клеточной инженерии.

Все приведенные данные получены в повторяющихся экспериментах. Выборки анализируемых данных представлены в объеме, достаточном для достоверной статистической обработки.

Личный вклад соискателя состоит в: непосредственном участии соискателя в получении исходных данных и научных экспериментах; личном участии в апробации результатов исследования, получении линий гибридных клеток, выделении моноклональных антител, разработке тест-системы ИФАХолХТ-М и способа пробоподготовки исследуемого материала. Обработка и интерпретация экспериментальных данных выполнена лично автором. Подготовка основных публикаций по выполненной работе осуществлена как лично автором, так и при ее непосредственном участии.

Клинические испытания тест-системы ИФАХолХТ-М проведены совместно с сотрудниками клинико-диагностической лаборатории ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» (г. Москва).

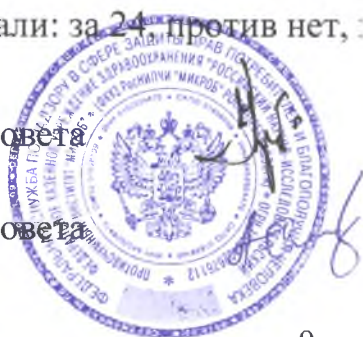
Диссертация охватывает основные вопросы поставленной научной проблемы по конструированию тест-системы для определения продукции холерного токсина и соответствует критерию внутреннего единства, что подтверждается логической связью этапов исследования и последовательностью их проведения, включая получение клеточных линий гибридом, моноклональных антител к холерному токсину, разработку ИФА тест-системы, пробоподготовку исследуемого материала, а также проведение технических и клинических испытаний разработанного диагностического препарата. Цель диссертации, поставленные задачи, использование методических подходов для их достижения, положения, выносимые на защиту, и выводы связаны основной идейной линией и не противоречат друг другу.

Диссертация Михеевой Е.А. является научно-квалификационным исследованием, по основному содержанию соответствует пунктам 9, 13, 14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ 24.09.2013 г. №842 с дополнениями, содержащимися в Постановлении Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335.

На заседании 24 мая 2017 г. диссертационный совет принял решение присудить Михеевой Е.А. ученую степень кандидата медицинских наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 24 человек, из них 6 докторов наук по специальности 03.02.03 – микробиология (медицинские науки), из 29 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 24, против нет, недействительных бюллетеней нет.

Председатель
диссертационного совета
Ученый секретарь
диссертационного совета
30 мая 2017 г.



Кутырев В.В.

Слудский А.А.