DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-49-57

Бактериология, 2026, том 11, №3, с. 49–57
Bacteriology, 2026, volume 11, No 3, p. 49–57

Скрининг и оптимизация парных комбинаций моноклональных антител для иммунодетекции ботулинического нейротоксина серотипа B

Т.А.Иващенко, А.С.Карцева, А.К.Рябко, Н.А.Зенинская, М.А.Марьин, М.М.Рогозин, Я.О.Романенко, И.С.Лутчева, А.А.Ершова, В.В.Фирстова

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

Ботулизм представляет собой потенциально опасное инфекционное заболевание, этиологическим фактором которого выступают штаммы бактерий рода Clostridium, синтезирующие ботулинический нейротоксин (BoNT). Своевременное обнаружение BoNT имеет большое значение для подтверждения клинического диагноза и определения серотипа BoNT, вызывающего заболевание.

Цель работы заключается в определении диагностической ценности панели моноклональных антител (МКА) и последующем подборе их наиболее эффективных парных комбинаций для высокочувствительной детекции ботулинического нейротоксина серотипа B (BoNT/B).

Материалы и методы. Рекомбинантные белки экспрессировали в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3), предварительно трансформированном плазмидными векторами pET-LCB и pET-HCB, сконструированными на базе исходной коммерческой плазмиды pET-22b(+). МКА модифицировали путем конъюгации с N-гидроксисукцинимидным эфиром биотина. Подбор комбинаций МКА проводили в формате иммуноферментного анализа («сэндвич»-ИФА). Оценку эффективности детектирования BoNT/B проводили в условиях сложных биологических матриц, представленных сывороткой крови человека и 10%-м раствором бычьего сывороточного альбумина.

Результаты. В результате проведенного скрининга было идентифицировано 38 комбинаций МКА, 4 из которых обеспечивали детекцию рекомбинантного фрагмента тяжелой цепи ботулинического нейротоксина (rBoNT/B-HC) в диапазоне концентраций от 0,2 до 0,9 нг/мл, а 3 пары МКА демонстрировали высокоспецифическое связывание с легкой цепью токсина (rBoNT/B-LC).

Определена наиболее эффективная комбинация антител, в которой в качестве захватывающего выступало МКА HCB 3-20, а в качестве детектирующего – МКА HCB 3-18. Данная пара антител обеспечивала минимальный предел обнаружения целевого антигена, составивший 0,2 нг/мл.

Проведена оценка эффективности связывания МКА с токсином в сложных биологических средах. Показано, что минимальная детектируемая концентрация ботулотоксина в сыворотке крови составила 5 нг/мл, а в растворе альбумина – 10 нг/мл.

Заключение. Подобранные комбинации МКА, специфичных к BoNT/B, могут представлять собой перспективную технологическую платформу для создания высокочувствительных систем иммуноанализа. Полученные иммунореагенты могут быть эффективно интегрированы как в классический формат «сэндвич»-ИФА, так и в гетерогенные детекционные платформы на основе магнитных микросфер, что открывает широкие возможности для вариативности и оптимизации инструментального выявления BoNT/B.

Ключевые слова: ботулизм, ботулинический нейротоксин типа B, моноклональные антитела, «сэндвич»-ИФА, детекция

Для цитирования: Иващенко Т.А., Карцева А.С., Рябко А.К., Зенинская Н.А., Марьин М.А., Рогозин М.М., Романенко Я.О., Лутчева И.С., Ершова А.А., Фирстова В.В. Скрининг и оптимизация парных комбинаций моноклональных антител для иммунодетекции ботулинического нейротоксина серотипа B. Бактериология. 2026; 11(3): 49–57. DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-49-57

Screening and optimization of paired monoclonal antibody combinations for immunodetection of botulinum neurotoxin serotype B

T.A.Ivashchenko, A.S.Kartseva, A.K.Riabko, N.A.Zeninskaya, M.A.Marin, M.M.Rogozin, Ya.O.Romanenko, I.S.Lutcheva, A.A.Ershova, V.V.Firstova

Для корреспонденции:

Иващенко Татьяна Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0147
ORCID: 0000-0002-4908-2524

Статья поступила 26.08.2026, принята к печати 30.09.2026

For correspondence:

Tatiana A. Ivashchenko, PhD in Biological Sciences,
Researcher of the Laboratory of Molecular Biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor

Address: 24 "Quarter A" Territory, 142279, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0147
ORCID: 0000-0002-4908-2524

The article was received 26.08.2026, accepted for publication 30.09.2026

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor, Obolensk, Russian Federation

Botulism is a potentially dangerous infectious disease caused by Clostridium bacteria that synthesize botulinum neurotoxin (BoNT). Timely detection of BoNT is essential for confirming the clinical diagnosis and determining the causative BoNT serotype.

The purpose of this study was to determine the diagnostic value of a panel of monoclonal antibodies (mAbs) and subsequently select the most effective paired combinations for highly sensitive detection of botulinum neurotoxin serotype B (BoNT/B).

Materials and methods. Recombinant proteins were expressed in Escherichia coli BL21(DE3) pre-transformed with pET-LCB and pET-HCB plasmid vectors, constructed from the original commercial pET-22b(+) plasmid. The mAbs were modified by conjugation with biotin N-hydroxysuccinimide ester. The selection of mAb combinations was performed using a sandwich ELISA. The efficiency of BoNT/B detection was assessed in complex biological matrices consisting of human serum and 10% bovine serum albumin.

Results. Thirty-eight mAb combinations were identified as a result of the screening. Four of these mAbs detected the recombinant heavy chain fragment of botulinum neurotoxin (rBoNT/B-HC) in the concentration range of 0.2 to 0.9 ng/ml, while three mAb pairs demonstrated highly specific binding to the toxin's light chain (rBoNT/B-LC).

The most effective antibody combination was identified, in which the HCB 3-20 mAb served as the capture antibody and the HCB 3-18 mAb served as the detection antibody. This pair of antibodies provided a minimum detection limit of 0.2 ng/ml for the target antigen.

The binding efficiency of the mAbs to the toxin was assessed in complex biological environments. The minimum detectable concentration of botulinum toxin in serum was 5 ng/ml, and in albumin solution, 10 ng/ml.

Conclusion. The selected combinations of mAbs specific to BoNT/B may represent a promising technological platform for the development of highly sensitive immunoassay systems. The resulting immunoreagents can be effectively integrated into both the classic sandwich ELISA format and heterogeneous detection platforms based on magnetic microspheres, opening up broad possibilities for variability and optimization of instrumental detection of BoNT/B.

