

**ВЕСТНИК БИОТЕХНОЛОГИИ  
И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ  
ИМЕНИ Ю.А. ОВЧИННИКОВА**

**Научно-практический журнал**

**Основан в 2005 году**

**Главный редактор**

Р.Г. Василов

**Редакционная коллегия**

В.С. Воробьев, Т.Н. Гаева, С.И. Матаев, А.А. Назаренко

**Редакционный совет**

В.Г. Дебабов (Москва), В.Т. Иванов (Москва), М.П. Кирпичников (Москва),  
Э.И. Коломиец (Минск, Республика Беларусь), А.И. Мирошников (Москва),  
Т.В. Овчинникова (Москва), В.О. Попов (Москва),  
Э.М. Раманкулов (Астана, Республика Казахстан), А.Н. Решетилов (Пушино),  
Э.К. Хуснутдинова (Уфа), Н.К. Янковский (Москва)

Журнал зарегистрирован в Росохранкультуре  
Рег. ПИ № ФС77-19745 от 11 апреля 2005 г.

Зав. редакцией О.В. Коломбет

Адрес: 123060, г. Москва, а/я 3

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru, vorobyev095@yandex.ru

Учредитель и издатель:

АНО «Информационно-аналитический центр

медико-социальных проблем»

Адрес: 127581 Москва, Керамический проезд, 53, кор. 1

Тел.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Издается при поддержке

Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова

2022, Vol. 18, No 1

**BULLETIN OF BIOTECHNOLOGY  
AND PHYSICO-CHEMICAL BIOLOGY  
NAMED AFTER Yu.A. OVCHINNIKOV**

**Scientific and practical journal**

**Founded in 2005**

**Chief editor**

R.G. Vasilov

**Editorial board**

V.S. Vorobyev, T.N. Gaeva, S.I. Mataev, A.A. Nazarenko

**Editorial council**

V.G. Debabov (Moscow), V.T. Ivanov (Moscow), M.P. Kirpichnikov (Moscow),  
E.I. Kolomiets (Minsk, Republic of Belarus), A.I. Miroshnikov (Moscow),  
T.V. Ovchinnikova (Moscow), V.O. Popov (Moscow),  
EM. Ramankulov (Astana, Republic of Kazakhstan), A.N. Reshetilov (Pushchino),  
E.K. Khusnutdinova (Ufa), N.K. Yankovsky (Moscow)

The journal is registered in Rosokhrankultura  
Reg. PI No. FS77-19745 dated April 11, 2005

Head edited by O.V. Colombet

Address: 123060, Moscow, PO Box 3

Tel.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: vestnik@biorosinfo.ru, vorobyev095@yandex.ru

Founder and Publisher:

ANO «Information and Analytical Center  
medical and social problems»

Address: 127581 Moscow, Keramicheskyy proezd, 53, box. one

Tel.: +7 (495) 648-09-13

E-mail: raifvasilov@mail.ru

Published with the support of the  
Russian Biotechnology Society named after Yu.A. Ovchinnikov

**ISSN 1996-4741**

© Information and Analytical Center  
for Medical and Social Problems, 2022

**СОДЕРЖАНИЕ**

**Колонка главного редактора**

К читателям. *Р.Г. Василев* ..... 5

**Оригинальные статьи**

Выделение и изучение биологических свойств бактериофага *Yersinia enterocolitica* 2021.

*А.О. Аноприенко, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.В. Тюрина, М.Г. Мелоян* ..... 6

Индукция секреции биологически активных соединений у рапаны *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (*Gastropoda, Muricidae*).

*А.В. Пиркова, Л.В. Ладыгина* ..... 13

Анализ результатов мониторинга холеры на территории России в период 1990–2020 гг. и проведенного генотипирования выделенных штаммов холерных вибрионов O1 и 139 серогрупп.

*А.М. Горох, А.А. Герасименко, Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, А.К. Носков* ..... 21

Изучение биохимических показателей клеток при воздействии зеараленона и Т-2 токсина.

*Н.Р. Касанова, Л.Р. Валиуллин, Рин. С. Мухаммадиев, А.П. Глинушкин, Н.В. Шамсутдинова* ..... 28

Изучение свойств холерного токсина и его дериватов в системе разработки новых вакцинных препаратов.

*М.Н. Киреев, О.В. Громова, О.С. Дуракова, С.А. Воробьева, Л.Ф. Ливанова, О.А. Волох* ..... 33

Биосовместимость природных штаммов бацилл, перспективных для включения в состав микробного биопрепарата.

*А.В. Малкова, А.Н. Иркутова, Д.Е. Дудник* ..... 38

Оптимизация набора штаммов для контроля качества сыворотки диагностической холерной не O1 группы O139.

*М.В. Овчинникова, А.С. Феськова, И.В. Шульгина, О.А. Лобовикова, Т.Ю. Кириллова, Л.В. Зайцева, Н.П. Миронова, С.С. Галетова, А.К. Никифоров* ..... 44

Формирование микробиоты недоношенных новорожденных детей при самопроизвольных и оперативных родах.

*О.А. Петрова, В.М. Червинец, Ю.В. Червинец* ..... 51

**Обзоры**

Биотехнологические разработки латексных препаратов для диагностики инфекционных болезней.

*А.Ю. Евченко, И.В. Жарникова, Т.В. Жарникова, Д.В. Русанова, С.А. Курчева, М.М. Курноскина, Е.В. Жданова, А.Г. Кошкидько* ..... 60

**Информация** ..... 71

**Страницы истории.** Юбилейные и знаменательные даты 2022 года ..... 73

**Хроника** ..... 78

**Правила для авторов** ..... 79

**CONTENTS**

**Column of the editor-in-chief**

To readers. *R.G. Vasilov* ..... 5

**Original articles**

Isolation and study of biological properties of bacteriophage *Yersinia enterocolitica* 2021.

*A.O. Anoprienko, N.E. Gaevskaya, M.P. Pogozhova, A.V. Tyurina, M.G. Meloyan* ..... 6

Induction of biologically active compound secretion in veined rapa whelk *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846)  
(*Gastropoda, Muricidae*).

*A.V. Pirkova, L.V. Ladygina* ..... 13

Analysis of the results of monitoring cholera on the territory of Russia in the period 1990–2020 and genotyping  
of isolated strains of *Vibrio cholerae* O1 and 139 serogroups.

*A.M. Gorokh, A.A. Gerasimenko, D.A. Levchenko, V.D. Kruglikov, A.K. Noskov* ..... 21

Study of biochemical parameters of cells exposed to zearalenone and T-2 toxin.

*N.R. Kasanova, L.R. Valiullin, Rin.S. Mukhammadiev, A.P. Glinushkin, N.V. Shamsutdinova* ..... 28

Study of the properties of cholera toxin and its derivatives in the development of new vaccine preparations.

*M.N. Kireev, O.V. Gromova, O.S. Durakova, S.A. Vorob'eva, L.F. Livanova, O.A. Volokh* ..... 33

Biocompatibility of natural bacilli strains prospective for inclusion in the microbial biopreparation composition.

*A.V. Malkova, A.N. Irkitova, D.E. Dudnik* ..... 38

Optimization of a set of strains for quality control serum diagnostic cholera non-O1 group O139.

*M.V. Ovchinnikova, A.S. Feskova, I.V. Shulgina, O.A. Lobovikova, T.Yu. Kirillova,*

*L.V. Zaitseva, N.P. Mironova, S.S. Galetova, A.K. Nikiforov* ..... 44

Formation of the microbiota of premature newborns in spontaneous and operative childbirth.

*O.A. Petrova, V.M. Chervinets, Yu.V. Chervinets* ..... 51

**Reviews**

Biotechnological development of latex preparations for diagnostics of infectious diseases.

*A.Yu. Evchenko, I.V. Zharnikova, T.V. Zharnikova, D.V. Rusanova,*

*S.A. Kurcheva, M.M. Kurnoskina, E.V. Zhdanova, A.G. Koshkidko* ..... 60

**The information** ..... 71

**Pages of history.** Anniversary and significant dates 2022 ..... 73

**The chronicle** ..... 78

**Rules for authors** ..... 79

## К читателям

В первом номере 2022 года представлена подборка в основном оригинальных статей. Аноприенко А.О. с коллегами из Ростовского-на-Дону противочумного института исследовали биологические свойства бактериофага *Yersinia enterocolitica*. Подчеркнута высокая специфичность явления бактериофагии в данном контексте, а также простота постановки пробы, быстрота и четкость результатов.

Исследователи Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. из Института биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН (Севастополь) описали биотехнологию многократной индукции секреции у рапаны биологически активных соединений – потенциального сырья для производства медицинских препаратов.

Горох А.М. и др. (Ростовский-на-Дону противочумный институт) проанализировали результаты мониторинга холеры на территории России в период 1990–2020 гг. и установили, что наибольшее количество штаммов холерных вибрионов за 30-летний период было изолировано на территориях Республики Калмыкия, Краснодарского края, Ростовской области и Забайкальского края.

Группа ученых из учреждений Казани и Московской области (Касанова Н.Р. и др.) провели изучение биохимических свойств показателей клеток в культуре при воздействии зеараленона и Т-2 токсина. Результаты оценивались на основании анализа активности некоторых ферментов и определения концентрации молочной кислоты.

Киреев М.Н. и др. из РосНИПЧИ (Саратов) представили обобщенные результаты исследования нескольких серий анатоксина и очищенного холерного токсина. Все изученные серии анатоксинов имели примерно одинаковые показатели, которые соответствовали нормативным документам на холерную таблетированную вакцину.

Коллектив сотрудников Алтайского государственного университета (Барнаул) – Малкова А.В. и др. – изучили биосовместимость 9 природных штаммов бактерий рода *Bacillus* (видов *B. pumilus*, *B. toyonensis* и *B. licheniformis*). Показано, что все 5 штаммов вида *B. pumilus* совместимы между собой.

В работе Овчинниковой М.В. и др. из РосНИПЧИ (Саратов) «Оптимизация набора штаммов для контроля качества сыворотки диагностической холерной не О1 группы О139» проведен сравнительный анализ культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств холерных вибрионов 02-83 групп для дальнейшей корректировки контрольного набора штаммов.

Петрова О.А. с коллегами из Тверского государственного медицинского университета провели мониторинг состава микрофлоры верхних дыхательных путей, ротовой жидкости, содержимого желудка и толстой кишки у недоношенных новорожденных детей при самопроизвольных и оперативных родах.

Единственный обзор в настоящем номере авторов Евченко А.Ю. и др. из Ставропольского противочумного института посвящен анализу биотехнологических разработок латексных препаратов для диагностики инфекционных болезней.

Главный редактор,  
президент Общества биотехнологов России,  
профессор Р.Г. ВАСИЛОВ

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИОФАГА *YERSINIA ENTEROCOLITICA* 2021

А.О. АНОПРИЕНКО\*, Н.Е. ГАЕВСКАЯ, М.П. ПОГОЖОВА, А.В. ТЮРИНА, М.Г. МЕЛОЯН

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону

К роду *Yersinia* относятся несколько видов микроорганизмов, одним из которых патогенным для человека является *Yersinia enterocolitica*. Кишечный иерсиниоз — это зооноз, распространенный во всем мире. В странах Европы этот микроорганизм в настоящее время является наиболее часто регистрируемым бактериальным патогеном, вызывающим острый гастроэнтерит. В связи с вариабельностью признаков и большим фенотипическим сходством представителей рода *Yersinia* для надежной и эффективной диагностики необходимо использовать традиционные методы в сочетании с современными молекулярными (MALDI-TOF-MS и ПЦР). Для патогенных представителей рода *Yersinia* свойственно явление бактериофагии, которое применяется на практике и при постановке метода фагодиагностики. Высокая специфичность этого явления, простота постановки пробы, быстрота и четкость результатов определили широкое использование данного метода для идентификации и дифференциации микроорганизмов. В связи с вышеизложенным необходимы весьма масштабные и целенаправленные исследования, ориентированные на поиск новых перспективных фагов для диагностики заболеваний, вызываемых иерсиниями, а также их полная биологическая и генетическая характеристика.

*Ключевые слова:* бактериофаг, *Yersinia enterocolitica*, биологические свойства.

### Введение

К роду *Yersinia* относятся несколько видов микроорганизмов, одним из которых патогенным для человека является *Yersinia enterocolitica*. Кишечный иерсиниоз — это зооноз, распространенный во всем мире. В странах Европы этот микроорганизм в настоящее время является наиболее часто регистрируемым бактериальным патогеном, вызывающим острый гастроэнтерит [26].

До сих пор отсутствует общепринятая клиническая классификация иерсиниозов из-за многообразия форм и вариантов данной бактериальной инфекции в большинстве стран мира. В связи с отсутствием унифицированного и постоянного микробиологического мониторинга истинный уровень заболеваемости иерсиниозами, их структура и динамика полностью не известны [3, 6].

Разнообразие проявлений иерсиниоза обуславливает важность лабораторного подтверждения диагноза. Своевременная лабораторная диагностика заболевания

служит залогом полного выздоровления, а также предупреждения рецидивов и хронизации заболевания [7, 15, 27].

В связи с вариабельностью признаков и большим фенотипическим сходством представителей рода *Yersinia* для надежной и эффективной диагностики необходимо использовать традиционные методы в сочетании с современными молекулярными (MALDI-TOF-MS и ПЦР). [20]. В настоящее время ПЦР-анализ уже прочно вошел в практику и применяется как при обследовании биотических, так и абиотических объектов внешней среды. Однако главным недостатком данного метода представляется одновременная амплификация ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма [13].

Для патогенных представителей рода *Yersinia* свойственно явление бактериофагии, которое применяется на практике при постановке метода фагодиагностики. Высокая специфичность этого явления, простота постановки пробы, быстрота и четкость результатов определили широкое использование данного метода для идентификации и дифференциации микроорганизмов [8–10, 12, 19].

Сейчас в мире нет стандартного набора иерсиниозных фагов и схемы для типирования. В 1990-е годы в некоторых европейских странах пользовались схемами фаготипирования, предложенными Никодем с соавторами в 1967 году, Нилен с соавторами в 1969 году. Однако по этим схемам не всегда удавалось типировать штаммы

© 2022 г. Аноприенко А.О., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Тюрина А.В., Мелоян М.Г.

\* Автор для переписки:

Аноприенко Анна Олеговна

мл.н.с. лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону  
ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский  
противочумный институт» Роспотребнадзора,

E-mail: nyra.anoprienko.1985@gmail.com

*Yersinia enterocolitica*, выделенные в других странах. Ученными США, Канады, Японии были предложены свои наборы фагов, выделенные авторами в тех странах, для которых они предлагают использование фаготипирования. Впервые в нашей стране фаготипирование штаммов вида *Yersinia enterocolitica* было проведено в Грузии в 1989 г. и в Средней Азии за период с 1974 по 1988 годы. С помощью предложенной схемы был установлен фаготип у 88,87% исследованных штаммов. Разработанный метод ускоренной идентификации и дифференциации видов *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* с помощью вирулентных иерсиниозных бактериофагов был положительно оценен при апробации в НИПЧИ Кавказа и Закавказья в г. Ставрополе, НИПЧИ г. Ростова-на-Дону, НИПЧИ Средней Азии и Казахстана в г. Алма-Ата, где были исследованы штаммы разных видов иерсиний. Были также разработаны методы фагоидентификации и дифференциации видов *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* (*Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*), выделенные в СССР и за рубежом [11].

По данным литературы, при исследовании культуры *Yersinia enterocolitica* на наличие фагов Коритняк Б.М. было выделено 3 бактериофага, которые имели спектр литической активности 14,3–78,6%, а специфичность данных фагов в отношении других родов микроорганизмов составляла 100% [4]. Также проводились исследования и во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Согласно данным литературы, Кудрякова Т.А. с соавт. обнаружили и идентифицировали 9 бактериофагов *Yersinia enterocolitica*, которые не лизировали представителей других видов семейства *Enterobacteriaceae*, кроме двух фагов, проявляющих активность в отношении некоторых штаммов *Shigella*, *Salmonella* и *E. coli*. Спектр литической активности данных фагов составлял 0,8–83,1% [14].

Изученные фаги в разные годы характеризовались индивидуальными особенностями в диапазоне литической активности и специфичности.

В настоящее время наряду с фагодиагностикой возродился интерес и к фагопрофилактике. Он сосредоточен на использовании фагов в качестве специфических антибактериальных агентов. Это произошло, прежде всего, из-за возникновения и распространения множественно устойчивых к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней и отсутствия новых антибиотиков, а фаготерапия рассматривается как возможное решение. Также в последние годы бактериофаги применяют не только для индикации и идентификации гомологичных

микроорганизмов, но и в целях деkontаминации пищевых продуктов и профилактики пищевых токсикоинфекций бактериальной этиологии [5].

В связи с вышеизложенным поиск новых бактериофагов актуален. Необходимы весьма масштабные и целенаправленные исследования, ориентированные на поиск новых перспективных фагов для диагностики заболеваний, вызываемых иерсиниями, а также их полная биологическая и генетическая характеристика.

Цель исследования — выделение и изучение биологических свойств нового иерсиниозного бактериофага.

## Материалы и методы

В эксперимент были взяты 47 штаммов *Y. enterocolitica*, которые были выделены в разные годы. Данные штаммы были получены из музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Первоначально индикаторами служили каждый из исследованных штаммов возбудителя кишечного иерсиниоза. Штаммы и свежесодержимый бактериофаг выращивали на 1,5 и 0,7% агаре и бульоне Хоттингера (рН 7,2). В лабораторных исследованиях применяли специфические сыворотки, которые были получены в результате внутривенной иммунизации кроликов возрастающими дозами свежесодержимых бактериофагов *Y. enterocolitica* по методу Марьиной Ю.Н. [18].

Обнаружение и выделение фагов из исследуемых культур проводили общепринятыми методами [1, 17, 25].

Для обнаружения бактериофага применяли метод выделения фагов из лизогенных культур. Для этого 1 стандартную петлю суточной агаровой культуры лизогенного штамма засеивали в 4,5 мл бульон Хоттингера и выращивали при 28 °С 24 часа. Затем добавляли 0,5 мл хлороформа, хорошо перемешивали, а затем осаждали центрифугированием при 3000 об/мин 20 минут. Надосадочную жидкость испытывали на наличие бактериофага методом агаровых слоев по Грациа или нанесением фаголизата на газон индикаторной культуры «дорожкой».

Кроме инактивирования хлороформом, надосадочные жидкости лизогенных суточных бульонных культур исследовали на присутствие фагов после прогревания при 56 °С 40 мин. Для освобождения от бактерий фаголизаты центрифугировали при 3000 об/мин 20 мин. Затем высевали по описанной выше методике (Адамс М., 1961) [1].

Строение корпускул бактериофага изучали в электронном микроскопе Jeol JEM 1011. Препараты

готовили из фагофильтрата, полученного в результате выращивания бактериофага методом агаровых слоев. На поверхность электронно-микроскопической сеточки, покрытой формваровой пленкой, наносили суспензию фага. Далее полученный препарат переносили на пленку и проводили негативное контрастирование 2%-ным раствором уранилацетата 1 минуту. Приготовленные препараты фагов изучали в электронном микроскопе с увеличением в 200000 раз.

Диапазон литической активности определяли путем постановки прямой пробы с фагами. Терморезистентность фагов устанавливали методом Friedman и Cowles [24]. Устойчивость бактериофагов к действию концентрированных растворов мочевины изучали по измененной методике Burnet [23].

Статистическую обработку результатов осуществляли общепринятыми методами [2, 16].

### Результаты и обсуждение

На наличие бактериофагов изучались 47 штаммов *Y. enterocolitica*, из которых была выявлена лизогенная культура *Y. enterocolitica* 2021 О1-серовара. В ходе эксперимента мы установили, что хорошими индикаторными свойствами обладал штамм *Y. enterocolitica* 2012, на котором бактериофаг *Y. enterocolitica* 2021 образовывал зоны фаголизиса (рис. 1).



Рис. 1. Бактериофаг *Y. enterocolitica* 2021

На чашках Петри бактериофаг формировал точечные мутные и полупрозрачные колонии, диаметром около 1 мм.

По данным электронно-микроскопического исследования (рис. 2), бактериофаг *Y. enterocolitica* 2021 имел полигональную головку размером 59 нм и длинный

сокращающийся хвост, размером 100 нм., относился к V морфогруппе (Тихоненко А.С., 1968), к семейству A, Myoviridae (Ackerman H.B., 1987) [21, 22].

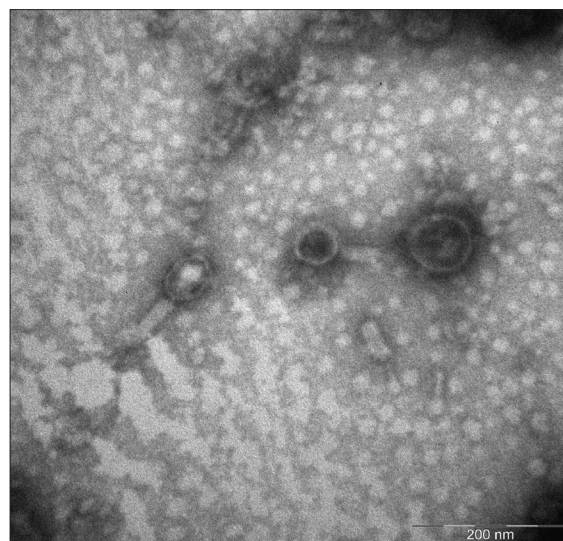


Рис. 2. Морфология бактериофага *Y. enterocolitica* 2021 (вид в электронном микроскопе Jeol JEM 1011, увеличение  $\times 200000$ )

Одним из основных показателей биологической характеристики бактериофагов является их антигенная структура. В работе при постановке прямых и перекрестных реакций нейтрализации бактериофагов применялись экспериментальные кроличьи сыворотки I, II и III серотипов. Было определено рабочее разведение всех антифаговых сывороток — 1:100 для каждой. Проведенные нами исследования позволили определить, что изучаемый фаг *Y. enterocolitica* 2021 относился ко II серотипу.

Специфичность фага оценивали на 44 штаммах различных представителей семейства *Enterobacteriaceae*, включающих в себя 7 видов (*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *S. typhi*, *S. paratyphi*, *Sh. dysenteriae*, *E. coli*). Результаты исследований представлены в таблицах 1, 2.

Изучение литического действия кишечной палочки фага выявило его специфичность в отношении гомологичного вида, так как он не лизировал представителей других видов семейства *Enterobacteriaceae*.

Следующим этапом наших исследований было изучение диапазона литической активности бактериофага. Для этой цели было исследовано 87 штаммов *Y. enterocolitica* О1-О10 и других сероваров. Фаг *Y. enterocolitica* 2021 лизировал 84% из 25 штаммов наиболее распространенного О3 серовара, а также 80% из 5 штаммов О1 серовара и по 1 штамму О9, О10, О12, О17 — сероваров (табл. 3).



Таблица 1

**Результаты изучения специфичности бактериофага *Y. enterocolitica* 2021 (1)**

Бактериофаг <i>Y. enterocolitica</i> 2021	Виды микроорганизмов					
	<i>Y. pestis</i>		<i>Y. pseudotuberculosis</i>		<i>Y. enterocolitica</i>	
	Кол-во изуч. штам.	Кол-во лизир. штам. в %	Кол-во изуч. штам.	Кол-во лизир. штам. в %	Кол-во изуч. штам.	Кол-во лизир. штам. в %
2021	3	0	8	0	15	33,3

Таблица 2

**Результаты изучения специфичности бактериофага *Y. enterocolitica* 2021 (2)**

Бактериофаг <i>Y. enterocolitica</i> 2021	Виды микроорганизмов							
	<i>S. typhi</i>		<i>S. paratyphi</i>		<i>Sh. dysenteriae</i>		<i>E. coli</i>	
	Кол-во изуч. штам.	Кол-во ли- зир. штам. в %	Кол-во изуч. штам.	Кол-во ли- зир. штам. в %	Кол-во изуч. штам.	Кол-во ли- зир. штам. в %	Кол-во изуч. штам.	Кол-во ли- зир. штам. в %
2021	3	0	5	0	3	0	7	0

Таблица 3

**Лизабельность штаммов *Y. enterocolitica* разных сероваров кишечной синиозным бактериофагом**

Серовары изученных штаммов <i>Y. enterocolitica</i>	Количество изученных штаммов	Лизировано бактериофагом <i>Y. enterocolitica</i> 2021, в %
I с/в	5	80,0
III с/в	25	84,0
V с/в	6	0
VI с/в	4	0
VII с/в	3	0
VIII с/в	7	0
IX с/в	10	10,0
X с/в	8	12,5
XII с/в	4	25,0
XXXVI с/в	6	0
Др. с/в	7	14,3

Данный биологический признак может быть использован на практике при идентификации и дифференциации *Y. enterocolitica* O:1 и главным образом O:3 серотипов.

Степень устойчивости бактериофага к действию физических и химических факторов может служить вспомогательным тестом фенотипической характеристики фагов. Испытано влияние различных температур (56°,

60°, 65°, 70°) на бактериофаг *Y. enterocolitica* 2021, разных концентраций мочевины (15 и 30%) и хлороформа (табл. 4).

Прогревание при 56° не изменяло титр свежесделанного фага. При температуре 60° в течение 30 минут наблюдалось резкое уменьшению числа корпускул, при 65° и 70° фаг погибал.

Таблица 4

**Влияние химических и физических факторов на кишечной синиозные бактериофаги**

Фаги	Мочевина		Хлороформ	Температура			
	15%	30%		56°	60°	65°	70°
	Количество корпускул, в %			БОЕ/мл			
<i>Y. enterocolitica</i> 2021	36,4±2,06	0,16±0,02	100	1,0·10 <sup>9</sup>	3,2·10 <sup>3</sup>	-	-

## Заключение

Таким образом, в ходе работы мы провели изучение биологических свойств бактериофага *Y. enterocolitica* 2021: морфологию негативных колоний, строение фаговых частиц, антигенной структуры, специфичность и диапазон литической активности в отношении гомологичных штаммов, чувствительность к физическим и химическим факторам. Выявили, что изученный фаг обладает специфичностью. Видовая специфичность фагов может быть использована на практике для дифференциации бактерий рода *Yersinia*. Для полной характеристики бактериофага *Y. enterocolitica* 2021 необходимо изучение его генетических свойств, на что и будут направлены наши дальнейшие исследования.

## Литература

1. Адамс М. Бактериофаги. — М., 1961. — 522 с.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. — Л.: Медгиз, 1962.
3. Бардаков Р.А. Молекулярно-генетический мониторинг *Yersinia enterocolitica* и *Yersinia pseudotuberculosis* // Известия Российской военно-медицинской академии. — 2019. — Т. 1. — № 51. — С. 39–43.
4. Васильев Д.А., Золотухин С.Н. Бактериофаги микроорганизмов, значимых для животных, растений и человека. — Ульяновск, 2013. — 311 с.
5. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В. Биологические свойства и применение бактериофагов патогенных вибрионов / Регион. проблемы окруж. среды, здоровья населения и сан. эпид. благополучия. — Ростов-на-Дону, 2013. — Вып. 3. — С. 157.
6. Галкина Л.А., Мескина Е.Р. Значение *Yersinia enterocolitica* в развитии болевого абдоминального синдрома у детей, находившихся на лечении в инфекционном стационаре // Лечение и профилактика. — 2018. — Т. 8. — № 4. — С. 23–30.
7. Домашенко О.Н., Черкасова Т.И., Колесникова Т.И., Небесная Л.В. Современные методы диагностики иерсиниоза // Архив клинической и экспериментальной медицины. — 2016. — Т. 25. — № 2. — С. 103–106.
8. Дрожжевкина М.С., Арутюнов Ю.И. Типирование холерных вибрионов новым набором фагов // Журн. гигиены, эпидемиол., микробиол. и иммунол. Прага. — 1979. — Т. 23. — № 3. — С. 306–312.
9. Дрожжевкина М.С., Киселева В.И., Македонова Л.Д., Кирдеев В.К. Полилизогения у вибрионов Эль-Тор // Вопр. вирусологии. — 1982. — № 4. — С. 81–83.
10. Дрожжевкина М.С., Ураева В.С., Александрова И.К. и др. Перспективы фагодиагностики нетипичных штаммов холерных вибрионов // Кишечные инфекции: Республ. сб. Киев. — 1981. — Вып. 13. — С. 71–72.
11. Колесникова А.Н. Использование бактериофагов для диагностики иерсиниозов и внутривидовой дифференциации *Yersinia enterocolitica*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Тбилиси, 1990. — 24 с.
12. Коровкина Г.И., Мороз В.П., Остроумова Н.М. К разработке polyvalentного фагового препарата специфического действия в отношении *vst* вибрионов эльтор / Холера. Вопр. эпидемиол., микробиол. и лаб. диагност.: матер. Рос. науч. конф. — Ростов-на-Дону, 1992. — С. 139–141.
13. Кочеткова А.О., Гаевская Н.Е., Павлович Н.В., Погужова М.П. Туляремийные бактериофаги и перспективы их использования // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15. — № 1. — С. 42–46.
14. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В., Саямов С.Р. Бактериофаги *Yersinia enterocolitica*: обнаружение и идентификация // Клин. лаб. диагностика. — 2010. — № 4. — С. 43–45.
15. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В., Саямов С.Р. Бактериофаги патогенных видов иерсиний / Современ. аспекты эпид. надзора за особо опас. инф. забол. на Юге России: Матер. науч.-практ. конф. — Ставрополь, 2007. — Ч. II. — С. 6–8.
16. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М., 1968. — 284 с.
17. Македонова Л.Д., Кудрякова Т.А., Качкина Г.В., Гаевская Н.Е. Индикаторные штаммы для обнаружения и первичной идентификации бактериофагов патогенных иерсиний / Обмен веществ при адаптации и повреждении: мат-лы IX межвуз. конф. с междунар. участием. — Ростов-на-Дону: ГОУ ВПО РостГМУ. — 2010. — С. 78–80.
18. Марьина Ю.Н. Получение антифаговой сыворотки и изучение антигенной структуры фага // Труды Ростовского противочумного института. — 1941. — Т. 2. — С. 3–7.
19. Остроумова Н.М., Коровкина Г.И., Мороз В.П. и др. Способ ускоренной идентификации микроорганизмов вида *V. cholerae* и дифференциация их от микроорганизмов близкородственных видов и семейств с помощью специфического фага ДДФ // Вопр. природноочаговых инф. — Саратов, 1983. — С. 51–56.
20. Рыковская О.А. Молекулярно-биологическая характеристика и совершенствование идентификации и дифференциации *Vibrio parahaemolyticus* и *Vibrio alginolyticus*: дис. ... канд. биол. — Ростов-на-Дону, 2016. — 145 с.
21. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. — М., 1968. — 89 с.
22. Ackerman H.B. Bacteriophage taxonomy in 1987 // Microbiol Sci. — 1987. — Vol. 4. — No. 7. — P. 214–218.
23. Burnet F. The classification of dysentery coli bacteriophage: II The serological classification of coli dysentery phage // J. Path. Bacteriol. — 1933. — Vol. 36. — P. 307.
24. Friedman M., Cowles P.B. The bacteriophage of *Bacillus megaterium*: I Serological physical and biological properties // J. Bacteriol. — 1953. — Vol. 66. — P. 379.

25. Leon-Velarde C.G., Jun J.W., Skurnik M. *Yersinia* phages and food safety // *Viruses*. — 2019. — Vol. 11. — No. 12. — Art. 1105. <https://doi.org/10.3390/v11121105>.
  26. Marimon J.M., et al. Thirty years of human infections caused by *Yersinia enterocolitica* in northern Spain: 1985–2014 // *Epidemiol. Infect.* — 2017. — No. 145. — P. 2197–2203.
  27. Triantafyllidis J.K., Thomaidis T., Papalois A. Terminal ileitis due to *Yersinia* infection: An underdiagnosed situation // *Biomed Res Int.* — 2020. — No. 4. — P. 1–10. doi: 10.1155/2020/1240626.
- References**
1. Adams M. *Bakteriofagi*. Moscow, 1961: 522 (in Russian).
  2. Ashmarin IP, Vorob'yev AA. *Statisticheskiye metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh*. Leningrad: Medgiz, 1962 (in Russian).
  3. Bardakov RA. Molekulyarno-geneticheskiy monitoring *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis*. *Izvestiya Rossiyskoy voyenno-meditsinskoy akademii* 2019; 1(51):39–43 (in Russian).
  4. Vasil'yev DA, Zolotukhin SN. *Bakteriofagi mikroorganizmov, znachimyykh dlya zhivotnykh, rasteniy i cheloveka*. Ul'yans'k, 2013: 311 (in Russian).
  5. Gayevskaya NYe, Kudryakova TA, Makedonova LD, Kachkina GV. *Biologicheskiye svoystva i primeneniye bakteriofagov patogennykh vibrionov. Region problemy okruzh sredey, zdorov'ya naseleniya i san epid blagopoluchiya*. Rostov-na-Donu, 2013; 3:157 (in Russian).
  6. Galkina LA, Meskina YeR. *Znachenije Yersinia enterocolitica v razvitiy bolevogo abdominal'nogo sindroma u detey, nakhodivshikhsya na lechenii v infektsionnom statsionare. Lecheniye i profilaktika* 2018; 8(4):23–30 (in Russian).
  7. Domashenko ON, Cherkasova TI, Kolesnikova TI, Nebesnaya LV. *Sovremennyye metody diagnostiki iyersinioza*. *Arkhiv klinicheskoy i eksperimental'noy meditsiny* 2016; 25(2):103–106 (in Russian).
  8. Drozhevskina MS, Arutyunov YuI. *Tipirovaniye kholernykh vibrionov novym naborom fagov. Zhurn gigiyeny, epidemiol, mikrobiol i immunol. Praga*. 1979; 23(3):306–312 (in Russian).
  9. Drozhevskina MS, Kiseleva VI, Makedonova LD, Kirdeyev VK. *Polilizogeniya u vibrionov El'-Tor. Vopr. virusologii* 1982(4):81–83 (in Russian).
  10. Drozhevskina MS, Uraleva VS, Aleksandrova IK i dr. *Perspektivy fagodiagnostiki netipichnykh shtammov kholernykh vibrionov. Kishhechnyye infektsii: Respubl sb. Kiyev*, 1981; 13:71–72 (in Russian).
  11. Kolesnikova AN. *Ispol'zovaniye bakteriofagov dlya diagnostiki iyersiniozov i vnutrividovoy differentsiatsii Yersinia enterocolitica: avtoref dis ... kand biol nauk. Tbilisi*, 1990: 24 (in Russian).
  12. Korovkina GI, Moroz VP, Ostroumova NM. *K razrabotke polivalentnogo fagovogo preparata spetsificheskogo deystviya v odnoshenii vct vibrionov el'tor. Kholera. Vopr epidemiol, mikrobiol i lab diagnost: mater Ros nauch konf. Rostov-na-Donu*, 1992: 139–141 (in Russian).
  13. Kochetkova AO, Gayevskaya NYe, Pavlovich NV, Pogozhova MP. *Tulyaremiynyye bakteriofagi i perspektivy ikh ispol'zovaniya. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova* 2019; 15(1):42–46 (in Russian).
  14. Kudryakova TA, Makedonova LD, Kachkina GV, Sayamov SR. *Bakteriofagi Yersinia enterocolitica: obnaruzheniye i identifikatsiya. Klin lab diagnostika* 2010(4):43–45 (in Russian).
  15. Kudryakova TA, Makedonova LD, Kachkina GV, Sayamov SR. *Bakteriofagi patogennykh vidov iyersiniy. Sovrem aspekty epid nadzora za osobo opas inf zabol na Yuge Rossii: Mater. nauch.-prakt. konf. Stavropol'*, 2007. Ch. II: 6–8 (in Russian).
  16. Lakin GF. *Biometriya*. Moscow, 1968: 284 (in Russian).
  17. Makedonova LD, Kudryakova TA, Kachkina GV, Gayevskaya NYe. *Indikatornyye shtammy dlya obnaruzheniya i pervichnoy identifikatsii bakteriofagov patogennykh iyersiniy. Obmen veshchestv pri adaptatsii i povrezhdenii: mat-ly IX mezhvuz konf s mezhdunar uchastiyem. Rostov-na-Donu: GOU VPO RostGMU*, 2010: 78–80 (in Russian).
  18. Mar'ina YuN. *Polucheniye antifagovoy syvorotki i izucheniye antigennoy struktury faga. Trudy Rostovskogo protivochumnogo instituta* 1941; 2:3–7 (in Russian).
  19. Ostroumova NM, Korovkina GI, Moroz VP i dr. *Sposob uskorennoy identifikatsii mikroorganizmov vida V. cholerae i differentsiatsiya ikh ot mikroorganizmov blizkorodstvennykh vidov i semeystv s pomoshch'yu spetsificheskogo faga DDF. Vopr prirodnoochagovykh inf, Saratov*. 1983: 51–56 (in Russian).
  20. Rykovskaya OA. *Molekulyarno-biologicheskaya kharakteristika i sovershenstvovaniye identifikatsii i differentsiatsii Vibrio parahaemolyticus i Vibrio alginolyticus: dis ... kand biol. Rostov-na-Donu*, 2016: 145 (in Russian).
  21. Tikhonenko AS. *Ul'trastruktura virusov bakteriy*. Moscow, 1968: 89 (in Russian).
  22. Ackerman HB. *Bacteriophage taxonomy in 1987. Microbiol Sci* 1987; 4(7):214–218.
  23. Burnet F. *The classification of dysentery coli bacteriophage: II The serological classification of coli dysentery phage. J Path Bacteriol* 1933; 36:307.
  24. Friedman M, Cowles PB. *The bacteriophage of Bacillus megaterium: I Serological physical and biological properties. J Bacteriol* 1953; 66:379.
  25. Leon-Velarde CG, Jun JW, Skurnik M. *Yersinia* phages and food safety. *Viruses* 2019; 11(12):1105. <https://doi.org/10.3390/v11121105>.
  26. Marimon JM, et al. Thirty years of human infections caused by *Yersinia enterocolitica* in northern Spain: 1985–2014. *Epidemiol Infect* 2017(145):2197–2203.
  27. Triantafyllidis JK, Thomaidis T, Papalois A. Terminal ileitis due to *Yersinia* infection: An underdiagnosed situation. *Biomed Res Int* 2020(4):1–10. doi: 10.1155/2020/1240626.

