10.15789/2220-7619-PAA-1602

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ИЗВЛЕКАЕМЫХ МОЧЕВИНОЙ ПОВЕРХНОСТНЫХ СТРУКТУР *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* O:1B

Крюкова А.В.

Марков Е.Ю.

Николаев В.Б.

Попова Ю.О.

Климов В.Т.

Игумнова С.В.

Андреевская Н.М.

Уланская А.В.

Загоскина Т.Ю.

Чеснокова М.В.

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск, Россия

PHYSICOCHEMICAL AND ANTIGENIC PROPERTIES OF THE UREA-EXTRACTED SURFACE STRUCTURES OF YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS O:1B

Kryukova A.V.

Markov E.Yu.

Nikolaev V.B.

Popova Yu.O.

Klimov V.T.

Igumnova S.V.

Andreevskaya N.M

Ulanskaya A.V.

ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

10.15789/2220-7619-PAA-1602
Zagoskina T.Yu.

Chesnokova M.V.

F. G. H. I. Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Irkutsk, Russia

ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

 10.15789/2220-7619-PAA-1602

Резюме. К важным методам диагностики псевдотуберкулеза относятся иммуносерологические исследования, в частности, направленные на выявление антигенов возбудителя. Практический интерес представляют основные иммунодоминантные и видоспецифические антигены, расположенные в поверхностных структурах бактериальной клетки. В связи с этим целью работы явилось выделение и характеристика биологически активных поверхностных структур псевдотуберкулезного микроба. В работе проведен лизис живых клеток *Y. pseudotuberculosis* 3704 (O:1b) путем обработки их 9 М раствором мочевины с целью извлечения антигенов, локализованных в поверхностных структурах микроба. Полученные субклеточные фракции – наружные мембраны (НМ), мочевинный экстракт (МЭ) и изолированный из него белково-липополисахаридный комплекс (БЛПК) охарактеризованы по физико-химическим параметрам. Содержание белка в препаратах составило от 42 % до 53 %. Полипептидный спектр препарата НМ псевдотуберкулезного микроба представлен 14 мажорными полипептидами с молекулярными массами от 13,9 kDa до 131,5 kDa, спектр МЭ – 16 полипептидами с молекулярными массами от 13,5 kDa до 101,6 kDa, спектр препарата БЛПК – 9 полипептидами с молекулярными массами от 20,7 kDa до 66,6 kDa. В изолированных субклеточных фракциях (НМ и МЭ) с помощью теста радиальной энзимодиффузии и субстратного электрофореза выявлены протеолитически активные белки и полипептиды. В препарате НМ таковыми явились 4 полипептида с молекулярными массами от 28,0 kDa до 118,0 kDa, в препарате МЭ – 7 полипептидов с молекулярными массами от 29,2 kDa до 97,7 kDa. Полученные субклеточные фракции способны проявлять иммуногенную активность при введении экспериментальным животным и антигенную активность при взаимодействии со специфическими антителами в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) и антителами, меченными наночастицами коллоидного серебра в дот-иммуноанализе (ДИА). Препараты НМ и БЛПК в

 ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

ДИА с иммуноглобулинами, выделенными из экспериментальных антисывороток и меченные наночастицами коллоидного серебра обнаруживались в концентрации ≥ 0,12 мкг/мл (по сухому весу), клетки штамма *Y. pseudotuberculosis* 3704 – в концентрации ≥ 3,9 × 10^6 м.к./мл, что аналогично результатам ДИА с иммуноглобулинами, выделенными из коммерческой псевдотуберкулезной антисыворотки (С.-Петербург) и меченными наночастицами коллоидного серебра. Таким образом, изолированные при использовании мочевины в качестве лизирующего и обеззараживающего агента субклеточные фракции псевдотуберкулезного микроба, сохраняют свои антигенные и иммуногенные свойства, ферментативную активность, что указывает на перспективность их использования для совершенствования ранней диагностики псевдотуберкулеза.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, диагностика, антигены, антитела, гипериммунизация, мочевина, псевдотуберкулез

Abstract. Immuno-serological diagnostic tools particularly identifying pathogen antigens are the most important methods of pseudotuberculosis studies . The main immunodominant and species-specific antigens located in the surface structures of the bacterial cell are of practical interest. Thereby the aim of the work was to isolate and characterize biologically active surface structures of the pseudotuberculosis microbe. Here, the living cells of *Y. pseudotuberculosis* 3704 (O:1b) were lysed by using 9 M urea solution to extract antigens localized in the microbial surface structures. The subcellular fractions obtained such as outer membranes (OM), urea extract (UE) and isolated protein-lipopolysaccharide complex (PLPSC) are characterized by physical and chemical parameters. The protein content in the preparations ranged from 42% to 53%. The polypeptide band of the OM preparation, UE polypeptide and PLPSC for pseudotuberculosis microbe was presented by 14, 16 and 9 major polypeptides with molecular weight ranging from

13,9 kDa to 131,5 kDa, 13,5 kDa to 101,6 kDa, and 20,7 kDa to 66,6 kDa, respectively. Proteolytically active proteins and polypeptides were detected in isolated subcellular fractions (OM and UE) by using the radial enzyme diffusion test and substrate-gel electrophoresis found to be presented by 4 and 7 polypeptides with molecular weight ranging from 28,0 kDa to 118,0 kDa and 29,2 kDa to 97,7 kDa in the OM and UE preparation, respectively. The subcellular fractions obtained are capable to exhibit immunogenic activity after inoculation to experimental animals and antigenic activity while interacting with specific antibodies in the radial immunodiffusion (RID) assay and antibodies labeled with colloidal silver nanoparticles in dot immunoassay (DIA). OM and PLPSC preparations in DIA with immunoglobulins isolated from experimental antisera and labeled with colloidal silver nanoparticles were detected at a concentration of ≥ 0.12 μg / ml (dry weight), cells of strain *Y. pseudotuberculosis* 3704 at a concentration of ≥ 3, 9 × 10^6 m.c. / ml, which is similar to the results of DIA with immunoglobulins isolated from commercial pseudotuberculosis antiserum (St. Petersburg) and labeled with nanoparticles of colloidal silver. Thus, the subcellular fractions of pseudotuberculosis microbe isolated by using urea as a lysing and decontaminating agent retain their antigenic and immunogenic properties and enzymatic activity suggesting about their potential benefits for use to improve early diagnostics of pseudotuberculosis.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, diagnostics, antigens, antibodies, hyperimmunization, urea, pseudotuberculosis

 10.15789/2220-7619-PAA-1602

Введение

Y. pseudotuberculosis – энтеропатоген, имеет глобальное распространение на всех континентах (кроме Антарктиды) и является причиной псевдотуберкулезной инфекции с фекально-оральным механизмом передачи, ведущее значение при которой отводится пищевым продуктам. Популяция возбудителя гетерогенна по О-антигену, в настоящее время известен 21 серологический вариант (O:1a, O:1b, O:1c, O:2a, O:2b, O:2c, O:3, O:4a, O:4b, O:5a, O:5b, O:6, O:7, O:8, O:9, O:10, O:11, O:12, O:13, O:14, O:15), однако наибольшее значение в патологии человека имеет серовариант *Y. pseudotuberculosis* O:1b. В Сибири и на Дальнем Востоке он доминирует в 90,7 % случаях [2].