Key words: botulism, botulinum neurotoxin type B, monoclonal antibodies, sandwich ELISA, detection

For citation: Ivashchenko T.A., Kartseva A.S., Riabko A.K., Zeninskaya N.A., Marin M.A., Rogozin M.M., Romanenko Ya.O., Lutcheva I.S., Ershova A.A., Firstova V.V. Screening and optimization of paired monoclonal antibody combinations for immunodetection of botulinum neurotoxin serotype B. Bacteriology. 2026; 11(3): 49–57. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2026-3-49-57

Ботулинические нейротоксины (BoNTs) – белковые вещества, синтезируемые грамположительной палочковидной бактерией *Clostridium botulinum*, представленные семью серологически и генетически различающимися типами (A–G) и обладающие избирательным протеолитическим действием в отношении SNARE-белков синаптического аппарата, что обусловливает их крайне высокую нейротоксичность [1].

Серотипы A и B являются причиной подавляющего числа случаев заболевания ботулизмом и летальных исходов у человека [2]. Обладая статусом одного из наиболее летальных биологических агентов естественного происхождения, BoNTs отнесены к категории патогенов класса A. Их токсичность превосходит аналогичный показатель цианистого калия приблизительно в 10^{11} раз [3]. Летальная доза для взрослого человека при пероральном попадании варьирует от 5 до 50 нг на 1 кг массы тела. Патогенез заболевания характеризуется пролонгированным течением: процесс реконвалесценции протекает крайне медленно, а неврологические нарушения требуют длительного периода реабилитации [4].

Ботулинический нейротоксин серотипа B (BoNT/B), как один из наиболее опасных и распространенных серотипов, часто встречается в случаях пищевых отравлений. Как и другие ботулинические токсины, BoNT/B состоит из легкой (LC) и тяжелой (HC) цепей, связанные одной дисульфидной связью. HC в основном отвечает за связывание с нервными клетками и облегчение их перемещения, в то время как LC опосредует нейротоксический эффект, блокируя нейротрансмиссию [5].

Вспышки заболевания среди людей регистрируются по всему миру, при этом пищевое отравление является наиболее распространенной формой заболевания [6]. В связи с этим обнаружение BoNT в продуктах питания является крайне актуальной задачей. Биопроба на мышах является распространенным стандартным методом подтверждения ботулизма. Несмотря на высокую чувствительность, этот метод сопряжен с трудностями интерпретации получаемых данных и может давать неоднозначные результаты. Биологический анализ на мышах – медленный процесс, требующий как минимум 4 дней для завершения, использования лабораторных животных и оценки конечной точки на основе смертности. Поэтому необходимы новые более быстрые и надежные методы обнаружения [7].

Благодаря своей уникальной способности распознавать молекулы-мишени моноклональные антитела (МКА) являются важным инструментом для диагностики и терапии ботулизма. Однако их разработка существенно осложняется выраженной антигенной гетерогенностью BoNT, представленного семью серологически дифференцированными серотипами, уровень вариабельности которых по аминокислотной последовательности составляет 34–64%. Дополнительный фактор вариативности обусловлен наличием внутри серотипов множества подтипов, демонстрирующих аминокислотные различия в диапазоне 1,6–32% [8]. В связи с этим своевременность и терапевтическая эффективность лечения возможны при условии быстрой дифференциации серотипов нейротоксина.

Высокую эффективность в лабораторной практике продемонстрировали иммунологические методы, основанные на применении специфических антител. В частности, иммуноферментный анализ (ИФА) позволяет выявить и идентифицировать ботулинический нейротоксин всего за 5–6 ч. Разработанные в ряде лабораторий ИФА-тесты по своей чувствительности уже практически не уступают классическому мышиному биоанализу [9].

Цель настоящей работы заключается в определении диагностической ценности панели МКА и последующем подборе их наиболее эффективных парных комбинаций для высокочувствительной детекции ботулинического нейротоксина серотипа В (BoNT/B).

Материалы и методы

Получение рекомбинантных легкой и тяжелой цепей ботулинического нейротоксина типа В (rBoNT/B-LC и rBoNT/B-HC)

Рекомбинантные белки были наработаны с плазмид pET-HCB и pET-LCB, сконструированных на основе исходного немодифицированного коммерческого вектора pET-22b(+) (Invitrogen, США) по методу, описанному в [10].

Полученные плазмиды использовали для экспрессии рекомбинантных белков в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3). Клетки-продуценты выращивали в среде 2xYT, содержащей 0,1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, при 37°С до достижения оптимальной оптической плотности культуры. Накопление целевых белков осуществляли в течение 18 ч при 25°С. Очистку рекомбинантных белков проводили на приборе AKTA FPLC (GE Healthcare, ex-Amersham) в два этапа: металл-хелатная хроматография с последующей доочисткой при помощи гель-фильтрационной хроматографией на колонке Superdex 75 (GE Healthcare, Великобритания) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (pH 7,4). Чистоту полученных белков контролировали электрофорезом в 10%-м полиакриламидном геле (ПААГ)..

Подбор комбинаций моноклональных антител («сэндвич» – дот-блот)

МКА, специфичные к LC и HC BoNT/B, получали с использованием стандартной методики, описанной нами в предыдущих исследованиях [11]. В качестве иммуногена использовали рекомбинантные белки rBoNT/B-LC и rBoNT/B-HC.

Каждое МКА тестировалось в комбинации со всеми используемыми в исследовании МКА для выявления пар, способных обнаруживать рекомбинантные rBoNT/B-LC и rBoNT/B-HC. Для этого МКА были конъюгированы с биотином с использованием биотинсукцинимидного эфира (Sigma, США) по методу Duk [12] с 50-кратным молярным избытком биотинового реагента. В качестве захватывающего антитела использовалось немеченое МКА, а в качестве детектирующего – биотинилированная форма. На нитроцеллюлозную мембрану (GE Water & Process Technologies, США) с помощью прибора Bio-Dot (Bio-Rad, США) наносили немеченые биотином антитела в концентрации 10 мкг/мл МКА в ФСБ. Далее мембрану блокировали 0,05%-м обезжиренным молоком в течение 1 ч при 37°С и добавляли раствор рекомбинантных rBoNT/B-LC или rBoNT/B-HC в концентрации 10 мкг/мл, затем биотинилированное МКА добавляли в разведении 1:400 в растворе ФСБ и инкубировали в течение 1 ч при 37°С. После каждой инкубации мембрану отмывали 4 раза с использованием раствора ФСБ с добавлением 0,05% Tween-20 (ФСБ-Т). Далее вносили конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена («Имтек», Россия) в рабочем разведении 1:10 000.