## ISOLATION AND STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF BACTERIOPHAGE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* 2021

A.O. ANOPRIENKO, N.E. GAEVSKAYA, M.P. POGOZHOVA, A.V. TYURINA, M.G. MELOYAN

*Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don*

Several types of microorganisms belong to the genus *Yersinia*, one of which is pathogenic for humans is *Yersinia enterocolitica*. Intestinal yersiniosis is a worldwide zoonotic disease. In European countries, this microorganism is currently the most frequently recorded bacterial pathogen causing acute gastroenteritis. Due to the variability of characters and the large phenotypic similarity of representatives of the genus *Yersinia*, for reliable and effective diagnosis, it is necessary to use traditional methods in combination with modern molecular methods (MALDI-TOF-MS and PCR). For pathogenic representatives of the genus *Yersinia*, the phenomenon of bacteriophage is characteristic, which is used in practice and in the formulation of the method of phagodiagnosics. The high specificity of this phenomenon, the simplicity of sample preparation, the speed and clarity of the results determined the widespread use of this method for the identification and differentiation of microorganisms. In connection with the above, a very large-scale and targeted research is needed, focused on the search for new promising phages for the diagnosis of diseases caused by *Yersinia*, as well as their complete biological and genetic characteristics.

*Keywords:* bacteriophage, *Yersinia enterocolitica*, biological properties.

### **Address:**

Анопrienko А.О.

junior researcher of the laboratory of bacteriophages

of the Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor,

E-mail: nyra.anoprienko.1985@gmail.com

### **Для цитирования:**

Анопrienko А.О., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Тюрина А.В., Мелоян М.Г. Выделение и изучение биологических свойств бактериофага *Yersinia enterocolitica* 2021. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(1):6–12.

### **For citation:**

Anoprienko A.O., Gaevskaya N.E., Pogozhova M.P., Tyurina A.V., Meloyan M.G. Isolation and study of biological properties of bacteriophage *Yersinia enterocolitica* 2021. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(1):6–12 (in Russian).

# ИНДУКЦИЯ СЕКРЕЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ У РАПАНЫ *RAPANA VENOSA* (VALENCIENNES, 1846) (*GASTROPODA, MURICIDAE*)

А.В. ПИРКОВА, Л.В. ЛАДЫГИНА\*

ФГБУН ФИЦ Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН, Севастополь

Хищный брюхоногий моллюск *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846), вселенец в Чёрное море, питается двустворчатыми моллюсками. При нападении на жертву взрослые особи рапаны выделяют биотоксин сложного химического состава. В статье описана биотехнология многократной индукции секреции у рапаны биологически активных соединений (БАС) — потенциального сырья для производства медицинских препаратов. Состав стимулирующего раствора, состоящий из сульфата магния и серотонина, основан на сведениях о синергическом эффекте воздействия этих веществ на физиологические функции беспозвоночных, связанном с питанием. Установлены зависимости среднего объема выделенного БАС от высоты раковины и общего веса моллюсков.

**Ключевые слова:** рапана *Rapana venosa*; индукция; секреция; биологически активные соединения; биотехнология; Чёрное море.

## Введение

Рапана *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) — хищный брюхоногий моллюск, вселенец в Чёрное море из Японского [6]. Впервые обнаружен в Новороссийской бухте в 1947 г. [1]. *R. venosa* питается двустворчатыми моллюсками, но основным пищевым объектом являются мидии *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) [6]. Взрослые особи при нападении парализуют жертву, выделяя биотоксин сложного химического состава [11]. Биотоксин вырабатывается в гипобранхиальной железе, которая разделяется на три отдела: два боковых, выделяющих слизь, и средний, окрашенный в молочно-белый цвет, секретирующий краситель пурпур [5, 22]. Гистологические исследования брюхоногих моллюсков показали, что гипобранхиальная железа — сложный орган, содержащий ряд секреторных клеток [9].

У всех моллюсков, принадлежащих к надсемейству *Muricoidea*, очень высокий уровень содержания сложных эфиров, строго локализованных в средней области гипобранхиальной железы, секретирующей краситель [7]. Сложные эфиры холина представлены

мурексином, дигидромурексином и сенсиоилхолином. Так, у *Rapana bezaor* (Linnaeus, 1767), близкого к *R. venosa* вида, содержание мурексина и сенсиоилхолина в свежих мягких тканях составило соответственно 400 и 100 мг·г<sup>-1</sup> [23]. Установлено, что все соединения обладали сильным нервно-мышечным блокирующим действием, вызывая паралич замыкательных мышц двустворчатых моллюсков, а также паралич мускулатуры позвоночных животных [10]. В малых дозах при кратковременном воздействии биотоксин рапаны разрушает нити ахроматинного веретена деления в анафазе митоза эмбрионов мидии и вызывает хромосомные aberrации, в том числе фрагментацию хромосом [3].

Известно, что фиолетовый тириан образуется из секрета гипобранхиальных желез брюхоногих моллюсков из соли-предшественника холинового эфира тириноксилсульфата после серии ферментативных, окислительных и фотохимических реакций [8]. Эти биоактивные вторичные метаболиты относятся к химическому классу индоловых алкалоидов, которые являются натуральными продуктами для производства лекарств [15]. Установлено, что производные индирубина эффективно ингибируют пролиферацию раковых клеток [16–19], а также вызывают апоптоз в клетках рака молочной железы и простаты человека [11, 17, 20]. Широко признано, что гибель клеток после повреждения ДНК противоопухолевыми агентами является, главным образом, результатом апоптоза [11].

© 2022 г. Пиркова А.В., Ладыгина Л.В.

\* **Автор для переписки:**

Ладыгина Людмила Владимировна

к.б.н, ст.н.с. ФГБУН ФИЦ Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН

E-mail: [lvladygina@yandex.ru](mailto:lvladygina@yandex.ru)

Для получения биологически активных веществ, содержащихся в гипобранхиальной железе брюхоногих моллюсков *Nucella lapillus* (Linnaeus, 1758), *Murex brandaris* (Linnaeus, 1758), *M. trunculus* (Linnaeus, 1758), *Purpura lapillus* (Linnaeus, 1758), *P. patula* (Linnaeus, 1758), *Dicathais orbita* (Gmelin, 1791) ее иссекают и экстракцией этанола выделяют тириноксилсульфат [13]. При этом высвобождается фермент (пурпураза), который удаляет сульфатную группу с образованием тириноксила. У брюхоногого моллюска *D. orbita* — эндемика прибрежных вод южной части Австралии и Новой Зеландии, была проведена прижизненная одноразовая стимуляция выделения биологически активных соединений методом погружения моллюсков в растворы этанола или бензокаина [21]. Выделение биотоксина происходило в результате стрессовой реакции

моллюска *D. orbita* на воздействие стимуляторов. Под воздействием стимуляторов нарушался контроль нервной системы за расслаблением мышцы ноги.

Цель работы — разработка биотехнологии прижизненной многократной индукции секреции биологически активных соединений как потенциального сырья для производства медицинских препаратов у хищного брюхоногого моллюска рапаны *R. venosa*.

## Материалы и методы

Материалом для исследований послужили рапаны *R. venosa* в количестве 20 экз. с высотой раковины от 46,36 до 81,31 мм (среднее значение:  $63,18 \pm 4,14$  мм); общим весом от 14,86 до 114,10 г (среднее значение:  $41,76 \pm 9,31$  г) и возрастом от 2+ до 4+ лет (табл. 1).

Таблица 1

Масс-размерные характеристики рапаны *Rapana venosa*

№	Высота раковины, Н, мм	Общий вес, W, г	Возраст, годы +	№	Высота раковины, Н, мм	Общий вес, W, г	Возраст, годы +
1	78,45	63,57	4	11	81,31	114,1	4
2	73,45	48,17	4	12	72,46	64,13	4
3	70,01	40,58	4	13	67,41	33,40	3
4	67,02	54,30	3	14	66,20	36,93	4
5	66,95	36,04	4	15	58,17	40,64	3
6	64,80	48,71	3	16	56,28	31,83	4
7	62,59	31,27	3	17	55,82	28,20	3
8	61,63	36,09	4	18	53,13	32,24	2
9	59,14	32,93	2	19	51,50	26,43	2
10	46,36	14,86	2	20	50,32	20,71	2

Моллюски были собраны в ноябре 2019 г. на глубине от 9 до 15 м под мидийно-устричной фермой (внешний рейд Севастопольской бухты:  $44^{\circ}37'13.4''$  N;  $33^{\circ}30'13.6''$  E). В дальнейшем их содержали в пластмассовом садке, сверху обшитом делью для предотвращения их выплзания (рис. 1А), подвешенном в море на глубине 2,5 м.

Температура воды в море за период исследования изменялась в пределах от 17,2 до 8,2 °С; солёность воды составила 18‰. В качестве корма для рапан послужили живые мидии размерами от 60,0 до 79,0 мм, выращенные на ферме ООО НИО «Марикультура». Рацион ( $\text{г} \cdot \text{сут}^{-1} \cdot \text{экз.}^{-1}$ ) рапан определяли как количество потребленной пищи ( $W_{\text{м.тк.}}$ , г) за сутки одним экземпляром моллюска [6]:

$$\rho = \frac{W_{\text{м.тк.}}}{\text{сут.} \cdot \text{экз.}}$$

Массу мягких тканей мидий ( $W_{\text{м.тк.}}$ , г) рассчитывали по формуле [2]:

$$W_{\text{м.тк.}} = 0,00003 \times L^{2,8651}; R^2 = 0,9893; \\ 18,9 \leq L, \text{ мм} \leq 81,9; n = 62 \text{ экз.}$$

Перед началом стимуляции индукции БАС определяли общий вес моллюсков (весы OHAUS, с точностью до 0,01 г); высоту раковины рапан (Н, мм — расстояние от вершины до сифонального канала) и длину раковины мидий измеряли цифровым штангенциркулем ШЦ-1 «Зубр» (с точностью до 0,01 мм). Возраст моллюсков определяли по годовым нерестовым меткам на

раковине. По данным В.Д. Чухчина, первая нерестовая метка у рапаны появляется в 2-летнем возрасте [6].

В течение периода исследования (с 28.10.2019 г. по 10.03.2020 г.) с интервалом в 2–3 недели в лабораторных условиях были проведены 10 стимуляций выделения БАС у рапан. Для стимуляции использовали комбинированный раствор, состоящий из 25%-ного раствора сульфата магния ( $MgSO_4$ ) и 0,04%-ного раствора серотонина ( $C_{14}H_{19}N_5O_2 \cdot H_2SO_4$ ; 5-Hydroxytryptamine, (Serotonin), Creatinine Sulfate Complex), в соотношении 1:1. Раствор готовили непосредственно перед проведением стимуляции следующим способом: 4 мг серотонина растворяли в 10 мл дистиллированной воды и добавляли

10 мл 25%-ного сульфата магния. Комбинированный раствор при помощи шприца вводили в сифон или мышцу ноги [4]. Экспериментально был определен оптимальный объем вводимого стимулирующего раствора в зависимости от размера моллюсков. Для рапан с высотой раковины: от 46,3 до 59,3 мм он составил 0,5 мл; от 60,0 до 77,0 мм — 1 мл; с высотой раковины 114,1 мм — 1,5 мл. Затем моллюсков раскладывали устьем вверх на поддон (рис. 1В).

После появления в устье раковины мутно-желтой жидкости рапаны устанавливали на бюксы или мерные стаканы вниз сифональным выростом для сбора БАС (рис. 2).

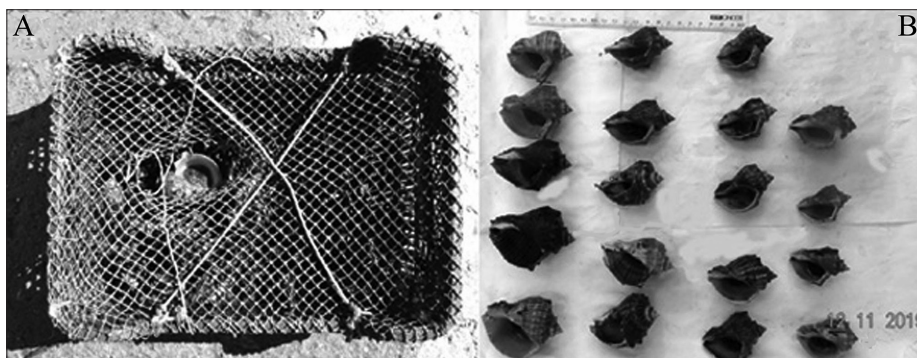


Рис. 1. А — садок с рапанами *Rapana venosa*. В — рапаны в лаборатории перед стимуляцией выделения биологически активных соединений.

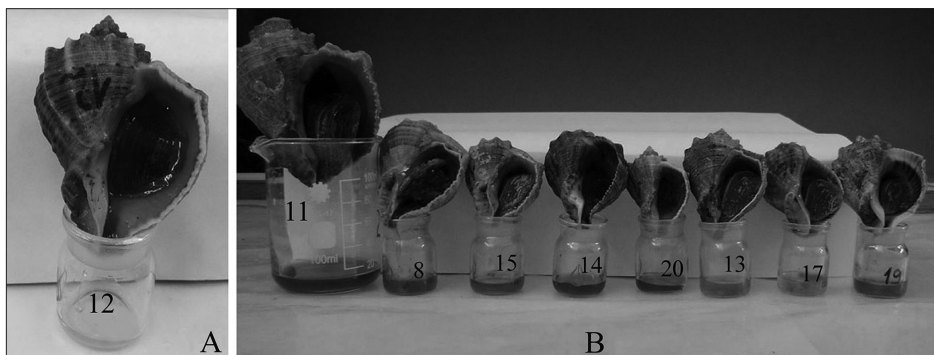


Рис. 2. Выделение биологически активных соединений рапанами *Rapana venosa* после стимуляции: А — свежесекретированный секрет гипобранхиальной железы желтого цвета. В — секрет гипобранхиальной железы после окислительных и фотохимических реакций — розового и пурпурного цвета

Зависимости среднего объема выделенного БАС от высоты раковины и общего веса моллюсков определяли по программе «Диаграмма» (Windows, 2003). Средние значения линейных параметров и доверительные интервалы ( $\pm i$ ) подсчитывали по программе Excel.

### Результаты и обсуждение

После введения стимулирующего раствора в мышцу ноги рапаны выделение биологически активных

соединений (БАС) начиналось через 2–3 мин; при введении его в хобот начало выделения биотоксина у разных особей было отмечено в интервале от 3 до 11 мин. в виде мутно-желтой жидкости, заполняющей устье раковины моллюска. Объем БАС зависел от размера и общего веса рапаны: максимальный объем — 8,5 мл был выделен рапаной с высотой раковины 114,1 мм и общим весом 81,31 г; а минимальный (0,4 мл) — с высотой раковины 50,32 мм и общим весом 20,71 г (табл. 2).

Таблица 2

Выделение биологически активных соединений рапанами *Rapana venosa* после стимуляции

Объем биологически активных соединений, мл												
№	2019 г.					2020 г.					$\Sigma V$ мл·экз. <sup>-1</sup>	$V_{ср.}$ , мл·экз. <sup>-1</sup>
	28.10	05.11	12.11	26.11	10.12	23.12	14.01	28.01	18.02	10.03		
1	0	6,3	3,8	0	0	0	5,5	0	0	0	15,6	5,20
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	2,4	0	0	0	0	0	0	2,40	2,40
4	0	1,6	1,4	1,9	0	1,8	0	0	0	0	6,70	1,68
5	1,7	0	0	0	0	1,5	0	0	1,2	2,0	5,40	1,35
6	0	2,0	0	0	1,7	0	0	0	0	0	3,70	1,85
7	0	0	1,2	0	1,4	1,9	1,8	1,9	1,4	1,2	10,8	1,54
8	1,6	2,5	1,2	1,0	1,3	0	1,8	2,5	0,8	1,3	14,0	1,56
9	0	1,7	1,4	0	0,9	0,9	0	0	0	0,8	5,70	1,14
10	0	0	0	0	0,7	0	0	0	1,8	0	2,50	1,25
11	-	-	-	-	6,0	0	8,5	0	0	1,7	16,2	5,40
12	2,1	2,0	1,7	0	0	0	0	0	0	1,5	7,30	1,83
13	2,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,50	2,50
14	1,5	2,4	1,3	0	0	1,3	1,8	1,8	0	0	10,1	1,68
15	-	1,6	1,2	1,3	1,5	0	0,8	1,7	0	0	8,10	1,35
16	0	1,0	1,5	1,6	1,5	1,1	0	2,0	0	0	8,70	1,45
17	0	1,5	1,5	0	1,6	0	0,8	1,5	0	1,5	8,40	1,40
18	0	0	1,2	0	1,3	1,3	0	0	0	0	3,80	1,27
19	0	0	0,7	1,0	0	0,7	0	1,3	0	0	3,70	0,93
20	0	0	1,0	1,1	0	0	0,4	0	0	0	2,50	0,83
T, °C	17,2	17,0	16,0	15,0	11,6	11,9	9,8	9,0	8,2	10,4	138,1	1,83

Примечание: номера моллюсков аналогичны как в таблице 1; 0 – биологически активные соединения не были выделены; - – отсутствие моллюска;  $\Sigma V$ , мл·экз.<sup>-1</sup> – суммарный объем БАС, выделенный одним экземпляром рапаны в течение эксперимента;  $V_{ср.}$ , мл·экз.<sup>-1</sup> – объем БАС, выделенный одним экземпляром рапаны в течение эксперимента, разделенный на количество положительных откликов на стимуляцию

Установлены зависимости среднего объема выделенного БАС от высоты раковины (1) и от общего веса (2) моллюсков:

$$V = 0,0983 \cdot e^{0,0454 \cdot H}; R^2 = 0,7616; \quad (1)$$

$$46,36 \leq H, \text{ мм} \leq 81,31$$

где:  $V$  – средний объем БАС, мл;  $e$  – основание натурального логарифма (2,71828),  $H$  – высота раковины рапаны, мм:

$$V = 0,8028 \cdot e^{0,0179 \cdot W}; R^2 = 0,6398; \quad (2)$$

$$14,86 \leq W, \text{ г} \leq 114,14$$

где:  $W$  – общий вес рапаны, г.

Наблюдается тенденция зависимости доли особей, выделивших БАС, от температуры воды в море: максимальный процент особей был отмечен при температуре воды 16,0 °C, минимальный – при 8,2 °C (рис. 3).

В результате 10 стимуляций 20 экз. рапан получено 138,10 мл БАС. Выживаемость моллюсков за период исследования составила 100%.

Известно, что сигналом для выделения биотоксина является физиологическая потребность рапаны в пище и наличие корма. По данным В.Д. Чухчина (1984), рапаны питаются с перерывами; после нападения на жертву наступает перерыв в несколько дней (в среднем 4 дня). Рацион *R. venosa* увеличивается с увеличением размера и составляет от 15 до 140 мг·г<sup>-1</sup> живой массы хищников разных размеров. Экспериментально установлено, что интенсивность питания рапаны в значительной степени зависит от температуры воды: с повышением температуры от 16,0 до 22,0 °C потребление пищи увеличивается [24]. При температуре воды ниже 10,0 °C рапаны прекращали питаться [6].

В течение эксперимента в осенне-зимний период температура воды в море изменялась от 17,2 до 8,2 °C. Количество мидий, потребленных рапанами, не зависело от температуры воды в пределах указанных значений. Так, при температуре 9,8 °C количество мидий, потребленных за две недели двадцатью рапанами, составило 10 экз., то есть рацион составил 0,22 г·экз<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup>, а при



температуре воды: 16,0, 10,4 и 8,2 °С за аналогичный период наблюдений — 0,02 г·экз<sup>-1</sup>·сут<sup>-1</sup> (см. рис. 3). По разнице между смежными значениями общего веса можно было определить моллюсков, которые недавно питались. Такие особи, как правило, не выделяли БАС после стимуляции. Следовательно, стимуляцию индукции БАС целесообразно проводить у голодных рапан.

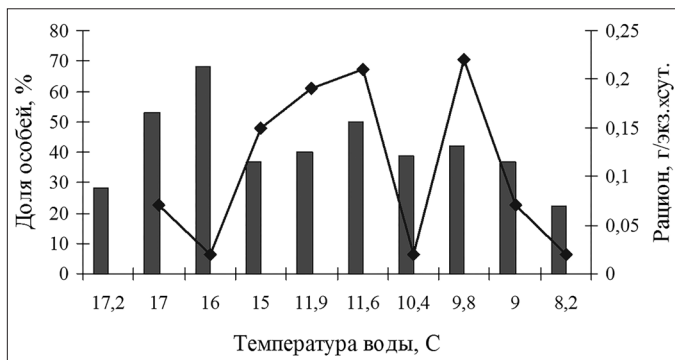


Рис. 3. Доля особей (в %) *Rapana venosa*, выделявших биологически активные соединения, и их рацион при разной температуре воды в море

Известно, что серотонин — это нейромодулятор, контролирующий питание у беспозвоночных животных [14]. Увеличение концентрации серотонина в гемолимфе моллюска после введения его в мышцу ноги или в сифон является сигналом для синтеза БАС. Раствор сульфата магния (магнезия), вызывая расслабление гладкой мускулатуры и расширение сосудов, как указано в инструкции по применению препарата (<https://apteka.103.by/magnija-sulfat-instruktsiya/#3>), способствует беспрепятственному выделению БАС. Таким образом, комбинированный раствор серотонина и сульфата магния является эффективным стимулятором выделения БАС у рапаны, не оказывающий отрицательного влияния на их жизнеспособность.

После введения стимулирующего раствора рапаны выделяют БАС в виде мутно-желтоватого вещества (см. рис. 2А). В зависимости от интенсивности света и продолжительности контакта с воздухом, желтый цвет БАС превращается в розовый или красный, а затем — в пурпурный (см. рис. 2В). Образование пурпура сопровождалось выделением летучего вещества с резким запахом, известного под названием меркаптан [5, 9].

Метод погружения моллюсков в растворы этанола (5%) или бензокаина (200 мг·л<sup>-1</sup>), которые были использованы для одноразовой индукции секреции БАС у брюхоногого моллюска *D. orbita* трех размерных классов (23–33 мм, 33,5–53 мм и >53,5 мм), не исключает возможность долгосрочных сублетальных последствий [21].

## Заключение

Таким образом, впервые разработана биотехнология многократной индукции секреции биологически активных соединений у хищного брюхоногого моллюска рапаны *Rapana venosa* — потенциального сырья для производства медицинских препаратов, позволяющая получать значительное количество БАС. Состав стимулирующего раствора основан на сведениях о синергическом эффекте воздействия серотонина и сульфата магния на физиологические функции беспозвоночных животных, связанном с питанием. Показано, что средний объем выделенного БАС зависит от высоты раковины или от общего веса моллюсков. Целесообразно отбирать моллюсков с высотой раковины от 60,0 мм и общим весом больше 30,0 г. Температура воды в диапазоне от 9,0 до 17,0 °С является оптимальной для содержания рапан с целью многократной индукции секреции БАС.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность директору ООО НИО «Марикультура» В.Д. Шенявскому за предоставленную возможность проведения эксперимента.

*Работа выполнена в рамках государственного задания ФИЦ ИнБЮМ по теме «Исследование механизмов управления продукционными процессами в биотехнологических комплексах с целью разработки научных основ получения биологически активных веществ и технических продуктов морского генезиса» № гос. регистрации 121030300149-0.*

## Литература

1. Драпкин Е.И. Новый моллюск в Чёрном море // Природа. — 1953. — № 9. — С. 92–95.
2. Пиркова А.В., Ладыгина Л.В., Цуров С.В. Формирование поселений мидий *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) на коллекторах фермы в бухте Ласпи в зависимости от экологических факторов // Уч. зап. Крым. фед. ун-та им. В.И. Вернадского. Биология. Химия. — 2019. — Т. 5(71). — № 1. — С. 92–106.
3. Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Мутагенное действие биотоксина рапаны *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (Gastropoda, Muricidae) // Ruthenica: Рус. малакол. журн. — 2020. — Т. 30. — № 1. — С. 45–53.
4. Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Способ индукции секреции биологически активных соединений у рапаны *Rapana venosa* Val. [Текст] // Пат. 2745401 Российская Федерация. МПК А01К 61/51 (2017.01) / Пиркова

- А.В., Ладыгина Л.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт биологии южных морей имени А.О. Ковалевского РАН» (ФИЦ ИнБИОМ). — № 2020124025; заявл. 13.07.2020; опубл. 24.03.2021. Бюл. № 9. — 12 с.
5. Чухчин В.Д. Функциональная морфология рапаны. — Киев: Наукова думка, 1970. — 138 с.
  6. Чухчин В.Д. Экология брюхоногих моллюсков Чёрного моря. — Киев: Наукова думка, 1984. — 176 с.
  7. Andrews E.B. The fine structure and function of the salivary glands of *Nucella lapillus* (Gastropoda: Muricidae) // Journal of Moll. Stud. — 1991. — Vol. 57. — Iss. 1. — P. 111–126.
  8. Benkendorff K., Bremner J.B., Davis A.R. Indole derivatives from the egg masses of muricid mollusks // Molecules. — 2001. — Vol. 6. — P. 70–78.
  9. Benkendorff K. Molluscan biological and chemical diversity: secondary metabolites and medicinal resources produced by marine mollusks // Biol. Rev. — 2010. — Vol. 85. — P. 757–775.
  10. Benkendorff K., Rudd D., Nongmaithem B., Liu L., Young F., Edwards V., Avila C., Abbott C. Are the traditional medical uses of *Muricidae* molluscs substantiated by their pharmacological properties and bioactive compounds? // Marine Drugs. — 2015. — Vol. 13. — Iss. 8. — P. 5237–5275.
  11. Brown J.M., Wouters B.G. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents // Cancer Res. — 1999. — Vol. 59. — Iss. 7. — P. 1391–1399.
  12. Cesari P., Mizzan L. Osservazioni su *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) in cattività (Gastropoda: Muricidae, Thaidinae) // Bollet. del Museo Civico di Storia Natur. di Venezia. — 1993. — Vol. 42. — P. 9–21.
  13. Cooksey C.J. Tyrian Purple: 6,6'-Dibromoindigo and related compounds // Molecules. — 2001. — Vol. 6. — Iss. 9. — P. 736–769.
  14. Dayan P., Huys Q.J.M. Serotonin in affective control // Annual Review Neuroscience. — 2009. — Vol. 32. — P. 95–126.
  15. Grabley S., Sattler I. Natural products for lead identification: Nature is a valuable resource for providing tools // Modern Methods of Drug Discovery. — 2003. — Vol. 93. — P. 87–107.
  16. Devanshi J., Mankodi P.C. Malacology and pharmacology: An integrated approach with special emphasis on Marine Realm / In book: Marine Niche: Applications in pharmaceutical sciences. — Springer, Singapore. — 2020 November. — Ch. 14. — P. 255–264.
  17. Kim S.-A., Kim Y.-C., Kim S.-W., Lee S.-H., Min J.-J., Ahn S.-G., Yoon J.-H. Antitumor activity of novel indirubin derivatives in rat tumor model // Clinical Cancer Res. — 2007. — Vol. 13. — Iss. 1. — P. 253–259.
  18. Leclerc S., Garnier M., Garnier M. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and CDK5/P25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? // J. of Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — Iss. 1. — P. 251–260.
  19. Meijer L., Skaltsounis A.-L. GSK-3-selective inhibitors derived from tyrian purple indirubins // Chem. and Biol. — 2003. — Vol. 10. — Iss. 12. — P. 1255–1266.
  20. Nam S., Buettner R., Buettner R. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells // Proc. of the Nation. Academ. of Scienc. of the USA. — 2005. — Vol. 102. — Iss. 17. — P. 5998–6003.
  21. Noble W.J. Aspects of life history and ecology of *Dicathais orbita* Gmelin, 1781 related to potential aquaculture for bioactive compound recovery // A thesis submitted to the Flinders Univers. in candidature for the degree Doctor. of Philosophy. School of Biolog. Scienc. Flinders Univers. — 2014. — 156 p. <https://flex.flinders.edu.au/file/20844afe-ccb6-4112-bb2a-6d3784d3ed73/1/Thesis-Noble-2014.pdf>.
  22. Ponte G., Modica M.V. Glands in predatory mollusks: Evolutionary considerations // Frontiers in Physiol. — 2017. — Vol. 8. — Art. 580. doi: 10.3389/fphys.2017.00580.
  23. Roseghini M., Severini C., Erspamer G.F., Erspamer V. Choline esters and biogenic amines in the hypobranchial gland of 55 molluscan species of the neogastropod *Muricoidea* superfamily // Toxicon. — 1996. — Vol. 34. — Iss. 1. — P. 33–55.
  24. Yanga M.-J., Songa H., Suna L.-N., Yu Zh.-L., Hu Zh., Wang X.-L., Zhu J.-Y., Zhang T. Effect of temperature on the microflora community composition in the digestive tract of the veined rapa whelk (*Rapana venosa*) revealed by 16S rRNA gene sequencing // Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics. — 2019. — Vol. 29. — P. 145–153.

## References

1. Drapkin YeI. Novyy mollyusk v Chornom more. Priroda 1953; 9:92–95 (in Russian).
2. Pirkova AV, Ladygina LV, Shchurov SV. Formirovaniye poseleniy midiy *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) na kollektorakh fermy v bukhte Laspi v zavisimosti ot ekologicheskikh faktorov. Uch zap Krym fed un-ta im VI Vernadskogo. Biologiya. Khimiya 2019; 5(1):92–106 (in Russian).
3. Pirkova AV, Ladygina LV. Mutagennoye deystviye biotoksina rapany *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (Gastropoda, Muricidae). Ruthenica: Rus. malakol. zhurn 2020; 30(1):45–53 (in Russian).
4. Pirkova AV, Ladygina LV. Sposob induktsii sekretsii biologicheskii aktivnykh soyedineniy u rapany *Rapana venosa* Val. [Text]. Pat 2745401 Rossiyskaya Federatsiya. MPK A01K 61/51 (2017.01). Pirkova AV, Ladygina LV; zayavitel' i patentoobladatel' Federal'noye gosudarstvennoye byudzhethnoye uchrezhdeniye nauki Federal'nyy issledovatel'skiy tsentr «Institut biologii yuzhnykh morey imeni AO Kovalevskogo RAN» (FITS InBYUM). № 2020124025; zayavl 13.07.2020; opubl 24.03.2021. Byul 9: 12 (in Russian).

5. Chukhchin VD. Funktsional'naya morfologiya rapany. Kiyev: Naukova dumka, 1970: 138 (in Russian).
6. Chukhchin VD. Ekologiya bryukhkhonogikh mollyuskov Chor-nogo morya. Kiyev: Naukova dumka, 1984: 176 (in Russian).
7. Andrews E.B. The fine structure and function of the salivary glands of *Nucella lapillus* (*Gastropoda: Muricidae*). Journal of Moll Stud 1991; 57(1):111–126.
8. Benkendorff K, Bremner JB, Davis AR. Indole derivatives from the egg masses of muricid mollusks. Molecules 2001; 6:70–78.
9. Benkendorff K. Molluscan biological and chemical diversity: secondary metabolites and medicinal resources produced by marine mollusks. Biol Rev 2010; 85:757–775.
10. Benkendorff K, Rudd D, Nongmaithem B, Liu L., Young F., Edwards V, Avila C, Abbott C. Are the traditional medical uses of *Muricidae molluscs* substantiated by their pharmacological properties and bioactive compounds? Marine Drugs 2015; 13(8):5237–5275.
11. Brown JM, Wouters BG. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. Cancer Res 1999; 59(7):1391–1399.
12. Cesari P, Mizzan L. Osservazioni su *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) in cattività (*Gastropoda: Muricidae, Thaidinae*). Bollet del Museo Civico di Storia Natur di Venezia 1993; 42:9–21.
13. Cooksey CJ. Tyrian Purple: 6,6'-Dibromoindigo and related compounds. Molecules 2001; 6(9):736–769.
14. Dayan P, Huys QJM. Serotonin in affective control. Annual Review Neuroscience 2009; 32:95–126.
15. Grabley S, Sattler I. Natural products for lead identification: Nature is a valuable resource for providing tools. Modern Methods of Drug Discovery 2003; 93:87–107.
16. Devanshi J, Mankodi PC. Malacology and pharmacology: An integrated approach with special emphasis on Marine Realm. In book: Marine Niche: Applications in pharmaceutical sciences. Springer, Singapore 2020; 14:255–264.
17. Kim S-A, Kim Y-C, Kim S-W, Lee S-H, Min J-J, Ahn S-G, Yoon J-H. Antitumor activity of novel indirubin derivatives in rat tumor model. Clinical Cancer Res 2007;13(1): 253–259.
18. Leclerc S, Garnier M, Garnier M. Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 $\beta$  and CDK5/P25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? J of Biol Chem 2001; 276(1):251–260.
19. Meijer L, Skaltsounis A-L. GSK-3-selective inhibitors derived from tyrian purple indirubins. Chem and Biol 2003; 10(12):1255–1266.
20. Nam S, Buettner R, Buettner R. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. Proc. of the Nation Academ of Scienc of the USA 2005; 102(17):5998–6003.
21. Noble WJ. Aspects of life history and ecology of *Dicathais orbita* Gmelin, 1781 related to potential aquaculture for bioactive compound recovery. A thesis submitted to the Flinders Univers. in candidature for the degree Doctor of Philosophy. School of Biolog Scienc Flinders Univers 2014: 156. <https://flex.flinders.edu.au/file/20844afe-ccb6-4112-bb2a-6d3784d3ed73/1/Thesis-Noble-2014.pdf>.
22. Ponte G, Modica MV. Glands in predatory mollusks: Evolutionary considerations. Frontiers in Physiol 2017; 8:580. doi: 10.3389/fphys.2017.00580.
23. Roseghini M, Severini C, Erspamer GF, Erspamer V. Choline esters and biogenic amines in the hypobranchial gland of 55 molluscan species of the neogastropod *Muricoidea superfamily*. Toxicon 1996; 34(1):33–55.
24. Yanga M-J, Songa H, Suna L-N, Yu Zh-L, Hu Zh, Wang X-L, Zhu J-Y, Zhang T. Effect of temperature on the microflora community composition in the digestive tract of the veined rapa whelk (*Rapana venosa*) revealed by 16S rRNA gene sequencing. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics 2019; 29:145–153.

## INDUCTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUND SECRETION IN VEINED RAPA WHELK *RAPANA VENOSA* (VALENCIENNES, 1846) (*GASTROPODA, MURICIDAE*)

A.V. PIRKOVA, L.V. LADYGINA

*A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas of RAS, Sevastopol*

The predatory gastropod *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846), invader in the Black Sea, feeds on bivalves. When attacking a prey, adult specimens of *R. venosa* secrete a biochemically complex biotoxin. The article describes the biotechnology of multiple induction of secretion of biologically active compounds (BAC) in veined rapa whelk, which are promising raw materials for the production of medicines. The composition of the stimulating solution, which includes magnesium sulfate and serotonin, is based on the information about the nutrition-related synergistic effect of these substances on physiological functions of invertebrates. Correlations of the average volume of secreted BAC with the shell height and the total live weight of the mollusks are obtained.

**Keywords:** veined rapa whelk *Rapana venosa*, induction, secretion, biologically active compounds, biotechnology, Black Sea.

**Address:**

Ladygina L.V., Ph.D.  
Senior researcher A.O. Kovalevsky Institute of Biology  
of the South Seas of RAS, Sevastopol  
E-mail: lvladygina@yandex.ru

**Для цитирования:**

Пиркова А.В., Ладыгина Л.В. Индукция секреции биологически активных соединений у рапаны *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (*Gastropoda, Muricidae*). Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(1):13–20.

**For citation:**

Pirkova A.V., Ladygina L.V. Induction of biologically active compound secretion in veined rapa whelk *Rapana venosa* (Valenciennes, 1846) (*Gastropoda, Muricidae*). Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(1):13–20 (in Russian).

## АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МОНИТОРИНГА ХОЛЕРЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В ПЕРИОД 1990–2020 ГГ. И ПРОВЕДЕННОГО ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 И 139 СЕРОГРУПП

А.М. ГОРОХ, А.А. ГЕРАСИМЕНКО, Д.А. ЛЕВЧЕНКО\*, В.Д. КРУГЛИКОВ, А.К. НОСКОВ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», Ростов-на-Дону

Ретроспективный анализ результатов мониторинговых исследований на холеру показал, что наибольшее количество штаммов холерных вибрионов за 30-летний период было изолировано на территориях Республики Калмыкия, Краснодарского края, Ростовской области и Забайкальского края. Установлена принадлежность изучаемых нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor и O139 к 109 генотипам. Выявлены генотипы (A50 и A54), наиболее широко распространенные в водоемах административных территорий России. Проведен сравнительный анализ ПЦР-генотипов клинических нетоксигенных холерных вибрионов со штаммами, обнаруженными в этот же период в водных экосистемах. Выявлено совпадение их генотипов. Среди популяции нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O139 установлены два генотипа (A34 и A38), что указывает на их однородность. Полученные результаты свидетельствуют об актуальности изучения нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, имея в виду цель последующего поиска новых генетических маркеров для возможной дифференциации клинических и водных штаммов.

**Ключевые слова:** мониторинг, холера, клинический материал, объекты окружающей среды, нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1, O139, генотип.

### Введение

В регионах нашей страны наблюдается циркуляция нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1, O139 серогрупп в водных объектах окружающей среды (ООС) [9]. На фоне обнаружения штаммов *V. cholerae* O1 в ходе мониторинговых исследований водных экосистем отмечалась их изоляция из клинического материала при регистрации спорадических случаев острых кишечных инфекций (ОКИ) на следующих территориях: Хабаровского края (один штамм, 1999 г.), Краснодарского края (два штамма, 1999 г.; два штамма, 2004 г.), Астраханской области (два штамма, 2000 г.), Челябинской области (один штамм, 2000 г.), Республики Калмыкия (один штамм, 2002 г.), Ростовской области (один штамм, 2005 г.) [7, 9].

Ранее проводились молекулярно-генетические исследования различных групп нетоксигенных штаммов

холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, обнаруженных в водных ООС. Так, были изучены особенности штаммов *V. cholerae* O1 *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>, выявленные в результате ПЦР-генотипирования, которые были изолированы на территории Ростовской области и Республики Калмыкия [1]. Проведен анализ результатов ПЦР-генотипирования нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1, неоднократно обнаруженных в поверхностных водоемах на территории России за период с 1989 по 2016 гг. и которые ранее не встречались в водных ООС на территории субъектов Российской Федерации (РФ) [3].

Изучены сходства и различия штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, изолированных из водных экосистем на территории Краснодарского края с 1990 по 2015 гг., а также проведен сравнительный анализ генетической организации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из ООС на территории Республика Калмыкия с 2013 по 2017 гг. [5, 6].

