

**«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы»
Жауапкершілігі шектеулі серіктестігі**

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

Товарищество с ограниченной ответственностью
«Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»

№ 3 (38)

ВЫХОДИТ 4 РАЗА В ГОД

АЛМАТЫ
2022

ISSN 2304–585 X
МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ
№ 2(37)/2022

Научно-практический журнал
 Журнал зарегистрирован в Комитете информации и архивов Министерства культуры и информации Республики Казахстан. Свидетельство о регистрации №12821-Ж от 12.06.2012 г.

УЧРЕДИТЕЛЬ И ИЗДАТЕЛЬ
 © ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии»

Редакционная коллегия

Саданов А.К. – доктор биологических наук, профессор, академик (главный редактор)
 Айткельдиева С.А. – доктор биологических наук (заместитель главного редактора)
 Балгимбаева А.С. – кандидат биологических наук (ответственный секретарь)
 Dr.Azliati Azizan (USA) – PhD
 Березин В.Э. – доктор биологических наук, профессор, член - корреспондент НАН РК
 Богоявленский А.П. – доктор биологических наук, профессор
 Гаврилова Н.Н. – доктор биологических наук, профессор
 Головлева Л.А. (Россия) – доктор биологических наук, профессор
 Кыдырманов А.И. – доктор ветеринарных наук
 Магай Е.Б. (Узбекистан) – кандидат биологических наук
 Мурадов П.З. (Азербайджан) – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Азербайджана
 Науанова А.П. – доктор биологических наук, профессор
 Ратникова И.А. – доктор биологических наук, доцент
 Савицкая И.С. – доктор биологических наук, профессор
 Dr. Sasan Fereidouni (Germany) – DVM, PhD
 Саубенова М.Г. – доктор биологических наук, профессор
 Смирнова И.Э. – доктор биологических наук

АДРЕС РЕДАКЦИИ 050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 105, тел.+7(727) 291-84-97, 291-97-36

Сайт: <http://imv-journal.kz>

Подписной индекс - 76057

ПЕЧАТЬ

ТОО «Print Market.kz»

Адрес: г. Алматы, ул. Казыбек би, 125

Тел.: 8 (727) 328-14-67, 225-00-68

Территория распространения –

Республика Казахстан

Периодичность – 4 номера в год

Тираж 500 экземпляров

МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

М.Г. Саубенова, Е.А. Олейникова, А.В. Чижаева, А.Ж. Алыбаева, А.А. Айтжанова, А.А. Амангелді, И.Ю. Потороко
 Микробиота человека и болезни цивилизации: в поисках выхода.....4

А.И. Кыдырманов, К.О. Карамендин, Т.Б.Сабыржан, С. Гудман
 Вирусы гриппа у морских млекопитающих.....23

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

К.Г. Мустафин, Н.А. Бисько, Ж.Б. Нармуратова, А.С. Жакипбекова, Ж.К. Садиева, А.К. Калиева, Н.Н. Ахметсадыков, Ж.Б. Сулейменова
 Скрининг штаммов лекарственных базидиомицетов с высоким содержанием полисахаридов.....47

З.А. Латыпова, А.М. Намет, Б.Ж. Исакулова, З.К. Буйенбаева, Р.А. Керимбаева
 Зонирование территории Республики Казахстан по степени распространения заболевания пастереллёзом среди крупного рогатого скота.....55

Б.Б. Баймаханова, А.Б. Сейдалина, С.А. Сулейменова, Е.Т. Касымбеков, Е.Я. Хан, К.О. Карамендин, А.И. Кыдырманов, С.Р. Ферейдоуни
 Гепатит Е птиц в Казахстане64

Ж.Б. Сулейменова, Р.К. Блиева, Н.А. Бисько, А.С. Жакипбекова, Ж.Б. Нармуратова, М.Н. Ахметжанова, А.К. Калиева
 Скрининг микромицета рода *Aspergillus* по способности к биосинтезу целлюлазы.....73

МАЗМҰНЫ

БІРТУМА МАҚАЛАЛАР

М.Г. Саубенова, Е.А. Олейникова, А.В. Чижаева,
А.Ж. Алыбаева, А.А. Айтжанова, А.А. Амангелді,
И.Ю. Потороко
Адам микробиотасы және өркениет аурулары: шығу
жолын іздеу13

А.И. Кыдырманов, К.О. Карамендин, Т.Б. Сабыржан,
С. Гудман
Теңіз сүтқоректілеріндегі тұмау вирустары.....31

БІРТУМА МАҚАЛАЛАР

К.Г. Мустафин, Н.А. Бисько, Ж.Б. Нармуратова,
А.С. Жакипбекова, Ж.К. Садыева, А.К. Калиева,
Н.Н. Ахметсадыков, Ж.Б. Сулейменова
Құрамында полисахариді жоғары дәрілік
базидиомицеттер штамдарының
скринингі40

З.А. Латыпова, А.М. Намет, Б.Ж. Исакулова,
З.К. Буйенбаева, Р.А. Керимбаева
Ірі қара мал арасында пастереллез ауруының таралуы
дәрежесі бойынша Қазақстан Республикасының
аумағын аймақтарға бөлу59

Б.Б. Баймаханова, А.Б. Сейдалина, С.А. Сулейменова,
Е.Т. Касымбеков, Е.Я. Хан, К.О. Карамендин,
А.И. Кыдырманов, С.Р. Ферейдоуни
Қазақстандағы құстардың Е гепатиті68

Ж.Б. Сулейменова, Р.К. Блиева, Н.А. Бисько,
А.С. Жакипбекова, Ж.Б. Нармуратова,
М.Н. Ахметжанова, А.К. Калиева
Aspergillus тектес микромицеттердің целлюлоза
биосинтезіне қабілеттілігі бойынша скринингі.....78

CONTENTS

REVIEW RESEARCH PAPERS

M.G. Saubenova, Ye.A. Oleinikova, A.V. Chizhayeva,
A.Zh. Alybayeva, A.A. Aitzhaniova, A.A. Amangeldi,
I.Yu. Potoroko
Human Microbiota and Diseases of Civilization:
Searching Way out.....14

A.I. Kydyrmanov, K.O. Karamendin, T.B. Sabyrzhon,
S. Goodman
Influenza Viruses in Marine Mammals32

ORIGINAL RESEARCH PAPERS

K.G. Mustafin, N.A. Bisko, Zh.B. Narmuratova,
A.S. Zhakipbekova, Zh.K. Saduyeva, A.K. Kalieva,
N.N. Akhmetsadykov, Zh.B. Suleimenova
Screening for Medicinal Basidiomycetes
with High Polysaccharide Content.....48

Z.A. Latypova, A.M. Namet, B.Zh. Isakulova,
Z.K. Buyenbaeva, R.A. Kerimbaeva
Zoning the Territory of the Republic of Kazakhstan According
to the Degree of the Distribution of Pasteurellosis Disease
among Cattle.....59

B.B. Baimakhanova, A.B. Seidalina, S.A. Suleimenova,
E.T. Kasymbekov, E.Ya. Khan, K.O. Karamendin,
A.I. Kydyrmanov, S.R. Fereidouni
Avian Hepatitis E in Kazakhstan.....68

Zh.B. Suleimenova, R.K. Blieva, N.A. Bisko,
A.S. Zhakipbekova, Zh.B. Narmuratova,
M.N. Akhmetzhanova, A.K. Kalieva
Screening of *Aspergillus* Fungus
for Cellulase Biosynthesis.....78

ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

МРНТИ: 34.27.23, 34.39.49, 34.27.39, 34.03.99

М.Г. САУБЕНОВА¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, А.В. ЧИЖАЕВА¹,
А.Ж. АЛЫБАЕВА¹, А.А. АЙТЖАНОВА¹, А.А. АМАНГЕЛДІ¹,
И.Ю. ПОТОРОКО²

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Южно-Уральский государственный университет, Челябинск, Россия

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

МИКРОБИОТА ЧЕЛОВЕКА И БОЛЕЗНИ ЦИВИЛИЗАЦИИ: В ПОИСКАХ ВЫХОДА

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.01

Аннотация

Растущая химизация и загрязнение пищевых продуктов, а также приверженность «западному» питанию с большим количеством жиров и низким содержанием пищевых волокон приводят к нарушению состава кишечной микробиоты и масштабному росту заболеваемости такими болезнями цивилизации, как ожирение, диабет, болезни сердца, рак и снижение иммунитета. В представленном обзоре человеческий организм рассматривается как единый суперорганизм, в котором различные части тесно связаны между собой и взаимно влияют друг на друга. В последние годы были разработаны и углублены концепции осей кишечник-мозг, кишечник-сердце и кишечник-легкие, связывающие кишечник и населяющие его микроорганизмы с другими органами и системами человеческого организма, и общим состоянием здоровья человека. В настоящем обзоре обобщены последние данные о возможных способах влияния на кишечную микробиоту. Показано, что модификация кишечной микробиоты путем изменения рациона питания является эффективным средством облегчения ряда заболеваний, повышения иммунитета и сопротивляемости инфекциям. Расширенное использование натуральных продуктов питания, содержащих пищевые волокна и другие биологически активные растительные вещества, а также включение в состав заквасок при производстве ферментированной пищи различных групп микроорганизмов будет способствовать стимуляции индигенной микрофлоры и повышению защитных сил организма человека. При разработке ферментированных продуктов особое внимание следует уделить уксуснокислым бактериям, продуцирующим ацетат, содержание которого должно быть максимальным среди остальных короткоцепочечных жирных кислот для поддержания здорового метаболизма в кишечнике и во всем организме.

Ключевые слова: микробиота, пробиотик, пребиотик, диета, иммунитет, короткоцепочечные жирные кислоты, уксусная кислота.

В последние десятилетия для коррекции состава продуктов повседневного спроса и их вкусовых достоинств в них вводится большое количество различных, зачастую физиологически необоснованных, химических добавок. Кроме того, на всех этапах производства и хранения происходит загрязнение сырья и самих продуктов питания посторонними микроорганизмами и продуктами их метаболизма, оказывающих на организм человека токсическое воздействие. *Ситуацию ухудшают погрешности питания, стрессы, использование гормонов и других лекарственных препаратов*, приводящих к «болезням цивилизации», запуская механизм которых являются нарушения в составе микробиоты желудочно-кишечного тракта.

Структура и активность триллионов микроорганизмов микробиоты формируется в зависимости от долгосрочного потребления той или иной диеты и отражает различия

между травоядными и плотоядными млекопитающими [1]. Помимо переваривания и извлечения энергии из пищи она обеспечивает осуществление важных физиологических функций хозяина. Она поставляет биологически активные вещества, несинтезируемые организмом человека, поддерживает целостность природного барьера, образованного слизистыми оболочками, препятствует заселению желудочно-кишечного тракта патогенными бактериями, конкурируя с ними за питательные вещества, места адгезии, подавляя их рост своими метаболитами, связывая и нейтрализуя токсические вещества, а также способствует созреванию иммунной системы. Иммуномодулирующая функция микробиоты является самым важным аспектом ее взаимодействия с макроорганизмом, поскольку она оказывает многогранное действие на здоровье кишечника и всего организма [2]. Она позволяет индуцировать защитные реакции на патогены. Когда же состав и функция микробиома нарушаются - возникают предпосылки к заболеваниям. При этом невозможно назвать болезнь, которая не сопровождалась бы микрoэкологическими нарушениями желудочно-кишечного тракта, требующими коррекции [3].

Болезни цивилизации и кишечная микробиота

В результате воздействия ряда негативных факторов, происходит резкое изменение видового разнообразия микробиоты, что в свою очередь приводит к значительному изменению ее функциональной активности, вплоть до развития необратимых поломок гомеостаза и гибели организма хозяина. Особенно это выражено в странах с высоким уровнем дохода, что, возможно объясняет резкий рост в этих регионах аутоиммунных и воспалительных заболеваний.

Уменьшение разнообразия кишечных микроорганизмов у населения стран с более высоким уровнем жизни связывают, главным образом, с отличиями в рационе питания, образе жизни и здравоохранении, которые значительно менее затронули жителей сельских районов. Прогрессирующую потерю разнообразия кишечной микробиоты у населения западных популяций объясняют высоким содержанием в диете жиров и простых углеводов, а также недостаточным использованием доступных углеводных компонентов, содержащихся в клетчатке, что приводит к снижению количества бактерий, синтезирующих короткоцепочечные жирные кислоты, ослабляющие воспалительные процессы [4].

В настоящее время распространенность ожирения, являющегося одним из пяти основных факторов риска смерти, возросла до масштабов пандемии. Модификации поведения и питания, направленные на снижение веса, эффективны лишь в краткосрочной перспективе, необходимы новые диетические стратегии, направленные на микробиоту кишечника [5]. Исследуются разные стороны взаимодействия между представителями кишечной микробиоты и организмом-хозяином, дающие представление о роли их уникальных метаболитов в обеспечении защиты макроорганизма от проникновения патогена, регуляции разнообразных физиологических функций хозяина, включая метаболизм, развитие и гомеостаз иммунитета и нервной системы или, напротив, способствующих возникновению и прогрессированию широкого спектра заболеваний, таких как воспалительное заболевание кишечника, мультисистемное аутоиммунное расстройство, ожирение, колоректальный рак, а также нервно-психическое расстройство [6]. Предполагается, что даже устранение постоянных партнеров, например, таких как гельминты, приводит к снижению разнообразия и устойчивости микробиоты, необходимых для установления сбалансированных иммунных реакций [7].

В последние годы продемонстрирована корреляция между составом и функцией кишечной микробиоты и атеросклерозом [8], метаболическими заболеваниями [9], аллергией [10], астмой [11], желудочно-кишечными заболеваниями, в том числе и раком толстой кишки [12, 13]. Стало известно, что причиной большинства хронических заболеваний, включая остеопороз [14], ожирение [15], сердечно-сосудистые [16] и

неврологические заболевания [17], сахарный диабет [18] является хроническое воспаление.

Обнаружена четкая зависимость между риском развития колоректального рака и потреблением определенных видов пищи, таких как красное мясо, и некоторые другие продукты [19], способствующих дисбактериозу [20], тогда как потребление диеты с низким содержанием жиров приводит к увеличению фекального обилия бифидобактерий [21].

Основным отличием пациентов с колоректальным раком от здоровых людей является высокая концентрация в толстой кишке патогенных бактерий, включая *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* и *Fusobacterium nucleatum* [22].

Кишечные бактерии продуцируют соединения аналогичные гормонам человека, таким как серотонин, тестостерон, норадреналин, дофамин, гистамин. Попадая в кровоток, они оказывают влияние на мозг, формируя вкусовые пристрастия, привычки, и даже поведение, модифицируя активность и функцию вегетативной нервной системы и нейробиологию [17] и участвует в патофизиологии многочисленных психических и неврологических заболеваний [23], в том числе шизофрении [24] и болезни Альцгеймера [25].

Кишечная микробиота и респираторные инфекции

Помимо понятия осей кишечник-мозг и кишечник-сердце, подразумевающих тесную взаимосвязь этих органов и систем человеческого организма, опосредованную кишечной микробиотой, в последнее время вводится понятие оси кишечник-легкое, указывающее на зависимость работы органов дыхания от кишечной микробиоты [26]. Показано, что дыхательные инфекции связаны с изменением состава микробиоты кишечника [27].

В норме микробиота легких формируется непрерывными волнами вторжения и изгнания микроорганизмов при дыхании. Доминирование каких-то видов бактерий, приводящее к уменьшению видового разнообразия микробиоты, связано с прогрессированием муковисцидоза и/или инфекционных заболеваний [28]. При заболевании легких нарушается баланс между иммиграцией и элиминацией, что приводит к преобладанию бактерий, демонстрирующих конкурентные преимущества [29].

Модуляция состава кишечной микробиоты у мышей регулирует иммунный ответ дыхательных путей и изменяет восприимчивость к легочным инфекциям гриппа [30]. Показано, что мыши, получавшие рацион с высоким содержанием клетчатки, имеющие высокий уровень короткоцепочечных жирных кислот в крови, были защищены от астмы [31]. С другой стороны, мыши, дефицитные по содержанию в кишечнике бактерий, продуцирующих их, были подвержены более тяжелому течению пневмонии, вызванной *Staphylococcus aureus* [32]. Доказано, что потребление пробиотиков может значительно снизить заболеваемость инфекциями верхних дыхательных путей и гриппоподобные симптомы [33].

Показано, что у пожилых людей менее разнообразна кишечная микробиота и снижено количество полезных микроорганизмов, таких как бифидобактерии [34] и, соответственно, ослаблен иммунитет легких [35]. Известно, что пневмония – одно из самых серьезных клинических проявлений Covid-19 – поражает, главным образом, пожилых людей. Большое количество летальных исходов пожилых пациентов еще раз подчеркивает роль, которую кишечная микробиота играет в этом заболевании.

Таким образом, экосистемы кишечника и легких (состоящие из микроорганизмов и клеток-хозяев) четко связывают питание, здоровье органов дыхания и пищеварительной системы, а главное, иммунную защиту через сложную систему взаимного общения. Локальные и отдаленные эффекты бактериальных сообществ, вероятно, будут определяющими при многих респираторных заболеваниях, вызванных вирусами, аллергенами или генетическим дефицитом [36].

Перспективы решения проблемы

Модификация микробиоты и продукция короткоцепочечных жирных кислот

Несмотря на успехи в области исследования микробиоты, возможность использования ее в качестве диагностического инструмента находится все еще в зачаточном состоянии [37]. Однако данные, показывающие решающее значение для воздействия на воспалительные процессы в кишечнике человека метаболитов некоторых представителей его микробиоты не вызывают сомнения.

Одним из потенциальных подходов к достижению здоровой микробиоты является непосредственное введение полезных бактерий, то есть пробиотиков, благоприятный эффект которых связан не только с улучшением микробного баланса кишечника [38, 39], но и с модулированием иммунных функций организма-хозяина. Как правило, это бактерии с противовоспалительными и/или с полезными метаболическими свойствами, такими как способность к образованию короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) [40]. КЦЖК (90-95% составляют уксусная, пропионовая, и масляная кислоты) – конечные продукты ферментации пищевых волокон анаэробной кишечной микробиотой – оказывают множественное благоприятное влияние на энергетический обмен млекопитающих [41, 42]. Механизмы, лежащие в основе этих эффектов, являются предметом интенсивных исследований и охватывают сложное взаимодействие между диетой, кишечной микробиотой и энергетическим обменом организма. Функцию подавления воспалительных реакций и появления рака выполняют, главным образом, ацетат, пропионат и бутират [43]. В обзоре Den Besten с соавторами [44] обобщаются данные об их роли в энергетическом метаболизме хозяина.

Ацетат и пропионат являются наиболее мощными активаторами рецепторов КЦЖК, поэтому их количество в кишечнике должно постоянно поддерживаться на высоком уровне [45]. Наиболее изобильной среди всех кишечных КЦЖК является уксусная кислота, которую производят *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Akkermansia muciniphila*, *Prevotella* spp., *Ruminococcus* spp. [46]. Кроме того, ацетат способствует антилипидической активности. Диета с высоким содержанием клетчатки (производящая большое количество ацетата) подавляет аллергические заболевания дыхательных путей за счет усиления регуляторных Т-клеток [47]. Диета с высоким содержанием клетчатки и последующее производство пропионата также могут защищать от аллергии дыхательные пути, индуцируя гемопоэз дендритных клеток, которые заселяют легкие [31].

При дефиците ферментируемых волокон микробы переключаются на энергетически менее благоприятные источники для роста, такие как аминокислоты из пищевых или эндогенных белков и пищевые жиры, что приводит к снижению ферментативной активности микробиоты и КЦЖК в качестве второстепенных конечных продуктов [45].

Основной продукт брожения молочнокислых бактерий, молочная кислота, не является короткоцепочечной жирной кислотой, однако тоже оказывает существенное влияние на метаболизм организма хозяина, а также является промежуточным продуктом, потребляемым кишечной микрофлорой и превращаемым в КЦЖК [45]. Помимо молочнокислых бактерий к перспективным пробиотикам относятся кишечные бактерии, такие как *Akkermansia muciniphila*, связанные с повышенной экспрессией генов врожденного и адаптивного иммунного ответа [48].

Пробиотики могут снизить экспрессию провоспалительных цитокинов, улучшить клинические симптомы, гистологические изменения и выработку слизи в кишечном тракте. Их применение привело к разработке концепции функционального питания.

За последнее десятилетие взаимодействие между здоровьем человека и микробиомом стало предметом растущего интереса [49], особое внимание при этом уделяется выявлению на него влияния диет [50]. В обзоре Singhvi с соавторами [51] описаны терапевтические достижения, полученные при исследовании влияния пре- и пробиотиков для восстановления микробного гомеостаза кишечника. Вместе с тем отмечено непредвиденно сложное участие кишечного генома в потенциале здоровья

человека. Некоторые результаты свидетельствуют о том, что следует соблюдать особую осторожность при введении этих препаратов на стадиях рецидивов воспалительных заболеваний кишечника [52]. Необходимо учитывать также, что пробиотические эффекты являются штамм-специфичными, и они не действуют через одни и те же механизмы [53].

Как в североамериканских, так и в европейских руководствах наиболее эффективной для лечения заболеваний, связанных с желудочно-кишечным микробным дисбиозом, включая воспалительные заболевания кишечника, нарушения обмена веществ, психоневрологические состояния или уничтожение мультирезистентных бактерий наиболее эффективной признана трансплантация фекальной микробиоты. Однако, консенсус в отношении важных методологических аспектов этой процедуры, а также доказательные рекомендации, за исключением клинических исследований, пока отсутствуют [54].

Микробиото-трансферная терапия на примере детей, страдающих аутизмом, показала долгосрочную безопасность и эффективность, поскольку положительные результаты сохранялись в течение двух лет наблюдения, однако, в будущем необходимо проведение двойного слепого плацебо-контролируемого исследования [55].

Влияние пищевых компонентов

Одним из основных типов макронутриентов, который считается важным для метаболического здоровья в целом, является клетчатка. Сложные углеводы, достигающие толстой кишки и ферментируемые кишечными бактериями, являются для них основным источником питания и имеют большое влияние на общий уровень бактерий, состав и его функциональную активность [56].

Как показано на мышах, недостаток клетчатки снижает плотность микробиоты, замедляет пролиферацию энтероцитов, ухудшает слизь и изменяет состав микробиоты, [57]. Другой высокоферментируемый полисахарид - инулин также может увеличивать уровни *Akkermansia muciniphila* как у мышей, так и у людей, что препятствует развитию диабета 2-го типа, поскольку способствует восстановлению прочности слизи и защите от воспаления [58].

Пребиотические соединения, такие как инулин, полидекстроза, кукурузное волокно, как было показано, улучшают иммунитет, разнообразие микробиоты кишечника (увеличивает число бифидобактерий), пищеварение и т. д. особенно у пожилых людей [59]. Показано, что богатая клетчаткой диета меняет не только микробиоту кишечника, но также влияет на микробиоту легких, модулируя иммунитет [31], что особенно важно учитывать в настоящее время при пандемии коронавируса.

Установлено, что диета, богатая полифенолами, защищает человека от хронических патологий, модулируя многочисленные физиологические процессы, такие как окислительно-восстановительный потенциал клеток, ферментативную активность, пролиферацию клеток и пути передачи сигналов [60-62].

Употребление пробиотиков, пребиотиков и полифенолов с пищей положительно влияет на состав кишечной микробиоты [63]. Так, куркумин и его метаболиты способствуют восстановлению кишечного микробиома. При этом он, как и другие полифенолы, подвержен бактериальным ферментативным модификациям, с образованием фармакологически более активных метаболитов, чем исходный куркумин [64].

Положительное воздействие на микробиоту кишечника оказывают также китайские травяные лекарства [65], используемые при лечении диабета 2-го типа, что объясняется обогащением микробиоты видами *Blautia* и *Faecalibacterium*. Отдельные растительные экстракты (включая богатые полифенолами экстракт клюквы, водно-этанольный экстракт зеленых микроводорослей, зеленый чай и имбирь) положительно влияют на микробиоту, способствуя увеличению численности *Akkermansia* и других представителей полезной микрофлоры [66].

Экстракты коры корицы и виноградной выжимки вызывают уменьшение

содержания *Peptococcus*, *Desulfovibrio*, *Lactococcus* и увеличение содержания *Allobaculum* и *Roseburia* [67], что способствует уменьшению жировой массы, уменьшению воспаления жировой ткани и улучшению толерантности к глюкозе. В целом, изменения в микробиоте кишечника в ответ на введение растительных экстрактов включают увеличение микробного разнообразия, уменьшение соотношения *Firmicutes/Bacteroidetes* и увеличение численности противовоспалительных бактерий (*Bidobacterium*, *Lactobacillus*, *Akkermansia* и *Faecalibacterium*), а также уменьшение количества патогенных бактерий (*E. coli* и *Enterococcus*), что может ослабить воспаление и улучшить гликемический контроль.

Улучшение профиля микробиоты кишечника за счет индивидуального питания и пищевых добавок, улучшающих иммунитет, может быть одним из профилактических способов, с помощью которых воздействие коронавируса может быть сведено к минимуму у пожилых людей и пациентов с ослабленным иммунитетом. Предлагается начинать дополнительные испытания для получения эффекта совместного действия персонализированной функциональной пищи, включая пребиотики и пробиотики, наряду с современными методами лечения [68].

Заключение

Таким образом, интегрированный взгляд на микробиом кишечника человека и его связь со здоровьем человека открывает широкие пути для достижения целей медицины, ориентированных на решение проблемы повышения иммунитета человека.

В настоящее время, когда человечество оказалось беззащитным перед новыми инфекциями, для лечения которых отсутствуют сколько-нибудь эффективные способы лечения, остается надежда на возможность укрепления неспецифической устойчивости организма, обусловленной его природной защитой, а именно иммунитетом, обеспеченным оптимальным симбиотическим сосуществованием с населяющими его микроорганизмами.

Расширение спектра естественно ферментированных продуктов, содержащих в своем составе различные группы микроорганизмов и разнообразные богатые пребиотиками продукты будет способствовать повышению защитных сил организма. Наряду с традиционными кисломолочными продуктами и ферментированными овощами, изготовленными с использованием молочнокислых бактерий, необходимо введение в состав производственных заквасок других групп микроорганизмов, в частности, уксуснокислых бактерий, производящих основную КЦЖК - уксусную кислоту, что будет способствовать нормализации функций желудочно-кишечного тракта, стимуляции индигенной микрофлоры и повышению защитных сил организма человека [69].

Финансирование

Работа выполнена при поддержке КН МОН РК (грант №AP09258699).

Литература:

- 1 Santos-Marcos J.A., Perez-Jimenez F., Camargo A. The role of diet and intestinal microbiota in the development of metabolic syndrome // The Journal of Nutritional Biochemistry. – 2019. – Vol. 70. – P. 1-27. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2019.03.017.
- 2 Al Nabhani Z., Eberl G. Imprinting of the immune system by the microbiota early in life // Mucosal Immunol. – 2020. – Vol. 13, Issue 2. – P. 183-189. DOI: 10.1038/s41385-020-0257-y.
- 3 Dickson R.P. The microbiome and critical illness // Lancet Respir. Med. - 2016. – Vol. 4, Issue 1. – P. 59-72. DOI: 10.1016/S 2213-2600(15000427-0).
- 4 Sonnenburg E.D., Smits S.A., Tikhonov M., Higginbottom S.K., Wingreen N.S., Sonnenburg J.L. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations // Nature. - 2016. – Vol. 529. – P. 212-215. DOI: 10.1038/nature16504
- 5 Van Hul. M, Cani P.D. Targeting carbohydrates and polyphenols for a healthy microbiome and healthy weight // Curr Nutr Rep. - 2019. – Vol. 8, Issue 4. – P. 307-316. DOI:10.1007/s13668-019-00281-5.
- 6 Kho Z.Y., Lal S.K. The human gut microbiome – a potential controller of wellness and disease // Front. Microbiol. - 2018. – Vol. 9. – Art. ID 1835. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01835.

- 7 Belkaid Y., Hand T. Role of the microbiota in Immunity and inflammation // *Cell*. - 2014. – Vol. 157(1). – P. 121–141. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011.
- 8 Tang W.H.W., Wang Z., Levison, B.S. Koeth R.A., Britt E.B., Fu X., Wu Y., Hazen S.L. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk // *N Engl J Med*. - 2013. – Vol. 368(17). – P. 1575–1584. DOI: 10.1056/NEJMoa1109400.
- 9 Pedersen H.K., Gudmundsdottir V., Nielsen H.B., et al. Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity // *Nature*. – 2016. – Vol. 535, 376–381. DOI: 10.1038/nature18646.
- 10 Lee K.H., Song Y., Wu W., Yu K., Zhang G. The gut microbiota, environmental factors, and links to the development of food allergy // *Clin Mol Allergy*. - 2020. – Vol. 18. – Art. ID 5. DOI: 10.1186/s12948-020-00120-x.
- 11 García-Rivero J.L. The microbiome and asthma // *Arch Bronconeumol*. - 2020. – Vol. 56(1). – P. 1-2. DOI: 10.1016/j.arbres.2019.01.016.
- 12 Ai D., Pan H., Li X., Gao Y., Liu G., Xia L.C. Identifying gut microbiota associated with colorectal cancer using a zero-inflated lognormal model // *Front. Microbiol*. - 2019. – Vol. 10. – Art. ID 826. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00826.
- 13 Kong F., Cai Y. Study insights into gastrointestinal cancer through the gut microbiota // *BioMed Research International*. – 2019. – Vol. 2019. – Art. ID 8721503. DOI: 10.1155/2019/8721503.
- 14 Locantore P., Del Gatto V., Gelli S., Paragliola R.M., Pontecorvi A. The interplay between immune system and microbiota in osteoporosis. // *Mediators of Inflammation*. – 2020. – Vol. 2020. - Art. ID 3686749. DOI: 10.1155/2020/3686749
- 15 Cao S.-Y., Zhao C.-N., Xu X.-Y., Tang G.-Y., Corke H., Gan R.-Y., Li H.-B. Dietary plants, gut microbiota and obesity: Effects and mechanisms // *Trends Food Sci. Technol*. - 2019. – Vol. 92. – P. 194–204. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.08.004.
- 16 Kasselmann L.J., Vernice N.A., DeLeon J., Reiss A.B. The gut microbiome and elevated cardiovascular risk in obesity and autoimmunity // *Atherosclerosis*. - 2018. – Vol. 271. – P. 203–213. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.02.036.
- 17 Hyland N., Cryan J.F. Microbe-host interactions: influence of the gut microbiota on the enteric nervous system // *Dev Biol*. - 2016. – Vol. 417, Issue 2. – P. 182–187. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.06.027.
- 18 Han H., Li Y.Y., Fang J., Liu G., Yin J., Li T.J., Yin Y.L. Gut microbiota and type 1 diabetes // *Int. J. Mol. Sci*. - 2018. – Vol. 19. – Art. ID 995. DOI: 10.3390/ijms19040995.
- 19 Song M., Garrett W.S., Chan A.T. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention // *Gastroenterology*. - 2015. – Vol. 148, Issue 6. – P. 1244–1260. e16. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.12.035
- 20 Shanahan F. The colonic microbiota in health and disease // *Current Opinion in Gastroenterology*. - 2013. - 29, 1, 49–54. DOI: 10.1097/MOG.0b013e32835a3493
- 21 David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., Ling A.V., Devlin A.S., Varma Y., Fischbach M.A., Biddinger S.B., Dutton R.J., Turnbaugh P.J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome // *Nature*. - 2014. – Vol. 505, Issue 7484. – P. 559–563. DOI: 10.1038/nature12820.
- 22 Park C.H., Eun C.S., Han D.S. Intestinal microbiota, chronic inflammation, and colorectal cancer // *Intestinal Research*. - 2018. – Vol. 16, Issue 3. – P. 338–345. DOI: 10.5217/ir.2018.16.3.338
- 23 Liang S., Wu X., Jin F. Gut-brain psychology: rethinking psychology from the microbiota–gut–brain axis // *Front. Integr. Neurosci*. - 2018. – Vol. 12. – Art. ID 33. DOI: 10.3389/fnint.2018.00033
- 24 Kelly J.R., Minuto C., Cryan J.F., Clarke G., Dinan T.G. The role of the gut microbiome in the development of schizophrenia // *Schizophrenia Research*. - 2021. – Vol. 234. – P. 4–23. DOI: 10.1016/j.schres.2020.02.010
- 25 Cryan J.F., O'Riordan K.J., Cowan C.S.M. et al. The Microbiota-Gut-Brain Axis // *Physiol Rev*. - 2019. – Vol. 99, Issue 4. – P. 1877–2013. DOI: 10.1152/physrev.00018.2018
- 26 Dumas A., Bernard L., Poquet Y., Lugo-Villarino G., Neurolles O. The role of the lung microbiota and the gut–lung axis in respiratory infectious diseases // *Cell. Microbiol*. - 2018. – Vol. 20, Issue 12. – Art. ID e12966. DOI: 10.1111/cmi.12966
- 27 Groves H.T., Higham S.L., Moffatt M.F., Cox M.J., Tregoning J.S. Respiratory viral infection alters the gut microbiota by inducing inappetence // *mBio*. - 2020. – Vol. 11, Issue 1. – Art. ID e03236-19. DOI: 10.1128/mBio.03236-19
- 28 Zemanick E. T., Wagner B. D., Robertson C. E. et al. Airway microbiota across age and disease spectrum in cystic fibrosis // *Eur. Respir. J*. - 2017. – Vol. 50. – Art. ID 1700832. DOI:

10.1183/13993003.00832-2017

29 Dickson R.P., Huffnagle G. B. The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease // *PLoS Pathog.* - 2015. - Vol. 11. - Art. ID e1004923. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004923

30 Rosshart S. P., Vassallo B.G., Angeletti D., Hutchinson D.S., Morgan A P., Takeda K., Hickman H.D., McCulloch J.A., Badger J.H., Ajami N.J., Trinchieri G., De Villena F.P.M., Yewdell J.W., Rehermann B. Wild mouse gut microbiota promotes host fitness and improves disease resistance // *Cell.* - 2017. - Vol. 171. - P. 1015–1028.e13. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.016

31 Trompette A., Gollwitzer E.S., Yadava K., Sichelstiel A.K., Sprenger N., Ngom-Bru C., Blanchard C., Junt T., Nicod L.P., Harris N.L., Marsland B.J. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis // *Nat. Med.* - 2014. - Vol. 20, Issue 2. - P. 159–166. DOI: 10.1038/nm.3444

32 Gauguier S., D'Ortona S., Ahnger-Pier K., Duan B., Surana N. K., Lu R., Cywes-Bentley C., Gadjeva M., Shan Q., Priebe G.P., Pier G.B. Intestinal microbiota of mice influences resistance to *Staphylococcus aureus* pneumonia // *Infect. Immun.* - 2015. - Vol. 83. - P. 4003–4014. DOI: 10.1128/IAI.00037-15

33 Zhang H., Yeh C., Jin Z., Ding L., Liu B.Y., Zhang L., Dannelly H.K. Prospective study of probiotic supplementation results in immune stimulation and improvement of upper respiratory infection rate // *Synth Syst Biotechnol.* - 2018. - Vol. 3, Issue 2. - P. 113-120. DOI: 0.1016/j.synbio.2018.03.001

34 Nagpal R., Mainali R., Ahmadi S., Wang S., Singh R., Kavanagh K., Kitzman D.W., Kushugulova A., Marotta F., Yadav H. Gut microbiome and aging: physiological and mechanistic insights // *Nutr Healthy Aging.* - 2018. - Vol. 4, Issue 4. - P. 267-285. DOI: 10.3233/NHA-170030.

35 Lake M.A. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research // *Clin Med (Lond).* - 2020. - Vol. 2. - P. 124-127. DOI: 10.7861/clinmed.2019-coron.

36 Mathieu E., Escribano-Vazquez U., Descamps D., Cherbuy C., Langella P., Riffault S., Remot A., Thomas M. Paradigms of lung microbiota functions in health and disease, particularly, in asthma // *Front Physiol.* - 2018. - Vol. 9. - Art. ID 1168. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01168>

37 Montalban-Arques A., Scharl M. Intestinal microbiota and colorectal carcinoma: implications for pathogenesis, diagnosis, and therapy // *EBioMedicine.* - 2019. - Vol. 48. - P. 648-655. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.09.050.