Псевдотуберкулез характеризуется внезапным проявлением, полиморфизмом клинических форм и, как следствие, трудностью достоверной ранней диагностики [9], что обуславливает необходимость совершенствования клинической и лабораторной диагностики заболевания [7]. Наиболее перспективными для ранней диагностики псевдотуберкулеза являются методы, направленные на выявление специфических антигенов, оптимизация которых остается актуальной до настоящего времени. Поскольку основные иммунодоминантные, включая видоспецифические, антигены локализованы в поверхностных структурах микробной клетки [10], выделение и использование их для конструирования иммунобиологических препаратов может представлять практический интерес, в том числе, в изучении роли субклеточных фракций и их отдельных компонентов в иммуно- и патогенезе псевдотуберкулеза. Кроме того, учитывая эффективность вакцинации против чумы аттенуированным штаммом *Y. pseudotuberculosis* [13], поверхностные структуры и антигены менее патогенного, но родственного чумному псевдотуберкулезного микроба могут быть использованы для конструирования химических противочумных вакцин.

 ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

 10.15789/2220-7619-PAA-1602

Актуальным остается и поиск альтернативных методов обеззараживания микробной массы и разрушения бактериальных клеток для получения стерильных субклеточных фракций, сохраняющих антигенную активность и отвечающих требованиям биологической безопасности, поскольку традиционные методы обеззараживания возбудителей особо опасных инфекций (кипячение, воздействие ацетоном, формалином, фенолом, этанолом, метанолом) могут приводить к необратимым изменениям их нативных свойств. Перспективной может оказаться обработка живых клеток концентрированным раствором мочевины, обладающей бактерицидным действием. Так, ранее нами был получен специфически стерильный высокоиммуногенный препарат наружных мембран холерного вибриона Эль Тор за счет одномоментного лизиса и обеззараживания раствором мочевины живых микробных клеток возбудителя холеры [3, 4, 10].

Цель работы – выделение и характеристика биологически активных поверхностных структур псевдотуберкулезного микроба с использованием бактерицидного действия мочевины, позволяющего одновременно обеззараживать и лизировать бактериальные клетки возбудителя.

Материалы и методы

Вся работа проводилась в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» [8]. Штамм *Y. pseudotuberculosis* 3704 (O:1b) (музей живых культур ФКУЗ НИПЧИ Сибири и ДВ, Иркутск, Россия) выращивали при 28 °C в течение 48 ч на агаре Хоттингера (pH 7,2), смывали забуференным (pH 7,2) физиологическим раствором (ЗФР) и получали взвесь концентрацией 40 млрд. микробных клеток в 1,0 мл. В микробную взвесь добавляли при постоянном перемешивании 9,0 М раствор мочевины до конечной концентрации 4,5 М и оставляли при температуре 20–25 °C. Через сутки ставили бактериологический контроль стерильности лизата, который до

 ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

окончания проведения процедуры хранили в холодильнике при температуре 4 °С. Дальнейшую работу проводили после отрицательного бактериологического контроля специфической стерильности. Полученный лизат подвергали последовательному центрифугированию при 10000 g в течение 30 минут при 4 °С для удаления не разрушенных микробных клеток и при 40000 g в течение 60 минут при 4 °С для осаждения фракции НМ и получения препарата МЭ. Полученный осадок промывали 4,5 М раствором мочевины скоростным центрифугированием (как указано выше). Далее осадок отмывали дистиллированной водой с последующим осаждением скоростным центрифугированием. Конечный осадок ресуспендировали в минимальном объеме дистиллированной воды и лиофильно высушивали. Оставшийся после центрифугирования лизата клеток супернатант – препарат МЭ – диализовали в течение трех суток против проточной и дистиллированной воды, освобождали от нерастворимых веществ центрифугированием и лиофильно высушивали.

Выделение и очистку БЛПК из препарата МЭ проводили методом двухфазного разделения с использованием детергента Тритона Х-114 (Serva, Германия) и отбором водной и детергентной фаз [5].

Содержание белка определяли по методу O. H. Lowry с соавт. [18] с применением бычьего сывороточного альбумина (Sigma-Aldrich, США) в качестве стандарта.

Липополисахарид (ЛПС) из клеток псевдотуберкулезного микроба изолировали водно-фенольной экстракцией по методу O. Westphal с соавт. [21] с получением водной и фенольной фракций ЛПС. Наличие ЛПС в препаратах определяли колориметрическим методом с использованием карбоцианинового красителя «Stains all» (ICN Biomedicals Inc, США) [16] в нашей модификации [6].

Электрофоретический анализ проводили в блоках полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия по методу U. K. Laemmli и M. Favre [17] с последующей окраской на белки Кумасси ярко-синим R-250 (Bio-

Rad, США) [14] и на углеводы ионами серебра (Химреактивснаб, Россия) [20]. В качестве маркера молекулярных масс использовали смеси белков (Thermo scientific, США) с диапазоном молекулярных масс от 14,4 kDa до 116,0 kDa и от 20 kDa до 120 kDa. Молекулярную массу полипептидов в препаратах оценивали с помощью гель-документирующей системы GelDoc™XR+ (Bio-Rad, США), программой ImageLab™.

Протеазную активность определяли в тесте радиальной энзимодиффузии (РЭД) в 1 % агарозе (Helicon, Россия) и в субстратном диск-электрофорезе [15] с использованием в качестве субстрата желатина (Serva, Германия) в концентрации 0,1 %.

Животными-продуцентами экспериментальной антисыворотки являлись кролики породы «шиншилла» (лаборатория подопытных животных ФКУЗ НИПЧИ Сибири и ДВ, Иркутск, Россия) весом 2,5-3,0 кг обоего пола, не имеющих клинических отклонений от нормы. Иммуногеном служили препараты НМ и БЛПК. Используемый препарат НМ подвергался предварительной трипсинизации для удаления примеси растворимых белков. Навеску НМ суспендировали в 0,025 М Трис-HCl буфере pH 7,2 в присутствии 0,5 мг/мл трипсина (Serva, Германия), инкубировали при 30 °С в течение 30 минут с последующим центрифугированием при 40000 g, отмыванием в дистиллированной воде (1:50), повторным центрифугированием. Полученный осадок лиофилизировали.