Ретроспективный анализ результатов генотипирования нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, выделенных за 30-летний период в ходе мониторинга холеры на территории субъектов РФ, позволит определить особенности циркуляции штаммов и организации генома этих микроорганизмов, установить происхождение штаммов, а также сравнить принадлежность к

© 2022 г. Горох А.М., Герасименко А.А., Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Носков А.К.

\* Автор для переписки:

Левченко Дарья Александровна

к.м.н., ст.н.с. отдела микробиологии холеры и др. ОКИ, ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», Ростов-на-Дону

E-mail: dasha26091987@hotmail.com

определенным генотипам штаммов, выделенных от людей и из водных ООС.

Поэтому цель исследования заключалась в анализе результатов мониторинговых исследований на холеру и ПЦР-генотипов обнаруженных штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп за период с 1990 по 2020 гг. на территории России.

### Материалы и методы

В работе были использованы 597 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 и O139, выделенные от людей из ООС за период 1990–2020 гг., которые были отобраны с помощью пополняемой географической информационной системы (ГИС) [2].

Анализ ПЦР-профилей проводили *in silico* по наличию/отсутствию следующих генетических детерминант: RS-элемент (*rstA*), остров патогенности VPI-I (*tcpA*), остров патогенности VPI-2 (*int*, *nanH*, *vce*), последовательность, кодирующая активный домен

MARTX (*acd-rtxA*) и его активатор (*rtxC*); последовательность, кодирующая активный домен эффектора T6SS VgrG3 (*ρbd-vgrG3*); ген системы секреции шестого типа T6SS (*vasK*, *acd-vgrG1*), гены системы секреции третьего типа T3SS (*ucsN2*, *vspD*); ген мажорной структурной единицы маннозочувствительных пилей (*mshA*); ген термостабильного токсина (*stn/sto*), связанный с патогенностью *V. cholerae* [4].

Кластерный и математический анализ проводили с применением средств языка программирования Python в среде разработки Jupiter Notebook [11].

### Результаты и обсуждение

При анализе количественного распределения выделенных за период 1990–2020 гг. штаммов по субъектам России установлено, что лидирующие позиции заняли следующие территории: Республика Калмыкия – 210 штаммов; Краснодарский край – 117; Ростовская область – 62; Забайкальский край – 53 (рис. 1).



Рис. 1. Количество выделенных штаммов холерных вибрионов в субъектах России в 1990–2020 гг. Примечание: цвет от голубого (градации серого) к синему (наиболее темному) — возрастание числа выделенных штаммов за 30-летний период

В результате проведенной работы была дана количественная характеристика 597 штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, выделенных из клинического материала (10) и из ООС (587) на 41 административной территории РФ в период 1990–2020 гг. Установлено,

что наибольшее количество штаммов *V. cholerae* O1 на отдельной административной территории за конкретный год было обнаружено в Краснодарском крае – 98 штаммов в 2015 г.; в Республике Калмыкия – по 34 в 2012 и 2017 гг.; в Забайкальском крае – 23 в 2017 г. (рис. 2).

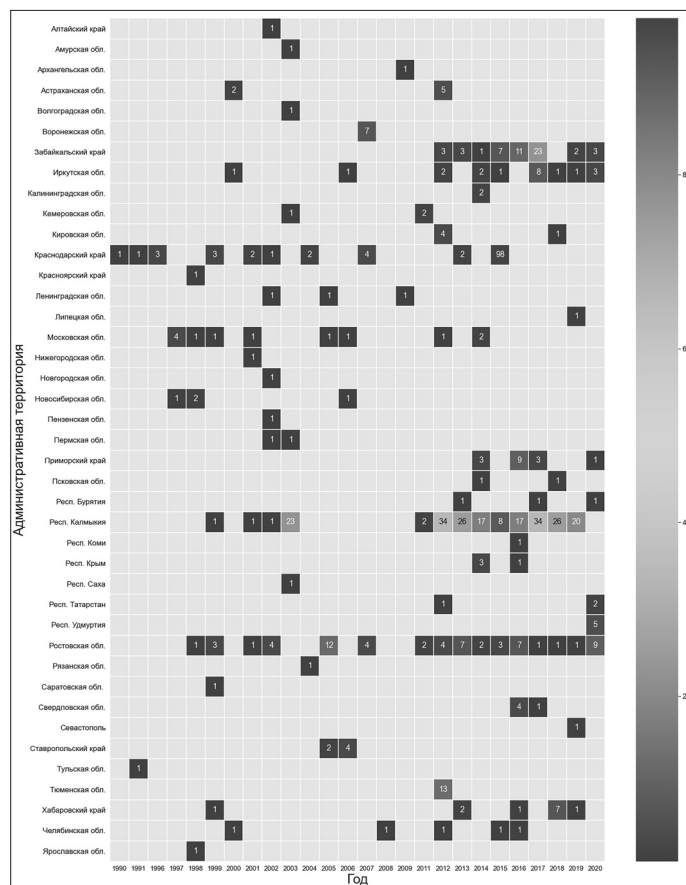


Рис. 2. Количество выделенных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* в субъектах РФ в каждый конкретный год в течение 1990–2020 гг. Примечание: цвет от голубого (нижний вертикальный столбец) к красному (верхний вертикальный столбец) — возрастание количества выделенных штаммов в отдельной административной единице за конкретный год

На основании полученных результатов исследования установлены субъекты России, на территории которых культуры холерных вибрионов выделялись на протяжении более трех лет. К таким территориям были отнесены: Иркутская область (2017–2020 гг.), Забайкальский край (2012–2017 гг.), Республика Калмыкия (2011–2019 гг.), Ростовская область (2011–2020 гг.) (см. рис. 2).

В результате ПЦР-типирования по 14 генам-мишеням была установлена принадлежность штаммов *V. cholerae* к 109 генотипам (рис. 3).

В ходе анализа особый интерес вызвали штаммы *V. cholerae* O1, отнесенные к генотипам A50 и A54, имеющие наиболее широкое распространение на территории России (см. рис. 3).

Генотип A50 включал в себя 33 нетоксигенных штамма холерных вибрионов O1 Эль Тор и встречался в 24 субъектах РФ. Штаммы *V. cholerae* O1 с таким

генотипом впервые были выделены в 1998 г. в Красноярском крае (р. Коросль) и в том же году — в Саратовской области (р. Чулым). Далее, в 1999 г. данный генотип был обнаружен в Саратовской области (р. Гуселка), а в 2001 г. — в Нижегородской области (р. Ветлуга). Затем, в 2002 г. — в Пензенской и Новгородской областях (р. Суры и озеро Ильмень) и в 2003 г. — в Волгоградской области (р. Петровка). Стоит отметить, что в 2004 году штамм с таким генотипом был изолирован в Краснодарском крае из клинического материала от двух больных гастроэнтеритом. В Ставропольском крае штаммы с указанным генотипом выделялись на протяжении двух лет с 2005 по 2006 гг. из р. Подкумок (2005) и Кума (2006), а также были обнаружены в 2006 г. в Новосибирской области в р. Обь.

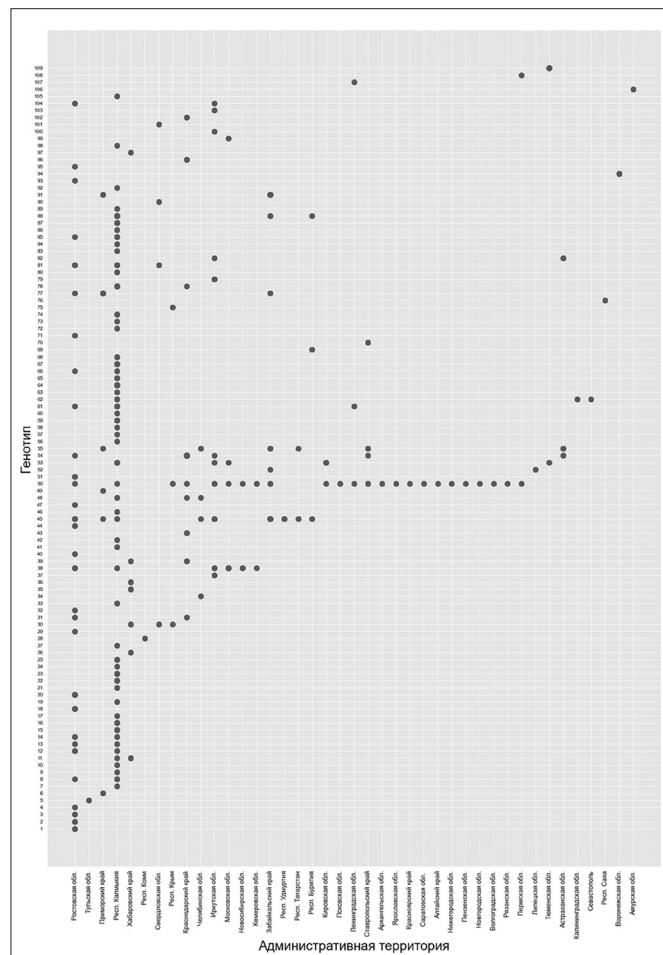


Рис. 3. Распределение генотипов штаммов холерных вибрионов по административным территориям России

В 2009 году штаммы с генотипом A50 были изолированы из ООС в двух административных территориях — Архангельская область (р. Северная Двина) и Ленинградская область (р. Невы). В 2011 году штаммы, относящиеся к данному генотипу, были обнаружены в

Кемеровской области (р. Бачат и Малый Бачат). Наибольшее количество штаммов указанного генотипа было выделено в 2014 г. в следующих субъектах: Иркутская область (р. Ангара и р. Пивоваровка), Московская область (пруд, г. Рыбное), Республика Крым (р. Салгир), Псковская область (р. Великая) и Забайкальский край (озеро Кенон). В 2017 году штаммы с таким генотипом были изолированы только в Иркутской области (р. Куда), а в 2018 г. — в Кировской и Псковской областях (р. Вятка и Великая, соответственно). На трех административных территориях штаммы с генотипом А50 были обнаружены в 2019 г., а именно: в Республике Калмыкия (гидроаккумулятор с. Березовское), Забайкальский край (озеро Кенон), Ростовская область (р. Дон). Стоит отметить, что штаммы холерных вибрионов с генотипом А50 встречались в водных экосистемах РФ на протяжении от года (например — 2009 г.) до шести лет (2001—2006 гг.) с интервалом в один-два года.

Генотип А54 включал в себя 105 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов различного происхождения. Примечательно, что десятки штаммов (98 штаммов) с этим генотипом были выявлены в 2015 г. в Краснодарском крае. Все культуры были изолированы из р. Агура, однако первый штамм с таким генотипом был найден еще в 1999 году в материале от больного человека с симптомами гастроэнтероколита. В 2000 г. изоляты данного генотипа выделялись от больных в Астраханской области. В 2006 г. штамм с генотипом А54 был обнаружен в Ставропольском крае, а в 2012 г. — в Иркутской области. Таким образом, изоляты *V. cholerae* O1, выделенные из клинического материала, относились к генотипу, совпадающему с генотипом штаммов, изолированных из ООС.

В результате анализа генетической организации штаммов *V. cholerae* O1, отнесенных к генотипам А50 и А54, выявлен ряд особенностей. Оба генотипа были представлены штаммами, содержащими гены острова патогенности VPI-2 (*int*, *nanH*). Известна роль нейраминидазы в развитии легкой формы инфекции [12]. Штаммы, содержащие гены, кодирующие её продукцию, были выделены от больных гастроэнтеритом в 1999 г. и в 2004 г. в Краснодарском крае, а также в 2000 г. — в Астраханской области. Кроме того, присутствие генов фермента нейраминидазы в геноме изолятов *V. cholerae*, возможно, связано с процессом адаптации микроорганизма к условиям среды обитания [8]. Установлено наличие в геноме последовательности *acd-rtxA*, кодирующей активный домен цитотоксина MARTX и его активатор — *rtxC*, а также гена системы секреции шестого типа T6SS (*vasK*).

Кластер MARTX тесно связан с СТХ-профагом, а ген *rtxA* присутствует в геноме большинства нетоксигенных вибрионов; обычно в этих штаммах определяется и *rtxC*. Одним из факторов адгезии и колонизации холерных вибрионов (участвующий в процессах прикрепления к различным поверхностям и формировании биопленки) является ген мажорной структурной единицы маннозочувствительных пилей (*mshA*). Наличие такого гена в структуре генома холерных вибрионов обоих генотипов, по-видимому, способствует их длительному сохранению в водоемах [10, 13]. Отличительной особенностью генотипа А50 явилось наличие генов кластера T3SS (табл. 1).

Таблица 1

Генетическая характеристика ПЦР-генотипов штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы

	RS1, RS2		VPI-1		VPI-2		MARTX			T6SS			T3SS		<i>mshA</i> <i>stn/sto</i>	Генотип
	<i>rstA</i>	<i>tcpA elt</i>	<i>int</i>	<i>nanH</i>	<i>vcc</i>	<i>rtxC</i>	<i>acd-rtxA</i>	<i>acd-vgrG1</i>	<i>pbd-vgrG3</i>	<i>vasK</i>	<i>vesN2</i>	<i>vspD</i>				
-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	A50	
-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	A54	

При анализе генетической организации водных штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы обнаружена их кластеризация на два генотипа: А38 и А34. Штаммы, принадлежащие к генотипу А38, были изолированы в шести субъектах РФ, а именно: Республика Калмыкия (1999 и 2001 гг.) из реки Элистинка; Московская область (1997—1999 гг., 2001 г., 2005 г., 2006 г.) из рек Москва и Ока; Ростовская область (1998—1999 гг.) из рек Дон и Темерник; Иркутская область (2000 г. и 2006 г.) из реки Ангара; Новосибирская область (1997 г., 1998 г.) из рек Обь и Кия; Кемеровская область (2003 г.) из реки Томь. К генотипу А34 принадлежал один штамм, выделенный в 2008 году в Челябинской области из озера Шелюгино.

В результате сравнительного анализа двух вышеуказанных генотипов было установлено, что они отличались по наличию/отсутствию последовательности *acd-vgrG1*, входящей в кластер системы секреции шестого типа (T6SS) и имеющей значение для экспрессии T6SS-



зависимой цитотоксичности. Так, штамм с генотипом А34 имел последовательность *acd-vgrG1*, в отличие от штаммов с генотипом А38 (табл. 2).

Таблица 2

**Генетическая характеристика ПЦР-генотипов штаммов холерных вибрионов O139 серогруппы**

RS1, RS2		VPI-1		VPI-2		MARTX		T6SS		T3SS		<i>mshA</i> <i>stn/sto</i>	Генотип
<i>rstA</i>	<i>tcpA elt</i>	<i>int</i>	<i>nanH</i>	<i>vce</i>	<i>rtxC</i>	<i>acd-rtxA</i>	<i>acd-vgrG1</i>	<i>pbd-vgrG3</i>	<i>vasK</i>	<i>vcsN2</i>	<i>vspD</i>		
-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	A34
-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	A38

**Заключение**

Таким образом, проведенный ретроспективный анализ результатов мониторинговых исследований на холеру в пространственном и временном форматах показал, что наибольшее количество штаммов холерных вибрионов за 30-летний период было изолировано на территориях Республики Калмыкия, Краснодарского края, Ростовской области и Забайкальского края. При анализе ПЦР-профилей нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 и O139 была констатирована их принадлежность к 109 генотипам. Выявлены генотипы (А50 и А54), наиболее широко распространенные в водоемах административных территорий России. Можно предположить, что штаммы *V. cholerae* O1 с такими генотипами, за счет их особенностей генетической организации, наиболее устойчивы к действию факторов окружающей среды и способны к переживанию на протяжении летнего периода или ряда лет. Проведенный сравнительный анализ ПЦР-генотипов клинических нетоксигенных холерных вибрионов со штаммами, обнаруженными в этот же период, в водных экосистемах выявил совпадения генотипов, что может указывать на взаимосвязь клинических изолятов со штаммами, циркулирующими в водных экосистемах. При анализе ПЦР-профилей «водных» нетоксигенных штаммов *V.*

*cholerae* O139 найдены два генотипа (А34 и А38), что указывает на однородность их популяции. Полученные данные свидетельствуют об актуальности изучения нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, что позволит верифицировать особенности их генетической организации как вновь выявленных, так и обнаруженных ранее штаммов, с последующим поиском новых генетических маркеров для возможной дифференциации клинических и водных штаммов.

**Литература**

1. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Водопьянов С.О. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы *ctxA tcpA*<sup>+</sup>, выделенных из водных объектов РФ, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы // Здоровье население и среда обитания. – 2014. – № 9(258). – С. 32–35.
2. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Шестиалтынова И.С., Архангельская И.В., Ежова М.И., Ускова Н.Н. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014621055. Геоинформационная система «Холера 1989–2014». – 2014.
3. Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. ПЦР-генотипирование нетоксигенных штаммов холерных вибрионов как один из подходов их актуализации в плане эпиднадзора за холерой // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2018. – № 2. – С. 28–35.
4. Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Титова С.В., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И., Гаевская Н.Е., Квасов А.Р. Анализ ПЦР-генотипов штаммов *V. cholerae* O1, однократно обнаруженных в поверхностных водоемах на территории России // Вода: химия и экология. – 2017. – № 11–12. – С. 119–124.
5. Левченко Д.А., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Ежова М.И., Ренгач М.В. Результаты мониторинга холерных вибрионов на территории Республики Калмыкия в 2013–2017 гг. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2019. – Т. 9. – № 4. – С. 6–11.
6. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ежова М.И., Непомнящая Н.Б. Анализ данных генотипирования *V. cholerae* O1 El Tor, из водных экосистем на территории Краснодарского края с 1990 по 2016 год // Здоровье населения и среда обитания. – 2017. – № 12(297). – С. 44–46.
7. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. Фено- и генотипические

особенности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов различного происхождения, изолированных на территории России // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 3. — С. 89–96.

8. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации (обзор) // Проблемы особо опасных инфекций. — 2013. — № 4. — С. 60–68.
9. Носков А.К., Кругликов В.Д., Лопатин А.А., Чемисова О.С., Левченко Д.А., Иванова С.М., Монахова Е.В., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Гаевская Н.Е., Подойницына О.А., Ежова М.И. Результаты мониторинга холеры на административных территориях России в период с 2013 по 2019 год // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2021. — Т. 98(2). — С. 163–175.
10. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период // Молекул. генетика, микробиология и вирусология. — 2004. — № 4. — С. 3–13.
11. Учебное пособие по Python: начало работы с Jupiter Notebook. <https://bestprogrammer.ru/programmirovanie-i-razrabotka/uchebnoe-posobie-po-python-nachalo-raboty-s-jupyter-notebook>.
12. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates // Microbiology. — 2002. — Vol. 148. — No. 11. — P. 3681–3693.
13. Marsh J.W., Taylor R.K. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus // J. Bacteriol. — 1999. — Vol. 181. — No. 4. — P. 1110–1117. Also citation: Marsh J.W. and Taylor R.K. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus (1999). Open Dartmouth: Peer-reviewed articles by Dartmouth faculty. 1378. <https://digitalcommons.dartmouth.edu/facoa/1378>.

## References

1. Zubkova DA, Kruglikov VD, Arkhangel'skaya IV, Vodop'yanov AS, Nepomnyashchaya NB, Vodop'yanov SO. Geneticheskiye osobennosti shtammov kholernykh vibriinov O1 serogruppy *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>, vydelennykh iz vodnykh ob'yektov RF, okharakterizovannyye s pomoshch'yu novoy geoinformatsionnoy sistemy. Zdorov'ye naseleniye i sreda obitaniya 2014; 9(258):32–35 (in Russian).
2. Zubkova DA, Kruglikov VD, Vodop'yanov AS, Nepomnyashchaya NB, Sheshialtyanova IS, Arkhangel'skaya IV, Yezhova MI, Uskova NN. Svidetel'stvo o gosudarstvennoy registratsii bazy dannykh № 2014621055. Geoinformatsionnaya sistema «Kholera 1989–2014», 2014 (in Russian).
3. Kruglikov VD, Levchenko DA, Vodop'yanov AS, Nepomnyashchaya NB. PTSR-genotipirovaniye netoksigenykh shtammov kholernykh vibriinov kak odin iz podkhodov ikh aktualizatsii v plane epidnazora za kholeroy. Epidemiologiya i

infektsionnyye bolezni. Aktual'nyye voprosy 2018; 2:28–35 (in Russian).

4. Kruglikov VD, Levchenko DA, Titova SV, Arkhangel'skaya IV, Vodop'yanov AS, Nepomnyashchaya NB, Yezhova MI, Gayevskaya NYe, Kvasov AR. Analiz PTSR-genotipov shtammov *V. cholerae* O1, odnokratno obnaruzhennykh v poverkhnostnykh vodoyemakh na territorii Rossii. Voda: khimiya i ekologiya 2017; 11–12:119–124 (in Russian).
5. Levchenko DA, Arkhangel'skaya IV, Kruglikov VD, Gayevskaya NYe, Yezhova MI, Rengach MV. Rezul'taty monitoringa kholernykh vibriinov na territorii Respubliki Kalmykiya v 2013–2017 gg. Epidemiologiya i infektsionnyye bolezni 2019; 9(4):6–11 (in Russian).
6. Levchenko DA, Kruglikov VD, Arkhangel'skaya IV, Yezhova MI, Nepomnyashchaya NB. Analiz dannykh genotipirovaniya *V. cholerae* O1 El Tor, iz vodnykh ekosistem na territorii Krasnodarskogo kraya s 1990 po 2016 god. Zdorov'ye naseleniya i sreda obitaniya 2017; 12(297):44–46 (in Russian).
7. Levchenko DA, Kruglikov VD, Gayevskaya NYe, Vodop'yanov AS, Nepomnyashchaya NB. Fenotipicheskiye osobennosti netoksigenykh shtammov kholernykh vibriinov razlichnogo proiskhozhdeniya, izolirovannykh na territorii Rossii. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2020; 3:89–96 (in Russian).
8. Monakhova YeV. Strategiya virulentnosti kholernykh vibriinov i puti yeye realizatsii (obzor). Problemy osobo opasnykh infektsiy 2013; 4:60–68 (in Russian).
9. Noskov AK, Kruglikov VD, Lopatin AA, Chemisova OS, Levchenko DA, Ivanova SM, Monakhova YeV, Arkhangel'skaya IV, Vodop'yanov AS, Gayevskaya NYe, Podoinitsyna OA, Yezhova MI. Rezul'taty monitoringa kholery na administrativnykh territoriyakh Rossii v period s 2013 po 2019 god. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2021; 98(2):163–175 (in Russian).
10. Smirnova NI, Kutyrev VV. Evolyutsiya genoma vzbuditeleya kholery v sovremenny period. Molekul genetika, mikrobiologiya i virusologiya 2004; 4:3–13 (in Russian).
11. Uchebnoye posobiye po Python: nachalo raboty s Jupiter Notebook. <https://bestprogrammer.ru/programmirovanie-i-razrabotka/uchebnoe-posobie-po-python-nachalo-raboty-s-jupyter-notebook> (in Russian).
12. Jermyn WS, Boyd EF. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. Microbiology 2002; 148(11):3681–3693.
13. Marsh JW, Taylor RK. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. J Bacteriol 1999; 181(4):1110–1117. Also citation: Marsh JW and Taylor RK. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus (1999). Open Dartmouth: Peer-reviewed articles by Dartmouth faculty. 1378. <https://digitalcommons.dartmouth.edu/facoa/1378>.

## ANALYSIS OF THE RESULTS OF MONITORING CHOLERA ON THE TERRITORY OF RUSSIA IN THE PERIOD 1990–2020 AND GENOTYPING OF ISOLATED STRAINS OF *VIBRIO CHOLERAE* O1 AND 139 SEROGROUPS

A.M. GOROKH, A.A. GERASIMENKO, D.A. LEVCHENKO, V.D. KRUGLIKOV, A.K. NOSKOV

*Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don*

A retrospective analysis of the results of monitoring studies for cholera showed that the largest number of *Vibrio cholerae* strains over a 30-year period was isolated in the Republic of Kalmykia, Krasnodar Territory, Rostov region and Trans-Baikal Territory. The belonging of the studied nontoxigenic *V. cholerae* O1 El Tor and O139 strains to 109 genotypes was established. The genotypes (A50 and A54), the most widespread in the water bodies of the administrative territories of Russia, have been identified. A comparative analysis of PCR genotypes of clinical nontoxigenic *Vibrio cholerae* with strains found in the same period in aquatic ecosystems was carried out. The coincidence of their genotypes was revealed. Among the population of nontoxigenic strains *V. cholerae* O139, two genotypes (A34 and A38) have been established, which indicates their homogeneity. The results obtained indicate the relevance of the study of nontoxigenic strains of *Vibrio cholerae*, with the aim of the subsequent search for new genetic markers for the possible differentiation of clinical and aquatic strains.

*Keywords:* monitoring, cholera, clinical material, environmental objects, non-toxigenic strains of *V. cholerae* O1, O139, genotype.

### **Address:**

Levchenko D.A., Ph.D.

Senior Researcher Department of Microbiology of Cholera and others.

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor

E-mail: [dasha26091987@hotmail.com](mailto:dasha26091987@hotmail.com)

### **Для цитирования:**

Горох А.М., Герасименко А.А., Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Носков А.К. Анализ результатов мониторинга холеры на территории России в период 1990–2020 гг. и проведенного генотипирования выделенных штаммов холерных вибрионов O1 и 139 серогрупп. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(1):21–27.

### **For citation:**

Gorokh A.M., Gerasimenko A.A., Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Noskov A.K. Analysis of the results of monitoring cholera on the territory of Russia in the period 1990–2020 and genotyping of isolated strains of *Vibrio cholerae* O1 and 139 serogroups. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(1):21–27 (in Russian).

## ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КЛЕТОК ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЗЕАРАЛЕНОНА И Т-2 ТОКСИНА

Н.Р. КАСАНОВА<sup>1\*</sup>, Л.Р. ВАЛИУЛЛИН<sup>2</sup>, Рин. С. МУХАММАДИЕВ<sup>2</sup>,  
А.П. ГЛИНУШКИН<sup>3</sup>, Н.В. ШАМСУТДИНОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»,

<sup>2</sup>ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»,  
Казань, Республика Татарстан;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» Московская обл.,  
Одинцовский р-н, р.п. Большие Вяземы

Микотоксины являются вторичными метаболитами, вырабатываемыми различными микроскопическими грибами. Они вызывают токсическую реакцию у животных даже при введении в низких концентрациях. Микроскопические грибы рода *Fusarium* при благоприятных условиях могут вырабатывать одновременно несколько микотоксинов, что может привести к высокому токсическому воздействию не только на животных, но и на человека. В связи с большой распространенностью таких фузариотоксинов, как зеараленон и Т-2 токсин, в исследованиях были изучены биохимические изменения культур клеток при их воздействии в различных дозах. В результате проведенных исследований видно, что активность фермента аланинаминотрансферазы (АЛТ) во второй группе повысилась незначительно в сравнении с контрольной группой, а при повышении концентрации микотоксинов в тринадцатой группе активность АЛТ была выше контроля на 22,8% ( $p \leq 0,05$ ). Активность аспаратаминотрансферазы (АСТ) в питательной среде к 24 часам опыта во второй группе снизилась по сравнению с контрольной группой на 4,0%, при повышении дозы микотоксинов в тринадцатой группе активность АСТ была выше контроля на 41,0% ( $p \leq 0,05$ ). Изменение концентрации молочной кислоты в культуральной среде во второй группе, в сравнении с контрольной группой, было незначительным; при повышении дозы токсикантов в тринадцатой группе концентрация молочной кислоты снизилась на 40,5% в сравнении контролем.

**Ключевые слова:** микроскопические грибы, микотоксины, зеараленон, Т-2 токсин, культура клеток, биохимия.

### Введение

Вторичные метаболиты микроскопических грибов называются микотоксинами, они в очень малых количествах могут приводить к различным видам отравлений организма. Наиболее важные грибы, продуцирующие микотоксины, относятся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* [7, 13]. Некоторые микотоксины имеют особое значение, поскольку они могут содержаться в кормах и способны вызвать интоксикации у сельскохозяйственных животных. Среди микотоксинов грибов рода *Fusarium* особое значение имеют трихотецены и зеараленон, так как они образуются на поле перед сбором урожая и их

образование невозможно полностью избежать применением стратегий минимизации контаминации растений микроскопическими грибами.

Особенно уязвимы для заражения фузариозом зерна пшеницы, тритикале и кукурузы, а также часто встречаются загрязнения трихотеценами (Т-2 токсином, ДОН и др.) и зеараленоном [4]. Заражение грибами рода *Fusarium* может привести к заболеванию растений, называемому фузариозная гниль [11, 16]. Более того, в процессе заражения растений грибами образуются микотоксины. Некоторые микотоксины являются причиной заболеваний растений и могут замедлять их рост [17]. Трихотецены представляют собой группу примерно из 150 структурно родственных соединений, характеризующихся тетрациклической структурой. Трихотецены делятся на четыре группы, Т-2 токсин типа А, ниваленол типа В, кротоцин типа С и макроциклический тип D [21]. Микотоксин зеараленон стабилен во время хранения, измельчения, обработки и приготовления пищи, а также он обладает термостабильностью [3, 8]. Зеараленон об-

© 2022 г. Касанова Н.Р., Валиуллин Л.Р., Мухаммадиев Рин. С., Глинушкин А.П., Шамсутдинова Н.В.

\* Автор для переписки:

Касанова Надия Радиковна

канд. с.-х. наук, доцент кафедры биохимии, физики и математики Казанской ГАВМ

E-mail: nadia-kasanova@mail.ru

ладает эстрогенными свойствами и относится к группе эндокринных разрушителей. Посредством воздействия на синтез РНК и белка он приводит к дерегуляции эстрогенных эффектов. Клинически это проявляется гиперэстрогенией и репродуктивными нарушениями. В исследованиях наблюдалось подавление пролиферации клеток эндометрия при воздействии на них зеараленона [23].

Среди сельскохозяйственных животных особенно молодняк и высокопродуктивное поголовье довольно чувствительно реагируют на воздействие фузариотоксинов [1, 5, 6]. На клеточном уровне одним из основных вредных действий Т-2 токсина является первичное ингибирование синтеза белка путем связывания фермента пептидилтрансферазы и нарушений функций рибосом [19]. Кроме того, присутствие токсина может привести и к нарушениям на генетическом уровне, таким как индукция фрагментации ДНК [22]. Другим весьма важным действием Т-2 токсина являются интенсивная продукция свободных радикалов и связанные с окислительным стрессом вредные эффекты: повреждение ядерной и митохондриальной ДНК, повышение перекисного окисления липидов и нарушения клеточного цикла [10, 18].

В связи с этим целью наших исследований было изучение влияния сочетанного воздействия зеараленона и Т-2 токсина на клеточном уровне.

### Материалы и методы

Для изучения биологических свойств зеараленона и Т-2 токсина использовалась иммортализованная культура клеток ЛЭК (ЛЭК). Ее происхождение — крупный рогатый скот, легкие эмбриона. Клетки культивировались в среде DMEM в присутствии 10% фетальной телячьей сыворотки при 37 °С и 5% CO<sub>2</sub>. Препараты растворялись в смеси ДМСО и 96% спирта в соотношении (1:1) [12]. В опыте участвовало 13 групп: первая группа служила контролем с добавлением смеси ДМСО и 96% спирта в соотношении (1:1) и без добавления микотоксинов; вторая группа получала зеараленон и Т-2 токсин 1×10<sup>-6</sup> и 1,07×10<sup>-9</sup>; третья, четвертая, пятая, шестая, седьмая, восьмая, девятая, десятая, одиннадцатая, двенадцатая и тринадцатая группы получали дополнительно к клеткам ЛЭК по 0,25×10<sup>-5</sup> и 10,7×10<sup>-9</sup>; 0,5×10<sup>-5</sup> и 21,5×10<sup>-9</sup>; 1×10<sup>-5</sup> и 42,9×10<sup>-9</sup>; 0,25×10<sup>-4</sup> и 6,4×10<sup>-8</sup>; 0,5×10<sup>-4</sup> и 8,6×10<sup>-8</sup>; 1×10<sup>-4</sup> и 10,7×10<sup>-8</sup>; 0,25×10<sup>-3</sup> и 12,9×10<sup>-8</sup>; 0,5×10<sup>-3</sup> и 1,5×10<sup>-7</sup>; 1×10<sup>-3</sup> и 1,7×10<sup>-7</sup>; 2×10<sup>-3</sup> и 1,9×10<sup>-7</sup>; 3×10<sup>-3</sup> и 2,14×10<sup>-7</sup> М зеараленона и Т-2 токсина соответственно. Исследуемое вещество добавляли в среду для культи-

вирования клеток. Биохимический анализ проводили на анализаторе Microlab-300.

### Результаты

Исследования биохимических показателей клеток линии ЛЭК при воздействии зеараленона и Т-2 токсина в течение 24 часов представлены в таблице 1.

Таблица 1

#### Биохимические показатели клеток линии ЛЭК при воздействии зеараленона и Т-2 токсина

Группы	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л	Лактат LO-POD, г/л
1	7,9±0,71	9,7±0,91	0,457±0,060
2	8,2±0,89	10,3±0,93	0,452±0,056
3	8,2±0,77	10,4±0,88	0,441±0,057
4	8,4±0,76	10,6±0,89	0,443±0,052
5	8,5±0,83	10,8±0,91	0,431±0,058
6	9,0±0,79	11,2±0,94	0,461±0,052
7	9,3±0,78	11,5±0,93	0,392±0,061
8	9,4±0,79	11,8±0,92	0,369±0,057
9	9,6±0,80	12,1±0,92	0,349±0,059
10	9,7±0,81	12,3±0,91	0,336±0,057
11	10,1±0,80	12,5±0,90	0,325±0,053
12	10,4±0,78*	12,8±0,92*	0,301±0,058
13	10,8±0,79*	13,7±0,93*	0,274±0,051*

Примечание: \* — различия с контролем достоверны с точностью  $p \leq 0,05$

Из таблицы 1 видно, что активность фермента АЛТ со второй по шестую группу незначительно выше по сравнению с контрольными значениями. В седьмой группе при повышении концентрации зеараленона и Т-2 токсина активность фермента АЛТ повысилась на 18,0% в сравнении с контролем. В восьмой, девятой и десятой группах активность фермента АЛТ возросла на 21,5—22,8%. В одиннадцатой, двенадцатой и тринадцатой группах повышение активности данного показателя относительно контроля составило 27,2, 31,6 и 36,7%, соответственно.

Активность АСТ в культуральной среде во второй, третьей, четвертой, пятой и шестой группах возросла по сравнению с контрольными значениями незначительно. При повышении концентрации зеараленона и Т-2 токсина в седьмой группе активность фермента АСТ повысилась на 18,6% в сравнении с контролем. В восьмой, девятой, десятой, одиннадцатой, двенадцатой и тринадцатой группах активность данного фермента увеличилась относительно контрольных значений на 21,6, 24,7, 26,8, 28,9, 32,0 и 41,2%, соответственно.

Содержание молочной кислоты во второй, третьей, четвертой, пятой, шестой и седьмой группах понизилось

незначительно относительно контроля. В восьмой и девятой группах содержание молочной кислоты в культуральной среде было ниже на 20,0 и 24,3% по сравнению с контрольной группой. В десятой и одиннадцатой группах уровень молочной кислоты понизился на 27,1 и 29,1%, соответственно. В двенадцатой и тринадцатой группах концентрация молочной кислоты была ниже на 34,2 и 40,5% относительно контроля.

### Заключение

Из результатов проведенных исследований видно, что в группе с содержанием зеараленона и Т-2 токсина в дозе  $1 \times 10^{-6}$  и  $1,07 \times 10^{-9}$  М наблюдается понижение уровня АСТ на 6,1%; при увеличении дозы токсина происходило повышение уровня АСТ до 41,2%. Данная динамика указывает на то, что при сочетанном воздействии зеараленона и Т-2 токсина ускоряются процессы апоптоза клеток и нарушается биосинтез ферментов.

### Литература

1. Валиуллин Л.Р., Хайруллин Д.Д., Семенов Э.И. и др. Комбинированное воздействие микотоксинов на физиологические показатели крыс // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. — 2015. — Т. 221. — № 1. — С. 45–48.
2. Валиуллин Л.Р., Валиев А.Р., Семенов Э.И., Трмасов М.Я. Некоторые аспекты, влияющие на иммунный статус и сохранность молодняка крупного рогатого скота // Актуальные вопросы ветеринарной медицины Сибири / Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию со дня основания Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 2010. — С. 172–182.
3. Валиуллин Л.Р., Лодвигов Э.Ю. Эмбриотоксическое действие зеараленона и Т-2 токсина при их отдельном и сочетанном применении // Ветеринарный врач. — 2008. — № 5. — С. 10–12.
4. Трмасов М.Я., Семенов Э.И., Танасева С.А. Проблемы микотоксикозов в Российской Федерации / Сборник: Товароведение и экспертиза, производство пищевых и кормовых продуктов, обеспечение их качества и безопасности материалы международной научно-практической конференции, 2016. — С. 224–230.
5. Dänicke S. Prevention and control of mycotoxins in the poultry production chain: a European view // World's Poultry Sci. J. — 2002. — Vol. 58. — P. 451–474.
6. Dänicke S., Goyarts T., Döll S., Grove N., Spolders M., Flachowsky G. Effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol on tissue protein synthesis in pigs // Toxicol. Lett. — 2006. — Vol. 165. — P. 297–311.
7. European Commission (EC). 519/2014 of 16 May 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis. Off. J. Eur. Union 2014, L147. — P. 29–43.
8. Ji F., He D., Olaniran A.O., Mokoena M.P., Xu J., Shi J. Occurrence, toxicity, production and detection of *Fusarium* mycotoxin: A review // Food Prod. Process. Nutr. — 2019. — Vol. 1(1). — Art. 6. doi: 10.1186/s43014-019-0007-2.
9. Knutsen H.K., et al. Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) // EFSA J. — 2017. — Vol. 15(7). — e04851. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4851.
10. Liu A., et al. DNA methylation and RASSF4 expression are involved in T-2 toxin-induced hepatotoxicity // Toxicology. — 2019. — Vol. 425. — Art. 152246. doi: 10.1016/j.tox.2019.152246.
11. Mukhammadiev R.S. et al. Isolation, purification, and characterization of a lectin from the fungus *Fusarium solani* 4 // Applied Biochemistry and Microbiology. — 2021. — Vol. 57(2). — P. 206–211.
12. Nabatov A.A. & Raginov I.S. The DC-SIGN-CD56 interaction inhibits the anti-dendritic cell cytotoxicity of CD56 expressing cells // Infect Agent Cancer. — 2015. — Vol. 10(1). — Art. 49. doi: 10.1186/s13027-015-0043-8.
13. Nganje W.E., Bangsund D.A., Leistritz F.L., Wilson W.W., Tiapo N.M. Regional economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat and barley // Rev. Agric. Econ. — 2004. — Vol. 26. — P. 332–347.
14. Karányi Z., Holb I., Hornok L., Pócsi I., Miskei M. FSRD: fungal stress response database. Database (Oxford). — 2013. — Vol. 2013. — bat037. doi: 10.1093/database/bat037.
15. Plasencia J., Mirocha C.J. Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp. // Appl. Environ Microbiol. — 1991. — Vol. 57(1). — P. 146–150.
16. Ploetz R.C. *Fusarium* wilt of banana // Phytopathology. — 2015. — Vol. 105(12). — P. 1512–1521.
17. Rocha O., Ansari K., Doohan F.M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review // Food Addit. Contam. — 2005. — Vol. 22. — P. 369–378.
18. Souza C.F., Da Silva A.S., Müller L.K., Baldissera M.D. et al. Changes of adenosinergic system in piglets fed a diet contaminated by mycotoxin and their effects on the regulation of adenosine // Microb. Pathog. — 2017. — Vol. 114. — P. 328–332.
19. Taroncher M., Rodríguez-Carrasco Y., Ruiz M.J. T-2 toxin and its metabolites: Characterization, cytotoxic mechanisms and adaptive cellular response in human hepatocarcinoma (HepG2) cells // Food Chem. Toxicol. — 2020. — Vol. 145. — Art. 111654. doi: 10.1016/j.fct.2020.111654.
20. Ueno Y. Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes // Fundam. Appl. Toxicol. — 1984.