38 Айтжанова А.А., Алыбаева А.А., Амангелды А.А., Ермекбай Ж.Н., Елубаева А.Е. Бактерии как продуценты антибиотиков. // *Микробиология және вирусология.* - 2020. - №3. - С. 4-19. https://imv-kaz.kz/f/mzhv_30_2020_3.pdf

39 Алыбаева А.Ж., Саубенова М.Г., Олейникова Е.А., Чижаева А.В., Айтжанова А.А., Амангелді А.А., Потороко И.Ю. Молочнокислые бактерии против антибиотикорезистентных патогенов // *Микробиология және вирусология.* - 2021. - №1-2 (32-33). - С. 4-19. <https://imv-journal.kz/index.php/mav/article/view/2>

40 Shen T.D. Diet and gut microbiota in health and disease // *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.* - 2017. - Vol. 88. - P. 117-126. DOI: 10.1159/000455220.

41 Bugaut M. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals // *Comp Biochem Physiol B.* - 1987. - Vol. 86. - P. 439–472.

42 Ríos-Covián D., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Gueimonde M., de los Reyes-Gavilán C.G., Salazar N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health // *Front. Microbiol.* - 2016. - Vol. 7, Issue FEB. - *Frontiers Media S.A.* DOI: 10.3389/fmicb.2016.00185

43 Ratajczak W., Rył A., Mizerski A., Walczakiewicz K., Sipak O., Laszczyńska M. Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs) // *Acta Biochim Pol.* - 2019. - Vol. 66, Issue 1. - P. 1-12. DOI: 10.18388/abp.2018_2648.

44 Den Besten G., van Eunen K., Groen A.K., Venema K., Reijngoud D., Bakker B.M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism // *J Lipid Res.* - 2013. - Vol. 54, Issue 9. - P. 2325-2340. DOI: 10.1194/jlr.R036012.

45 Koh A., de Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites // *Cell.* - 2016. - Vol. 165, Issue 6. - P. 1332–1345. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.041

46 Feng W., Ao H., Peng C. Gut microbiota, short-chain fatty acids, and herbal medicines // *Frontiers in Pharmacology.* - 2018. - Vol. 9, Issue NOV. *Frontiers Media S.A.* DOI: 10.3389/fphar.2018.01354

47 Thorburn A.N., McKenzie C.I., Shen S., Stanley D., Macia L., Mason L.J., Roberts L.K., Wong C.H.Y., Shim R., Robert R., et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites // *Nat. Commun.* - 2015. – Vol. 6. – Art. ID 7320.

48 Giri S., Mangalam A. The gut microbiome and metabolome in multiple sclerosis // J. Faintuch, S. Faintuch (Eds.), *The gut microbiome and metabolome in multiple sclerosis microbiome and metabolome in diagnosis, therapy, and other strategic applications.* – London: Academic Press, 2019. – P. 333-340.

49 Gupta A., Saha S., Khanna S. Therapies to modulate gut microbiota: Past, present and future // *World J Gastroenterol.* - 2020. – Vol. 26, Issue 8. – P. 777-788. DOI:10.3748/wjg.v26.i8.777.

50 Milani C., Ferrario C., Turroni F., Duranti S., Mangifesta M., van Sinderen D., Ventura M. The human gut microbiota and its interactive connections to diet // *J Hum Nutr Diet.* - 2016. – Vol. 29, Issue 5. – P. 539-546. DOI: 10.1111/jhn.12371.

51 Singhvi N., Gupta V., Gaur M., Sharma V., Puri A., Singh Y., Dubey G.P., Lal R. Interplay of human gut microbiome in health and wellness // *Indian Journal of Microbiology.* - 2020. – Vol. 60. – P. 26–36. DOI: 10.1007/s12088-019-00825-x

52 Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda F.J., Vilchez-Padial L.M., Gil A. Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases // *Nutrients.* - 2017. – Vol. 9, Issue 6. – Art. ID 555. DOI: 10.3390/nu9060555.

53 Gogineni, V.K., Morrow, L.E., Malesker, M.A. Probiotics: mechanisms of action and clinical applications // *J Prob Health.* - 2013. – Vol. 1. – Art. ID 101. DOI: 10.4172/2329-8901.1000101

54 Reygnier J., Kapel N. Current status of fecal microbiota transplantation in microbiome and metabolome in diagnosis, therapy, and other strategic applications // J. Faintuch, S. Faintuch (Eds.) *The gut microbiome and metabolome in multiple sclerosis microbiome and metabolome in diagnosis, therapy, and other strategic applications.* - London: Academic Press, 2019. – P. 155-165.

55 Kang D.W., Adams J.B., Coleman D.M., Pollard E.L., Maldonado J., McDonough-Means S., Caporaso J.G., Krajmalnik-Brown R. Long-term benefit of microbiota transfer therapy on autism symptoms and gut microbiota // *Sci Rep.* - 2019. – Vol. 9, Issue 1. Art. ID 5821. DOI: 10.1038/s41598-019-42183-0

56 Makki K., Deehan E.C., Walter J., Backhed F. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease // *Cell Host Microbe.* - 2018. – Vol. 23, Issue 6. – P. 705–715. DOI:10.1016/j.chom.2018.05.012.

57 Zou J., Chassaing B., Singh V., Pellizzon M., Ricci M., Fythe M.D., Kumar M.V., Gewirtz A.T. Fiber-mediated nourishment of gut microbiota protects against diet-induced obesity by restoring IL-22-mediated colonic health // *Cell Host Microbe.* - 2018. – Vol. 23, Issue 1. – P. 41-53. e4. DOI:10.1016/j.chom.2017.11.003

58 Cani P.D., De Vos W.M. Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila* // *Front Microbiol.* - 2017. – Vol. 8. – Art. ID 1765. DOI:10.3389/fmicb.2017.01765.

59 Bouhnik Y., Achour L., Paineau D., Riottot M., Attar A., Bornet F. Four-week short chain fructo-oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacteria and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers // *Nutr J.* - 2007. - Vol. 6. – Art. ID 42. DOI:10.1186/1475-2891-6-42.

60 Crasci L., Lauro M.R., Puglisi G., Panico A. Natural antioxidant polyphenols on inflammation management: Anti-glycation activity vs. metalloproteinases inhibition // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* - 2018. – Vol. 58. – P. 893–904. DOI: 10.1080/10408398.2016.1229657.

61 Kinger M., Kumar S., Kumar V. Some important dietary polyphenolic compounds: An anti-inflammatory and immunoregulatory perspective // *Med. Chem.* - 2018. – Vol. 18. – P. 1270-1282. DOI: 10.2174/1389557517666170208143410.

62 Singh A.K., Cabral C., Kumar R., Ganguly R., Rana H.K., Gupta A., Lauro M.R., Carbone C., Reis F., Pandey A.K. Beneficial effects of dietary polyphenols on gut microbiota and strategies to improve delivery efficiency // *Nutrients.* - 2019. – Vol. 11, Issue 9. – Art. ID 2216. DOI:10.3390/nu11092216

63 Neri-Numa I.A., Pastore G.M. Novel insights into prebiotic properties on human health: A review // *Food Research International.* - 2020. – Vol. 131. – Art. ID 108973. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108973

64 Di Meo F., Margarucci S., Galderisi U., Crispi S., Peluso G. Curcumin, gut microbiota, and neuroprotection // *Nutrients.* - 2019. – Vol. 11, Issue 10. – Art. ID 2426. DOI: 10.3390/nu11102426

65 Zhang B., Yue R., Chen Y., Yang M., Huang X., Shui J., Peng Y., Chin J. Gut microbiota, a

potential new target for chinese herbal medicines in treating diabetes mellitus // Evid Based Complement Alternat Med. - 2019. – Vol. 2019. – Art. ID 2634898. DOI: 10.1155/2019/2634898

66 Xia T., Yao J., Zhang J., Duan W., Zhang B., Xie X., Xia M., Song J., Zheng Y., Wang M. Evaluation of nutritional compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of Shanxi aged vinegars during the aging process // J Food Sci. - 2018. – Vol. 83, Issue 10. – P. 2638-2644. DOI: 10.1111/1750-3841.14356.

67 Van Hul M., Geurts L., Plovier H., Druart C., Everard A., Ståhlman M., Rhimi M., Chira K., Teissedre P.L., Delzenne N.M., Maguin E., Guilbot A., Brochot A., Gérard P., Bäckhed F., Cani P.D. Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier // Am J Physiol Endocrinol Metab. - 2018.- Vol. 314, Issue 4. - P. E334-E352. DOI: 10.1152/ajpendo.00107.2017.

68 Dhar D, Mohanty A. Gut microbiota and Covid-19- possible link and implications // Virus Res. - 2020. – Vol. 285. – Art. ID 198018. DOI:10.1016/j.virusres.2020.198018

69 Бухарин О.В., Андриященко С.В., Перунова Н.Б., Иванова Е.В. Механизм персистенции индигенных бифидобактерий под действием ацетата в кишечном биотопе человека // Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. – 2021. - 98(3). – С. 276-282.

М.Г. САУБЕНОВА¹, Е.А. ОЛЕЙНИКОВА^{1*}, А.В. ЧИЖАЕВА¹,
А.Ж. АЛЫБАЕВА¹, А.А. АЙТЖАНОВА¹, А.А. АМАНГЕЛДІ¹,
И.Ю. ПОТОРОКО²

¹Микробиология және вирусология ғылыми - өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Оңтүстік-Орал мемлекеттік университеті, Челябинск, Ресей

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

АДАМ МИКРОБИОТАСЫ ЖӘНЕ ӨРКЕНИЕТ АУРУЛАРЫ: ШЫҒУ ЖОЛЫН ІЗДЕУ

Түйін

Азық-түлік өнімдерінің химиялануы мен ластануының жоғарылауы, сондай-ақ құрамында май мөлшері көп және тағамдық талшықтары аз «батыс» тамақтануын ұстану ішек микробиотасының құрамының бұзылуына және аурулардың кең ауқымды өсуі семіздік, қант диабеті, жүрек ауруы, қатерлі ісік және иммунитеттің төмендеуі сияқты өркениет ауруларына шалдығуына әкеледі. Ұсынылған әдеби шолуда адам ағзасының әртүрлі бөліктері бір-бірімен тығыз байланысты және бір-біріне әсер ететін біртұтас суперорганизм ретінде қарастырылады. Соңғы жылдары ішек пен ондағы микроорганизмдердің адам ағзасының басқа мүшелерімен және жүйелерімен, жалпы денсаулықпен байланыстыратын ішек-ми, ішек-жүрек, ішек-өкпе осі туралы түсініктер әзірленіп, тереңдетілуде. Бұл шолуда ішек микробиотасына әсер етудің ықтимал жолдары туралы соңғы деректер жинақталған. Тамақтану рационын өзгерту арқылы ішек микробиотасының модификациясы бірқатар ауруларды жеңілдетудің, иммунитетті және инфекцияларға төзімділікті арттырудың шын мәнінде тиімді құралы болып табылады. Табиғи азық-түлік өнімдерін, оның ішінде тағамдық талшықтарды кеңінен қолдану, сондай-ақ ферменттелген тағам өндірісінде ұйытқы құрамына микроорганизмдердің әртүрлі топтарын қосу индигенді микрофлораны ынталандыруға және адам ағзасының қорғаныс қабілетін арттыруға көмектеседі. Ферменттелген тағамдарды әзірлеу кезінде ішекте және бүкіл денеде сау метаболизмді сақтау үшін басқа қысқа тізбекті май қышқылдары арасында ең жоғары болуы керек ацетат түзетін сіркеқышқылды бактерияларға ерекше назар аудару керек.

Кілт сөздер: микробиота, пробиотик, пребиотик, диета, иммунитет, қысқа тізбекті май қышқылдары, сірке қышқылы.

IRSTI: 34.27.23, 34.39.49, 34.27.39, 34.03.99

M.G. SAUBENOVA¹, Ye. A. OLENIKOVA¹, A.V. CHIZHAYEVA¹,
A.Zh. ALYBAYEVA¹, A.A. AITZHANIOVA¹, A.A. AMANGELDI¹,
I.Yu. POTOROKO²

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²South Ural State University, Chelyabinsk, Russia

*e-mail: elena.olejnikova@mail.ru

HUMAN MICROBIOTA AND DISEASES OF CIVILIZATION: SEARCHING WAY OUT

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.01

Abstract

Growing chemicalization and contamination of food, as well as commitment to a “western” diet with high fat and low dietary fiber content, lead to disturbances in gut microbiota composition and to a large-scale increase in the incidence of such diseases of civilization as obesity, diabetes, heart disease, cancer, and reduced immunity. The review considers a human body as a single super organism with various parts closely interconnected and mutually influencing each other. In recent years, the concepts of gut-brain, gut-heart and gut-lung axes connecting the intestines and the microorganisms inhabiting it with other organs and systems of the human body and the general state of human health have been developed and deepened. In present review, the latest data on the ways of gut microbiota modification are summarized. It is shown that modification of intestinal microbiota through diet variation is an effective mean of alleviating a number of diseases, increasing immunity and anti-infectious resistance. The expanded use of natural food products containing dietary fiber and other biologically active plant substances, as well as the inclusion of various groups of microorganisms in starter cultures in food production, will help promote the indigenous microflora and increase the defenses of the human body. When developing fermented foods, special attention should be paid to acetic acid bacteria producing acetate, which amount should be the highest among the other short-chain fatty acids in order to maintain healthy metabolism in the intestines and throughout the body.

Keywords: microbiota, probiotic, prebiotic, diet, immunity, short chain fatty acids, acetic acid.

In recent decades, a large number of different, often physiologically unreasonable, chemical additives have been introduced into food products to correct their sensory and technological properties. In addition, the contamination of raw materials and foods by extraneous microorganisms and their metabolic products, which have a toxic effect on the human body, occurs at all stages of production and storage. The situation is aggravated by nutritional errors, stresses, the use of hormones and other drugs, leading to “diseases of civilization”, the triggering mechanism of which are the disturbances in the composition of gastrointestinal microbiota.

The structure and activity of trillions microorganisms of human microbiota is formed depending on the consumption of a particular diet and reflects the differences between herbivorous and carnivorous mammals [1]. In addition to the digestion and extraction of energy from food, they provide the implementation of important physiological functions of the host. Microorganisms supply biologically active substances that are not synthesized by the human body, maintain the integrity of the natural barrier formed by the mucous membranes, prevent the colonization of the gastrointestinal tract by pathogenic bacteria, competing with them for nutrients, adhesion sites, inhibiting their growth with produced metabolites, binding and neutralizing toxic substances, and also promoting the immune system function. The immunomodulatory function of microbiota is the most important aspect of its interaction with a macroorganism, since it has a multifaceted effect on the health of the intestine and the whole organism [2]. It allows us to induce protective reactions against pathogens. However, if the composition and functions of the microbiome are disturbed, prerequisites for diseases arise. It is impossible to name a disease that would not be accompanied by microecological disorders of the

gastrointestinal tract requiring correction [3].

Diseases of civilization

The influence of a number of negative factors entails a shift in the species diversity of the microbiota, which, in turn, leads to a significant change in its functional activity, up to the development of irreversible damage to homeostasis and the death of the host organism. This is especially pronounced in high-income countries with “western” diet, which may explain the sharp increase in autoimmune and inflammatory diseases in these regions. The decrease in the diversity of intestinal microorganisms in the population of countries with a higher standard of living is mainly associated with differences in diet, lifestyle and health care, which significantly less affect the rural residents. The progressive loss of intestinal microbiota diversity in the population of Western populations is explained by a high dietary fat and simple carbohydrate content, as well as insufficient use of available carbohydrate components contained in fiber, which leads to a decrease in the number of bacteria synthesizing short-chain fatty acids that weaken inflammatory processes [4]. Currently, the prevalence of obesity, which is one of the five main risk factors for death, has increased to a pandemic scale. Modifications of behavior and nutrition aimed at weight loss are effective only in the short term [5]. New dietary strategies aimed at intestinal microbiota are needed. Various aspects of the interactions between representatives of the intestinal microbiota and the host organism are being studied. These researches give an idea of the role of microbial unique metabolites in protecting the macroorganism from pathogen penetration, regulating various physiological host functions, including metabolism, development and homeostasis of the immune and nervous systems, or, conversely, contributing to the onset and progression of a wide range of diseases, such as inflammatory bowel disease, cardiovascular disease, multisystem autoimmune disorder, obesity, colorectal cancer, and neuropsychiatric disorders [6]. It is suggested that even the elimination of permanent partners, such as helminths, leads to a decrease in the diversity and stability of microbiota necessary to establish balanced immune responses [7].

In recent years, a correlation has been demonstrated between the composition and function of intestinal microbiota and atherosclerosis [8], metabolic diseases [9], allergies [10], asthma [11], gastrointestinal diseases including colon cancer [12, 13]. It has become recognized that the cause of the most chronic diseases, such as osteoporosis [14], obesity [15], cardiovascular [16] and neurological diseases [17], and diabetes mellitus [18], lies in chronic inflammation.

A clear correlation was found between the risk of a colorectal cancer and the consumption of certain types of food, such as red meat and some other foods [19] that contribute to dysbiosis [20], while a low-fat diet leads to an increase fecal bifidobacteria abundance [21].

The main difference between colorectal cancer patients and healthy people is the high concentration of pathogenic bacteria in the colon, including *Enterococcus faecalis*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli* and *Fusobacterium nucleatum* [22].

Intestinal bacteria produce compounds similar to human hormones, such as serotonin, testosterone, norepinephrine, dopamine, histamine. Getting into the bloodstream, they affect the brain, forming taste preferences, habits, and even behavior, modifying the activity and function of the autonomic nervous system and neurochemistry [17], participate in the pathophysiology of numerous mental and neurological diseases [23] including schizophrenia [24] and Alzheimer's disease [25].

Intestinal microbiota and respiratory infections

In addition to the concepts of gut-brain axis and gut-heart axis, which imply a close relationship between these organs and systems of the human body that is mediated by the intestinal microbiota, the concept of the gut-lung axis has recently been introduced, implying the interdependence between intestinal microbiota and respiratory function [26]. Respiratory infections have been shown to be associated with changes in the composition of the intestinal microbiota [27].

Normally, the microbiota of the lungs is formed by continuous waves of invasion and expulsion of microorganisms during respiration. The dominance of certain types of bacteria, leading to a decrease in the species diversity of microbiota, is associated with the progression of cystic fibrosis and/or infectious diseases [28]. In lung disease, the balance between immigration and elimination is disrupted, leading to a predominance of bacteria that demonstrate competitive advantages [29].

Modulation of the composition of mice intestinal microbiota regulates the immune response of respiratory tract and changes the susceptibility to pulmonary influenza infections [30]. The mice fed a high fiber diet with high levels of short chain fatty acids in the blood were protected from asthma [31]. On the other hand, mice, deficient in the intestines of the bacteria producing short chain fatty acids, were susceptible to more severe pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* [32]. It is demonstrated that consumption of probiotics can significantly reduce the incidence of upper respiratory infection and flu-like symptoms [33].

The older people were shown to have a less diverse intestinal microbiota and a reduced number of beneficial microorganisms, such as bifidobacteria [34] and, accordingly, weakened lung immunity [35]. It is known that pneumonia - one of the most serious clinical manifestations of Covid-19 – seriously affects mainly the elderly people. A large number of deaths of elderly patients once again emphasize the role of intestinal microbiota in this disease.

Thus, the intestinal and lung ecosystems (consisting of microorganisms and host cells) clearly connect nutrition, respiratory and digestive health, and most importantly, the immune defense, through a complex system of mutual communication. The local and long-term effects of bacterial communities are likely to be decisive in many respiratory diseases caused by viruses, allergens, or genetic deficiencies [36].

Prospects for solving the problem

Modification of microbiota and production of short-chain fatty acids

Despite successes in the field of microbiota research, the possibility of using it as a diagnostic tool is still in its infancy [37]. However, data showing the crucial importance of the metabolites of some representatives of the intestinal microbiota for influencing inflammatory processes are not in doubt.

One of the potential approaches to achieving a healthy microbiota is the direct administration of beneficial bacteria, i.e. probiotics, whose beneficial effect is associated not only with improving the intestinal microbial balance [38, 39], but also with modulating the immune functions of the host organism. These are usually bacteria with anti-inflammatory and/or beneficial metabolic properties, such as the ability to form short-chain fatty acids SCFA [40]. SCFA (90-95% consist of acetic, propionic, and butyric acids) - the final products of the fermentation of dietary fiber by anaerobic intestinal microbiota. They have a multiple beneficial effect on the energy metabolism of mammals [41, 42]. The mechanisms underlying these effects are the subject of intensive research and encompass the complex interaction between diet, intestinal microbiota and the body's energy metabolism. The function of suppressing inflammatory reactions and the appearance of cancer is performed mainly by acetate, propionate and butyrate [43]. The review by Den Besten et al. [44] summarizes data on their role in the energy metabolism of the host.

Acetate and propionate are the most potent activators of SCFA receptors, so they must be constantly maintained at a high level in the gut [45]. The most abundant among all intestinal SCFAs is acetic acid, which is produced by *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Akkermansia muciniphila*, *Prevotella* spp., and *Ruminococcus* spp. [46]. In addition, acetate promotes anti-lipolytic activity. A high-fiber diet (with high acetate production) suppresses allergic airway disease by enhancing regulatory T cells [47]. A high-fiber diet and subsequent propionate production may also protect against airway allergy by inducing hematopoiesis of dendritic cells that colonize the lungs [31].

When fermentable fibers are deficient, microbes switch to energetically less favorable

sources for growth, such as amino acids from dietary or endogenous proteins or dietary fats, resulting in reduced enzymatic activity of the microbiota and SCFAs as secondary end products [45].

The main fermentation product of lactic acid bacteria, lactic acid, is not a short-chain fatty acid, but it also has a significant effect on the metabolism of the host organism [45]. In addition to lactic acid bacteria, promising probiotics include intestinal bacteria such as *Akkermansia muciniphila* associated with the increased expression of genes for the innate and adaptive immune response [48].

Probiotics can improve clinical symptoms, histological indicators and mucus production in gastrointestinal tract and reduce the expression of pro-inflammatory cytokines. The application of probiotics has led to the development of the concept of functional nutrition.

Over the past decade, the interaction between human health and the microbiome has become a subject of growing interest [49] with particular emphasis on identifying the effects of diets on microbiota [50]. The review by Singhvi et al. [51] describes the therapeutic achievements obtained by studying the effects of pre- and probiotics for restoration of microbial intestinal homeostasis. However, an unexpectedly complex involvement of the intestinal genome in the potential of human health was noted. Some results suggest that particular care should be taken when administering probiotics at the stages of relapse of inflammatory bowel disease [52]. It must also be taken into account that probiotic effects are strain-specific and they do not act through the same mechanisms [53].

In both North American and European guidelines, fecal microbiota transplantation is recognized as the most effective for the treatment of diseases associated with gastrointestinal microbial dysbiosis, including inflammatory bowel diseases, metabolic disorders, neuropsychiatric conditions or the destruction of multiresistant bacteria. However, there is still no consensus on important methodological aspects of this procedure, and evidence-based recommendations, with the exception of clinical studies, are still absent [54].

Microbiota transfer therapy of autistic children has shown long-term safety and effectiveness, since positive results persisted for two years of follow-up, however, a double blind, placebo-controlled study is needed in the future [55].

Impact of dietary components

One of the main types of macronutrients, which is considered important for metabolic health in general, is fiber. Complex carbohydrates, reaching the colon and fermented by intestinal bacteria, are their main source of nutrition and have a great influence on the overall level of bacteria, composition and its functional activity [56].

As shown in mice, the deficiency of fiber reduces microbiota density, slows down the proliferation of enterocytes, worsens mucus, and alters the composition of the microbiota [57]. Another highly fermentable polysaccharide, inulin, can also increase *Akkermansia muciniphila* levels in both mice and humans, which prevents the development of type 2 diabetes because it helps restore mucus strength and protects against inflammation [58].

Prebiotic compounds such as inulin, polydextrose, and corn fiber have been shown to improve immunity, variety of intestinal microbiota (increases the number of bifidobacteria), digestion, etc., especially in the elderly [59]. A fiber-rich diet has been shown to change not only the intestinal microbiota, but also the lungs microbiota, modulating the immunity [31], which is especially important to take into account at present in the case of the coronavirus pandemic.

It has been established that a diet rich in polyphenols protects a person from chronic pathologies by modulating numerous physiological processes, such as cells redox potential, enzymatic activity, proliferation and signaling pathways [60-62].

The use of probiotics and prebiotics, including polyphenols, with food has a positive effect on the composition of the intestinal microbiota [63]. Thus, curcumin and its metabolites contribute to the restoration of the intestinal microbiome. At the same time, it, like other polyphenols, is susceptible to bacterial enzymatic modifications with the formation of pharmacologically more active metabolites than the original curcumin [64].

Chinese herbal medicines [65] used in the treatment of type 2 diabetes also have a positive effect on the intestinal microbiota, which is explained by the enrichment of the microbiota with *Blautia* and *Faecalibacterium* species. Certain plant extracts (including polyphenol-rich cranberry extract, water-ethanol extract of green microalgae, green tea and ginger), which have a positive effect on microbiota, are used to treat diabetes because they increase the number of *Akkermansia* and other beneficial microflora [66].

Extracts of cinnamon bark and grape bagasse cause a decrease in the content of *Peptococcus*, *Desulfovibrio*, and *Lactococcus* and an increase in the content of *Allobaculum* and *Roseburia* [67], which helps to reduce fat mass, reduce inflammation of adipose tissue and improve glucose tolerance. In general, changes in the gut microbiota in response to the administration of plant extracts include an increase in microbial diversity, a decrease in the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio and an increase in the abundance of anti-inflammatory bacteria (*Bidobacterium*, *Lactobacillus*, *Akkermansia* and *Faecalibacterium*), as well as a decrease in the number of pathogenic bacteria (*E. coli* and *Enterococcus*), which can reduce inflammation and improve glycemic control.

Improving the intestinal microbiota profile through individual nutrition and nutritional supplements that improve immunity may be one of the preventive methods by which the effects of coronavirus can be minimized in the elderly and immunocompromised patients. It is proposed that additional trials be initiated to produce the combined effects of personalized functional foods, including prebiotics/probiotics, along with modern treatments [68].

Conclusion

Thus, an integrated view of the human gut microbiome and its relationship with human health opens up broad avenues for achieving the goals of medicine focused on solving the problem of increasing human immunity.

At present, when humanity has turned out to be defenseless against new infections, for the treatment of which there are no effective methods of treatment, there remains hope for the possibility of strengthening the nonspecific resistance of the body, due to its natural defenses, namely, immunity, ensured by optimal symbiotic coexistence with the microorganisms inhabiting it.

Expanding the range of naturally fermented foods containing various groups of microorganisms and a variety of foods rich in prebiotics will help increase the body's defenses. Along with traditional fermented milk products and fermented vegetables made using lactic acid bacteria, it is necessary to introduce other groups of microorganisms into the production starter cultures, in particular, acetic acid bacteria that produce the main SCFA - acetic acid, which will help normalize the functions of the gastrointestinal tract, stimulate indigenous microflora and increase the protective forces of the human body [69].

Funding

The work was supported by the Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (grant no. AP09258699).

References:

- 1 Santos-Marcos J.A., Perez-Jimenez F., Camargo A. (2019). The role of diet and intestinal microbiota in the development of metabolic syndrome. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 70, 1-27. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2019.03.017
- 2 Al Nabhani Z., Eberl G. (2020). Imprinting of the immune system by the microbiota early in life. *Mucosal Immunol.*, 13, 2, 183-189. DOI: 10.1038/s41385-020-0257-y
- 3 Dickson R.P. (2016). The microbiome and critical illness. *Lancet Respir. Med.*, 4, 1, 59-72. DOI: 10.1016/S 2213-2600(15000427-0
- 4 Sonnenburg E.D., Smits S.A., Tikhonov M., Higginbottom S.K., Wingreen N.S., Sonnenburg J.L. (2016). Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature*, 529, 212-215. DOI: 10.1038/nature16504

- 5 Van Hul. M, Cani P.D. (2019). Targeting carbohydrates and polyphenols for a healthy microbiome and healthy weight. *CurrNutr Rep.*, 8, 4, 307-316. DOI:10.1007/s13668-019-00281-5
- 6 Kho Z.Y., Lal S.K. (2018). The human gut microbiome – a potential controller of wellness and disease. *Front. Microbiol.*, 9, 1835. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01835
- 7 Belkaid Y., Hand T. (2014). Role of the microbiota in Immunity and inflammation. *Cell*, 157(1), 121–141. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.011
- 8 Tang W.H.W., Wang Z., Levison, B.S. Koeth R.A., Britt E.B., Fu X., Wu Y., Hazen S.L. (2013). Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 368(17), 1575–1584. DOI: 10.1056/NEJMoa1109400.
- 9 Pedersen H.K., Gudmundsdottir V., Nielsen H.B., et al. (2016) Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity. *Nature*, 535, 376–381. DOI: 10.1038/nature18646
- 10 Lee K.H., Song Y., Wu W., Yu K., Zhang G. (2020). The gut microbiota, environmental factors, and links to the development of food allergy. *Clin Mol Allergy*, 18, 5. DOI: 10.1186/s12948-020-00120-x.
- 11 García-Rivero J.L. (2020). The microbiome and asthma. *Arch Bronconeumol*. 56(1), 1-2. DOI: 10.1016/j.arbres.2019.01.016.
- 12 Ai D., Pan H., Li X., Gao Y., Liu G., Xia L.C. (2019). Identifying gut microbiota associated with colorectal cancer using a zero-inflated lognormal model. *Front. Microbiol.*, 10, 826. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00826.
- 13 Kong F., Cai Y. (2019). Study insights into gastrointestinal cancer through the gut microbiota. *BioMed Research International*. 2019, 3, 8721503. DOI: 10.1155/2019/8721503.
- 14 Locantore P., Del Gatto V., Gelli S., Paragliola R.M., Pontecorvi A. (2020). The interplay between immune system and microbiota in osteoporosis. *Mediators of Inflammation*, 2020, Article ID 3686749. DOI: 10.1155/2020/3686749
- 15 Cao S.-Y., Zhao C.-N., Xu X.-Y., Tang G.-Y., Corke H., Gan R.-Y., Li H.-B. (2019). Dietary plants, gut microbiota and obesity: Effects and mechanisms. *Trends Food Sci. Technol.*, 92, 194–204. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.08.004.
- 16 Kasselmann L.J., Vernice N.A., DeLeon J., Reiss A.B. (2018). The gut microbiome and elevated cardiovascular risk in obesity and autoimmunity. *Atherosclerosis*, 271, 203-213. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2018.02.036.
- 17 Hyland N., Cryan J.F. (2016). Microbe-host interactions: influence of the gut microbiota on the enteric nervous system. *Dev Biol.*, 417, 2, 182-187. DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.06.027.
- 18 Han H., Li Y.Y., Fang J., Liu G., Yin J., Li T.J., Yin Y.L. (2018). Gut microbiota and type 1 diabetes. *Int. J. Mol. Sci.*, 19, 995. DOI: 10.3390/ijms19040995.
- 19 Song M., Garrett W.S., Chan A.T. (2015). Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*, 148, 6, 1244–1260. e16. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.12.035
- 20 Shanahan F. The colonic microbiota in health and disease. (2013). *Current Opinion in Gastroenterology*, 29, 1, 49–54. DOI: 10.1097/MOG.0b013e32835a3493
- 21 David L.A., Maurice C.F., Carmody R.N., Gootenberg D.B., Button J.E., Wolfe B.E., Ling A.V., Devlin A.S., Varma Y., Fischbach M.A., Biddinger S.B., Dutton R.J., Turnbaugh P.J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 505, 7484, 559-563. DOI: 10.1038/nature12820.
- 22 Park C.H., Eun C.S., Han D.S. (2018). Intestinal microbiota, chronic inflammation, and colorectal cancer. *Intestinal Research*, 16, 3, 338–345. DOI: 10.5217/ir.2018.16.3.338
- 23 Liang S., Wu X., Jin F. (2018). Gut-brain psychology: rethinking psychology from the microbiota–gut–brain axis. *Front. Integr. Neurosci.*, 12, 33. DOI: 10.3389/fnint.2018.00033
- 24 Kelly J.R., Minuto C., Cryan J.F., Clarke G., Dinan T.G. (2021). The role of the gut microbiome in the development of schizophrenia. *Schizophrenia Research.*, 234, 4-23. DOI: 10.1016/j.schres.2020.02.010
- 25 Cryan J.F., O'Riordan K.J., Cowan C.S.M. et al. (2019). The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev.*, 99, 4, 1877-2013. DOI: 10.1152/physrev.00018.2018
- 26 Dumas A, Bernard L., Poquet Y., Lugo-Villarino G., Neurolles O. (2018). The role of the lung microbiota and the gut–lung axis in respiratory infectious diseases. *Cell. Microbiol.*, 20, 12, e12966. DOI: 10.1111/cmi.12966
- 27 Groves H.T., Higham S.L., Moffatt M.F., Cox M.J., Tregoning J.S. (2020). Respiratory viral infection alters the gut microbiota by inducing inappetence. *mBio*, 11, 1, e03236-19.

DOI: 10.1128/mBio.03236-19

28 Zemanick E. T., Wagner B. D., Robertson C. E. et al. (2017). Airway microbiota across age and disease spectrum in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.*, 50, 1700832. DOI: 10.1183/13993003.00832-2017

29 Dickson R.P., Huffnagle G. B. (2015). The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. *PLoS Pathog.*, 11, e1004923. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004923

30 Rosshart S. P., Vassallo B.G., Angeletti D., Hutchinson D.S., Morgan A P., Takeda K., Hickman H.D., McCulloch J.A., Badger J.H., Ajami N.J., Trinchieri G., De Villena F.P.M., Yewdell J.W., Rehmann B. (2017). Wild mouse gut microbiota promotes host fitness and improves disease resistance. *Cell*, 171, 1015–1028.e13. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.016

31 Trompette A., Gollwitzer E.S., Yadava K., Sichelstiel A.K., Sprenger N., Ngom-Bru C., Blanchard C., Junt T., Nicod L.P., Harris N.L., Marsland B.J. (2014). Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.*, 20, 2, 159–166. DOI: 10.1038/nm.3444

32 Gauguet S., D'Ortona S., Ahnger-Pier K., Duan B., Surana N. K., Lu R., Cywes-Bentley C., Gadjeva M., Shan Q., Priebe G.P., Pier G.B. (2015). Intestinal microbiota of mice influences resistance to *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Infect. Immun.*, 83, 4003–4014. DOI: 10.1128/IAI.00037-15

33 Zhang H., Yeh C., Jin Z., Ding L., Liu B.Y., Zhang L., Dannelly H.K. (2018). Prospective study of probiotic supplementation results in immune stimulation and improvement of upper respiratory infection rate. *Synth Syst Biotechnol*, 3, 2, 113-120. DOI: 10.1016/j.synbio.2018.03.001

34 Nagpal R., Mainali R., Ahmadi S., Wang S., Singh R., Kavanagh K., Kitzman D.W., Kushugulova A., Marotta F., Yadav H. (2018). Gut microbiome and aging: physiological and mechanistic insights. *Nutr Healthy Aging*, 4, 4, 267-285. DOI: 10.3233/NHA-170030.

35 Lake M.A. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research. (2020). *Clin Med (Lond)*, 2, 124-127. DOI: 10.7861/clinmed.2019-coron.

36 Mathieu E., Escobedo-Vazquez U., Descamps D., Cherbuy C., Langella P., Riffault S., Remot A., Thomas M. (2018). Paradigms of lung microbiota functions in health and disease, particularly, in asthma. *Front Physiol.*, 9, 1168. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01168>

37 Montalban-Arques A., Scharl M. (2019). Intestinal microbiota and colorectal carcinoma: implications for pathogenesis, diagnosis, and therapy. *EBioMedicine*, 48, 648-655. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.09.050.

38 Aitzhanova A.A., Alybayeva A.Zh., Amangeldy A.A., Ermekbay Zh.N., Elubaeva A.E. Bakterii kak producenty antibiotikov. *Microbiology and Virology*. 2020. №3. S. 4-19. https://imv-kaz.kz/f/mzhv_30_2020_3.pdf

39 Alybayeva A.Zh., Saubenova M.G., Oleinikova E.A., Chizhayeva A.V., Aitzhanova A.A., Amangeldy A.A., Potoroko I.Yu. Molochnokislye bakterii protiv antibiotikorezistentnyh patogenov. *Microbiology and Virology*. 2021. №1-2 (32-33). S. 4-19. <https://imv-journal.kz/index.php/mav/article/view/2>

40 Shen T.D. (2017). Diet and gut microbiota in health and disease. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*, 88, 117-126. DOI: 10.1159/000455220.