При иммунизации животных применялось две схемы. Кроликов-продуцентов разделили на четыре группы. Животным первой и третьей групп перед иммунизацией препаратом НМ и препаратом БЛПК, соответственно, вводили полный адъювант Фрейнда (ПАФ) по 0,5 мл в подушечки задних лап. Через 5-7 дней кроликам проводили инъекцию НМ по 1,0 мг сухого вещества (по белку 0,55 мг) и БЛПК по 1,0 мг сухого вещества (по белку 0,45 мг) в каждый подколенный лимфатический узел в 0,4 мл ЗФР с 1,2 мл ПАФ. Через 3–5 дней иммунизировали в передние лапы в той же дозе, но без добавления

ПАФ. Через 15 дней осуществляли второй цикл иммунизации, который предусматривал трехкратное внутривенное введение комплекса антиген-антитело (АГ-АТ). С этой целью у животных обеих групп забирали кровь для получения 3,0 мл сыворотки: по 1,0 мл разливали в стерильные пробирки и растворяли в каждой по 1,0 мг сухого антигенного препарата. Полученный комплекс АГ-АТ вводили внутривенно каждому кролику, от которого была получена сыворотка, с интервалом между инъекциями в 5 дней. Одновременно каждому животному делали внутримышечно инъекцию антигена в вышеуказанных дозах в объеме 0,5 мл ЗФР. Животным второй и четвертой групп инъекции препаратов НМ и БЛПК осуществляли подкожно двукратно в дозе из расчета по 1,0 мг иммуногена в 1,0 мл ЗФР с 1,0 мл ПАФ в четыре точки спины вдоль позвоночника с интервалом 3 дня. Через 7 дней после последнего введения антигенов у всех животных проводили забор крови, определяли активность и специфичность сыворотки с помощью иммуносерологических методов, используя в качестве антигенов выделенные препараты НМ, БЛПК, штамм *Y. pseudotuberculosis* 3704 и тест-штаммы гетерологичных микроорганизмов (*Y. enterocolitica* 628, *Salmonella enterica typhi* 21, *Shigella flexneri* 1964) (музей живых культур ФКУЗ НИПЧИ Сибири и ДВ, Иркутск, Россия).

Наличие антигенов в препаратах определяли в РИД в 1 % агарозном геле с последующей окраской белков Кумасси ярко-синим [11] и в ДИА, используя специфические антитела экспериментальных кроличьих антисывороток, меченные наночастицами коллоидного серебра [1], а также аналогичный конъюгат на основе антител из коммерческой диагностической антисыворотки для постановки РНГА производства ФГУП СПб НИИВС, Россия (в качестве контроля). Выделение антител (IgG) из антисывороток осуществляли комбинированным методом с использованием каприловой кислоты и сульфата аммония [19]. ДИА ставили традиционным способом, предполагающим адсорбцию исследуемого препарата на нитроцеллюлозной мембране с

величиной пор 0,3 мкм (Synpor, Чехия) с последующей его детекцией антителами, меченными коллоидным серебром [1].

Результаты и обсуждения

Физико-химические свойства полученных субклеточных фракций

Из бактериальной массы клеток *Y. pseudotuberculosis* 3704 в результате обработки их 9 М раствором мочевины получены субклеточные фракции (НМ и МЭ) псевдотуберкулезного микроба. Путем обработки МЭ детергентом Тритон Х-114 (Serva, Германия) получен препарат БЛПК.

Содержание белка в препаратах НМ, МЭ и БЛПК составило в среднем 53 %, 50 % и 42 %, соответственно.

При проведении электрофоретического анализа в препаратах НМ и МЭ псевдотуберкулезного микроба определен полипептидный состав (рис. 1).

В полипептидном спектре препарата НМ установлено наличие 14 мажорных полипептидов с молекулярными массами от 13,9 kDa до 131,5 kDa. В препарате МЭ выявлено 16 мажорных полипептидов с молекулярными массами от 13,5 kDa до 101,6 kDa. Полипептиды с массами 24,4, 29,7, 39,8, 43,3 kDa оказались представленными в обоих препаратах, вероятно, в результате того, что при воздействии хаотропного агента на клеточную стенку происходит частичный выход мембранных компонентов в мочевинный экстракт, в том числе белков и ЛПС.

При окраске на углеводы ионами серебра препарата БЛПК *Y. pseudotuberculosis* 3704 выявлено 9 полос с молекулярными массами от 20,7 kDa до 66,6 kDa (рис. 2). Кроме того, обнаружен быстро мигрирующий компонент с молекулярной массой ниже 20 kDa.

Метахроматическая активность

Выявлено, что при горячей водно-фенольной экстракции клеток псевдотуберкулезного микроба липополисахаридный антиген распределяется как в водную, так и в фенольную фазы, а также обнаруживается в препаратах НМ, МЭ и БЛПК, что подтверждается метахроматическим эффектом: при

взаимодействии исследуемых фракций с карбоцианиновым красителем «Stains all» происходит сдвиг максимума поглощения красителя в коротковолновую область в препарате НМ (λ_{max} 574 нм → λ_{max} 472 нм), МЭ, фенольной фракции ЛПС (λ_{max} 574 нм → λ_{max} 466 нм) и водной фракции ЛПС и БЛПК (λ_{max} 574 нм → λ_{max} 467 нм), что характерно для ЛПС грамотрицательных бактерий.

Ферментативная активность

При обработке возбудителя псевдотуберкулеза раствором мочевины в препаратах субклеточных фракций определяется протеолитическая активность (рис. 3), что свидетельствует о минимальном денатурирующем воздействии мочевины на нативные свойства получаемых фракций микробной клетки.

Препарат МЭ в РЭД тесте уступает по активности препарату НМ благодаря активности мембраносвязанных протеаз последних, обладающих повышенной стабильностью за счет своего микроокружения, по сравнению с растворимыми формами протеаз в МЭ (рис. 3; 5–8).

Субстратным электрофорезом в препаратах НМ и МЭ выявлены протеолитически активные полипептиды и обнаружено их различие в спектре субклеточных фракций (рис. 4).

В препарате НМ протеазной активностью обладают полипептиды с молекулярными массами 28,0, 48,4, 61,5 kDa и в области 72,5–118,0 kDa, тогда как в препарате МЭ данной активностью обладают полипептиды с молекулярными массами 29,2, 36,0, 74,7, 79,0, 82,8, 89,4, 97,7 kDa.

Иммуногенная и антигенная активности

Анализ исследуемых препаратов в РИД выявил в регистрируемых количествах только один компонент, идентифицированный как ЛПС, играющий основную роль в индукции специфического гуморального иммунитета у макроорганизмов. При взаимодействии с цельной коммерческой поливалентной антисывороткой в РИД наблюдается полное слияние преципитата между препаратами ЛПС водно-фенольной экстракции и препаратами НМ и МЭ, что указывает на их антигенную идентичность (рис. 5).

 10.15789/2220-7619-PAA-1602

Сыворотки, полученные путем иммунизации животных-продуцентов препаратами НМ и БЛПК, по специфической активности не отличались между собой.

