



УКРАЇНА

(19) UA (11) 59737 (13) A

(51) 7 C12N1/00,G01N33/15,  
C12N1/00//C12R1:63МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПОЗАКЛІТИННИХ ТОКСИЧНИХ СУБСТАНЦІЙ

1

2

(21) 2002119537

(22) 29 11 2002

(24) 15 09 2003

(46) 15 09 2003, Бюл. № 9, 2003 р.

(72) Стопчанська Алла Григорівна, Костюченко Людмила Сергіївна, Пилипенко Наталія Василівна, Винник Валентина Димитрівна, Пархоменко Наталія Борисівна, Пушкіна Валентина Олександрівна

(73) УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ПРОТИЧУМНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. І. І. МЕЧНИКОВА

(57) 1 Спосіб одержання позаклітинних токсичних субстанцій патогенних бактерій, що полягає у посіві мікроорганізмів на живильне середовище, вирощуванні при температурі культивування збудника та здобуванні токсичних продуктів, який відрізняється тим, що патогенну культуру бактерій засівають на щільне живильне середовище, наприклад агар, а токсичні субстанції здобувають із середовища протягом 20-24 годин дифузії через нижню поверхню агарової пластинки в поглинаючий розчин

2 Спосіб одержання позаклітинних токсичних субстанцій патогенних бактерій за п. 1, який відрізняється тим, що ділянку агару з ізольованою колонією бактерій кладуть усередину пеніцилінового флакона та зістиковують його з верхнім кінцем покривного скла, заглибленого в поглинаючий розчин, об'ємом 1,0-1,5 см<sup>3</sup>, при цьому флакон ставлять на опору під гострим кутом

3 Спосіб одержання позаклітинних токсичних субстанцій патогенних бактерій за п. 1, який відрізняється тим, що ділянку агару з культурою бактерій, зрощеною газоном, відокремлюють на відстані не менше 1,0 см від кінцевої зони росту мікроорганізмів, перекладають у чашку Петрі на опорні елементи та заповнюють об'єм між елементами поглинаючим розчином до зіткнення його з нижньою поверхнею агару

4 Спосіб одержання позаклітинних токсичних субстанцій патогенних бактерій за п. 1, 2, 3, який відрізняється тим, що як поглинаючий розчин використовують 0,85-0,90 % розчин хлористого натрію

Винахід належить до медицини, а саме, мікробіології і може бути використаний для визначення основних факторів вірулентності, які секретують патогенні бактерії, наприклад, холерні вібриони або дифтерійні бактерії, та при виготовленні імунобіологічних препаратів. Розроблений спосіб може бути використаний в практичних лабораторіях для встановлення токсигенності виділених штамів патогенних бактерій і оцінки їх епідемічного потенціалу, а також в наукових дослідженнях при вивченні біологічних властивостей патогенних бактерій, для виявлення високотоксигенних штамів та накопичення токсинів з метою приготування імунобіологічних препаратів.

В умовах періодичного епідемічного неблагополуччя з холери, дифтерії та інших небезпечних інфекційних хвороб, виділення від хворих і об'єктів зовнішнього середовища штамів патогенних бактерій різного ступеня вірулентності, особливого значення набуває визначення здатності до токсигенності і його рівня у циркулюючих штамів

для об'єктивної оцінки епідемічної ситуації [5, 11, 12, 13]. Висновок про токсигенність має виключно важливе значення для діагностики захворювання, адекватного лікування та своєчасного проведення протиепідемічних та профілактичних заходів [1, 10]. Одержання токсичних субстанцій патогенних бактерій необхідне і для виготовлення імунобіологічних препаратів, вивчення патогенезу та імунітету [2, 3, 4, 8].

Однак проблема одержання очищених токсичних субстанцій патогенних бактерій зі збереженими нативними властивостями залишається складною. Основна трудність полягає у виділенні нативних токсинів вільних від компонентів живильного середовища та продуктів руйнування бактерій, наприклад, їх соматичних антигенів. Присутність цих компонентів значно затруднює імунологічне та біологічне тестування позаклітинних токсичних субстанцій, виготовлення імунобіологічних препаратів, вивчення факторів вірулентності та захисних механізмів. Необхідно

(13) A

(11) 59737

(19) UA

підкреслити складність та високу вартість існуючих способів виділення токсичних речовин