- Vol. 4(2 Pt 2). – S124–S132. doi: 10.1016/0272-0590(84)90144-1.
21. Yu F.F., Lin X.L., Yang L., Liu H., et al. Comparison of T-2 toxin and HT-2 toxin distributed in the skeletal system with that in other tissues of rats by Acute Toxicity Test // Biomed. Environ Sci. – 2017. – Vol. 30(11). – P. 851–854.
  22. Yang J., et al. T-2 Toxin-induced oxidative stress leads to imbalance of mitochondrial fission and fusion to activate cellular apoptosis in the human liver 7702 cell line // Toxins (Basel). – 2020. – Vol. 12(1). – Art. 43. doi: 10.3390/toxins12010043.
  23. Zhang G.L., Feng Y.L., Song J.L., Zhou X.S. Zearalenone: A mycotoxin with different toxic effect in domestic and laboratory animals' granulosa cells // Front Genet. – 2018. – Vol. 9. – Art. 667. doi: 10.3389/fgene.2018.00667.
- ### References
1. Valiullin LR, Khayrullin DD, Semenov EI i dr. Kombinirovannoye vozdeystviye mikotoksinov na fiziologicheskiye pokazateli krysa. Uchenyye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoy akademii veterinarnoy meditsiny im NE Baumana 2015; 221(1):45–48 (in Russian).
  2. Valiullin LR, Valiyev AR, Semenov EI, Tremasov MYa. Nekotoryye aspekty, vliyayushchiye na immunnyy status i sokhrannost' molodnyaka krupnogo rogatogo skota. Aktual'nyye voprosy veterinarnoy meditsiny Sibiri. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvyashchennoy 70-letiyu so dnya osnovaniya Instituta eksperimental'noy veterinarii Sibiri i Dal'nego Vostoka, 2010: 172–182 (in Russian).
  3. Valiullin LR, Lodvigov EYu. Embriotoksicheskoye deystviye zearalenona i T-2 toksina pri ikh razdel'nom i sochetannom primenenii. Veterinarnyy vrach 2008; 5:10–12 (in Russian).
  4. Tremasov MYa, Semenov EI, Tanaseva SA. Problemy mikotoksikozov v Rossiyskoy Federatsii. Sbornik: Tovarovedeniye i ekspertiza, proizvodstvo pishchevykh i kormovykh produktov, obespecheniye ikh kachestva i bezopasnosti materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, 2016: 224–230 (in Russian).
  5. Dänicke S. Prevention and control of mycotoxins in the poultry production chain: a European view. World's Poultry Sci J 2002; 58:451–474.
  6. Dänicke S, Goyarts T, Döll S, Grove N, Spolders M, Flachowsky G. Effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol on tissue protein synthesis in pigs. Toxicol Lett 2006; 165:297–311.
  7. European Commission (EC). 519/2014 of 16 May 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis. Off J Eur Union 2014, L147:29–43.
  8. Ji F, He D, Olaniran AO, Mokoena MP, Xu J, Shi J. Occurrence, toxicity, production and detection of *Fusarium* mycotoxin: A review. Food Prod Process Nutr 2019; 1(1):6. doi: 10.1186/s43014-019-0007-2.
  9. Knutsen HK, et al. Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). EFSA J 2017; 15(7):e04851. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4851.
  10. Liu A, et al. DNA methylation and RASSF4 expression are involved in T-2 toxin-induced hepatotoxicity. Toxicology 2019; 425:152246. doi: 10.1016/j.tox.2019.152246.
  11. Mukhammadiev RS et al. Isolation, purification, and characterization of a lectin from the fungus *Fusarium solani* 4. Applied Biochemistry and Microbiology 2021; 57(2):206–211.
  12. Nabatov AA & Raginov IS. The DC-SIGN-CD56 interaction inhibits the anti-dendritic cell cytotoxicity of CD56 expressing cells. Infect Agent Cancer 2015; 10(1):49. doi: 10.1186/s13027-015-0043-8.
  13. Nganje WE, Bangsund DA, Leistritz FL, Wilson WW, Tia-po NM. Regional economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat and barley. Rev Agric Econ 2004; 26:332–347.
  14. Karányi Z, Holb I, Hornok L, Pócsi I, Miskei M. FSRD: fungal stress response database. Database (Oxford) 2013; 2013:bat037. doi: 10.1093/database/bat037.
  15. Plasencia J, Mirocha CJ. Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp. Appl Environ Microbiol 1991; 57(1):146–150.
  16. Ploetz RC. *Fusarium* wilt of banana. Phytopathology 2015; 105(12):1512–1521.
  17. Rocha O, Ansari K, Doohan FM. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. Food Addit Contam 2005; 22:369–378.
  18. Souza CF, Da Silva AS, Müller LK, Baldissera MD et al. Changes of adenosinergic system in piglets fed a diet co-contaminated by mycotoxin and their effects on the regulation of adenosine. Microb Pathog 2017; 114:328–332.
  19. Taroncher M, Rodríguez-Carrasco Y, Ruiz MJ. T-2 toxin and its metabolites: Characterization, cytotoxic mechanisms and adaptive cellular response in human hepatocarcinoma (*HepG2*) cells. Food Chem Toxicol 2020; 145:111654. doi: 10.1016/j.fct.2020.111654.
  20. Ueno Y. Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. Fundam Appl Toxicol 1984; 4(2 Pt 2):S124–S132. doi: 10.1016/0272-0590(84)90144-1.
  21. Yu FF, Lin XL, Yang L, Liu H, et al. Comparison of T-2 toxin and HT-2 toxin distributed in the skeletal system with that in other tissues of rats by Acute Toxicity Test. Biomed Environ Sci 2017; 30(11):851–854.
  22. Yang J, et al. T-2 Toxin-induced oxidative stress leads to imbalance of mitochondrial fission and fusion to activate cellular apoptosis in the human liver 7702 cell line. Toxins (Basel) 2020; 12(1):43. doi: 10.3390/toxins12010043.
  23. Zhang GL, Feng YL, Song JL, Zhou XS. Zearalenone: A mycotoxin with different toxic effect in domestic and laboratory animals' granulosa cells. Front Genet 2018; 9:667. doi: 10.3389/fgene.2018.00667.

## STUDY OF BIOCHEMICAL PARAMETERS OF CELLS EXPOSED TO ZEARELENONE AND T-2 TOXIN

N.R. KASANOVA<sup>1</sup>, L.R. VALIULLIN<sup>2</sup>, Rin.S. MUKHAMMADIEV<sup>2</sup>,  
A.P. GLINUSHKIN<sup>3</sup>, N.V. SHAMSUTDINOVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N.E. Bauman,*

<sup>2</sup> *Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan;*

<sup>3</sup> *All-Russian Research Institute of Phytopathology, Moscow region*

Mycotoxins are secondary metabolites produced by various microscopic fungi. They cause a toxic reaction in animals even when administered at low concentrations. Microscopic fungi of the genus *Fusarium* under favorable conditions can produce several mycotoxins at the same time, which can lead to high toxic effects not only on animals, but also on humans. Due to the high prevalence of fuzariotoxins such as zearalenone and T-2 toxin, studies have examined biochemical changes in cell cultures at different doses. Studies show that the enzyme activity (ALT) of alanine aminotransferase in the second group increased slightly compared to the control group, and with an increase in the concentration of mycotoxins in the thirteenth group, ALT activity was higher than the control by 22.8% ( $p \leq 0.05$ ). The activity (AST) of aspartate aminotransferase in the nutrient medium by the 24 hours of experience in the second group decreased compared to the control group by 4.0%, with an increase in the dose of mycotoxins in the thirteenth group, the activity of AST was higher than the control on 41.0% ( $p \leq 0.05$ ). The change in the concentration of lactic acid in the culture medium in the second group, compared with the control group, was insignificant; with an increase in the dose of toxicants in the thirteenth group, the concentration of lactic acid decreased by 40,5% compared with the control.

*Keywords:* microscopic fungi, mycotoxins, zearolenone, T-2 toxin, cell culture, biochemistry.

### Address:

Kasanova N.R., Candidate of Agricultural Sciences,  
Associate Professor of the Department of Biochemistry,  
Physics and Mathematics of the Kazan State Academy of Achievements  
E-mail: nadia-kasanova@mail.ru

### Для цитирования:

Касанова Н.Р., Валиуллин Л.Р., Мухаммадиев Рин. С., Глинушкин А.П., Шамсутдинова Н.В. Изучение биохимических показателей клеток при воздействии зеараленона и Т-2 токсина. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(1):28–32.

### For citation:

Kasanova N.R., Valiullin L.R., Mukhammadiev Rin.S., Glinushkin A.P., Shamsutdinova N.V. Study of biochemical parameters of cells exposed to zearalenone and T-2 toxin. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(1):28–32 (in Russian).



## ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ЕГО ДЕРИВАТОВ В СИСТЕМЕ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ

М.Н. КИРЕЕВ\*, О.В. ГРОМОВА, О.С. ДУРАКОВА, С.А. ВОРОБЬЕВА,  
Л.Ф. ЛИВАНОВА, О.А. ВОЛОХ

*Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

В статье представлены обобщенные результаты исследования нескольких серий анатоксина и очищенного холерного токсина (ХТ). Антигены охарактеризованы по своей иммунохимической и иммунобиологической активности, электрофоретической подвижности, спектроскопическому профилю. Были установлены хроматографические характеристики. Показано, что все изученные серии анатоксинов, полученные в разное время, хранящиеся с соблюдением холодовой цепи, имели примерно одинаковые показатели, которые соответствовали нормативным документам на холерную таблетированную вакцину.

**Ключевые слова:** холерный токсин, анатоксин, анитоксические сыворотки, холерная вакцина.

### Введение

Для конструирования бесклеточных вакцин против различных инфекций, содержащих растворимые антигены бактерий, и усовершенствования существующих профилактических препаратов обычно проводится получение различных антигенных компонентов в очищенном виде и их стандартизация по химическому составу, иммунохимическим и иммунобиологическим характеристикам.

В России вакцинация против холеры включена в Национальный календарь профилактических прививок в соответствии с Приказом Минздрава России № 229 от 27.07.2001. В настоящее время в мире зарегистрировано несколько противохолерных вакцин [1, 4], среди которых единственная на территории Российской Федерации вакцина холерная бивалентная химическая разработана и выпускается в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Ее основными компонентами являются холероген-анатоксин и О-антигены холерного вибриона сероваров Инаба и Огава, отвечающие за формирование антибактериального иммунитета [3]. Вакцина рекомендована лицам, выезжающим в эндемичные страны, а также населению

районов, граничащих с неблагополучными по холере территориями, в случае неблагоприятной обстановки.

Проведено сравнительное изучение физико-химических и иммунобиологических свойств нескольких серий анатоксина холерного вибриона как компонента бивалентной химической вакцины и очищенного холерного токсина. Антигены были получены на новом оборудовании по экспериментальной технологии. Выделенные антигены используются для конструирования экспериментальных серий холерной химической вакцины, для разработки методов контроля и стандартизации получаемых препаратов. Холерный токсин был использован при получении кроличьих анитоксических сывороток. Получены и сравнены электрофоретические профили препаратов и иммунохимические характеристики с кроличьей сывороткой, полученной к очищенному ХТ.

Технология выделения, очистки и стандартизации холерного токсина и его анатоксина, получения к ним специфических антител требует постоянного совершенствования в связи с необходимостью улучшения качества этих иммунобиологических препаратов и расширением конкретных практических задач, стоящих перед исследователями.

На сегодняшний день актуальным остается решение вопросов стабильного содержания специфической биологической активности в условиях хранения у индивидуальных очищенных антигенов бактерий, используемых как компоненты профилактических препаратов.

Наконец, в связи с существующей напряженной ситуацией в мире по холере — ее довольно широким рас-

© 2022 г. Киреев М.Н., Громова О.В., Дуракова О.С., Воробьева С.А., Ливанова Л.Ф., Волох О.А.

\* **Автор для переписки:**

Киреев Михаил Николаевич

к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

E-mail: rusrapi@microbe.ru

пространением, высоким уровнем летальности и реальной угрозой заноса этой инфекции в любую точку земного шара по-прежнему актуальной проблемой является усовершенствование оральных химических вакцин путем оптимизации биотехнологических этапов производства, содержания и стандартизации антигенов и факторов патогенности.

Учитывая все вышеизложенное, предпринятое биохимическое и иммунохимическое изучение наиболее иммунологически значимого антигена холерного вибриона холерного токсина и его атоксигенного варианта при условии хранения в холодильнике как основы для конструирования эффективных профилактических и диагностических препаратов является достаточно актуальным и практически значимым.

### Материалы и методы

Выращивание холерных вибрионов проводили в реакторах методом глубинного культивирования в производственных условиях в бульоне из ферментативного казеинового гидролизата (рН 7,8) при аэрации с подкормкой глюкозой и аммиаком при температуре  $37 \pm 1$  °С.

Для получения холерного токсина использовали бульонную культуру холерного вибриона штамма 569В (безмикробный центрифугат после стерилизующей мембранной фильтрации). Холерный токсин осаждали добавлением в фильтрат соляной кислоты до 18,5% в присутствии гексаметафосфата натрия (рН 4,3). Осаждение проводили при комнатной температуре и постоянном перемешивании в течение двух часов. Затем центрифугировали и полученный осадок растворяли в фосфатном буфере (рН 7,0) и диализовали сутки против фосфатного буфера (рН 7,0) в условиях холодильника. Затем при помощи ионообменной хроматографии на фосфоцеллюлозе отделяли холерный токсин от примесей. Фракции второго пика собирали, добавляли азид натрия до 0,02% и диализовали против 0,9%-ного раствора хлорида натрия.

Холероген-анатоксин представляет собой очищенный и концентрированный препарат, полученный из центрифугата бульонной культуры холерного вибриона штамма 569В, обезвреженного формалином. Препарат бывает сухим и жидким. Сухой холероген-анатоксин имеет вид серовато-желтой пористой массы, жидкий — желтовато-коричневого цвета с небольшой опалесценцией. В работе были использованы шесть серий анатоксина, полученных в разные годы, лиофилизированных и хранящихся в холодильнике.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм или по О. Lowry при длине волны 750 нм с применением набора реактивов «Bio-Rad DC Protein Assay» (Bio-Rad, США); ВЭЖХ проводили на колонке для гель-фильтрации BioSep-SEC-s3000 (Phenomenex, США), размером 300×7,8 мм. Элюентом служил 0,1 М фосфатный буфер рН 7,4, содержащий 0,02% азида натрия, скорость элюции составляла 1 мл/мин. Детекцию осуществляли с помощью проточного спектрофотометра при длине волны 280 нм. Колонка откалибрована производителем с использованием маркеров молекулярного веса от 0,2 до 670 кДа.

Состав белковых фракций исследовали методами электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) по U.K. Laemmli (1970) в 12%-ном разделительном геле. Иммуноблоттинг проводили по методу H. Towbin (1979) с использованием экспериментальных поликлональных кроличьих антител к ХТ в разведении 1:200, а в качестве конъюгата — антикроличьих антител, меченных пероксидазой (ИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва). Для обнаружения белков в SDS-PAGE использовали окраску Кумасси синим R-250 (ДиаЭм, Германия) и азотнокислым серебром с помощью набора реактивов «Silver Stain» (Bio-Rad).

*Дот-иммуноанализ (ДИА).* Использовали раствор коллоидного золота (КЗ) с диаметром частиц 15–17 нм — получали по методу Г. Френса из золотохлористоводородной кислоты [5]. «Золотое число» определяли по методу Жигмонди Р. [2]. Для оптимальных условий стабилизации увеличивали рН раствора коллоидного золота 0,2М раствором углекислого калия (0,2М  $K_2CO_3$ ) до рН 7,0. Далее в раствор коллоидного золота с оптимальным значением рН 7,0 добавляли необходимое количество иммуноглобулина в соответствии с выявленным «золотым числом». С целью блокировки свободных сайтов поверхности наночастиц золота и вторичной стабилизации конъюгата к нему добавляли 0,5%-ный раствор высокомолекулярного полимера ПЭГ-20М до конечной концентрации 0,02%. Затем полученный диагностикум выдерживали при температуре 3–5 °С не менее 1 ч, по истечении которого конъюгат брали в работу.

В качестве твердой фазы при постановке прямого варианта дот-иммуноанализа применяли расчерченную на квадраты нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм. В микротитровальных планшетах готовили последовательные двукратные разведения исследуемых образцов на деионизованной воде. Исследуемый образец антигена наносили на нитроцеллюлозную мембрану

аликвотами по 2 мкл. Полоску мембраны с нанесенными образцами выдерживали до полного высушивания. Для блокировки свободных сайтов связывания мембрану погружали в 1–3%-ный раствор БСА, приготовленный на деионизованной воде, и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. После инкубации мембрану промывали деионизованной водой и помещали в пакет-камеру из пленки типа «Parafilm», куда добавляли 400 мкл диагностикума. Мембрану выдерживали до появления красных пятен. Для повышения чувствительности метода проводили процедуру усиления цветового сигнала, для чего мембрану погружали в раствор физического проявителя. Трехкомпонентный проявитель готовили непосредственно перед использованием, для чего к 600 мкл деионизованной воды добавляли 400 мкл 0,5%-ного раствора лимонной кислоты, 1000 мкл 0,2%-ного раствора метола и 40 мкл 0,2%-ного раствора нитрата серебра. После процедуры усиления мембрану отмывали в деионизованной воде и высушивали. За положительную реакцию принимали то наибольшее разведение, при котором визуально регистрировали четко различимое пятно.

Степень достоверности основана на значительном объеме экспериментов и полученных в ходе исследования данных, их статистической обработке, соответствии теоретическим данным, применении современных актуальных методов исследования, соответствующих цели и задачам работы. Эксперименты проведены на аттестованном оборудовании, контрольно-измерительные приборы, задействованные в ходе исследования, прошли метрологическую проверку.

### Результаты и обсуждение

При конструировании химических вакцин антигенного уровня актуальной и важной является проблема стандартности компонентов вакцин — антигенов. Как известно, антигены бактериальной клетки являются биологически активными веществами и их физико-химические характеристики могут варьировать в определенных пределах у разных серий. Поэтому их стандартизируют по биологической активности, которую определяют на лабораторных животных.

Холероген-анатоксин представляет собой очищенный и концентрированный препарат, полученный из центрифугата бульонной культуры холерного вибриона штамма 569В, обезвреженного формалином.

Холероген-анатоксин был получен согласно нормативным документам в производственных условиях из штамма 569В. Было изучено 6 серий, выделенных в

разные годы и хранившихся в сухом виде с соблюдением холодовой цепи.

Для оценки и дальнейшей стандартизации образцов анатоксина выполняли аналитическую высокоэффективную жидкостную хроматографию и электрофорез в полиакриламидном геле по Лэмли.

По данным ВЭЖХ, препараты холероген-анатоксина показали сходные результаты. Профили полученных графиков состояли из ряда пиков с одним высокомолекулярным пиком и рядом белковых пиков с молекулярной массой от 20 до 60 кДа.

По данным электрофореза в ПААГ, также получены примерно одинаковые электрофоретические профили всех изученных серий холероген-анатоксина.

На рисунке 1 показаны электрофореграммы двух серий анатоксина, остальные, взятые в работу серии, продемонстрировали аналогичные результаты.

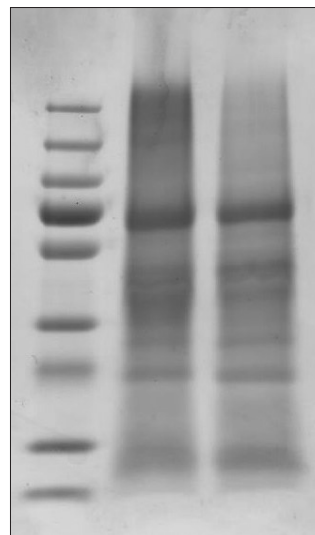


Рис. 1. Электрофорез серий анатоксина. Слева: маркеры молекулярной массы. Справа: две серии холерогена-анатоксина (98–99, 2016 г.; 237–238, 2020 г.)

При сканировании образцов анатоксина на спектрофотометре были обнаружены спектры поглощения, одинаковые у всех изученных серий. Также было показано, что препараты имеют максимумы поглощения в ультрафиолетовой области от 190 до 300 нм.

В дот-иммуноанализе с кроличьей анитоксической сывороткой все образцы были иммунохимически активны в разведении до 0,7 мкг. Холерный токсин был использован в качестве положительного контроля. В таблице 1 приведены основные характеристики изученных серий холерогена, а количественные результаты определения анатоксина в ДИА с антихолерогенной сывороткой представлены на рисунке 2.

**Основные характеристики и активность препаратов холероген-анатоксина  
в дот-иммуноанализе с антихолерогенной сывороткой**

Серии холероген-анатоксина (№ реакторов)	Специфическая активность (ЕС)	Холерогенность	Активность в РДП с АХС	Кол-во антигена в ДИА (мкг)
98–99, 2016 г.	8000	отсутствует	1:64	0,7
100–101, 2016 г.	10000	отсутствует	1:64	0,7
126–127, 2017 г.	10000	отсутствует	1:64	0,7
237–238, 2020 г.	6000	отсутствует	1:256	0,7
241–242, 2020 г.	8000	отсутствует	1:128	0,7
255–256, 2020 г.	8000	отсутствует	1:64	0,7

На рисунке 2 представлены результаты определения активности антигена в дот-иммуноанализе с антитоксической сывороткой в пяти сериях препарата анатоксина.

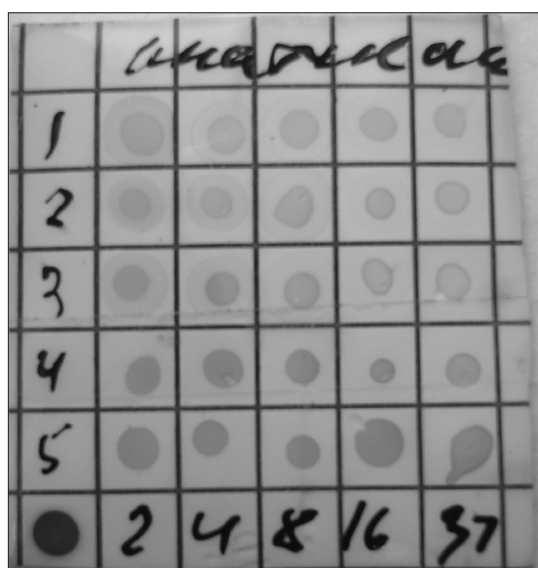


Рис. 2. Результаты дот-иммуноанализа с использованием конъюгата антитоксических антител с наночастицами золота. *Примечание:* по оси абсцисс: двукратные разведения холерогена, начиная с 0,02 мг/мл; по оси ординат: 1–5 — холероген-анатоксин разных серий. В левом нижнем углу — холерный токсин (положительный контроль)

ДОТ-иммуноанализ продемонстрировал одинаковые результаты у всех взятых на анализ серий холероген-анатоксина.

### Заключение

Развитие биологических наук способствует интенсивному развитию вакцинных технологий, основанных на применении современных подходов и высокоточного оборудования, что открывает возможность получать бо-

лее активные и стандартные препараты. Стандартизация антигенов, входящих в вакцинные препараты, обычно проводится по специфической активности. Мы провели серию работ для стандартизации холероген-анатоксина как компонента холерной химической вакцины.

В итоге установлено, что исследованные серии анатоксина имеют незначительные девиации по своим иммунохимическим и биофизическим характеристикам.

### Литература

1. Горяев А.А., Саяпина Л.В., Обухов Ю.И., Бондарев В.П. Эффективность и безопасность вакцин для профилактики холеры // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. — 2018. — Т. 18. — № 1(65). — С. 42–49.
2. Жигмонди Р. Коллоидная химия. — Харьков, Киев: Изд-во НК Снаба УССР, 1933. — 452 с.
3. Кутырев В.В., Девдариани Э.Л., Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области вакцинопрофилактики особо опасных бактериальных инфекций // Проблемы особо опасных инфекций. — 2006. — № 92(2). — С. 18–24.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Шуковская Т.Н., Смирнова Н.И., Никифоров А.К., Еремин С.А., Топорков В.П. Специфическая профилактика холеры в современных условиях // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — № 107(1). — С. 5–12.
5. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // Nature Physical Science. — 1973. — Vol. 241(105). — P. 20–22.

### References

1. Goryayev AA, Sayapina LV, Obukhov YUI, Bondarev VP. Effektivnost' i bezopasnost' vaksyn dlya profilaktiki kholery. Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lecheniye 2018; 18(1):42–49 (in Russian).
2. Zhigmondi R. Kolloidnaya khimiya. Khar'kov, Kiyev: Izd-vo NK Snaba USSR, 1933: 452 (in Russian).

3. Kutylev VV, Devdariani ZL, Sayapina LV. Sovremennoye sostoyaniye nauchnykh issledovaniy v oblasti vaksino profilaktiki osobo opasnykh bakterial'nykh infektsiy. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2006; 92(2):18–24. (in Russian).
4. Onishchenko GG, Kutylev VV, Shchukovskaya TN, Smirnova NI, Nikiforov AK, Yerebin SA, Toporkov VP. Spetsificheskaya profilaktika kholery v sovremennykh usloviyakh. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2011; 107(1):5–12 (in Russian).
5. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. Nature Physical Science 1973; 241(105):20–22.

## STUDY OF THE PROPERTIES OF CHOLERA TOXIN AND ITS DERIVATIVES IN THE DEVELOPMENT OF NEW VACCINE PREPARATIONS

M.N. KIREEV, O.V. GROMOVA, O.S. DURAKOVA, S.A. VOROB'EVA,  
L.F. LIVANOVA, O.A. VOLOKH

*Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov*

This article presents the generalized results of a study of several series of anatoxin and purified cholera toxin (ChT). Antigens are characterized by their immunochemical and immunobiological activity, electrophoretic mobility, spectroscopic profile. Chromatographic features have been identified. It is shown that all the studied series of anatoxins, obtained at different times and stored in compliance with the cold chain requirements, have approximately the same indicators, which correspond to the regulatory documents for tableted cholera vaccine.

*Keywords:* cholera toxin, anatoxin, antitoxic sera, cholera vaccine.

### **Address:**

Kireev M.N., Ph.D.  
Leading Researcher, Laboratory of Cholera Vaccines  
Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»  
E-mail: rusrapi@microbe.ru

### **Для цитирования:**

Киреев М.Н., Громова О.В., Дуракова О.С., Воробьева С.А., Ливанова Л.Ф., Волох О.А. Изучение свойств холерного токсина и его дериватов в системе разработки новых вакцинных препаратов. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(1):33–37.

### **For citation:**

Kireev M.N., Gromova O.V., Durakova O.S., Vorob'eva, S.A. Livanova L.F., Volokh O.A. Study of the properties of cholera toxin and its derivatives in the development of new vaccine preparations. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(1):33–37 (in Russian).

## БИОСОВМЕСТИМОСТЬ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ БАЦИЛЛ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В СОСТАВ МИКРОБНОГО БИОПРЕПАРАТА

А.В. МАЛКОВА\*, А.Н. ИРКИТОВА, Д.Е. ДУДНИК

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный университет», Барнаул

В рамках данного исследования была изучена биосовместимость 9 природных штаммов бактерий рода *Bacillus* (видов *B. pumilus*, *B. toyonensis* и *B. licheniformis*). Для этого использовались диффузионные методы перпендикулярных штрихов и лунок. Было установлено, что все 5 штаммов вида *B. pumilus* совместимы между собой. Представители других изучаемых видов бацилл в разной степени проявили антагонистическое действие по отношению к остальным объектам исследования.

**Ключевые слова:** *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus toyonensis*, бациллы, биосовместимость, антагонизм, биопрепараты.

### Введение

Все организмы в природе существуют в постоянном взаимодействии друг с другом и с другими организмами. Это приводит к возникновению различных ассоциаций и типов взаимоотношений [3]. Так, микроорганизмы по отношению к растениям могут выступать не только в качестве фитопатогенов, но и как представители нормальной и полезной микрофлоры, населяющей ризосферу (прикорневую зону) и филлосферу (надземные части растений), а также внутренние ткани растений (эндوفитная микрофлора) [1].

Особенно разнообразны взаимоотношения микроорганизмов между собой. Для них характерны синергичные (благоприятные), нейтральные и антагонистические (неблагоприятные) взаимодействия [6]. Последние имеют практическое значение для человека и нашли широкое применение в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве [11]. Например, при создании микробных биопрепаратов для растениеводства используются различные роды микроорганизмов: *Azotobacter* («Азотобактерин»), *Rizobium* («Ризоторфин»), *Flavobacterium* («Флавобактерин»), *Agrobacterium* («Агрофил»), *Arthrobacter*

(«Мизорин»), *Pseudomonas* («Экстрасол»), *Bacillus* («БисолбиСан») и др. Они способствуют увеличению урожайности, фиксации азота, подавляют рост патогенной микрофлоры и др., однако большинство из них представляют собой однокомпонентные препараты [10]. В последние годы все чаще применяют микробные композиции, для которых характерен более широкий спектр биологической активности по сравнению с моноштаммовыми биопрепаратами [8].

В ходе создания поликомпонентных микробных препаратов стоит учитывать не только антагонистическую активность или ростостимулирующие свойства полезных бактерий, но также и их биосовместимость между собой. Высокая степень совместимости штаммов непосредственно влияет на возможность применения, эффективность и стабильность разрабатываемого продукта [2, 5]. Важно, чтобы культуры в многоштаммовом биопреparate не вступали в конкурентные взаимоотношения между собой, а пребывали в нейтральном или синергичном взаимодействии.

Цель работы — изучить биосовместимость природных штаммов бактерий рода *Bacillus*, перспективных для включения в состав микробного биопрепарата.

### Материалы и методы

**Объекты исследования.** В качестве объектов исследования выступали штаммы бацилл из коллекции ИЦ «Промбиотех» ФГБОУ ВО «Алтайского государственного университета» (АлГУ). Их перечень, а также источник выделения указаны в таблице 1.

© 2022 г. Малкова А.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е.

\* **Автор для переписки:**

Малкова Ангелина Владимировна

аспирант кафедры экологии, биохимии и биотехнологии Института биологии и биотехнологии, младший научный сотрудник ИЦ «Промбиотех» Алтайского государственного университета

E-mail: gelishka96@mail.ru

Таблица 1

## Объекты исследования

Штамм	Источник выделения
<i>B. pumilus</i> 4	ризосфера р. <i>Berteroa</i>
<i>B. pumilus</i> 5	ризосфера р. <i>Ranunculus</i>
<i>B. pumilus</i> 6	ризосфера р. <i>Urtica</i>
<i>B. pumilus</i> 7	ризосфера р. <i>Rumex</i>
<i>B. pumilus</i> 16	ризосфера р. <i>Helianthus</i>
<i>B. toyonensis</i> 15	ризосфера р. <i>Cichorium</i>
<i>B. licheniformis</i> 8	ризосфера р. <i>Taraxacum</i>
<i>B. licheniformis</i> 9	ризосфера р. <i>Chelidonium</i>
<i>B. licheniformis</i> 10	филосфера злаковых

**Условия культивирования.** Культивирование бактерий рода *Bacillus* осуществляли на питательной L-среде (г/л): дрожжевой экстракт — 5,0, пептон — 15,0, NaCl — 5,0, агар — 15,0. Жидкий бульон готовили аналогично, но без добавления агара. Инкубировали микроорганизмы при 37 °С в течение 18–24 часов в термостате «Binder BD 115» (на твердой среде) или шейкер-инкубаторе «Innova 44» (в колбах) при 250 об/мин [7].

**Установление биосовместимости.** Биосовместимость бацилл устанавливали двумя методами — перпендикулярных штрихов и лунок. В обоих случаях сперва выращивали накопительные культуры на L-бульоне. При первом методе сперва засеивали вертикальный штрих и инкубировали его в течение суток при оптимальных

условиях. Затем подсеивали к нему горизонтальные штрихи тест-культур и снова культивировали. Для анализа взаимоотношений бактерий методом лунок один штамм засеивали поверхностным газоном в чашку Петри. Далее стерильным сверлом прорезали углубления в агаре (D=5–7 мм), заполняли их культуральной жидкостью другого штамма бактерий р. *Bacillus* (30 мкл в каждую) и затем инкубировали [4].

Учет результатов производили по наличию или отсутствию зон подавления роста. На основании этого делали выводы о биосовместимости исследуемых штаммов или антагонистических взаимоотношениях между ними.

**Статистическая обработка.** Эксперименты проводились в трехкратной повторности. В случае антагонизма устанавливалось среднее значение длины области ингибирования роста (M) и стандартное отклонение (mm).

## Результаты и обсуждение

**Метод перпендикулярных штрихов.** В таблице 2 представлены результаты исследования взаимоотношений бактерий рода *Bacillus* с использованием метода перпендикулярных штрихов. Согласно полученным данным, не все штаммы бацилл совместимы друг с другом.

Таблица 2

## Биосовместимость штаммов бацилл, установленная методом перпендикулярных штрихов

Штаммы по вертикали	Штаммы по горизонтали								
	<i>B. p.</i> 4	<i>B. p.</i> 5	<i>B. p.</i> 6	<i>B. p.</i> 7	<i>B. p.</i> 16	<i>B. t.</i> 15	<i>B. l.</i> 8	<i>B. l.</i> 9	<i>B. l.</i> 10
<i>B. p.</i> 4		+	+	+	+	$\bar{-(12,0 \pm 1,0)}$	$\bar{-(2,3 \pm 0,6)}$	+	$\bar{-(2,0 \pm 0,0)}$
<i>B. p.</i> 5	+		+	+	+	$\bar{-(9,7 \pm 2,1)}$	$\bar{-(2,3 \pm 0,6)}$	+	$\bar{-(2,3 \pm 0,6)}$
<i>B. p.</i> 6	+	+		+	+	$\bar{-(10,0 \pm 1,0)}$	$\bar{-(2,3 \pm 0,6)}$	+	$\bar{-(3,0 \pm 0,0)}$
<i>B. p.</i> 7	+	+	+		+	$\bar{-(10,0 \pm 2,6)}$	$\bar{-(2,3 \pm 0,6)}$	+	$\bar{-(2,0 \pm 0,0)}$
<i>B. p.</i> 16	+	+	+	+		$\bar{-(10,0 \pm 1,0)}$	$\bar{-(2,8 \pm 0,3)}$	+	$\bar{-(3,0 \pm 0,0)}$
<i>B. t.</i> 15	$\bar{-(1,0 \pm 0,0)}$	$\bar{-(1,7 \pm 0,6)}$	$\bar{-(1,0 \pm 0,0)}$	$\bar{-(1,0 \pm 0,0)}$	$\bar{-(1,0 \pm 0,0)}$		+	+	+
<i>B. l.</i> 8	$\bar{-(6,0 \pm 0,0)}$	$\bar{-(5,7 \pm 0,6)}$	$\bar{-(5,3 \pm 0,6)}$	$\bar{-(6,0 \pm 1,0)}$	$\bar{-(5,7 \pm 1,2)}$	$\bar{-(5,7 \pm 0,6)}$		$\bar{-(4,0 \pm 1,0)}$	$\bar{-(4,0 \pm 0,0)}$
<i>B. l.</i> 9	$\bar{-(3,3 \pm 1,5)}$	$\bar{-(3,7 \pm 1,2)}$	$\bar{-(3,7 \pm 2,1)}$	$\bar{-(4,0 \pm 1,0)}$	$\bar{-(4,3 \pm 0,6)}$	$\bar{-(4,0 \pm 1,0)}$	$\bar{-(3,0 \pm 0,0)}$		$\bar{-(4,0 \pm 1,0)}$
<i>B. l.</i> 10	$\bar{-(1,7 \pm 0,6)}$	$\bar{-(1,7 \pm 0,6)}$	$\bar{-(2,7 \pm 0,6)}$	$\bar{-(1,6 \pm 1,2)}$	+	+	+	+	

Примечание: *B. p.* — *B. pumilus*; *B. t.* — *B. toyonensis*; *B. l.* — *B. licheniformis*; «+» — биосовместимы; «-» — антагонизм (M±mm в мм)

Высокая биосовместимость была зафиксирована для всех представителей вида *B. pumilus*. Штаммы под номерами 4, 5, 6, 7 и 16 не угнетали друг друга, а проявляли скорее нейтральные взаимоотношения. Возможно, для данных культур может быть характерно даже обоюдное стимулирование роста, но для установления этого необходимы дополнительные исследования.

По отношению к штаммам *B. licheniformis* 8 и 10, а также *B. toyonensis* 15 все 5 штаммов вида *B. pumilus* проявили антагонистический эффект, сильнее всего угнетая последний штамм (на 12 мм максимально). *B. toyonensis* 15 также слабо подавлял рост штаммов *B. pumilus* (от 1 до 1,7 мм), не ингибируя при этом рост всех представителей вида *B. licheniformis*.