41 Bugaut M. (1987). Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol B.*, 86, 439–472.

42 Rios-Covián D., Ruas-Madiedo P., Margolles A., Gueimonde M., de los Reyes-Gavilán C. G., Salazar N. (2016). Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 7, Issue FEB). Frontiers Media S.A. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00185

43 Ratajczak W., Rył A., Mizerski A., Walczakiewicz K., Sipak O., Laszczyńska M. (2019). Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs). *Acta Biochim Pol.*, 66, 1, 1-12. DOI: 10.18388/abp.2018_2648.

44 Den Besten G., van Eunen K., Groen A.K., Venema K., Reijngoud D., Bakker B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res.*, 54, 9, 2325-2340. DOI: 10.1194/jlr.R036012.

45 Koh A., de Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., & Bäckhed F. (2016). From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell*, 165, 6, 1332–1345. DOI: 10.1016/j.cell.2016.05.041

46 Feng W., Ao H., Peng C. (2018). Gut microbiota, short-chain fatty acids, and herbal medicines. *Frontiers in Pharmacology*. Vol. 9, Issue NOV. Frontiers Media S.A. DOI: 10.3389/fphar.2018.01354

47 Thorburn A.N., McKenzie C.I., Shen S., Stanley D., Macia L., Mason L.J., Roberts L.K., Wong

C.H.Y., Shim R., Robert R., et al. (2015). Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. *Nat. Commun.* 6, 7320.

48 Giri S., Mangalam A. (2019). The gut microbiome and metabolome in multiple sclerosis. In J. Faintuch, S. Faintuch (Eds.), *The gut microbiome and metabolome in multiple sclerosis microbiome and metabolome in diagnosis, therapy, and other strategic applications*. London: Academic Press, 2019, 333-340.

49 Gupta A., Saha S., Khanna S. (2020). Therapies to modulate gut microbiota: Past, present and future. *World J Gastroenterol.*, 26, 8, 777-788. DOI:10.3748/wjg.v26.i8.777.

50 Milani C., Ferrario C., Turroni F., Duranti S., Mangifesta M., van Sinderen D., Ventura M. (2016). The human gut microbiota and its interactive connections to diet. *J Hum Nutr Diet.* 29, 5, 539-546. DOI: 10.1111/jhn.12371.

51 Singhvi N., Gupta V., Gaur M., Sharma V., Puri A., Singh Y., Dubey G.P., Lal R. (2020). Interplay of human gut microbiome in health and wellness. *Indian Journal of Microbiology*, 60, 26–36. DOI: 10.1007/s12088-019-00825-x

52 Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda F.J., Vilchez-Padial L.M., Gil A. (2017). Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. *Nutrients*, 9, 6, 555. DOI: 10.3390/nu9060555.

53 Gogineni, V.K., Morrow, L.E., Malesker, M.A. (2013). Probiotics: mechanisms of action and clinical applications. *J Prob Health.*, 1:101. DOI: 10.4172/2329-8901.1000101

54 Reygnier J., Kapel N. Current status of fecal microbiota transplantation. 2019. in *microbiome and metabolome in diagnosis, therapy, and other strategic applications*, In J. Faintuch, S. Faintuch (Eds.), *The gut microbiome and metabolome in multiple sclerosis microbiome and metabolome in diagnosis, therapy, and other strategic applications*. London: Academic Press, 155-165.

55 Kang D.W., Adams J.B., Coleman D.M., Pollard E.L., Maldonado J., McDonough-Means S., Caporaso J.G., Krajmalnik-Brown R. (2019). Long-term benefit of microbiota transfer therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Rep.*, 9, 1, 5821. DOI: 10.1038/s41598-019-42183-0

56 Makki K., Deehan E.C., Walter J., Backhed F. (2018). The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell Host Microbe*, 23, 6, 705–715. DOI:10.1016/j.chom.2018.05.012.

57 Zou J., Chassaing B., Singh V., Pellizzon M., Ricci M., Fythe M.D., Kumar M.V., Gewirtz A.T. (2018). Fiber-mediated nourishment of gut microbiota protects against diet-induced obesity by restoring IL-22-mediated colonic health. *Cell Host Microbe*, 23, 1, 41-53. e4. DOI:10.1016/j.chom.2017.11.003

58 Cani P.D., De Vos W.M. (2017). Next-generation beneficial microbes: the case of *Akkermansia muciniphila*. *Front Microbiol.*, 8, 1765. DOI:10.3389/fmicb.2017.01765.

59 Bouhnik Y., Achour L., Paineau D., Riottot M., Attar A., Bornet F. (2007). Four-week short chain fructo-oligosaccharides ingestion leads to increasing fecal bifidobacteria and cholesterol excretion in healthy elderly volunteers. *Nutr J.*, 6, 42. DOI:10.1186/1475-2891-6-42.

60 Crasci L., Lauro M.R., Puglisi G., Panico A. (2018). Natural antioxidant polyphenols on inflammation management: Anti-glycation activity vs. metalloproteinases inhibition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 58, 893–904. DOI: 10.1080/10408398.2016.1229657.

61 Kinger M., Kumar S., Kumar V. (2018). Some important dietary polyphenolic compounds: An anti-inflammatory and immunoregulatory perspective. *Med. Chem.*, 18, 1270-1282. DOI: 10.2174/1389557517666170208143410.

62 Singh A.K., Cabral C., Kumar R., Ganguly R., Rana H.K., Gupta A., Lauro M.R., Carbone C., Reis F., Pandey A.K. (2019). Beneficial effects of dietary polyphenols on gut microbiota and strategies to improve delivery efficiency. *Nutrients*, 11, 9, 2216. DOI:10.3390/nu11092216

63 Neri-Numa I.A., Pastore G.M. (2020). Novel insights into prebiotic properties on human health: A review. *Food Research International*, 131, 108973. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.108973

64 Di Meo F., Margarucci S., Galderisi U., Crispi S., Peluso G. (2019). Curcumin, gut microbiota, and neuroprotection. *Nutrients*, 11, 10, 2426. DOI: 10.3390/nu11102426

65 Zhang B., Yue R., Chen Y., Yang M., Huang X., Shui J., Peng Y., Chin J. (2019). Gut microbiota, a potential new target for chinese herbal medicines in treating diabetes mellitus. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2019, 2634898. DOI: 10.1155/2019/2634898

66 Xia T., Yao J., Zhang J., Duan W., Zhang B., Xie X., Xia M., Song J., Zheng Y., Wang M. (2018). Evaluation of nutritional compositions, bioactive compounds, and antioxidant activities of Shanxi aged vinegars during the aging process. *J Food Sci.*, 83, 10, 2638-2644. DOI: 10.1111/1750-3841.14356.

67 Van Hul M., Geurts L., Plovier H., Druart C., Everard A., Ståhlman M., Rhimi M., Chira K., Teissedre P.L., Delzenne N.M., Maguin E., Guilbot A., Brochot A., Gérard P., Bäckhed F., Cani P.D. (2018). Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 314, 4, E334-E52. DOI: 10.1152/ajpendo.00107.2017.

68 Dhar D, Mohanty A. (2020). Gut microbiota and Covid-19- possible link and implications. *Virus Res.*, 285, 198018. DOI:10.1016/j.virusres.2020.198018

69 Buharin O.V., Andriushchenko S.V., Perunova N.B., Ivanova E.V. Mechanism persistency indigenous bifidobacteria under the action of acetate in the human gut biotope. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2021, 98(3), 276-282.

МРНТИ: 34.25.29; 34.25.39

А.И. КЫДЫРМАНОВ^{1*}, К.О. КАРАМЕНДИН¹, Т.Б. САБЫРЖАН¹, С. ГУДМАН²¹ Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан;² Институт общей и сравнительной биологии, Университет Лидса, Лидс, Великобритания;

*e-mail: kydyrmanov@yandex.kz

ВИРУСЫ ГРИППА У МОРСКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**doi:10.53729/MV-AS.2022.03.02****Аннотация**

В обзоре обсуждается роль морских млекопитающих в эволюции, экологии и циркуляции вирусов гриппа А и В, свиного вируса пандемического гриппа А (H1N1) и высокопатогенных вариантов вируса гриппа птиц H5N1 и H5N8. Подчеркивается положение о том, что морские ластоногие могут служить одним из резервуаров широкого спектра вирусов, в частности гриппа В человека. Отмечено, что характер и интенсивность связывания вирусов гриппа различного происхождения с клетками эпителия респираторных органов морских млекопитающих – определяющий фактор их восприимчивости к инфекции, а также её продуктивности и особенностей патогенеза. Также выдвигается заключение о необходимости проведения комплексного эколого-вирусологического мониторинга вирусов гриппа, циркулирующих в популяциях тюленей в казахстанской акватории Каспийского моря.

Ключевые слова: вирус гриппа, эпизоотия, серология, ластоногие, морские млекопитающие, каспийский тюлень.

Отслеживание состояния популяций морских млекопитающих – одно из важных научных направлений в экологии. Наиболее значимыми остаются исследования животных, имеющих частые и длительные контакты с человеком. Согласно данным NOAA's National Marine Fisheries Service [1], в период с 1991 по 2007 гг. причиной гибели морских млекопитающих явились: инфекционные заболевания (15%), биотоксины (29%), экологические факторы (7%), человеческие воздействия (5%) и другие неизвестные факторы (44%).

В условиях отсутствия очевидных стрессовых воздействий существенное влияние на численность популяции морских млекопитающих оказывают возбудители инфекционных болезней (вирусы, бактерии), а также паразиты, относящиеся практически ко всем известным семействам.

Вирусные заболевания играют важную роль в динамике численности популяций диких животных, ограничивая их прирост и усиливая селекцию на генетическом уровне. Воздействие вирусов становится еще более существенным для популяций, находящихся под угрозой исчезновения или фрагментированных в результате деятельности человека. Прямое влияние на численность животных оказывают вирусы гриппа и морбилливирусы.

Вирус гриппа способен периодически преодолевать межвидовой барьер в результате мутации в одном из генов, повышающей изменчивость возбудителя. В результате возникает значительно большее количество его вариантов, что создаёт лучшие условия для адаптации в организме различных видов млекопитающих и птиц [2, 3].

Вопросы циркуляции и взаимосвязи возбудителей гриппа у различных видов хозяев, включая преодоление межвидового барьера, – основополагающее направление научного поиска, необходимого для понимания механизмов возникновения массовой инфекции человека и животных.

Распространение вируса гриппа А (ВГ А) среди морских млекопитающих связано с экологией этих животных и тесным контактом с птичьим резервуаром возбудителя.

В предлагаемом обзоре приводятся сведения об эпизоотиях среди морских млекопитающих, обусловленных вирусами гриппа родов А и В, обсуждается роль этих животных в экологии и в эволюции возбудителей.

Вирус гриппа А у морских млекопитающих

ВГ А изолированы от широкого круга хозяев, включая 105 видов диких и домашних птиц, различные виды млекопитающих (человек, свинья, лошадь, морские млекопитающие, норка, кошка и др.) [4]. Дикие птицы, относящиеся к отрядам *Anseriformes* (утки, гуси, лебеди) и *Charadriiformes* (прибрежные виды вместе с чайками), образуют естественный резервуар ВГ А в природе, из которого может происходить трансмиссия к другим хозяевам.

Первая информация о возможности инфицирования тюленей ВГ А получена во время тяжелой эпизоотии на побережье Новой Англии, в период с декабря 1979 по октябрь 1980 гг. В результате погибло около 600 млекопитающих, от одного из них выделен ВГ А /тюлень/Массачусетс/1/80 (H7N7) [5]. Генетическая характеристика вируса показала, что все участки РНК вируса имеют близкое сходство с таковыми у птичьих штаммов. Вторая эпизоотия среди тюленей, протекавшая с выраженными клиническими проявлениями пневмонии, возникла на побережье Новой Англии в июне 1982-августе 1983 гг. и была ассоциирована с ВГ А (H4N5) [6].

По сообщению J.R. Geraci и соавторов [4] инфекция среди тюленей протекала тяжело: у упитанных животных наблюдались конъюнктивиты, пенисто-кровянистые истечения из ноздрей, слабость, мышечная дрожь, нарушение координации движения и дыхания. У больных животных отмечалось опухание шеи в результате проникновения воздуха в фасции и мышцы из дыхательных путей. Животные теряли способность к плаванию или нырянию, что приводило к вынужденному их дрейфу по морскому течению или направлению ветра. У павших тюленей наблюдалась пневмония, которая характеризовалась некротизированными бронхитами, бронхиолитами и геморрагическими альвеолитами.

Со времени описания данных эпизоотий систематического обследования тюленей на ВГ А на побережье Новой Англии не проводилось. С января 1991 по февраль 1992 г. от млекопитающих, погибших от пневмонии на п-ове Кейп-Код (штат Массачусетс), выделены пять штаммов ВГ А, два из которых идентифицированы как А (H4N6), три – А (H3N3). Гены гемагглютинаина (НА) H3 изолятов А/тюлень/Массачусетс/3911/92 и А/тюлень/Массачусетс/3984/92 оказались на 99,7% идентичными между собой. Филогенетический анализ показал тесную связь их последовательностей с таковыми НА H3 птичьего вируса А/кряква/Нью-Йорк/6874/7, что указывает на длительную циркуляцию ВГ этого подтипа в популяциях тюленей [7].

К. Ohishi с соавторами [8] при исследовании сывороток крови каспийских тюленей, собранных в 1993-2000 гг., показали, что млекопитающие были инфицированы эпидемическими А/Бангкок/1/79-подобными вирусами гриппа, циркулировавшими среди людей в 1979-1981 гг. Антитела к вирусу H3N2 также обнаружены в сыворотках крови байкальских – *Phoca sibirica* и кольчатых нерп – *Phoca hispida* Карского моря [9]. При серологическом исследовании сывороток крови курильского подвида обыкновенных тюленей (*Phoca vitulina stejnegeri*) на о-ве Хоккайдо выявлены антигемагглютинины к вирусам гриппа с подтипами НА H3 и H6, что указывает на способность последнего варианта инфицировать млекопитающих [10]. Получены так же косвенные серологические доказательства циркуляции ВГ А в популяциях морских млекопитающих (кольчатые нерпы, белухи – *Delphinapterus leucas*) в Баренцевом море (гренландские тюлени – *Phoca groenlandica* и хохлачи – *Cystophora cristata*) Арктической Канады, Северного и Берингового морей (тюлени и котики) [11-12]. De Boer с соавторами [13] выявили наличие антител к вирусам с подтипами гемагглютининов: H1, H3, H4, H7, и H12 в сыворотках тюленей, отловленных в Беринговом море. В то же время, сыворотки крови

сивучей (*Eumetopias jubatus*), положительные на грипп А в ИФА, оказались отрицательными в РТГА (реакция торможения гемагглютинации), что позволило авторам предположить возможное присутствие в сыворотках этих животных антител к ранее неизвестным подтипам гемагглютининов ВГ А. В 2008 г. P. Calle с соавторами [14] не обнаружили антитела к ВГ в сыворотках морского зайца (*Erignathus barbatus*) на побережье Аляски, но установили их наличие к гемагглютинуину Н10 и нейраминидазам N2, N3, N5, N7 в 21% из 38 исследованных сывороток крови моржей (*Odobenus rosmarus*) [15]. При мониторинге зоонозов морских позвоночных в прибрежных водах Северо-западной Атлантики от гренландского тюленя был изолирован ВГ А (Н3N8) [16].

ВГ А (Н1N3) изолирован Д.К. Львовым с соавт. [17] от гладкого кита (карликовый полосатик – *Balaenoptera acutorostrata*) в южной части Тихого океана в 1975-1976 гг. От зубатых китов (обыкновенная гринда – *Globicephala melas*) V. Hinshaw et al. [18] выделили ВГ Н13N9 и Н13N2 в генетическом отношении близкие к вирусам Н13, циркулировавшим среди чайковых птиц. Неизвестно, вызвали ли эти вирусы болезнь у китов, или же простую оппортунистическую инфекцию. Доказательств, указывающих на то, что вирусы с этим подтипом НА передавались от одного животного к другому не получено. В результате сравнения их полных геномов с нуклеотидными последовательностями ВГ Н13 околотовтных птиц и вирусов гриппа морских млекопитающих обнаружена редкая констелляция генотипов, полученных от чаек, крачек и куликов [19]. Как показывают филогенетические исследования, изолированные от морских млекопитающих вирусы гриппа происходят от предшественников адаптированных к гусеобразным. В связи этим авторы считают, что штамм А/кит/Майн/328В/1984 – это единственный ВГ чайкового происхождения вызвавший инфекцию у морских млекопитающих.

В 2010 г. при вирусологическом мониторинге северных морских слонов (*Mirounga angustirostris*) у калифорнийского побережья были выявлены особи, инфицированные ВГ А. Носовые смывы двух взрослых самок из 42 исследованных животных, оказались положительными на М-ген ВГ А в полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени [20]. В последующем вирусы были выделены на развивающихся куриных эмбрионах, секвенирован их полный геном, в реакции торможения гемагглютинирующей активности установлена принадлежность изолятов к ВГ А (Н1N1). В результате секвенирования генома вируса гриппа, выделенного от северного морского слона, показана более чем 99% гомология его с прототипным вирусом пандемического «свиного» гриппа А/California/04/2009 (Н1N1), который циркулирует среди людей с 2009 г.

Циркуляция ВГ А (Н1N1) среди морских слонов косвенно подтверждена при анализе более 300 сывороток крови этих животных. Установлено, что в образцах, собранных до апреля 2010 г., отсутствовали антитела к вирусу Н1N1, серопозитивные особи стали обнаруживаться только после появления в циркуляции пандемического вируса «свиного» гриппа [21]. По характеру репликации вируса А/Elephant seal/California/1/2010 (Н1N1) в эпителиальных клетках респираторных путей человека было высказано предположение об их адаптации к морским слонам. Вовлечение морских млекопитающих в циркуляцию пандемического вируса Н1N1 свидетельствует о межвидовой трансмиссии эпидемических вариантов от людей обратно к диким животным.

Осенью 2011 г. в Новой Англии (штат Массачусетс, США) 162 тюленя погибли от пневмонии, вызванной ВГ Н3N8, сходным с вирусами водоплавающих птиц, циркулировавшими в Северной Америке с 2002 г. Вирус обладал мутацией в PB2 гене, характерной высокопатогенному для людей варианту Н5N1, что указывает на его способность к межвидовой передаче и адаптации к млекопитающим [21].

Имеется ряд сообщений о вирусологическом мониторинге циркуляции ВГ А в популяциях морских млекопитающих Северной Евразии. Так, в период с 1976 по 1999 гг. С.С. Ямникова с соавт. [22] в ходе мониторинга за циркуляцией ВГ А в популяциях диких птиц Северного Каспия исследовали образцы от 152 особей каспийского тюленя (*Phoca*

casifica), но им не удавалось обнаружить инфицированных животных. Позже, исследования сывороток крови каспийских тюленей, собранных в 1993–2000 гг., показали, что млекопитающие были инфицированы эпидемическими А/Бангкок/1/79-подобными вирусами, циркулировавшими среди людей в 1979–1981 гг. [23].

Позднее А.М. Шестопалов с соавт. [24,25] и З.К. Чувакова с соавт. [26,27] сообщили об изоляции ВГ А (H7N7), из материалов, собранных от павших каспийских тюленей во время их массовой гибели в апреле–июне 2000–2002 гг. Однако в литературе нет каких-либо данных о филогенетических или патобиологических свойствах эпизоотического ВГ А (H7N7).

В 2002 и 2012 гг. ВГ А (H4N6) были выделены от каспийских тюленей в российских водах [28]. Этот тюлений изолят был тесно связан с вирусами птичьего гриппа классической евразийской линии.

В 2002–2010 гг. А.М. Шестопалов с соавт. [29] провели серологические исследования сывороток крови от 298 китообразных (афалины - *Tursiops truncatus* и белухи) Черного и Охотского морей на наличие антител к ВГ в РТГА с использованием в качестве антигенов вирусов (H1, H3, H4, H7 и H13), которые ранее выделяли или диагностировали у морских млекопитающих. Антитела к указанным подтипам ВГ ни у одного из исследуемых животных не были обнаружены.

Т. Harkonen с соавторами [30] в 2007 г. исследовали эпизоотию среди тюленей на датском о-ве. Анхольт и вдоль побережья Швеции, где погибли несколько тысяч животных. У пораженных особей наблюдали слабость, опухание, эмфизематозность шеи, одышку, кровохарканье. При вскрытии павших тюленей обнаружена интерстициальная пневмония, некротический трахеит и бронхит. В этих же регионах, отмечен выброс туш морских свиней с эмфизематозными проявлениями. Исходя из отрицательных результатов бактериологических исследований материалов от павших особей и ПЦР анализа, авторы [29] считают, что этиологическим агентом инфекции тюленей и морских свиней мог быть другой вирусный патоген. V.C. White [31] обсуждая вопрос о возможном участии ВГ в эпизоотии 2007 г. среди ластоногих и китообразных в Скандинавии, предполагает, что эта редкая вспышка могло произойти в результате интродукции нового варианта вируса в популяцию одного из этих видов животных с последующей межвидовой трансмиссией.

Эпизоотии у морских млекопитающих, вызванные ВГ А в других частях света, впервые зарегистрированы в 2014 г. ВГ А (H10N7) изолирован от павших обыкновенных тюленей (*Ph. vitulina*) на побережье Северного моря в Швеции, Дании, Германии и Нидерландах [32–33], где погибло свыше 1400 животных.

В Великобритании были зарегистрированы спорадические случаи выявления ВГ у тюленей, включая подтипы А (H3N8), выделенные от молодых *Halichoerus grypus* в Корнуолле в 2017 г. [34], и А (H5N8) от серых тюленей и двух *Phoca vitulina* в Норфолке в 2020 г. [35]. Из-за отсутствия рутинного эпиднадзора за популяциями морских млекопитающих в Соединенном Королевстве невозможно определить, случайный ли ВГ птиц у этих видов, либо он проявляет эндемичность в популяции британских тюленей [36].

Высокопатогенный ВГ А (H5N8) был обнаружен в образцах легких двух *Halichoerus grypus*, выброшенных на берег Балтийского побережья Польши в 2016 и 2017 гг. Изолированный вирус был отнесен к кладе 2.3.4.4 В, которая тесно связана с птичьим вариантом H5N8, циркулировавшим в то время в Европе [37].

В июле 2022 г. в Службе инспекции здоровья животных и растений Министерства сельского хозяйства США подтвердили, что образцы четырех тюленей, выброшенных на берег в штате Мэн, дали положительный результат на высокопатогенный грипп птиц А (H5N1) [38]. Выявление ВГ птиц подтипов H5N1, H5N8 у тюленей свидетельствует о постоянном риске возникновения эпизоотии среди тюленей, сталкивающихся с высокопатогенными вариантами возбудителей гриппозной инфекции птичьего

происхождения на пересечении пролетных путей, сезонных миграций ластоногих и человеческой деятельности.

В обзорной статье V.C. White [31] обобщены данные по круговороту ВГ в цепи питания обитателей водной среды. Основным фактором передачи вирусов гриппа, где они остаются жизнеспособными в течение нескольких месяцев, считается вода. Вирусы длительное время сохраняются во льдах водоемов, а также концентрируются в организме у фильтрующих беспозвоночных [39,40]. Рыбы могут питаться донными отложениями, пометом птиц и детритами, содержащими в большом количестве вирусы гриппа. В свою очередь, контаминированные ВГ рыбы и беспозвоночные становятся кормом для рыбоядных птиц и тюленей [41]. При алиментарном пути заражения вирусы, поступившие в желудочно-кишечный тракт плотоядных животных, могут проникнуть в печень через портальную вену [34,42].

ВГ имеет только одну группу специфических рецепторов на клеточной поверхности. Их структура зависит от видового и тканевого происхождения клеток, которые определяют возможности межвидовой трансмиссии возбудителей гриппа [43]. Различные подтипы НА отличаются по способности распознавания и связывания сиаловой кислоты. НА ВГ человека соединяется с остатками сиаловой кислоты в положении 2'-6' связи, а НА птичьих вирусов 2'-3' связи. Рецепторная специфичность НА ВГ А, изолированных от морских млекопитающих, коррелирует с сиалоолигосахаридами SA α 2,3Gal, обнаруженными в эпителиях легких тюленей и китов [44]. Это указывает на возможность прямой передачи ВГ птиц к морским млекопитающим вышеуказанных отрядов. В отличие от птиц, у тюленей сиалоолигосахаридные рецепторы SA α 2,3Gal расположены в легких, а не кишечном тракте, что делает их более восприимчивыми к воздушно-капельному пути заражения. [37,45].

Изучение характера и интенсивности связывания ВГ различных хозяев с клетками эпителия респираторных органов морских млекопитающих – определяющий фактор их восприимчивости к инфекции, а так же ее продуктивности и особенностей патогенеза. При гистохимическом анализе A.J. Ramis с соавторами [38] установили, что изоляты ВГ водоплавающих птиц, сходные с эпизоотическими штаммами ластоногих (H4N5, H7N7), умеренно связываются с эпителиальными рецепторами трахеи и бронхов *Phoca vitulina* и *Halichoerus grypus*, а так же частично взаимодействуют с таковыми китообразных (морская свинья, афалина). В то же время клетки эпителия альвеол всех четырех видов животных проявляли к ним только частичную аффинность. На основании вышеизложенных данных, высказывается предположение о возможности инфицирования тюленей широким спектром ВГ птиц путем прямой трансмиссии без предварительной адаптации.

В вышеуказанной работе [38] показано, что взятые в эксперимент вирусы пандемического («свиной» грипп H1N1pdm) и сезонного (H3N2) гриппа человека слабо связывались с клетками трахеобронхиального эпителия китообразных и не прикреплялись к таковым у тюленей. По их мнению, это обстоятельство служит доказательством отсутствия случаев вспышек гриппозных инфекций среди тюленей, вызванных вирусами человека. Тем не менее, в литературе имеются сведения об инфицированности свободноживущих калифорнийских морских пандемическим «свиным» гриппом [21], и серологические данные об инфицированности каспийских тюленей А/Бангкок/1/79 (H3N2)-подобными эпидемическими вирусами [8].

Обнаружение ВГ А некоторых подтипов в популяциях тюленей и других морских млекопитающих свидетельствует о том, что эти животные могут участвовать в процессах генетической реассортации между ВГ различного происхождения, но они не играют существенной роли в экологии и эволюции возбудителя.

Вирус гриппа В у тюленей

До 1999 г. ВГ В считался исключительно человеческим патогеном. Однако, относительно недавно было доказано, что обыкновенные и серые тюлени могут инфицироваться этим вирусом [46]. ВГ В, заражающий культуру клеток *in vitro* почек тюленя, выделен от молодняка обыкновенного тюленя с признаками респираторного заболевания. С момента установления морских млекопитающих в качестве новых хозяев появились несколько сообщений по обнаружению антител к ВГ В у некоторых видов ушастых и настоящих тюленей. На основании этих данных было выдвинуто предположение, что тюлени могут служить одним из резервуаров вируса гриппа В человека [7, 47].

С целью определения возможности циркуляции ВГ В среди тюленей исследовательская группа из Медицинского Центра Эразмус (Роттердам, Нидерланды) проанализировала 615 образцов сывороток крови ластоногих (548 от обыкновенных тюленей и 67 от серых тюленей), собранных на побережье Нидерландов, и поступивших в центр реабилитации тюленей в Питербюрене в 2002–2012 гг. В результате в образцах, собранных от тюленей в 2002 – 2009 гг. и после 2011 г., специфические антитела к ВГ В не выявлены. Однако в десяти сыворотках, из 170 собранных в 2010-2011 гг., в РТГА в высоких титрах обнаружены антитела к штамму B/Yamanashi/166/98. В этих же сыворотках в низких титрах выявлены антигемагглютинины к прототипному вирусу B/Seal/Netherlands/1/99, выделенному от тюленя в нидерландских прибрежных водах [48]. Авторы считают, что тюлени инфицировались вирусом сходным с B/Yamanashi/166/98, который в антигенном отношении отличается от B/Seal/Netherlands/1/99. Следует отметить, что в 79 сыворотках крови морских свиней, собранных в 2003 - 2013 гг. в тех же водах Нидерландов, что и серопозитивные сыворотки от тюленей, антитела к ВГ В не обнаружены [49].

В наших исследованиях инфицирование каспийских тюленей ВГ В подтверждается серологическими методами. Наивысшие титры антител выявлены против штамма гриппа В/Алматы/8/18, относящегося к вирусам линии B/Victoria, несколько более низкие титры антител выявлены к штамму B/Florida/4/2006 линии B/Yamagata. Антитела в высоких титрах были обнаружены в образцах сыворотки молодых тюленей, что свидетельствует о недавнем заражении этих животных гриппом В.

Проведенный анализ данных литературы свидетельствует об инфицированности морских млекопитающих различными подтипами вирусов гриппа А. К настоящему времени от ластоногих изолированы ВГ А с антигенными формулами H1N1, H3N3, H3N8, H4N5, H4N6, H5N1, H5N8, H7N7, H10N7, от китообразных – H1N3, H13N2, H13N9. В единичных исследованиях показана возможность циркуляции среди каспийских тюленей ВГ А (H3N2), А (H4N6) и В.

В связи с этим, важным представляется проведение комплексного эколого-вирусологического мониторинга вирусов гриппа, циркулирующих среди каспийских тюленей, являющихся одним из возможных резервуаров в природе, где может произойти реассортация генов ВГ птиц с появлением новых вариантов возбудителей, адаптированных к млекопитающим животным и человеку.

Источник финансирования

Исследование финансируется Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант № AP08856073 «Исследование вирусной метапопуляций каспийского тюленя для раннего обнаружения возбудителей новых и возвращающихся инфекций»).

Литература:

1 <http://www.nmfs.noaa.gov/pr/health>

- 2 Furió V1, Moya A, Sanjuán R. The cost of replication fidelity in an RNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, Jul 19; 102(29), 10233-7. PMID:16006529
- 3 Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, 1992, Dec 15, 122(2), P.281-288. PMID:1336756
- 3 Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier R. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, 2006, 312, 384-388. PMID:17500589
- 4 Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier R. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, 2006, 312, 384-388. PMID:17500589
- 5 Geraci J.R, St Aubin D.J, Barker I.K, et al. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science*, 1982, 215, 1129-1131. PMID:7063847
- 6 Hinshaw V. S., Bean W. J., Webster R. G. et al. Are seals frequently infected with avian influenza viruses. *J. Virol*, 1984, 51, 863-865. PMID:3701925
- 7 Callan R.G., Early C., Rida H., Hinshaw V.S. The appearance of H3 influenza viruses in seals. *J. Gen. Virol*, 1995, 76 (Part 1), P. 199-203. PMID:7844533
- 8 Ohishi K., Ninomiya A., Kida H. et al. Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiol Immunol*, 2002, 46(9), P. 639-44. PMID:12437032
- 9 Ohishi K, Kishida N, Ninomiya A, et al. Antibodies to human-related H3 influenza A virus in baikal seals (*Phoca sibirica*) and ringed seals (*Phoca hispida*) in Russia. *Microbiol Immunol*, 2004, 48(II), 905-909. PMID:15557750
- 10 Fuji K., Kakumoto Ch., Kobayashi M. et al. Serological evidence of Influenza A virus infection in Kuril harbour seals (*Phoca vitulina stejnegeri*) of Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med Sci*, 2007. Aug., 69 (3), 259-263. PMID:17409641
- 11 Nielsen O., Clavijo A., Boughen J.A. Serologic Evidence of Influenza A Infection in Marine Mammals of Arctic Canada, *J Wildl Dis.*, 2001, 37(4), 820–825. PMID:11763748
- 12 Козырева М.В., Соколова О.В., Юров Г.К., Алексеенкова С.В. Бурканов В.Н., Юров К.П. Выявление специфических антител к ряду вирусов млекопитающих у сивуча (*Eumetopias jubatus*) Курильских островов. В сб.: Морские млекопитающие Голарктики: сборник научных трудов по материалам V международной конференции, Одесса, 2008, –628 с.
- 13 De Boer GF, Back W, Osterhaus ADME. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. *Arch Virol*, 1990, Vol.115, 47-61. PMID:2174233
- 14 Calle PP, Seagars DJ, McClave C, Senne D, House C, House JA. Viral and bacterial serology of six free-ranging bearded seals *Erignathus barbatus*. *Dis Aquat Organ*, 2008, 81, 77-80. PMID:18828565.
- 15 Calle PP, Seagars DJ, McClave C, Senne D., House C., House J.A. Viral and bacterial serology of free-ranging Pacific walrus. *J Wildl Dis.*, 2002, 38, 93-100. PMID:11838234.
- 16 Bogomolni AL, Gast RJ, Ellis JC, Dennett M, Pugliares KR, Lentell BJ, Moore MJ. Victims or vectors: a survey of marine vertebrate zoonoses from coastal waters of the Northwest Atlantic. *Dis Aquat Organ*, 2008 Aug 19;81(1), 13-38. doi: 10.3354/dao01936. PMID:18828560
- 17 Lvov D.K., Zhdanov V.M., Sazonov A.A. et al. Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales. *Bull. WHO*, 1978, 56, 923-930. PMID:310734
- 18 Hinshaw V.S., Bean W.J., Geraci J.R. Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *J Virol*, 1986, 58, 655-656. PMID:3701925
- 19 Groth M., Lange J., Kanrai P., Pleschka S., Scholtissek C., Krumbholz A., Platzer M., Sauerbrei A., Zell R.. The genome of an influenza virus from a pilot whale: Relation to influenza viruses of gulls and marine mammals. *Infect Genet Evol*, 2014, 24, 183-186. doi: 10.1016/j.meegid.2014.03.026.
- 20 Goldstein T., Mena I., Anthony SJ. et al. Pandemic H1N1 Influenza Isolated from Free-Ranging Northern Elephant Seals in 2010 off the Central California Coast. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e62259. doi:10.1371/journal.pone.0062259
- 21 Anthony S.J, et al. Emergence of fatal avian influenza in New England harbor seals. *mBio*, 2012, № 3(4):e00166-12. doi:10.1128/mBio.00166-12.
- 22 Ямникова С.С., Гамбарян А.С., Федякина И.Т. и др. Мониторинг за циркуляцией вирусов гриппа А в популяциях диких птиц Северного Каспия. *Вопр. Вирусол*, 2001, 4, 39-43.
- 23 Ohishi K., Ninomiya A., Kida H., Park C., Maruyama T., Arai T., Katsumata E., Tobayama T., Boltunov A., Khuraskin L., Miyazaki N. Serological evidence of transmission of human influenza A and

- В viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiology and Immunology*, 2002, 46(9), 639-44. PMID:12437032.
- 24 Шестопалов А.М., Беклемишев А.Б., Хураськин Л.С. и др. Пара- и ортомиксовирусы у каспийских тюленей. В сб.: Морские млекопитающие Голарктики: сборник научных трудов по материалам II международной конференции, Москва: КМК, 2002, 294.
- 25 Дурыманова А.А., Беликов С.И., Золотых С.И. и др. Мониторинг инфекционных заболеваний каспийских тюленей (*Phoca caspica*). В сб.: Морские млекопитающие Голарктики: сборник научных трудов по материалам III международной конференции, Москва, КМК, 2004. - 609.
- 26 Чувакова З.К., Икранбегийн Р., Глебова Т.И. и др. Грипп у тюленей: Обзор информации и результаты экспедиций на Северный Каспий в связи массовой гибелью тюленей в 2000 г., Изв. НАН РК. Сер. биол. и мед., 2001, 3. 47-54
- 27 Бекмагамбетова А.Ж., Икранбегийн Р., Глебова Т.И. Иммуноферментная диагностика бинарной миксовирусной инфекции во время массовой гибели тюленей на Северном Каспии летом 2000 г. В сб.: 1 Междунар. науч. конф. молодых ученых и студентов, посвященная 10-летию независимости Республики Казахстан «Актуальные вопросы современной биологии и биотехнологии», Алматы, 2001, 159-161.
- 28 Gulyaeva M., Sobolev I., Sharshov K., Kurskaya O., Alekseev A., Shestopalova L., Kovner A., Bi Y., Shi W., Shchelkanov M., Shestopalov A. Characterization of Avian-like Influenza A (H4N6) Virus Isolated from Caspian Seal in 2012. *Virologica Sinica*, 2018, 33(5), 449-452. doi: 10.1007/s12250-018-0053-y. Epub 2018 Oct 17.
- 29 Шестопалов А.М., Алексеев А.Ю. Розанова Е.И., Абрамов А.В. Вирусы гриппа у морских млекопитающих. В сб.: Морские млекопитающие Голарктики: сборник научных трудов по материалам VII международной, Калининград: Капрос, 2010, 654.
- 30 Harkonen T, Backlin BM, Barrett T, et al. Mass mortality in harbor seals and harbor porpoises caused by an unknown pathogen. *VetRec.*, 2008, 162, 555-556. PMID: 18441352
- 31 White V.C. A Review of Influenza Viruses in Seals and the Implications for Public Health, *US Army Med Dep J.*, 2013, Jan-Mar, 45-50. PMID:23277445
- 32 Zohari S, Neimanis A, Härkönen T, Moraeus C, Valarcher JF. Avian influenza A(H10N7) virus involvement in mass mortality of harbour seals (*Phoca vitulina*) in Sweden, March through October 2014. *Euro Surveill*, 2014;19(46):pii=20967.
- 33 Krog JS, M Hansen MS, Holm E, Hjulsgaard CK, Chriél M, Pedersen K, Andresen LO, Abildstrøm M, Jensen TH, Larsen LE. Influenza A(H10N7) virus in dead harbor seals Denmark. *Emerg Infect Dis.*, 2015, 21(4), 684-7. doi: 10.3201/eid2104.141484.
- 34 Venkatesh D, Bianco C, Núñez A, Collins R, Thorpe D, Reid SM, Brookes SM, Essen S, McGinn N, Seekings J, Cooper J, Brown IH, Lewis NS. Detection of H3N8 influenza A virus with multiple mammalian-adaptive mutations in a rescued Grey seal (*Halichoerus grypus*) pup. *Virus Evol.*, 2020, 18;6(1), 016. doi: 10.1093/ve/veaa016.
- 35 Floyd T, Banyard AC, Lean FZX, Byrne AMP, Fullick E, Whittard E, Mollett BC, Bexton S, Swinson V, Macrelli M, Lewis NS, Reid SM, Núñez A, Duff JP, Hansen R and Brown IH. 2021. Systemic infection with highly pathogenic H5N8 of avian origin produces encephalitis and mortality in wild mammals at a UK rehabilitation centre. *bioRxiv*, 2021.2005.2026.445666. 10.1101/2021.05.26.445666
- 36 UK Health Security Agency. Influenza of avian origin in UK seal populations: qualitative assessment of the risk to the UK human population. Published 19 July 2022 <https://www.gov.uk/government/publications/avian-influenza-in-uk-seal-populations-hairs-risk-assessment/influenza-of-avian-origin-in-uk-seal-populations-qualitative-assessment-of-the-risk-to-the-uk-human-population#ENREF9>
- 37 Shin DL, Siebert U, Lakemeyer J, Grilo M, Pawliczka I, Wu NH, Valentin-Weigand P, Haas L, Herrler G. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus in Gray Seals, Baltic Sea. *Emerg Infect Dis*, 2019, 25(12), 2295-2298. doi: 10.3201/eid2512.181472.
- 38 NOAA Fisheries. Recent Increase in Seal Deaths in Maine Linked to Avian Flu 2022
- 39 Smith AW, Skilling DE, Castello JD, Rogers SO. Ice as a reservoir for pathogenic human viruses: specifically, caliciviruses, influenza viruses, and enteroviruses. *Med Hypotheses*, 2004, 63, 560-566. PMID: 15324997

- 40 Faust C, Stallknecht D, Swayne D, Brown J. Filter-feeding bivalves can remove avian influenza viruses from water and reduce infectivity. *Proc Biol Sci.*, 2009, 276, 3727-3735. PMID: 19656788
- 41 Reperant L.A, Rimmelzwaan G.F., Kuiken T. Avian influenza viruses in mammals. *Rev Sci* 2009, 28 (1), 137-159. PMID:19618623
- 42 Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, et al. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (5), 699. PMID:15890122
- 43 Matrosovich, M., N. Zhou, Y. Kawaoka, R. Webster. 1999. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol.*, 1999, 73(2), 1146-1155. PMID:9882316
- 44 Ito T., Kawaoka Y., Noruma A., Otsuki K. Receptor specificity of influenza A viruses from sea mammals correlates with lung sialyloligosaccharides in these animals. *J. Vet. Med Sci.*- 1999, Aug. 61(8), 955-958. PMID:10487239
- 45 Ramis A.J., Debby van Riel, Marco W.G van de Bildt, Osterhaus A., Kuiken T. Influenza A and B Virus Attachment to Respiratory Tract in Marine Mammals. *Emerging Infectious Diseases*. 2012, 18, No. 5, May. 817-820. PMID:22516350
- 46 Osterhaus A.D.M.E., Rimmelzwaan G.F., Martina, B.E.E. et al. Influenza B virus in seals. *Science*, 2000, 288, 1051-1053. PMID:10807575
- 47 Blanc A, Ruchansky D, Clara M, Achaval F, Le Bas A, Arbiza J. Serologic evidence of influenza A and B viruses in South American fur seals (*Arctocephalus australis*). *J Wildl Dis.*, 2009, 45, 519-21. PMID:19395764
- 48 Bodewes R., Morick D., de Mutsert Gerrie, Osinga N., Bestebroer T. et al. Recurring Influenza B Virus Infections in Seals. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19, No. 3, 511-512. PMID:23750359.
- 49 Bodewes R, van de Bildt MW, van Elk CE. et al. No serological evidence that harbour porpoises are additional hosts of influenza B viruses. *PLoS One.*, 2014, Feb 13;9(2):e89058. doi: 10.1371/journal.pone.0089058. eCollection 2014. PMID:24551217.