Відомий спосіб одержання позаклітинних токсичних субстанцій *V. cholerae* [8] полягає в культивуванні досліджуваних штамів холерних вібріонів в рідкому триптовому живильному середовищі протягом 18-36 годин в умовах шутелювання, та подальшому ультрацентрифугуванню бульони культури 30 хвилин при 8000 об/хв

Недоліками способу є необхідність наявності спеціального обладнання для шутелювання та ультрацентрифугування, що має використовуватись в умовах дотримання протиепідемічного режиму роботи зі збудниками особливо небезпечних інфекцій, присутність в супернатантах компонентів живильного середовища та продуктів розпаду вібріонів, зокрема, ліпополісахаридів, значні затрати електроенергії

Відомий також спосіб одержання препаратів холерного токсину, вільних від компонентів живильного середовища [4] Після трьох послідовних пересівів на бульон і агар Мартена холерні вібріони вносять в 3-літрові колби з 300 мл 5% пептонної води і вирощують протягом 8 годин при 28°C в умовах постійного струшування на шутель-апараті. Потім бульонну культуру центрифугують в рефрижераторній центрифугі при 4°C 30 хвилин при 5-6 тисячах об/хв, супернатант пропускають через керамічні бактерійні свічки і токсин концентрують за допомогою охолодженого до - 40° ацетону, знову центрифугують при температурі - 6-8°C і проводять очищення на хроматографічних колонках з сефадексом G-100. На цьому етапі в отриманих зразках виявляють холерний токсин в суміші з соматичним O-антигеном. Подальше очищення здійснюють за допомогою препаративного диск-електрофорезу в поліакриламідному гелі та елюції з окремих ділянок гелю речовин, що розділяли, виявляють елюат, котрий містить холерний токсин. На заключному етапі вивчають біологічні властивості та антигенну подібність з природним холерогеном одержаних зразків токсину

Недоліками цього способу є виключна складність, трудомісткість, дорожня хімічних речовин та обладнання

Відомий спосіб одержання позаклітинних токсичних продуктів *S. dysenteriae* [11] включає культивування протягом 7 діб штамів цього збудника в рідкому живильному середовищі Лінгуда або Мартена, ультрацентрифугування з подальшою фільтрацією крізь бактерійні фільтри. Основними недоліками цього способу є довготривалість культивування, дорожня хімічного середовища, необхідність звільнення від бактерійних клітин ультрацентрифугуванням та фільтрацією, наявність в кінцевому продукті компонентів живильного середовища та соматичних антигенів

У наведених вище способах одержання позаклітинних токсичних субстанцій є спільні ознаки (етапи): а) накопичення токсичних продуктів в рідкому живильному середовищі в суміші з бактеріями, б) подальше звільнення від бактерій

Отже, узагальнюючи, необхідно наголосити, що недоліками аналогів є

наявність у фільтратах або супернатантах

(окрім позаклітинних токсичних продуктів) компонентів живильного середовища та продуктів розпаду бактерій,

використання в процесі видобутку токсинів значних об'ємів живильного середовища та дорогого обладнання

Методи подальшої очистки від побічних домішок дуже складні та трудомісткі. Вони передбачають накопичення токсичних продуктів в великих об'ємах рідкого живильного середовища в умовах шутелювання, ультрацентрифугування на холоді, хроматографію на колонках з сефадексом, та інші процедури. На цьому етапі в кінцевому продукті, окрім холерного токсину, все ще міститься соматичний антиген, а можливо і інші компоненти

Прототипом способу, який пропонується, є метод Лобанова В.В., Сальникової О.В., Олексієвої Л.П. та ін. [5]. Він складається з таких етапів: 1) вирощування досліджуваного штаму *V. Cholerae* на пластинках агару Мартена протягом 18-20 годин, 2) пересів на 10мл бульону Мартена та вирощування протягом 2-3 годин при 28-29°C, 3) другий пересів на 50мл цього ж середовища та вирощування протягом 20-22 годин при 28-29°C, 4) центрифугування бульонної культури 30-40 хвилин при 5000 об/хв, відповідно до правил проти-епідемічного режиму роботи зі збудниками, особливо небезпечних захворювань, 5) одержання супернатантів

Основними недоліками прототипу є

1) присутність в супернатанті, окрім холерних токсинів, компонентів рідкого живильного середовища та продуктів розпаду бактерій,

2) багатоетапність процесу отримання токсичних субстратів,

3) необхідність звільнення від мікроорганізмів центрифугуванням, відповідно до правил проти-епідемічного режиму роботи з особливо небезпечними збудниками,