Визуализацию реакции проводили раствором субстрата – 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma, США) – в течение 20 мин при 37°С, после чего измеряли значения абсорбции на фотометре Multiskan (Labsistems, США) при длине волны 450 нм. Реакцию останавливали после отчетливо различимого окрашивания образцов путем погружения мембраны в дистиллированную воду.

Определение минимальной детектируемой концентрации rBoNT/B-LC и rBoNT/A-HC50 методом «сэндвич»-ИФА

Полистироловые 96-луночные планшеты для ИФА покрывали немечеными биотином МКА в ФСБ, pH 7,4 с концентрацией 10 мкг/мл и инкубировали в течение 1 ч на шейкере при температуре 37°С, затем 4 раза промывали ФСБ-Т. Свободные сайты пластика блокировали добавлением в каждую лунку по 160 мкл молока 0,05%-й жирности, инкубировали в течение 1 ч на шейкере при температуре 37°С и промывали 3 раза ФСБ-Т. Далее добавляли растворы рекомбинантных белков rBoNT/B-LC и rBoNT/A-HC50 в исходной концентрации 500 нг/мл, последовательно разбавляя в 2 раза. Для определения ботулотоксина в сложных матричных системах проводили последовательное разведение рекомбинантных белков rBoNT/BLC и rBoNT/AHC50 в 10%-й человеческой сыворотке и растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA) (Sigma-Aldrich, США).

В качестве контроля использовали лунки без добавления антигена. Затем биотинилированное МКА добавляли в разведении 1:400 в растворе ФСБ и инкубировали в течение 1 ч при 37°С. После каждой инкубации планшет отмывали 4 раза с использованием раствора ФСБ-Т. Затем в лунки планшета добавляли по 100 мкл конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена («Имтек», Россия) в разведении 1:10 000 в ФСБ-Т. После этого в лунки вносили по 100 мкл субстратного раствора на основе тетраметилбензидина (TMB). Реакцию оценивали по появлению синего окрашивания раствора. Интенсивность окрашивания измеряли на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad xMark) при λ = 450 нм.

Результаты исследования и их обсуждение

Получение рекомбинантных легкой и тяжелой цепей ботулинического нейротоксина типа В (rBoNT/B-LC и rBoNT/B-HC)

На первом этапе были получены рекомбинантные белки LC BoNT/B и HC BoNT/B. Белки очищали методом металл-хелатной хроматографии с последующей гель-фильтрацией. При электрофоретическом разделении образцы мигрировали в виде пятен молекулярной массой 52,1 и 57,8 кДа, что соответствует теоретически расчетным значениям для белков LC BoNT/B и HC BoNT/B (рис. 1). Белки LC BoNT/B и HC BoNT/B были получены с высокой степенью чистоты (~ 97%) и выходом более 45 и 25 мг/л культуры соответственно.

Скрининг и валидация диагностических пар моноклональных антител

На следующем этапе работы методом гибридомной технологии была получена панель МКА, специфичных к LC (9 клонов) и к HC (21 клон) BoNT/B. Разработка панели МКА проводилась с целью выбора пар антител, пригодных для создания высокочувствительной иммунохимической тест-системы для детекции BoNT/B. Стратегия скрининга антител основывалась на матричном подходе, при котором каждый клон МКА последовательно тестировали в комбинации со всеми остальными клонами из сгенерированной библиотеки МКА.

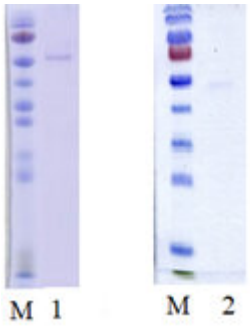

Рис. 1. **Результаты электрофоретического разделения рекомбинантных очищенных белков. М – маркер молекулярных масс SM0671 (Invitrogen); 1 – белок HC50 BoNT/B, MW 57,8 кДа; 2 – белок LC BoNT/B после финальной очистки, MW 52,1 кДа.**
*Fig. 1. **Results of electrophoretic separation of recombinant purified proteins. M – Molecular mass marker SM0671 (Invitrogen); 1 – HC50 BoNT/B protein, MW 57.8 kDa; 2 – LC BoNT/B protein after final purification, MW 52.1 kDa.***

Для создания детектирующего компонента МКА подвергали конъюгации с N-гидроксисукцинимидным эфиром биотина, что обеспечивало образование стабильной амидной связи с ε-аминогруппами лизиновых остатков в молекуле иммуноглобулина. Неконъюгированное МКА иммобилизовали на планшете в качестве захватывающего реагента, тогда как его биотинилированный аналог применяли в качестве детектирующего антитела с последующей визуализацией комплекса при помощи конъюгата стрептавидин-пероксидаза хрена.

В ходе перекрестного сэндвич-анализа всех возможных сочетаний МКА были идентифицированы 38 функциональных комбинаций, проявляющих специфическое связывание с целевыми антигенами. В частности, установлено, что 4 пары МКА обеспечивали эффективное детектирование rBoNT/B-LC, тогда как оставшиеся 34 комбинации детектировали rBoNT/B-HC50. Результаты скрининга парных сочетаний МКА и оценка их аналитической чувствительности представлены в таблице.

Определение чувствительности полученных пар МКА

После выбора комбинаций захватывающего и детектирующего МКА была проведена серия экспериментов в формате «сэндвич»-ИФА, целью которых являлась сравнительная оценка аналитической эффективности всех возможных сочетаний пар антител по критерию максимальной чувствительности. Валидация каждой комбинации проводилась путем титрования rBoNT/B-LC и rBoNT/B-HC50 BoNT/B в диапазоне концентраций, обеспечивающем определение предела обнаружения. Итоговый выбор диагностической пары осуществлялся на основе минимальной детектируемой концентрации целевого антигена. Данное исследование позволило идентифицировать комбинацию МКА, обладающую наибольшей чувствительностью и специфичностью.