Полученные экспериментальные антисыворотки в разведении 1:10 в РИД не реагировали с гетерологичными тест-штаммами (1×10^9 м.к./мл) и проявляли серологическую активность только в отношении гомологичного штамма *Y. pseudotuberculosis* 3704 (рис. 6), а также с изолированными из него препаратами НМ и БЛПК (1 мг/мл).

Препараты НМ и БЛПК в ДИА при использовании антител, изолированных из полученных экспериментальных антисывороток, меченных наночастицами коллоидного серебра, обнаруживались в концентрации ≥0,12 мкг/мл (по сухому весу) в объеме исследуемого образца, наносимого на мембрану – 1,5 мкл, штамм *Y. pseudotuberculosis* 3704 – в концентрации ≥ 3,9 $\times 10^6$ м.к./мл (рис.7) в объеме исследуемого образца, наносимого на мембрану – 1,5 мкл.

Аналогичные результаты зарегистрированы при исследовании указанных антигенных комплексов в ДИА с антителами из коммерческой диагностической антисыворотки, меченными наночастицами коллоидного серебра. Тест-штаммы гетерологичных микроорганизмов в ДИА перекрестно реагировали в высоких концентрациях с антителами экспериментальных антисывороток (≥ $7{,}8 \times 10^6$ м.к./мл.).

В ДИА с антителами из коммерческой антисыворотки гетерологичные тест-штаммы не выявлялись ввиду того, что в технологическую схему ее получения входит этап адсорбции антител антигенами близкородственных в антигенном отношении микроорганизмов, что минимизирует неспецифическое взаимодействие антигенов с антителами.

Заключение

Как известно, антигенную специфичность псевдотуберкулезного микроба определяет соматический О-антиген, который содержится в поверхностных

 ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

 10.15789/2220-7619-PAA-1602

структурах бактериальной клетки. При этом, говоря об антигенном спектре псевдотуберкулезного микроба, нельзя не отметить наличие структурного сходства отдельных поверхностных компонентов микробной клетки возбудителя с аналогичными макромолекулами некоторых других представителей семейств Yersiniaceae и Enterobacteriaceae. Применение мочевины в качестве лизирующего агента для выделения поверхностных структур бактериальной клетки позволяет сохранить антигенные, иммуногенные свойства и специфичность выделяемых антигенов.

Использованная техника гипериммунизации животных-продуцентов субклеточными фракциями *Y. pseudotuberculosis* для получения высокоактивных псевдотуберкулезных антисывороток в совокупности с более высокой чувствительностью ДИА по сравнению с РИД объясняют наличие перекрестного реагирования с гетерологичными микроорганизмами в ДИА. В связи этим, для эффективного использования в диагностических целях полученных псевдотуберкулезных антисывороток и минимизации риска получения ложноположительных результатов, необходимо дальнейшее продолжение работы по оптимизации способа получения высокоспецифичных АТ. Одним из направлений повышения специфичности экспериментальных псевдотуберкулезных антисывороток является их адсорбция близкородственными в антигенном отношении гетерологичными микроорганизмами.

Таким образом, методика обеззараживания путем лизиса микробных клеток концентрированным раствором мочевины позволяет получить стерильные субклеточные фракции псевдотуберкулезного микроба, сохраняющие свои иммуногенные и антигенные свойства, а также ферментативную активность и представляет практический интерес в плане конструирования иммунобиологических препаратов для совершенствования ранней диагностики псевдотуберкулеза.

 ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

 10.15789/2220-7619-PAA-1602

РИСУНКИ

Рисунок 1. Электрофоретическое разделение в 12 % полиакриламидном геле препаратов, полученных мочевинной экстракцией из Y. pseudotuberculosis 3704. Окраска Кумасси ярко-синим R-250.

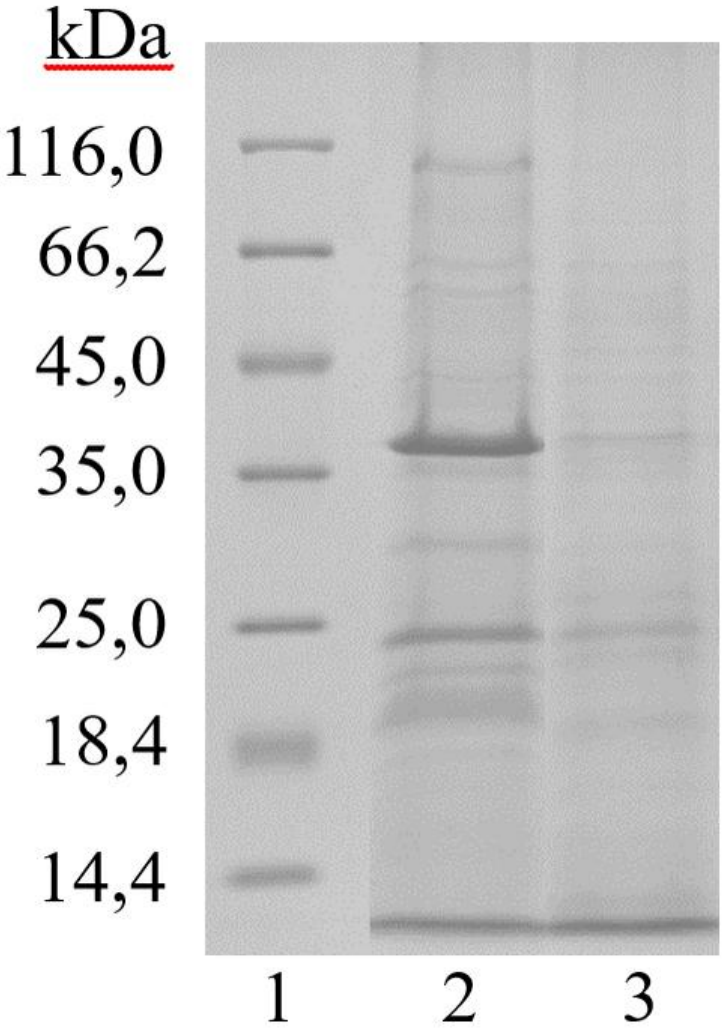
1 – маркер молекулярных масс, 2 – препарат наружных мембран, 3 – препарат мочевинного экстракта

Figure 1. Electrophoretic separation of preparations obtained by urea extraction from Y. pseudotuberculosis 3704 in 12 % polyacrylamide gel. Stained with Coomassie brilliant blue R-250.