А.И. ҚЫДЫРМАНОВ^{1*}, Қ.О. КАРАМЕНДИН¹, Т.Б. САБЫРЖАН¹, С. ГУДМАН²

¹ Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан;

² Жалпы және салыстырмалы биология институты, Лидс университеті, Лидс, Ұлыбритания;

*e-mail: kydyrmanov@yandex.kz

ТЕҢІЗ СҮТҚОРЕКТІЛЕРІНДЕГІ ТҰМАУ ВИРУСТАРЫ

Түйін

Шолулық мақалада теңіз сүтқоректілері арасында А және В тұмау вирустары туғызған індеттер жайында деректер келтірілген. Бұл жануарлардың тұмау қоздырғыштарының экологиясы мен эволюциясындағы рөлі талқыланады. Доңыз тұмауының А (H1N1) пандемиялық вирусының және құс тұмауының H5N1 және H5N8 зардапты нұсқаларының айналымына теңіз сүтқоректілерінің қатысу жағдайлары сипатталған. Тұмау вирустарының кең ауқымы итбалықтарға алдын-ала бейімделмей-ақ тікелей жұғу мүмкіндігі жайында пікір айтылған. Шығу тегі әртүрлі тұмау вирустарының теңіз сүтқоректілерінің респираторлық ағза эпителийі торшаларымен байланысу сипаты мен қарқыны жануарлардың инфекцияға бейімталдығының, ауру өршуі мен зардаптану ерекшеліктерінің шешуші факторы екендігі аталған. Сондай-ақ теңіз ескекаяқтылары В тұмауы вирусының табиғаттағы қоры деген тұжырым жасалған. Каспий теңізінің қазақстандық бөлігіндегі итбалықтар арасындағы тұмау вирустарының айналымына кешенді экологиялық-вирусологиялық мониторинг жүргізу қажеттілігі туралы ой қортылған.

Кілтті сөздер: тұмау вирусы, мониторинг, індет, серология, итбалық, ескекаяқтылар, киттәрізділер, теңіз сүтқоректілері, каспий итбалығы.

A.I. KYDYRMANOV^{1*}, K.O. KARAMENDIN¹, T.B. SABYRZHAN¹, S. GOODMAN²

¹ Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan;

² Institute of General and Comparative Biology, University of Leeds, Leeds, UK;

*e-mail: kydyrmanov@yandex.kz

INFLUENZA VIRUSES IN MARINE MAMMALS

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.02

Abstract

The review presents information about epizootic infections among marine mammals induced by A and B influenza viruses. The role of these animals in the ecology and evolution of the pathogen is discussed. Cases of involvement of marine mammals in the circulation of swine pandemic influenza A (H1N1) virus and highly pathogenic variants of H5N1 and H5N8 avian influenza viruses are described. It is suggested that seals can be infected with a wide range of influenza viruses by direct transmission without prior adaptation. It was noted that the nature and intensity of binding of influenza viruses of various origins to the epithelial cells of the respiratory organs of marine mammals is a determining factor in their susceptibility to infection, as well as its productivity and pathogenesis features. The position that marine pinnipeds can serve as one of the reservoirs of human influenza B virus in nature is emphasized. It is concluded that conducting a comprehensive environmental and virological monitoring of influenza viruses circulating in seal populations in the Kazakhstan waters of the Caspian Sea is necessary.

Keywords: influenza virus, epizootics, serology, seal, pinnipeds, marine mammals, Caspian seal.

Monitoring the condition of marine mammal populations is one of the essential scientific directions in ecology. Of particular relevance are studies of animals with frequent and prolonged contact with humans. According to NOAA's National Marine Fisheries Service [1], during the period from 1991 to 2007, 15% of marine mammals died from infectious diseases, 29% - from poisoning by biotoxins, 7% - from ecological factors, 5% - from human impact and 44% - from other unknown factors.

In the absence of direct stressors, a significant impact on the number of marine mammals has infectious disease agents (viruses, bacteria) and parasites of almost all known families.

Viruses play a significant role in regulating the population dynamics of wildlife populations, limiting their increase and enhancing selection at the genetic level. The effects of viruses are even more important for populations endangered or fragmented by human activities. Influenza viruses and morbilliviruses have a direct impact on animal populations.

The influenza virus (IV) is periodically able to cross the interspecies barrier due to a mutation in one of the polymerase genes that increases the level of variability of the pathogen. As a result, a much larger number of its variants emerge, which creates better conditions for adaptation in the organisms of different species of animals and birds [2, 3].

The circulation and interrelationship of influenza pathogens in different host species, including overcoming the interspecies barrier, is a fundamental area of scientific inquiry necessary for understanding the mechanisms of mass infection in humans and animals.

The spread of influenza A viruses (IAV) among marine mammals is related to the ecology of these animals and close contact with the avian reservoir of the pathogen.

The proposed review provides information about epizootics among marine mammals caused by influenza A and B viruses. It discusses the role of these animals in the ecology and evolution of the pathogens.

Influenza A virus in marine mammals

IAV are isolated from a wide range of hosts, including 105 wild and domestic birds and various mammal species (human, pig, horse, marine mammals, mink, cat, etc.) [4]. Wild birds

belonging to the *Anseriformes* (ducks, geese, swans) and *Charadriiformes* (shorebirds, gulls) form a natural reservoir of IAV in nature, from which transmission to other hosts can occur.

The first information about the possibility of seals being infected with IAV was obtained during a severe epizootic on the New England coast between December 1979 and October 1980. As a result, about 600 mammals died, and the influenza A/seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) virus was isolated from one of them [5]. Genetic characterisation of the virus showed that all its RNA segments closely resemble those of avian strains. The second epizootic among seals with pronounced clinical manifestations of pneumonia occurred on the coast of New England from June 1982-August 1983 and was associated with IAV (H4N5) [6].

J.R Geraci et al. [4] reported that the infection in seals was severe: in well body condition animals, there was conjunctivitis, frothy-bloody discharge from the nostrils, weakness, muscular tremors, impaired coordination of movement and breathing. Swelling of the neck as a result of air infiltration into the fasciae and muscles from the respiratory tract was noted in sick animals. Animals lost their ability to swim or dive, forcing them to drift along the sea current or wind direction. Died seals had pneumonia characterised by necrotising bronchitis, bronchiolitis, and hemorrhagic alveolitis.

No systematic examination of seals for IAV has been conducted on the New England coast since these epizootics were described. From January 1991 to February 1992, five strains of IAV was isolated from mammals that died of pneumonia on Cape Cod, Massachusetts, two of which were identified as A (H4N6) and three as A (H3N3). The hemagglutinin (HA) genes of H3 isolates of A/seal/Massachusetts/3911/92 and A/seal/Massachusetts/3984/92 were 99.7% identical. Phylogenetic analysis demonstrated a close association of their sequences with those of HA H3 of avian virus A/Mallard/New York/6874/7, indicating a long circulation of the IV of this subtype in seal populations [7].

K. Ohishi et al. [8], in a study of blood sera of Caspian seals collected in 1993-2000, showed that the mammals were infected with epidemic A/Bangkok/1/79-like IV circulating among humans in 1979-1981. Antibodies to the H3N2 virus were also found in the sera of Baikal (*Phoca sibirica*) and ringed seals (*Phoca hispida*) of the Kara Sea [9]. Serological study of the Kuril subspecies of harbour seals (*Phoca vitulina stejnegeri*) on Hokkaido Island revealed anti-HAs to IV with HA subtypes H3 and H6, which indicates the ability of the latter variant to infect mammals [10]. Indirect serological evidence of IAV circulation in populations of marine mammals (ringed seals, beluga whales - *Delphinapterus leucas*) of the Barents Sea (harp seals - *Phoca groenlandica* and hooded seals - *Cystophora cristata*) of Arctic Canada, Northern and Bering Seas (seals and fur seals) was also obtained [11-12]. De Boer et al. [13] detected the presence of antibodies to viruses with HA subtypes: H1, H3, H4, H7, and H12 in sera of seals caught in the Bering Sea. At the same time, sera of sea lions (*Eumetopias jubatus*) positive for IAV in NP-ELISA were negative in the hemagglutination inhibition test (HI), which allowed to assume the possible presence of antibodies to previously unknown subtypes of HAs of influenza A viruses in the sera of these animals. In 2008 P. Calle et al. [14] found no antibodies to the IV in the sera of the bearded seals (*Erignathus barbatus*) on the coast of Alaska. Still, they detected their presence against HA H10 and neuraminidases N2, N3, N5, and N7 in 21% of sera from 38 samples of walrus (*Odobenus rosmarus*) studied [15]. IAV (H3N8) was isolated from harp seals while monitoring marine vertebrates' zoonoses in the Northwest Atlantic's coastal waters [16].

IAV (H1N3) was isolated by D.K. Lvov et al. [17] from a minke whale (*Balaenoptera acutorostrata*) in the South Pacific in 1975-1976. From toothed whales (pilot whale - *Globicephala melas*), V. Hinshaw et al. [18] isolated IV H13N9 and H13N2 genetically similar to the H13 viruses circulating among gulls. It is unknown whether these viruses caused disease in the whales or common opportunistic infection. Evidence indicating that viruses with this HA subtype were transmitted from one animal to another has not been obtained. A comparison of their complete genomes with the nucleotide sequences of influenza H13 viruses from water birds and influenza viruses from marine mammals revealed a rare constellation of genotypes from

gulls, terns, and waders [19]. As phylogenetic studies show, IV isolated from marine mammals originated from precursors adapted to *Anseriformes*. In this regard, the authors believe that strain A/whale/Main/328B/1984 is the only gull influenza virus that causes infection in marine mammals.

In 2010, virological monitoring of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) on the coast of California revealed individuals infected with IAV. Nasal swabs of two adult females out of 42 animals were positive for the IAV M gene by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) [20]. Subsequently, the viruses were isolated from developing chicken embryos, their complete genome was sequenced, and the isolates were determined to be IAV (H1N1) by the hemagglutination inhibition test (HI). Genome sequencing of an influenza virus isolated from a northern elephant seal showed more than 99% homology with the pandemic swine influenza virus prototype A/California/04/2009 (H1N1), which had been circulating among humans since 2009.

The circulation of IAV (H1N1) among elephant seals was additionally confirmed by analysis of more than 300 sera of these animals. In samples collected before April 2010, there were no antibodies to the H1N1 virus; seropositive individuals were detected only after the appearance of the pandemic «swine» IV in circulation [21]. The nature of replication of the A/Elephant seal/California/1/2010 (H1N1) virus in human respiratory epithelial cells suggested their adaptation to marine elephants. The involvement of marine mammals in the circulation of the pandemic H1N1 virus suggests cross-species transmission of epidemic variants from humans back to wildlife.

In autumn 2011, 162 seals in New England (Massachusetts, USA) died of pneumonia caused by IV H3N8, similar to the waterfowl viruses circulating in North America since 2002. The virus had a mutation in the PB2 gene characteristic of the highly pathogenic human variant H5N1, indicating its ability to transmit interspecies and adapt to mammals [21].

There are several reports on virological monitoring of IAV circulation in marine mammal populations of coastal waters of Northern Eurasia. Therefore, between 1976 and 1999. S. Yamnikova et al. [22], while monitoring the circulation of IAV in wild bird populations of the Northern Caspian Sea, examined samples from 152 individuals of Caspian seal (*Pusa caspica*). Still, they were unable to find infected animals. Later, examination of blood sera of Caspian seals collected in 1993-2000 showed that the mammals were infected with epidemic A/Bangkok/1/79-like viruses circulating among humans in 1979-1981. [23].

Later, A. Shestopalov et al. [24,25] and Z. Chuvakova et al. [26, 27] reported the isolation of IAV (H7N7) from materials collected from affected Caspian seals during morbillivirus epizootics in April-June 2000-2002. However, in the references, there are no data on the phylogenetic or pathobiological properties of the epizootic strain of IAV (H7N7).

In 2002 and 2012, IAV (H4N6) were isolated from Caspian seals in Russian waters [28]. This seal isolate was closely related to avian IV of the classical Eurasian lineage.

From 2002-2010. A. Shestopalov et al. [29] conducted serological studies of sera from 298 cetaceans (*Tursiops truncatus* and beluga whales) of the Black Sea and Sea of Okhotsk on the presence of antibodies to IV in HI test using as antigens viruses (H1, H2, H4, H7 and H13) that had been isolated or diagnosed in marine mammals previously. Antibodies to these IV subtypes were not detected in any of the animals tested.

T. Harkonen et al. [30] 2007 investigated the epizootic among seals on the Danish islands. Anholt and along the coast of Sweden, where several thousand animals died. Weakness, swelling, emphysematous neck, difficulties in breathing and coughing up blood were observed in the affected individuals. Autopsy of dead seals revealed interstitial pneumonia, necrotising tracheitis and bronchitis. The stranded harbor porpoise carcasses with emphysematous manifestation were noted in the same regions. Based on the negative results of bacteriological tests of materials from the corpses and PCR analysis, the authors [29] believe that another viral pathogen could be the etiological agent of infection in seals and harbor porpoises. V.C. White [31], discussing the possible involvement of the IV in the 2007 epizootic among pinnipeds and

cetaceans in Scandinavia, suggests that this rare outbreak could have resulted from the introduction of a new virus variant into the population of one of these species with the subsequent interspecies transmission.

Marine mammal epizootics induced by IAV were registered in European waters in 2014. IAV (H10N7) was isolated from dead harbor seals (*Phoca vitulina*) on the North Sea coast in Sweden, Denmark, Germany and the Netherlands [32-33], where over 1400 animals died.

In the United Kingdom, sporadic cases of IAV have been reported in seals, including subtypes A (H3N8) isolated from juvenile grey seals (*Halichoerus grypus*) in Cornwall in 2017 [34], and A (H5N8) from grey seals and two common seals (*Phoca vitulina*) in Norfolk in 2020 [35]. Due to the lack of routine surveillance of marine mammal populations in the UK impossible to determine whether these are random IV or endemic to the British seal population [36].

Highly pathogenic IAV (H5N8) was detected in lung samples of two gray seals stranded on the Baltic coast of Poland in 2016 and 2017. The isolated virus was assigned to clade 2.3.4.4 B, which is closely related to the avian variant H5N8 circulating in Europe at the time [37].

In July 2022, the U.S. Department of Agriculture's Animal and Plant Health Inspection Service confirmed that samples from four seals washed ashore in Maine tested positive for highly pathogenic avian IAV (H5N1) [38]. The detection of avian influenza virus subtypes and H5N1, and H5N8 in seals indicates an ongoing risk of epizootic disease in seals encountering highly pathogenic variants of avian influenza pathogens at crossings of flyways, seasonal pinniped migrations and human activities.

A review article by V.C. White [31] summarizes the data on the IV cycle in the food chain of habitants of aquatic environments. It is known that water is the main transmission factor of IV, where they remain viable for several months. Viruses persist for a long time in the ice of water bodies and are also concentrated in filtering invertebrates [39, 40]. Fish can feed on bottom sediments, bird droppings, and detritus that contain large amounts of IV. In turn, fish and invertebrates contaminated with IV become food for fish-eating birds and seals [41]. In the alimentary route of infection, viruses entering the gastrointestinal tract of carnivores can enter the liver through the portal vein [34, 42].

IV has only one cluster of specific receptors on the cell surface. Their structure depends on the species and tissue origin, which determine the possibilities of interspecies transmission of influenza pathogens [43]. Different HA subtypes differ in their ability to recognize and bind sialic acid, which is coupled to galactose in the cell membrane oligosaccharide. The HA of human IV binds to sialic acid residues at the 2'-6' bond position, while the HA of avian viruses binds to 2'-3' bonds. The receptor specificity of HAs of influenza A viruses isolated from marine mammals with the sialooligosaccharides SA α 2,3Gal found in the lung epithelium of seals and whales [44]. This indicates the possibility of direct transmission of avian IV to marine mammals. In contrast to birds, seals have sialooligosaccharide receptors SA α 2,3Gal located in the lungs rather than the intestinal tract, which makes them more vulnerable to the airborne route of infection. [37, 45]

The study of the nature and intensity of binding of IV of different hosts to the cells of the respiratory organ epithelium of marine mammals is a determinant of their susceptibility to infection, as well as its productivity and pathogenesis features. In a histochemical analysis, A.J. Ramis et al. [38] found that waterfowl IV isolates similar to epizootic strains of pinnipeds (H4N5, H7N7) moderately bound to the receptors of the tracheal and bronchial epithelium of harbor and grey seals and partially interact with those of cetaceans (porpoise - *Phocoena phocoena*, Bottlenose dolphin). At the same time, alveolar epithelial cells of all four animal species showed only partial affinity to them. Based on the above data, it is suggested that a wide variety of avian IV can infect seals by direct transmission without prior adaptation.

In the previous work [38], it was shown that human pandemic (H1N1pdm) and seasonal (H3N2) IV taken in experiments weakly bound to the cells of the cetacean tracheobronchial epithelium and did not attach to such in seals. In their opinion, this fact proves the absence of

outbreaks of influenza infections in seals caused by human viruses. Nevertheless, in the literature, there are data on the disease of free-living Californian elephant seals with pandemic "swine" influenza (H1N1pdm) [21], and serological data on the infection of Caspian seals with A/Bangkok/1/79 (H3N2)-like epidemic viruses [8].

The detection of some subtypes of IAV in seal populations indicates that these animals are able to participate in the processes of genetic reassortment between IV of different origins, but they do not play a significant role in the ecology and evolution of the pathogen.

Influenza B virus in seals

Until 1999, the influenza B virus (IBV) was considered an exclusively human pathogen. However, more recently, it has been shown that harbor seals and harbor seals can be infected with this virus [46]. IBV was isolated from juvenile harbor seals with signs of respiratory disease and infected in vitro seal kidney cell culture. Since the establishment of marine mammals as new hosts, there have been several reports of detection of antibodies to IBV in some species of *Otarid* and *Phocid* seals. Based on these findings, it has been hypothesized that seals could serve as one of the reservoirs of the human influenza B virus [7, 47].

In order to determine whether IBV can circulate among seals a research group from Erasmus Medical Center (Rotterdam, The Netherlands) has analyzed 615 serum samples from pinnipeds (548 from harbor seals and 67 from grey seals) collected from the coast of the Netherlands and taken to the Seal Rehabilitation Center in Peterburen in 2002-2012. As a result, no specific antibodies to IBV were detected in samples collected from seals between 2002 and 2009 and after 2011. However, ten of the 170 sera collected in 2010-2011 showed antibodies to B/Yamanashi/166/98 in high titers by HI. In the same sera, anti-HAs to the prototype virus B/Seal/Netherlands/1/99 isolated from seals in Dutch coastal waters were detected in low titers [48]. The authors believe that the seals were infected with a virus similar to B/Yamanashi/166/98, which is antigenically different from B/Seal/Netherlands/1/99. It should be noted that no antibodies to IBV were detected in 79 porpoise sera collected between 2003 and 2013 in the same Dutch waters as seropositive sera from seals [49].

In our studies, the infection of Caspian seals with IBV was confirmed by serological analysis. The highest antibody titers were detected against the influenza B/Almaty/8/18 strain of B/Victoria viruses; somewhat lower antibody titers were detected against the B/Florida/4/2006 strain of B/Yamagata-like viruses. Antibodies in high titers were detected in serum samples of subadult seals, indicating the most recent infection of these animals with influenza B.

The analysis of literature data indicates that marine mammals are infected with various subtypes of influenza A virus. IAV with the antigenic formulas H1N1, H3N3, H3N8, H4N5, H4N6, H5N1, H5N8, H7N7, H10N7 have been isolated from pinnipeds to date and H1N3, H13N2, H13N9 from cetaceans. Single studies have shown possible circulation of IAV (H3N2), A (H4N6) and IBV among Caspian seals.

In this connection, it seems important to conduct complex ecological and virological monitoring of IV circulating among the Caspian seals being one of the possible reservoirs in nature where reassortation of avian IV' genes with the appearance of new variants of pathogens adapted to mammals and people can take place.

Funding

The research is funded by the Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (grant № AR08856073 "Research of viral metapopulation of the Caspian seal for early detection of pathogens of new and reemerging infections").

References:

- 1 <http://www.nmfs.noaa.gov/pr/health>
- 2 Furió V1, Moya A, Sanjuán R. The cost of replication fidelity in an RNA virus. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, Jul 19; 102(29), 10233-7. PMID:16006529

- 3 Steinhauer DA, Domingo E, Holland JJ. Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, 1992, Dec 15, 122(2), P.281-288. PMID:1336756
- 4 Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD, Fouchier R. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, 2006, 312, 384-388. PMID:17500589
- 5 Geraci J.R, St Aubin D.J, Barker I.K, et al. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science*, 1982, 215, 1129-1131. PMID:7063847
- 6 Hinshaw V. S., Bean W. J., Webster R. G. et al. Are seals frequently infected with avian influenza viruses. *J. Virol*, 1984, 51, 863-865. PMID:3701925
- 7 Callan R.G., Early C., Rida H., Hinshaw V.S. The appearance of H3 influenza viruses in seals. *J. Gen. Virol*, 1995, 76 (Part 1), P. 199-203. PMID:7844533
- 8 Ohishi K., Ninomiya A., Kida H. et al. Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiol Immunol*, 2002, 46(9), P. 639-44. PMID:12437032
- 9 Ohishi K, Kishida N, Ninomiya A, et al. Antibodies to human-related H3 influenza A virus in baikal seals (*Phoca sibirica*) and ringed seals (*Phoca hispida*) in Russia. *Microbiol Immunol*, 2004, 48(II), 905-909. PMID:15557750
- 10 Fuji K., Kakumoto Ch., Kobayashi M. et al. Serological evidence of Influenza A virus infection in Kuril harbour seals (*Phoca vitulina stejnegeri*) of Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med Sci*, 2007. Aug., 69 (3), 259-263. PMID:17409641
- 11 Nielsen O., Clavijo A., Boughen J.A. Serologic Evidence of Influenza A Infection in Marine Mammals of Arctic Canada, *J Wildl Dis.*, 2001, 37(4), 820–825. PMID:11763748
- 12 Kozyreva M.V., Sokolova O.V., Jurov G.K., Alekseenkova S.V. Burkanov V.N., Jurov K.P. Vyjavlenie specificheskikh antitel k rjadu virusov mlekopitajushhih u sivucha (*Eumetopias jubatus*) Kuril'skikh ostrovov. V sb.: Morskie mlekopitajushhie Golarktiki: sbornik nauchnyh trudov po materialam V mezhdunarodnoj konferencii, Odessa, 2008, –628.
- 13 De Boer GF, Back W, Osterhaus ADME. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. *Arch Virol*, 1990, Vol.115, 47-61. PMID:2174233
- 14 Calle PP, Seagars DJ, McClave C, Senne D, House C, House JA. Viral and bacterial serology of six free-ranging bearded seals *Erignathus barbatus*. *Dis Aquat Organ*, 2008, 81, 77-80. PMID:18828565.
- 15 Calle PP, Seagars DJ, McClave C, Senne D., House C., House J.A. Viral and bacterial serology of free-ranging Pacific walrus. *J Wildl Dis.*, 2002, 38, 93-100. PMID:11838234.
- 16 Bogomolni AL, Gast RJ, Ellis JC, Dennett M, Pugliares KR, Lentell BJ, Moore MJ. Victims or vectors: a survey of marine vertebrate zoonoses from coastal waters of the Northwest Atlantic. *Dis Aquat Organ*, 2008 Aug 19;81(1), 13-38. doi: 10.3354/dao01936. PMID:18828560
- 17 Lvov D.K., Zhdanov V.M., Sazonov A.A. et al. Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales. *Bull. WHO*, 1978, 56, 923-930. PMID:310734
- 18 Hinshaw V.S., Bean W.J., Geraci J.R. Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. *J Virol*, 1986, 58, 655-656. PMID:3701925
- 19 Groth M., Lange J., Kanrai P., Pleschka S., Scholtissek C., Krumbholz A., Platzer M., Sauerbrei A., Zell R.. The genome of an influenza virus from a pilot whale: Relation to influenza viruses of gulls and marine mammals. *Infect Genet Evol*, 2014, 24, 183-186. doi: 10.1016/j.meegid.2014.03.026.
- 20 Goldstein T., Mena I., Anthony SJ. et al. Pandemic H1N1 Influenza Isolated from Free-Ranging Northern Elephant Seals in 2010 off the Central California Coast. *PLoS ONE*, 2013, 8(5): e62259. doi:10.1371/journal.pone.0062259
- 21 Anthony S.J, et al. Emergence of fatal avian influenza in New England harbor seals. *mBio*, 2012, № 3(4):e00166-12. doi:10.1128/mBio.00166-12.
- 22 Jamnikova S.S., Gambarjan A.S., Fedjakina I.T. i dr. Monitoring za cirkulacijej virusov grippa A v populacijah dikih ptic Severnogo Kaspija. *Vopr. Virusol*, 2001, 4, 39-43.
- 23 Ohishi K., Ninomiya A., Kida H., Park C., Maruyama T., Arai T., Katsumata E., Tobayama T., Boltunov A., Khuraskin L., Miyazaki N. Serological evidence of transmission of human influenza A and B viruses to Caspian seals (*Phoca caspica*). *Microbiology and Immunology*, 2002, 46(9), 639-44. PMID:12437032.
- 24 Shestopalov A.M., Beklemishev A.B., Huras'kin L.S. i dr. Para- i ortomiksovirusy u kaspijskikh tjulenej. V sb.: Morskie mlekopitajushhie Golarktiki: sbornik nauchnyh trudov po materialam II mezhdunarodnoj konferencii, Moskva: KMK, 2002, 294.

25 Durymanova A.A., Belikov S.I., Zolotyh S.I. i dr. Monitoring infekcionnyh zabolevanij kaspijskih tjulenij (*Phoca caspica*). V sb.: Morskije mlekopitajushhie Golarkтики: sbornik nauchnyh trudov po materialam III mezhdunarodnoj konferencii, Moskva, KMK, 2004. - 609.

26 Chuvakova Z.K., Ikranbegijn R., Glebova T.I. i dr. Gripp u tjulenej: Obzor informacii i rezul'taty jekspedicii na Severnyj Kaspij v svjazi massovoj gibel'ju tjulenej v 2000 g., Izv. NAN RK. Ser. biol. i med., 2001, 3. 47-54

27 Bekmagambetova A.Zh., Ikranbegijn R., Glebova T.I. Immunofermentnaja diagnostika binarnoj miksovirusnoj infekcii vo vremja massovoj gibeli tjulenej na Severnom Kaspii letom 2000 g. V sb.: 1 Mezhdunar. nauch. konf. molodyh uchenykh i studentov, posvjashhennaja 10-letiju nezavisimosti Respubliki Kazahstan «Aktual'nye voprosy sovremennoj biologii i biotehnologii», Almaty, 2001, 159-161.

28 Gulyaeva M., Sobolev I., Sharshov K., Kurskaya O., Alekseev A., Shestopalova L., Kovner A., Bi Y., Shi W., Shchelkanov M., Shestopalov A. Characterization of Avian-like Influenza A (H4N6) Virus Isolated from Caspian Seal in 2012. *Virologica Sinica*, 2018, 33(5), 449-452. doi: 10.1007/s12250-018-0053-y. Epub 2018 Oct 17.

29 Shestopalov A.M., Alekseev A.Ju. Rozanova E.I., Abramov A.V. Virussy grippa u morskih mlekopitajushhih. V cb.: Morskije mlekopitajushhie Golarkтики: sbornik nauchnyh trudov po materialam VII mezhdunarodnoj, Kaliningrad: Kappoc, 2010, 654.

30 Harkonen T, Backlin BM, Barrett T, et al. Mass mortality in harbor seals and harbor porpoises caused by an unknown pathogen. *VetRec.*, 2008, 162, 555-556. PMID: 18441352

31 White V.C. A Review of Influenza Viruses in Seals and the Implications for Public Health, US Army Med Dep J., 2013, Jan-Mar, 45-50. PMID:23277445

32 Zohari S, Neimanis A, Härkönen T, Moraeus C, Valarcher JF. Avian influenza A(H10N7) virus involvement in mass mortality of harbour seals (*Phoca vitulina*) in Sweden, March through October 2014. *Euro Surveill*, 2014;19(46):pii=20967.

33 Krog JS, M Hansen MS, Holm E, Hjulsager CK, Chriél M, Pedersen K, Andresen LO, Abildstrøm M, Jensen TH, Larsen LE. Influenza A(H10N7) virus in dead harbor seals Denmark. *Emerg Infect Dis.*, 2015, 21(4), 684-7. doi: 10.3201/eid2104.141484.

34 Venkatesh D, Bianco C, Núñez A, Collins R, Thorpe D, Reid SM, Brookes SM, Essen S, McGinn N, Seekings J, Cooper J, Brown IH, Lewis NS. Detection of H3N8 influenza A virus with multiple mammalian-adaptive mutations in a rescued Grey seal (*Halichoerus grypus*) pup. *Virus Evol.*, 2020, 18;6(1), 016. doi: 10.1093/ve/veaa016.

35 Floyd T, Banyard AC, Lean FZX, Byrne AMP, Fullick E, Whittard E, Mollett BC, Bexton S, Swinson V, Macrelli M, Lewis NS, Reid SM, Núñez A, Duff JP, Hansen R and Brown IH. 2021. Systemic infection with highly pathogenic H5N8 of avian origin produces encephalitis and mortality in wild mammals at a UK rehabilitation centre. *bioRxiv*, 2021.2005.2026.445666. 10.1101/2021.05.26.445666

36 UK Health Security Agency. Influenza of avian origin in UK seal populations: qualitative assessment of the risk to the UK human population. Published 19 July 2022 <https://www.gov.uk/government/publications/avian-influenza-in-uk-seal-populations-hairs-risk-assessment/influenza-of-avian-origin-in-uk-seal-populations-qualitative-assessment-of-the-risk-to-the-uk-human-population#ENREF9>

37 Shin DL, Siebert U, Lakemeyer J, Grilo M, Pawliczka I, Wu NH, Valentin-Weigand P, Haas L, Herrler G. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus in Gray Seals, Baltic Sea. *Emerg Infect Dis*, 2019, 25(12), 2295-2298. doi: 10.3201/eid2512.181472.