В ходе скрининга методом «сэндвич»-ИФА было идентифицировано 19 комбинаций МКА, проявляющих специфическое связывание с rBoNT/B-HC50 BoNT/B. Наибольшую аналитическую чувствительность продемонстрировали 4 пары МКА, три из которых были образованы МКА НСВ 3-29, НСВ 3-23 и НСВ 3-20 в качестве захватывающих в комбинации с детектирующим МКА НСВ 3-18. Четвертая комби-

Таблица 1. **Результаты скрининга парных сочетаний моноклональных антител (МКА) и оценка их аналитической чувствительности**
*Table 1. **Results of screening paired monoclonal antibody (MAb) combinations and assessment of their analytical sensitivity***

МКА иммобилизованное / *MAb immobilized*	МКА детектирующее / *MAb detecting*	Предел обнаружения в ИФА, нг/мл / *Detection limit in ELISA, ng/ml*
МКА к rBoNT/B-HC		
НСВ 3-23	НСВ 3-29	–
НСВ 3-20	НСВ 3-29	10
НСВ 3-8-3	НСВ 3-29	–
НСВ 3-18	НСВ 3-29	–
НСВ 3-29	НСВ 3-23	7
НСВ 3-20	НСВ 3-23	0,9
НСВ 3-8	НСВ 3-23	–
НСВ 3-18	НСВ 3-23	1,9
НСВ 3-29	НСВ 3-5	250
НСВ 3-23	НСВ 3-5	7,8
НСВ 3-20	НСВ 3-5	62
НСВ 3-8-3	НСВ 3-5	–
НСВ 3-18	НСВ 3-5	7,8
НСВ 3-29	НСВ 3-12	–
НСВ 3-23	НСВ 3-12	–
НСВ 3-20	НСВ 3-12	–
НСВ 3-8	НСВ 3-12	125
НСВ 3-18	НСВ 3-12	30
НСВ 3-29	НСВ 3-18	7
НСВ 3-20	НСВ 3-18	7
НСВ 3-8	НСВ 3-18	–
НСВ 3-18	НСВ 3-18	7
НСВ 3-29	НСВ 3-20	30
НСВ 3-23	НСВ 3-20	1,9
НСВ 3-8	НСВ 3-20	–
НСВ 3-18	НСВ 3-20	30
НСВ 3-29	НСВ 3-8	–
НСВ 3-23	НСВ 3-8	–
НСВ 3-18	НСВ 3-8	–
НСВ 3-29	НСВ 3-18	0,4
НСВ 3-23	НСВ 3-18	0,9
НСВ 3-20	НСВ 3-18	0,2
МКА к rBoNT/B-LC		
LCB 4-78	LCB 4-23	1,9
LCB 4-67	LCB 4-23	125
LCB 4-67	LCB 4-79	–
LCB 4-23	LCB 4-79	62

Серым цветом выделены пары МКА, демонстрирующие минимальный предел обнаружения целевого антигена; красным цветом – обладающие перекрестной специфической активностью в отношении BoNT/A и BoNT/B; «–» указывает на отсутствие специфического связывания. /
Pairs of MAbs demonstrating the minimum detection limit of the target antigen are highlighted in gray; MAbs exhibiting cross-specific activity against BoNT/A and BoNT/B are highlighted in red. «–» indicates the absence of specific binding.

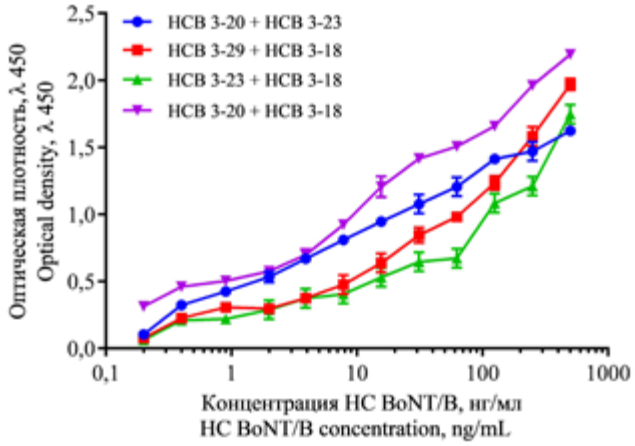

Рис. 2. **Результаты детекции rBoNT/B-HC с использованием пар МКА в «сэндвич»-формате ИФА. Представлены кривые титрования, полученные при использовании трех захватывающих антител (НСВ 3-29, НСВ 3-23, НСВ 3-20) в комбинации с двумя детектирующими биотинилированными антителами (НСВ 3-23 и НСВ 3-18).**

*Fig. 2. **Results of rBoNT/B-HC detection using MAbs pairs in a sandwich ELISA format. Titration curves obtained using three capture antibodies (HCB 3-29, HCB 3-23, HCB 3-20) in combination with two biotinylated detection antibodies (HCB 3-23 and HCB 3-18) are shown.***

нация была образована захватывающими МКА НСВ 3-20 и мечеными МКА НСВ 3-23. Предел обнаружения rBoNT/B-HC50 в указанных конфигурациях варьировал от 0,9 до 0,2 нг/мл, что свидетельствует о высокой чувствительности полученных МКА. Наиболее эффективной оказалась комбинация антител, в которой в качестве захватывающего выступало МКА НСВ 3-2, а в качестве детектирующего – МКА НСВ 3-18. Данная пара антител обеспечивала самый низкий уровень обнаружения целевого антигена (0,2 нг/мл). Данные по сравнению эффективности рабочих пар МКА представлены на рис. 2. Результаты отражают специфичность взаимодействия антител с антигеном и позволяют оценить чувствительность каждой комбинации.

При анализе распознавания легкой цепи rBoNT/B-LC установлено, что из 4 протестированных комбинаций МКА специфическую реактивность в формате «сэндвич»-ИФА проявили 3 пары антител. Оптимальной комбинацией антител оказалась пара, в которой МКА LCB 4-78 выполняло функцию захватывающего антитела, а МКА LCB 4-23 – детектирующего. Данная комбинация обеспечила наиболее низкий порог обнаружения среди всех вариантов, специфичных к LC-домену. Результаты определения аналитической чувствительности комбинаций МКА представлены в таблице.

Оценку воспроизводимости данного анализа в сложных матрицах оценивали на модельных системах, содержащих rBoNT/B-LC и rBoNT/A-HC50, последовательно разведенные в растворе человеческой сыворотки и BSA для имитации *in vivo* условий и контроля неспецифической сорбции. Для данного этапа исследования были отобраны только те пары антител, которые продемонстрировали максимальную эффективность в предварительных экспериментах с буферным раствором, что позволило сфокусировать исследование на наиболее перспективных кандидатах (рис. 3).

Данный эксперимент показал снижение иммунохимического сигнала при использовании исследуемых матриц. В частности, отмечено, что пара МКА НСВ 3-20 и НСВ 3-18, ранее продемонстрировавшая высокую эффективность при детекции НС BoNT/B в буферном растворе (0,2 нг/мл), характеризовалась снижение эффективности в матричном растворе примерно до 5 нг/мл (в сыворотке крови) и до 10 нг/мл (в растворе альбумина).