Штаммы *B. licheniformis* 8 и 9 оказались антагонистами по отношению ко всем остальным природным штаммам бацилл и друг к другу (рис. 1). Вероятно, данные бактерии синтезируют бактериоцины, позволяющие им угнетать близкородственные виды бактерий [9]. Кроме того, они могут представлять собой вещества малой молекулярной массы, так как способны диффундировать в твердой среде. Штамм *B. licheniformis* 10 оказался биосовместимым со штаммами *B. toyonensis* 15, 2 другими представителями своего вида и *B. pumilus* 16, подавляя при этом всех остальных бацилл вида *B. pumilus* (от 1,6 до 2,7 мм).

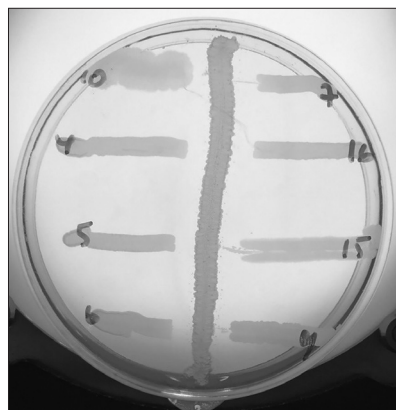


Рис. 1. Тест на биосовместимость штамма *B. licheniformis* 8 (вертикальный штрих) с другими штаммами бацилл

**Метод лунок.** Данный способ отличается от предыдущего тем, что здесь культура бактерий рода *Bacillus*, помещенная в лунки, первоначально инкубировалась в жидком агрегатном состоянии. Это могло поспособствовать накоплению не только низкомолекулярных, но и высокомолекулярных соединений, оказывающих влияние на тип взаимодействия бактерий. В таблице 3 изложены данные по биосовместимости бацилл при применении метода лунок. Приведенные результаты во многом совпадают с полученными в ходе исследования взаимоотношений бацилл методом перпендикулярных штрихов.

Таблица 3

**Биосовместимость штаммов бацилл, установленная методом лунок**

Штаммы в газонах	Штаммы в лунках								
	<i>B. p.</i> 4	<i>B. p.</i> 5	<i>B. p.</i> 6	<i>B. p.</i> 7	<i>B. p.</i> 16	<i>B. t.</i> 15	<i>B. l.</i> 8	<i>B. l.</i> 9	<i>B. l.</i> 10
<i>B. p.</i> 4		+	+	+	+	+	- (2,0±1,0)	+	+
<i>B. p.</i> 5	+		+	+	+	+	- (1,3±0,6)	+	+
<i>B. p.</i> 6	+	+		+	+	+	- (3,3±0,6)	+	+
<i>B. p.</i> 7	+	+	+		+	+	- (1,7±0,6)	+	+
<i>B. p.</i> 16	+	+	+	+		+	- (2,7±0,6)	+	+
<i>B. t.</i> 15	- (1,7±0,6)	- (1,7±0,6)	- (2,7±0,6)	- (1,0±0,0)	- (2,3±0,6)		- (1,0±0,0)	- (2,0±0,6)	- (1,0±0,0)
<i>B. l.</i> 8	-	-	-	-	-	+		-	-
<i>B. l.</i> 9	+	+	+	+	+	+	- (1,0±0,0)		+
<i>B. l.</i> 10	+	+	+	+	+	+	- (1,0±0,0)	+	

Примечание: *B. p.* – *B. pumilus*; *B. t.* – *B. toyonensis*; *B. l.* – *B. licheniformis*; «+» – биосовместимы; «-» – антагонизм (M±mm в мм)



Штаммы вида *B. pumilus* снова продемонстрировали высокую биосовместимость между собой. А штамм *B. toyonensis* 15 оказался наименее устойчивым, так как все остальные бактерии подавляли рост его газона (на 3,3 мм максимально) (рис. 2). Возможно, это обусловлено тем, что данный штамм единственный из исследуемых принадлежит к группе *B. cereus*, а не *B. subtilis* [12].

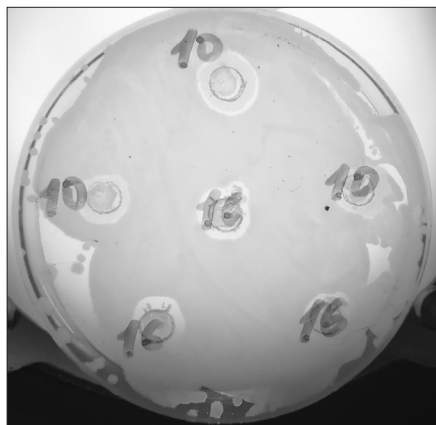


Рис. 2. Тест на биосовместимость штаммов *B. toyonensis* 15 (газон) с *B. licheniformis* 10 и *B. pumilus* 16 (лунки и область вокруг них)

Для штамма *B. licheniformis* 8 снова зафиксирован сильный антагонистический эффект. Газон данной бактерии препятствовал росту других исследуемых бактерий даже в их лунках (кроме штамма *B. toyonensis* 15). Поэтому полученные результаты свидетельствуют об абсолютном уровне антагонистического действия. А штамм *B. licheniformis* 9, наоборот, оказался биосовместимым с другими бактериями.

Таким образом, для установления типа взаимоотношений между бактериями необходимо использовать различные микробиологические методы. Это обусловлено тем, что при различных условиях (консистенция среды, совместное/отсроченное культивирование и т.д.) могут срабатывать различные механизмы взаимодействия, в частности — антагонизма.

### Заключение

Штаммы *B. licheniformis* 9 и 10, а также *B. toyonensis* 15 в разной степени подавляли рост других исследуемых бактерий. *B. licheniformis* 8 оказался самым сильным антагонистом по отношению ко всем изучаемым представителям рода *Bacillus*.

Биосовместимость штаммов вида *B. pumilus* (4, 5, 6, 7 и 16) подтверждена обоими используемыми методами (перпендикулярных штрихов и лунок). Поэтому

именно они рекомендованы для создания мультиштаммового биопрепарата для сельского хозяйства.

### Литература

1. Васильева Е.Н., Ахтемова Г.А., Жуков В.А., Тихонович И.А. Эндофитные микроорганизмы в фундаментальных исследованиях и сельском хозяйстве // Экологическая генетика. — 2019. — Т. 17. — № 1. — С. 19–32.
2. Волкова Г.С., Куксова Е.В., Сербя Е.М. Изучение биологических межштаммовых взаимодействий и ростовых свойств производственных штаммов молочнокислых бактерий // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. — 2020. — Т. 1. — № 1(1). — С. 104–109.
3. Иванова Е.В. Роль бифидофлоры в ассоциативном симбиозе кишечной микробиоты человека: дис. ... док. биол. наук. — Оренбург, 2018. — 295 с.
4. Иркитова А.Н., Каган Я.Р. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий // Известия Алтайского государственного университета. — 2012. — № 3. — С. 41–44.
5. Ковалевская В.С., Молодкина Н.Р., Тимофеев Т.И. Изучение биосовместимости и биотехнологических свойств молочнокислых бактерий // Научные труды Кубанского государственного технологического университета. — 2016. — № 14. — С. 284–288.
6. Красникова Л.В. Микробиология. — Санкт-Петербург: Трицкий мост, 2015. — 296 с.
7. Малкова А.В., Евдокимов И.Ю., Ширманов М.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е. Разработка пробиотика для животных и аквакультуры на основе штаммов *Bacillus toyonensis* В-13249 и *Bacillus pumilus* В-13250 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. — 2021. — № 11(3). — С. 393–402.
8. Смирнова И.Э., Саданов А.К. Целлюлитические бактерии и ассоциация эффективных микроорганизмов для биоконтроля корневых гнилей сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Сельскохозяйственная биология. — 2019. — Т. 54(5). — С. 1041–1051.
9. Тагиева С.А., Гахраманова Ф.Х. Преимущества применения бактериоцидных препаратов по сравнению с химическими антибиотиками для лечения инфекций у человека и животных // Вестник Воронежского государственного университета. — 2020. — № 4. — С. 122–128.
10. Фатина П.Н. Применение микробиологических препаратов в сельском хозяйстве // Вестник Астраханского государственного технического университета. — 2007. — № 4(39). — С. 133–136.
11. García-Bayona L., Comstock L.E. Bacterial antagonism in host-associated microbial communities // Science. — 2018. — Vol. 361(6408). — Art. eaat2456. doi: 10.1126/science.aat2456.

12. Jimenez G., Urdiain M., Cifuentes A., López-López A., Blanch A.R., Tamames J., Kämpfer P., Kolstø A.B., Ramón D., Martínez J.F., Codoñer F.M., Rosselló-Móra R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations // Systematic and Applied Microbiology. — 2013. — Vol. 36(6). — P. 383–391.
6. Krasnikova LV. Mikrobiologiya. Sankt-Peterburg: Troitskiy most, 2015: 296 (in Russian).
7. Malkova AV, Yevdokimov IYu, Shirmanov MV, Irkitova AN, Dudnik DYe. Razrabotka probiotika dlya zhivotnykh i akvakul'tury na osnove shtammov *Bacillus toyonensis* V-13249 i *Bacillus pumilus* V-13250. Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya 2021; 11(3):393–402 (in Russian).
8. Smirnova IE, Sadanov AK. Tsellyulolicheskiye bakterii i assotsiatsiya effektivnykh mikroorganizmov dlya biokontrolya korneyvykh gniley sakharnoy svekly (*Beta vulgaris* L.). Sel'skokhozyaystvennaya biologiya 2019; 54(5):1041–1051 (in Russian).
9. Tagiyeva SA, Gakhramanova FK. Preimushchestva primeneniya bakteriotsinnykh preparatov po sravneniyu s khimicheskimi antibiotikami dlya lecheniya infektsiy u cheloveka i zhivotnykh. Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta 2020; 4:122–128 (in Russian).
10. Fatina PN. Primeneniye mikrobiologicheskikh preparatov v sel'skom khozyaystve. Vestnik Astrakhanskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta 2007; 4(39):133–136 (in Russian).
11. García-Bayona L, Comstock LE. Bacterial antagonism in host-associated microbial communities. Science 2018; 361(6408):eaat2456. doi: 10.1126/science.aat2456.
12. Jimenez G, Urdiain M, Cifuentes A, López-López A, Blanch AR, Tamames J, Kämpfer P, Kolstø AB, Ramón D, Martínez JF, Codoñer FM, Rosselló-Móra R. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. Systematic and Applied Microbiology 2013; 36(6):383–391.

## References

## BIOCOMPATIBILITY OF NATURAL BACILLI STRAINS PROSPECTIVE FOR INCLUSION IN THE MICROBIAL BIOPREPARATION COMPOSITION

A.V. MALKOVA, A.N. IRKITOVA, D.E. DUDNIK

*Altai State University, Barnaul*

The biocompatibility of nine natural strains of the genus *Bacillus* bacteria (species *B. pumilus*, *B. toyonensis*, and *B. licheniformis*) was studied within the framework of this research. The diffusion methods of perpendicular bands and wells were used for this. It was found that all five strains of the *B. pumilus* species are compatible with each other. Representatives of other studied bacilli species to varying degrees showed antagonistic action in relation to the rest of the study objects.

**Keywords:** *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus toyonensis*, bacilli, biocompatibility, antagonism, biopreparations.

### Address:

Malkova A.V.

postgraduate student of the Department of Ecology, Biochemistry and Biotechnology of the Institute of Biology and Biotechnology,

Junior Researcher of the Research Center «Prombiotech» Altai State University

E-mail: gelishka96@mail.ru

**Для цитирования:**

Малкова А.В., Иркитова А.Н., Дудник Д.Е. Биосовместимость природных штаммов бацилл, перспективных для включения в состав микробного биопрепарата. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(1):38–43.

**For citation:**

Malkova A.V., Irkitova A.N., Dudnik D.E. Biocompatibility of natural bacilli strains prospective for inclusion in the microbial biopreparation composition. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(1):38–43 (in Russian).

## ОПТИМИЗАЦИЯ НАБОРА ШТАММОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА СЫВОРОТКИ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ХОЛЕРНОЙ НЕ О1 ГРУППЫ О139

М.В. ОВЧИННИКОВА, А.С. ФЕСЬКОВА\*, И.В. ШУЛЬГИНА, О.А. ЛОБОВИКОВА, Т.Ю. КИРИЛЛОВА, Л.В. ЗАЙЦЕВА, Н.П. МИРОНОВА, С.С. ГАЛЕТОВА, А.К. НИКИФОРОВ

ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб», Саратов

В ходе проведения мониторинга объектов окружающей среды, исследования клинического материала от подозрительных на холеру больных для идентификации выделенной культуры схема лабораторной диагностики предполагает постановку реакции агглютинации с холерными агглютинирующими сыворотками О1 и О139 серогрупп. При серийном выпуске сыворотки диагностической холерной не О1 группы О139 адсорбированной кроличьей для реакции агглютинации на этапе выпускающего контроля качества нормативной документацией предусмотрено использование 83 штаммов *V. cholerae* не О1 О2-83 групп. Это является продолжительным по времени, высокочувствительным и трудоемким процессом, в том числе и в плане обеспечения биологической безопасности. В данном исследовании проведен сравнительный анализ культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств холерных вибрионов О2-83 групп для дальнейшей корректировки контрольного набора штаммов. На основании полученных результатов определены предполагаемые кандидаты для выпускающего контроля качества сыворотки диагностической холерной не О1 группы О139.

**Ключевые слова:** холерные вибрионы не О1 не О139 серогруппы, диагностическая сыворотка, контроль специфической активности.

### Введение

Несмотря на усилия ВОЗ по реализации стратегии борьбы с холерой в соответствии с резолюцией 71-Q (WHA71.4) [9], данное заболевание продолжает оставаться одной из значимых социальных инфекций и представляет серьезную угрозу как для мирового, так и для отечественного здравоохранения. По оценкам ВОЗ, во всем мире ежегодно констатируется от 1,3 до 4,0 миллионов случаев заболевания холерой, которые заканчиваются летальным исходом у 21000–143000 больных [10]. За период с 2011 по 2020 гг. в 97 странах мира зарегистрировано 4413988 случаев холеры с общей тенденцией к снижению заболеваемости. Однако в связи с продолжением эпидемических проявлений холеры в эндемичных странах Азии, Африки и Америки эпидемиологическая ситуация по холере на

этих континентах в 2020 г. характеризовалась как неблагоприятная [6].

Эпидемиологическая обстановка по холере в Российской Федерации определяется периодическими завозами инфекции российскими туристами, возвращающимися из эндемичных по этому заболеванию стран, а также контаминацией *V. cholerae* О1 и *V. cholerae* О139 серогрупп поверхностных водоемов, используемых в качестве источников водоснабжения и водопользования [3].

Этиологическим фактором вспышек заболевания являются *V. cholerae* О1 и О139 серогрупп. Штаммы *V. cholerae* О139, впервые выявленные во время эпидемии холеры в Бангладеш в 1992 году, в настоящее время имеют ограниченное распространение, в основном, в странах Юго-Восточной Азии.

В ходе проведения мониторинга объектов окружающей среды, исследования клинического материала от подозрительных на холеру больных для идентификации выделенной культуры предусмотрена постановка реакции агглютинации с холерными агглютинирующими сыворотками О1 и О139 серогрупп [4, 5].

С 1983 года Институт «Микроб» является единственным производителем «Сыворотки диагностической холерной не О1 группы О139 адсорбированной кроличьей для РА» (Приказ Минздрава СССР № 1023

© 2022 г. Овчинникова М.В., Феськова А.С., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Кириллова Т.Ю., Зайцева Л.В., Миронова Н.П., Галетова С.С., Никифоров А.К.

\* Автор для переписки:

Феськова Анна Сергеевна

мл.н.с. отдела стандартизации, качества и метрологии ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»

E-mail: feskovaas@yandex.ru

от 31 августа 1983 г.), в настоящее время зарегистрированной в качестве медицинского изделия (№ ФСР 2008/03209). Экспрессность и простота постановки реакции слайд-агглютинации наряду с высокой чувствительностью и специфичностью данного диагностикума обуславливает его востребованность при идентификации чистых культур *V. cholerae* O139.

Препарат представляет собой сыворотку крови кроликов, иммунизированных корпускулярным O-антигеном штамма *Vibrio cholerae* O139, инаktivированного нагреванием при температуре  $100 \pm 1$  °С в течение 2 ч. Сыворотка адсорбирована убитыми формалином холерными вибрионами не O1 группы O22 серогруппы, которые дают положительную реакцию агглютинации с сывороткой до адсорбции.

Для производства используют штаммы *Vibrio cholerae* O139 № Р-16064 и *V. cholerae* O22 № 169-68 из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб».

Для контроля аналитической чувствительности сыворотки холерной O139 применяют 5 штаммов *V. cholerae* O139, не входящих в состав антигена для иммунизации. Для контроля аналитической специфичности используют по 2 штамма *V. cholerae* O1 классического и эльтор биоваров серовара *Ogawa* и *Inaba* и 82 штамма *V. cholerae* O2-O83 серогрупп.

Как показывает многолетняя практика серийного производства сыворотки холерной O139, результаты контроля специфичности готового препарата неизменно констатировали отсутствие агглютинации всех штаммов *V. cholerae* O2-O83 серогрупп вышеобозначенным препаратом. Целесообразность использования полного комплекта 82 серовариантов при выпускающем контроле качества каждой производственной серии сыворотки вызывает вопрос и является продолжительным по времени, высокочрезвычайно трудоемким процессом, в том числе и в рамках обеспечения биологической безопасности.

Вместе с тем снижение микробиологических рисков и повышение рентабельности производства являются актуальными исследованиями по оптимизации набора штаммов *V. cholerae* O2-O83 серогрупп для контроля качества готового диагностического препарата сыворотки холерной не O1 группы O139.

В связи с этим целью настоящего исследования являлось проведение сравнительного анализа культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств *V. cholerae* не O1/не O139 для выявления сходных серовариантов для дальнейшей корректировки контрольного набора штаммов.

## Материалы и методы

Использовали штаммы *V. cholerae* не O1 O2-O83 серогрупп, полученных из ГКПБ «Микроб».

Морфологию вибрионов изучали микроскопией мазков, окрашенных по Грамму, приготовленных из 18–24-часовых бульонных или агаровых культур, выращенных при температуре  $37 \pm 1$  °С на бульоне и агаре Хоттингера рН  $7,6 \pm 0,1$ . Культуральные свойства холерных вибрионов изучали в посевах на бульоне и чашках Петри с агаром Хоттингера рН  $7,6 \pm 0,1$ . Посевы просматривали через 18–20 ч инкубации при температуре  $37 \pm 1$  °С.

Подвижность холерных вибрионов определяли под микроскопом в висячей или раздавленной капле. Препараты готовили из 18–20-часовой агаровой или 3–5-часовой бульонной культуры холерных вибрионов, выращенной при температуре  $37 \pm 1$  °С.

Ферментацию аминокислот *V. cholerae* O2-O83 изучали прямым посевом агаровой культуры на бульоне Мюллера, ферментацию сахаров — на средах Гисса.

Проверку серологических свойств штаммов холерных вибрионов O2-O83 серогрупп проводили в объемной реакции агглютинации с коммерческими сериями сывороток холерных O1, RO, типовыми Инаба, Огава и в реакции слайд-агглютинации с сывороткой диагностической не O1 группы O139 с соответствующими сроками годности. Также исследовали штаммы в реакции агглютинации на стекле с полуфабрикатом сыворотки O139 без адсорбций.

Агглютинацию оценивали по общепринятой четырехкрестовой системе.

Для получения статистически достоверных результатов все опыты проводили в трех повторностях.

## Результаты и обсуждение

Все изученные микроорганизмы обладали типичными для вида *Vibrio* культурально-морфологическими свойствами. В мазках вибрионы имели вид слегка изогнутых грамотрицательных палочек, однообразных по величине и форме. Рост холерных вибрионов в S-форме в бульоне вызывал равномерное помутнение среды и образование нежной пленки. На агаровых средах через 18–20 ч колонии холерных вибрионов O2-O83 серогрупп в S-форме гладкие и прозрачные. Признаки S-R диссоциации у всех штаммов выявлены не были: в течение 3 дней хранения посевов при температуре  $20 \pm 2$  °С сохранялась S-форма колоний.

Все взятые в опыт вибрионы обладали подвижностью, некоторые слабой подвижностью.

Штаммы холерных вибрионов O22 серогруппы ферментировали с образованием кислоты сахарозу, маннозу и не ферментировали арабинозу; декарбоксилировали лизин, орнитин и не дигидрировали аргинин. Обладали оксидазной активностью. По способности ферментировать маннозу, сахарозу и арабинозу все взятые в опыт штаммы по классификации Б. Хейберга распределялись по группам следующим образом: I группа серовары: 2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 19, 22, 24, 26, 27, 28, 31, 33,

34, 35, 37, 38, 40, 42, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83; II группа: 5, 6, 7, 8, 13, 14, 18, 21, 23, 25, 29, 36, 39, 41, 44, 50, 51, 54, 67 сероварианты; V группа – 20, 30, 32 серовары.

Штаммы холерных вибрионов O5, O7, O9, O13, O21, O59 серогруппы дегидрировали аргинин. У штамма *V. cholerae* O23 отсутствовали свойства декарбоксилировать лизин и орнитин. Штаммы O5, O7, O9, O12, O13, O21, O23, O26, O50, O55, O71, O75 не декарбоксилировали орнитин (табл. 1).

Таблица 1

**Биохимическая и серологическая активность штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 серогрупп**

№ п/п	№ штамма	Сахароза	Манноза	Арабиноза	Лизин	Аргинин	Орнитин	Сыворотка диагностическая холерная O 1:50/1:100	Сыворотка диагностическая холерная RO 1:50/1:100	Сыворотка диагностическая холерная Iнаба 1:50/1:100	Сыворотка диагностическая холерная Oтава 1:50/1:100	Сыворотка диагностическая холерная O139/ неадсорб.
1	NCTC 4711 (O2, инв. № 9)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
2	NCTC 4715 (O3, инв. № 10)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-
3	NCTC 4716 (O4, инв. № 11)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
4	B 4202-64 (O5, инв. № 12)	+	-	-	+	+	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
5	7007-62 (O6, инв. № 13)	+	-	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
6	8394-62 (O7, инв. № 14)	+	-	-	+	+	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
7	10317-62 (O8, инв. № 15)	+	-	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
8	112-68 (O9, инв. № 16)	+	+	-	+	+	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
9	218-68 (O10, инв. № 17)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-
10	10843-62 (O11, инв. № 18)	+	+	+/-	+	-	+	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-
11	370-68 (O12, инв. № 19)	+	+	-	+	-	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
12	11416-62 (O13, инв. № 20)	+	-	-	+	+	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
13	B 8645-64 (O14, инв. № 21)	+	-	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
14	103-68 (O15, инв. № 22)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
15	223-68 (O16, инв. № 23)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
16	110-68 (O17, инв. № 24)	+	+/-	-	+	-	+	+/+	+/+	+/+	+/+	-/-
17	B 5257-64 (O18, инв. № 25)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
18	139-68 (O19, инв. № 26)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
19	10332-62 (O20, инв. № 27)	-	+	-	+	-	+	+/+	+/-	+/-	-/-	-/-
20	109-68 (O21, инв. № 28)	+	-	-	+	+	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
21	357 (сер. O22, инв. № KM-24)	+	+	-	+	-	+/-	++/-	-/-	-/-	-/-	-/+++
22	169-68 (O22)	+	+	-	+	-	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+++
23	180-68 (O23, инв. № 30)	+	-	+/-	-	-	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	++/-
24	14438-62 (O24, инв. № 31)	+	+/-	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
25	14821-62 (O25, инв. № 32)	+	-	+/-	+	-	+	+/-	-/-	+/-	-/-	-/+
26	173-68 (O26, инв. № 33)	+	+	-	+	-	-	+/-	-/-	+/-	-/-	-/-
27	10438-62 (O27, инв. № 34)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
28	12630-62 (O28, инв. № 35)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
29	161-68 (O29, инв. № 36)	+	-	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
30	12795-62 (O30, инв. № 37)	-	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
31	5473-62 (O31, инв. № 38)	+	-/+	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
32	171-68 (O32, инв. № 39)	-	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
33	151-68 (O33 инв. № 40)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-

34	152-68 (O34, инв. № 41)	+	+/-	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
35	1311-69 (O35, инв. № 42)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
36	1321-69 (O36, инв. № 43)	+	-	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
37	1322-69 (O37, инв. № 44)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
38	215-68 (O38, инв. № 45)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
39	225-68 (O39, инв. № 46)	+	-	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
40	П-258/1099 (O40, инв. № 47)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
41	14520 (O41, инв. № 48)	+	-	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
42	13030 (O42, инв. № 53)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
43	450 (O43, инв. № 50)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
44	М-296 (O44, инв. № 51)	+/-	-	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
45	Р-912 (O45, инв. № 58)	+	+	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
46	Р-907 (O46, инв. № 59)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
47	Р-1114 (O47, инв. № 60)	+	-/+	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
48	Р-6071 (O48, инв. № 61)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
49	Р-9507 (O49, инв. № 62)	+	-/+	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
50	Р-8845 (O50, инв. № 63)	+	+/-	-	+	-	-	-/-	++++/+++	-/-	-/-	-/-
51	Р-1422 (O51, инв. № 64)	+	+/-	-	+	-	+	-/-	++++/+++	-/-	-/-	-/-
52	Р-2302 (O52, инв. № 65)	+	+	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
53	Р-936 (O53, инв. № 66)	+	+/-	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
54	Р-4114 (O54, инв. № 67)	+	+/-	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
55	Р-9508 (O55, инв. № 68)	+	-/+	-	+	-	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
56	95 (O56, инв. № 69)	+	+	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
57	14947 (O57, инв. № М-252)	+	+/-	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
58	19131(O58, инв. № М-297)	+	-	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
59	125/121 (O59, инв. № М-298)	+	+/-	-	+	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
60	1881 (O60, инв. № КМ-1)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
61	154 (O61, инв. № КМ-2)	+	-/+	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
62	2810/291 (O62, инв. № КМ-3)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
63	Р-11972 (O63, инв. № КМ-4)	+	+	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
64	Р-12691 (O64, инв. № КМ-5)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
65	1206 (O65, инв. № КМ-6)	+	-/+	-	+/-	-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-
66	Р-12696 (O66, инв. № КМ-7)	+	-	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
67	316/77 (O67, инв. № КМ-16)	+	-/+	-	+/-	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
68	6931 (O68, инв. № КМ-15)	+	-/+	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
69	57 (O69, инв. № КМ-17)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
70	613 (O70, инв. № КМ-35)	+	-/+	-	+	-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
71	1150 (O71, инв. № КМ-36)	+	-/+	-	+	-	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
72	162 (O72, инв. № КМ-37)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
73	184 (O73, инв. № КМ-43)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
74	3761 (O74, инв. № КМ-44)	+	+/-	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
75	3792 (O75, инв. № КМ-45)	-/+	-/+	-	+	-	-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
76	2128 (O76, инв. № КМ-46)	+	+/-	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
77	8/1398 (O77, инв. № КМ-47)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
78	1267 (O78, инв. № КМ-48)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
79	203 (O79, инв. № КМ-49)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
80	1790 (O80, инв. № КМ-50)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
81	4017 (O81, инв. № КМ-51)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
82	2 (O82, инв. № КМ-52)	+	-/+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
83	864 (O83, инв. № КМ-54)	+	+	-	+	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Штаммы *V. cholerae* O22–O83 в S-форме не агглютинировались холерными сыворотками O1, Инаба, Огава, RO до диагностических титров. Однако в данном опыте неоднократно регистрировали наличие агглютинации штаммов O3, O11, O17, O20, O25, O26, O65 серогрупп сывороткой Инаба в разведении 1:50 – 1:100, O17 серогруппы – сывороткой Огава, серовариантов O17,

O50, O51 – сывороткой RO и серовариантов O11, O17, O20, O25, O26 – сывороткой холерной O1 в аналогичных разведениях.

В отношении сыворотки холерной не O1 группы O139 в виде готового препарата и неадсорбированного полуфабриката группа контрольных штаммов O2-O83 серогрупп проявляла следующую активность: штаммы

*V. cholerae* O10, O24 серогрупп агглютинировались коммерческим препаратом сыворотки холерной не O1 группы O139. Штамм *V. cholerae* O25 сероварианта был чувствителен к полуфабрикату сыворотки O139.

Сравнительный анализ культурально-морфологических, серологических и биохимических свойств штаммов *V. cholerae* не O1/неO139 не выявил резких отличий между ними по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам, но показал отличия по серологическим признакам, что может быть основанием выбора кандидатов в группу контрольных штаммов.

В доступной литературе имеются сведения о распространенности генов основных и дополнительных факторов вирулентности типовых штаммов *V. cholerae* O2-O83 серогрупп. В геноме подавляющего большинства штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 серогрупп отсутствуют гены основных факторов патогенности — холерного токсина *ctxAB* и токсинрегулируемых пилей адгезии *tcpA*. В то же время у ряда штаммов, выделенных в эпидемически значимые периоды или на эндемичных территориях, обнаружены генетические детерминанты факторов патогенности [1, 8]. Поэтому целесообразно включение в состав контрольных штаммов потенциально опасных серовариантов *V. cholerae* не O1/не O139. Таковыми являются штаммы *V. cholerae* O37 и O61 сероваров, имеющие в своем составе ген *ctxAB*.

По данным А.В. Фадеевой [8], при проведении ПЦР анализа 270 штаммов *V. cholerae* O2-O83 серогрупп, выделенных на территории Российской Федерации и за рубежом, было обнаружено, что данные микроорганизмы имели большое содержание генов патогенности, состав которых был смешанным, не встречающимся в таких комбинациях у эпидемически значимых штаммов O1 и O139 серогрупп. Данный факт дает основание предполагать, что эти штаммы не являются производными последних и представляют собой отдельные филогенетические линии эволюции и имеют различные профили амплификации, отличные друг от друга и от вирулентных штаммов O1 и O139 серогрупп.

Необходимо отметить, что в ходе исследований в области геносистематики *V. cholerae* не O1/не O139 серогрупп установлено несоответствие сероваров 12 (№ 370-68), 23 (№ 180-68) и 26 (№ 173-68) таксономическим критериям вида *Vibrio cholerae* и определена их принадлежность к виду *V. fluvialis* [1, 2], что является основанием для исключения этих штаммов из коллекции контрольных.

Таким образом, в результате детального культурально-морфологического, биохимического, серологического анализа, а также анализа литературы, посвященной

изучению распространения генов факторов патогенности и персистенции у штаммов *V. cholerae* не O1/неO139 серогрупп, были определены вероятные кандидаты в контрольные штаммы микроорганизмов O3, O10, O11, O17, O20, O24, O25, O26, O37, O50, O51, O61, O65 серовариантов для постановки контроля специфической активности готового препарата сывороткой диагностической не O1 группы O139. Существенное уменьшение числа контрольных штаммов с 82 до 13 не только позволит повысить рентабельность производства, но и значительно снизит биологические риски при работе с микроорганизмами I–IV групп патогенности.

Однако для внедрения в выпускающий контроль качества сыворотки холерной O139 серогруппы скорректированного набора контрольных штаммов для подтверждения аналитической специфичности необходимо дальнейшее проведение серий предварительных лабораторных и технических испытаний, по результатам которых будет пересмотрен комплект нормативной и технической документации сыворотки диагностической холерной не O1 группы O139 адсорбированной кроличьей для реакции агглютинации (РА) на стекле с целью внесения изменений в регистрационное досье медицинского изделия [7].

## Литература

1. Авдеева Е.П. Совершенствование метода серологической идентификации холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Ростов-на-Дону, 2006. — 22 с.
2. Гальцева Г.В., Зайденов А.М., Черноусова Э.Л. и др. Холероподобный гастроэнтерит, обусловленный вибрио флювиалис / Сб. науч. трудов. Новороссийск, 1994. — Вып. 1. — С. 129–132.
3. Москвитина Э.А. Холера: мониторинг эпидемиологической обстановки в мире и России (2010–2019 гг.). Прогноз на 2020 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — Вып. 2. — С. 38–47.
4. МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры».
5. МУК 4.2.2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней».
6. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Монахова Е.В., Левченко Д.А., Янович Е.Г., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б., Подойницына О.А., Ежова М.И. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2021. — Вып. 1. — С. 43–51.
7. Приказ МЗ РФ от 19 января 2017 г. N 11н «Об утверждении требований к содержанию технической и эксплуата-



- тационной документации производителя (изготовителя) медицинского изделия».
8. Фадеева А.В. Молекулярно-генетический анализ штаммов не O1/не O139 серогрупп: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Саратов, 2012. — 22 с.
  9. Электронный ресурс. — Режим доступа: [https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA71/A71\\_ACONF3Rev1-en.pdf](https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA71/A71_ACONF3Rev1-en.pdf) Cholera prevention and control. Seventy-first world health assembly, Agenda item 11.2. URL (дата обращения 23.06.2021).
  10. Электронный ресурс. — Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cholera/> (дата обращения 18.06.2021).
  4. МУК 4.2.2218-07 «Laboratornaya diagnostika kholery». (in Russian).
  5. МУК 4.2.2870-11 «Poryadok organizatsii i provedeniya laboratornoy diagnostiki kholery dlya laboratoriy territorial'nogo, regional'nogo i federal'nogo urovney» (in Russian).
  6. Noskov AK, Kruglikov VD, Moskvitina EA, Monakhova YeV, Levchenko DA, Yanovich YeG, Vodop'yanov AS, Pisanov RV, Nepomnyashchaya NB, Podoynitsyna OA, Yezhova MI. Kharakteristika epidemiologicheskoy situatsii po kholere v mire i v Rossiyskoy Federatsii v 2020 g. i prognoz na 2021 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2021; 1:43–51 (in Russian).
  7. Prikaz MZ RF ot 19 yanvarya 2017 g. N 11n «Ob utverzhdenii trebovaniy k sodержaniyu tekhnicheskoy i ekspluatatsionnoy dokumentatsii proizvoditelya (izgotovityela) meditsinskogo izdeliya» (in Russian).
  8. Fadeyeva AV. Molekulyarno-geneticheskiy analiz shtammov ne O1/не O139 serogrupp: avtoref dis ... kand biol nauk. Saratov, 2012: 22 (in Russian).
  9. Elektronnyy resurs. Rezhim dostupa: [https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA71/A71\\_ACONF3Rev1-en.pdf](https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA71/A71_ACONF3Rev1-en.pdf) Cholera prevention and control. Seventy-first world health assembly, Agenda item 11.2. URL (data obrashcheniya 23.06.2021) (in Russian).
  10. Elektronnyy resurs. Rezhim dostupa: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cholera/> (data obrashcheniya 18.06.2021). (in Russian).

## References

1. Avdeyeva YeP. Sovershenstvovaniye metoda serologicheskoy identifikatsii kholernykh vibriionov ne O1/не O139 serogrupp: avtoref dis ... kand med nauk. Rostov-na-Donu, 2006: 22 (in Russian).
2. Gal'tseva GV, Zaydenov AM, Chernousova EL i dr. Kholeropodobnyy gastroenterit, obuslovlennyy vibrio flyuvialis. Sb nauch trudov. Novorossiysk, 1994; 1:129–132 (in Russian).
3. Moskvitina EA. Kholera: monitoring epidemiologicheskoy obstanovki v mire i Rossii (2010–2019 gg.). Prognoz na 2020 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2020; 2:38–47 (in Russian).
4. МУК 4.2.2218-07 «Laboratornaya diagnostika kholery». (in Russian).
5. МУК 4.2.2870-11 «Poryadok organizatsii i provedeniya laboratornoy diagnostiki kholery dlya laboratoriy territorial'nogo, regional'nogo i federal'nogo urovney» (in Russian).
6. Noskov AK, Kruglikov VD, Moskvitina EA, Monakhova YeV, Levchenko DA, Yanovich YeG, Vodop'yanov AS, Pisanov RV, Nepomnyashchaya NB, Podoynitsyna OA, Yezhova MI. Kharakteristika epidemiologicheskoy situatsii po kholere v mire i v Rossiyskoy Federatsii v 2020 g. i prognoz na 2021 g. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2021; 1:43–51 (in Russian).
7. Prikaz MZ RF ot 19 yanvarya 2017 g. N 11n «Ob utverzhdenii trebovaniy k sodержaniyu tekhnicheskoy i ekspluatatsionnoy dokumentatsii proizvoditelya (izgotovityela) meditsinskogo izdeliya» (in Russian).
8. Fadeyeva AV. Molekulyarno-geneticheskiy analiz shtammov ne O1/не O139 serogrupp: avtoref dis ... kand biol nauk. Saratov, 2012: 22 (in Russian).
9. Elektronnyy resurs. Rezhim dostupa: [https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA71/A71\\_ACONF3Rev1-en.pdf](https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA71/A71_ACONF3Rev1-en.pdf) Cholera prevention and control. Seventy-first world health assembly, Agenda item 11.2. URL (data obrashcheniya 23.06.2021) (in Russian).
10. Elektronnyy resurs. Rezhim dostupa: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/cholera/> (data obrashcheniya 18.06.2021). (in Russian).

## OPTIMIZATION OF A SET OF STRAINS FOR QUALITY CONTROL SERUM DIAGNOSTIC CHOLERA NON-O1 GROUP O139

M.V. OVCHINNIKOVA, A.S. FESKOVA, I.V. SHULGINA, O.A. LOBOVIKOVA, T.Yu. KIRILLOVA, L.V. ZAITSEVA, N.P. MIRONOVA, S.S. GALETOVA, A.K. NIKIFOROV

*Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov*

During the monitoring of environmental objects, the study of clinical material from patients suspected of cholera to identify the isolated culture, the laboratory diagnostic scheme involves the formulation of an agglutination reaction with cholera agglutinating sera O1 and O139 serogroups. In the serial production of diagnostic cholera serum of group O139 of group O1 adsorbed rabbit for an agglutination reaction at the stage of producing quality control, the regulatory documentation provides for the use of 83 strains *V. cholerae* is not O1 O2-83 groups. This is a long-term, high-cost and time-consuming process, including in terms of ensuring biological safety. In this study, a comparative analysis of the cultural-morphological, biochemical and serological properties of cholera vibriions of groups O2-83 was carried out for further adjustment of the control set of strains. On the basis of the obtained results, the prospective candidates for the final quality control of the diagnostic cholera serum of the O1 group O139 were determined

**Keywords:** cholera vibriions not O1 not O139 serogroups, diagnostic serum, control of specific activity.

### Address:

Feskova A.S.

junior researcher of the department of standardization, quality and metrology of the Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe»

E-mail: feskovaas@yandex.ru

**Для цитирования:**

Овчинникова М.В., Феськова А.С., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Кириллова Т.Ю., Зайцева Л.В., Миронова Н.П., Галетова С.С., Никифоров А.К. Оптимизация набора штаммов для контроля качества сыворотки диагностической холерной не О1 группы О139. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова 2022; 18(1):44–50.