4) дорожня хімічного середовища, електроенергії та апаратури, яка використовується в процесі накопичення і видобутку токсичних субстанцій,

5) секреція токсинів в рідке живильне середовище, що гальмує подальший синтез токсину холерними вібріонами в цьому середовищі

В основу винаходу поставлена задача розробити спосіб одержання позаклітинних субстанцій патогенних бактерій шляхом використання щільного живильного середовища у якості молекулярного сита, що дозволить накопичувати позаклітинні токсичні субстанції патогенних бактерій вивільнені від компонентів рідких живильних середовищ і продуктів розпаду мікроорганізмів, скоротити етапи видобування, забезпечити одержання токсичних субстанцій та підвищити економічну ефективність способу

Задача винаходу досягається тим, що одержання позаклітинних токсичних субстанцій патогенних бактерій, здійснюють шляхом посіву мікроорганізмів на поживне середовище, вирощування при температурі культивування збудника, а як поживне середовище застосовують щільне поживне середовище, наприклад, агар і токсичні субстанції здобувають із середовища протягом 20-24 годин

дифузією крізь нижню поверхню агарової пластинки у поглинаючий розчин. У тому разі, коли необхідно одержати токсичну субстанцію від ізолюваної колонії бактерій, ділянку агару з ізолюваною колонією бактерій, кладуть усередину пеніцилінового флакону та зістикують його з верхнім кінцем покривного скла, заглибленого в поглинаючий розчин, об'ємом 1,0-1,5 см<sup>3</sup>, при цьому флакон ставлять на опору під гострим кутом. Поглинаючим розчином є 0,85-0,90% розчин хлористого натрію. У разі вирощування культури бактерій газоном, ділянку агару з культурою бактерій, зрощений газоном, відокремлюють на відстані не менше 1,0 см від кінцевої зони росту мікроорганізмів, перекладають у чашку Петрі на опорні елементи та заповнюють вільний об'єм між ними поглинаючим розчином до зіткнення його з нижньою поверхнею агару.

Суть винаходу полягає в накопиченні по-заклітинних токсичних субстанцій патогенних бактерій у щільному живильному середовищі та їх видобуток у поглинаючий розчин шляхом дифузії. Для цього досліджуваний штам холерного вібріона висівають в 5 мл 1% лептонної води і після 4<sup>х</sup> годинного підрощення при 37°C пересівають на чашку Петрі з лужним агаром рН 7,6. В залежності від мети дослідження і необхідної кількості секретованих токсичних продуктів холерного вібріона посів виконують або штрихом для отримання ізолюваних колоній, або газоном з метою отримання суцільного росту діаметром 6-7,5 см в центрі чашки Петрі. Культури бактерій вирощують протягом 24-48 годин при 37°C для накопичення секретованих токсичних продуктів в шарі агару. Потім ділянку агару з ізолюваною колонією або культурою бактерій, що виросла газоном, вирізають і переносять на опорні елементи відповідно в пеніцилінові флакони та чашки Петрі. З метою попередження потрапляння мікроорганізмів в поглинаючий розчин ділянку агару з культурою вирізають на відстані 1-2 мм від краю росту культури при використанні ізолюваних колоній і не менше 1 см у випадку використання зон суцільного росту бактерій.

Простір під агаром заповнюють поглинаючим розчином, наприклад, фізіологічним, вносячи відповідно 1-1,5 см<sup>3</sup> та 6-8 см<sup>3</sup> розчину до зіткнення з нижньою поверхнею агару. Токсичні продукти добувають з агару, розміщуючи вказані ємності на 24 години при температурі культивування збудника. Дифузія токсинів в поглинаючий розчин оптимізує процес токсинування, тому що присутність

токсинів в середовищі культивування пригнічує продукцію бактеріями токсинів.

Одержані дифунданти переносять в стерильний посуд, перевіряють на специфічну стерильність шляхом висіву на поживні середовища відповідно до інструкції і додають антибіотик абактал в кінцевій концентрації 0,2 мг/мл перфлораксацину (активна речовина препарату), до якого холерні вібріони є високочутливими.

Вміст токсичних продуктів визначають в культурі HeLa за числом пошкоджених клітин з морфологічними проявами цитотоксичної дії холерного токсину або цитолізину [9], вміст білка в пробах визначають за методом Лоурі. Кількість його в більшості проб не перевищує 1 мг/мл.