38 NOAA Fisheries. Recent Increase in Seal Deaths in Maine Linked to Avian Flu 2022

39 Smith AW, Skilling DE, Castello JD, Rogers SO. Ice as a reservoir for pathogenic human viruses: specifically, caliciviruses, influenza viruses, and enteroviruses. *Med Hypotheses*, 2004, 63, 560-566. PMID: 15324997

40 Faust C, Stallknecht D, Swayne D, Brown J. Filter-feeding bivalves can remove avian influenza viruses from water and reduce infectivity. *Proc Biol Sci.*, 2009, 276, 3727-3735. PMID: 19656788

41 Reperant L.A, Rimmelzwaan G.F., Kuiken T. Avian influenza viruses in mammals. *Rev Sci* 2009, 28 (1), 137-159. PMID:19618623

42 Thanawongnuwech R, Amonsin A, Tantilertcharoen R, et al. Probable tiger-to-tiger transmission of avian influenza H5N1. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (5), 699. PMID:15890122

43 Matrosovich, M., N. Zhou, Y. Kawaoka, R. Webster. 1999. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol.*, 1999, 1.73(2), 1146-1155. PMID:9882316

44 Ito T., Kawaoka Y., Noruma A., Otsuki K. Receptor specificity of influenza A viruses from sea mammals correlates with lung sialyloligosaccharides in these animals. *J. Vet. Med Sci.*- 1999, Aug. 61(8), 955-958. PMID:10487239

45 Ramis A.J., Debby van Riel, Marco W.G van de Bildt, Osterhaus A., Kuiken T. Influenza A and B Virus Attachment to Respiratory Tract in Marine Mammals. *Emerging Infectious Diseases*. 2012, 18, No. 5, May. 817-820. PMID:22516350

46 Osterhaus A.D.M.E., Rimmelzwaan G.F., Martina, B.E.E. et al. Influenza B virus in seals. *Science*, 2000, 288, 1051-1053. PMID:10807575

47 Blanc A, Ruchansky D, Clara M, Achaval F, Le Bas A, Arbiza J. Serologic evidence of influenza A and B viruses in South American fur seals (*Arctocephalus australis*). *J Wildl Dis.*, 2009, 45, 519-21. PMID:19395764

48 Bodewes R., Morick D., de Mutsert Gerrie, Osinga N., Bestebroer T. et al. Recurring Influenza B Virus Infections in Seals. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19, No. 3, 511-512. PMID:23750359.

40 Bodewes R, van de Bildt MW, van Elk CE. et al. No serological evidence that harbour porpoises are additional hosts of influenza B viruses. *PLoS One.*, 2014, Feb 13;9(2):e89058. doi: 10.1371/journal.pone.0089058. eCollection 2014. PMID:24551217.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

FTAMP: 62.13.63

К.Г. МУСТАФИН¹, Н.А. БИСЬКО², Ж.Б. НАРМУРАТОВА^{3*},
А.С. ЖАКИПБЕКОВА¹, Ж.К. САДУЕВА¹, А.К. КАЛИЕВА⁴,
Н.Н. АХМЕТСАДЫКОВ¹, Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА⁵

¹«Антиген» ғылыми-өндірістік кәсіпорны, Алматы, Қазақстан

²Н.Г. Холодный атындағы ботаника институты, Киев, Украина

³Қ. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық зерттеу университеті, Алматы
Қазақстан

⁴Қ. Жұбанов атындағы Ақтөбе өңірлік Университеті, Ақтөбе, Қазақстан

⁵Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы, Алматы,
Қазақстан

*e-mail: z.narmuratova@satbayev.university

ҚҰРАМЫНДА ПОЛИСАХАРИДІ ЖОҒАРЫ ДӘРІЛІК БАЗИДИОМИЦЕТТЕР ШТАММДАРЫНЫҢ СКРИНИНГІ

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.03

Түйін

Қазіргі уақытта жоғары базидиялы саңырауқұлақтар құнды тамақ өнімі ретінде ғана емес, сонымен қатар онкостатикалық, антивирустық, иммуномодуляциялық, анти-склеротикалық, тоникалық және басқа да табиғи фармакологиялық заттарды алудың маңызды көзі ретінде қарастырылады. Көптеген саңырауқұлақтардың биологиялық белсенділігі көбінесе көмірсулар табиғатының қосылыстарымен анықталады, олардың көпшілігі полисахаридтерден тұрады. Саңырауқұлақ полисахаридтері онкогенездің алдын алуға ықпал етеді, әртүрлі аллогенді және сингенді ісіктерге қарсы айқын ісікке қарсы белсенділікке ие және метастаздардың дамуына жол бермейді. Осы мақалада базидиялы саңырауқұлақтардың 17 түрінің 20 штаммына экзо - және эндополисахаридтердің биосинтезге қабілеттілігіне салыстырмалы сипаттамасы жүргізілді. Зерттеулер нәтижесінде эндополисахаридтердің ең көп мөлшері *Ganoderma* туысының өкілдерінде синтезделгені анықталды (олардың мөлшері 4,4% - дан 8% - ға дейін ауытқыды). Эндополисахаридтердің ең жоғары пайызы *Ganoderma lucidum* 1900 биомассасында болды. Экзополисахаридтердің ең көп мөлшерін (2,2 г/л) *Trametes versicolor* 353 штаммы синтездеді. Екі штамм да полисахаридтердің перспективалы продуценттері болып табылады.

Кілтгі сөздер: базидиомицеттер, эндополисахаридтер, экзополисахаридтер, терең өсіру

Қазіргі уақытта ағзаның әртүрлі функцияларын гомеостаз бен денсаулықты сақтауға белсенді қатысатын диеталық факторлар басқара алатындығы туралы көптеген дәлелдер бар. Тамақтану мен денсаулық/ауру арасындағы мүмкін байланыс туралы идеяларға сүйене отырып, "функционалды тамақтану" тұжырымдамасы пайда болды, оның парадигмасы-тағамды дәрі ретінде түсіну. Ғылымдағы осы бағыттың негізгі мақсаттары денсаулықты сақтау, гомеостазды қалыпқа келтіру және адамның тамақтануын бақылау арқылы аурумен күресу үшін жағдай жасау. Бұл медицина мен фармацевтика міндеттерінен түбегейлі ерекшеленеді – ауруды емдеу немесе басқару [1].

Бұл саладағы зерттеулер бір жағынан адам денсаулығына белгілі тағам өнімдерінің рөлін толық зерттеуге, ал екінші жағынан жаңа емдік тамақтану көздерін іздеуге бағытталады. Соңғы уақытта адам ағзасындағы физиологиялық функцияларды реттеу үшін қолдануға болатын тағамдық қоспалар мен емдік-профилактикалық препараттарды

жасауға көп көңіл бөлінді. Бұл бағыттағы перспективалы нысандар жоғары базидиялы саңырауқұлақтар болып табылады, өйткені олардың құрамында адам ағзасы үшін маңызы бар қажетті биологиялық белсенді заттардың ерекше кешені бар [2-5]. Атап айтқанда, олар ісікке қарсы және иммуномодуляциялық қасиеттері бар жаңа полисахаридтердің көзі болып табылады [6, 7]. Бұл саңырауқұлақтардың жемісті денесі әлемнің көптеген елдерінде өнеркәсіптік ауқымда өсіріледі және екі мың жылдан астам уақыт бойы қытай медицинасында кеңінен қолданылады [8]. Емдік қасиеттері бар жеуге жарамды саңырауқұлақтарға *Lentinus*, *Auricularia*, *Hericium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus*, *Tremella* және т.б. туыстарының түрлері жатады. Саңырауқұлақтардың дәрілік қасиеттерінің кең спектрі олардың құрамында биологиялық белсенді компоненттердің болуына байланысты [9-15]. Олардың арасында антиоксидантты, антиканцерогенді және иммуномодельдеуші әсері бар бірқатар дәрілік және емдік-профилактикалық препараттардың негізі болып табылатын жоғары молекулалық көмірсулар мен меланин ерекше рөл атқарады.

Көптеген саңырауқұлақтардың биологиялық белсенділігі көбінесе құрамы саңырауқұлақтардың құрғақ биомассасының 60% - на жететін көмірсулар табиғатының қосылыстарымен анықталады [16]. Олар бос және байланысқан қанттармен, сондай-ақ полисахаридтермен ұсынылған. Бұл заттар резервтік, осморегуляциялық, реттеуші және протекторлық функцияларды орындайды.

Өткен ғасырдың 70-ші жылдарының басында жапондық ғалымдар тобы кейбір базидиялы саңырауқұлақтардың жемісті денесінен оқшауланған полисахаридтердің онкостатикалық әсерін анықтап, осы қосылыстарды белсенді зерттеуге, сондай-ақ олардың продуценттерін іздестіруге көңіл бөлді [17].

Полисахаридтер – табиғатта кең таралған, құрылымы әртүрлі биологиялық макромолекулалардың тобы. Олар бір-бірімен гликозидтік байланыспен тізбектелген моносахаридтердің қалдықтарымен қайталанатын құрылымдық бірліктерден тұрады. Полисахаридтер ақуыздар мен нуклеин қышқылдарымен салыстырғанда биологиялық ақпаратты беруге қабілетті, өйткені олар құрылымдық өзгергіштіктің үлкен потенциалына ие. Саңырауқұлақ полисахаридтері онкогенездің алдын алуға ықпал етеді, әртүрлі аллогенді және сингенді ісіктерге қарсы айқын белсенділікке ие және метастаздардың дамуына жол бермейді. Полисахаридтер рак клеткаларына тікелей әсер етпейді, бірақ организмдегі әртүрлі иммундық реакцияларды белсендіреді.

Әр түрлі ісікке қарсы полисахаридтердің көрінісі Т жасушаларының прекурсорлары мен макрофагтардың ісік жасушаларын нақты танудан кейін лимфоциттер шығаратын цитокиндерге реакциясының артуының нәтижесі болып табылады. Молекулалық массасы төмен екінші реттік метаболиттер апоптоз, ангиогенез, метастаздардың дамуы, жасуша циклін реттеу және жасушадағы сигнал каскадтарының берілуі сияқты процестерге әсер етеді [18].

Қазіргі уақытта барлық саңырауқұлақ препараттарын 70% -80% жемісті денесінен, 20% -30% - саңырауқұлақ мицелийінің сығындылары мен дақылдық сұйықтықтан алады [19]. Соңғы кездері зерттеушілер тек жемісті денесінен ғана емес, сонымен қатар терең мицелий мен дақылдық сұйықтықтан алынған полисахаридтерге назар аударуда, алайда олар әлі де аз зерттелген [20, 21]. Сонымен қатар құрылымы мен қасиеттері бойынша олар жемісті денесінің полисахаридтерінен аз ерекшеленеді деп айтуға негіз бар. Сонымен бірге терең мицелийден жасушадан тыс полисахаридтер мен эндополисахаридтерді алудың технологиялық сызбасы оларды жемісті денесінен алуға қарағанда әлдеқайда оңай [21]. Осыған байланысты зерттеудің негізгі мақсаты эндо - және экзополисахаридтерін синтездеуші дәрілік базидиялы саңырауқұлақтарының - продуценттері штаммдарының скринингі болып табылады.

Материалдар мен әдістер.

Зерттеу нысаны ретінде Украина ҰҒА Н.Г. Холодный атындағы ботаника институтының қалпақты саңырауқұлақтар коллекциясынан 17 түрінен 20 штамм алынды: *Ganoderma applanatum* 1899, *G. carnosum* 2502, *G. lucidum* 1900, *G. lucidum* 1904, *G. oregonense* 2560, *G. resinaceum* 2477, *G. sinense* 2516, *G. tsugae* 1848, *G. tsugae* 2024, *G. tsugae* 2566, *Pholiota nameko* 2153, *P. adiposa* 22, *P. subochracea* 2535, *P. limonella* 2335, *P. alnicola* 2406, *P. squarrosa* 2010, *P. aurivella* 2605, *Lentinus tigrinus* 2478, *Trametes versicolor* 353, *Pleurotus osreatus* 548.

Эндополисахаридтер жоғарыда келтірілген штаммдарды жартылайсинтетикалық глюкоза-пептон-ашытқы (ГПА) ортасында, г/л: глюкоза – 30,0; пептон – 3,0; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.25; ашытқы экстракті – 3,0, терең дақылдау әдісімен өсіру арқылы мицелийінен бөлініп алынды.

Тәжірибелер зертханалық шайқағыштарға (180 айн/мин) 50 мл сұйық ортасы бар 250 мл Эрленмейер колбаларына қойылып, қараңғыда 14 күн ішінде жүргізілді. Өсіру температурасы 25-27°C болды. Инокулум колбалардағы ортаның жалпы көлемінің 10% мөлшерінде стерильді ортаға енгізілді.

Инокулум келесі жолмен алынды: ГПА-ның 2% агаризацияланған ортасында өсірілген 7 күндік дақыл гомогенизацияланды және стерильді ортаға енгізілді (көлемнің 10%). Инокулумді зертханалық шайқағыштарда (180 айн./мин.) 50 мл ортасы бар 250 мл Эрленмейер колбасында жеткілікті ұсақ дисперсті суспензия түзілгенше өсірілді және инокуляция үшін тәжірибиелік колбалар қолданылды. *G. applanatum* 1899, *G. lucidum* 1900, *G. lucidum* 1904 штаммдарының мицелийінен инокулумын алу үшін 4 тәулік; *G. tsugae* 1848, *G. tsugae* 2024, *G. tsugae* 2566, *G. carnosum* 2502, *G. resinaceum* 2477, *T. versicolor* 353, *Pleurotus osreatus* 548 штаммдары – 5 тәулік; *G. oregonense* 2560, *G. sinense* штаммдары 2516, *Lentinus tigrinus* 2478 – 7 тәулік; *Pholiota nameko* 2153 *P. subochracea* 2535, *P. limonella* 2335, *P. squarrosa* 2010, *P. aurivella* 1527 штаммдары – 9 тәулік; *P. adiposa* 22, *P. alnicola* 2406 штаммдары – 10 тәулік өсірілді.

Өсіруден кейін мицелий нейлон матасы арқылы дақылдық сұйықтықтан бөлініп, бірнеше рет калий-фосфат буферімен (рН 6,6) жуылады және тұрақты салмаққа дейін 60°C температурада кептіріледі. Алынған кептірілген биомасса бөлме температурасында қараңғы жерде, силикагельді жабық контейнерлерде 10 күннен асырылмай эндополисахаридтер алынғанға дейін сақталды. Терең мицелийден эндополисахаридтерді алу үшін ол гомогенизаторда бұзылды. Бұзылған мицелийге салмағы бойынша 1:10 қатынасында дистелденген су құйылып, су моншасында 18 сағат қайнатылды. Экстракция кептелген тығындары бар шыны түтіктерде жүргізілді. Цитоплазмалық құрамды алып тастау 15 минут ішінде 3000g кезінде центрифугалаумен дистилденген суда жойылған мицелийді бірнеше рет суспензиялау арқылы жүзеге асырылды. Жуу процедурасы супернатанттың оптикалық тығыздығы 280 нм-де 0,1-ден аспаған кезде ғана тоқтатылды [22].

Алынған сығындылар роторлы буландырғышта бастапқы көлемнің 1/3 дейін концентрленді. Алынған концентрат көлемі бойынша 1:1 қатынасында 96° этил спиртімен өңделді және эндополисахаридтері бар фракциялар толығымен тұндырылғанға дейін 4°C температурада қалдырылды. Түскен тұнба 3000 g режимінде центрифугалау арқылы 20 минут ішінде бөлінді. Тұндыру арқылы алынған құрамында эндополисахаридтері бар фракция төмен молекулалы қосылыстар қоспасынан дистилденген суға қарсы диализдің көмегімен 3 тәулік бойы тазартылды. Тазартудан кейін құрамында эндополисахаридтер бар фракция көлемі бойынша 1:2 қатынасында этил спиртімен өңделді, нәтижесінде пайда болған тұнба 3000 g режимінде 20 минут центрифугалау арқылы бөлінді.

Алынған преципитатты этанол, эфир, ацетонмен жуып, 37°C температурада кептірілді. Эндополисахаридтің гомогенділігі G-200 сефадексінде гельфилтрация көмегімен тексерілді, элюенттегі полисахаридті анықтау фенол-күкірт қышқылы әдісі

арқылы жүргізілді. Эндополисахаридтердің құрамы толығымен құрғақ биомасса (а.с.м.) % - бен есептелді.

Экзополисахаридтер жоғарыда аталған штаммдарды өсіру барысында алынған культуралдық сұйықтықтан эндополисахаридтердің құрамын зерттеу үшін қолданылған сол құрамдағы жартылай синтетикалық глюкоза-пептон-ашытқы ортасын (ГПД) қолдана отырып, терең өсіру әдісімен бөлініп алынды. Зерттелген штаммдардың мицелийін өсіргеннен кейін 20 минут ішінде 3000 g кезінде центрифугалау арқылы дақылдық сұйықтықтан бөлінді. Дақылдық сұйықтықтан экзополисахаридтерді алып тастамас бұрын, ол бастапқы көлемнің үштен біріне дейін буландырылды. Буландыру процедурасы айналмалы буландырғышта 50°C температурада жүргізілді. Буланған дақылдық сұйықтықтан экзополисахаридтерді тұндыру үшін ол 1:2 қатынасында 96° этил спиртімен араласып, экзополисахаридтері бар фракциялар толығымен тұндырылғанға дейін 4°C температурада қалдырылды.

Тұнба 3000 g режимінде центрифугалау арқылы 20 минут ішінде бөлінді. Тұндыру арқылы алынған құрамында экзополисахаридтер бар фракция төмен молекулалы қосылыстар қоспасынан дистилденген суға қарсы диализдің көмегімен 3 тәулік бойы тазартылды. Алынған преципитат этанолмен, эфирмен, ацетонмен жуылып, 37°C температурада кептірілді. Экзополисахаридтің гомогенділігі G-200 сефадексінде гельфльтрация көмегімен тексерілді, элюенттегі экзополисахаридтерді анықтау фенол-күкірт қышқылы әдісі арқылы жүргізілді. Экзополисахаридтердің құрамы дақылдық ортаның бір литріне есептелді.

Нәтижелер және оларды талқылау.

Базидиялы саңырауқұлақтардың көптеген биологиялық белсенді заттарды, соның ішінде экзополисахаридтерді синтездеу қабілеті бар, сондықтан организмдердің осы тобы биотехнологиялық зерттеулер үшін перспективті болып табылады.

Ұсынылған эксперименттік жұмыста экологиясы бойынша ағаш шірітетін сапротрофты саңырауқұлақтардың 5 туысына жататын базидиялы саңырауқұлақтардың 17 түрінің 20 штаммы зерттелді. Саңырауқұлақтардың бұл тобы көптеген биологиялық белсенді заттардың, соның ішінде эндополисахаридтердің болуына байланысты зерттеу қызығушылығын тудырады. Жемісті денесінен, мицелийден немесе осы саңырауқұлақтар тобының спораларынан оқшауланған эндополисахаридтердің көптеген дәрілік қасиеттері бар екендігі тәжірибе жүзінде дәлелденді.

Барлық сыналған штаммдар эндополисахаридтер синтезінің тиімділігі бойынша үлкен гетерогенділікті көрсетті (1-кесте). Бұл қосылыстардың ең көп саны *Ganoderma* туысының өкілдерінде синтезделді және олардың құрамы 4,4% - дан 8% - ға дейін өзгерді. Эндополисахаридтердің ең жоғары пайызы (8%) *G. Lucidum* 1900 биомассасында болды. Осы туыстың 4 түрінің төрт штаммында *G. lucidum* 1904, *G. oregonense* 2560, *G. sinense* 2516 және *G. tsugae* 2024 біршама аз мөлшерде эндополисахаридтер болды (7,0-7,7%).

Ganoderma тектес саңырауқұлақтардың мицелийіндегі полисахаридтердің ең аз мөлшері *G. tsugae* 2566 және *G. resinaceum* 2477 штамдарында болды – сәйкесінше 5,1% және 4,4%.

Осылайша, біз *Ganoderma lucidum* 1900 штаммын эндополисахаридтердің өндірушісі ретінде таңдадық. Сонымен, бүгінгі таңда *G. lucidum* жемісті денесінен және мицелийден оқшауланған және молекулалық салмағы 4×10^5 -тен 1×10^6 Дальтонға дейінгі эндополисахаридтердің 200-ден астам түрі анықталған, олардың көпшілігі антигуморлық қасиеттерін көрсеткен. Құрылымдық талдау көрсеткендей, *G. lucidum* эндополисахаридтері негізінен жоғары молекулалық салмағы бар гетерополимерлер болып табылады, олардың негізгі компоненті глюкоза, ал мөлшерде - ксилоза, манноза, галактоза және фруктоза.

G. lucidum-дан оқшауланған полисахаридтердің әртүрлі түрлері молекуланың тармақталу дәрежесі бойынша өзгергіштікке ие және әртүрлі күш пен сипаттағы

иммундық реакцияларды тудыруы мүмкін. *G. lucidum*-дан окшауланған липополисахаридтер мен ганодерандар сияқты мукополисахаридтерден тұратын күрделі қосылыстар да ісікке қарсы белсенділікті көрсетеді. Бірқатар зерттеулерде *G. lucidum* полисахаридтері иммундық функцияларды жақсартатыны көрсетілген.

Кесте 1 – Ағаш шірітетін базидиялы саңырауқұлақтардың әртүрлі түрлерінің зерттелген штаммдарының мицелийіндегі полисахаридтердің мөлшері

Штамм	Эндополисахаридтер, % а.с.м.
<i>Ganoderma applanatum</i> 1899	6,3 ± 0,2
<i>G. carnosum</i> 2502	6,6 ± 0,3
<i>G. lucidum</i> 1900	8,0 ± 0,2
<i>G. lucidum</i> 1904	7,5 ± 0,3
<i>G. oregonense</i> 2560	7,7 ± 0,3
<i>G. resinaceum</i> 2477	4,4 ± 0,2
<i>G. sinense</i> 2516	7,0 ± 0,3
<i>G. tsugae</i> 1848	6,2 ± 0,3
<i>G. tsugae</i> 2024	7,8 ± 0,2
<i>G. tsugae</i> 2566	5,1 ± 0,4
<i>Pholiota nameko</i> 2153	1,64 ± 0,04
<i>P. adiposa</i> 22	1,45 ± 0,16
<i>P. subochracea</i> 2535	1,44 ± 0,10
<i>P. limonella</i> 2335	1,51 ± 0,09
<i>P. alnicola</i> 2406	1,57 ± 0,13
<i>P. squarrosa</i> 2010	1,61 ± 0,09
<i>P. aurivella</i> 1527	1,68 ± 0,10
<i>Lentinus tigrinus</i> 2478	1,55 ± 0,21
<i>Trametes versicolor</i> 353	1,74 ± 0,17
<i>Pleurotus osreatus</i> 548	1,61 ± 0,09

Олардың иммундық жүйенің жасушаларынан цитокин секрециясын ынталандыратыны дәлелденді, бұл жасуша белсенділігінің артуына әкеледі және макрофагтар мен лимфоциттердің өмір сүруіне ықпал етеді.

Сонымен қатар, *G. lucidum* полисахаридтері меланома жасушаларының сызығындағы негізгі гистосәйкестік кешенінің көрінісін арттырады, бұл антигеннің мүмкіншілігін жақсартады, осылайша ісікке қарсы және вирусқа қарсы иммундық реакцияны ынталандырады [23].

Базидиялы саңырауқұлақтардың дақылдық ортаға синтезделген биологиялық белсенді заттардың көп мөлшерін, соның ішінде экзополисахаридтерді бөлу қабілеті организмдердің осы тобын биотехнологиялық зерттеулер үшін перспективалы етеді. Ол үшін дақылдық сұйықтығын концентрациялау, тұндыру, центрифугалау және диализ сынды әдістерін қамтитын бірнеше кезекті өңдеуден өткізді.

Экзополисахаридтерден тұратын ретентат 96° этил спиртімен, эфирмен, ацетонмен өңделді және алынған преципитат кептіріліп, 37°С температурада сақталды. 2-кестеде экзополисахаридтердің құрамы бойынша көрсеткіштерді қамтитын жүргізілген эксперименттердің нәтижелері берілген. Жоғарыда келтірілген мәліметтерден көріп отырғанымыздай, экзополисахаридтердің ең көп мөлшерін (2,2 г/л) *Trametes versicolor* 353 штаммы, ал одан сәл аз *Lentinus tigrinus* 2478 және *P. squarrosa* 2010 штаммдары

синтездеді.

Кесте 2 – Ағаш шірітетін базидиялы саңырауқұлақтардың әртүрлі түрлерінің зерттелген штаммдарының мицелийіндегі полисахаридтердің мөлшері

Штамм	Экзополисахаридтер, г/л
<i>Ganoderma applanatum</i> 1899	0,71 ± 0,05
<i>G. carnosum</i> 2502	0,67 ± 0,09
<i>G. lucidum</i> 1900	0,88 ± 0,09
<i>G. lucidum</i> 1904	0,81 ± 0,08
<i>G. oregonense</i> 2560	0,84± 0,06
<i>G. resinaceum</i> 2477	0,91± 0,08
<i>G. sinense</i> 2516	0,62 ± 0,08
<i>G. tsugae</i> 1848	0,74 ± 0,08
<i>G. tsugae</i> 2024	0,82 ± 0,09
<i>G. tsugae</i> 2566	0,80± 0,07
<i>Pholiota nameko</i> 2153	1,01 ± 0,13
<i>P. adiposa</i> 22	1,31 ± 0,11
<i>P. subochracea</i> 2535	0,69 ± 0,08
<i>P. limonella</i> 2335	1,55 ± 0,16
<i>P. alnicola</i> 2406	0,99 ± 0,11
<i>P. squarrosa</i> 2010	1,75 ± 0,15
<i>P. aurivella</i> 1527	1,07± 0,09
<i>Lentinus tigrinus</i> 2478	1,83 ± 0,14
<i>Trametes versicolor</i> 353	2,24± 0,17
<i>Pleurotus osreatus</i> 548	1,33± 0,11

Қорытынды. Зерттеу барысында эндо - және экзополисахаридтердің ең көп мөлшерін синтездеу қабілеті бар құнды дәрілік саңырауқұлақтардың коллекциялық дақылдарынан штаммдарды іріктеу бойынша бірқатар эксперименттер жүргізілді.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде эндополисахаридтердің белсенді продуценті ретінде - *Ganoderma lucidum* 1900, ал экзополисахаридтердің белсенді продуценті ретінде - *Trametes versicolor* 353 перспективалы биотехнологиялық штаммдары таңдалып алынды. Біздің зерттеулеріміз *G. lucidum*, *T. versicolor* саңырауқұлақтары әртүрлі дәрілік қасиеттері бар полисахаридтердің белсенді продуценті екенін дәлелдеді.

Қаржыландыру туралы ақпарат

Зерттеу Қазақстан Республикасы Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің қаржылық қолдауымен жүзеге асырылды (грант № AP09258296).

Әдебиеттер:

1 Filipa S.R., Anabela M., Vasconcelos H., Morales P. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 66: P. 48-62 (doi: 10.1016/j.tifs.2017.05.010).

2 Grazyna J., Bribiescas G., Furberg A. Human reproduction and health: an evolutionary perspective. *The Lancet*, 2017, 390: 510-520 (doi: 10.1016/s0140-6736(17)30573-1).

3 Xin M., et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydrate Research*, 2016, 424: 30-41 (doi: 10.1016/j.carres.2016.02.008).

- 4 Ferreira I.C., Heleno S. A. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry*, 2015, 114: 38-55 (doi: 10.1016/j.phytochem.2014.10.011).
- 5 Hobbs C. *Medicinal mushrooms: An exploration of tradition, healing, and culture*. Santa-Cruz, 2002: 251.
- 6 Bellini M., et al. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicology in vitro*, 2013, 17: 465-469 (doi: 10.1016/s0887-2333(03)00043-2).
- 7 Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycete mushrooms: A modern prospective. *Critical Reviews in Immunology*, 2011, 19: 65-96.
- 8 Chang S.T., Miles P.G. *Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact*. Florida, 2004.
- 9 Rathore H., Prasad Sh. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *Pharma Nutrition*. 2017, 5(2): 35-46.
- 10 Chu K. *Coriolus versicolor*: A medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2012, 42(9): 976-984 (doi:10.1177/009127002401102894).
- 11 Boh B. *Ganoderma lucidum*: a potential for biotechnological production of anti-cancer drugs. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 2013, 8: 255-287 (doi: 10.2174/1574891x113089990036).
- 12 Kao C. Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways. *Functional Foods in Health and Disease*, 2013, 3(2): 48-65 (doi:10.31989/ffhd.v3i2.65).
- 13 Wasser S. P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomedical Journal*. 2014, 37: 345-356 (doi: 10.4103/2319-4170.138318).
- 14 Donatini B. Control of Oral Human Papillomavirus (HPV) by Medicinal Mushrooms, *Trametes versicolor* and *Ganoderma lucidum*: A Preliminary Clinical Trial. *International Journal of medicinal mushrooms*, 2014, 16(5): 497-498 (doi: 10.1615/intjmedmushrooms.v16.i5.80).
- 15 Xu Z., Chen X. et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities. *American Journal of Chinese medicine*, 2011, 39(1): 15-27 (doi: 10.1142/s0192415x11008610).
- 16 Heleno S.A., Ferreir R.C. Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. *Food Bioscience*, 2015, 11: 48-55 (doi: 10.1016/j.fbio.2015.04.006).
- 17 Chang S.T. Mushroom biology: the impact on mushroom production and mushroom products. *Mushroom Biology and Mushroom Products*, 2013: 3-20.
- 18 Rich Milton R.D., Grisha C.R., Erlyn J.B. Mycelial growth and basidiocarp production of wild hairy sawgill *Lentinus strigosus*, a new record of naturally occurring mushroom in the Philippines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2017, 10: 242-246 (doi: 10.1016/j.bcab.2017.03.017).
- 19 Kim S.W., Hwang H.J., Park J.P. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 34: 56-61 (doi: 10.1046/j.1472-765x.2002.01041.x).
- 20 Chihara G., Hamuro J., Maeda Y.Y. Fractionation and purification of polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Cancer Research*, 1970, 30: 2776-2781.
- 21 Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре. Киев, 1988.
- 22 Гончарова И.А., Щерба В.В., Бабицкая В.Г. Полисахариды клеточной стенки базидиомицета *Coriolus hirsutus*. Прикладная биохимия и микробиология, 1996, 32(4): 434-437.
- 23 Sanodiya B.S., Thakur G. S., Baghel R. K. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2009. 10(8): 717-742 (doi: 10.2174/138920109789978757).

К.Г. МУСТАФИН¹, Н.А. БИСЬКО², Ж.Б. НАРМУРАТОВА^{3*},
А.С. ЖАКИПБЕКОВА¹, Ж.К. САДУЕВА¹, А.К. КАЛИЕВА⁴,
Н.Н. АХМЕТСАДЫКОВ¹, Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА⁵

¹Научно-производственное предприятие «Антиген», Алматы, Казахстан

²Институт ботаники имени Н.Г. Холодного, Киев, Украина

³Казахский национальный исследовательский технический университет им.
К. Сатпаева, Алматы, Казахстан

⁴Актюбинский региональный университет имени К. Жубанова, Актобе, Казахстан

⁵Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы,
Казахстан

*e-mail: z.narmuratova@satbayev.university

СКРИНИНГ ШТАММОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ БАЗИДИОМИЦЕТОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ПОЛИСАХАРИДОВ

Аннотация

В настоящее время высшие базидиальные грибы рассматриваются не только как ценный пищевой продукт, но и как важный источник получения природных фармакологических веществ онкостатического, антивирусного, иммуномоделирующего, антисклеротического, тонизирующего и др. действия. Биологическую активность большинства грибов во многом определяют соединения углеводной природы, большая часть которых представлена полисахаридами. Грибные полисахариды способствуют предотвращению онкогенеза, обладают выраженной противоопухолевой активностью в отношении различных аллогенных и сингенных опухолей и предотвращают развитие метастазов. В настоящей статье проведена сравнительная характеристика 20 штаммов 17 видов базидиальных грибов на способность к биосинтезу экзо- и эндополисахаридов. В результате проведенных исследований установлено, что наибольшее количество эндополисахаридов синтезировалось у представителей рода *Ganoderma* (их содержание варьировало от 4,4% до 8,0%). Наивысший процент эндополисахаридов содержался в биомассе *G. lucidum* 1900. Наибольшее же количество экзополисахаридов (2,2 г/л) синтезировал штамм *Trametes versicolor* 353. Оба штамма являются перспективными продуцентами полисахаридов.

Ключевые слова: базидиомицеты, *Ganoderma*, *Trametes*, эндополисахариды, экзополисахариды, глубинное культивирование

K.G. MUSTAFIN¹, N.A. BISCO², Zh.B. NARMURATOVA^{3*},
A.S. ZHAKIPBEKOVA¹, Zh.K. SADUYEVA¹, A.K. KALIEVA⁴,
N.N. AKHMETSADYKOV¹, Zh.B. SULEIMENOVA⁵

¹Scientific-Production Enterprise «Antigen», Almaty, Kazakhstan

²N.G. Kholodny Institute of Botany, Kiev, Ukraine

³Kazakh National Technical Research University named after K. Satbayev, Almaty, Kazakhstan

⁴K. Zhubanov Aktobe Regional University, Aktobe, Kazakhstan

⁵Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: z.narmuratova@satbayev.university

SCREENING FOR MEDICINAL BASIDIOMYCETES WITH HIGH POLYSACCHARIDE CONTENT

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.03

Abstract

At present, higher basidiomycetes are considered not only as a valuable food product, but also as an important source of natural pharmacological substances with oncostatic, antiviral, immunomodulating, antisclerotic, tonic, and other effects. The biological activity of most fungi is largely determined by carbohydrate compounds, most of which are represented by polysaccharides. Mushroom polysaccharides contribute to the prevention of oncogenesis, have a pronounced antitumor activity against various allogeneic and syngeneic tumors, and prevent the development of metastases. In this article, a comparative characteristic of 20 strains of 17 species of basidiomycetes for the ability to biosynthesis of exo- and endopolysaccharides was carried out. As a result, it was found that the largest amount of endopolysaccharides was synthesized by *Ganoderma* fungi (their content varied from 4.4% to 8.0%). The highest yield of endopolysaccharides was determined in the biomass of *G. lucidum* 1900. The highest yield of exopolysaccharides (2.2 g/l) was synthesized by *Trametes versicolor* 353. Thus, both strains are considered as promising polysaccharides producers.

Key words: basidiomycetes, *Ganoderma*, *Trametes*, endopolysaccharides, exopolysaccharides, submerged cultivation.

Various bodily functions can be controlled by dietary factors that are actively involved in maintaining homeostasis and health. Based on ideas about the possible relationship between nutrition and health/disease, the concept of “functional nutrition” was born, the paradigm of which is the understanding of food as medicine. The main goals of this brunch of science are maintaining good health, normalizing homeostasis and creating conditions to prevent disease by controlling human nutrition. This is fundamentally different from the tasks of medicine and pharmaceuticals - the cure or management of the disease [1].

Research in this area is aimed, on the one hand, at a more detailed study of the role of known food products in human health, and, on the other, at finding new sources of therapeutic nutrition. Recently, there has been increased attention to the development of food additives and therapeutic and prophylactic drugs that can be used to regulate physiological functions in the human body. Higher basidiomycetes are promising objects of biotechnology since they contain a unique complex of biologically active substances vital for the human body [2–5]. In particular, they are a source of new polysaccharides with antitumor and immunomodulatory properties [6, 7]. The fruiting bodies of these mushrooms are grown on an industrial scale in many countries of the world and have been widely used in Chinese medicine for more than two millennia [8].

Edible mushrooms with medicinal properties include species of the genera *Lentinus*, *Auricularia*, *Hericium*, *Grifola*, *Flammulina*, *Pleurotus*, *Tremella*, etc. A wide range of medicinal properties of mushrooms is due to the presence of biologically active components in

their composition [9-15]. A special role belongs to high molecular weight carbohydrates and melanins, which are the basis of a number of medicinal, therapeutic and prophylactic drugs with antioxidant, anticarcinogenic and immunomodulating effects.

The biological activity of most fungi is largely determined by carbohydrate compounds, which reaches 60% of the dry fungal biomass [16]. They are represented by free and bound sugars, as well as by polysaccharides. These substances perform reserve, osmoregulatory, regulatory and protective functions. In the early 70s of the last century, a group of Japanese scientists established the oncostatic effect of polysaccharides isolated from the fruit bodies of some basidial fungi, which led to an active study of these compounds, as well as the search for their producers [17].

Polysaccharides are a structurally diverse group of biological macromolecules widely distributed in nature. They consist of repeating structural units - monosaccharide residues interconnected by glycosidic bonds. Compared to proteins and nucleic acids, polysaccharides have a higher ability to carry biological information, as they have the greatest potential for structural variability. Mushroom polysaccharides contribute to the prevention of oncogenesis, have a pronounced antitumor activity against various allogeneic and syngeneic tumors, and prevent the development of metastases. Polysaccharides do not directly affect cancer cells, but activate various immune responses in the body. The diverse antitumor effects of polysaccharides is the result of an increase in the response of T-cell precursors and macrophages to cytokines produced by lymphocytes after specific recognition of tumor cells. Secondary metabolites with low molecular weight affect such processes as apoptosis, angiogenesis, development of metastases, regulation of the cell cycle, and transmission of signaling cascades in the cell [18].