1 – molecular weight marker, 2 – outer membrane preparation, 3 – urea extract preparation

 ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

10.15789/2220-7619-PAA-1602



ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

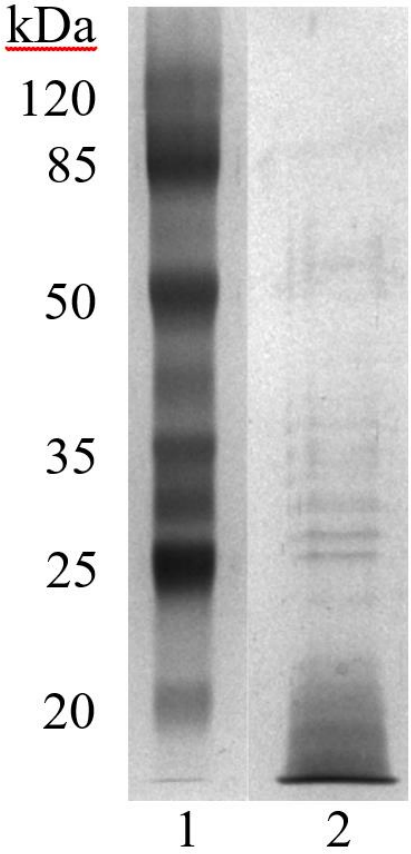
 10.15789/2220-7619-PAA-1602

Рисунок 2. Электрофоретическое разделение в 12 % полиакриламидном геле препарата белково-липополисахаридного комплекса, полученного из мочевинного экстракта Y. pseudotuberculosis 3704. Окраска ионами серебра.

1 – маркер молекулярных масс, 2 – препарат белково-липополисахаридного комплекса

Figure 2. Electrophoretic separation of a protein-lipopolysaccharide complex preparation obtained from urea extract Y. pseudotuberculosis 3704 in 12% polyacrylamide gel. Stained with silver ions.

1 – molecular weight marker, 2 – protein-lipopolysaccharide complex preparation



 ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

10.15789/2220-7619-PAA-1602

Рисунок 3. Тест радиальной энзимодиффузии полученных препаратов из Y. pseudotuberculosis 3704 в 1% агарозном геле с использованием в качестве субстрата желатина

1, 2, 3, 4 – препарат наружных мембран в концентрации 8 мг/мл, 6 мг/мл, 4 мг/мл, 2 мг/мл, соответственно; 5, 6, 7, 8 – препарат мочевинного экстракта в концентрации 2 мг/мл, 4 мг/мл, 6 мг/мл, 8 мг/мл, соответственно.

(к+) – положительный контроль (трипсин), (к–) – отрицательный контроль (контроль растворителя)

Figure 3. Radial enzyme diffusion test of preparations obtained from Y. pseudotuberculosis 3704 in 1% agarose gel using gelatin as a substrate

1, 2, 3, 4 – outer membrane preparation at concentration of 8 mg/ml, 6 mg/ml, 4 mg/ml, 2 mg / ml, respectively; 5, 6, 7, 8 – preparation of urea extract at concentration of 2 mg/ml, 4 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml, respectively.

(k +) – positive control (trypsin solution), (k–) – negative control (solvent control)

ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

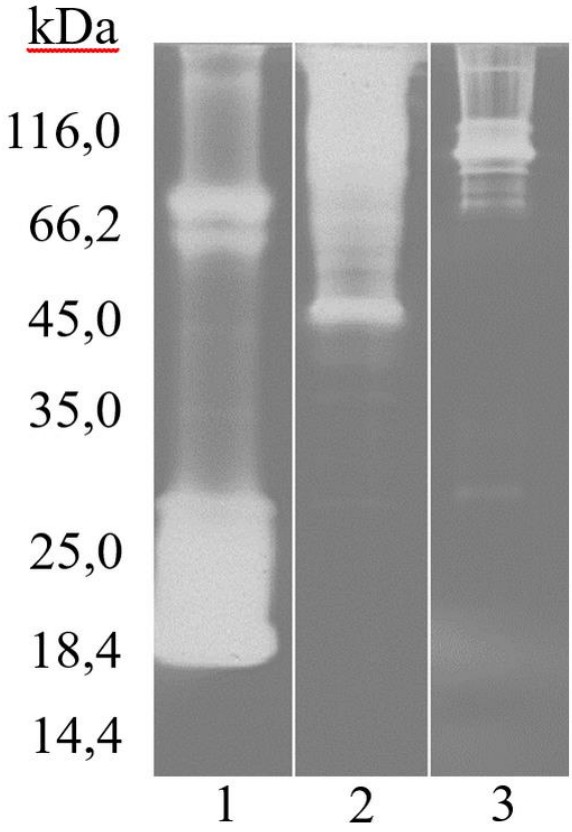
 10.15789/2220-7619-PAA-1602

Рисунок 4 Субстратный электрофорез препаратов субклеточных фракций из Y. pseudotuberculosis 3704 в 12 % полиакриламидном геле с использованием в качестве субстрата раствора желатина.

1 – положительный контроль (трипсин), 2 – препарат наружных мембран, 3 – препарат мочевинного экстракта. Слева указано положение маркера молекулярных масс. Окраска Кумасси ярко-синим R-250.

Figure 4. Substrate-gel electrophoresis of subcellular fraction preparations from Y. pseudotuberculosis 3704 in 12% polyacrylamide gel using a gelatin solution as a substrate

1 – positive control (trypsin solution), 2 – outer membrane preparation, 3 – preparation of urea extract. The position of the molecular weight marker is indicated on the left. Stained with Coomassie brilliant blue R-250



 ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

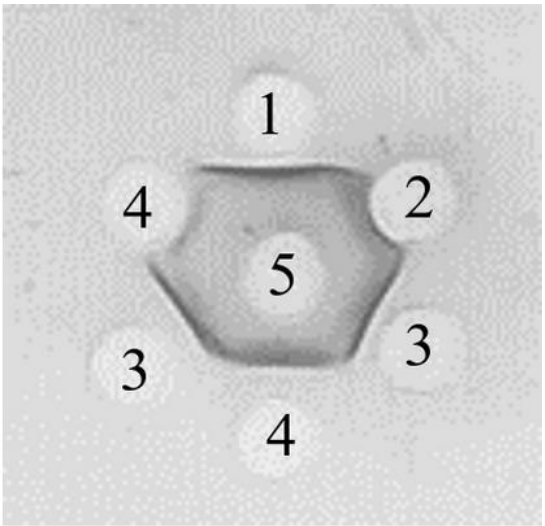
 10.15789/2220-7619-PAA-1602

Рисунок 5. Реакция иммунодиффузии антигенных препаратов, полученных из Y. pseudotuberculosis 3704 в 1 % агарозном геле с коммерческой псевдотуберкулезной антисывороткой

1 – липополисахарид из водной фракции, 2 – препарат мочевинного экстракта, 3 – липополисахарид из фенольной фракции, 4 – препарат наружных мембран, 5 – коммерческая поливалентная псевдотуберкулезная антисыворотка (СПб.). Окраска Кумасси ярко-синим R-250.