Щоб уникнути інактивування токсичних субстанцій, збереження їх спектру та нативних властивостей отримані дифунданти використовують без будь-яких додаткових етапів очищення і концентрування. Розроблений нами спосіб виключає потрапляння в поглинаючий розчин такої кількості бактерій, яку можна було б визначити, а також продуктів їх розпаду та компонентів живильного середовища. При цьому кількість токсинів, що поступають в поглинаючий розчин, характеризує інтенсивність і спектр токсичних субстанцій, що секретуються досліджуванним штамом бактерій.

В таб 1 представлені порівняльні дані про активність продукції та антигенну специфічність токсичних субстанцій, що секретують ізолювані колонії високотоксигенного еталонного штаму 569 В *V. cholerae* та 10 *ctx*<sup>+</sup> штамів *V. cholerae* eltor, котрі були виділені від хворих на холеру в період епідемії в 1994-1995 рр.

З матеріалів таблиці випливає, що в дифундатах штамів *V. cholerae* eltor знаходилась приблизно однакова (40% штамів) або менша (60% штамів) порівняно з штамом 569 В, кількість холерного токсину. При цьому антигенна структура останнього у всіх вивчених штамів була ідентичною, тому що антитоксична сироватка до штаму 569 В повністю нейтралізувала цитотоксичний ефект токсичних субстанцій. Ці дані підтверджують можливість встановлення за допомогою запропонованого способу ступеню антигенної спорідненості та інтенсивності продукції токсинів, що виділяють штам холерного вібріона, і таким чином прогнозувати важкість захворювань, визначати рівень антигенної мінливості основного фактора патогенності, оцінювати епідемічний потенціал штамів холерного вібріона, що виділяються.

Таблиця 1

Інтенсивність токсинування *ctx*<sup>+</sup> штамми *V. cholerae* eltor, ізолюваними від хворих на холеру в Миколаївській області в 1994-1995 рр

Кількість штамів <i>V. cholerae</i>	Число пошкоджених клітин в осередку (24 год.)	Специфічна нейтралізація токсичного ефекту антитілами до токсину шт. 569 В
4	10-15 і >	повна нейтралізація
2	5-10	"-
4	2-3	"-
Високотоксигенний шт. 569В	10-15 і >	"-

Можливість визначення токсигенності та рівня токсиноутворення за допомогою запропонованого способу продемонстрована і для штамів *C. diphtheriae*, виділених від хворих на дифтерію (таб 2)

Таблиця 2

Рівень токсиноутворення штамми *C. diphtheriae*, ізольованими в період епідемії дифтерії в Україні в 1993-1994р р

№ штаму <i>C. diphtheriae</i>	Кількість пошкоджених клітин	Токсин нейтралізуючий ефект антитоксичної сироватки до дифтерійного токсину PW-8	Кількість дифтерійного екзотоксину, що визначена на морських свинках (Dlm/ml)
56	80	Повна нейтралізація пошкоджуючої дії	-
64	90	"-	-
75	20	"-	-
182	95	"-	30
228	80	"-	-
302	100	"-	-
PW - 8 (Торонто), етап шт	98	"-	-
10648 (еталон штаму)	95	"-	30

Із даних таблиці 2 випливає, що всі вивчені штамми були токсигенними, рівень токсиноутворення у переважного числа штамів був високим і антигенна структура токсинів була ідентичною у свіжовиділених від хворих штамів та еталонного штаму PW-8. Ці дані дозволяють заключити, що виготовлені з токсину штаму PW-8 профілактичні (дифтерійний анатоксин) та лікувальні препарати (дифтерійна антитоксична сироватка) зберігають специфічну ефективність і в період останньої епідемії дифтерії в Україні. Високий рівень токсиноутворення вказує на необхідність використання максимально допустимих доз лікувальної сироватки на самих ранніх строках захворювання.

Другий варіант запропонованого способу отримання позаклітинних токсичних субстанцій патогенних бактерій, що передбачає збільшення площі зони суцільного росту культури, дозволяє накопичувати токсичні продукти в кількості, необхідній для імунізації тварин з метою виготовлення антитоксичної сироватки. Наприклад, в результаті імунізації кроликів анатоксином, виготовленим з токсичних продуктів високотоксигенного штаму 569 B V *Cholerae classica*, отримана антитоксична сироватка, яка повністю нейтралізує токсини в розведенні 1:15 - 1:30, котрі продукуються однією колонією цього штаму та *ctx*<sup>+</sup> штамми холерних вібріонів біовару ельтор. Анти-О-антитіла виявляються лише в низьких концентраціях - при розведенні сироватки 1:5.