Обсуждение

BoNTs признаны высокотоксичными веществами, представляющими наибольшую угрозу в контексте биотерроризма [13]. В экстренных клинических ситуациях успех лечения напрямую

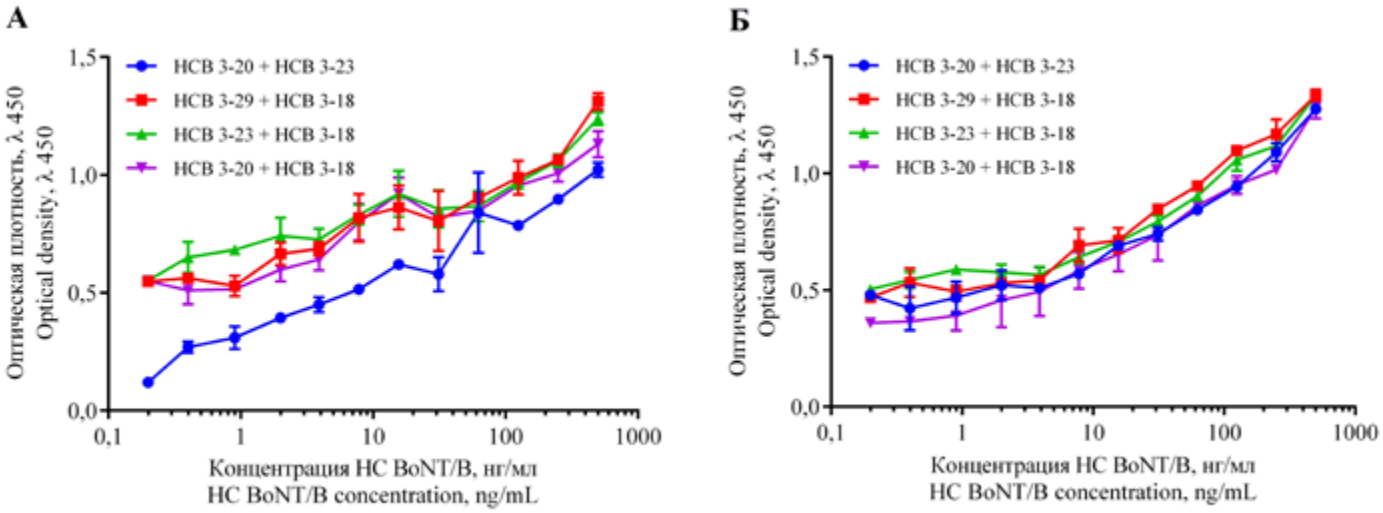

Рис. 3. **Влияние компонентов сложных биологических матриц на эффективность детекции rBoNT/B-HC в «сэндвич»-варианте твердофазного ИФА с использованием пар МКА: а – кривые, полученные при добавлении rBoNT/B-HC в сыворотку крови человека; б – полученные при добавлении rBoNT/B-HC в 10%-й раствор бычьего сывороточного альбумина. Представлены кривые титрования, полученные при использовании трех захватывающих антител (НСВ 3-29, НСВ 3-23, НСВ 3-20) в комбинации с двумя детектирующими биотинилированными антителами (НСВ 3-23 и НСВ 3-18).**

*Fig. 3. **Effect of complex biological matrix components on rBoNT/B-HC detection efficiency in a sandwich solid-phase ELISA using pairs of MAbs: a – curves obtained by adding rBoNT/B-HC to human serum; b – curves obtained by adding rBoNT/B-HC to a 10% bovine serum albumin solution. Titration curves obtained using three capture antibodies (HCB 3-29, HCB 3-23, and HCB 3-20) in combination with two biotinylated detection antibodies (HCB 3-23 and HCB 3-18) are shown.***

зависит от скорости распознавания симптомов и оперативного лабораторного детектирования BoNTs в биоматериале пациента. В связи с этим возникает острая необходимость в быстрых и высокочувствительных диагностических методах, позволяющих обнаруживать BoNTs и определять серотип.

В настоящем исследовании представлена панель МКА и оптимизированы их парные сочетания, обладающие высоким потенциалом для конструирования экспресс-систем иммунодетекции BoNT/B. Максимальная аналитическая чувствительность в формате гетерогенного «сэндвич»-ИФА была достигнута при использовании антител HCB 3-29, HCB 3-23 или HCB 3-20 в качестве иммобилизованной (захватывающей) фазы в комбинации с детектирующим антителом HCB 3-18. Разра-ботанные пары МКА обеспечивали эффективную регистрацию рекомбинантного фрагмента тяжелой цепи (rBoNT/B-HC50) в линейном диапазоне от 0,2 до 0,9 нг/мл, а также выявление легкой цепи (rBoNT/B-LC) с минимально определяемой концентрацией 1,9 нг/мл. Ключевым преимуществом и отличительной особенностью разработанной системы является ее аналитическая универсальность на этапе первичного связывания антигена. Проведенный ранее анализ перекрестной реактивности показал, что полученные захватывающие МКА обладают выраженным сродством не только к целевому токсину серотипа B, но и к рекомбинантным доменам ботулинического нейротоксина серотипа A.

Данный феномен находит строгое структурно-биологическое обоснование: согласно результатам рентгеноструктурного анализа, транслокационные домены BoNT/A и BoNT/B характеризуются высокой степенью гомологии и фактически идентичной пространственной укладкой, что детерминирует наличие общих консервативных эпитопов для генерации перекрестно-реагирующих МКА [14]. Поскольку заранее определить серотип токсина, ставшего причиной инфекции, в клинических условиях часто невозможно, рационально применять в качестве захватывающих антител МКА с широкой перекрестной активностью. Такая стратегия позволяет эффективно концентрировать и изолировать из образца токсины обоих эпидемически значимых серотипов (A и B) на одной подложке. Окончательная верификация и дифференциация конкретного серотипа реализуются на следующем этапе за счет применения высокоспецифичного детектирующего антитела. В частности, применение МКА HCB 3-29 в качестве иммобилизованного, обеспечивающего одновременное распознавание ботулинических токсинов серотипов A и B, в комплексе с детектирующим МКА HCB 3-18, характеризующимся выраженной сероспецифичностью к BoNT/B, позволило создать аналитическую систему с пределом обнаружения на уровне 0,4 нг/мл.

Полученные нами параметры чувствительности согласуются с мировыми данными. Так, в работе Trinh et al., посвященной скринингу мышиных МКА, специфичных к легкой цепи BoNT/B, минимальный предел детекции рекомбинантной формы легкой цепи ботулотоксина с использованием МКА 3B7 составлял лишь 4 нг/мл [15], что подчеркивает конкурентоспособность разработанных нами иммунореагентов (1,9 нг/мл).