Figure 5. Immunodiffusion reaction of antigenic preparations obtained from Y. pseudotuberculosis 3704 in 1% agarose gel with commercial pseudotuberculosis antiserum

1 – lipopolysaccharide from the aqueous fraction, 2 – preparation of urea extract, 3 – lipopolysaccharide from the phenolic fraction, 4 – outer membrane preparation, 5 – commercial polyvalent pseudotuberculosis antiserum (St. Petersburg). Stained with Coomassie brilliant blue R-250



 ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

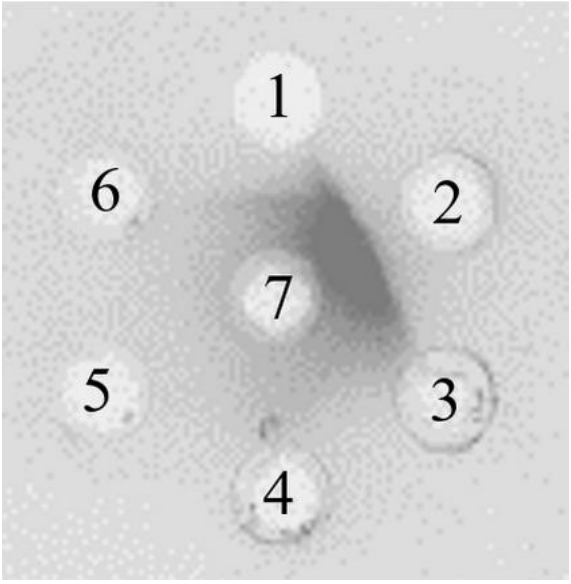
 10.15789/2220-7619-PAA-1602

Рисунок 6. Реакция иммунодиффузии антигенных препаратов Y. pseudotuberculosis 3704 и микробных взвесей в 1% агарозном геле с экспериментальной кроличьей антисывороткой, полученной против препарата белково-липополисахаридного комплекса

1 – препарат наружных мембран, 2 – препарат белково-липополисахаридного комплекса, 3 – микробная взвесь Y. pseudotuberculosis 3704, 4 – микробная взвесь Y. enterocolitica 628, 5 – микробная взвесь S. typhi 21, 6 – микробная взвесь S. flexneri 1964, 7 – экспериментальная псевдотуберкулезная кроличья антисыворотка

Figure 6. Immunodiffusion reaction of antigenic preparations of Y. pseudotuberculosis 3704 and microbial suspensions in 1% agarose gel with experimental rabbit antiserum obtained against the preparation of a protein-lipopolysaccharide complex

1 – outer membrane preparation, 2 – protein-lipopolysaccharide complex preparation, 3 – microbial suspension of Y. pseudotuberculosis 3704, 4 – microbial suspension of Y. enterocolitica 628, 5 – microbial suspension of S. typhi 21, 6 – microbial suspension S. flexneri 1964, 7 – experimental Y. pseudotuberculosis rabbit antiserum



 ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

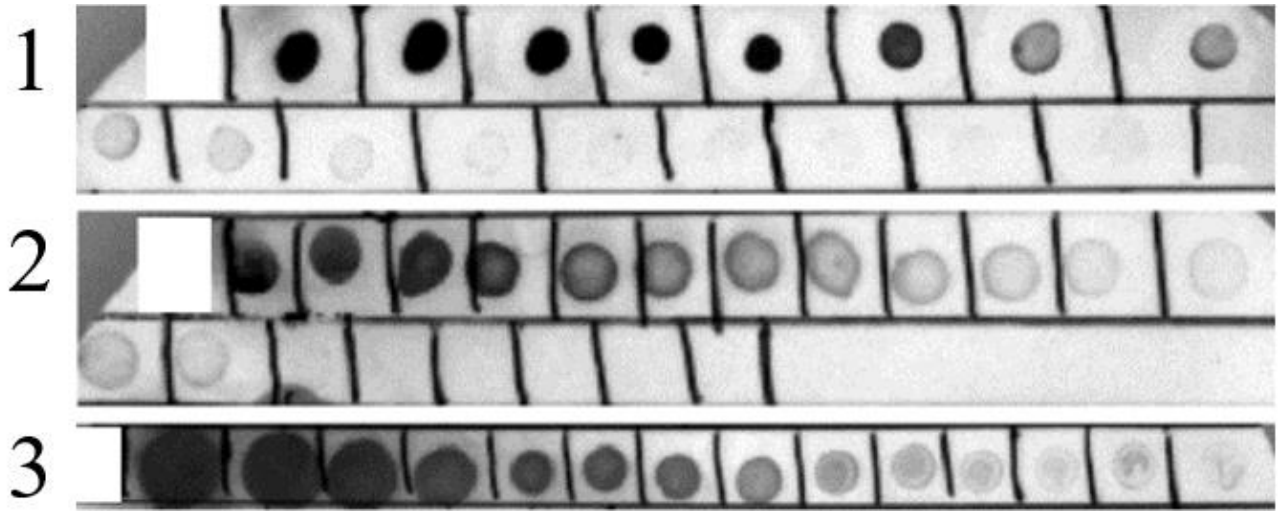
 10.15789/2220-7619-PAA-1602

Рисунок 7. Дот-иммуноанализ препаратов и микробной взвеси Y. pseudotuberculosis 3704 с изолированными из экспериментальной антисыворотки антителами, полученными против препарата белково-липополисахаридного комплекса и меченными наночастицами коллоидного серебра

1 – микробная взвесь Y. pseudotuberculosis 3704, 2 – препарат наружных мембран, 3 – препарат белково-липополисахаридного комплекса

Figure 7. Dot immunoassay of preparations and microbial suspension of Y. pseudotuberculosis 3704 by using antibodies isolated from experimental antiserum against the preparation of protein-lipopolysaccharide complex and labeled with colloidal silver nanoparticles

1 – microbial suspension of Y. pseudotuberculosis 3704, 2 – outer membrane preparation, 3 – protein-lipopolysaccharide complex preparation



 ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

10.15789/2220-7619-PAA-1602

МЕТАДАННЫЕ

Крюкова Анна Витальевна, м.н.с. биохимического отдела

Kryukova Anna Vitalyevna, Junior Researcher of biochemical Department

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Иркутский ордена трудового Красного знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Federal Government Health Institution Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and far East awarded with Order of the Red Banner of the Federal Service for Surveillance in the sphere of consumers' rights protection and human welfare

664007 Иркутск, ул. Трилиссера, 78

664007 Irkutsk, Trilsser str, 78

тел.: (3952)220-135, факс: 3952 220-140, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

phone: (3952)220-135, fax: (3952) 220-140, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Соавторы:

Марков Е. Ю. – д.б.н., с.н.с., зав. биохимическим отделом

Николаев В. Б. – к.м.н., с.н.с. биохимического отдела

Попова Ю. О. – лаборант биохимического отдела

Климов В. Т. – к.м.н., с.н.с. эпидемиологического отдела

Игумнова С. В. – врач эпидемиологического отдела

Андреевская Н. М. – к.б.н., с.н.с. лаборатории диагностических сывороток

Уланская А. В. – вет. врач лаборатории диагностических сывороток

Загоскина Т. Ю. – д.м.н., с.н.с, заведующая отделом подготовки и усовершенствования специалистов.