Currently, 70%–80% of all fungal preparations are obtained from fruiting bodies and 20%–30% from mycelium extracts and culture fluid [19]. Recently, the attention of researchers has been attracted in polysaccharides obtained not only from fruiting bodies, but also from deep mycelium and culture fluid; however, they still remain poorly understood [20, 21]. At the same time, there is a reason to believe that in their structure and properties they will not differ from the polysaccharides of fruit bodies. Moreover, the technological scheme for obtaining extracellular polysaccharides and endopolysaccharides from deep mycelium is much simpler compared to obtaining from fruiting bodies [21]. In this regard, the main goal of this study was the screening of strains of medicinal basidiomycetes - producers of endo- and exopolysaccharides.

Materials and methods

The object of research was 20 strains of 17 species of basidiomycetes from the collection of cap mushroom cultures of the N.G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine (IBK): *Ganoderma applanatum* 1899, *G. carnosum* 2502, *G. lucidum* 1900, *G. lucidum* 1904, *G. oregonense* 2560, *G. resinaceum* 2477, *G. sinense* 2516, *G. tsugae* 1848, *G. tsugae* 2024, *G. tsugae* 2566, *Pholiota nameko* 2153, *P. adiposa* 22, *P. subochracea* 2535, *P. limonella* 2335, *P. alnicola* 2406, *P. squarrosa* 2010, *P. aurivella* 2605, *Lentinus tigrinus* 2478, *Trametes versicolor* 353, *Pleurotus osreatus*.

Endopolysaccharides were isolated from the fungal mycelium grown by submerged cultivation on a glucose-peptone-yeast medium (GPA) of the following composition g/L: glucose - 30.0; peptone - 3.0; KH_2PO_4 - 1.0; K_2HPO_4 - 1.0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.25; yeast extract - 3.0.

The experiments were carried out on laboratory shakers (180 rpm) in 250 mL Erlenmeyer flasks with 50 mL of the medium for 14 days in the dark. The cultivation temperature was 25–27°C. The inoculum was introduced into a sterile medium in an amount of 10% of the total volume of the medium in the flasks.

The inoculum was obtained in the following way: 7-day old culture grown on 2% GPA agar medium was homogenized and added into a sterile medium (10% by volume). The inoculum was grown on laboratory shakers (180 rpm) in 250 ml Erlenmeyer flasks with 50 ml of medium for the time necessary to form a fine suspension of mycelium, which was used to inoculate the experimental flasks. To obtain an inoculum, the mycelium of strains *G. applanatum*

1899, *G. lucidum* 1900, *G. lucidum* 1904 was cultivated for 4 days; strains *G. tsugae* 1848, *G. tsugae* 2024, *G. tsugae* 2566, *G. carnosum* 2502, *G. resinaceum* 2477, *T. versicolor* 353, *Pleurotus osreatus* 548 – 5 days; strains *G. oregonense* 2560, *G. sinense* 2516, *Lentinus tigrinus* 2478 – 7 days; strains *Pholiota nameko* 2153 *P. subochracea* 2535, *P. limonella* 2335, *P. squarrosa* 2010, *P. aurivella* 1527 – 9 days; strains *P. adiposa* 22, *P. alnicola* 2406 - 10 days.

After cultivation, the mycelium was separated from the culture liquid through a nylon cloth, washed with potassium phosphate buffer (pH 6.6), and dried at 60°C to constant weight. The resulting dried biomass was stored at room temperature in the dark in closed containers with silica gel for 10 days until the extraction of endopolysaccharides.

To extract endopolysaccharides from deep mycelium, it was destroyed in a homogenizer. The destroyed mycelium was poured with distilled water in a ratio of 1:10 according to weight and boiled in a water bath for 18 hours. Extraction was carried out in glass tubes with ground stoppers. Removal of cytoplasmic content was carried out by repeated suspension of the destroyed mycelium in distilled water with centrifugation at 3000g for 15 minutes. The washing procedure was stopped only when the optical density of the supernatant at 280 nm did not exceed 0.1 [22].

The obtained extracts were concentrated on a rotary evaporator to 1/3 of the original volume. The resulting concentrate was treated with 96° ethyl alcohol in a ratio of 1:1 by volume and left at a temperature of 4°C until the complete precipitation of fractions containing endopolysaccharides. The precipitate that formed was separated by centrifugation at 3000g for 20 min. The fraction obtained by precipitation, containing endopolysaccharides, was purified from impurities of low molecular weight compounds by dialysis against distilled water for 3 days. After purification, the fraction containing endopolysaccharides was treated with ethyl alcohol in a ratio of 1:2 by volume, the precipitate was separated by centrifugation at 3000g for 20 minutes. The precipitate obtained was successively washed with ethanol, ether, acetone and dried at 37°C. The homogeneity of the endopolysaccharide was checked by gel filtration on Sephadex G-200, the detection of the polysaccharide in the eluent was carried out using the phenol-sulfuric acid method. The content of endopolysaccharides was calculated as percent of absolutely dry biomass (a.d.m.).

Exopolysaccharides were isolated from the culture liquid obtained during the cultivation of the studied strains by deep cultivation on a glucose-peptone-yeast medium (GPA) of the same composition and under the same conditions that were used to study the content of endopolysaccharides. After cultivation, fungal mycelium was separated from the culture liquid by centrifugation at 3000 g for 20 min. Before extracting exopolysaccharides from the culture liquid, it was evaporated to 1/3 of the original volume. The evaporation procedure was carried out in a rotary evaporator at 50°C. To precipitate exopolysaccharides from cultural liquid, it was mixed with 96° ethyl alcohol in a ratio of 1:2 by volume and left 4°C until complete precipitation of fractions containing exopolysaccharides.

The precipitate was separated by centrifugation at 3000g for 20 minutes. The fraction obtained by precipitation, containing exopolysaccharides, was purified from impurities of low molecular weight compounds by dialysis against distilled water for 3 days. The precipitate obtained was successively washed with ethanol, ether, acetone and dried at 37°C. The homogeneity of the exopolysaccharide was checked by gel filtration on Sephadex G-200. The determination of exopolysaccharides in the eluent was carried out using the phenol-sulfuric acid method. The content of exopolysaccharides was calculated in terms of one liter of culture medium.

Results and discussion

The ability of basidial fungi synthesize a large number of biologically active substances, including exopolysaccharides, makes this group of organisms promising for biotechnological research.

In presented experimental work, 20 strains of 17 species of basidiomycetes fungi were studied, which by their ecology belong to 5 genera of wood-destroying saprotrophic fungi. This group of fungi is of research interest due to the presence of a large number of biologically active substances, including endopolysaccharides. It has been experimentally proven that endopolysaccharides isolated from the fruiting bodies, mycelium or spores of this group of fungi have numerous medicinal properties.

All tested strains showed great heterogeneity in the efficiency of endopolysaccharide synthesis (Table 1). The greatest amount of these compounds was synthesized in representatives of the genus *Ganoderma* and their content varied from 4.4% to 8%. The highest percentage of endopolysaccharides (8%) was contained in the biomass of *G. lucidum* 1900. *G. lucidum* 1904, *G. oregonense* 2560, *G. sinense* 2516 and *G. tsugae* 2024 contained a lower amount of endopolysaccharides (7.0 -7.7%). *G. tsugae* 2566 and *G. resinaceum* 2477 strains had the least amount of polysaccharides in the mycelium of the *Ganoderma* genus – 5.1% and 4.4%, respectively.

Thus, according to Table 1 *G. lucidum* 1900 is a promising producer of endopolysaccharides. Thus, more than 200 different types of endopolysaccharides with a molecular weight from 4×10^5 to 1×10^6 Dalton have been isolated and identified from the fruiting bodies and mycelium of *G. lucidum*, most of which exhibited antitumor properties. Structural analysis showed that *G. lucidum* endopolysaccharides are mainly high molecular weight heteropolymers, the main component of which is glucose, and the minor ones are xylose, mannose, galactose, and fucose. Different types of polysaccharides isolated from *G. lucidum* have variability in the degree of branching of the molecule and can induce immune reactions of different strength and nature.

Table 1 – Endopolysaccharides content in mycelia of different strains of basidiomycetes fungi

Strain	Endopolysaccharides, % a.s.m.
1	2
<i>Ganoderma applanatum</i> 1899	6,3 ± 0,2
<i>G. carnosum</i> 2502	6,6 ± 0,3
<i>G. lucidum</i> 1900	8,0± 0,2
<i>G. lucidum</i> 1904	7,5 ± 0,3
<i>G. oregonense</i> 2560	7,7 ± 0,3
<i>G. resinaceum</i> 2477	4,4 ± 0,2
<i>G. sinense</i> 2516	7,0 ± 0,3
<i>G. tsugae</i> 1848	6,2 ± 0,3
<i>G. tsugae</i> 2024	7,8 ± 0,2
<i>G. tsugae</i> 2566	5,1 ± 0,4
<i>Pholiota nameko</i> 2153	1,64±0,04
<i>P. adiposa</i> 22	1,45±0,16
<i>P. subochracea</i> 2535	1,44±0,10
<i>P. limonella</i> 2335	1,51±0,09
<i>P. alnicola</i> 2406	1,57±0,13

Table 1 continuation

1	2
<i>P. squarrosa</i> 2010	1,61±0,09
<i>P. aurivella</i> 1527	1,68±0,10
<i>Lentinus tigrinus</i> 2478	1,55±0,21
<i>Trametes versicolor</i> 353	1,74±0,17
<i>Pleurotus osreatus</i> 548	1,61±0,09

Complex compounds containing endopolysaccharides such as glycopolysaccharides and ganoderans isolated from *G. lucidum* also exhibit antitumor activity. *G. lucidum* polysaccharides have been shown in a number of studies to improve immune functions. It has been proven that they stimulate the secretion of cytokines from cells of the immune system, which leads to an increase in cellular activity and promotes the survival of macrophages and lymphocytes. In addition, polysaccharides from *G. lucidum* increase the expression of the major histocompatibility complex in a melanoma cell line, which improves antigen presentation, thereby stimulating antitumor and antiviral immune responses [23].

The ability of basidial fungi to release into the culture medium a large amount of biologically active substances, including exopolysaccharides, makes this group of organisms promising for biotechnological research. The culture fluid was subjected to a series of successive treatments, including various methods of concentration, precipitation, centrifugation and dialysis. The resulting retentive exopolysaccharides was treated with 96° ethyl alcohol, ether, acetone, and the resulting precipitate was dried and stored at 37°C. Table 2 presents the results of the experiments, including data on the content of exopolysaccharides. As can be seen from the presented data, the largest amount of exopolysaccharides (2.2 g/l) was synthesized by the strain *Trametes versicolor* 353. In *Lentinus tigrinus* 2478 and *P. squarrosa* 2010 the amount of exopolysaccharides was $1,83 \pm 0,14$ and $1,75 \pm 0,15$ g/l, respectively.

Table 2 - Exopolysaccharides content in mycelia of different strains of basidiomycetes fungi

Strain	Exopolysaccharides, % a.s.m.
1	2
<i>Ganoderma applanatum</i> 1899	0,71 ± 0,05
<i>G. carnosum</i> 2502	0,67 ± 0,09
<i>G. lucidum</i> 1900	0,88 ± 0,09
<i>G. lucidum</i> 1904	0,81 ± 0,08
<i>G. oregonense</i> 2560	0,84± 0,06
<i>G. resinaceum</i> 2477	0,91± 0,08
<i>G. sinense</i> 2516	0,62 ± 0,08
<i>G. tsugae</i> 1848	0,74 ± 0,08
<i>G. tsugae</i> 2024	0,82 ± 0,09
<i>G. tsugae</i> 2566	0,80± 0,07
<i>Pholiota nameko</i> 2153	1,01 ± 0,13

Table 2 continuation

1	2
<i>P. adiposa</i> 22	1,31 ± 0,11
<i>P. subochracea</i> 2535	0,69 ± 0,08
<i>P. limonella</i> 2335	1,55 ± 0,16
<i>P. alnicola</i> 2406	0,99 ± 0,11
<i>P. squarrosa</i> 2010	1,75 ± 0,15
<i>P. aurivella</i> 1527	1,07 ± 0,09
<i>Lentinus tigrinus</i> 2478	1,83 ± 0,14
<i>Trametes versicolor</i> 353	2,24 ± 0,17
<i>Pleurotus osreatus</i> 548	1,33 ± 0,11

Conclusion

In the present work, a series of experiments were carried out to select strains from fungal cultures of valuable medicinal mushrooms that have the ability to synthesize the largest amount of endo- and exopolysaccharides. As a result, biotechnologically promising strains of *Ganoderma lucidum* 1900 were selected as the best producer of endopolysaccharides and *Trametes versicolor* 353 as the best producer of exopolysaccharides. Our studies have confirmed the fact that *G. lucidum* and *T. versicolor* fungi are active producers of polysaccharides with various medicinal properties.

Funding

The research was carried out with the financial support of the Scientific Committee of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (grant number AP09258296).

References:

- 1 Filipa S.R., Anabela M., Vasconcelos H., Morales P. Functional foods based on extracts or compounds derived from mushrooms. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 66: P. 48-62 (doi: 10.1016/j.tifs.2017.05.010).
- 2 Grazyna J., Bribiescas G., Furberg A. Human reproduction and health: an evolutionary perspective. *The Lancet*, 2017, 390: 510-520 (doi: 10.1016/s0140-6736(17)30573-1).
- 3 Xin M., et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on the structural characteristics, antitumor mechanisms and immunomodulating activities. *Carbohydrate Research*, 2016, 424: 30-41 (doi: 10.1016/j.carres.2016.02.008).
- 4 Ferreira I.C., Heleno S. A. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities. *Phytochemistry*, 2015, 114: 38-55 (doi: 10.1016/j.phytochem.2014.10.011).
- 5 Hobbs C. Medicinal mushrooms: An exploration of tradition, healing, and culture. Santa-Cruz, 2002: 251
- 6 Bellini M., et al. Anticlastogenic effect of aqueous extracts of *Agaricus blazei* on CHO k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. *Toxicology in vitro*, 2013, 17: 465-469 (doi: 10.1016/s0887-2333(03)00043-2).
- 7 Wasser S.P., Weis A.L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycete mushrooms: A modern prospective. *Critical Reviews in Immunology*, 2011, 19: 65-96.
- 8 Chang S.T., Miles P.G. Mushrooms. Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. Florida, 2004.
- 9 Rathore H., Prasad Sh. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. *Pharma Nutrition*, 2017, 5(2): 35-46.

- 10 Chu K. *Coriolus versicolor*: A medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2012, 42(9): 976-984 (doi:10.1177/009127002401102894).
- 11 Boh B. *Ganoderma lucidum*: a potential for biotechnological production of anti-cancer drugs. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 2013, 8: 255-287 (doi: 10.2174/1574891x113089990036).
- 12 Kao C. Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: active ingredients and pathways. *Functional Foods in Health and Disease*, 2013, 3(2): 48-65 (doi:10.31989/ffhd.v3i2.65).
- 13 Wasser S. P. Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomedical Journal*, 2014, 37: 345-356 (doi: 10.4103/2319-4170.138318).
- 14 Donatini B. Control of Oral Human Papillomavirus (HPV) by Medicinal Mushrooms, *Trametes versicolor* and *Ganoderma lucidum*: A Preliminary Clinical Trial. *International Journal of medicinal mushrooms*, 2014, 16(5): 497-498 (doi: 10.1615/intjmedmushrooms.v16.i5.80).
- 15 Xu Z., Chen X. et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharides: immunomodulation and potential anti-tumor activities. *American Journal of Chinese medicine*, 2011, 39(1): 15-27 (doi: 10.1142/s0192415x11008610).
- 16 Heleno S.A., Ferreir R.C. Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. *Food Bioscience*, 2015, 11: 48-55 (doi: 10.1016/j.fbio.2015.04.006).
- 17 Chang S.T. Mushroom biology: the impact on mushroom production and mushroom products. *Mushroom Biology and Mushroom Products*, 2013: 3-20.
- 18 Rich Milton R.D., Grisha C.R., Erlyn J.B. Mycelial growth and basidiocarp production of wild hairy sawgill *Lentinus strigosus*, a new record of naturally occurring mushroom in the Philippines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2017, 10: 242-246 (doi: 10.1016/j.bcab.2017.03.017).
- 19 Kim S.W., Hwang H.J., Park J.P. Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology*, 2002, 34: 56-61 (doi: 10.1046/j.1472-765x.2002.01041.x).
- 20 Chihara G., Hamuro J., Maeda Y.Y. Fractionation and purification of polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Cancer Research*, 1970, 30: 2776-2781.
- 21 Buhalo A.S. Vysshie s"edobnye bazidiomicety v chistoj kul'ture. Kiev, 1988.
- 22 Goncharova I.A., Shcherba V.V., Babickaya V.G. Polisaharidy kletочноj stenki bazidiomiceta *Coriolus hirsutus*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*, 1996, 32(4): 434-437.
- 23 Sanodiya B.S., Thakur G. S., Baghel R. K. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2009. 10(8): 717-742 (doi: 10.2174/138920109789978757).

МРНТИ: 68.41.35, 68.41.53

З.А. ЛАТЫПОВА *, А.М. НАМЕТ, Б.Ж. ИСАКУЛОВА', З.К. БУЙЕНБАЕВА,
Р.А. КЕРИМБАЕВА

Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт, Алматы, Казахстан
*e-mail: zalinal@list.ru

ЗОНИРОВАНИЕ ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН ПО СТЕПЕНИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПАСТЕРЕЛЛЁЗОМ СРЕДИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.04

Аннотация

Проведено районирование территории РК на зоны по степени распространения пастерелллёзной инфекции среди крупного рогатого скота (КРС) за 2012–2021 годы. К зоне с высокой степенью распространения пастерелллёза отнесены - Западно-Казахстанская и Восточно-Казахстанская области. К зоне со средней степенью распространения - Атырауская, Актыбинская, Алматинская, Карагандинская, Жамбылская, Костанайская области. К зоне с низкой степенью распространения отнесены - Кызылординская, Акмолинская и Павлодарская области. Свободными (благополучными) являются Мангистауская, Северо-Казахстанская и Туркестанская области. Всего установлено 11 областей республики с разной степенью распространения пастерелллёзной инфекции среди крупного рогатого скота.

Ключевые слова: пастерелллёз КРС, зонирование, распространение, эпизоотология.

Одной из широко распространенных инфекционных болезней животных, наносящих большой экономический ущерб животноводству и имеющих определенное социальное значение, является пастерелллёз.

Пастерелллёз (*Pasteurellosis*) - геморрагическая септицемия - инфекционная болезнь многих видов сельскохозяйственных и диких млекопитающих, а также птиц, характеризующаяся при остром течении симптомами септицемии, при подостром и хроническом - преимущественным поражением легких.

По современной эпидемиологической классификации представителей пастерелл относят к возбудителям зооантропонозов. Носителями *Pasteurella multocida* являются КРС, лошади, мелкий рогатый скот, буйволы, козы, свиньи, грызуны, кошки, собаки, дикие животные, домашние и дикие птицы. При благоприятных условиях пастерелллёз развивается и распространяется среди благополучного поголовья животных.

На территории Казахстана, согласно данным ветеринарной отчётности и литературы, ежегодно отмечается энзоотические вспышки пастерелллёза среди сельскохозяйственных животных, преимущественно молодняка [1, 2].

Болезнь сопровождается высокой (до 100%) летальностью, снижением продуктивности, длительным носительством патогенных форм микроба. Кроме того, пастереллоносительство у этих животных может обуславливать появление болезни среди других видов млекопитающих и возникновение новых эпизоотических очагов. В литературе имеются указания о необходимости контроля за пастерелллёзом животных и человека [3 - 5].

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о циркуляции возбудителя пастерелллёза на территории республики среди животных и необходимости мониторинга за данной инфекцией. При этом важно зонировать территорию страны в зависимости от степени распространения болезни в областях, районах и т.д. для дальнейшего анализа и принятия корректирующих действий (отбор проб для диагностических исследований, вакцинация, улучшение содержания и кормления животных и пр.).

Цель данного исследования – провести зонирование территории Республики Казахстан по степени распространения заболевания пастереллёзом среди крупного рогатого скота.

Материалы и методы. Изучение эпизоотологической характеристики территории страны по пастереллёзу КРС осуществляли путем анализа данных ветеринарной отчётности КВКН МСХ РК за 2012-2021 гг. Для графического отображения вычисляемых величин использована программа Microsoft Paint 2010.

Результаты и обсуждение.

Эпизоотологический мониторинг в отношении пастереллёза крупного рогатого скота, осуществляемый нами в эпизоотологических единицах хозяйствующих субъектах Республики Казахстан, за период с 2012–2022 гг. позволил выявить особенности возникновения, развития и проявления болезни, установить степень её распространения и составить карту зонирования территории областей РК (рисунок 1).

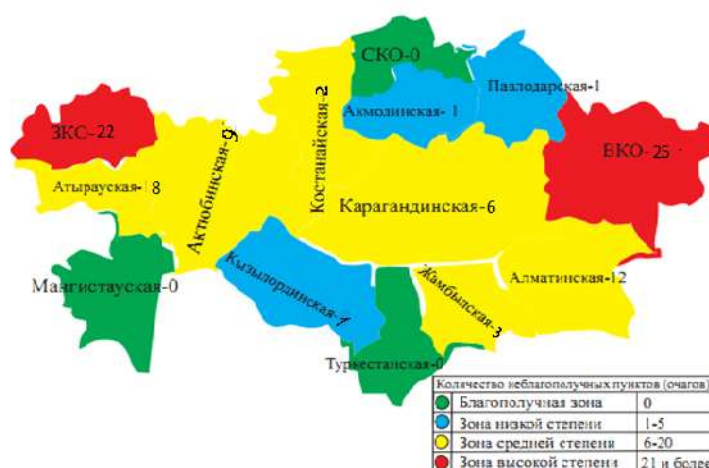


Рисунок 1 – Картографирование (районирование) территории РК на зоны по степени распространения пастереллёзной инфекции среди КРС за 2012-2021 годы

Как показано на рисунке 1, за анализируемый период к зоне высокой степени распространения пастереллёза КРС отнесены Западно-Казахстанская и Восточно-Казахстанская области.

К зоне средней степени распространения - Атырауская, Актыбинская, Алматинская, Карагандинская, Жамбылская, Костанайская области.

К зоне низкой степени распространения отнесены Кызылординская, Акмолинская Павлодарская области.

Свободными (благополучными) являются Мангистауская, Северо-Казахстанская, Туркестанская области.

Детализация данных эпизоотической карты визуализации эпизоотического процесса пастереллёза крупного рогатого скота за период с 2012 по 2021 годы на примере Западно-Казахстанской и Восточно-Казахстанской областей, как наиболее неблагополучных регионов, представлены на рисунках 2 и 3.

На территории Западно-Казахстанской области за период с 2012 по 2021 годы зарегистрировано 37 очагов пастереллёзной инфекции.

К высокой степени зараженности пастереллёзом отнесены два района – Аягозский, где зарегистрировано 15 эпизоотических очагов и Урджарский - 10 очагов.

К средней степени отнесены Кокпектинский, Курчумский, Бескарагайский, Алтай и город Семей, где за 10 лет зарегистрировано по 1 случаю.

Остальные 11 районов являются благополучными - Бородулихинский, Глубоковский, Жарминский, Зайсанский, Катон-Карагайский, Тарбагатайский, Уланский, Шемонаихинский районы и города Риддер, Курчатов, Усть-Каменогорск.

Приведенные данные являются количественными показателями эпизоотического процесса.

Заключение

Всего установлено 11 областей республики с разной степенью распространения пастереллёзной инфекции среди КРС. Из них 2 области отнесены к зоне с высокой степенью распространения, 6 - со средней и 3 - с низкой степенью распространения пастереллёза. 3 области являются благополучными по данному заболеванию.

Стоит добавить, что характерной особенностью пастереллёза в РК является стационарность эпизоотических очагов. Стационарность данной инфекции поддерживается и за счет присутствия в гуртах животных-пастереллоносителей.

При резких перепадах температуры воздуха, смены других погодных условий, ухудшения содержания и плохого кормления и т.д. у животных-пастереллоносителей снижается резистентность организма и на этом фоне происходит активация персистирующих в организме пастерелл, что ведет к возникновению вторичного пастереллёза, сопровождающегося спорадическими случаями, эпизоотиями и даже эпизоотическими вспышками.

Изучение данных о пастереллёзе крупного рогатого скота за последние 10 лет позволяет утверждать, что эта болезнь получила широкое распространение и является серьезным препятствием развития скотоводства.

Финансирование

Работа выполнена в рамках ПЦФ МСХ РК (2021-2023 гг.) по проекту «Изучить эпизоотологическую характеристику территории страны по пастереллёзу КРС и разработать ветеринарно-санитарные мероприятия по повышению их эффективности».

Литература:

- 1 Meka-Mechenko VG, Nekrassova LE, Meka-Mechenko TV, Lukhnova LYu, Kunitsa TN, Izbanova UA, Begimbayeva EZh. Pasteurellosis of animals in the Republic of Kazakhstan. Vestnik KazNU, seriya ekologicheskaya. Bulletin KazNU, ecologica series, 2014, 40:156-159.
- 2 Мусаева А.К., Егорова Н.Н.. Пастереллез копытных животных. Мат. Межд. Науч-практ. Конф. «Зоопарки Казахстана, перспективы и пути развития». Алматы, 2016: 82-93.
- 3 Nahar Panna S., Hussain Nazir N., Rahman B., Ahamed S., Saroare G., Chakma Sh., Kamal T., Majumder Ummay H. Isolation and molecular detection of Pasteurellamultocida Type A from naturally infected chickens, and their histopathological evaluation in artificially infected chickens in Bangladesh. J. Adv. Vet. Anim. Res., 2015, 2(3): 338-345.
- 4 Hamada M., Elshimy N., Abusriwil H. Infective Exacerbation of Pasteurellamultocida. Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Infectious Diseases, 2016: 4 (doi.org/10.1155/2016/2648349).
- 5 Shalini D., Tulsi D. Chugh Pasteurellamultocida: Cause of subdural and paranasal sinus abscesses in an adolescent. Journal of Pediatric Infectious Diseases, 2014, 9: 115-118.

З.А. ЛАТЫПОВА*, А.М. НАМЕТ, Б.Ж. ИСАКУЛОВА, З.К. БУЙЕНБАЕВА,
Р.А. КЕРИМБАЕВА

Қазақ ветеринарлық ғылыми-зерттеу институты, Алматы, Қазақстан

*e-mail: zalinal@list.ru

ІРІ ҚАРА МАЛ АРАСЫНДА ПАСТЕРЕЛЛЕЗ АУРУЫНЫҢ ТАРАЛУЫ ДӘРЕЖЕСІ БОЙЫНША ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ АУМАҒЫН АЙМАҚТАРҒА БӨЛУ

Түйін

2012-2021 жылдары ІҚМ арасында пастереллез инфекциясының таралу дәрежесі бойынша Қазақстан Республикасының аумағын аймақтарға бөлу жүргізілді. Пастереллездің жоғары таралу аймағына Батыс Қазақстан және Шығыс Қазақстан облыстары, ал орташа таралу дәрежесіне – Атырау, Ақтөбе, Алматы, Қарағанды, Жамбыл, Қостанай облыстары кіреді. Төмен таралу аймағына Қызылорда, Ақмола және Павлодар облыстары жатқызылған. Маңғыстау, Солтүстік Қазақстан, Түркістан облыстары еркін (ауру тіркелмеген) аймақтар болып табылады. Республикамыздың 11 облысы бойынша ірі қара мал (ІҚМ) арасында таралу дәрежесі әртүрлі пастереллез инфекциясы анықталған.

Кілт сөздер: ірі қара мал пастереллезі, аймақтарға бөлу, таралуы, эпизоотология.

IRSTI: 68.41.35, 68.41.53

Z.A. LATYPOVA*, A.M. NAMET, B.ZH. ISAKULOVA, Z.K. BUYENBAEVA,
R.A. KERIMBAEVA

Kazakh Research Veterinary Institute, Almaty, Kazakhstan

*e-mail: zalinal@list.ru

ZONING THE TERRITORY OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN ACCORDING TO THE DEGREE OF THE DISTRIBUTION OF PASTEURILLOSIS DISEASE AMONG CATTLE

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.04

Abstract

The zoning of the territory of the Republic of Kazakhstan into zones was carried out according to the degree of spread of pasteurellosis infection among cattle for 2012-2021. The zone with a high spread of pasteurellosis includes the West Kazakhstan and East Kazakhstan regions. To the average degree of distribution - Atyrau, Aktobe, Almaty, Karaganda, Zhambyl, Kostanay regions. The Kyzylorda, Akmola and Pavlodar regions are assigned to the zone of low distribution. Free (prosperous) are Mangystau, North-Kazakhstan, Turkestan regions. In total, 11 regions of the republic were identified with varying degrees of spread of pasteurellosis infection among cattle (cattle).

Key words: cattle pasteurellosis, zoning, distribution, epizootology.

One of the widespread infectious animal diseases that cause great economic damage to animal husbandry and have a certain social significance is pasteurellosis.

Pasteurellosis (*Pasteurellosis*) - hemorrhagic septicemia - an infectious disease of many species of agricultural and wild mammals, as well as birds, characterized in acute by symptoms of septicemia, in subacute and chronic - a predominant lesion of the lungs.

According to the modern epidemiological classification, representatives of *Pasteurella* are classified as pathogens of zoonoses. Carriers of *Pasteurella multocida* are cattle, horses, small cattle, buffaloes, goats, pigs, rodents, cats, dogs, wild animals, domestic and wild birds. Under favorable conditions, pasteurellosis develops and spreads among prosperous livestock.

On the territory of Kazakhstan, according to the data of veterinary reporting and literature, enzootic outbreaks of pasteurellosis are observed annually among farm animals, mainly young animals [1, 2].

The disease is accompanied by high (up to 100%) lethality, reduced productivity, and long-term carriage of pathogenic forms of the microbe. In addition, Pasteurellosis in these animals can cause the appearance of the disease among other mammalian species and the emergence of new epizootic foci. There are indications in the literature about the need to control pasteurellosis in animals and humans [3 - 5].

Thus, the above data indicate the circulation of the causative agent of pasteurellosis in the territory of the republic among animals and the need to monitor this infection. At the same time, it is important to zone the country's territory depending on the degree of spread of the disease in regions, districts, etc. for further analysis and taking corrective actions (sampling for diagnostic studies, vaccination, improvement of animal welfare and feeding, etc.).

The purpose of this study is to conduct zoning of the territory of the Republic of Kazakhstan on the spread of pasteurellosis diseases among cattle.

Materials and methods

The study of the epizootological characteristics of the country's territory in terms of cattle pasteurellosis of a consistent analysis of data from veterinary reporting by the KVKN of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan for 2012-2021. Microsoft Paint 2010 was used to graphically display the calculated values.

Results and discussion

Epizootological monitoring in relation to pasteurellosis of cattle, carried out by us in epizootological units of economic entities of the Republic of Kazakhstan, for the period from 2012-2022. made it possible to identify the features of the occurrence, development and manifestation of the disease, to establish the degree of its spread and to draw up a map of the zoning of the territory of the regions of the Republic of Kazakhstan. Picture 1.

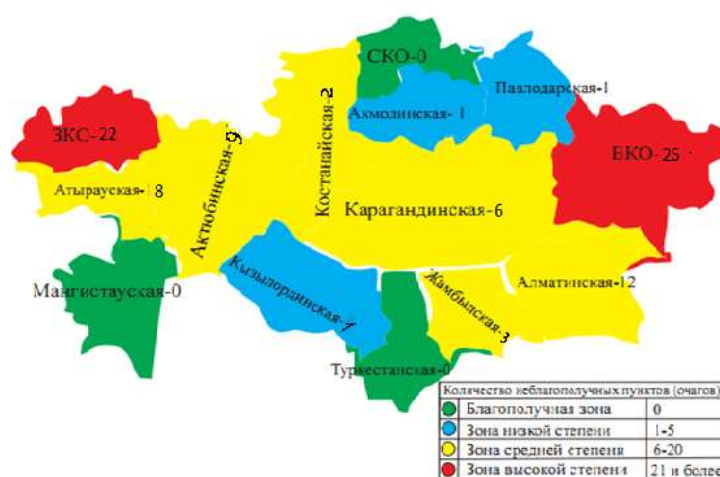


Figure 1 - Mapping (zoning) of the territory of the Republic of Kazakhstan into zones according to the degree of spread of pasteurellosis infection among cattle for 2012-2021

As shown in Figure 1, for the analyzed period, the West Kazakhstan and East Kazakhstan regions were assigned to the zone of high prevalence of cattle pasteurellosis.

To the zone of medium distribution - Atyrau, Aktobe, Almaty, Karaganda, Zhambyl, Kostanay regions.

The Kyzylorda, Akmola and Pavlodar regions are assigned to the zone of low distribution.

Free (prosperous) are Mangystau, North-Kazakhstan, Turkestan regions.

Detailed data of the epizootic visualization map of the epizootic process of pasteurellosis in cattle for the period from 2012 to 2021 on the example of the West Kazakhstan and East Kazakhstan regions, as the most disadvantaged regions, are presented in Figures 2 and 3.

On the territory of the West Kazakhstan region for the period from 2012 to 2021, 37 foci of pasteurellosis infection were registered.

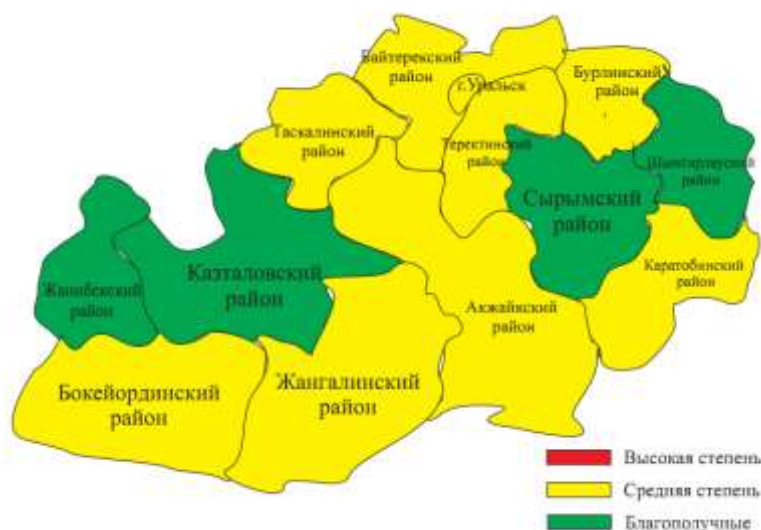


Figure 2 - Mapping (zoning) of the territory of the West Kazakhstan region into zones according to the degree of spread of pasteurellosis infection among cattle for 2012-2021

As can be seen from Figure 3, the region was conditionally divided into high areas with 5 or more outbreaks, medium areas with 1 to 5 outbreaks, and prosperous areas. A high degree of infection with pasteurellosis in the region has not been identified.

The Akzhaik, Baiterek, Bokeyordinsky, Burlinsky, Zhangalinsky, Karatobinsky, Taskalinsky, Terektinsky districts and the city of Uralsk are classified as medium, where from 1 to 4 epizootic foci have been registered over the past 10 years.

The remaining 4 districts are Kaztalovsky. Zhanibek, Syrym, Shyngyrlau are prosperous.

On the territory of the East Kazakhstan region for the period from 2012 to 2021, 36 foci of pasteurellosis infection were registered.

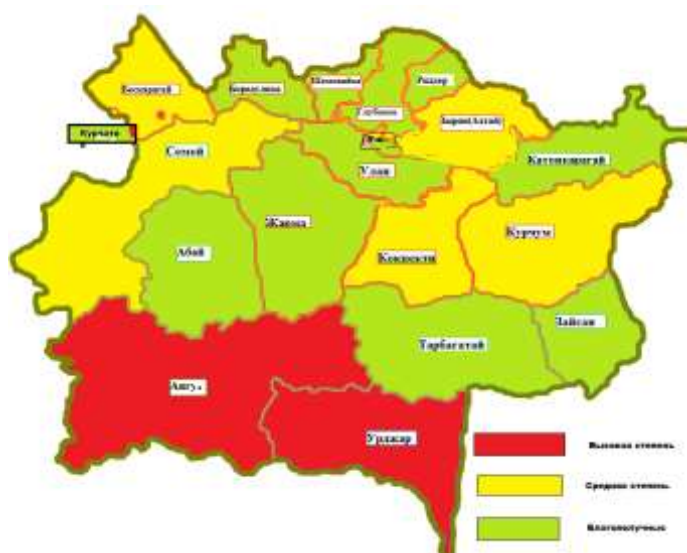


Figure 3 - Mapping (zoning) of the territory of the East Kazakhstan region into zones according to the degree of spread of pasteurellosis infection among cattle for 2012-2021

As can be seen from Figure 3, the East Kazakhstan region was conditionally divided into high from 5 and above foci, medium from 1 to 5 foci and prosperous areas.