Отримані результати свідчать про можливість отримання позаклітинних токсичних субстанцій патогенних бактерій вільних від компонентів рідких поживних середовищ та продуктів розпаду холерних вібріонів при скороченні етапів їх одержання та здевелювання способу.

При порівнянні заявленого способу із способом-прототипом необхідно відзначити, що використання відомого способу одержання токсинів не дозволяє кількісно оцінити рівень токсиноутворення і визначити таким чином ступінь вірулентності збудника, тому що інтенсивність його росту та секреції токсинів варіює залежно від умов культивування і складу рідкого поживного середовища.

Окрім того, присутність значної кількості соматичних антигенів в супернатантах маскує наявність токсинів і не дозволяє одержувати сироватки, що містять переважно антитоксичні антитіла, як це має місце при використанні запропонованого способу. Так, сироватки, одержані при імунізації супернатантами лабораторних тварин, містять в 10 і більше разів анти-О-соматичних антитіл.

Таким чином, запропонований спосіб має наступні переваги:

1) виключається необхідність культивування патогенних мікроорганізмів у великих об'ємах коштовного поживного середовища, а також етап швидкісного центрифугування в режимі роботи зі збудниками особливо небезпечних інфекцій.

2) з'являється можливість отримання позаклітинних токсичних продуктів, вільних від компонентів рідких поживних середовищ та продуктів розпаду мікроорганізмів.

3) оптимізується токсиноутворення за рахунок дифузії токсинів в агар, а потім в поглинаючий розчин.

4) дає можливість отримання антитоксичних сироваток з переважним вмістом токсинейтралізуючих антитіл.

5) забезпечує можливість оцінки рівня токсиноутворення і ступеня антигенної спорідненості еталонних та циркулюючих штамів.

Метод технічно не складний, економічно вигідний, може бути використаний в медичних установах для визначення епідемічного потенціалу циркулюючих штамів патогенних бактерій та антигенної структури секретованих факторів патогенності.

Відомості, котрі підтверджують виконання способу

#### Приклад 1

Штам холерного вібріона вирощують протягом 4-х годин на 1% лептонній воді і засівають на чашку Петрі з лужним агаром. Посів проводять легким дотиком до агару петлею діаметром 1 мм з інтервалом не менше 1см. Через 24 години росту при 37°C очним пінцетом вирізають ділянку агару з бляшкою або колонією розміром 0,7x0,7см таким

чином, щоб відстань між краєм зони росту та краєм вирізаної ділянки складала 1,5-2мм. Вирізану ділянку очним пінцетом обережно розміщують в пеніциліновому флаконі з 1,5мл фізіологічного розчину і закріплюють її на верхньому краї покривного скла. Флакони кладуть під кутом 45°. При цьому з поглинаючим розчином стикається тільки нижня поверхня агару, що забезпечує дифузію токсичних субстанцій в поглинаючий розчин і попереджує потрапляння в останній мікроорганізмів та їх продуктів. Флакони поміщають в термостат на 24 години, потім пастерівською піпеткою відбирають поглинаючий розчин, вміщуючий токсичні субстанції (дифундант). Провіряють на специфічну стерильність, додають абактал в концентрації 0,2мг/мл активної речовини і використовують для визначення наявності, кількості та антигенної структури токсину за морфологічним проявленням цитотоксичного ефекту на культурі клітин HeLa [9].

#### Приклад 2

З косяка еритроагару, на якому зберігається штам *C. diphtheriae*, культура штрихами засівається на чашку Петрі з МПА (м'ясо-пептонний агар) для отримання 1 добової культури, котру знову пересівають на чашку Петрі з МПА легким дотиком до агару петлею діаметром 1мм з інтервалом не менше 1см. Через 24 години росту при 37°C очним пінцетом вирізають ділянку агару з бляшкою або колонією розміром 0,7х0,7см таким чином, щоб відстань між краєм зони росту і краєм вирізаної ділянки складала 1,5х2мм. Вирізану ділянку очним пінцетом обережно розміщують в пеніциліновому флаконі з 1,5мл фізіологічного розчину і закріплюють її на верхньому краї покривного скла. Флакони кладуть під кутом 45°. При цьому з поглинаючим розчином стикається тільки нижня поверхня агару, що забезпечує дифузію токсичних субстанцій в поглинаючий розчин і попереджує потрапляння в останній мікроорганізмів та їх продуктів. Флакони поміщають в термостат на 24 години. Потім пастерівською піпеткою відбирають поглинаючий розчин, вміщуючий токсичні субстанції (дифундант). Провіряють на специфічну стерильність, додають абактал в концентрації 0,2мг/мл активної речовини і використовують для визначення наявності та кількості токсину за морфологічними проявленнями цитотоксичного ефекту на культурі клітин.