Чеснокова М. В. – д.м.н., профессор, заведующая отделом научного и учебно-методического обеспечения.

ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

10.15789/2220-7619-PAA-1602

Полное название статьи: Физико-химические и антигенные свойства извлекаемых мочевиной поверхностных структур *Yersinia pseudotuberculosis* O:1b

Количество страниц текста: 10, количество рисунков: 7, количество таблиц: 0.

Работа представлена для раздела «Оригинальная статья».

Дата отправления работы: 23.09.2020

ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

 10.15789/2220-7619-PAA-1602

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ

Физико-химические и антигенные свойства извлекаемых мочевиной поверхностных структур *Yersinia pseudotuberculosis* O:1b

Physicochemical and antigenic properties of the surface structures of *Yersinia pseudotuberculosis* O: 1b extracted by urea

Соавторы:

Марков Е. Ю. – д.б.н., с.н.с., зав. биохимическим отделом.

Николаев В. Б. – к.м.н., с.н.с. биохимического отдела

Попова Ю. О. – лаборант биохимического отдела

Климов В. Т. – к.м.н., с.н.с. эпидемиологического отдела

Игумнова С. В. – врач эпидемиологического отдела

Андреевская Н. М. – к.б.н., с.н.с. лаборатории диагностических сывороток

Уланская А. В. – вет. врач лаборатории диагностических сывороток

Загоскина Т. Ю. – д.м.н., заведующая отделом подготовки и усовершенствования специалистов.

Чеснокова М. В. – д.м.н., профессор, заведующая отделом научного и учебно-методического обеспечения.

Markov E. Yu. – MD, PhD (Biology), Senior Researcher, Head of biochemical department

Nikolaev V. B. – PhD (Medicine), Senior Researcher of biochemical department

Popova Yu. O. – assistant of biochemical Department of biochemical department

Klimov V.T.– PhD (Medicine), Senior Researcher, department of epidemiology

Igumnova S.V. – physician, department of epidemiology

 ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

Andreevskaya N.M. – Candidate of Science (Biology), laboratory of diagnostic sera

Ulanskaya A.V. – veterinarian, laboratory of diagnostic sera

Zagoskina T.Yu. – PhD, MD (Medicine), Head of department of professional and advanced training

Chesnokova M.V. – PhD, MD (Medicine), professor, Head of information analytical sector

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Иркутский ордена трудового Красного знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека – Federal Government Health Institution Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and far East awarded with Order of the Red Banner of the Federal Service for Surveillance in the sphere of consumers' rights protection and human welfare

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула: антигены *Y. pseudotuberculosis* – *Y. pseudotuberculosis* antigens

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, диагностика, антигены, антитела, гипериммунизация, мочевина, псевдотуберкулез

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, diagnostics, antigens, antibodies, hyperimmunization, urea, pseudotuberculosis

Адрес для переписки: г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78. Индекс 664007, тел.: (3952)220-135, факс: (3952)220-140, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

10.15789/2220-7619-PAA-1602

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или
1	Загоскина Т.Ю., Чеснокова М.В., Климов В.Т., Попова Ю.О., Марков Е.Ю., Старикова О.А. Конструирование тест-системы с наночастицами коллоидного серебра для обнаружения возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза в дот-иммуноанализе // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2017. № 1. С. 55–61.	Zagoskina T.Yu., Chesnokova M.V., Klimov V.T., Popova Yu.O., Markov E.Yu., Starikova O.A. Construction of a test-system with nanoparticles of colloid silver for detection of pseudotuberculosis and intestinal yersiniosis for causative agents in dot-immunoassay. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 2017, no 1, pp. 55–61. (in Russ.)	https://microbiol.elpub.ru/jour/article/view/123 [DOI: 10.36233/0372-9311-2017-1-55-61]
2	Каримова Т.В., Климов В.Т., Чеснокова М.В. Молекулярно-биологическая характеристика *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке // Acta	Karimova T.V., Klimov V.T., Chesnokova M.V. Biomolecular characteristics of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* isolated in Siberia and in the Far East. Acta Biomedica Scientifica. 2016, vol. 1, no 3 (1), pp. 60–64. (in Russ.)	https://www.actabiomedica.ru/jour/article/view/228 [DOI: 10.12737/21612]

ISSN 2220-7619 (Print)
ISSN 2313-7398 (Online)

	Biomedica Scientifica. 2016. Т. 1, № 3 (1). С. 60–64.		
3	Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Голубинский Е.П., Чернов А.Б., Каретникова Э.С., Иванова Т.А., Пакулев Н.А. Наружные мембраны холерного вибриона как потенциальный компонент химической вакцины // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1995. № 2. Приложение. С. 86–89.	Markov E.Yu., Urbanovich L.Ya., Golubinsky E.P., Chernov A.B., Karetnikova E. S., Ivanova T.A., Pakulev N. A. Outer membranes of the *Vibrio cholerae* as a potential component of a chemical vaccine. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology, 1995. no 2. Suppl., pp. 86–89. (In Russ.)*	https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7771156/
4	Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Голубинский Е.П., Каретникова Э.С., Иванова Т.А., Николаев В.Б., Завезенов Н.П., Субычева Е.Н. Получение высокоиммуногенного препарата наружных мембран *Vibrio cholerae eltor* // Журнал инфекционной патологии (Иркутск). 1998. Т. 5, № 4. С. 42–48.	Markov E.Yu., Urbanovich L.Ya., Golubinsky E.P., Karetnikova E. S., Ivanova T.A., Nikolaev V. B., Zavezenov N. P., Subycheva E. N. Obtaining highly immunogenic preparation of the outer membranes of *Vibrio cholerae eltor. Zhurnal infektsionnoy patologii = Journal of infectious pathology (Irkutsk), 1998, vol. 5, no 4, pp. 42–48. (In Russ.)*	https://elibrary.ru/item.asp?id=32427583