**For citation:**

Ovchinnikova M.V., Feskova A.S., Shulgina I.V., Lobovikova O.A., Kirillova T.Yu., Zaitseva L.V., Mironova N.P., Galetova S.S., Nikiforov A.K. Quality control improvement of diagnostic cholera non O1 group O139 serum. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(1):44–50 (in Russian).

## ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОБИОТЫ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ ДЕТЕЙ ПРИ САМОПРОИЗВОЛЬНЫХ И ОПЕРАТИВНЫХ РОДАХ

О.А. ПЕТРОВА\*, В.М. ЧЕРВИНЕЦ, Ю.В. ЧЕРВИНЕЦ

Тверской государственной медицинской университет, Тверь

В работе ставилась цель провести мониторинг состава микрофлоры верхних дыхательных путей, ротовой жидкости, содержимого желудка и толстой кишки у недоношенных новорожденных детей при самопроизвольных и оперативных родах. В исследование включены 60 недоношенных новорожденных детей. Проводили бактериологическое исследование с применением оптимальных питательных сред (HiMedia) и идентификационных систем (bio Mérieux Vitek, Inc). В верхних дыхательных путях отмечается нормобиоценоз, причем, частота встречаемости золотистого стафилококка в 2,5 раза ниже у новорожденных, появившихся на свет оперативным путем. В ротовой жидкости на фоне нормобиоценоза у новорожденных при оперативных родах в 4 раза реже выделялся золотистый стафилококк, но чаще в 1,5–3 раза изолировались стрептококки и энтерококки. В содержимом желудка при оперативных родах в 2 раза реже, чем при самопроизвольных родах выделялись *Bifidobacterium* spp. и *Escherichia coli*, в 1,5 раза *Lactobacillus* spp. и *Staphylococcus aureus*. В содержимом толстой кишки *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. и *Escherichia coli* изолировались почти одинаково. При оперативных родах по сравнению с новорожденными при самопроизвольных родах в 2 раза чаще изолировались *Peptostreptococcus* spp., в 1,5 раза — *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Bacillus* spp. Заключают, что у недоношенных новорожденных детей при самопроизвольных и оперативных родах достоверного значения не получено в формировании микробиоты содержимого желудка и толстой кишки.

**Ключевые слова:** микробиота, новорожденные, самопроизвольные роды, оперативное родоразрешение.

### Введение

Установлена значимость способа родоразрешения в определении характера микробной колонизации младенца. Исследования показали, что респираторная микробиота независимо от способа родов меняется в течение одного дня от переменного смешанного бактериального сообщества с преобладанием *Streptococcus viridans*. Изначально у новорожденных преобладает *Staphylococcus aureus*, затем происходит смена с преобладанием *Corynebacterium pseudodiphtheriticum/propinquum*, *Dolosigranulum pigrum*, *Moraxella catarrhalis/nonliquefaciens*, *Streptococcus pneumoniae* или *Haemophilus influenzae*. У младенцев, рожденных путем кесарева сечения, наблюдается задержка в общем развитии респираторных микробиот и уменьшение колонизации нормальной микрофлоры, такими как *Corynebacterium* и *Dolosigranulum*, что влияет

на состояние органов дыхательной системы в течение жизни [1–8, 10].

По данным норвежских ученых, установлено, что кишечная микробиота у детей, родившихся недоношенными, отличается низким разнообразием и пониженным содержанием анаэробных бактерий. Выявлено наличие у недоношенных детей специфической микробиоты, не зависящей от неонатальной среды [9]. Исследователями из Вашингтонского университета отмечено, что родившиеся до срока младенцы обладают иным набором кишечных бактерий, чем доношенные дети. В кишечнике новорожденных спектр микроорганизмов гораздо ниже. Независимо от возраста ребенка в момент рождения, независимо от типа диеты, от применяемых антибиотиков, микробная популяция развивалась достаточно стандартно. Авторами обнаружено, что три основных класса бактерий — бациллы, гаммапротеобактерии и кластридии колонизировали кишечник недоношенных детей [11].

Различия количественного и качественного состава микрофлоры новорожденных детей может меняться в широких пределах у детей разных регионов, поэтому представляет интерес изучение особенности формирования микробиома в сравнительном аспекте у

© 2022 г. Петрова О.А., Червинец В.М., Червинец Ю.В.

\* **Автор для переписки:**

Петрова Ольга Александровна

аспирант кафедры микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава РФ

E-mail: ollgap@mail.ru

недоношенных новорожденных детей в зависимости от способа родоразрешения.

Цель работы — провести мониторинг состава микрофлоры верхних дыхательных путей, ротовой жидкости, содержимого желудка и толстой кишки у недоношенных новорожденных детей при самопроизвольных и оперативных родах.

### Материалы и методы

Проведено исследование микрофлоры указанных биотопов у 60 недоношенных новорожденных детей. Первичный забор материала проводился в первые 3–6 суток жизни ребенка. Работа проводилась с разрешения этического комитета ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России. Материал собирали в стерильные пробирки, в течение 2 часов доставляли в бактериологическую лабораторию кафедры микробиологии и вирусологии Тверского ГМУ. Для выделения факультативно анаэробных и аэробных бактерий использованы следующие питательные среды: хромогенный селективный агар для уропатогенных кишечных бактерий, маннит-солевой агар (M118) — для стафилококков, агар Баэрда — Паркера — для выявления лецитиназной активности, HiCrome Bacillus Agar — для обнаружения и идентификации бацилл, МРС лактоагар — для лактобацилл, HiCrome Enterococcus faecium Agar — для энтерококков, желчно-эскулиновый агар — для бактероидов, шоколадный агар — для нейссерий, хромогенные среды — для выявления дрожжевых грибов рода *Candida*, HiCrom Listeria Agar — для листерий, Mitis Salivarius Agar — для стрептококков (HiMedia). Для культивирования анаэробов были использованы бифидоагар и кровяной агар Шедлера.

Идентификация выделенных микроорганизмов осуществлялась по культуральным, морфологическим, тинкториальным свойствам. Количество выделенных микроорганизмов выражали в lg КОЕ/мл или КОЕ/г.

Статистическую обработку материала проводили с использованием программы «STATISTICA» (StatSoftRussia).

### Результаты

При самопроизвольных родах в верхних дыхательных путях выделялись (рис. 1): *Staphylococcus* spp. — в 47%, *Peptostreptococcus* spp. — в 42%, *Peptococcus* spp. — в 39%, *Staphylococcus aureus* и

*Stomatococcus* spp. — в 37%, *Streptococcus* spp. — в 29%, *Micrococcus* spp. — в 26%, *Streptococcus salivarius* и *Lactobacillus* spp. — в 21%, *Enterococcus* spp. и *Clostridium* spp. — в 19%, *Staphylococcus epidermidis* — в 18%, *Veillonella* spp. — в 16%, *Bacteroides* spp. — в 15%. Соответственно *Streptococcus pyogenes*, *Candida* spp., *Candida albicans*, *Bifidobacterium* spp., *Bacillus subtilis*, *Yersinia* spp., *Enterococcus faecalis*, *Neisseria* spp., *Bacillus* spp. и *Klebsiella* spp. наблюдались в 6–2%.

Количество микробиоты колебалось от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл у *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus pyogenes*, *Stomatococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Clostridium* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Veillonella* spp., *Klebsiella* spp., *Candida* spp., *Lactobacillus* spp., *Yersinia* spp., *Streptobacillus*. При этом меньше 4 lg КОЕ/мл было установлено у *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Neisseria* spp., *Candida albicans*, *Bifidobacterium* spp., *Bacillus* spp. и *Bacillus subtilis*.

При оперативных родах в верхних дыхательных путях выделялись: *Peptostreptococcus* spp. — в 71%, *Micrococcus* spp. — в 68%, *Staphylococcus* spp. — в 67%, *Streptococcus* spp. — в 34%, *Stomatococcus* spp. и *Bacteroides* spp. — в 28%, *Enterococcus* spp. — в 26%, *Peptococcus* spp. — в 24%, *Lactobacillus* spp. в — 17%, *Staphylococcus aureus* — в 15%, *Veillonella* spp. и *Clostridium* spp. — в 10%, *Streptococcus salivarius* — в 7%, *Staphylococcus epidermidis* — в 5%, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella* spp. и *Bacillus* spp. — в 4%, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Candida* spp. и *Enterobacteriaceae* — в 2%, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Prevotella* spp., *Actinomyces* spp., *Bacillus cereus* и *Bacillus coagulans* — в 1%.

В количестве от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл выделялись *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus salivarius*, *Stomatococcus* spp., *Clostridium* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Klebsiella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Prevotella* spp., *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacteriaceae*. Соответственно *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus* spp., *Veillonella* spp., *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Candida* spp., *Bacillus cereus* и *Bacillus coagulans* были выделены в количестве меньше 4 lg КОЕ/мл.

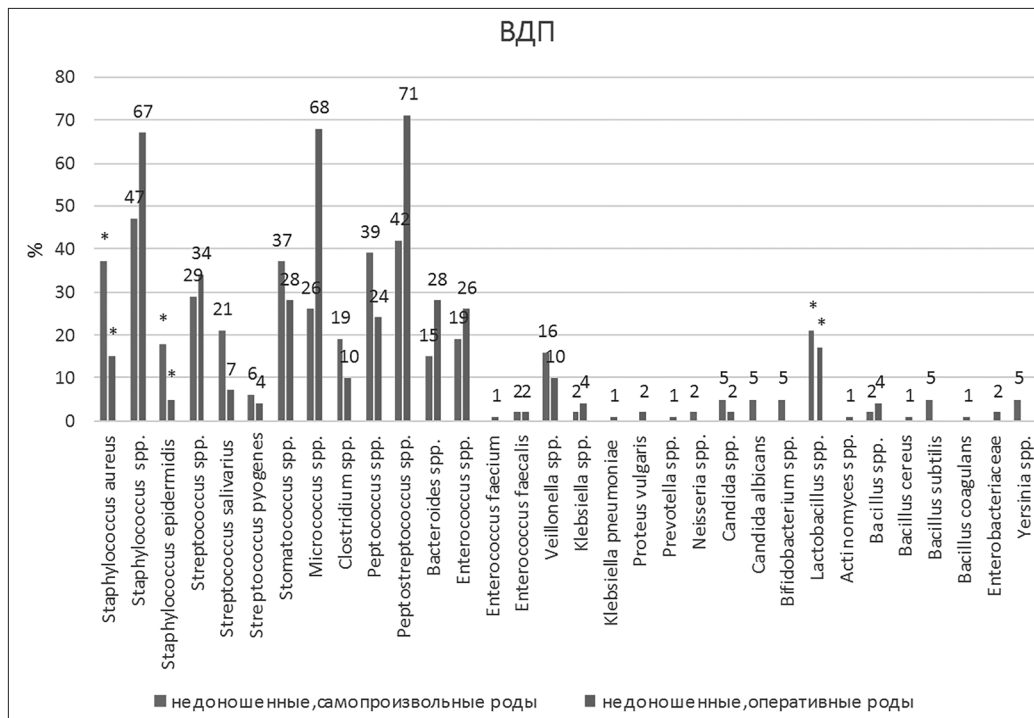


Рис. 1. Частота встречаемости микроорганизмов верхних дыхательных путей у недоношенных новорожденных при самопроизвольных и оперативных родах.

Примечание: В парах столбиков слева — недоношенные, самопроизвольные роды (во всех рисунках); \* — достоверно значимые значения для микроорганизмов при  $p < 0,05$

При самопроизвольных родах в ротовой жидкости (рис. 2) в 68% выделялись *Staphylococcus* spp., в 52% — *Peptostreptococcus* spp., в 42% — *Stomatococcus* spp., в 39% — *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus* spp., в 35% — *Peptococcus* spp. и *Micrococcus* spp., в 32% — *Clostridium* spp., в 26% — *Streptococcus salivarius*, в 23% — *Lactobacillus* spp., в 19% — *Bacteroides* spp. и *Veillonella* spp., в 16% — *Enterococcus* spp. и *Staphylococcus epidermidis*, в 13% — *Streptococcus pyogenes*, в 10% — *Bacillus subtilis* и *Candida albicans*, в 6% — *Streptobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. и в 3% — *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* spp., *Candida* spp., *Bacillus* spp., *Bacillus cereus* и *Yersinia* spp.

В таких условиях количественный состав микробиоты колебался от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл у *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Streptococcus salivarius*, *Stomatococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Clostridium* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Veillonella* spp., *Candida* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. и *Yersinia* spp.; но меньше 4 lg КОЕ/мл было определено у *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella* spp., *Candida albicans*, *Bacillus* spp., *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*.

При оперативных родах в ротовой жидкости (см. рис. 2) выделялись в 73% *Staphylococcus* spp., в 56% — *Streptococcus* spp., в 46% — *Enterococcus* spp., в 34% — *Micrococcus* spp. и *Peptostreptococcus* spp., в 29% — *Bacteroides* spp., в 27% — *Stomatococcus* spp. и *Lactobacillus* spp., в 24% — *Peptococcus* spp., в 15% — *Clostridium* spp., в 10% — *Staphylococcus aureus* и *Bacillus* spp., в 7% — *Streptococcus salivarius*, *Veillonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, в 5% — *Staphylococcus epidermidis*, *Bifidobacterium* spp. и *Actinomyces* spp., в 2% — *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Listeria* spp., *Candida* spp., *Candida albicans*, *Bacillus megaterium* и *Enterobacteriaceae*.

Наибольшее количество 6,6 lg КОЕ/мл было отмечено у *Actinomyces* spp.; от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл — у *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Stomatococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Clostridium* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Veillonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria* spp., *Candida* spp., *Candida albicans*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Bacillus* spp. и меньше 4 lg КОЕ/мл — у *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* и *Enterobacteriaceae*.



Рис. 2. Частота встречаемости микроорганизмов ротовой жидкости у недоношенных новорожденных при самопроизвольных и оперативных родах.

Примечание: \* — достоверно значимые значения для микроорганизмов при  $p < 0,05$

При самопроизвольных родах в содержимом желудка (рис. 3) выделялись *Enterococcus spp.* и *Lactobacillus spp.* в 33%, *Peptococcus spp.* — в 29%, *Staphylococcus spp.* и *Bacteroides spp.* — в 24%, *Stomatococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* и *Bifidobacterium spp.* — в 14%, *Peptostreptococcus spp.* — в 10% и *Prevotella spp.*, *Candida spp.*, *Candida albicans*, *Bacillus spp.*, *Bacillus megaterium* и *Enterobacteriaceae* — в 4%.

В данном случае количественный состав микробиоты варьировал от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл у *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Prevotella spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* и *Enterobacteriaceae* и меньше 4 lg КОЕ/мл — у *Staphylococcus aureus*, *Stomatococcus spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Candida spp.*, *Candida albicans*, *Bacillus spp.*, *Bacillus megaterium*.

При оперативных родах в содержимом желудка обнаруживались: *Peptostreptococcus spp.* и *Enterococcus spp.* — в 32%, *Staphylococcus spp.*, *Stomatococcus spp.* — в 29%, *Bacteroides spp.* — в 27%, *Micrococcus spp.*

и *Lactobacillus spp.* — в 22%, *Staphylococcus aureus* — в 12%, *Clostridium spp.*, *Peptococcus spp.* — 10%, *Streptococcus spp.*, *Veillonella spp.* и *Bifidobacterium spp.* — в 7%, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinomyces spp.* и *Bacillus spp.* — в 5%, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Listeria ivanovii*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* и *Yersinia spp.* — в 2%.

При этом количество микробиоты от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл было констатировано у *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Stomatococcus spp.*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium spp.*, *Peptococcus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Enterococcus spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Veillonella spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria ivanovii*, *Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Bacillus spp.*, *Yersinia spp.* и меньше 4 lg КОЕ/мл — у *Micrococcus spp.*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Candida albicans*, *Bacillus cereus* и *Bacillus subtilis*.

При самопроизвольных родах в содержимом толстой кишки (рис. 4) были определены *Staphylococcus spp.* — в 68%, *Enterococcus spp.* — в 45%, *Enterococcus faecalis* — в 42%, *Bacteroides spp.* и *Lactobacillus spp.* —

в 39%, *Stomatococcus* spp. и *Escherichia coli* — в 35%, *Peptostreptococcus* spp. *Klebsiella* spp. и *Staphylococcus aureus* — в 29%, *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp. и *Bacillus subtilis* — в 26%, *Peptococcus* spp. и *Proteus* spp. — в 23%, *Bifidobacterium* spp. — в 19%, *Staphylococcus*

*epidermidis* и *Candida albicans* — в 16%, *Micrococcus* spp. и *Listeria* spp. — в 13%, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus* spp. и *Candida* spp. — в 10%, *Enterococcus faecium*, *Proteus mirabilis* и *Pseudomonas* spp. — в 6%, *Veillonella* spp., *Candida tropicalis* и *Yersinia* spp. — в 3%.



Рис. 3. Частота встречаемости микроорганизмов содержимого желудка у недоношенных новорожденных при самопроизвольных и оперативных родах.

Примечание: \* — достоверно значимые значения для микроорганизмов при  $p < 0,05$

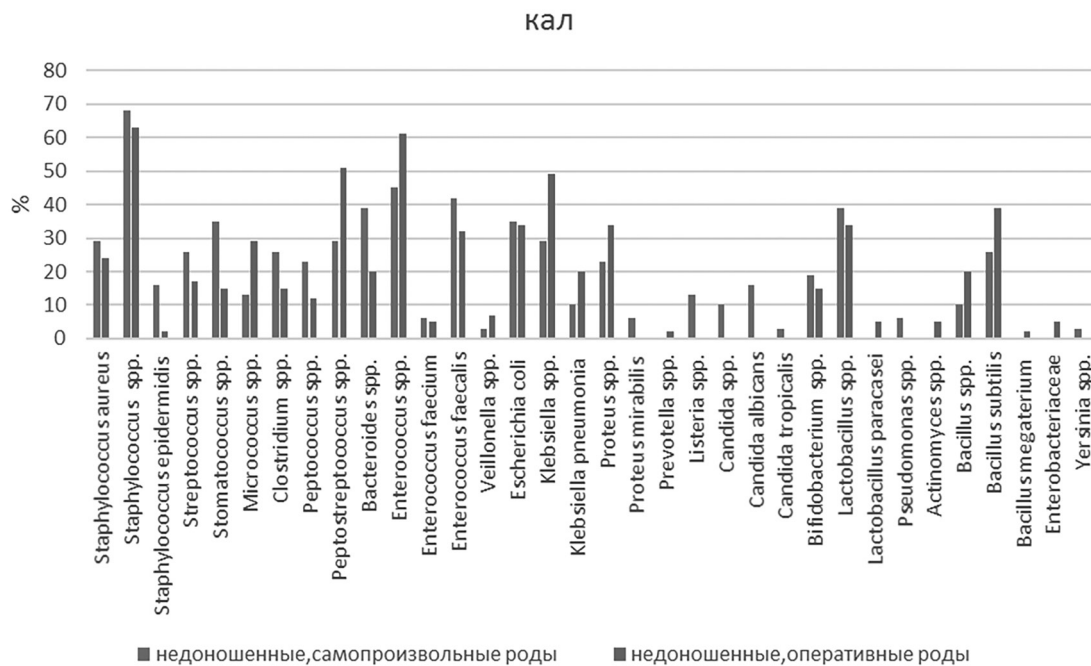


Рис. 4. Частота встречаемости микроорганизмов в содержимом толстой кишки у недоношенных новорожденных при самопроизвольных и оперативных родах.

Примечание: \* — достоверно значимые значения для микроорганизмов при  $p < 0,05$

В этом объекте количество микробиоты имело разброс: от 6 lg КОЕ/мл до 8 lg КОЕ/мл — у *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Veillonella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacillus subtilis* и *Yersinia* spp.; от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл — у *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Stomatococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Listeria* spp., *Candida* spp., *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.

При оперативных родах в содержимом толстой кишки выделялись *Staphylococcus* spp. в 63%, *Enterococcus* spp. — в 61%, *Peptostreptococcus* spp. — в 51%, *Klebsiella* spp. — в 49%, *Bacillus subtilis* — в 39%, *Escherichia coli*, *Proteus* spp. и *Lactobacillus* spp. — в 34%, *Enterococcus faecalis* — в 32%, *Micrococcus* spp. — в 29%, *Staphylococcus aureus* — в 24%, *Bacillus* spp., *Bacteroides* spp. и *Klebsiella pneumoniae* — в 20%, *Streptococcus* spp. — в 17%, *Stomatococcus* spp., *Clostridium* spp. и *Bifidobacterium* spp. — в 15%, *Peptococcus* spp. — в 12%, *Veillonella* spp. — в 7%, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei*, *Actinomyces* spp. и *Enterobacteriaceae* — в 5%, *Prevotella* spp., *Staphylococcus epidermidis* и *Bacillus megaterium* — в 2%.

При исследовании здесь количество микробиоты колебалось: от 6 lg КОЕ/мл до 7 lg КОЕ/мл — у *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Veillonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Prevotella* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus paracasei*, *Bacillus* spp. и *Bacillus subtilis*; от 4 lg КОЕ/мл до 6 lg КОЕ/мл — у *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Stomatococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Peptococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Actinomyces* spp., *Bacillus megaterium* и *Enterobacteriaceae*.

### Заключение

В верхних дыхательных путях у недоношенных новорожденных при оперативных родах в 2–3 раза реже изолировались *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Clostridium* spp. В 2–2,5 раза чаще выделялись *Micrococcus* spp. и *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp., чем у недоношенных детей при самопроизвольных родах.

В ротовой жидкости у недоношенных детей при оперативных родах в 4 раза реже выделялись

*Staphylococcus aureus*, в 3 раза — *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*. *Candida albicans*, в 2 раза — *Clostridium* spp., *Veillonella* spp., в 1,5 раза — *Stomatococcus* spp. Напротив, здесь в 3 раза чаще изолировались *Enterococcus* spp., *Bacillus* spp., в 1,5 раза — *Streptococcus* spp., *Bacteroides* spp.

При оперативных родах высевалась *Klebsiella pneumoniae* в 7% в количестве 4,68 lg КОЕ/мл, в 5% *Actinomyces* spp. — в количестве 6,62 lg КОЕ/мл.

В содержимом желудка при оперативных родах в 3 раза чаще, чем у недоношенных при самопроизвольных родах выделялись *Peptostreptococcus* spp., в 2 раза — *Stomatococcus* spp.

Реже в 3 раза изолировались *Peptococcus* spp., *Enterococcus faecalis*, в 2 раза — *Streptococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., в 1,5 раза — *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Lactobacillus* spp.

При оперативных родах в 2–7% выявлялись микроорганизмы, не встречаемые при самопроизвольных родах: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecium*, *Veillonella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Listeria ivanovii*, *Actinomyces* spp., *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* и *Yersinia* spp.

В содержимом толстой кишки при оперативных родах в 2 раза чаще, чем у недоношенных при самопроизвольных родах изолировались *Micrococcus* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus* spp., в 1,5 раза — *Peptostreptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Proteus* spp., *Bacillus subtilis*.

В 2,5 раза реже выделялись *Stomatococcus* spp., в 2 раза — *Peptococcus* spp., *Bacteroides* spp., в 1,5 раза — *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus faecalis*.

*Bifidobacterium* spp. встречались только в 19% недоношенных, рожденных естественным путем, и 15% — оперативным путем. *Lactobacillus* spp. выделялись одинаково в 39% случаев, а *E. coli* — в 34–35% в двух сравниваемых группах.

При оперативных родах у недоношенных детей не выявлялись микроорганизмы, которые встречались при самопроизвольных родах. Они изолировались в 2–16% случаев: *Proteus mirabilis*, *Listeria* spp., *Candida* spp., *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Pseudomonas* spp., *Yersinia* spp. и в 2–5% изолировались *Prevotella* spp., *Actinomyces* spp., *Bacillus megaterium* и бактерии семейства *Enterobacteriaceae* в количестве 5–6 lg КОЕ/мл.

Способ родоразрешения влияет на микрофлору новорожденного ребенка. По всем 5 биотопам частота встречаемости *Candida* spp. чаще при самопроизвольных родах. Это подтверждает результаты других исследований,



показавших, что микрофлора матери влияет и взаимосвязана с микрофлорой ребенка. При оперативном родоразрешении ребенок минует родовые пути и обсеменяется окружающей микрофлорой. По 4 биотопам (верхние дыхательные пути, ротовая жидкость, содержимое желудка и толстой кишки) при самопроизвольных родах чаще выделялись *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. В ротовой жидкости их частота почти одинакова.

### Заключение

На основании проведенного исследования делаются следующие выводы:

1. В верхних дыхательных путях отмечается нормобиоценоз, причем частота встречаемости золотистого стафилококка в 2,5 раза ниже у новорожденных, рожденных оперативным путем.
2. В ротовой жидкости у новорожденных при оперативных родах в 4 раза реже выделялся золотистый стафилококк. Однако чаще в 1,5–3 раза изолировались стрептококки и энтерококки.
3. В содержимом желудка при оперативных родах в 2 раза реже, чем при самопроизвольных родах выделялись *Bifidobacterium* spp. и *Escherichia coli*, в 1,5 раза — *Lactobacillus* spp. и *Staphylococcus aureus*.
4. В содержимом толстой кишки *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. и *Escherichia coli* изолировалось почти одинаково. При оперативных родах по сравнению с новорожденными при самопроизвольных родах в 2 раза чаще выделялись *Peptostreptococcus* spp., в 1,5 раза — *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Bacillus* spp. Здесь можно отметить дисбактериоз 1–2-й степени за счет выявления условно-патогенных микроорганизмов.
5. У недоношенных новорожденных детей при самопроизвольных и оперативных родах в формировании микробиоты содержимого желудка и толстой кишки достоверной разницы не отмечено.

### Литература

1. Захарова И.Н., Дмитриева Ю.А. Особенности становления кишечной микрофлоры у детей раннего возраста // Педиатрия. — 2014. — Т. 93. — № 6. — С. 138–144.
2. Захарова И.Н. Качественное питание — здоровое будущее // Журнал «Детский доктор». — 2016. — Т. 4. — № 4. — С. 3–4.
3. Малыгина О.Г., Бажукова Т.А., Лобанова Е.В., Чумакова Г.Н. Формирование микробиоценоза толстой

кишки у недоношенных детей с низкой и экстремально низкой массой тела в условиях стационара // Экология человека. — 2013. — № 3. — С. 28–33.

4. Николаева И.В., Анохин В.А., Айнутдинова И.А. Кишечная микрофлора у здоровых детей раннего возраста // Российский вестник перинатологии и педиатрии. — 2009. — № 2. — С. 30–33.
5. Петрова О.А., Червинец В.М., Червинец Ю.В. Микробиота недоношенных детей при применении антибиотиков // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. — 2019. — № 3. — С. 19.
6. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Борисова С.С., Петрова О.А., Антонова Л.К. Динамика колонизации микробиотой недоношенных детей на первой недели жизни / Материалы XI съезда Всероссийского научно-практического Общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения». 16–17 ноября 2017 г. Москва. — С. 494.
7. Червинец В.М., Червинец Ю.В., Петрова О.А., Антонова Л.К., Погасян С.В., Ганина Е.Б., Миронов А.Ю. Микробиота желудочно-кишечного тракта новорожденных первого месяца жизни в Тверской области // Клиническая лабораторная диагностика. — 2018. — Т. 63. — № 9. — С. 579–583.
8. Bosch A.A.T.M., Levin E., van Houten M.A., et al. Development of upper respiratory tract microbiota in infancy is affected by mode of delivery // EBioMedicine. — 2016. — Vol. 9. — P. 336–345.
9. Dahl C., Stigum H., Valeur J., et al. Preterm infants have distinct microbiomes not explained by mode of delivery, breastfeeding duration or antibiotic exposure // International Journal of Epidemiology. — 2018. — Vol. 47. — No. 5. — P. 1658–1669.
10. Gregory K.E., Samuel B.S., Houahtelina P., Shan G., Ausubel F.M., Sadrejev R.I., Walker W.A. Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants // Microbiome. — 2016. — Vol. 4. — Art. 68. doi: 10.1186/s40168-016-0214-x.
11. WestMedGroup. All rights reserved. 2020. <https://westmedgroup.ru/inaya-kishechnaya-mikroflora-nedonoshennykh-detej>.

### References

1. Zakhapova IN, Dmitriyeva YuA. Osobennosti stanovleniya kishechnoy mikroflory u detey rannego vozrasta. *Pediatrics* 2014; 93(6):138–144 (in Russian).
2. Zakhapova IN. Kachestvennoe pitaniye — zdorovoe budushcheye. *Zhurnal «Detkiy doktor»* 2016; 4(4):3–4 (in Russian).
3. Malygina OG, Bazhukova TA, Lobanova YeV, Chumakova GN. Formirovaniye mikrobiotsenoza tolctoy kishki u nedonoshennykh detey s nizkoy i ekstremal'no nizkoy massoy tela v

- ucloviyakh ctatsionapa. *Ekologiya cheloveka* 2013; 3:28–33 (in Russian).
4. Nikolaeva IV, Anokhin VA, Aynutdinova IA. Kischechnaya mikroflopa u zdopovykh detey pannego vozpacta. *Rossiyskiy vестnik pepinatologii i pediatrii* 2009; 2:30–33 (in Russian).
  5. Petpova OA, Chepvinets VM, Chepvinets YuV. Mikrobiota nedonoshennykh detey pri ppimenenii antibiotikov. *Byulleten' Openbugckogo nauchnogo tsentpa UpO PAN* 2019; 3:19 (in Russian).
  6. Chepvinets VM, Chepvinets YuV, Bopicova SS, Petpova OA, Antonova LK. Dinamika kolonizatsii mikrobioty nedonoshennykh detey na pervoy nedeli zhizni. *Matepialy KHI s"ezda Vserossiysckogo nauchno-ppakticheckogo Obshchestva epidemiologov, mikrobiologov i papazitologov. «Obespecheniye epidemiologicheskogo blagopoluchiya: vyzovy i pesheniya»*. 16–17 noyabrya 2017 g. Moskva. 2017: 494 (in Russian).
  7. Chepvinets VM, Chepvinets YuV, Petpova OA, Antonova LK, Pogacyan SV, Ganina YeB, Miponov AYu. Mikrobiota zheludochno-kischechnogo trakta novopozhdennykh pervogo mecyatsa zhizni v Tverckoy oblasti. *Klinicheskaya labopatopnaya diagnostika* 2018; 63(9):579–583 (in Russian).
  8. Bosch AATM, Levin E, van Houten MA, et al. Development of upper respiratory tract microbiota in infancy is affected by mode of delivery. *EBioMedicine* 2016; 9:336–345.
  9. Dahl C, Stigum H, Valeur J, et al. Preterm infants have distinct microbiomes not explained by mode of delivery, breastfeeding duration or antibiotic exposure. *International Journal of Epidemiology* 2018; 47(5):1658–1669.
  10. Gregory KE, Samuel BS, Houahtelina P, Shan G, Ausubel FM, Sadrejev RI, Walker WA. Influence of maternal breast milk ingestion on acquisition of the intestinal microbiome in preterm infants. *Microbiome* 2016; 4:68. doi: 10.1186/s40168-016-0214-x.
  11. WestMedGroup. All rights reserved. 2020. <https://west-medgroup.ru/inaya-kischechnaya-mikroflora-nedonoshennykh-detej>.

## FORMATION OF THE MICROBIOTA OF PREMATURE NEWBORNS IN SPONTANEOUS AND OPERATIVE CHILDBIRTH

O.A. PETROVA, V.M. CHERVINETS, Yu.V. CHERVINETS

*Tver State Medical University, Tver*

The aim of the work was to monitor the composition of the microflora of the upper respiratory tract, oral fluid, content of the stomach and colon in premature newborns with spontaneous and operative childbirth. The study included 60 premature newborns. A bacteriological study was carried out using optimal nutrient media (HiMedia) and identification systems (bio Mérieux Vitek, Inc.). In the upper respiratory ways, normobiocenosis is noted, moreover, the frequency of occurrence of *Staphylococcus aureus* is 2.5 times lower in newborns, born in an operative way. In the oral fluid against the background of normobiocenosis in newborns during surgical delivery, *Staphylococcus aureus* was isolated 4 times less often, but streptococci and enterococci were isolated 1.5–3 times more often. *Bifidobacterium spp.* and *Escherichia coli* were isolated in the contents of the stomach during operative labor 2 times less than during spontaneous labor, and *Lactobacillus spp.* and *Staphylococcus aureus* – 1.5 times less. In the contents of the colon *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* and *Escherichia coli* isolated almost identically. *Peptostreptococcus spp.* in operative childbirth, compared with newborns in spontaneous childbirth, it was isolated 2 times more often, but *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Bacillus spp.* – 1.5 times. It is concluded that in premature newborns with spontaneous and operative births, no significant value was obtained in the formation of the microbiota of the contents of the stomach and large intestine.

*Keywords:* microbiota, newborns, spontaneous childbirth, operative delivery.

### Address:

Petrova O.A.  
postgraduate student of the Department of Microbiology  
and Virology with a course Immunology Tver State Medical  
University of the Ministry of Health of the Russian Federation  
E-mail: ollgap@mail.ru

### Для цитирования:

Петрова О.А., Червинец В.М., Червинец Ю.В. Формирование микробиоты недоношенных новорожденных детей при самопроизвольных и оперативных родах. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2022; 18(1):51–59.

**For citation:**

Petrova O.A., Chervinets V.M., Chervinets Yu.V. Formation of the microbiota of premature newborns in spontaneous and operative childbirth. Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov 2022; 18(1):51–59 (in Russian).

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ ЛАТЕКСНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

А.Ю. ЕВЧЕНКО, И.В. ЖАРНИКОВА\*, Т.В. ЖАРНИКОВА, Д.В. РУСАНОВА, С.А. КУРЧЕВА,  
М.М. КУРНОСКИНА, Е.В. ЖДАНОВА, А.Г. КОШКИДЬКО

*ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь*

В обзоре представлены литературные данные о биотехнологических разработках диагностических препаратов для выявления возбудителей инфекций и антител к ним с использованием в качестве твердой фазы латексов, позволяющих проводить постановку анализа (реакция агглютинации латекса — РАЛ) с достаточной чувствительностью и специфичностью. Простота постановки анализов, при которых нет необходимости в инструментальном учете результатов, способствует сокращению материальных, трудовых затрат и возможности постановки реакций в полевых условиях.

*Ключевые слова:* латекс, иммобилизация, реакция агглютинации латекса (РАЛ).

### Введение

Проблема ранней диагностики занимает одно из ведущих мест в системе эпидемиологического мониторинга, профилактических мероприятий, направленных на борьбу с инфекционными заболеваниями и контроль эффективности проводимой терапии. Для диагностики инфекционных заболеваний и выявления их возбудителей применяют различные методы: микробиологический, микроскопический, серологический, молекулярно-генетический. Каждый из этих методов имеет свои преимущества и недостатки; поэтому поиск простых в исполнении, надежных, быстрых и доступных методов выявления антител и антигенов для диагностики различных инфекционных заболеваний сохраняет свою актуальность и в настоящее время. При этом диагностические препараты должны быть высокочувствительны и специфичны [11].

Данным характеристикам отвечают препараты на основе полимерных соединений для реакции латекс-агглютинации, широко применяемой в мировой практике [8, 12, 34]. Метод латексной агглютинации является

вариантом реакции пассивной гемагглютинации (РПГА), в которой полимерные микросферы (латексные частицы) с адсорбированными на них молекулами антител или антигенов вступают в реакцию и агглютинируют с соответствующими антигенами микроорганизмов или антителами. По своей чувствительности РАЛ значительно превышает иммунодиффузные тесты, реакцию преципитации в геле и встречный иммуноэлектрофорез. Он также не уступает реакции пассивной гемагглютинации и при использовании специальных анализаторов для учета степени агглютинации может конкурировать с иммуноферментным и радиоиммунным анализами [24].

### Параметры полимерных микросфер

Основной компонент при постановке РАЛ — латексный диагностикум на основе полимерных микросфер, которые являются весьма удобной и гибкой системой для разработки диагностических препаратов. При выборе полимерных микросфер обычно учитывают диаметр и распределение частиц по размерам, состав (плотность, показатель преломления, гидрофобность/гидрофильность, неспецифическое связывание, аутофлуоресценция), химические свойства поверхности (реакционные группы, функциональность, заряд) и другие более специфические свойства, такие как наличие хромофорных наполнителей (красителей), флуоресцентных веществ, наночастиц металлов и их оксидов. Для латексной агглютинации чаще применяются микросферы (окрашенные, неокрашенные) с размером 0,2–1,0 мкм, активированные (для ковалентной сшивки) и неактивированные (для физической сорбции) [19].

© 2022 г. Евченко А.Ю., Жарникова И.В., Жарникова Т.В., Русанова Д.В., Курчева С.А., Курноскина М.М., Жданова Е.В., Кошкидько А.Г.

\* Автор для переписки:

Жарникова Ирина Викторовна

д.б.н., ведущий научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций. ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора

E-mail: ivj-biotech@yandex.ru

Важным параметром является и состав полимерных микросфер. Обычно полимерные микросферы состоят из полиакролеина, полистирола, полиметилметакрилата. Эти материалы обладают различными физическими и оптическими свойствами, которые могут показывать преимущества или же накладывать некоторые ограничения их использования. В общей массе полимерные микросферы гидрофобны и, как правило, обладают высокой способностью связываться с белками. Тем не менее они часто требуют применения некоторых поверхностно-активных веществ (ПАВ) (например, 0,01–0,1% масс Твин 20 или додецилсульфат натрия) в буферном растворе для хранения. Для создания реакционноспособных полимерных микросфер применяют различные функциональные сомомеры на стадии синтеза [19].