Таким образом, применение МКА, сочетающих универсальность связывания на этапе захвата с возможностью дифференцированного сэндвич-анализа, оптимизирует и значительно удешевляет производство мультиплексных диагностических и терапевтических платформ благодаря сокращению номенклатуры необходимых антител.

Разработка высокочувствительных систем детекции ботулинического нейротоксина серотипа B (BoNT/B) имеет первостепенное значение для пищевой безопасности и клинической диагностики. Главной аналитической проблемой в этой области остается необходимость надежного обнаружения токсина в сложных биологических матрицах – пищевых продуктах и биоматериалах. В исследовании Scotcher et al., например, описаны МКА, специфичные для BoNT/B, демонстрирующие эффективное взаимодействие с иммобилизованным токсином в стандартных тестах (прямой ИФА и вестерн-блоттинг). Однако критическим ограничением данных конструкций является полная утрата связывающей способности в гомогенной фазе (в растворе), что делает невозможным их использование для детекции в физиологических условиях [16].

В нашей работе было изучено влияние многокомпонентных сред на эффективность иммунодетекции BoNT/B с помощью подобранных комбинаций МКА. Наблюдаемое снижение аналитического сигнала в сложных модельных системах указывает на выраженные матричные эффекты. Они обусловлены присутствием эндогенных белков, липидов и гетерофильных антител, которые экранируют антиген или конкурируют за сайты связывания.

Продемонстрированные нами пределы обнаружения BoNT/B, составившие 5 нг/мл в сыворотке крови и 10 нг/мл в растворе альбумина, сопоставимы с литературными данными, где порог детекции токсина в такой сложной матрице, как, например, рыбная продукция, был определен на уровне 10 нг/мл. Данное соответствие подтверждает высокую аналитическую чувствительность и состоятельность разработанной нами методики.

Разработанная Stanker et al. тест-система обладает субнанограммовой чувствительностью в пищевых матрицах (2 нг/г в говяжьем фарше) [17]. Тем не менее полученные нами пределы обнаружения BoNT/B (5 нг/мл в сыворотке крови) также свидетельствуют о высоком сродстве подобранных МКА к токсину. С учетом того, что сыворотка крови представляет собой более агрессивную для иммуноанализа среду с точки зрения неспецифического связывания, достигнутая чувствительность подтверждает высокий потенциал нашей панели для практического применения в клинических сценариях.

В Российской Федерации также активно развиваются инструменты для мониторинга токсинов в сложных средах. В 2013 г. во ФГУП «ГНЦПП» зарегистрировали мультианалитный иммунохроматографический тест – экспресс-тест для выявления ботулотоксинов типов A и B. Заявленная чувствительность теста для серотипа B составляет 10 нг/мл [18].

Для диагностических целей в 2014 г. был запатентован штамм гибридных клеток мыши 3F11, который продуцирует высокоспецифичные МКА к BoNT/B. Разработка принадлежит ФБУН «ГНЦ ПМБ» (Оболенск) [19].

Параллельно развивается и терапевтическое направление: хотя на данный момент в России нет зарегистрированных лекарственных препаратов на основе МКА к BoNT/B. Однако в

2024 г. Минздрав России разрешил клинические исследования препарата на основе МКА против ботулинического токсина типа А, что создает основу для будущей разработки аналогичных средств и против типа В (разработка НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи). Это закладывает технологическую базу для создания аналогичных средств против серотипа В [20].

Таким образом, разработанная нами панель МКА может быть использована в качестве реагентной базы для конструирования диагностических систем иммунодетекции BoNT/B, в т.ч. в сложной биологической матрице. Данные антитела могут эффективно применяться как в классических «сэндвич»-ИФА, так и гетерогенных форматах с использованием магнитных микросфер, что обеспечивает гибкость при выборе платформы для обнаружения ботулинического нейротоксина серотипа В.

Заключение

В ходе данной работы был проведен скрининг и подбор функциональных пар МКА, специфичных к BoNT/B. Полученные результаты демонстрируют, что комбинация МКА НСВ 3-20 и НСВ 3-18 обеспечивает стабильное распознавание целевого антигена, что является критическим условием для создания чувствительных тест-систем.

Ключевым преимуществом предложенного диагностического подхода является использование МКА как для захвата, так и для детекции аналита. Такой подход позволяет полностью отказаться от использования лабораторных животных для получения антитоксических сывороток и сводит к минимуму вариабельность, неизбежно возникающую при работе с поликлональными препаратами, гарантируя высокую воспроизводимость результатов. Это открывает широкие перспективы для внедрения предложенного метода в практику клинико-диагностических лабораторий и структуры мониторинга биобезопасности.

Источники финансирования

Работа выполнена в рамках отраслевой научной программы Роспотребнадзора в Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии на уникальной научной установке ФБУН «ГНЦ ПМБ».

Funding

The work was carried out within the framework of the industry scientific program of Rospotrebnadzor at the State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology on a unique scientific facility of the Federal Budgetary Institution of Science State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими организациями), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Conflict of interest

The authors have no relationships, activities, or interests with third parties (commercial or non-commercial organizations) to declare that could have influenced the work reported in this paper in the last three years.

Вклад авторов

Все авторы подтверждают равное участие на всех этапах подготовки рукописи: разработка концепции, получение и анализ данных, написание и редактирование текста.

Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты настоящей работы, гарантируют надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой ее части.

Author contributions

All authors contributed equally to this work, including conceptualization and design, data acquisition and analysis, manuscript writing and editing.

All authors have read and approved the final manuscript and agree to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Генеративный искусственный интеллект

При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Generative artificial intelligence

No generative artificial intelligence technologies were used in the preparation of this article.