#### Приклад 3

Штам *V. cholerae* 569 В засівають газоном (d=6-7см) на 4-5 або більше чашок Петрі з 25мл 1% лужного агару. Посіви інкубують 24-48 годин при 37°C. Ділянку агару з вирощеною культурою холерних вібрионів вирізають скальпелем по периметру на відстані не менше 1см від краю мікроорганізмів і поміщають в стерильну чашку Петрі на скляні запаї з обох сторін трубочки діаметром 1-2мм, які укладаються паралельно на відстані не більше 1 см одна від одної. При цьому агар стикається з поглинаючим розчином тільки своєю нижньою поверхнею, закриті чашки Петрі поміщають в термостат при 37°C на 24 години для дифузії токсичних продуктів в поглинаючий розчин. Вміщуючий токсичні субстанції розчин (ди-

фундант) збирають пастерівською піпеткою в стерильну ємність і визначають кількість та спектр токсичних субстанцій на моделі клітин HeLa [9]. Безпосередньо після цього до дифунданту додають мертиоллят натрію з кінцевою концентрацією 1:10000, перевіряють його на специфічну стерильність і використовують для одержання анатоксину з метою імунізації кроликів і приготування антитоксичної сироватки. Вказана сироватка повністю нейтралізувала в розведенні 1:15-1:30 токсини, які продукуються однією колонією цього штаму.

#### Джерела інформації

- 1 Бароян О В. Холера зльотор -М - 1971 -276с
- 2 Джапаридзе М Н, Караева Л Т, Дертева И И и др. Изучение иммунологической эффективности холерогена-анатоксина при испытании на экспериментальных животных // ЖМЭИ - 1974 - №3- С 58-61
- 3 Джапаридзе М Н, Караева Л Т, Дертева И И и др. Изучение иммунологической эффективности холерогена-анатоксина на добровольцах // ЖМЭИ- 1974-№8-С 106-109
- 4 Ефременко В И. Получение кристаллических препаратов холерогена и холерогеноида //ЖМЭИ - 1978 - №4- С 45-49
- 5 Ломов Ю М, Лобанов В В, Сальникова О И и др. Оценка эпидемиологической значимости свежeweделенных холерных вибрионов // Эпидемиология и инфекционные болезни - 2001 - №3 - С 30-32
- 6 Мазрухо А Б, Михась Н К, Монакова Е В и др. Определение оптимальных условий продукции ряда факторов патогенных холерных вибрионов // Журн. микробиологии - 2000 - №1 - С 21-24
- 7 Оценка способности холерных вибрионов продуцировать холерный токсин. Метод рекомендации - Ростов-на-Дону - 1999
- 8 Патент України №39348А. Спосіб отримання позаклітинного дифтерійного антигена Щетиніна В М, Ніколенко В М, Альсaban Абдулхаким та ін., опубл. 15.02.2001р.
- 9 Патент України №4593 ОА. Спосіб визначення токсигенності холерних вібрионів. Стопчанська А Г, Винник В Д, Дронова І Ю та ін., опубл. 28.02.2002р.
- 10 Смирнова Н И, Кукушкин А М. Эпидемически значимые штаммы холерного вибриона: генетические особенности и возникновение // Эпидемиология и инфекционные болезни - 2001 - №3 - с 25-29
- 11 Щетинина В Н, Шинкаренко А А, Москаленко В Н и др. Изучение токсинсодержащих фильтратов из культуральных жидкостей клинических штаммов *Corynebacterium diphtheriae* //Микробиол. журнал - 1997 - т 59, - №1 - с 65-69
- 12 Otteman K T and J J Mekalanos. Regulation of Cholera Toxin Expression // *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives* /Ed by Kaye Washmuth, Paul A Blake and Orjan Olsvik - 1994 - American Society for Microbiology - Washington
- 13 Reeves P R and R Lan. Cholera in the 1990 // *British Medical Bulletin* - 1998 - 54 (№3)-P 611-623