Поверхность микросферы является одним из наиболее важных преимуществ, используемых в диагностических тестах и других сферах применения, где белки и иные биомолекулы связаны с полимерными частицами. Остаточные ПАВ, мономеры и различные другие загрязнения могут помешать успешной конъюгации с частицами. Эти примеси часто являются причиной невоспроизводимости от партии к партии, и эти изменения могут повлиять на производственный процесс диагностических тестов. Изменение площади поверхности способно привести к изменениям чувствительности и возникновению ложных положительных и отрицательных результатов. Полимерные микросферы могут быть покрыты оболочкой особых лигандов, таких как антитела или олигонуклеотиды, для их дальнейшего использования в диагностических системах. Покрытия микросфер обычно подобраны согласно требуемой удельной активности и при сведении к минимуму неспецифических взаимодействий [1].

### Параметры иммобилизации лигандов

Разработка латексного диагностикума для постановки серологического исследования в иммунологическом планшете требует определения не только нахождения оптимальных свойств и размера частиц самого носителя, но и подбора оптимального количества иммобилизуемого на поверхность полимерного носителя биолганда. Кроме того, необходимы знания о седиментационной неустойчивости дисперсных систем в гравитационном поле, движении полимерного носителя внутри лунки, оптимальных характеристиках полимерных дисперсий (природы полимерного материала, размера полимерных микросфер, рабочей концентрации полимерной дисперсии, количества полимерного

материала в одной пробе), определяющих возможность их применения в качестве носителей биолгандов при проведении РАЛ в планшетном формате. Только такой комплексный подход позволит создать эффективные латексные диагностикумы для проведения анализа [5].

В литературе содержится большое количество публикаций, касающихся исследования адсорбции биолгандов на поверхности полимерных микросфер и создания на их основе диагностических тест-систем, используемых в РАЛ [1, 7, 9, 49, 50].

Биомолекулы могут быть иммобилизованы на микросферы с помощью физической сорбции (за счет электростатических, гидрофобных, дисперсионных взаимодействий) или ковалентной связи. Адсорбционная способность различных веществ в отношении антител или антигенов зависит от их химической структуры. Наиболее интенсивно антигены адсорбируются на вещества, содержащие сульфогруппы, нитрогруппы, альдегидные, гидроксильные и карбоксильные группы [1, 23, 30].

### Физическая сорбция лигандов

Покрытие полимерных микросфер с помощью физической сорбции не требует особых условий и протекает достаточно быстро. Определение специфической сорбции веществ, таких как антитела (антигены), легко достигается путем смешивания микросфер с белками при оптимальном рН и последующим отделением несвязавшегося белка от твердой фазы, как правило, путем центрифугирования, диализа [23].

Влияние рН среды на количество адсорбированного биолганда на поверхности полимерных микросфер подробно изучено и описано в работе Грицковой И.А. с соавт. [9]. В качестве специфического биолганда использовали человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), а полимерного носителя — полистирольные микросферы. Значения рН изменяли в интервале 4,0–7,7, используя ацетат-уксуснокислый буфер (рН 4,0, 5,0) и фосфатный буфер (рН 5,8, 6,8, 7,7, 9,0). Изоэлектрическая точка ЧСА составляет рН 4,7. Было установлено, что максимальная адсорбция молекул ЧСА на поверхность полистирольных микросфер наблюдается при рН среды 5,0, минимальная — при рН 7,7. Для максимальной плотности упаковки белка на поверхности полимерных микросфер необходимо проводить адсорбцию белка при значениях рН среды, лежащих вблизи изоэлектрической точки ЧСА. По мере удаления от изоэлектрической точки ЧСА (при смещении рН среды в щелочную область) количество белка, адсорбированного на поверхности

полистирольных микросфер, уменьшается, а адсорбция ЧСА на поверхность полистирольных микросфер при рН среды 4,0 приводит к потере агрегатированной устойчивости системы. Со смещением рН среды в щелочную область уменьшается и сродство между молекулами ЧСА и полистирольной поверхностью микросфер [23].

На физическую адсорбцию белков существенное влияние оказывает и величина ионной силы раствора [46]. Так, при адсорбции ЧСА в диапазоне рН от 3,0 до 11 было изучено влияние ионной силы среды, которую меняли в диапазоне значений от 0,001 М до 0,3 М. В кислой области (рН < 4,7) ниже изоэлектрической точки ЧСА количество адсорбированного белка на поверхности полистирольных микросфер увеличивается с повышением ионной силы раствора. В щелочной области (рН > 7) с увеличением ионной силы раствора с 0,001 М до 0,1 М наблюдалось уменьшение адсорбированного белка на поверхности полимерных микросфер с 2 до 0,3 мг/м<sup>2</sup>. Высокая ионная сила (> 0,1) не препятствовала процессу физической адсорбции ЧСА на поверхности полистирольных микросфер, однако повышение ионной силы раствора способствовало протеканию спонтанной агрегации полистирольных микросфер. Максимальная адсорбция ЧСА (3 мг/м<sup>2</sup>) и отсутствие спонтанной агрегации частиц полистирольной суспензии наблюдались при низких значениях ионной силы раствора 0,001 при рН 4,7.

Влияние условий адсорбции ЧСА на поверхности полистирольных микросфер на чувствительность получаемых тест-систем оценивали методом РАЛ. В качестве детектируемого компонента были выбраны антитела к ЧСА, содержащиеся в моноспецифической сыворотке. При значениях рН 5,8, 6,8 и 7,7 с увеличением концентрации ЧСА в растворе с 0,3 до 3 мг/мл происходит снижение чувствительности РАЛ с 1:4096 до 1:256. Показано также, что увеличение рН среды, то есть смещение рН в щелочную область (> 7,7), приводит к снижению чувствительности РАЛ с 1:4096 до 1:4. Наибольшую чувствительность РАЛ 1:4096 удалось получить при величинах адсорбции ЧСА на поверхности полистирольных микросфер, не достигших своего предельного значения и составляющих 0,3–0,5 мг/мл. Выбор рН среды для проведения адсорбции ЧСА и постановки РАЛ также определяется максимальной чувствительностью тест-систем, которая достигается при рН среды 5,8 и ионной силе раствора 0,01 М. В этом случае молекулы ЧСА имеют небольшой отрицательный заряд, который достаточен для стабилизации частиц и не препятствует проведению реакции РАЛ [23].

Кроме ионной силы среды и рН, существенное влияние на чувствительность РАЛ оказывает температура, при которой проводят физическую адсорбцию биолигандов. На примере адсорбции иммуноглобулина G (IgG) [18–20 °С (инкубация 24 ч), 37 °С (инкубация 60 мин) и 60 °С (инкубация 15 мин) на поверхности полимерных микросфер было показано [2], что при температуре 60 °С тест-системы эффективно выявляли С-реактивный белок (СРБ) и миоглобин в диапазоне концентраций 5–750 мкг/мл и 100–20000 мкг/мл соответственно.

Важную роль при создании тест-систем играет и концентрация специфических биолигандов, физически адсорбированных на поверхности полимерных микросфер [2]. Показано, что при адсорбции человеческого IgG низкой концентрации (< 3 мг/мл) на поверхности полистирольных микросфер происходит спонтанная агрегация полимерных микросфер, содержащих IgG, что, по-видимому, связано с недостаточной насыщенностью гидрофобной поверхности полистирольных микросфер молекулами IgG. Для обеспечения агрегатированной устойчивости полимерных микросфер, содержащих на поверхности IgG низкой концентрации, дополнительно проводили адсорбцию альбумина или смещали рН среды в щелочную область, приводящую к значительному возрастанию заряда иммобилизованных IgG, содержащихся на поверхности полимерных микросфер; тем самым сохраняется устойчивость системы [23].

При конструировании диагностикума для определения количества белка гемагглютиниана в моновалентных вакцинах против гриппа с адьювантом наилучшие результаты были получены при покрытии 1 г микросфер 40 мг очищенной сыворотки методом физической сорбции [30].

РАЛ для быстрой серодиагностики японского энцефалита (ЯЭ) описана в работе Grace M.R., Dhanze N., Pantwane P. et al. [35]. Стандартизация РАЛ путем физической адсорбции рекомбинантного белка NS1 вируса на латексных микросферах была проведена путем изменения различных переменных, а именно: концентрации антигена, концентрации частиц, поверхностного блокирующего агента, условия блокирования. Были определены оптимальные условия для конструирования препарата: концентрация антигена для сенсibilизации 750 мкг/мл; полистироловые микросферы диаметром 0,8 мкм с концентрацией 2,5%; блокирующий реагент — 1% бычий сывороточный альбумин в фосфатно-солевом буфере (рН 7,2); блокировка в течение 16–18 ч при 4 °С. Учет результатов реакции был возможен уже через 5 минут после добавления тестируемого образца сыворотки к сенсibilизированным латексам. Результаты

исследования подчеркивают потенциал РАЛ в качестве быстрого анализа в полевых условиях для диагностики ЯЭ у свиней, который поможет в прогнозировании вспышек ЯЭ у людей [35].

При конструировании диагностикума для РАЛ с целью быстрой диагностики криптококкового менингита оптимальными для приготовления сенсibilизированных латексных частиц стали: концентрация сыворотки 1:1024, латексные микросферы диаметром 0,8 мкм, а наивысшая агглютинирующая активность отмечалась для раствора с концентрацией 0,4–0,6 мг иммуноглобулинов на 1 мг латексных частиц [48].

К негативным факторам, которые влияют на чувствительность и специфичность диагностических тест-систем, полученных физической сорбцией, относится и десорбция специфических биолигандов с поверхности полимерных микросфер. Так, при небольшом изменении условий (рН и ионной силы среды, температуры и т.д.) с поверхности полимерных микросфер происходила десорбция биолигандов в водную фазу, что приводило к снижению чувствительности тестов и неспецифическим реакциям с другими биообъектами, содержащимися в сыворотке крови [23].

Способы получения диагностических тест-систем с использованием полимерных микросфер с физически адсорбированными на их поверхности биолигандами «легко» осуществимы. Однако ряд серьезных недостатков, среди которых следует выделить возможную десорбцию биолиганда с поверхности полимерных микросфер, обуславливают невысокую диагностическую эффективность тест-систем, недостаточное время их хранения, а также невозможность результатов анализа со временем [23].

### Ковалентная сорбция лигандов

Свободными от указанных недостатков оказались полимерные суспензии с функциональными группами на поверхности полимерных микросфер, которые способны к ковалентному связыванию с функциональными группами биолигандов, образуя при этом прочную ковалентную связь.

Ковалентное связывание — это химическое взаимодействие биомолекул и активированных микросфер. Оно может обеспечить необходимую стабильность реагента. Функциональные группы, имеющиеся на поверхности микросфер, контролируют химию процесса конъюгации. Выбор микросферы с соответствующими поверхностными и качественными характеристиками является ключевым моментом в разработке стабиль-

ных, воспроизводимых диагностических тестов. К функциональным группам, способным непосредственно реагировать с амино-, карбоксильными или сульфгидрильными группами биолигандов, относятся хлорметильные [39], хлорсульфоновые, альдегидные, [32], эпоксидные [44].

Такие группы, как карбоксильные, гидроксильные, аминные, амидные, гликолевые, могут взаимодействовать с функциональными группами биолигандов только после относительно простой реакции их активации. Ковалентное связывание часто требует более высокого уровня оптимизации, аппаратного оформления и знаний технологии, чем другие подходы [19]. Карбоксильные группы полимера взаимодействуют с аминогруппами биолиганда после реакции активации с водорастворимым карбодимидом. Наиболее распространенным методом активации гидроксильных групп полимера является цианоген-бромидный метод [23]. При обработке гидроксильных групп бромцианом в щелочной среде рН=10 возникают реакционноспособные цианаты и имидокарбонаты, которые могут вступать в реакции с аминогруппами биолиганда. Путем варьирования концентрации функциональных групп на поверхности частиц возможно контролировать концентрацию биолигандов, иммобилизованных на поверхности частиц, что особенно важно при создании диагностических тест-систем с высокой чувствительностью РАЛ [23].

Так, при использовании в качестве специфических биолигандов антигенов клеточных стенок грибов *Candida* spp., концентрацию которых меняли в интервале от 0,01 до 0,25 мг/мл при постоянной концентрации аминогрупп, равной  $100 \cdot 10^{-3}$  моль/г полимера, содержащихся на поверхности полимерных микросфер, было показано, что максимальная чувствительность РАЛ (1:1024) наблюдается при использовании антигенов клеточных стенок грибов р. *Candida* при концентрации 0,05 мг/мл [20]. Уменьшение концентрации антигенов приводило к ухудшению контроля РАЛ, а увеличение концентрации антигенов — к снижению диагностической эффективности тест-систем (титр РАЛ снижался до 1:32).

При разработке технологии получения псевдотуберкулезного видоспецифического антигенного полимерного диагностикума установлено, что оптимальными условиями иммобилизации антигена и сенсibilизации носителя является антигенная нагрузка 1 мг на 100 мг полимерных сфер, бикарбонатная буферная система (рН 9,2), носитель — окрашенные полимерные акролеиновые микросферы диаметром 1,5 мкм с реакционно-

### Спейсерное присоединение лигандов

способными альдегидными группами. Чувствительность разработанного диагностикума составляет 86%, специфичность — 89% [21, 22].

Эффективными параметрами при конструировании латексного диагностикума, направленного на определение реакционной способности сыворотки к очищенному солевому экстракту растворимых бруцеллезных периплазматических белков *B. melitensis* при бруцеллезе овец, являются следующие: использование полистирольных микросфер, диаметром 0,81 мкм (LB8, Sigma) для ковалентного связывания; концентрация антигена — 0,6 мг белка/мл; инкубация в течение ночи при 37 °С; используемый раствор — глицин-хлоридный буфер, содержащий БСА 1:500 [36].

Принципиальная возможность применения РАЛ на основе карбоксилированных полистирольных микросфер, сенсibilизированных антителами к рибонуклеопротеину вируса бешенства, для экспресс-диагностики бешенства животных представлена в работе Н.А. Назарова, Н.М. Михайлиной, А.В. Молодкина [17]. По результатам проведенных экспериментов были отобраны оптимальные параметры: концентрация латексных частиц для сенсibilизации по сухому веществу — 3%; сенсibilизирующая концентрация антител — 500 мкг/мл; концентрация сенсibilизированного латекса в конечном препарате — 1,5%; рабочее разведение готовых диагностикумов — 1:2.

Кроме концентрации биолигандов, существенное влияние на чувствительность РАЛ оказывают температура и сродство (аффинитет) биолиганда к детектируемому компоненту. На примере иммобилизации IgG на поверхности полимерных микросфер при различных температурных режимах 18–20 и 56 °С было продемонстрировано [2], что при температуре 56 °С тест-системы максимально (титр РАЛ — 1:512) выявляли иммуноглобулины класса М [ревматоидный-фактор (RF)]. При высокой температуре иммобилизации происходит модификация Fc-фрагмента молекулы IgG, которая влияет на аффинитет IgG к иммуноглобулину класса М, повышая чувствительность РАЛ с 1:64 до 1:512. Было показано, что повышение чувствительности РАЛ связано исключительно с повышением аффинитета модифицированных Fc-фрагментов IgG до и после процесса иммобилизации IgG на поверхности полимерных микросфер. Важным фактором, влияющим на чувствительность РАЛ, является сохранение доступности активных центров (детерминант) биолигандов после проведения процесса иммобилизации биолиганда на поверхности полимерных микросфер [23].

Для сохранения реакционной способности специфических биолигандов предпочтительно использовать полимерные микросферы, содержащие на поверхности молекулы спейсера (англ. spacer — «распорка», «прокладка», «разделитель»), которые позволяют увеличить расстояние между биолигандом и полимерной поверхностью; тем самым сохраняется нативная конформация биолиганда, а, следовательно, его иммунологическая активность. Молекула, выполняющая роль спейсера, — «мостика», должна иметь небольшие размеры и после присоединения к функциональным группам полимерной микросферы сохранять еще одну функциональную группу, способную вступать в реакцию с функциональными группами биолиганда.

В качестве такой спейсерной молекулы могут выступать соединения различной природы: 1-6-диаминогексан,  $\epsilon$ -аминокапроновая кислота, глутаровый альдегид и др. В работе [37] подробно рассмотрено ковалентное связывание аминокислотных групп иммуноглобулина G (IgG) и карбоксильных групп полимерных микросфер с использованием спейсера 1-6-диаминогексана. В этом случае проводят реакцию активации карбоксильных групп полимерных микросфер карбодимидом при температуре 4–6 °С и рН 6–7 в течение 2–4 часов при отсутствии или в присутствии инертного буфера, например, N-2-гидроксиэтил пиперазин-N'-этансульфоновой кислоты.

Затем к активированным карбоксильным группам полимерных микросфер присоединяют аминокислотную группу спейсера 1-6-диаминогексана. К преимуществам данного способа активации карбоксильных групп (карбодимидный метод) следует отнести его простоту. Однако вследствие того, что спейсерная молекула 1-6-диаминогексана содержит две аминокислотные группы, а молекула биолиганда содержит как карбоксильные, так и аминокислотные группы, возможно протекание меж- и внутримолекулярного сшивания, что снижает активность биолиганда при выявлении детектируемого компонента в РАЛ [23, 38].

Ковалентное связывание аминокислотных групп иммуноглобулина G (IgG) и аминокислотных групп полимерных микросфер с использованием спейсера глутарового альдегида подробно рассмотрено в работе Margel S. (1984) [40]. Спейсерная молекула глутарового альдегида содержит на концах цепи две альдегидные группы. Эти группы при нейтральных значениях рН реагируют со свободными аминокислотными группами. Таким образом, один конец молекулы глутаральдегида может быть присоединен к аминокислотным группам частицы полимера, а другой — к аминокислотным группам биолиганда (IgG) [23].



Образующееся в результате взаимодействия amino- и альдегидной групп основание Шиффа восстанавливается боргидридом натрия  $\text{BH}_4\text{Na}$  (температура  $25^\circ\text{C}$ , 30 мин). Введение в систему спейсерных молекул позволяет не только увеличить расстояние между молекулой биолиганда и полимерной поверхностью, тем самым увеличивая вариабельность биомолекулы, но и определенным образом обеспечить доступность активных центров (детерминант) биолиганда для аффинного связывания с детектируемым компонентом, как показано в работе Cho I.-H., 2007 [33], Butler J., 1992 [31].

В качестве специфического биолиганда использовали молекулу иммуноглобулина G (IgG), а в качестве спейсеров — молекулы стрептавидина (авидина) и биотина. Способность к комплементарному взаимодействию стрептавидина и биотина легло в основу создания спейсерного «мостика» между биолигандом и полимерной микросферой при создании диагностических тест-систем для выявления антигена — сердечного тропонина I [33].

Изначально на поверхности полистирольных микросфер физически адсорбировали молекулу стрептавидина или авидина. К молекуле IgG присоединяли биотин с образованием конъюгированных комплексов «биотин-биолиганд»: затем к полимерным микросферам, содержащим на поверхности стрептавидин, фиксировали конъюгат «биотин — биолиганд» за счет аффинного сродства молекулы биотина и стрептавидина [10]. Посредством спейсерного присоединения были получены высокочувствительные диагностические тест-системы для выявления сердечного тропонина [23].

Из данных литературы следует, что использование моноклональных антител при разработке антительных диагностикумов для РАЛ способствует повышению диагностических возможностей данного метода за счет увеличения специфичности, как и применение высокоочищенных антигенов при получении антигенных диагностикумов.

При проведении сравнительной характеристики биотехнологии получения эритроцитарных и латексных иммуноглобулиновых диагностикумов установлено, что при производстве латексного диагностикума сокращаются трудовые и материальные затраты за счет того, что нет необходимости в содержании животных-продуцентов для получения эритроцитов, причем данное биологическое сырье (эритроциты) не стандартизировано и его параметры зависят от многих факторов (пол, возраст животного, время взятия крови и т.д.). Для получения качественных эритроцитарных диагностикумов необходимо выдерживать формализированные эритроциты в течение года (для стабилизации). Латексные микросферы более

стандартизированы по химическому строению, размеру, стабильны и легко иммобилизуются с биолигандами (антигенами, антителами). По чувствительности и специфичности реакция агглютинации латекса не уступает по показателям РНГА с эритроцитарными диагностикумами [10, 13, 18, 29].

### Сравнение РАЛ с другими методами анализа

Некоторые авторы проводили сравнение не только биотехнологии получения диагностикумов, но и постановку РАЛ с другими реакциями. Так, в работах [15, 27, 28] показано, что результаты РАЛ согласуются с ПЦР при обнаружении ротавируса А и аденовируса человека [15, 27], диагностике бактериального менингита [28], возбудителя туляремии [43].

Авторы отмечают, что при отсутствии возможности проведения ПЦР, «золотого стандарта», РАЛ станет достойной альтернативой и может быть использована для быстрого скрининга инфекционных болезней. Также представлена согласованность результатов РАЛ и ИФА при обнаружении копроантигена *Fasciola* spp. у крупного рогатого скота [41]. В работе Thongsukkaeng K., Woonyom R. (2018) [47] показано, что чувствительность и специфичность РАЛ соответствует реакции иммунофлуоресценции (РИФ).

Преимущество РАЛ по сравнению с традиционными методами, такими как РИФ, ИФА, ПЦР, заключается в экспрессности и простоте постановки реакции. Метод не требует наличия дорогостоящего оборудования и поэтому может применяться в диагностических лабораториях любого уровня и разной степени приборной оснащённости [4].

В лабораторной практике используются латексные диагностикумы для выявления поверхностных антигенов гепатита В (HBsAg), для диагностики лептоспироза животных (НПФ «Диавак») и людей [3], для выявления возбудителей туляремии, чумы [6] буркхольдерий [25], бешенства животных [16], острых кишечных инфекционных заболеваний вирусной этиологии (ротавирусная, аденовирусная и норовирусная инфекции) [15, 27], сальмонеллеза [14], менингита [42], мелиоидоза [45], сибирской язвы [26] и других инфекций.

### Заключение

Таким образом, создание диагностических латексных препаратов, функционирующих на микро- и наноровнях, для безаппаратной диагностики (РАЛ) требует от авторов научно обоснованного подхода к технологии

их получения, позволяющего обеспечить определенное распределение полимерных частиц по размерам и составу с заданным комплексом свойств, а также целенаправленных способов иммобилизации биополимеров на поверхности полимера. Это является необходимым условием для разработки высокочувствительных диагностикумов для экспресс-детекции макромолекулярных маркеров и их промышленного производства [23].

В сочетании с высокими показателями чувствительности и специфичности РАЛ успешно пополняет арсенал методов лабораторной серологической диагностики. Полученные на основе полимерных микросфер диагностические препараты дают возможность оценивать состояние инфекционного процесса, что делает доступным их применение как при постановке диагноза, так и при скрининговых исследованиях проб от людей и животных.

## Литература

1. Артыкова Э.Б. и др. Получение диагностических тест-систем на основе полимерных микросфер в присутствии поливинилпирролидона, модифицированного аминокислотой // Вестник МИТХТ им. М.В. Ломоносова. — 2010. — Т. 5(3). — С. 82–87.
2. Басырева Л.Ю. Создание диагностических тест-систем на основе полимерных суспензий и факторы, определяющие их чувствительность и специфичность: дис. ... канд. хим. наук. — М., 1994.
3. Волина Е.Г. и др. Выявление противолептоспирозных антител в сыворотках крови больных людей в реакции латекс-агглютинации // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2001. — № 3. — С. 89–90.
4. Волина Е.Г. и др. Применение диагностической латексной тест-системы для обнаружения антигенов лептоспир в крови экспериментально инфицированных животных // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. — 2000. — № 3. — С. 31–34.
5. Волкова Е.В. и др. Выбор полимерных микросфер для проведения реакции латексной агглютинации в плащечном формате // Вестник МИТХТ им. М.В. Ломоносова. — 2013. — Т. 8(6). — С. 68–72.
6. Волох О.А., Кузнецова Е.М., Щербаков А.А. Оценка возможности использования экспериментальных иммунодиагностических препаратов в лабораторной диагностике чумы и туляремии // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. — 2014. — Т. 14. — № 2. — С. 78–82.
7. Гаспарян В.К. Полистирольные латексы в реакции агглютинации, приготовление и сенсбилизация // Клиническая лабораторная диагностика. — 2001. — № 1. — С. 43–45.
8. Готовцев П.М. и др. Иммобилизация микробных клеток для биотехнологических производств. Современные решения и перспективные технологии // Биотехнология. — 2015. — № 2. — С. 33–45.
9. Грицкова И.А. и др. Адсорбция белков на полистирольных микросферах и постановка реакции латекс-агглютинации // Коллоидный журнал. — 1994. — Т. 56(4). — С. 491–495.
10. Жарникова И.В., Жданова Е.В., Жарникова Т.В., Старцева Е.В., Курчева С.А. и др. Сравнительная характеристика биотехнологии получения эритроцитарных и латексных иммуноглобулиновых диагностикумов для выявления возбудителя туляремии // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2019. — Т. 15. — № 4. — С. 27–31.
11. Иващенко Т.А. и др. Разработка латекс-агглютинационной тест-системы для выявления капсульного антигена F1 *Yersinia pestis* // Биотехнология. — 2012. — № 6. — С. 76–85.
12. Кедик С.А. и др. Высокочувствительные тест-системы на основе конъюгатов «полимерная микросфера — биополимер» для экспресс-диагностики протеинопатий // Вестник МИТХТ им. М.В. Ломоносова. — 2013. — Т. 8. — № 4. — С. 3–10.
13. Латексные диагностикумы в медицине, ветеринарии и биологии: [монография]. Воробьева З.Г., Лазовская А.Л., Кравцов Э.Г., Васильева Е.А. 2-е изд., испр. и доп. — М.: РУДН, 2012. — 292 с.
14. Лобанова Н.А., Грицкова И.А., Прокопов Н.И. и др. Получение полистирольных суспензий с карбоксильными группами на поверхности частиц для создания диагностических тест-систем на сальмонеллез // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2014. — № 4(9). — С. 100–106.
15. Лобова Т.П. Усовершенствование лабораторной диагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — М., 2006. — 20 с.
16. Назаров Н.А., Михайлина Н.М., Молодкина А.В., Рыбаков С.С., Чепуркин А.В. Разработка реакции агглютинации латекса для диагностики бешенства животных // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. — 2007. — Т. 5. — С. 186–201.
17. Назаров Н.А. и др. Разработка реакции агглютинации латекса для диагностики бешенства животных // Труды Федерального центра охраны здоровья животных / ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»). Т. 5. — Владимир: Издательство ООО «Транзит-ИКС», 2007. — С. 186–202.
18. Наркевич А.Н., Симакова Д.И., Писанов Р.В. Стабильные полиакролеиновые микросферы для приготовления диагностических тест-систем // Инфекция и иммунитет. — 2017. — № 5. — С. 950.
19. Полимерные микросферы и частицы: Общая информация [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://gtpt.ru/>

- tekhnicheskaya-literatura/polimernye-mikrosfery, свободный. (Дата обращения: 09.08.2021).
20. Прокопов Н.И. Синтез полимерных суспензий с узким распределением частиц по размерам методом гетерофазной полимеризации: дис. ... докт. хим. наук. — М., 1999. — 322 с.
  21. Симакова Д.И., Ларионова Л.В., Карбышев Г.Л., Терентьев А.Н., Лысова Л.К. Способ получения псевдотуберкулезного антигенного полимерного диагностикума. Патент РФ № 2430376. Опубликовано: 27.09.2011. Бюл. № 27.
  22. Симакова Д.И. Конструирование видоспецифического антигенного полимерного препарата для серологической диагностики псевдотуберкулеза: автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Ростов-на-Дону, 2019. — 23 с.
  23. Станишевский Я.М. Создание тест-систем для безаппаратной диагностики динамических макромолекулярных маркеров (сообщение 1. Теоретические аспекты) // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2014. — № 3(8). — С. 88–96.
  24. Старовойтова Т.А. и др. Видеоцифровой анализ для лабораторной диагностики: комплекс «эксперт-лаб» на основе сканера для документирования, объективизации и регистрации результатов латекс-агглютинационных, гемагглютинационных тестов, изосерологических и иммуноферментных исследований // Лаборатория. — 2006. — № 1. — С. 19–22.
  25. Фролов Д.М. и др. Разработка теста латекс-агглютинации для выявления патогенных буркхолдерий и его апробация в эндемичных регионах Вьетнама // Проблемы особо опасных инфекций. — 2020. — № 4. — С. 133–138.
  26. Хлынцева А.Е. и др. Разработка и испытания диагностикума на основе моноклональных антител для определения спор возбудителя сибирской язвы в реакции латекс-агглютинации // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — № 4(110). — С. 71–75.
  27. Швец Ю.В. Экспресс-диагностика острых кишечных инфекций вирусной этиологии с использованием ротаскрин латекс-теста // Известия Российской Военно-медицинской академии. — 2018. — Т. 37. — № 1. S1–2. — С. 374–377.
  28. Amidu N. et al. Diagnosis of bacterial meningitis in Ghana: Polymerase chain reaction versus latex agglutination method // PloS One. — 2019. — Vol. 14(1). — e0210812. doi: 10.1371/journal.pone.0210812.
  29. Basinska T., Wisniewska M., Chmiela M. Principle of a new immunoassay based on electrophoretic mobility of poly(styrene/alpha-tert-butoxy-omega-vinylbenzyl-polyglycidol) microspheres: application for the determination of *Helicobacter pylori* IgG in blood serum // Macromol. Biosci. — 2005. — Vol. 5(1). — P. 70–77.
  30. Buffin S. et al. A latex agglutination assay to quantify the amount of hemagglutinin protein in adjuvanted low-dose influenza monovalent vaccines // Journal of Virological Methods. — 2018. — Vol. 251. — P. 46–53.
  31. Butler J. et al. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene // J. Immunol. Methods. — 1992. — Vol. 150(1–2). — P. 77–90.
  32. Changhong Y. et al. Poly(styrene-co-acrolein) latex particles: copolymerization and characteristics // J. of Appl. Polym. Sci. — 1990. — Vol. 40. — P. 89–98.
  33. Cho I.-H. et al. Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces // Analytical Biochemistry. — 2007. — Vol. 365 (1). — P. 14–23.
  34. Gasparyan V.K. Preparation and sensitization of polystyrene latex beads by some antigens and anti-bodies. Factors affecting sensitivity and specificity of latex agglutination tests // J. Immunoassay Immunochem. — 2002. — Vol. 23. — No. 3. — P. 399–404.
  35. Grace M.R. et al. Latex agglutination test for rapid on-site serodiagnosis of Japanese encephalitis in pigs using recombinant NS1 antigen // Journal of Vector Borne Diseases. — 2019. — Vol. 56(2). — P. 105–110.
  36. Ismael A.B. et al. Latex agglutination using the periplasmic proteins antigen of *Brucella melitensis* is a successful, rapid, and specific serodiagnostic test for ovine brucellosis // International Journal of Immunopathology and Pharmacology. — 2016. — Vol. 29(3). — P. 480–487.
  37. Johansen L. et al. The new latex agglutination test kit for immunological assay // J. Immunol. Methods. — 1983. — No. 59. — P. 255–264.
  38. Kjellqvist K. Reactive acid curing waterborne microparticles // Prog. in Org. Coatings. — 1994. — Vol. 24(1–4). — P. 209–223.
  39. Margel S., Nov E., Fisher I. Polychloromethylstyrene microspheres: Synthesis and characterization // J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. — 1991. — Vol. 29(3). — P. 347–355.
  40. Margel S. Characterization and chemistry of polyaldehyde microspheres // J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. — 1984. — Vol. 22(11). — P. 3521–3533.
  41. Orejarena Ávila L.P., Inguilan E.M., Padilla Sanabria L. et al. Standardization of a latex agglutination test for coproantigen detection of *Fasciola* sp. in bovine cattle stool // Journal of Parasitic Diseases. — 2018. — Vol. 42(1). — P. 55–61.
  42. Paliwal V.K., Tejan N. Clinical utility of latex agglutination test for the rapid diagnosis of acute bacterial meningitis // Neurology India. — 2018. — Vol. 66(4). — P. 1050–1051.
  43. Rastawicki W., Formińska K., Zasada A.A. Development and evaluation of a latex agglutination test for the identification of *Francisella tularensis* subspecies pathogenic for human // Polish Journal of Microbiology. — 2018. — Vol. 67(2). — P. 241–244.
  44. Schlund B., Pith T., Lambli M. Syntheses et caractéristiques structurales de latex réactifs // Macromol. Chem. Suppl. — 1985. — No. 10/11. — P. 419–433.
  45. Suttisunhakul Vichaya et al. Evaluation of polysaccharide-based latex agglutination assays for the rapid detection of

- antibodies to *Burkholderia pseudomallei* // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 2015. — Vol. 93(3). — P. 542–546.
46. Suzawa T., Shirahama H. Adsorption of plasma proteins onto polymer latices // Advances in Colloid and Interface Science. — 1991. — Vol. 35. — P. 139–172.
  47. Thongsukkaeng K., Boonyom R. Development and evaluation of latex agglutination test coating with recombinant antigen, LipL32 for serodiagnosis of human leptospirosis // Journal of Genetic Engineering & Biotechnology. — 2018. — Vol. 16(2). — P. 441–446.
  48. Trovero A.C. et al. Production of a latex agglutination reagent for the rapid diagnosis of cryptococcal meningitis // Revista Argentina de Microbiologia. — 2020. — Vol. 52(3). — P. 169–175.
  49. Tsai H.A., Chen C.H., Lee W.C. Influence of surface hydrophobic groups on the adsorption of proteins onto nonporous polymeric particles with immobilized metal-ions // J. Colloid and Interfaces Sci. — 2001. — Vol. 240(2). — P. 379–383.
  50. Zhulina E.B., Dobrynin A.V., Rubinstein M. Adsorption-isotherms of polyampholytes at charged spherical-particles // J. Phys. Chem. B. — 2001. — Vol. 105(37). — P. 8917–8930.
  7. Gasparyan VK. Polistiro'l'nyye lateksy v reaktsii agglyutinatsii, prigotovleniye i sensibilizatsiya. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika 2001; 1:43–45 (in Russian).
  8. Gotovtsev PM i dr. Immobilizatsiya mikrobnnykh kletok dlya biotekhnologicheskikh proizvodstv. Sovremennyye resheniya i perspektivnyye tekhnologii. Biotekhnologiya 2015; 2:33–45 (in Russian).
  9. Gritskova IA i dr. Adsorbtsiya belkov na polistiro'l'nykh mikroferakh i postanovka reaktsii lateks-agglyutinatsii. Kolloidnyy zhurnal 1994; 56(4):491–495 (in Russian).
  10. Zharnikova IV, Zhdanova YeV, Zharnikova TV, Startseva YeV, Kurcheva SA i dr. Sravnitel'naya kharakteristika biotekhnologii polucheniya eritrotsitarnykh i lateksnykh immunoglobulinovykh diagnostikumov dlya vyyavleniya vozбудitelya tulyaremii. Vestnik biotekhnologii i fiziko-khimicheskoy biologii im YuA Ovchinnikova 2019; 15(4):27–31 (in Russian).
  11. Ivashchenko TA i dr. Razrabotka lateks-agglyutinatsionnoy test-sistemy dlya vyyavleniya kapsul'nogo antigena F1 *Yersinia pestis*. Biotekhnologiya 2012; 6:76–85 (in Russian).
  12. Kedik SA i dr. Vysokochuvstvitel'nyye test-sistemy na osnove kon'yugatov «polimernaya mikrosfera — bioligand» dlya ekspress-diagnostiki proteinopatiy. Vestnik MITKHT im MV Lomonosova 2013; 8(4):3–10 (in Russian).
  13. Lateksnyye diagnostikumy v meditsine, veterinarii i biologii: [monografiya]. Vorob'yeva ZG, Lazovskaya AL, Kravtsov EG, Vasil'yeva YeA. 2-ye izd, ispr i dop. Moscow: RUDN, 2012: 292 (in Russian).
  14. Lobanova NA, Gritskova IA, Prokopov NI i dr. Polucheniye polistiro'l'nykh suspenziy s karboksil'nymi gruppami na poverkhnosti chastits dlya sozdaniya diagnosticheskikh test-sistem na sal'monellez. Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv 2014; 4(9):100–106 (in Russian).
  15. Lobova TP. Uovershenstvovaniye laboratornoy diagnostiki adenovirusnoy infektsii krupnogo rogatogo skota: avtoref dis ... kand biol nauk. Moscow, 2006: 20 (in Russian).
  16. Nazarov NA, Mikhaylina NM, Molodkina AV, Rybakov SS, Chepurkin AV. Razrabotka reaktsii agglyutinatsii lateksa dlya diagnostiki beshenstva zivotnykh. Trudy Federal'nogo tsentra okhrany zdorov'ya zivotnykh 2007; 5:186–201 (in Russian).
  17. Nazarov NA i dr. Razrabotka reaktsii agglyutinatsii lateksa dlya diagnostiki beshenstva zivotnykh. Trudy Federal'nogo tsentra okhrany zdorov'ya zivotnykh. FGU «Federal'nyy tsentr okhrany zdorov'ya zivotnykh» (FGU «VNIIZZH») T 5. Vladimir: Izdatel'stvo OOO «Tranzit-IKS», 2007: 186–202 (in Russian).
  18. Narkevich AN, Simakova DI, Pisanov RV. Stabil'nyye poliakroleinovyye mikrosfery dlya prigotovleniya diagnosticheskikh test-sistem. Infektsiya i immunitet 2017; 5:950 (in Russian).
  19. Polimernyye mikrosfery i chastitsy: Obshchaya informatsiya [Elektronnyy resurs]. Rezhim dostupa: <http://gtpt.ru/>

## References

1. Artykova ZB i dr. Polucheniye diagnosticheskikh test-sistem na osnove polimernykh mikrosfer v prisutstvii polivinilpirrolidona, modifitsirovannogo aminokislotoy. Vestnik MITKHT im MV Lomonosova 2010; 5(3):82–87 (in Russian).
2. Basyreva LYu. Sozdaniye diagnosticheskikh test-sistem na osnove polimernykh suspenziy i faktory, opredelyayushchiye ikh chuvstvitel'nost' i spetsifichnost': dis ... kand khim nauk. Moscow, 1994 (in Russian).
3. Volina YeG i dr. Vyyavleniye protivoleptospiroznykh antitel v syvorotkakh krovi bol'nykh lyudey v reaktsii lateks-agglyutinatsii. Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii 2001; 3:89–90 (in Russian).
4. Volina YeG i dr. Primeneniye diagnosticheskoy lateksnoy test-sistemy dlya obnaruzheniya antigenov leptospir v krovi eksperimental'no infitsirovannykh zivotnykh. Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Meditsina 2000; 3:31–34 (in Russian).
5. Volkova YeV i dr. Vybor polimernykh mikrosfer dlya provedeniya reaktsii lateksnoy agglyutinatsii v plashechnom formate. Vestnik MITKHT im MV Lomonosova 2013; 8(6):68–72 (in Russian).
6. Volokh OA, Kuznetsova YeM, Shcherbakov AA. Otsenka vozmozhnosti ispol'zovaniya eksperimental'nykh immunodiagnosticheskikh preparatov v laboratornoy diagnostike chumy i tulyaremii. Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya 2014; 14(2):78–82 (in Russian).