A high degree of pasteurellosis infection includes two districts Ayagoz where 15 epizootic foci and Urdzhar 10 foci are registered.

Kokpektinsky, Kurchumsky, Beskaragaisky, Altai and the city of Semey are assigned to the average degree, where 1 case has been registered in 10 years.

The remaining 11 districts are prosperous - Borodulikha, Glubokovsky, Zharminsky, Zaisansky, Katon-Karagaysky, Tarbagataisky, Ulansky, Shemonakhinsky districts and the cities of Ridder, Kurchatov, Ust-Kamenogorsk.

The given data are quantitative indicators of the epizootic process.

Conclusion

In total, 11 regions of the republic were identified with varying degrees of spread of pasteurellosis infection among cattle. Of these, 2 regions are classified as a zone with a high degree of spread, 6 with an average and 3 with a low degree of spread of pasteurellosis. 3 regions are safe for this disease.

It should be added that a characteristic feature of pasteurellosis in the Republic of Kazakhstan is the stationarity of epizootic foci. The stationarity of this infection is also maintained due to the presence of pasteurell-carrying animals in herds.

With sudden changes in air temperature, changes in other weather conditions, deterioration of maintenance and poor feeding, etc. in pasteurell-carrying animals, the body's resistance decreases and, against this background, pasteurella persisting in the body is activated, which leads to the emergence of secondary pasteurellosis, accompanied by sporadic cases, epizootics and even epizootic outbreaks.

The study of data on cattle pasteurellosis over the past 10 years suggests that this disease has become widespread and is a serious obstacle to the development of cattle breeding.

Funding

The work was carried out within the framework of the PTF of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan (2021-2023) under the project "To study the epizootological characteristics of the country's territory for cattle pasteurellosis and develop veterinary and sanitary measures to improve their effectiveness"

References:

- 1 Meka-Mechenko VG, Nekrassova LE, Meka-Mechenko TV, Lukhnova LYu, Kunitsa TN, Izbanova UA, Begimbayeva EZh. Pasteurelosis of animals in the Republic of Kazakhstan. Vestnik KazNU, seriya ekologicheskaya. Bulletin KazNU, ecologica series, 2014, 40:156-159.
- 2 Musaeva A.K., Egorova N.N. Pasterellez kopytnykh zhivotnykh. Mat. Mezhd. Nauch-prakt. Konf. «Zooparki Kazahstana, perspektivy i puti razvitiya». Almaty, 2016: 82-93.
- 3 Nahar Panna S., Hussain Nazir N., Rahman B., Ahamed S., Saroare G., Chakma Sh., Kamal T., Majumder Ummay H. Isolation and molecular detection of Pasteurellamultocida Type A from naturally infected chickens, and their histopathological evaluation in artificially infected chickens in Bangladesh. J. Adv. Vet. Anim. Res., 2015, 2(3): 338-345.
- 4 Hamada M., Elshimy N., Abusriwil H. Infective Exacerbation of Pasteurellamultocida. Hindawi Publishing Corporation Case Reports in Infectious Diseases, 2016: 4 (doi.org/10.1155/2016/2648349).
- 5 Shalini D., Tulsi D. Chugh Pasteurellamultocida: Cause of subdural and paranasal sinus abscesses in an adolescent. Journal of Pediatric Infectious Diseases, 2014, 9: 115-118.

Б. Б. БАЙМАХАНОВА^{1*}, А.Б. СЕЙДАЛИНА¹, С.А. СУЛЕЙМЕНОВА¹,
Е.Т. КАСЫМБЕКОВ¹, Е.Я. ХАН¹, К.О. КАРАМЕНДИН¹,
А.И. КЫДЫРМАНОВ¹, С.Р. ФЕРЕЙДОУНИ²

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Венский университет ветеринарной медицины, Вена, Австрия

*e-mail: bbbayken@mail.ru

ГЕПАТИТ Е ПТИЦ В КАЗАХСТАНЕ

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.05

Аннотация

В статье описаны исследования вируса гепатита Е, обнаруженного в птицеводческом хозяйстве пригорода г.Алматы (Казахстан), во время вспышки заболевания неизвестной этиологии у цыплят месячного возраста. В паренхиме печени и почек выявлены зернистая дистрофия и некротические изменения, резкое увеличение размера селезенки и лимфоидных фолликул. При ОТ-ПЦР к консервативному фрагменту гена хеликазы вируса гепатита Е в четырех исследованных образцах обнаружена РНК вируса, подтверждающая наличие возбудителя.

Ключевые слова: птица, вирус гепатита Е, ОТ-ПЦР, гистологические исследования.

Вирусный гепатит Е (ВГЕ) – это инфекционное заболевание птиц, млекопитающих животных и человека, вызываемое РНК-содержащим вирусом семейства *Hepeviridae*. У домашних кур гепатит Е зарегистрирован во многих странах мира с 80-х годов прошлого столетия – в Австралии, США, Испании, России, Венгрии, Италии, Китае [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7], Корею, Чехии, Англии, Украине, Польше, Израиле [8] по сегодняшний день.

Впервые болезнь была отмечена у цыплят с синдромом большой печени и селезенки (Big liver and spleen – BLS) в Австралии [9]. В США и Канаде также зарегистрировано заболевание, известное как синдром гепато-спленомегалии без каких-либо известных возбудителей и провоцирующих факторов. Молекулярно-генетические исследования показали, что возбудители BLS в Австралии и гепато-спленомегалии в США являются различными вариантами ВГЕ почти идентичными по нуклеотидной последовательности. На основе значительного сходства их геномов с таковыми ВГЕ человека и других животных возбудитель BLS обозначен отдельно как ВГЕ птиц.

Заражение домашних птиц гепатитом Е происходит алиментарно, возможен также трансвариальный путь передачи вируса [10]. Заболевание у кур развивается с 24-недельного возраста, и у большинства клинически не проявляется. Снижаются продуктивность и яйценоскость поголовья, у некоторых наблюдается сонное состояние, происходит массовый падеж здоровой с виду птицы [11]. Часто вирусный гепатит Е сопровождается желточным перитонитом. Диагностировать инфекцию можно по патолого-морфологическим изменениям с обязательным подтверждением с помощью ИФА или ПЦР.

Целью данного исследования явилось определение возможной роли ВГЕ в смертности и снижении продуктивности у кур с синдромом гепато-спленомегалии в птицеводческих хозяйствах РК.

Материалы и методы исследования

Для вирусологических, гистологических и гематологических исследований от больных и павших птиц собраны клоакальные, трахеальные смывы, кусочки внутренних органов и образцы крови.

Смывы собирали стерильными ватными тампонами, помещали во флаконы со средой 199, содержащей комплекс антибиотиков (пенициллин 2000 ед/мл, стрептомицин 2 мг/мл, гентамицин 50 мкг/мл, нистатин 50 ед/мл) и бычий сывороточный альбумин (0,5%/л). Для помета и клоакальных смывов концентрацию антибиотиков увеличивали в пять раз. Пробы до вирусологических исследований хранили в жидком азоте (-196°C).

Для гистологических и патологоанатомических исследований тушки вскрывали, при внешнем осмотре учитывали размеры тела, вес, упитанность, состояние кожи, слизистых оболочек. Из павших цыплят получены кусочки внутренних органов (печень, почка, селезенка, легкие, кишечник). Ткани фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, после промывки в воде проводили обезвоживание в спиртах восходящей крепости, пропитывали парафином. Затем готовили гистосрезы толщиной 3–5 мкм, окраску срезов проводили гематоксилином и эозином по Ван-Гизону, окрашивали по общепринятой методике [12], микрофото препаратов снимали при помощи микроскопа марки «Leica» EVOS XL Core, (Thermo Fisher Scientific). Мазки крови от больных цыплят фиксировали в 96% спирте и окрашивали по Романовскому [13]. Для молекулярно-генетических исследований пробы органов и тканей гомогенизировали в криопробирках с транспортировочной средой при помощи нержавеющей стальных шариков в автоматическом высокоскоростном гомогенизаторе закрытого типа TissueLyzer II (QIAGEN). Выделение РНК из гомогенатов органов проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden) в соответствии с рекомендациями производителя. РНК экстрагировали из 140 мкл клинических образцов и элюировали в окончательном объеме 60 мкл деионизированной воды.

Вирусоспецифические РНК выявляли в биопробе в одношаговой обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции с применением набора Access One-Step RT-PCR Kit (Promega) согласно инструкции с использованием праймеров к консервативному фрагменту гена хеликазы ВГЕ AHEV F: 5'- TGT TAT TCAC CCAC CAA GAAC GTCTG - 3'; Helic R: 5'- CCTCAGTGGACCGTATATCGACCC, охватывающему фрагмент в 452 пар оснований.

Реакцию проводили в термоциклере Eppendorf Gradient при следующих параметрах: обратная транскрипция при 48°C 45 мин, начальная 2 мин денатурация при 95°C и амплификация в 40 циклов, включающая денатурацию (94°C, 60 сек), отжиг праймеров (42°C, 60 сек) и удлинение цепи (72°C, 60 сек) с последующей окончательной элонгацией при 72°C, 10 мин.

Результаты и обсуждение

Летом 2014 г. в одном из птицев хозяйств пригорода г.Алматы обнаружено заболевание неизвестной этиологии, сопровождавшееся гибелью цыплят месячного возраста. У больных птиц отмечали общее угнетение, постепенное ослабление с летальным исходом.

При вскрытии трупов установлены: значительное увеличение объема (в 4–6 раз) печени, тестоватость консистенции, подкапсульные кровоизлияния в ней. Селезенка была увеличена в 3–4 раза, и на разрезе находились полупрозрачные зерна. У птиц наблюдались сгустки крови, серозная жидкость в области грудной полости.

В мазках крови находили множество зернистых лейкоцитов и отмечали уменьшение количество лимфоцитов. В паренхиме печени и почек выявлены зернистая дистрофия и некротические изменения. Многие кровеносные сосуды были сдавленными и пустыми, балочное строение печени повсеместно было нарушено, в пространствах наблюдалось отложение амилоида. В междольковой соединительной ткани печени находили очаги клеточной инфильтрации, состоящие из лимфоцитов и эозинофилов с примесью плазматических клеток (рисунок 1); выявлены гнездные скопления клеточных элементов в мезенхиме, также отмечено резкое увеличение размера селезенки и лимфоидных фолликулов.

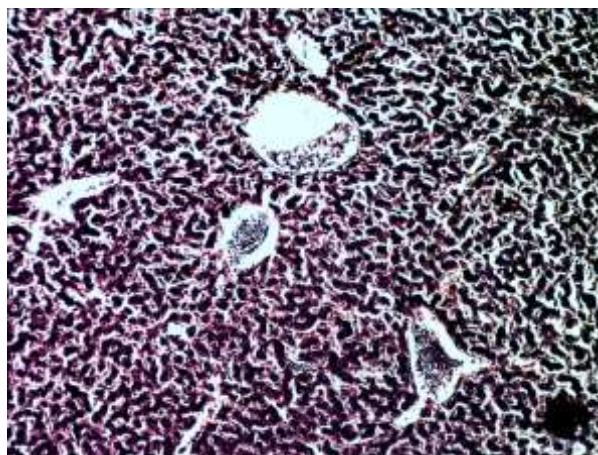
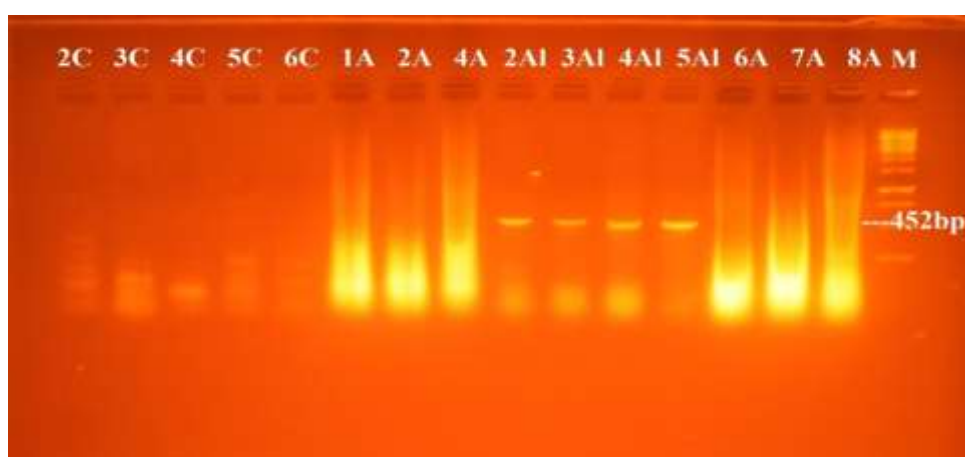


Рисунок 1 – Печень павшего цыпленка. Дискомплексация балок и некрозы гепатоцитов. Гематоксилин-эозин. М ×10

Патологические и гистологические изменения с преимущественным поражением печени и селезёнки, массовость заболевания указывали на возможность поражения птиц вирусной инфекцией характеризующейся гепатолиенальным синдромом.

С целью установления возможного инфицирования цыплят ВГЕ птиц проводили ОТ-ПЦР к консервативному фрагменту гена хеликазы ВГЕ. В четырех исследованных образцах обнаружена РНК вируса, охватывающая фрагмент в 452 пары оснований (рисунок 2).



Примечание – М молекулярный маркер, 2С по 6С пробы птиц, 1А по 8А пробы из птицефабрики №1, 2А1, 3А1, 4А1, 5А1 пробы птицефабрики №2

Рисунок 2 – фрагмент РНК вируса, охватывающий 452 пары оснований

В пробах птицефабрики №2. – 2А1, 3А1, 4А1, 5А1 обнаружена РНК ВГЕ, в остальных пробах РНК данного вируса отсутствовала.

Заключение

Вирус гепатита Е связан с синдромом большой печени и селезёнки (BLS), также называемым синдромом гепато-спленомегалии. Впервые он обнаружен у кур в Австралии в 1980-х гг. [1], в Европе зарегистрирован в Италии и Венгрии в 2004–2005 гг. [14, 15]. В Польше ветеринары наблюдали случаи заболевания BLS в 2007 г., хотя первые частичные последовательности генов польских изолятов ВГЕ описаны и представлены в GenBank в 2010 г. [16].

По данным Х. J Meng, Н L Shivoprosad [17] от субклинических форм птичьего ВГЕ страдают преимущественно взрослые несушки, бройлеры и работники ферм, при этом

производство яиц снижается до 20% в неделю, а смертность увеличивается до 1%, возбудитель также выделяется от здоровых кур [18].

Помимо других факторов (например, иммунного статуса птиц), генетические различия между изолятами ВГЕ могут быть причиной различной степени их патогенности и инфекционной дозы [19].

Обнаруженные в нашем исследовании увеличенные печень и селезёнка, субкапсулярные кровоизлияния в печени и кровянистая жидкость в висцеральной полости являются типичными патологическими повреждениями при ВГЕ. Таким образом, описанные выше патологоанатомические и гистологические изменения, а также результаты ПЦР анализа органов больных цыплят свидетельствуют о наличии ВГЕ птиц в хозяйствах на территории РК.

Финансирование

Настоящее исследование финансируется Комитетом науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (грант №AP08053014).

Литература:

- 1 Payne C.J. Big liver and spleen disease. In: Diseases of poultry / Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, D.E. Swayne (eds.). Ames, Iowa State Press, 2003: 1184-1186 (doi: 10.1016/S0378-1135(99)00067-X).
- 2 Shivaprasad H.L. Hepatitis splenomegaly syndrome. In: Diseases of poultry / Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, D.E. Swayne (eds.). Ames, Iowa State Press, 2003: 1186-1188.
- 3 Peralta B., Biarnes M., Ordonez G., Porta R., Martin M., Mateu E., Pina S., Meng X.J. Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain // Vet. Microbiol., 2009, 137: 31-36 (doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.010).
- 4 Irza V., Sprygin A. Big liver and spleen syndrome is a new viral disease in Russian chicken flocks // Agricultural Biology, 2012, 4: 73-77 (<http://www.agrobiology.ru/4-2012irza-eng.html>).
- 5 Morrow C.J., Samu G., Matrai E., Klausz A., Wood A.M., Richter S., Jaskulska B., Hess M. Avian hepatitis E virus infection and possible associated clinical disease in broiler breeder flocks in Hungary // Avian Pathol., 2008, 37: 527-535 (doi: 10.1080/03079450802356946).
- 6 Massi P., Tosi G., Gelmetti D., Lavazza A., Lombardi G., Torcoli G. Big liver and spleen disease in broiler breeders in Italy // Ital. J. Anim. Sci., 2005, 4: 303-305.
- 7 Zhao Q., Zhou E.M., Dong S.W. et al. Analysis of avian hepatitis E virus from chickens, China // Emerg Infect Dis., 2010, 16(9): 1469-1472.
- 8 Marek A., Bilic L., Prokofieva L., Hess M. Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising at least three different genotypes // Vet. Microbiol., 2010, 145: 54-61 (doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.014).
- 9 Payne C.J., Ellis T.M., Plant S.L., Gregory A.R., Wilcox G.E. Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus // Vet Microbiol. 1999 Aug 16; Vol.68(1-2). P.119-25.
- 10 Agunos A.C. Avian hepatitis E virus in an outbreak of hepatitis-splenomegaly syndrome and fatty liver haemorrhage syndrome in two flaxseed-fed layer flocks in Ontario / A.C.Agunos, D.Yoo, S.A.Youssef, D.Ran, B.Binnington, D.B.Hunter // Avian Pathology. – 2006. – V. 35. – № 5. – P. 404-412.
- 11 Кравчинский К. Гепатит Е / К.Кравчинский // Гепатология. – 1993. – № 17. – С. 932-941.
- 12 Шалгимбаева С.М., Кобегенова С.С., Нуршин К.А. «Микротехника негізери» // Алматы 2007. С.19.
- 13 Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А. Окраска мазков по Романовскому // В кн. Клиническая гематология животных. М.Колос. 1974, С.69-70.
- 14 Massi P., Tosi G., Gelmetti D., Lavazza A., Lombardi G., Torcoli G., Big liver and spleen disease in broiler breeders in Italy // J Anim Sci. 2005; Vol.4. P.303–305.
- 15 Morrow CJ, Samu G, Matrai E, Klausz A, Wood AM, Richter S, Jaskulska B, Hess M. Avian hepatitis E virus infection and possible associated clinical disease in broiler breeder flocks in Hungary // Avian Pathol. 2008. Vol. 37. P.527-535. doi: 10.1080/03079450802356946.

16 Marek A., Bilic I., Prokofieva I., Hess M. Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising at least three different genotypes // *Vet Microbiol.* 2010; Vol. 145, P.54-61. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.014.

17 Meng X.J., Shivaprasad H.L. Avian Hepatitis E Virus Infections // In D.E. Swayne (Ed.). *Diseases of Poultry* 2013. P.494-512.

18 Sun Z.F., Larsen, C.T., Dunlop, A., Huang, F.F., Pierson, F.W., Toth, T.E., Meng X.J. Genetic identification of avian hepatitis E virus (HEV) from healthy chicken flocks and characterization of the capsid gene of 14 avian HEV isolates from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in different geographical regions of the United States // *Journal of General Virology.* 2004. Vol. 85. P.693-700. 10.1099/vir.0.19582-0

19 Billam P., Sun Z.F., Meng X.J. Analysis of the complete genomic sequence of an apparently avirulent strain of avian hepatitis E virus (avian HEV) identified major genetic differences compared with the prototype pathogenic strain of avian HEV // *Journal of General Virology*, May 2007. Vol. 88 P.1538-1544. 10.1099 / vir.0.82754-0

Б. Б. БАЙМАХАНОВА^{1*}, А.Б. СЕЙДАЛИНА¹, С.А. СУЛЕЙМЕНОВА¹,
Е.Т. ҚАСЫМБЕКОВ¹, Е.Я. ХАН¹, К.О. ҚАРАМЕНДИН¹,
А.И. ҚЫДЫРМАНОВ¹, С.Р. ФЕРЕЙДОУНИ²

¹Микробиология және вирусология ғылыми өндірістік орталығы, Алматы, Қазақстан

²Вена ветеринариялық медицина университеті, Вена, Австрия

*e-mail: bbbayken@mail.ru

ҚАЗАҚСТАНДАҒЫ ҚҰСТАРДЫҢ Е ГЕПАТИТИ

Түйін

Мақалада бір айлық тауықтарда этиологиясы белгісіз ауру ошағы кезінде Алматы (Қазақстан) қаласының маңындағы құс фабрикасында анықталған Е гепатиті вирусын зерттеу сипатталған. Бауыр мен бүйрек паренхимасында түйіршікті дистрофия және некроздық өзгерістер, көкбауыр мен лимфоидты фолликулалардың күрт ұлғаюы анықталды. Е гепатиті вирусының геликаз генінің консервативті фрагментіне КТ-ПТР төрт үлгіде вирустық РНҚ анықталуы, қоздырғыштың болуын растайды.

Түйінді сөздер: құс, гепатит Е вирусы, КТ-ПТР, гистологиялық зерттеулер

IRSTI: 34.25.00

B.B. BAIMAKHANOVA^{1*}, A.B. SEIDALINA¹, S.A. SULEIMENOVA¹,
E.T. KASYMBEKOV¹, E.YA. KHAN¹, K.O. KARAMENDIN¹,
A.I. KYDYRMANOV¹, S.R. FEREIDOUNI²

¹Scientific Production Center of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria.

*e-mail: bbbayken@mail.ru

AVIAN HEPATITIS E IN KAZAKHSTAN

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.05

Abstract

The article describes the study of hepatitis E virus detected in a poultry farm in the suburbs of Almaty (Kazakhstan), during an outbreak of a disease of unknown etiology in 30-day old chickens. In the parenchyma of the liver and kidneys, granular dystrophy and necrotic changes, a sharp increase in the size of the spleen and lymphoid follicles were revealed. Viral RNA were revealed In reverse transcription

polymerase chain reaction with primers directed to the conservative fragment of the hepatitis E virus helicase gene in four samples, confirming with the presence of the pathogen.

Keywords: poultry, hepatitis E virus, RT-PCR, histological studies

Hepatitis E virus (HEV) is an infectious disease of birds, mammals and humans caused by RNA-containing virus of the family *Hepeviridae*. In domestic chickens, hepatitis E has been registered in many countries of the world - in Australia, USA, Spain, Russia, Hungary, Italy, China [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7], Korea, Czech Republic, England, Ukraine, Poland, Israel [8].

The disease was first reported in chickens with Big liver and spleen syndrome (BLS) in Australia [9]. A disease known as hepatosplenomegaly syndrome has also been reported in the United States and Canada without any known causative agents or provoking factors. Molecular genetic studies have shown that the causative agents of BLS in Australia and hepatosplenomegaly in the United States are different variants of HEV with almost identical nucleotide sequences. Based on the significant similarity of their genomes to those of human and other animal HEVs, the causative agent of BLS is designated separately as avian HEV.

Infection of poultry with hepatitis E occurs in the alimentary way, transovarian route of virus transmission is also possible [10]. The disease in chickens develops from 24 weeks of age, and most chickens have no clinical manifestations. The productivity and egg production of the livestock are reduced, some have a sleepy state, there is a mass death of a healthy-looking bird [11]. Often viral hepatitis E is accompanied by yolk peritonitis. The infection can be diagnosed by pathological and morphological changes with mandatory confirmation by ELISA or PCR.

The purpose of this study was to determine the possible role of HEV in mortality and loss of productivity in chickens with hepatosplenomegaly syndrome in poultry farms of Kazakhstan.

Materials and research methods

Cloacal and tracheal wipes, pieces of internal organs and blood samples were collected from sick and dead birds for virological, histological and hematological studies.

Washouts were collected with sterile cotton swabs, placed into vials with medium 199 containing a complex of antibiotics (penicillin 2000 U/ml, streptomycin 2 mg/ml, gentamicin 50 µg/ml, nystatin 50 U/ml) and bovine serum albumin (0.5% /l). For litter and cloacal washings, the concentration of antibiotics was increased five times. Samples were stored in liquid nitrogen (-196°C) before virological studies.

For histological and pathoanatomical studies, the carcasses were dissected; during an external examination, the body size, weight, fatness, condition of the skin, mucous membranes were taken into account. Pieces of internal organs (liver, kidney, spleen, lungs, intestines) were obtained from dead chickens. The tissues were fixed in a 10% neutral formalin solution, after washing in water, they were dehydrated in alcohols of increasing strength, and soaked in paraffin. Then, histosections 3-5 µm thick were prepared, the sections were stained with hematoxylin and eosin according to Van Gieson, stained according to the generally accepted method [12], microphotograph preparations were taken using a Leica EVOS XL Core microscope (Thermo Fisher Scientific). Blood smears from sick chickens were fixed in 96% alcohol and stained according to Romanovsky [13]. For molecular genetic studies, samples of organs and tissues were homogenized in cryovials with a transport medium using stainless steel balls in an automatic high-speed homogenizer of a closed type TissueLyzer II (QIAGEN). RNA isolation from organ homogenates was performed using the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden) according to the manufacturer's recommendations. RNA was extracted from 140 µl of clinical samples and eluted in a final volume of 60 µl of deionized water.

Virus-specific RNA was detected in a bioassay in a one-step reverse transcription-polymerase chain reaction using the Access One-Step RT-PCR Kit (Promega) according to instructions using primers to the conserved fragment of the AHEV helicase gene: 5'-TGT TAT TCAC CCAC CAA GAAC GTCTG -3'; Helic R: 5'-CCTCAGTGGACCGTATCATGACCC, spanning a 452 base pair fragment.

The reaction was performed in an Eppendorf Gradient thermocycler under the following parameters: reverse transcription at 48°C 45 min, initial 2 min denaturation at 95°C, and amplification in 40 cycles including denaturation (94°C, 60 sec), primer annealing (42°C, 60 sec) and chain extension (72°C, 60 sec) followed by final elongation at 72°C, 10 min.

Results and discussion

In the summer of 2014, a disease of unknown etiology, accompanied by the death of one-month-old chickens, was found in one of the poultry farms in the suburbs of Almaty. The sick birds showed general depression, gradual weakening with lethal outcome.

At autopsy, the following were established: a significant increase in the volume (4-6 times) of the liver, testiness of the consistency, subcapsular hemorrhages in it. The spleen was enlarged 3-4 times, and translucent grains were found on the section. Blood clots and serous fluid in the thoracic cavity were observed in the birds.

In blood smears, many granular leukocytes were found and a decrease in the number of lymphocytes was noted. In the parenchyma of the liver and kidneys, granular dystrophy and necrotic changes were revealed. Many blood vessels were compressed and empty, hepatic bar structure was disturbed everywhere, amyloid deposition was observed in spaces between them. In the interlobular connective tissue of the liver, foci of cell infiltration were found, consisting of lymphocytes and eosinophils with an admixture of plasma cells (Figure 1); nested accumulations of cellular elements in the mesenchyme were revealed, and a sharp increase in the spleen and lymphoid follicles was also noted.

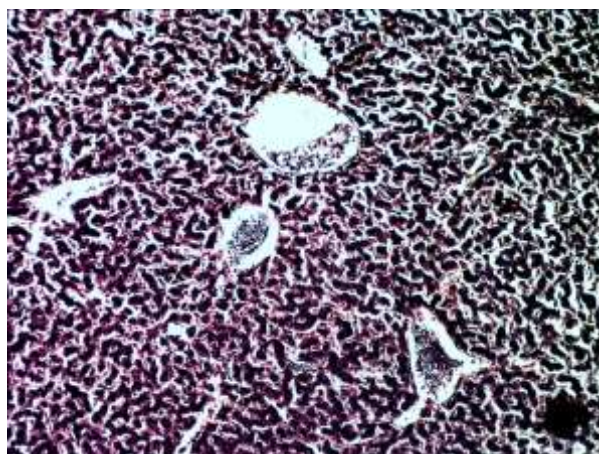
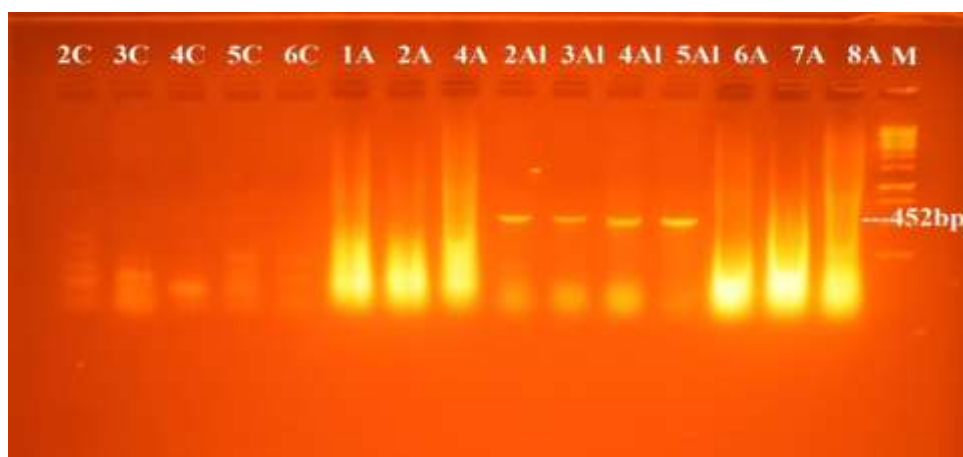


Figure 1 - Liver of a fallen chicken. Discomplexation of bars and necrosis of hepatocytes.
Hematoxylin-eosin. M $\times$ 10

Pathological and histological changes with a predominant lesion of the liver and spleen, the mass nature of the disease indicated the possibility of birds being affected by a viral infection characterized by hepatolienal syndrome.

In order to determine the possible infection of chickens with avian hepatitis E viruses, PCR was performed to identify the pathogen. During RT-PCR to a conservative fragment of the HEV helicase gene revealed viral RNA covering a fragment of 452 base pairs in the four samples examined (Figure 2).



Note - M molecular marker, 2C to 6C bird samples, 1A to 8A samples from poultry farm #1, 2Al, 3Al, 4Al, 5Al samples from poultry farm #2

Figure 2 – RNA fragment of the virus covering 452 base pairs

In the samples of poultry farm No. 2. – 2Al, 3Al, 4Al, 5Al HEV RNA was detected, in other samples RNA of this virus was absent.

Conclusion

Hepatitis E virus is associated with large liver and spleen syndrome (BLS), also called hepato-splenomegaly syndrome. It was first discovered in chickens in Australia in the 1980s. [1], in Europe it was registered in Italy and Hungary in 2004-2005. [14, 15]. In Poland, veterinarians observed cases of BLS in 2007, although the first partial gene sequences of Polish HEV isolates were described and presented in GenBank in 2010 [16].

According to X. J. Meng, H. L. Shivoprosad [17], subclinical forms of avian HEV predominantly affect adult layers, broilers and farm workers, with egg production decreasing to 20% per week and mortality increasing to 1%; the pathogen is also isolated from healthy hens [18].

In addition to other factors (e.g., the immune status of birds), genetic differences between HEV isolates may account for their varying degrees of pathogenicity and infective dose [19].

Enlarged liver and spleen, subcapsular hemorrhages in the liver, and bloody fluid in the visceral cavity found in our study are typical pathological lesions in HEV. Thus, the pathoanatomical and histological changes described above, as well as the results of PCR analysis of the organs of sick chickens, indicate the presence of avian HEV in farms in the territory of the Republic of Kazakhstan.

Funding

This study is funded by the Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (grant no. AP08053014).

References:

- 1 Payne C.J. Big liver and spleen disease. In: Diseases of poultry. Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, D.E. Swayne (eds.). Ames, Iowa State Press, 2003: 1184-1186 (doi: 10.1016/S0378-1135(99)00067-X).
- 2 Shivaprasad H.L. Hepatitis splenomegaly syndrome. In: Diseases of poultry. Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, D.E. Swayne (eds.). Ames, Iowa State Press, 2003: 1186-1188.
- 3 Peralta B., Biarnes M., Ordonez G., Porta R., Martin M., Mateu E., Pina S., Meng X.J. Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. Vet. Microbiol., 2009, 137: 31-36 (doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.010).

- 4 Irza V. , Sprygin A. Big liver and spleen syndrome is a new viral disease in Russian chicken flocks // *Agricultural Biology*, 2012, 4: 73-77 (<http://www.agrobiology.ru/4-2012irza-eng.html>).
- 5 Morrow C.J., Samu G., Matrai E., K1ausz A., Wood A.M., Richter S., Jaskulska B., Hess M. Avian hepatitis E virus infection and possible associated clinical disease in broiler breeder flocks in Hungary // *Avian Pathol.*, 2008, 37: 527-535 (doi: 10.1080/03079450802356946).
- 6 Massi P., Tosi G., Gelmetti D., Lavazza A., Lombardi G., Torcoli G. Big liver and spleen disease in broiler breeders in Italy. *Ital. J. Anim. Sci.*, 2005, 4: 303-305.
- 7 Zhao Q., Zhou E.M., Dong S.W. et al. Analysis of avian hepatitis E virus from chickens, China. *Emerg Infect Dis.*, 2010, 16(9): 1469-1472.
- 8 Marek A., Bilic L., Prokofieva L., Hess M. Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising at least three different genotypes. *Vet. Microbiol.*, 2010, 145: 54-61 (doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.014).
- 9 Payne C.J., Ellis T.M., Plant S.L., Gregory A.R., Wilcox G.E. Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet Microbiol.* 1999 Aug 16; Vol.68(1-2). P.119-25.
- 10 Agunos A.C. Avian hepatitis E virus in an outbreak of hepatitis-splenomegaly syndrome and fatty liver haemorrhage syndrome in two flaxseed-fed layer flocks in Ontario / A.C.Agunos, D.Yoo, S.A.Youssef, D.Ran, B.Binnington, D.B.Hunter. *Avian Patology*. 2006. V.35. № 5: 404-412.
- 11 Kravchinskij K. Gepatit E. K.Kravchinskij. *Gepatologiya*. 1993. 17: 932-941.
- 12 S. Halgimbaeva S.M., Kobegenova S.S., Nurshin K.A. «Mikrotehnika negizeri». *Almaty*. 2007: 19.
- 13 Kudryavcev A.A., Kudryavceva L.A. Okraska mazkov po Romanovskomu. V kn. *Klinicheskaya gematologiya zhivotnyh*. M.Kolos. 1974, S.69-70.
- 14 Massi P., Tosi G., Gelmetti D., Lavazza A., Lombardi G., Torcoli G., Big liver and spleen disease in broiler breeders in Italy. *J Anim Sci*. 2005; Vol.4. P.303–305.
- 15 Morrow CJ, Samu G, Matrai E, Klausz A, Wood AM, Richter S, Jaskulska B, Hess M. Avian hepatitis E virus infection and possible associated clinical disease in broiler breeder flocks in Hungary // *Avian Pathol*. 2008. Vol. 37: 527-535. doi: 10.1080/03079450802356946.
- 16 Marek A., Bilic I., Prokofieva I., Hess M. Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising at least three different genotypes. *Vet Microbiol*. 2010; Vol. 145, P.54-61. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.014.
- 17 Meng X.J., Shivaprasad H.L. Avian Hepatitis E Virus Infections. In D.E. Swayne (Ed.). *Diseases of Poultry* 2013: 494-512.
- 18 Sun Z.F., Larsen, C.T., Dunlop, A., Huang, F.F., Pierson, F.W., Toth, T.E., Meng X.J. Genetic identification of avian hepatitis E virus (HEV) from healthy chicken flocks and characterization of the capsid gene of 14 avian HEV isolates from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in different geographical regions of the United States. *Journal of General Virology*. 2004. Vol. 85. P.693-700. 10.1099/vir.0.19582-0
- 19 Billam P., Sun Z.F., Meng X.J. Analysis of the complete genomic sequence of an apparently avirulent strain of avian hepatitis E virus (avian HEV) identified major genetic differences compared with the prototype pathogenic strain of avian HEV. *Journal of General Virology*, May 2007. Vol. 88 P.1538-1544. 10.1099. vir.0.82754-0

МРНТИ: 62.09.39

Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА¹, Р.К. БЛИЕВА¹, Н.А. БИСЬКО², А.С. ЖАКИПБЕКОВА^{1*},
Ж.Б. НАРМУРАТОВА³, М.Н. АХМЕТЖАНОВА⁴, А.К. КАЛИЕВА⁵

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Институт ботаники имени Н.Г. Холодного, Киев, Украина

³Казахский национальный технический университет им. К. Сатпаева, Алматы, Казахстан

⁴Казахский Национальный Аграрный Исследовательский Университет, Алматы,
Казахстан

⁵Актюбинский региональный университет имени К. Жубанова, Актобе, Казахстан

*e-mail: aika90aiko@mail.ru

СКРИНИНГ МИКРОМИЦЕТА РОДА *ASPERGILLUS* ПО СПОСОБНОСТИ К БИОСИНТЕЗУ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.06

Аннотация

В статье приведены результаты исследования скрининга высокоактивного штамма *Aspergillus niger* 355 для дальнейшего использования в кормопроизводстве. Культуру выращивали в течение 45 суток при температуре 26-28°C на оптимизированной ранее питательной среде. Установлено, что после 6-9 суток культивирования наблюдается стабилизация биосинтеза фермента. Наибольшая целлюлазная активность наблюдалась на 9, 18 и 45 сутки культивирования. Активность целлюлазы варьировала от 1,63 до 3,5 ед/мл.