5	Патент № 2051969 C1 Российская Федерация, МПК[6] C 12 P 19/04. Способ получения бактериальных липополисахаридов; заявлено 1992.07.31: опубликовано 1996.01. 10 / Марков Е.Ю., Николаев В.Б. / Патентообладатель: Иркут. н-и. противочум. ин-т Сибири и ДВ. 3 с.	Patent No. 2051969 C1 Russian Federation, Int. Cl.[6] C l2 P 19/04. Method of bacterial lipopolysaccharide preparing; application 1992.07.31: date of publication 10.01.1996 / Markov E.Ju., Nikolaev V.B. Proprietors: Irkutskij nauchno-issledovatel'skij protivochumnyj institut Sibiri i Dal'nego Vostoka. 3 p.	https://yandex.ru/patents/doc/RU2051969C1_19960110
6	Патент № 2114436 C1, Российская Федерация, МПК[6] G01N 33/52. Способ определения бактериальных липополисахаридов; заявлено 1996.05.06: опубликовано 1998.06.27 / Чернов А.Б., Марков Е.Ю. (РФ) / Патентообладатель: Иркут. н.-и. противочум. ин-т Сибири и ДВ. 5 с.	Patent No. 2051969 C1 Russian Federation, Int. Cl.[6] G01N 33/52. Method of assay of bacterial lipopolysaccharides; application 1996.05.06: date of publication 1998.06.27 / Chernov A.B., Markov E.Ju. Proprietors: Irkutskij nauchno-issledovatel'skij protivochumnyj institut Sibiri i Dal'nego Vostoka. 5 p.	https://yandex.ru/patents/doc/RU2114436C1_19980627
7	Помогаева А.П., Уразова О.И., Ковширина Ю.В., Перевозчикова Т.В., Бармина С.Э. Клинико-	Pomogayeva A.P., Ourazova O.I., Kovshirina Yu.V., Perevozchikova T.V., Barmina S.E. Clinical and	https://elibrary.ru/item.asp?id=9305909

	иммунологические особенности псевдотуберкулеза у детей // Бюллетень сибирской медицины. 2006. № 4. С. 103–111.	immunological peculiarities of pseudotuberculosis at children. *Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine, 2006, no. 4, pp. 103–111. (In Russ.)*	
8	Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2008 г. № 4.	Sanitary and epidemiological rules SR 1.3.2322-08 «Safety of work with microorganisms of the III-IV pathogenicity (danger) groups and pathogens of parasitological diseases» approved by the decision of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation approved on January 28, 2008. no 4.	http://docs.cntd.ru/document/902091086
9	Тимченко Н.Ф., Попов А.Ф. Псевдотуберкулез – прошлое и настоящее // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2014, № 4 (9). С. 51–56.	Timchenko N.F., Popov A.F. Pseudotuberculosis – past and present. *Infektsionnyye bolezni: novosti, mneniya, obucheniye = Infection Diseases: News, Opinions, Training. 2014, no 4 (9), pp. 51–56. (In Russ.)*	https://cyberleninka.ru/article/n/psevdotuberkulez-proshloe-i-nastoyaschee
10	Корнева А.В., Николаев В.Б.,	Korneva A.V., Nikolaev V.B., Polovinkina V.S., Markov E.Yu.,	https://elibrary.ru/download/elibrary

	Половинкина В.С., Марков Е.Ю., Козлов С.Н., Мазепа А.В., Дубровина В.И., Загоскина Т.Ю., Урбанович Л.Я., Иванова Т.А., Балахонов С.В. Получение, характеристика и вакцинный потенциал поверхностных структур бактериальных возбудителей особо опасных инфекций. // Дальневосточный Журнал Инфекционной Патологии. 2019. № 37. С. 91–92.	Kozlov S.N., Mazepa A.V., Dubrovina V.I., Zagoskina T.Yu., Urbanovich L.Ya., Ivanova T.A., Balakhonov S.V. Purification, characteristics and vaccine potential of the surface structures of bacterial agents of especially dangerous infections. *Dal'nevostochnyy Zhurnal Infektsionnoy Patologii = The Far Eastern Journal of Infectious Pathology. 2019, no. 37, pp. 91–92. (In Russ.)*	_41420825_36483590.pdf
11	Hornbeck P. Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies (Ouchterlony). *Curr. Protoc. Immunol., 2017, vol. 116, pp. 2.3.1–2.3.4.*	–	https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpim.18 [DOI: 10.1002/cpim.18]
12	Hu Y.F., Zhao D., Yu X.L., Hu Y.L., Li R.C., Ge M., Xu T.Q., Liu X.B., Liao H.Y. Identification of bacterial surface antigens by screening	–	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5266700/pdf/fmicb-08-00082.pdf [DOI: 10.3389/fmicb.2017.00082]

	peptide phage libraries using whole bacteria cell-purified antisera. *Front Microbiol., 2017, vol. 8, Article 82.*		
13	Derbise A., Guillas C., Gerke C., Carniel E., Pizarro-Cerda J., Demeure C.E. Subcutaneous vaccination with a live attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* plague vaccine. *Vaccine, 2020, vol. 38, no 8, p. 1888–1892.*	–	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31964555 [DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.01.014]
14	Dong W., Wang F., Zhang J., Zhou Y., Zhang L., Wang T. A simple, time-saving dye staining of proteins in sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel using Coomassie blue. *Protein Gel Detection and Imaging, 2018, pp. 31–35.*	–	https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-8745-0_5 [10.1007/978-1-4939-8745-0_5]
15	Tajhya R.B., Patel R.S., Beeton C. Detection of matrix metalloproteinases by zymography.	–	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28299740 [DOI: 10.1007/978-1-4939-6863-3_12]

	Methods Mol. Biol., 2017, vol. 1579. pp. 231–244.		
16	Zubova S.V., Prokhorenko I.R. Use of colorimetric method for evaluation of LPS of different structure. *Bull. Exp. Biol. Med., 2006, vol. 141, no 6, pp. 765–767.*	–	https://www.researchgate.net/publication/6443293_Use_of_colorimetric_method_for_evaluation_of_LPS_of_different_structure [DOI: 10.1007/s10517-006-0274-1]
17	Gallagher S.R. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr. Protoc. Cell Biol., 2007, vol. 37, no 1, pp. 6.1.1–6.1.38.*	–	https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471143030.cb0601s37 [DOI: 10.1002/0471143030.cb0601s37]
18	Waterborg J.H. The Lowry Method for Protein Quantitation. In: Walker J.M. (ed.) The Protein Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks. Third Edition. Totowa, NJ.: Humana Press, 2009, pp. 7–10.	–	https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-198-7_2 [DOI: 10.1007/978-1-59745-198-7_2]
19	Fishman J.B., Berg E.A. Antibody purification and storage. *Cold Spring Harbor Protocols, 2019, vol.*	–	http://cshprotocols.cshlp.org/content/2019/5/pdb.top099101.full.pdf+html [DOI: 10.1101/pdb.top099101]

	2019, no 5, pp. 331–344.		
20	Li H., Benghezal M. Crude preparation of lipopolysaccharide from *Helicobacter pylori* for silver staining and Western blot. *Bio Protoc., 2017, vol. 7, no 20, Article e2585.*	–	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8438427/pdf/BioProtoc-7-20-2585.pdf [DOI: 10.1094/MPMI-08-13-0248-R]
21	Wang X., Zhang C., Shi F., Hu X. Purification and characterization of lipopolysaccharides. *Subcell. Biochem., 2010, vol. 53, pp. 27–51.*	–	https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-90-481-9078-2_2 [DOI: 10.1007/978-90-481-9078-2_2]