Литература

1. Bever CS, Scotcher M, Cheng LW, Hnasko RM, Stanker LH. Development and Characterization of Monoclonal Antibodies to Botulinum Neurotoxin Type E. Toxins (Basel). 2019;11(7):407. DOI: 10.3390/toxins11070407
2. Tighe AP, Schiavo G. Botulinum neurotoxins: mechanism of action. Toxicon. 2013;67:87-93. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.11.011
3. Dembek ZF, Smith LA, Rusnak JM. Botulism: cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities. Disaster Medicine and Public Health Preparedness. 2007;1(2):122-134. DOI: 10.1097/DMP.0b013e318158c5fd
4. Никифоров ВВ, Кожевникова АВ. Ботулизм: новые данные о патогенезе, ближайших исходах и отдаленных последствиях болезни. Журнал инфектологии. 2025;17(2):5-20. DOI: 10.22625/2072-6732-2025-17-2-5-20
5. Swaminathan S, Eswaramoorthy S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. Nature Structural Biology. 2000;7(8):693-699. DOI: 10.1038/78005
6. Honeyman DA, Notaras A, Heslop DJ, MacIntyre CR. Botulism outbreak in Russia connected to readymade salads. Global Biosecurity. 2024;6:1-15. DOI: 10.31646/gbio.292
7. Sesardic D, Leung T, Das RG. Role for standards in assays of botulinum toxins: international collaborative study of three preparations of botulinum type A toxin. Biologicals. 2003;31(4):265-276. DOI: 10.1016/j.biologicals.2003.08.001
8. Garcia-Rodriguez C, Geren IN, Lou J, Conrad F, Forsyth C, Wen W, et al. Neutralizing human monoclonal antibodies binding multiple serotypes of botulinum neurotoxin. Protein Engineering, Design & Selection: PEDS. 2011;24(3):321-331. DOI:10.1093/protein/gzq111
9. Ferreira JL, Eliasberg SJ, Edmonds P, Harrison MA. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinal toxin in food. Journal of Food Protection. 2004;67(1):203-206. DOI: 10.4315/0362-028X-67.1.203
10. Иващенко ТА, Романенко ЯО, Карцева АС, Силкина МВ, Марьин МА, Хлынцева АЕ, и др. Моноклональные антитела, способные ингибировать взаимодействие рецептор-связующего домена вируса SARS-CoV-2 с ангиотензин-

превращающим рецептором 2 клеток человека. Проблемы особо опасных инфекций. 2024;(3):111-117. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-111-117
11. Duk M, Lisowska E, Wu JH, Wu AM. The biotin/avidin-mediated microtiter plate lectin assay with the use of chemically modified glycoprotein ligand. Anal Biochem. 1994;221(2):266-72. DOI: 10.1006/abio.1994.1410
12. Патент № 2361921 C1 Российская Федерация, МПК C12N 15/31, C12N 1/21, C12P 21/02. Способ получения функционально активного рекомбинантного белка летального фактора язвы (LF), рекомбинантная плазмидная ДНК pETHIS-LF, кодирующая активный белок LF и штамм *Escherichia coli* BL-HISLF, продуцирующий активный белок летального фактора сибирской язвы: №2007143248/13: заявл. 23.11.2007: опубл. 20.07.2009. Колесников АВ, Захарова МЮ, Козырь АВ, Шемякин ИГ; заявитель Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН.
13. Eun-Sun C, So-Hyeon K, Jun-Ho J, Hwajung Yi, Yoon-Seok C. Development of a Laboratory Test for Botulism Using Sandwich ELISA. Public Health Wkly Rep. 2023;16(44):1491-1503. DOI: 10.56786/PHWR.2023.16.44.1
14. Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. Trends in Biochemical Sciences. 2002;27(11),552-558. DOI: 10.1016/S0968-0004(02)02177-1
15. Trinh TV, Nguyen DV, Hoang HD, Pham HV, Vu DN, Le PV, et al. Development and selection of candidate monoclonal antibodies for the detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype B light chain. Journal of Microbiological Methods. 2025;228:106659. DOI: 10.1016/j.pep.2025.106659
16. Scotcher MC, Cheng LW, Stanker LH. Detection of botulinum neurotoxin serotype B at sub mouse LD_{50} levels by a sandwich immunoassay and its application to toxin detection in milk. PLoS ONE. 2010;5:1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0011047
17. Stanker LH, Scotcher MC, Cheng L, Ching K, McGarvey J, Hodge D, et al. A monoclonal antibody-based capture ELISA for botulinum neurotoxin serotype B: toxin detection in food. Toxins. 2013;5(11):2212-2226. DOI: 10.3390/toxins5112212
18. Шиленко ИВ, Ярков СП, Шаулина ЕК, Титов АА, Бровкина АН, Храмов ЕН. Разработка мультианалитного иммунохроматографического устройства для индикации токсинов. Проблемы особо опасных инфекций. 2015;4:103-106.
19. Иващенко ТА, Белова ЕВ, Мицевич ИВ, Мицевич ЕВ, Козырь АВ, Колесников АВ, и др. Штамм гибридных клеток животных *Mus musculus* 3F11 – продуцент моноклональных антител, специфичных к ботулиническому токсину типа В. Патент 27.10.2015 Бюл. №30, 2014145295/10, 12.11.2014.
20. Деркаев АА, Рябова ЕИ, Есмагамбетов ИБ, Щебляков ДВ, Носков АН, Виноградова ИД, и др. Кандидатный препарат на основе модифицированных однодоменных антител для терапии ботулизма, вызванного ботулиническим токсином типа А. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2025;25(1):58-70.