При периодическом же культивировании *Aspergillus niger* 355 максимум образования фермента наблюдался на 3 сутки и составил 1.63 ед/мл с последующим падением ферментативной активности.

Ключевые слова: комбикорм, целлюлаза, *Aspergillus*, селекция, биосинтез

Основу комбикормов для птицы составляют семена зерновых и зернобобовых культур, являющиеся основными источниками питательных веществ и энергии [1]. Однако зерновые корма, наряду с питательными и биологически активными соединениями, содержат антипитательные вещества: некрахмалистые полисахариды, фитаты, ингибиторы пищеварительных ферментов, гликозиды, алкалоиды, танины и др. Эти вещества ухудшают перевариваемость корма, снижают его конверсию.

В желудочно-кишечном тракте сельскохозяйственных животных отсутствуют ферменты, катализирующие деградацию клетчатки – основного некрахмалистого полисахарида входящего в состав корма и являющегося антипитательным фактором. В кишечнике растворимая клетчатка может образовывать высоковязкие гели, увеличивающие объем и массу химуса и замедляющие скорость его прохождения, проникновение ферментов и переваривание, что приводит к затруднению процессов всасывания питательных веществ, [2-4].

Наиболее эффективным решением проблемы деградации трудногидролизуемых растительных остатков, поднятия перевариваемости и обогащения кормов легкоусвояемыми источниками углерода является применение в качестве добавок к корму экзогенных ферментов микробного происхождения, которые способствуют разрушению клеточных стенок растений, гидролизуя крупные молекулы некрахмалистых полисахаридов, что, в конечном счете, обеспечивает улучшение переваримости питательных веществ.

Наиболее перспективными продуцентами целлюлозоразрушающих ферментов являются мицелиальные грибы *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma* [5-7]. Долгое время рост производства ферментных препаратов сдерживался из-за отсутствия активных

штаммов микроорганизмов. Поэтому задача получения высокоактивных штаммов продуцентов ферментов является первоочередной и актуальной.

Целью данного исследования было селекционное улучшение ферментативных свойств микроскопического гриба *Aspergillus niger* 355 – продуцента целлюлазы.

Объекты и методы исследования

Объектом исследований служил штамм *A. niger* 355 из коллекции ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии». В работе использовались общепринятые микробиологические и биохимические методы исследований. Исходную культуру выращивали на оптимизированной ранее питательной среде Чапека, содержащую (в г/л): сахарозу – 10; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,15%) – 9; KCl – 0,5; MgSO_4 – 0,5; KH_2PO_4 – 1; FeSO_4 – 0,001; пектин – 1 г/100 мл.

Для выявления активного варианта, сформированного на подложке, проводили отбор изолятов в разные периоды длительного культивирования, для чего отбирали изоляты на I, II и последующих этапах культивирования, связанных с периодичностью снятия мицелия с подложки. Пробы отбирали путем выщипывания мицелия с поверхности и из глубины иммобилизованной структуры. Готовили суспензию клеток в концентрации 170 000 конидий в 1 мл для посева на агаризованную питательную среду. Полученную взвесь – обрывки мицелия, одиночные клетки и клетки, собранные в цепочки, фильтровали через стеклянный фильтр с многослойной стерильной фильтровальной бумагой в стерильную пробирку. Фильтрованную взвесь разводили стерильной водой до нужной концентрации в соотношении 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000 и высевали на агаризованную среду в чашки Петри. В каждую чашку вносили по 0,1 мл разведенной взвеси, которую растирали на поверхности агаризованной среды с помощью стерильного шпателя. Засеянные чашки инкубировали в течение 3-6 суток при 28-30°C. После инкубации проводили подсчет выросших на чашках колоний. Полученные варианты выделяли в чистую культуру, которые затем выращивали в периодических условиях в течение 3-4 суток в жидкой питательной среде. В полученной культуральной жидкости определяли активность целлюлазы.

Определение активности целлюлозоразрушающих ферментов проводили по ГОСТу 31662-2012 [8]. Метод основан на количественном определении восстанавливающих сахаров, образующихся при действии ферментов целлюлолитического комплекса на натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ). Содержание восстанавливающих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяли спектрофотометрическим методом с реактивом денитросалициловой кислоты (ДНС). Расчет ферментативной активности проводили по градуировочному графику, построенному для глюкозы.

Реактив Динитросалициловая кислота (ДНС) с массовой долей 1% готовили следующим образом: в стакан вместимостью 1000 мл вносили 10,0 г ДНС, добавляли 400 мл дистиллированной воды и перемешивали на магнитной мешалке в течение 25-30 мин, при комнатной температуре. Затем постепенно, при постоянном перемешивании, добавляли 150 мл раствора гидроксида натрия (10,7%-й NaOH). При этом окраска раствора менялась от светло-желтой до ярко-зеленой. Стакан с полученным раствором помещали в водяную баню с температурой $47 \pm 1^\circ\text{C}$ и постепенно, небольшими порциями добавляли 300 г виннокислого калия-натрия. Перемешивание продолжали до полного растворения реактива. Раствор охлаждали холодной водой до комнатной температуры и доводили объем до 1000 мл дистиллированной водой.

Анализ проводили в двух параллельных определениях. Для определения целлюлазной активности одного варианта использовали три пробирки (2 опытные и одну контрольную), в которые вносили по 1 мл субстрата и термостатировали при $50 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 5 минут. В две опытные пробирки вносили по 1 мл рабочего раствора ферментного препарата. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и выдерживали

при температуре $50 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 10 минут. После проведения гидролиза в две опытные пробирки вносили по 3 мл реактива ДНС, в третью пробирку (контрольную) добавляли 3 мл реактива ДНС и 1 мл рабочего раствора препарата. Затем смеси тщательно перемешивали и помещали в кипящую водяную баню на 5 мин, после чего охлаждали до комнатной температуры. Оптические плотности опытных и контрольных проб измеряли на спектрофотометре PD-303 UV (фирмы Arcl, Япония) при длине волны 540 нм против контрольной пробы на реактивы. Целлюлолитическую активность КМЦЛА, ед/г, в ферментном препарате вычисляли по формуле:

$$\text{КМЦЛА} = \frac{C_0 + C_K}{t \cdot c}$$

где C_0 – молярная концентрация глюкозы в опытной пробе, найденная по градуировочному графику, мкмоль/см³;

C_K – молярная концентрация глюкозы в контрольной пробе, найденная по градуировочному графику, мкмоль/см³;

t – продолжительность гидролиза, мин (10 мин);

c – массовая концентрация ферментного препарата в реакционной смеси, г/см³.

Статистическую обработку результатов исследований проводили по общепринятым критериям вариационно-статистического анализа с вычислением средних величин (M), ошибки средней арифметической (m) с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel, 2010. Оценку статистической значимости различий средних величин проводили по стандартной методике, описанной С. Гланцом [9]. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

С целью изучения ферментообразующей способности *A. niger* 355 на разных этапах длительного культивирования продуцент выращивали в течение 45 суток при температуре $26-28^\circ\text{C}$ на оптимизированной ранее питательной среде (рисунок 1).

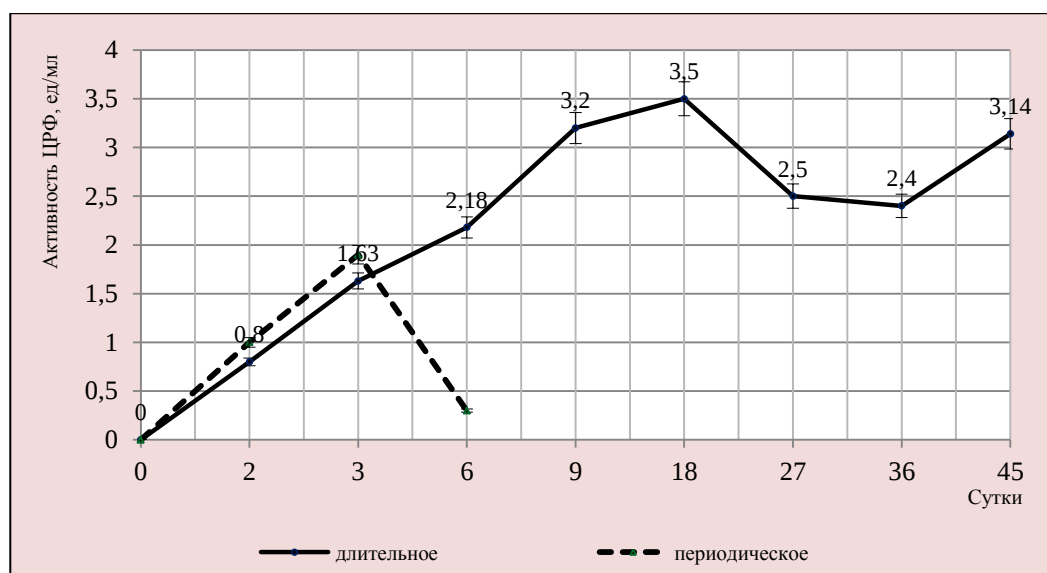


Рисунок 1 – Активность целлюлазы при длительном и периодическом культивировании *Aspergillus niger* 355

Иммобилизация культуры на подложке создает условия для непрерывного и длительного, на протяжении 45 суток, получения целевых ферментов. При проведении длительного культивирования установлено, что после 6-9 суток культивирования

наблюдается стабилизация в образовании ферментов. Наибольший биосинтез целлюлозоразрушающих ферментов наблюдается на 9, 18 и 45 сутки культивирования. Активность целлюлазы варьировала от 1,63 до 3,5 ед/мл (рисунок 1). При периодическом же культивировании полученной ассоциации максимум образования ферментов наблюдается на 3 сутки (1,63 ед/мл) с последующим падением активности к 5-6 суткам культивирования.

При длительном выращивании иммобилизованных микроорганизмов на подложке формируется множество различных вариантов, среди которых образуется и высокоактивный. Предпосылкой для формирования активного варианта являются стрессы, которые испытывает культура в процессе длительного культивирования. Это механическое повреждение гиф при удалении скапливающегося мицелия с подложки, условия смены питательной среды – с обедненной на полноценную, и сам процесс длительного культивирования. С ростом продуктивности иммобилизованной культуры появляется возможность выделения активных вариантов, обладающих повышенной ферментативной активностью.

Для выявления активного варианта *A. niger* 355 пробы исследовались на I этапе (6 сутки), II этапе (18 сутки) и III этапе (45 сутки) длительного культивирования. Пробы отбирались путем выщипывания клеток с иммобилизованной на подложке культуры. Всего отобрано 14 изолятов: на I этапе длительного культивирования отобрано 5, на II этапе – 4 и на III этапе – 5 изолятов. Ферментативная активность изолятов, выделенных на I этапе длительного культивирования составила $2,9 \pm 0,7$ - $3,3 \pm 1,2$ ед/мл. Ферментативная активность изолятов, выделенных на II этапе длительного культивирования составила $3,4 \pm 0,9$ - $3,7 \pm 1,1$ ед/мл и на III этапе - $2,2 \pm 0,5$ - $2,8 \pm 0,6$ ед/мл (таблица 1).

Таблица 1 – Ферментативная активность изолятов, полученных на разных этапах длительного культивирования *A. niger* 355

Изоляты		ЦРФ (ед/мл)
I этап	1-1	$3,1 \pm 1,2$
	1-2	$2,9 \pm 0,7$
	1-3	$3,0 \pm 0,6$
	1-4	$3,3 \pm 1,2$
	1-5	$3,1 \pm 0,7$
II этап	2-6	$3,4 \pm 0,9$
	2-7	$3,7 \pm 1,1$
	2-8	$3,6 \pm 0,6$
	2-9	$3,5 \pm 1,1$
III этап	5-10	$2,6 \pm 1,0$
	5-11	$2,8 \pm 0,6$
	5-12	$2,7 \pm 0,8$
	5-13	$2,2 \pm 0,5$
	5-14	$2,0 \pm 0,7$

Самую высокую ферментативную активность обнаружил изолят *A. niger* 355 2-7, выделенный во втором этапе длительного культивирования, ферментативная активность которого составила $3,7 \pm 1,1$ ед/мл.

Таким образом, в ходе селекции штамма *A. niger* 355 получен активный изолят *A. niger* 355 2-7, целлюлазная активность которого выше исходной культуры в 10,9 раз. В целом, хочется отметить, что примененный в данной работе метод иммобилизации прост и доступен. При его реализации отсутствуют факторы, повреждающие микробные клетки

и ингибирующие ферментативную активность, не затрудняется массообмен. Он даёт возможность разработки непрерывных биокаталитических технологий. Иммобилизация клеток интересна еще и тем, что микроорганизмы возвращаются в свое естественное прикрепленное состояние, изучение которого позволяет приблизиться к пониманию процессов, происходящих в природе.

Литература:

- 1 Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова, М.Т. Лутфуллин, Л.М. Богомольная, М.Р. Шарипова Биопрепараты микробного происхождения в птицеводстве. *Ученые записки казанского университета*, 2018, 160: 395-418 (<https://cyberleninka.ru/article/n/biopreparaty-mikrobnogo-proishozhdeniya-v-ptitsevodstve>).
- 2 Knudsen K.E. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poultry Science*, 2014, 93(9): 2380–2393 (doi.org/10.3382/ps.2014-03902).
- 3 Ravindran V., Son J.-H. Feed enzyme technology: Present status and future developments. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2011, 3(2): P. 102–109 (doi: 10.2174/2212798411103020102).
- 4 Adeola O., Cowieson A.J. Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve non-ruminant animal production. *Journal of Animal Sciences*, 2011, 89(10): P. 3189–3218 (doi: 10.2527/jas.2010-3715).
- 5 Manish P., Sonali M., Pradeep K., Hrudayanath T., Microbial cellulases – An update towards its surface chemistry, genetic engineering and recovery for its biotechnological potential. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125710 (doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125710).
- 6 Vaishnav N., Singh A., Adsul M., Dixit P. Penicillium: The next emerging champion for cellulase production. *Bioresource Technology Reports*, 2018, 2: P. 131-140 (doi.org/10.1016/j.biteb.2018.04.003).
- 7 Kubicek C., Messner R., Gruber F. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, 15(2): 90-99 (doi.org/10.1016/0141-0229(93)90030-6).
- 8 ГОСТ 32662-2012. Методы определения ферментной активности целлюлазы. Введ. 2014–01–01. М.: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации. III, 9 с.
- 9 Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., 1998.

Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА¹, Р.К. БЛИЕВА¹, Н.А. БИСЬКО², А.С. ЖАКИПБЕКОВА^{1*},
Ж.Б. НАРМУРАТОВА³, М.Н. АХМЕТЖАНОВА⁴, А.К. КАЛИЕВА⁵

¹Микробиология және вирусология ғылыми – өндірістік орталығы, Алматы,
Қазақстан

²Н.Г. Холодный атындағы Ботаника институты, Киев, Украина

³Қ. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық университеті, Алматы, Қазақстан

⁴Қазақ Ұлттық Аграрлық Зерттеу Университеті, Алматы, Қазақстан

⁵Қ.Жұбанов атындағы Ақтөбе өңірлік университеті, Ақтөбе, Қазақстан

*e-mail: aika90aiko@mail.ru

ASPERGILLUS ТЕКТЕС МИКРОМИЦЕТТЕРДІҢ ЦЕЛЛЮЛОЗА БИОСИНТЕЗІНЕ ҚАБІЛЕТТІЛІГІ БОЙЫНША СКРИНИНГІ

Түйін

Мақалада жем өндірісінде одан әрі пайдалану үшін *Aspergillus niger* 355 жоғары белсенді штаммының скринингі бойынша зерттеу нәтижелері берілген. Дақылды 45 күн бойы 26-28°C температурада бұрын оңтайландырылған коректік ортада өсірді. Өсіргеннен кейін 6-9 күннен кейін ферменттердің түзілуінің тұрақтануы байқалатыны анықталды. Целлюлозаны ыдырататын ферменттердің ең үлкен биосинтезі өсірудің 9, 18 және 45-ші күндерінде байқалады. Целлюлаза белсенділігі 1,63-тен 3,5 U/мл-ге дейін өзгерді.

Aspergillus niger 355-ті кезеңді түрде өсіру кезінде ферменттің максималды түзілуі 3-ші күні байқалды және 1,63 U/мл құрады, содан кейін белсенділіктің төмендеуі байқалады.

Кілтті сөздер: құрама жем, целлюлоза, *Aspergillus*, селекция, биосинтез

IRSTI: 62.09.39

ZH.B. SULEIMENOVA¹, R.K. BLIEVA¹, N.A. BISCO², A.S. ZHAKIPBEKOVA^{1*},
ZH.B. NARMURATOVA³, M.N. AKHMETZHANOVA⁴, A.K. KALIEVA⁵

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²N.G. Kholodny Institute of Botany, Kiev, Ukraine

³Satbayev University, Almaty, Kazakhstan

⁴Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

⁵K. Zhubanov Aktobe Regional University, Aktobe, Kazakhstan

*e-mail: aika90aiko@mail.ru

SCREENING OF ASPERGILLUS FUNGUS FOR CELLULASE BIOSYNTHESIS

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.06

Abstract

The article presents the results of a study on the screening of a highly active strain of *Aspergillus niger* 355 for further application in feed production. The culture was grown for 45 days at a temperature of 26-28°C on a previously optimized nutrient medium. It was found that after 6-9 days of cultivation, stabilization in enzymes biosynthesis was observed. The highest cellulase activity has been observed on the 9th, 18th and 45th days of fungal cultivation. Enzymatic activity varied from 1.63 to 3.5 U/ml.

In periodic cultivation of *Aspergillus niger* 355, the maximum enzymatic activity was observed on the 3rd day and was 1.63 U/ml, followed by a decrease in activity.

Key words: feed, cellulase, *Aspergillus*, selection, biosynthesis

The basis of feed for poultry is the seeds of grain and leguminous crops, which are the main sources of nutrients and energy [1]. However, grain feeds, along with nutritious and biologically active compounds, contain anti-nutritional substances: non-starchy polysaccharides,

phytates, inhibitors of digestive enzymes, glycosides, alkaloids, tannins, etc. These substances impair feed digestibility and reduce its conversion.

In the gastrointestinal tract of farm animals there are no enzymes that catalyze the degradation of fiber - the main non-starchy polysaccharide that is part of the feed and is an anti-nutritional factor. In the intestine, soluble fiber can form highly viscous gels that increase the volume and mass of chyme and slow down the rate of its passage, the penetration of enzymes and digestion, which leads to difficulty in the absorption of nutrients [2-4].

The most effective solution of the problem of degradation of plant residues that are difficult to hydrolyze and increasing digestibility and enriching feed with easily digestible carbon sources is the use of exogenous microbial enzymes. This contributes to the destruction of plant cell walls by hydrolyzing large molecules of non-starchy polysaccharides, which ultimately provides improving the digestibility of nutrients.

The most promising producers of cellulose-degrading enzymes are filamentous fungi *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* [5-7]. For a long time, the growth in the production of enzyme preparations was held back due to the lack of active strains of microorganisms. Therefore, the task of obtaining highly active strains of enzyme producers is a very important problem.

The aim of this study was to improve the enzymatic activity of microscopic fungus *Aspergillus niger* 355 - cellulase producer.

Materials and methods

The objects of research were the *A. niger* 355 strain from the collection of Research and Production Center for Microbiology and Virology. The work used standard microbiological and biochemical research methods. The initial culture was grown on an optimized Czapek medium containing (in g/l): sucrose – 10; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,15%) – 9; KCl – 0,5; MgSO_4 – 0,5; KH_2PO_4 – 1; FeSO_4 – 0,001; pectin - 1g / 100ml.

To identify the active variant formed on the substrate, isolates were selected at different periods of long-term cultivation, for which isolates were selected at stages I, II, and subsequent stages of cultivation associated with the frequency of removal of the mycelium from the substrate. Samples were taken by plucking mycelium from the surface and from the depth of the immobilized structure.

A cell suspension was prepared at a concentration of 170,000 conidia per 1ml for seeding on agar nutrient medium. The resulting suspension - fragments of mycelium, single cells and cells collected in chains, was filtered through a glass filter with multilayer sterile filter paper into a sterile test tube. The filtered suspension was diluted with sterile water to the required concentration in the ratio of 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000 and sown on the agar medium in Petri dishes. 0.1 ml of a diluted suspension was added to each dish, which was triturated on the surface of the agar medium using a sterile spatula. Seeded cups were incubated for 3-6 days at 28-30°C. After incubation, the colonies grown on the plates were counted. The resulting variants were isolated in pure culture, which were then grown under periodic conditions for 3-4 days in a liquid nutrient medium. Cellulase activity was determined in the obtained culture liquid.

Determination of the activity of cellulose-degrading enzymes was carried out according to GOST 31662-2012 [8]. The method is based on the quantitative determination of reducing sugars formed by the action of enzymes of the cellulolytic complex on the sodium salt of carboxymethyl cellulose (Na-CMC). The content of reducing sugars formed as a result of the enzymatic reaction was determined by the spectrophotometric method with the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent. Calculation of enzymatic activity was carried out according to the calibration curve constructed for glucose.

The DNS reagent with a mass fraction of 1% was prepared as follows: 10.0g of DNS was added to a beaker with a capacity of 1000 ml, 400 ml of distilled water was added and stirred on a magnetic stirrer for 25–30 min at room temperature. Then gradually, with constant stirring, 150

ml of sodium hydroxide solution (10.7% NaOH) was added. The color of the solution changes from light yellow to bright green. A beaker with the resulting solution was placed in a water bath at a temperature of $47 \pm 1^\circ\text{C}$ and gradually, in small portions, 300 g of potassium sodium tartrate was added. Stirring was continued until complete dissolution of the reagent. The solution was cooled with cold water to room temperature and made up to 1000 ml with distilled water.

The analysis was carried out in two parallel determinations. To determine the cellulase activity of one variant, three test tubes (2 experimental and one control) were taken, 1 ml of the substrate was added and thermostated at $50 \pm 1^\circ\text{C}$ for 5 minutes. Two test tubes were filled with 1 ml of the working solution of the enzyme preparation. The contents of the tubes were thoroughly mixed and all three tubes were kept at a temperature of $50 \pm 1^\circ\text{C}$ for 10 minutes. After hydrolysis, 3 ml of the DNS reagent were added to two test tubes, and 3 ml of the DNS reagent and 1 ml of the working solution of the preparation were added to the third test tube (control). The mixtures were then thoroughly mixed and placed in a boiling water bath for 5 min, after which they were cooled to room temperature. Optical densities of experimental and control samples were measured on a PD-303 UV spectrophotometer (Apel, Japan) at a wavelength of 540 nm against a control sample for reagents. The cellulolytic activity in the enzyme preparation was calculated by the formula:

$$CMCIA = \frac{C_0 + C_K}{t \cdot c}$$

where C_0 - is the molar concentration of glucose in the test sample, found from the calibration curve, $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$;

C_K - is the molar concentration of glucose in the control sample, found from the calibration curve, $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$;

T - is the duration of hydrolysis, min (10 min);

c - is the mass concentration of the enzyme preparation in the reaction mixture, g/cm^3 .

Statistical analysis was carried out according to the generally accepted criteria of variance-statistical analysis with the calculation of mean values (M), arithmetic mean error (m) using the Microsoft Excel, 2010 software package. The statistical significance of differences in mean values was assessed according to the standard method described by Glants [9]. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results and discussion

In order to study the enzyme production ability of *A. niger* 355 at different stages of long-term cultivation, the producer was grown for 45 days at a temperature of $26\text{--}28^\circ\text{C}$ on a previously optimized nutrient medium (Figure 1).

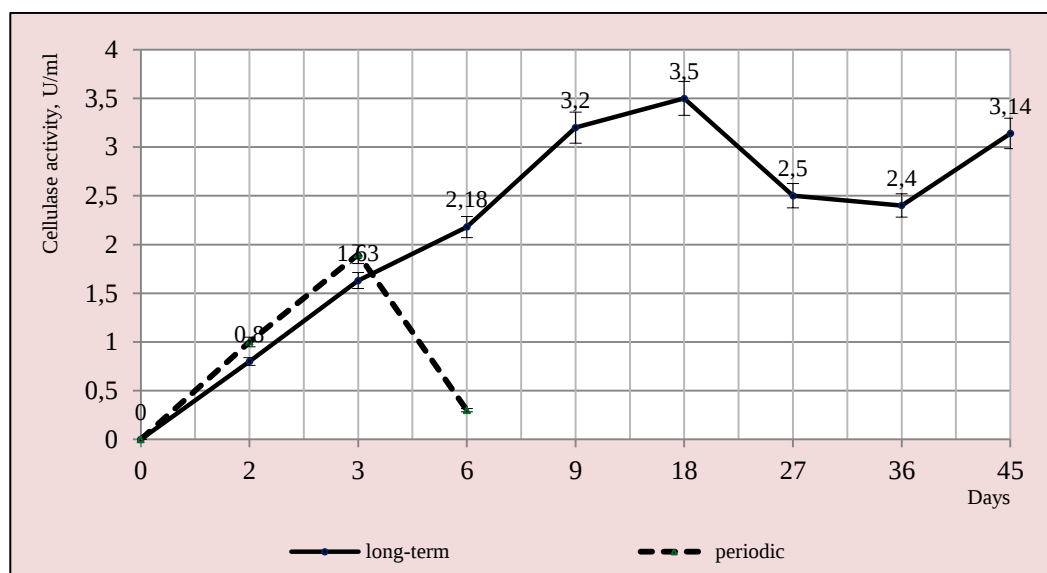


Figure 1 - Cellulase activity during long-term and periodic cultivation of *Aspergillus niger* 355

Immobilization of the culture on a substrate creates conditions for multiple production of target enzymes. During long-term cultivation, it was found that after 6-9 days stabilization in the enzyme biosynthesis was observed. The greatest enzymatic activity was observed on the 9th, 18th and 45th days of cultivation. Cellulase activity varied from 1.63 to 3.5 Units/ml (Figure 1). However, in periodic conditions, the maximum of enzyme biosynthesis was observed on the 3d day (1.63 U/ml), followed by a decrease in activity.

During long-term cultivation of immobilized microorganisms, many different variants are formed, among which a highly active one is formed. A prerequisite for the active variant formation is the stress experienced by the culture during long-term cultivation. These are mechanical damage to hyphae when the accumulating mycelium is removed from the substrate, the conditions for changing the nutrient medium. With an increase in the productivity of the immobilized culture, it becomes possible to select active variants with increased enzymatic activity.

To identify the active variant of *A. niger* 355, samples were taken at stage I (day 6), stage II (day 18) and stage III (day 45) of long-term cultivation. All samples were taken by plucking cells from a culture immobilized on a substrate. A total of 14 isolates were selected: 5 isolates were selected at the 1st stage of long-term cultivation, 4 at the 2nd stage, and 5 isolates at the 3rd stage. The enzymatic activity of the isolates isolated at the 1st stage of long-term cultivation was 2.9 ± 0.7 - 3.3 ± 1.2 U/ml. The enzymatic activity of isolates isolated at stage I of long-term cultivation was 3.4 ± 0.9 - 3.7 ± 1.1 U/ml, and at stage III cellulase activity was 2.2 ± 0.5 - 2.8 ± 0.6 Units/ml (Table).

Table 1 - Enzymatic activity of isolates obtained at different stages of long-term cultivation of *A. niger* 355

Isolates		Cellulase (U/ml)
1		2
I stage	1-1	3.1 ± 1.2
	1-2	2.9 ± 0.7
	1-3	3.0 ± 0.6
	1-4	3.3 ± 1.2
	1-5	3.1 ± 0.7

Table 1 continuation

	1	2
II stage	2-6	3,4±0,9
	2-7	3,7±1,1
	2-8	3,6±0,6
	2-9	3,5±1,1
III stage	5-10	2,6±1,0
	5-11	2,8±0,6
	5-12	2,7±0,8
	5-13	2,2±0,5
	5-14	2,0±0,7

The highest enzymatic activity was found by the *A. niger* 355 2-7 isolate, selected in the second stage of long-term cultivation 3.7±1.1 U/ml.

Thus, during the selection of the strain *A. niger* 355, an active isolate of *A. niger* 355 2-7 was obtained. The cellulase activity of obtained isolate was 10.9 times higher than the parental culture. In fact, immobilization method presented in this work is simple and affordable. During its implementation, there are no factors that damage microbial cells and inhibit enzymatic activity, mass transfer is not hindered. It enables the development of continuous biocatalytic technologies. Immobilization of cells is also interesting in that microorganisms return to their natural attached state, the study of which allows one to get closer to understanding the processes occurring in nature.

References:

- 1 N.V. Feoktistova, A.M. Mardanova, M.T. Lutfullin, L.M. Bogomolnaya, M.R. Sharipova Biopreparaty mikrobnogo proiskhozhdeniya v pticzevodstve. *Uchenye zapiski kazanskogo universiteta*, 2018, 160: 395-418 (<https://cyberleninka.ru/article/n/biopreparaty-mikrobnogo-proishozhdeniya-v-ptitsevodstve>).
- 2 Knudsen K.E. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poultry Science*, 2014, 93(9): 2380–2393 (doi.org/10.3382/ps.2014-03902).
- 3 Ravindran V., Son J.-H. Feed enzyme technology: Present status and future developments. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2011, 3(2): P. 102–109 (doi: 10.2174/2212798411103020102).
- 4 Adeola O., Cowieson A.J. Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve non-ruminant animal production. *Journal of Animal Sciences*, 2011, 89(10): P. 3189–3218 (doi: 10.2527/jas.2010-3715).
- 5 Manish P., Sonali M., Pradeep K., Hrudayanath T., Microbial cellulases – An update towards its surface chemistry, genetic engineering and recovery for its biotechnological potential. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125710 (doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125710).
- 6 Vaishnav N., Singh A., Adsul M., Dixit P. Penicillium: The next emerging champion for cellulase production. *Bioresource Technology Reports*, 2018, 2: P. 131-140 (doi.org/10.1016/j.biteb.2018.04.003).
- 7 Kubicek C., Messner R., Gruber F. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, 15(2): 90-99 (doi.org/10.1016/0141-0229(93)90030-6).
- 8 GOST 32662-2012. Metody opredeleniya fermentnoj aktivnosti czellyulazy. Vved. 2014–01–01. M.: Mezghos. sovet po standartizaczii, metrologii i sertifikaczii. III, 9s.
- 9 Glancz S. Mediko-biologicheskaya statistika. M., 1998.

ПРАВИЛА
издания журнала
«МИКРОБИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ВИРУСОЛОГИЯ»

Журнал публикует статьи фундаментального и прикладного характера. Материалы должны отражать результаты научных исследований и практических достижений в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии.

Плата за публикацию статей не взимается.

Представленные для опубликования материалы должны удовлетворять следующим требованиям:

Содержать результаты оригинальных научных исследований по актуальным проблемам в области микробиологии, вирусологии, биотехнологии и экологии, ранее не опубликованные и не предназначенные к публикации в других изданиях.

Все статьи принимаются и публикуются одновременно на двух языках (казахском и английском, или русском и английском).

Статьи принимаются в электронном виде (в формате .doc, .docx либо .rtf) через профиль автора на сайте imv-journal.kz.

При невыполнении формальных требований, статья к публикации не принимается. Статьи поступившие в редакцию журнала могут быть проверены с помощью системы **Антиплагиат**. В случае, если результат проверки выявляет некорректно оформленные заимствования, статья может быть отклонена.

При выполнении формальных требований, статья направляется на рассмотрение членам редколлегии, имеющим ученую степень в научной области, соответствующей содержанию статьи. При этом редакция определяет соответствие статьи профилю журнала, требованиям к оформлению. При соответствии вышеуказанным требованиям направляет ее на рецензирование стороннему специалисту, обладающему высокими профессиональными знаниями и опытом работы по конкретному научному направлению, имеющему ученую степень PhD, доктора или кандидата наук.

К рецензированию не привлекаются специалисты, работающие в одном отделе или департаменте учреждения, где выполнена работа. Рецензент выносит решение о возможности опубликования

Окончательное решение о целесообразности публикации принимается Редакционной коллегией в соответствии с рекомендациями рецензентов.

После принятия Редакционной коллегией решения о допуске статьи к публикации ответственный редактор журнала информирует об этом автора и указывает сроки публикации.

1. Присланные материалы должны содержать:

- Материалы статьи (файлу со статьей присваивается имя по фамилии первого автора).
- Сведения об авторах (фамилия, имя, отчество, ученая степень, звание, должность, место работы, контактные телефоны, электронные адреса (e-mail), идентификационный номер (ORCID)).
- Отсканированное сопроводительное письмо.

2. Статья должна содержать:

- МРНТИ – межгосударственный рубрикатор научно-технической информации
- Фамилии авторов статьи (прописными буквами, инициалы следуют перед фамилией);
- Название организации, в которой была выполнена работа и город (строчными буквами);

- Название статьи (прописными буквами полужирным шрифтом);
- Аннотация (в начале статьи перед основным текстом);
- Ключевые слова (не более 7);
- Введение (без заголовка), в котором кратко излагается актуальность и новизна рассматриваемого вопроса;
- Основной текст (включает материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, содержащее краткое изложение основных результатов работы);
- Список литературы (оформляется с указанием фамилии и инициалов автора, полного названия книги (статьи), места издания, названия журнала (года, тома, номера, страницы).

3. Размер одной статьи не должен превышать 5-7 машинописных страниц (статьи обзорного характера – до 15 стр.), включая аннотацию, таблицы, рисунки, список литературы. В том же файле следует представлять резюме на трех языках (казахском, русском и английском).

4. Статья должна быть набрана на компьютере в редакторе MS Office Word, шрифтом Times New Roman 12 пт, с пробелом между строк 1 компьютерный интервал, поля – верхнее и нижнее 2 см, левое 3 см, правое 1,5 см. Количество рисунков – не более пяти. Аннотация, таблицы, рисунки, список литературы – 11 пт через 1 компьютерный интервал. Ссылки на литературные источники даются цифрами в прямых скобках по мере упоминания и должны быть идентичными на двух языках. Необходимо тщательно следить за точным соответствием обозначений в тексте и на таблицах, рисунках и др. При изложении экспериментального материала должна быть использована международная система единиц (СИ).

5. После статьи на английском языке приводится список литературы в романском алфавите (References) для SCOPUS и других БАЗ ДАННЫХ полностью отдельным блоком, повторяя список литературы к русскоязычной части, независимо от того, имеются или нет в нем иностранные источники. Если в списке есть ссылки на иностранные публикации, они полностью повторяются в списке, готовящемся в романском алфавите (латиница).

В References не используются разделительные знаки («//» и «—»). Название источника и выходные данные отделяются от авторов типом шрифта, чаще всего курсивом, точкой или запятой.

На сайте <http://www.translit.ru/> можно бесплатно воспользоваться программой транслитерации русского текста в латиницу, используя различные системы. Программа очень простая, ее легко использовать для готовых ссылок. К примеру, выбрав вариант системы Библиотеки Конгресса США (LC), получаем изображение всех буквенных соответствий. Вставляем в специальное поле весь текст библиографии на русском языке и нажимаем кнопку «в транслит».

6. Статьи, не соответствующие Правилам, не публикуются и не возвращаются автору. Редакция оставляет за собой право производить сокращения и правки статей.