- tekhnicheskaya-literatura/polimernye-mikrosfery, svobodnyy. (Data obrashcheniya: 09.08.2021) (in Russian).
20. Prokopov NI. Sintez polimernykh suspenziy s uzkim raspredeleniyem chastits po razmeram metodom geterofaznoy polimerizatsii: dis ... dokt khim nauk. Moscow, 1999: 322 (in Russian).
  21. Simakova DI, Larionova LV, Karbyshev GL, Terent'yev AN, Lysova LK. Sposob polucheniya psevdotuberkuleznogo antigenogo polimernogo diagnostikuma. Patent RF № 2430376. Opublikovano: 27.09.2011. Byul № 27 (in Russian).
  22. Simakova DI. Konstruirovaniye vidospetsificheskogo antigenogo polimernogo preparata dlya serologicheskoy diagnostiki psevdotuberkuleza: avtoref dis ... kand biol nauk. Rostov-na-Donu, 2019: 23 (in Russian).
  23. Stanishevskiy YaM. Sozdaniye test-sistem dlya bezapparatnoy diagnostiki dinamicheskikh makromolekulyarnykh markerov (soobshcheniye 1. Teoreticheskiye aspekty). Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv 2014; 3(8):88–96 (in Russian).
  24. Starovoytova TA i dr. Videotsifrovoy analiz dlya laboratornoy diagnostiki: kompleks «ekspert-lab» na osnove skanera dlya dokumentirovaniya, ob'yektivizatsii i registratsii rezul'tatov lateks-agglyutinatsionnykh, gemagglyutinatsionnykh testov, izoserologicheskikh i immunofermentnykh issledovaniy. Laboratoriya 2006; 1:19–22 (in Russian).
  25. Frolov DM i dr. Razrabotka testa lateks-agglyutinatsii dlya vyyavleniya patogennykh burkhol'deriy i yego aprobatsiya v endemichnykh regionakh V'yetnama. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2020; 4:133–138 (in Russian).
  26. Khlyntseva AYe i dr. Razrabotka i ispytaniya diagnostikuma na osnove monoklonal'nykh antitel dlya opredeleniya spor vozбудitelya sibirskoy yazvy v reaktsii lateks-agglyutinatsii. Problemy osobo opasnykh infektsiy 2011; 4(110):71–75 (in Russian).
  27. Shvets YuV. Ekspress-diagnostika ostrykh kishhechnykh infektsiy virusnoy etiologii s ispol'zovaniyem rotaskrin lateks-testa. Izvestiya Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii 2018; 37(1. S1–2):374–377 (in Russian).
  28. Amidu N et al. Diagnosis of bacterial meningitis in Ghana: Polymerase chain reaction versus latex agglutination method. PloS One 2019; 14(1):e0210812. doi: 10.1371/journal.pone.0210812.
  29. Basinska T, Wisniewska M, Chmiela M. Principle of a new immunoassay based on electrophoretic mobility of poly(styrene/alpha-tert-butoxy-omega-vinylbenzyl-polyglycidol) microspheres: application for the determination of *Helicobacter pylori* IgG in blood serum. Macromol Biosci 2005; 5(1):70–77.
  30. Buffin S et al. A latex agglutination assay to quantify the amount of hemagglutinin protein in adjuvanted low-dose influenza monovalent vaccines. Journal of Virological Methods 2018; 251:46–53.
  31. Butler J et al. The physical and functional behavior of capture antibodies adsorbed on polystyrene. J. Immunol. Methods 1992; 150(1–2):77–90.
  32. Changhong Y et al. Poly(styren-co-acrolein) latex particles: copolymerization and characteristics. J of Appl Polym Sci 1990; 40:89–98.
  33. Cho I-H et al. Site-directed biotinylation of antibodies for controlled immobilization on solid surfaces. Analytical Biochemistry 2007; 365 (1):14–23.
  34. Gasparyan VK. Preparation and sensitization of polystyrene latex beads by some antigens and anti-bodies. Factors affecting sensitivity and specificity of latex agglutination tests. J Immunoassay Immunochem 2002; 23(3):399–404.
  35. Grace MR et al. Latex agglutination test for rapid on-site serodiagnosis of Japanese encephalitis in pigs using recombinant NS1 antigen. Journal of Vector Borne Diseases 2019; 56(2):105–110.
  36. Ismael AB et al. Latex agglutination using the periplasmic proteins antigen of *Brucella melitensis* is a successful, rapid, and specific serodiagnostic test for ovine brucellosis. International Journal of Immunopathology and Pharmacology 2016; 29(3):480–487.
  37. Johansen L. et al. The new latex agglutination test kit for immunological assay. J Immunol Methods 1983(59):255–264.
  38. Kjellqvist K. Reactive acid curing waterborne microparticles. Prog. in Org. Coatings 1994; 24(1–4):209–223.
  39. Margel S, Nov E, Fisher I. Polychloromethylstyrene microspheres: Synthesis and characterization. J Polym Sci, Part A: Polym Chem 1991; 29(3):347–355.
  40. Margel S. Characterization and chemistry of polyaldehyde microspheres. J Polym Sci, Part A: Polym Chem 1984; 22(11):3521–3533.
  41. Orejarena Ávila LP, Inguilan EM, Padilla Sanabria L et al. Standardization of a latex agglutination test for coproantigen detection of *Fasciola* sp. in bovine cattle stool. Journal of Parasitic Diseases 2018; 42(1):55–61.
  42. Paliwal VK, Tejan N. Clinical utility of latex agglutination test for the rapid diagnosis of acute bacterial meningitis. Neurology India 2018; 66(4):1050–1051.
  43. Rastawicki W, Formińska K, Zasada AA. Development and evaluation of a latex agglutination test for the identification of *Francisella tularensis* subspecies pathogenic for human. Polish Journal of Microbiology 2018; 67(2):241–244.
  44. Schlund B, Pith T, Lambla M. Syntheses et caractéristiques structurales de latex reactifs. Macromol Chem Suppl 1985(10)/11:419–433.
  45. Suttisunhakul Vichaya et al. Evaluation of polysaccharide-based latex agglutination assays for the rapid detection of antibodies to *Burkholderia pseudomallei*. Am J Trop Med Hyg 2015; 93(3):542–546.
  46. Suzawa T, Shirahama H. Adsorption of plasma proteins onto polymer latices. Advances in Colloid and Interface Science 1991; 35:139–172.
  47. Thongsukkaeng K, Boonyom R. Development and evaluation of latex agglutination test coating with recombinant antigen, LipL32 for serodiagnosis of human leptospirosis. Journal of Genetic Engineering & Biotechnology 2018; 16(2):441–446.

48. Trovero AC et al. Production of a latex agglutination reagent for the rapid diagnosis of cryptococcal meningitis. *Revista Argentina de Microbiologia* 2020; 52(3):169–175.
49. Tsai HA, Chen CH, Lee WC. Influence of surface hydrophobic groups on the adsorption of proteins onto nonporous polymeric particles with immobilized metal-ions. *J Colloid and Interfaces Sci* 2001; 240(2):379–383.
50. Zhulina EB, Dobrynin AV, Rubinstein M. Adsorption-isotherms of polyampholytes at charged spherical-particles. *J Phys Chem B* 2001; 105(37):8917–8930.

## BIOTECHNOLOGICAL DEVELOPMENT OF LATEX PREPARATIONS FOR DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS DISEASES

A.Yu. EVCHENKO, I.V. ZHARNIKOVA, T.V. ZHARNIKOVA, D.V. RUSANOVA, S.A. KURCHEVA, M.M. KURNOSKINA, E.V. ZHDANOVA, A.G. KOSHKIDKO

*Stavropol Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор, Stavropol*

The review presents literature data on biotechnological developments of diagnostic preparations for the detection of infectious agents and antibodies to them using latexes as a solid phase, which allow performing the analysis (latex agglutination reaction – LAR) with sufficient sensitivity and specificity. The simplicity of setting up analyzes, in which there is no need for instrumental accounting of results, helps to reduce material and labor costs and the possibility of setting up reactions in the field.

*Keywords:* latex, immobilization, latex agglutination reaction (LAR).

### Address:

Zharnikova I.V., Doctor of Biological Sciences,  
Leading Researcher of the Research and Production Laboratory  
of Preparations for the Diagnosis of Especially Dangerous and  
Other Infections. FKUZ Stavropol Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор  
E-mail: ivj-biotech@yandex.ru

### Для цитирования:

Евченко А.Ю., Жарникова И.В., Жарникова Т.В., Русанова Д.В., Курчева С.А., Курноскина М.М., Жданова Е.В., Кошкидько А.Г. Биотехнологические разработки латексных препаратов для диагностики инфекционных болезней. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова* 2022; 18(1):60–70.

### For citation:

Evchenko A.Yu., Zharnikova I.V., Zharnikova T.V., Rusanova D.V., Kurcheva S.A., Kurnoskina M.M., Zhdanova E.V., Koshkidko A.G. Biotechnological development of latex preparations for diagnostics of infectious diseases. *Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov* 2022; 18(1):60–70 (in Russian).

**К итогам XXXIV международной зимней  
молодежной научной школы  
«Перспективные направления физико-химической  
биологии и биотехнологии»**

С 8 по 11 февраля 2022 года в Институте биоорганической химии РАН состоялась ежегодная международная молодежная зимняя научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Инициатором и организатором проведения Школы-2022 выступили Учебно-научный центр ИБХ РАН и Общество биотехнологов России им Ю.А. Овчинникова. В 2022 г. это была XXXIV школа, которая с каждым годом становится все более популярной среди студентов, аспирантов и молодых научных сотрудников. Школа-2022 проводилась в формате международной конференции на английском языке.

По сложившейся традиции открытие Школы было приурочено ко Дню науки, который отмечается в нашей стране 8 февраля — в день основания Российской академии наук. С приветственным словом к участникам школы обратился научный руководитель ИБХ РАН, сопредседатель Программного комитета Школы-2021 академик В.Т. Иванов. В качестве приглашенных пленарных докладчиков на Школе-2022 выступили с докладами Алексей Белогуров (Россия), Бёхард Бехингер (Франция), Барбара Боле (Австрия), Александр Габиров (Россия), Рудольф Глоксубер (Швейцария), Роман Ефремов (Россия), Дмитрий Карпов (Россия), Сергей Кочетков (Россия), Марио Мардироссян (Италия), Константин Минеев (Россия), Сергей Недоспасов (Россия), Максим Никитин (Россия), Илья Остерман (Россия), Сабрина Пакор (Италия), Юрий Поликанов (США), Алексей Семьянов (Россия), Александр Соболевский (США), Алексей Степанов (Россия), Ю Хуанг (Китай), Тим Хухо (Германия), Надежда Шилова (Россия), Виктория Шипунова (Россия). 175 молодых ученых, студентов и аспирантов прислали тезисы и видеозаписи своих сообщений; 33 из них были отобраны для представления в форме устных докладов. Организаторы и участники школы единодушно отмечают высокий профессиональный уровень докладов, представленных молодыми учеными. Активная дискуссия, проходившие

в онлайн-формате, способствовала формированию атмосферы научного творчества.

В рамках Школы-2022 был проведен Конкурс работ молодых ученых. Научные сотрудники УНЦ и члены СМУ ИБХ РАН провели экспертизу представленных проектов. Обладателем первой премии в номинации «Студенты» стал Андрей Булахов, студент 2 курса магистратуры Сколковского института науки и технологий. Его работа «Оптимизация условий антиген-специфического выращивания регуляторных Т-клеток периферической крови на модели цитомегаловирусной инфекции» была признана лучшей в номинации «Студенты». 1 место в номинации «Аспиранты» получила аспирантка Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН Анастасия Зенченко, представившая работу «Новые биологически активные аналоги цитокининовых нуклеозидов». В номинации «Молодые научные сотрудники» победила работа Олега Ветрового из Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (г. Санкт-Петербург) «Фармакологическое ингибирование NIF1 в модели окислительного стресса, вызванного тяжелой гипоксией, предотвращает супрессию пентозофосфатного пути и апоптоз нейронов в гиппокампе крыс». Победителям и призерам Конкурса работ молодых ученых вручены памятные дипломы.

Организуя ежегодные молодежные научные школы, Учебно-научный центр ИБХ РАН и Общество биотехнологов России ставят перед собой задачу привлечь в науку талантливую молодежь, расширить профессиональный кругозор слушателей и сети их научных контактов. Организаторы желают всем участникам Школы-2022 новых творческих успехов и выражают надежду на то, что в следующем году XXXV международная зимняя молодежная научная школа привлечет еще более широкую и заинтересованную молодежную аудиторию.

С программой Школы-2022, сборником тезисов и видеозаписями стендовых сообщений можно ознакомиться на сайте [sec-ibch.ru](http://sec-ibch.ru).

Т.В. Овчинникова,  
руководитель Учебно-научного центра ИБХ РАН,  
председатель Оргкомитета Школы-2022

## ПУБЛИКАЦИИ

*Оленев С.Н.* Конструкция мозга. Изд. 2. — URSS, 2021. — 216 с.

**Аннотация.** В настоящей книге рассмотрена структурно-функциональная организация мозга (анатомическое подразделение и номенклатура, связи, распределение медиаторов и нейропептидов) на примерах крысы, кошки и отчасти человека. Приведены данные об эволюции, онтогенезе и роли данных структур мозга в патологии человека. Книгу иллюстрируют уточненные стереотаксические схемы коры, проводящих путей. Книга предназначена для морфологов, физиологов, патофизиологов, фармакологов, невропатологов и психиатров.

*Власов Е.А.* Томографическая (КТ и МРТ) анатомия центральной нервной системы человека. Атлас. — Издательский дом Видар-М, 2020. — 144 с.

**Аннотация.** В книге приводятся МРТ и КТ сканы в стандартных плоскостях с обозначением основных анатомических структур, отделов и областей головного мозга. Кроме того, освещается анатомия костей черепа на аксиальных сканах, как взрослого человека, так и ребенка в разных возрастных интервалах. Приводится анатомия сосудов головного мозга и территориальные границы сосудистых бассейнов головного мозга. Обсуждаются и демонстрируются возрастные изменения головного мозга, гипофиза и костей черепа от детского до старческого возраста. Сообщается о вариантной анатомии, допустимых изменениях в рамках нормальных параметров и крайних проявлений на границе нормальных анатомических критериев. Демонстрируются схемы анатомии проводящих путей спинного мозга и основных путей волокон белого вещества. Для ведения строгой документации и медицинских комиссий могут быть полезны приводимые параметры измерений желудочковой

системы головного мозга и индексы черепа. Издание предназначено для врачей рентгенологов, неврологов, нейрохирургов, а также может быть полезно студентам медицинского профиля, биологических специальностей, ординаторам и аспирантам.

Handbook of Clinical Neurology Ser.: Thermoregulation Part I: From Basic Neuroscience to Clinical Neurology by Andrej A. Romanovsky (2018, Hardcover).

**Аннотация.** Представлен очередной том (154) фундаментального руководства по клинической неврологии. Он посвящен вопросам терморегуляции и содержит часть I: От фундаментальной нейроанатомии к клинической неврологии. В нем рассматривается не только как изменяется регуляция температуры тела при неврологических заболеваниях, но и как этот аспект влияет на течение и исходы каждого заболевания. В других разделах тома обсуждаются три терапевтических подхода, направленных на манипулирование температурой тела, включая индуцированную гипотермию, индуцированную гипертермию и жаропонижающую терапию. Книга состоит из 9 разделов в двух томах, 5 из которых посвящены основным аспектам регуляции температуры тела, а 4 — клиническим аспектам. Основные разделы охватывают систему терморегуляции, терморцепторы, термоэффекторы, нервные пути и терморегуляцию как гомеостатическую функцию. Кроме того, книга включает в себя физиологию и нейроанатомию системы терморегуляции и дает описание того, как регуляция температуры тела взаимодействует с другими физиологическими функциями (такими как сон, осморегуляция и иммунитет), стрессом, физическими упражнениями и старением. Основные разделы служат введением в четыре клинических раздела: температура тела, клиническое значение, аномальная температура тела, терморегуляция при неврологических заболеваниях и терапевтические вмешательства.



## ЮБИЛЕЙНЫЕ И ЗНАМЕНАТЕЛЬНЫЕ ДАТЫ 2022 ГОДА\*

## СОБЫТИЯ, ФАКТЫ

**1797** — обнаружение Дженнером эффективности профилактической прививки от оспы — первая вакцинация осуществлена в мае 1796 г. (1797 год — год официального отклонения Лондонским Королевским обществом его рукописи «Исследование причин и действий коровьей оспы»).

**1877** — Роберт Кох разработал метод культивирования микроорганизмов в биологических жидкостях, предложил метод окрашивания бактерий анилиновыми красителями.

**1882** — открытие Кохом возбудителя туберкулеза.

**1882** — открытие фагоцитоза И.И. Мечниковым.

**1892** — открытие Д.И. Ивановским вируса табачной мозаики.

**1897** — открытие Эдуардом Бухнером бесклеточного брожения.

**1902** — Т. Бовери (Германия) и У. Саттон (США) независимо друг от друга сделали предположение, что гены расположены в хромосомах и что каждая яйцеклетка или сперматозоид содержит только по одной хромосоме каждого типа.

**1902** — присуждение Нобелевской премии по химии Эмилю Фишеру за исследования синтеза веществ с сахаридными и пуриновыми группами.

**1907** — начало изучения дрозофилы Т.Х. Морганом.

**1907** — получение Нобелевской премии по химии Э. Бухнером за биохимические исследования и открытие бесклеточного брожения.

**1912** — публикация книги Э.Б. Вильсона «Клетка и ее роль в наследственности и эволюции».

**1917** — впервые введен термин «биотехнология» (предложен венгерским инженером Карлом Эреки — Karl Ereky, 1865–1933).

**1917** — открытие бактериофагов канадским ученым Феликсом Д'Эреллем (Felix Huber D'Herelle, 1873–1949).

**1917** — основание Н.К. Кольцовым Института экспериментальной биологии (Москва).

**1922** — 100-летие создания Т.Х. Морганом карты хромосом дрозофилы.

**1927** — обнаружение Г. Меллером открытия радиационного мутагенеза: публикация статьи «Искусственная трансмутация генов».

**1927** — выступление Н.К. Кольцова на III Всероссийском съезде зоологов, анатомов и гистологов с идеей репликации наследственных молекул.

**1937** — обнаружение нуклеопротеидной (РНК) природы вируса табачной мозаики английским вирусологом Ф. Боуденом (Frederick Charles Bawden, 1908–1972).

**1947** — Барбара Мак-Клинток сообщила об открытии подвижных генетических элементов у бактерий («транспозонов»).

**1947** — вручение половинной Нобелевской премии по физиологии и медицине супругам Карлу Ф. и Гертти Т. Кори за открытие каталитического обмена гликогена; второй половины — Бернардо Альберто Усаю за открытие действия гормона передней доли гипофиза на обмен сахара.

**1957** — присуждение Нобелевской премии по химии Александеру Тодду за работы по нуклеотидам и нуклеотидным коферментам.

**1957** — Ф. Крик и Дж. Гамов предложили концепцию центральной догмы молекулярной биологии — переноса генетической информации в цепи: ДНК — мРНК — белок.

**1957** — публикация статьи Мэтью Мезельсона и Франклина Сталя о новом методе изучения макромолекул, с помощью которого ими было показано, что репликация ДНК имеет полуконсервативный характер (1958), то есть каждая дочерняя двойная спираль ДНК состоит из одной старой (матричной) цепи и одной вновь синтезированной цепи.

\* Материал подготовлен О.В. Коломбет

**1957** — публикация А.С. Спирина, А.Н. Белозерского, Н.В. Шугаевой, Н.В. Ванюшина «Изучение видовой специфичности нуклеиновых кислот у бактерий» в журнале «Биохимия» (Т. 22, С. 744–754) с предсказанием существования иРНК.

**1962** — присуждение Нобелевской премии по химии Дж.К. Кендрию вместе с М. Перуцем за исследование структуры глобулярных белков.

**1967** — выделение А. Корнбергом биологически активной ДНК (публикация: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1967, Vol. 58, P. 2321–2328). 1967 — Мери Вейс и Ховард Грин предложили метод гибридизации соматических клеток.

**1967** — основание Института биологии развития АН СССР (ныне РАН), позднее получившего имя Н.К. Кольцова.

**1972** — П. Берг сконструировал и получил биологически активную гибридную плазмиду путем обработки рестриктазой двух плазмид с последующей их сшивкой ДНК-лигазой. Таким образом была создана 1-я рекомбинантная молекула ДНК.

**1972** — Х.Г. Корана и др. синтезировали полно-размерный ген тРНК.

**1972** — присуждение Нобелевской премии по химии К. Анфинсену (одна половина) и У.Х. Стайну и С. Муру (другая половина) за исследования рибонуклеазы.

**1972** — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Дж. Эдельману и Родни Р. Портеру за установление химического строения антител.

**1972** — установлено, что структура ДНК шимпанзе и гориллы на 99% совпадает с человеческой.

**1977** — У. Гилберт и Ф. Сенгер независимо предложили быстрый метод определения последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК (в результате открылась возможность одному исследователю определять до 1000 нуклеотидов в неделю).

**1977** — Б. Ритгер и Г. Гудман выделили ген инсулина.

**1982** — разрешена к применению в Европе первая вакцина для животных, полученная по технологии рекомбинантных ДНК.

**1982** — разрешение FDA на выход на рынок генноинженерного инсулина человека.

**1982** — создание биотехнологическим путем первого культурного растения — стойкого к антибиотику табака. Начало эры трансгенных растений.

**1987** — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине Судзуми Тонегаве за открытие генетических принципов генерации антител.

**1987** — первые полевые испытания генетически модифицированных сельскохозяйственных растений (помидор, устойчивый к вирусным заболеваниям).

**1987** — американский генетик М. Олсон из Вашингтонского университета сконструировал новый тип экспрессирующего вектора — «искусственные дрожжевые хромосомы» («yeast artificial chromosomes»), предназначенные для клонирования больших фрагментов ДНК.

**1987** — компания Genentech получила разрешение FDA на выпуск на рынок генно-инженерного тканевого активатора плазминогена.

**1987** — компания Calgene запатентовала модифицированный ген томата, подавляющий экспрессию антисмысловой полигалактуроназной РНК, что дает возможность отсрочить созревание плодов.

**1997** — первый опыт клонирования млекопитающего из дифференцированной соматической клетки («овечка «Долли») — Институт Рослина, Шотландия.

**2002** — расшифровка генома мыши.

**2002** — объявлено об успешном завершении секвенирования генома риса (полная расшифровка закончена в 2005 г.).

**2002** — присуждение Нобелевской премии по физиологии и медицине С. Бреннеру, Дж.Э. Салстону и Х.Р. Хорвицу за открытие механизма апоптоза.

## ПЕРСОНАЛИИ

**200 лет со дня рождения Фрэнсиса Гальтона**, выдающегося английского ученого-энциклопедиста, антрополога, основоположника учения о евгенике.

**165 лет со дня рождения А.Н. Баха**, отечественного биохимика.

**150 лет со дня рождения Н.К. Кольцова**, классика биологии, одного из создателей отечественной школы экспериментальной биологии, первооткрывателя внутриклеточного цитоскелета, автор гипотез о матричном синтезе хромосом и их эпигенетических изменениях.

**145 лет со дня рождения Освальда Теодора Эйвери (1877–1955)**, американского микробиолога, показавшего в 1944 г. совместно с К. Мак-Леодом и М. Мак-Карти роль ДНК в передаче генетической информации.

**135 лет со дня рождения Н.И. Вавилова (25 ноября)**, отечественного генетика и селекционера.

**135 лет со дня рождения Эрвина Шредингера**, австрийского физика, лауреата Нобелевской премии (1933, совместно с П. Дираком).

**120 лет со дня рождения и 30 лет со дня смерти Барбары Мак-Клинтон (1902–1992)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1983) за открытие подвижных элементов генома (спустя тридцать с лишним лет после этого открытия).

**120 лет со дня рождения Андре Львова (1902–1994)**, французского микробиолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1965, совместно с Ф. Жакобом и Ж. Моно).

**115 лет со дня рождения и 15 лет со дня смерти Александра Тодда (1907–1997)**, выдающегося английского химика, лауреата Нобелевской премии по химии (1957).

**110 лет со дня рождения Сальвадора Луриа (1912–1991)**, итало-американского биолога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1969, совместно с М. Дельбрюком и А. Херши) за открытие цикла репродукции вирусов и развитие генетики бактерий и вирусов.

**110 лет со дня рождения Конрада Блоха (1912–2000)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1964, совместно с Ф. Линеном) за открытия, касающиеся механизмов регуляции обмена холестерина и жирных кислот.

**110 лет со дня рождения Джорджа Паладе (1912–2008)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1974, совместно с А. Клодом и К. де Дювом) за исследования структурной и функциональной организации клетки.

**105 лет со дня рождения Кристиана де Дюва**, бельгийского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1974, совместно с А. Клодом и Дж. Паладе) за исследования структурной и функциональной организации клетки.

**105 лет со дня рождения и 25 лет со дня смерти Джона К. Кендрю (1917–1997)**, английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по химии (1962, совместно с М. Перуцком) за исследования структуры глобулярных белков.

**105 лет со дня рождения Родни Роберта Портера (1917–1985)**, английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1972, совместно с Дж. М. Эдельманом) за открытие химической структуры антител.

**100 лет со дня рождения Хара Гобинда Кораны (1922–2011)** лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1968, совместно с Р.У. Холли и М.У. Ниренбергом) за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков.

**100 лет со дня рождения Роберта У. Холли (1922–1993)**, американского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1968, совместно с Х.Г. Кораной и М.У. Ниренбергом) за расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков.

**100 лет со дня рождения Стэнли Коэна (1922–2020)**, американского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1986, совместно с Р. Леви-Монтальчини) за открытия, имеющие значение для раскрытия механизмов регуляции роста клеток и органов. Один из пионеров (вместе с Гербертом Бойером) внедрения генной инженерии в практику.

**95 лет со дня рождения Маршалла У. Ниренберга (1927–2010)**, американского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1968, совместно с Х.Г. Кораной и Р.У. Холли) за

расшифровку генетического кода и его роли в синтезе белков.

**95 лет со дня рождения и 10 лет со дня смерти Сезара Мильштейна (1927–2002)**, аргентинского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и биохимии — 1984 г., половинная премия вместе с Г. Келером за разработку техники получения гибридом; вторая половина была присуждена Нильсу К. Йерне за разработку теории идиотипической сети.

**95 лет со дня рождения Сидни Бреннера (1927–2020)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (2002, совместно с Р. Хорвицом и Дж. Салстоном) за открытия в области генетической регуляции развития органов и программированной гибели клеток (апоптоза).

**95 лет со дня рождения Джона Р. Вейна (1927–2004)**, английского фармаколога, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1982, совместно с С. Бергстромом и Б. Самуэльсоном) за открытия, касающиеся простагландинов и родственных биологически активных веществ.

**90 лет со дня рождения Уолтера Гилберта**, американского молекулярного биолога, лауреата Нобелевской премии — 1980 г., половинная премия вместе с Ф. Сенгером за вклад в определение последовательности оснований в нуклеиновых кислотах; вторая половина была присуждена Полу Бергу за фундаментальные исследования в области биохимии нуклеиновых кислот, в особенности, рекомбинантных ДНК.

**80 лет со дня рождения Стенли Б. Прузинера**, американского невролога и биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1997) за открытие прионов как нового биологического принципа инфекции.

**80 лет со дня рождения Джона Салстона**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (2002, совместно с Р. Хорвицом и С. Бреннером) за открытия в области генетической регуляции развития органов и программированной гибели клеток (апоптоза).

**75 лет со дня рождения Роберта Хорвица** лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (2002, совместно с С. Бреннером и Дж. Салсто-

ном) за открытия в области генетической регуляции развития органов и программированной гибели клеток (апоптоза).

**105 лет со дня смерти Эдуарда Бухнера (1860–1917).**

**65 лет со дня смерти Герти Т. Кори (1896–1957)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине — 1947, половинная премия вместе с супругом Карлом Ф. Кори за открытие каталитического обмена гликогена; вторая половина присуждена Бернардо Альберто Усаю за открытие действия гормона передней доли гипофиза на обмен сахара.

**55 лет со дня смерти Г. Меллера (1890–1967)**, выдающегося генетика, лауреата Нобелевской премии (1946).

**50 лет со дня смерти А.Н. Белозерского (1905–1972)**, выдающегося отечественного биохимика.

**50 лет со дня смерти Эдуарда К. Кендалла (1886–1972)**, английского биохимика, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1950, совместно с Ф.Ш. Хенчем и Т. Рейхштейном) за открытия, касающиеся гормонов коры надпочечников, их структуры и биологических эффектов

**45 лет со дня смерти английского физиолога Арчибалда В. Хилла (1886–1977)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине — 1922, половинная премия за открытие теплообразования в мышцах; вторая половина была вручена вручена Отто Мейергофу за открытие законов регуляции поглощения кислорода мышцей и образования в ней молочной кислоты.

**40 лет со дня смерти шведского биохимика Хуго Теорелля (1903–1982)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине 1955 года за открытия, касающиеся природы и механизма действия окислительных ферментов.

**35 лет со дня смерти американского биохимика Джона Х. Нортропа (1891–1987)**, лауреата Нобелевской премии по химии — 1946, вместе с У.М. Стенли за получение в чистом виде ферментов и белковых вирусов; вторая половина была присуждена Дж.Б. Самнеру за открытие свойства кристаллизации ферментов.

---

**35 лет со дня смерти английского биолога Питера Брайана Медавара (1915–1987)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1960, совместно с М. Бернетом) за исследования приобретенной иммунологической толерантности.

**25 лет со дня смерти Алфреда Херши (1908–1997)**, лауреата Нобелевской премии по физиологии и медицине (1969, совместно с М. Дельбрюком и С.

Луриа) за открытие цикла репродукции вирусов и развитие генетики бактерий и вирусов.

**15 лет со дня смерти Артура Корнберга (1918–2007)**, выдающегося американского молекулярного биолога, первым в мире осуществившим синтез ДНК *in vitro*. В 1959 году разделил Нобелевскую премию по физиологии и медицине с Северо Очоа, осуществившим аналогичный синтез РНК.

## Памяти профессора Борисенко Е.Г. (1948–2022)



2 марта 2022 года скончался Евгений Георгиевич Борисенко, профессор кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» Московского государственного университета пищевых производств, известный биотехнолог, внесший вклад в становление и возрождение в послеперестроечном периоде биотехнологического направления в нашей стране.

Его жизненный итог свидетельствует о том, как много может сделать ученый, избравший путь развития цельной личности в рамках актуального, востребованного временем научного направления. Речь идет о его востребованных научно-практических исследованиях в сфере микробной биотехнологии применительно к важнейшей общегосударственной проблеме создания отечественных пищевых и кормовых продуктов.

Здесь он был занят двумя главными проблемами:

- Разработка теоретических основ нового вида пищевых продуктов-нутрипарафармацевтиков

микробно-растительного происхождения и осуществление их производства в условиях пищевых предприятий.

- Разработка биотехнологии кормовых, пищевых и биологически активных добавок.

Борисенко Е.Г. является автором более 250 научных работ, авторских свидетельств и патентов на изобретения. Они послужили основой для развертывания производства биологически активных добавок на предприятиях нашей страны и за ее пределами.

Свой научный опыт он передавал и за рубежом: в 1973–1976 гг. преподавал в Департаменте микробиологии Оранского университета (Алжир), а в 1983–1986 гг. был экспертом-микробиологом Всемирной организации здравоохранения и Программы развития ООН в Лаосе.

Естественно, будучи опытным педагогом (он – Почетный работник высшего профессионального образования РФ), Евгений Георгиевич воспитал, помимо практиков пищевой индустрии, десятки научных работников, которые успешно трудятся в нашей стране, а также являются ведущими экспертами и возглавляют крупные предприятия в странах Юго-Восточной Азии и Африки.

Общество биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова с благодарностью вспоминает высоко полезную, профессионально обоснованную деятельность профессора Е.Г. Борисенко на начальном периоде возобновления общественной активности с целью восстановления утраченных позиций биотехнологии в Российской Федерации в 2000-х годах. Он входил в состав редколлегии нашего журнала, его участие помогало поддерживать высокий уровень рецензирования и содержания публикаций.

Редакционная коллегия и редакционный совет журнала глубоко скорбят об этой утрате и выражают соболезнование родным и близким покойного.

1. *Предметная область.* Принимаются оригинальные и обзорные научные работы по теории, методологии и практике биотехнологии и сопряженных дисциплин: физико-химическая (молекулярная) биология, генная инженерия, геномные и постгеномные технологии, биохимия, биофизика, биоинформатика, микробиология и др.
2. *Общие положения.* Рукописи оформляются в соответствии с общепринятыми требованиями, предъявляемыми к научному исследованию в отношении авторских прав, преемственности, обоснованности целеполагания, достоверности, доказательности, орфографической и стилистической корректности и т.д. В статье должны быть четко обозначены актуальность, научная значимость, методология, цель исследования, результаты и выводы, а также исчерпывающий анализ литературы.
3. Статьи принимаются на русском и английском языках.
4. Объем статьи не должен превышать от 14 до 26 страниц.
5. Оригинальность текста должна составлять не менее 80% (статьи проходят проверку по системе «Антиплагиат»).
6. Для набора текста, формул и таблиц необходимо использовать редактор Microsoft Word для Windows. Параметры текстового редактора: все поля по 2 см; шрифт Times New Roman, размер — 12; межстрочный интервал — 1,5; выравнивание по ширине; абзацный отступ — 1 см; ориентация листа — книжная.
7. Все визуальные объекты должны быть предоставлены в формате, допускающем форматирование. Все файлы рисунков должны быть пронумерованы, а названия рисунков должны быть приведены в конце статьи (например: Рисунок 1. Название рисунка). Любые рисунки (в том числе графики и диаграммы) должны быть информативными как в цветном, так и черно-белом исполнении. Иллюстрации прилагаются в электронном виде в формате JPEG или TIF.
8. Таблицы размещаются в самой статье. Ниже таблицы нужно дать номер таблицы и название (например: Таблица 3. Название таблицы).
9. Оформление мета-данных статьи: 1. Полное название статьи. 2. Укороченный вариант названия статьи (Running title). 3. Ф.И.О. автора статьи. 4. Ученое звание, ученая степень, должность. 5. Место работы: кафедра, факультет, название вуза. 6. Город, страна. 7. Рабочий адрес с почтовым индексом, рабочий телефон. 8. E-mail. 9. Информация о гранте (если есть).
  - Если авторов статьи несколько, то информация повторяется для каждого автора.
  - Возможно при желании сопроводить статью кратким биографическим описанием автора как исследователя (не более 50 слов на английском языке, не более 60 слов на русском языке).
10. Текст статьи должен быть разбит на части, заголовки должны быть подписаны: Аннотация (Abstract). Ключевые слова (Keywords). Введение (Introduction). Материалы и методы (Materials and methods). Литературный обзор (Literature Review). Результаты (Results). Обсуждение (Discussion). Заключение (Conclusion). Благодарности (Acknowledgements). Список литературы (References).
11. Аннотация — оптимальный объем 150 слов (не более 250 слов на русском языке или 200 на английском языке). При этом в случае несоответствия требованию издательство оставляет за собой право частичного изменения и сокращения аннотации. Это же касается и редактирования всего текста рукописи. Аннотация должна включать в себя информацию о цели исследования, методологии, результатах.
12. Ключевые слова — 5–10 слов. Ключевые слова отделяются друг от друга точкой с запятой. Требуется УДК, а также сопроводительное письмо из учреждения.
13. Включить JEL-коды, если применимо.
14. Список литературы приводится в алфавитном порядке, со сквозной нумерацией. Ссылки в тексте на соответствующий источник из списка литературы оформляются в квадратных скобках, например: [1, с. 277]. Использование автоматических постраничных ссылок не допускается. Список литературы

должен содержать не менее 20 источников за последние 3 года (для работ исторического характера могут быть сделаны исключения). Иностраных источников — не менее 15. Преимуществом станет использование статей, опубликованных в базах Scopus и Web of Science.

- Информация о цитируемой статье в журнале должна включать в себя: фамилию и имя автора, год публикации, название статьи, название журнала, том/номер/выпуск, страницы.
  - Информация об упоминаемой книге должна включать в себя: фамилию и имя автора, год публикации, название книги, название издательства, место публикации.
  - В случае с электронным источником информации обязательны ссылка и дата доступа.
  - Необходимо указать тип каждого источника: например, материалы конференции, и т.д. для исключения путаницы при оформлении списка литературы в соответствии с требованиями журнала.
15. Не допускается публикация работ, уже напечатанных или посланных в редакции других изданий.
  16. При несоблюдении указанных правил статьи редакцией не принимаются.
  17. Принятые к публикации рукописи проходят рецензирование, после чего принимается окончательное решение о возможности печатания. Отклоненные рукописи не возвращаются.
  18. Редакция не несет ответственности за достоверность фактов, выводы и суждения, приведенные в представленном к печати и опубликованном ранее материале авторов.
  19. Редакция оставляет за собой право делать научную и литературную правку, в том числе сокращать объем статей.
  20. Адрес редакции указан на титульном листе журнала.
  21. Журнал является безгонорарным. Редакция резервирует для автора статьи по 1 экземпляру журнала. По вопросам приобретения отдельных номеров журнала следует обращаться в редакцию.
  22. Имеется электронный архив журнала на сайте Общества биотехнологии России им. Ю.А. Овчинникова ([www.biorosinfo.ru](http://www.biorosinfo.ru)).



Подписано к печати 22.03.2022  
Формат 60/90<sup>1</sup>/<sub>8</sub>. Бумага офсетная № 1.  
Печать офсетная. Гарнитура Академия.  
Печ. л. 5,0. Тираж 1000 экз.

ООО «Издательство «БИОСФЕРА»  
109147 Москва, ул. Марксистская, 20, стр. 8  
Тел.: +7 (495) 763-18-41; E-mail: [biosphere@biorosinfo.ru](mailto:biosphere@biorosinfo.ru)