References

1. Bever CS, Scotcher M, Cheng LW, Hnasko RM, Stanker LH. Development and Characterization of Monoclonal Antibodies to Botulinum Neurotoxin Type E. Toxins (Basel). 2019;11(7):407. DOI: 10.3390/toxins11070407
2. Tighe AP, Schiavo G. Botulinum neurotoxins: mechanism of action. Toxicon. 2013;67:87-93. DOI: 10.1016/j.toxicon.2012.11.011
3. Dembek ZF, Smith LA, Rusnak JM. Botulism: cause, effects, diagnosis, clinical and laboratory identification, and treatment modalities. Disaster Medicine and Public Health Preparedness. 2007;1(2):122-134. DOI: 10.1097/DMP.0b013e318158c5fd
4. Nikiforov VV, Kozhevnikova AV. Botulism: new data on pathogenesis, nearest outcomes and distant consequences of the disease. Journal Infectology. 2025;17(2):5-20. DOI: 10.22625/2072-6732-2025-17-2-5-20 (In Russian).
5. Swaminathan S, Eswaramoorthy S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. Nature structural biology. 2000;7(8):693-699. DOI: 10.1038/78005
6. Honeyman DA, Notaras A, Heslop DJ, MacIntyre CR. Botulism outbreak in Russia connected to readymade salads. Global Biosecurity. 2024;6:1-15. DOI: 10.31646/gbio.292
7. Sesardic D, Leung T, Das RG. Role for standards in assays of botulinum toxins: international collaborative study of three preparations of botulinum type A toxin. Biologicals. 2003;31(4):265-276. DOI: 10.1016/j.biologicals.2003.08.001
8. Garcia-Rodriguez C, Geren IN, Lou J, Conrad F, Forsyth C, Wen W, et al. Neutralizing human monoclonal antibodies binding multiple serotypes of botulinum neurotoxin. Protein Engineering, Design & Selection: PEDS. 2011;24(3):321-331. DOI:10.1093/protein/gzq111
9. Ferreira JL, Eliasberg SJ, Edmonds P, Harrison MA. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinal toxin in food. Journal of Food Protection. 2004;67(1):203-206. DOI: 10.4315/0362-028X-67.1.203
10. Ivashchenko TA, Romanenko YaO, Kartseva AS, Silkina MV, Mar'in MA, Khlyntseva AE, et al. Monoclonal antibodies capable of inhibiting the interaction of the receptor binding domain of SARS-CoV-2 virus with the angiotensin-converting receptor 2 of human cells. Problemy osobo opasnykh infektsii. 2024;3:111-117. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-111-117 (In Russian).
11. Duk M, Lisowska E, Wu JH, Wu AM. The biotin/avidin-mediated microtiter plate lectin assay with the use of chemically modified glycoprotein ligand. Anal Biochem. 1994;221(2):266-72. DOI: 10.1006/abio.1994.1410
12. Patent No 2361921 C1 Russian Federation, IPC C12N 15/31, C12N 1/21, C12P 21/02. Method for producing a functionally active recombinant protein of ulcer lethal factor (LF), recombinant plasmid DNA pETHIS-LF encoding the active LF protein and the *Escherichia coli* strain BL-HISLF producing the active protein of anthrax lethal factor: No 2007143248/13: declared 23.11.2007: published 20.07.2009. Kolesnikov AV, Zakharova MYu, Kozyr AV, Shemyakin IG; applicant Institution of the Russian Academy of Sciences Academicians M.M.Shemyakin and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS.
13. Eun-Sun C, So-Hyeon K, Jun-Ho J, Hwajung Yi, Yoon-Seok C. Development of a Laboratory Test for Botulism Using Sandwich ELISA. Public Health Wkly Rep. 2023;16(44):1491-1503. DOI: 10.56786/PHWR.2023.16.44.1
14. Turton K, Chaddock JA, Acharya KR. Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. Trends in Biochemical Sciences. 2002;27(11),552-558. DOI: 10.1016/S0968-0004(02)02177-1
15. Trinh TV, Nguyen DV, Hoang HD, Pham HV, Vu DN, Le PV, et al. Development and selection of candidate monoclonal antibodies for the detection of *Clostridium botulinum* neurotoxin serotype B light chain. Journal of Microbiological Methods. 2025;228:106659. DOI: 10.1016/j.pep.2025.106659
16. Scotcher MC, Cheng LW, Stanker LH. Detection of botulinum neurotoxin serotype B at sub mouse LD_{50} levels by a sandwich immunoassay and its application to toxin detection in milk. PLoS ONE. 2010;5:1-10. DOI: 10.1371/journal.pone.0011047
17. Stanker LH, Scotcher MC, Cheng L, Ching K, McGarvey J, Hodge D, et al. A monoclonal antibody-based capture ELISA for botulinum neurotoxin serotype B: toxin detection in food. Toxins. 2013;5(11):2212-2226. DOI: 10.3390/toxins5112212
18. Shilenko IV, Yarkov SP, Shaulina EK, Titov AA, Brovkina AN, Khramov EN. Development of multi-analytical immune-chromatographic device for toxin indication. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2015;4:103-106. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-103-106
19. Ivashchenko TA, Belova EV, Mitsevich IV, Mitsevich EV, Kozyr AV, Kolesnikov AV, et al. Animal hybrid cell strain *Mus musculus* 3F11 – a producer of monoclonal antibodies specific to botulinum toxin type B. № RU 2566553. Patent October 27, 2015.

20. Derkaev AA, Ryabova EI, Esmagambetov IB, Shcheblyakov DV, Noskov AN, Vinogradova ID, et al. A modified single-domain antibody candidate for the treatment of botulism caused by botulinum toxin type A. Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2025;25(1):58-70. DOI: 10.30895/2221-996X-2025-591

Информация о соавторах:

Карцева Алёна Сергеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-3159-6439

Рябко Алёна Константиновна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-7478-909X

Зенинская Наталья Алексеевна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-5388-292X

Марьин Максим Александрович, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-0560-915X

Рогозин Метхун Мадибронович, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-3361-3263

Романенко Яна Олеговна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-1698-6516

Лутчева Ирина Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0009-0005-1829-7871

Ершова Анастасия Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0009-0002-0463-7925

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0002-9898-9894

Information about co-authors:

Alena S. Kartseva, PhD in Biological Sciences, Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-3159-6439

Alena K. Riabko, Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0001-7478-909X

Natalya A. Zeninskaya, Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-5388-292X

Maxim A. Marin, Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-0560-915X

Metkhun M. Rogozin, Junior Researcher, laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-3361-3263

Yana O. Romanenko, Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0003-1698-6516

Irina S. Lutcheva, Junior Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

Anastasia A. Ershova, Junior Researcher of laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0009-0002-0463-7925

Victoria V. Firstova, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief research scientist of the laboratory of molecular biology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor
ORCID: 0000-0002-9898-9894

Ученые возродили мощный антибиотик, который был побежден супербактериями



Устойчивый к ванкомицину *Enterococcus faecium* (VREfm) является одной из основных причин инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, что требует поиска новых подходов к лечению. В данной работе показано, что генетическая или фармакологическая инактивация высококонсервативной пептидогликан-гидролазы семейства NlpC/P60 – секретируемого антигена A (SagA) – повышает чувствительность VREfm к ванкомицину как *ex vivo*, так и *in vivo*. Примечательно, что делеция гена *sagA* арушает процессы ремоделирования пептидогликана и рост VREfm, а также усиливает действие ванкомицина. Кроме того, нами были выявлены первые в своем классе ковалентные ингибиторы пептидогликан-гидролаз семейства NlpC/P60. Было продемонстрировано, что фармакологическое подавление активности *SagA* также нарушает ремоделирование пептидогликана и повышает эффективность ванкомицина в отношении различных клинических изолятов VREfm. Таким образом, наше исследование показывает, что пептидогликан-гидролазы являются перспективными мишенями для лекарственного воздействия, а их инактивация способствует повышению эффективности ванкомицина против VREfm.

Fam KT, Chodisetti PK, Wang Z, Homer JA, Smedley CJ, Kitamura S, et al.
Genetic and pharmacological inactivation of peptidoglycan remodeling increases antibiotic susceptibility of vancomycin-resistant Enterococcus faecium.
Nat Commun. 2026 Jun 16;17(1):7581. DOI: 10.1038/s41467-026-74057-1