



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2024. Т. 24, вып. 2. С. 202–207

Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2024, vol. 24, iss. 2, pp. 202–207

<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2024-24-2-202-207>, EDN: XXJNWQ

Научная статья

УДК 579.6



Оптимизация технологии фагового дисплея для получения антител, специфичных к тетрациклину

А. В. Мартыненко¹, О. А. Караваева², А. С. Фомин², О. И. Гулий² ✉

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, ФИЦ «Саратовский научный центр», Россия, 410049, г. Саратов, пр. Энтузиастов, д. 13

Мартыненко Анжелика Викторовна, студент кафедры биохимии и биофизики, lika_martynenko2002@mail.ru

Караваева Ольга Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии, helga1121@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0665-1846>

Фомин Александр Сергеевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммунохимии, strazth87@bk.ru

Гулий Ольга Ивановна, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии, guliy_olga@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0541-0020>

Аннотация. Масштабное производство и использование противомикробных препаратов в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве привело к загрязнению антибиотиками водных ресурсов, поэтому актуальным является развитие методов мониторинга содержания антибиотиков, особенно в водных ресурсах. Успешными для анализа антибиотиков являются биосенсорные методы. Одним из основных составляющих биосенсорной системы является подбор элемента распознавания. Альтернативным инструментом для подбора чувствительного элемента (элемента распознавания) является фаговый дисплей, позволяющий получать антитела к низкомолекулярным антигенам. Цель работы заключалась в проведении исследований по отработке и оптимизации методики получения антител, специфичных к тетрациклину, с использованием технологии фагового дисплея, и оценке возможности их применения для индикации тетрациклина. Проведены исследования оптимизации условий по наработке фаговых антител, специфичных к тетрациклину, а также сохранению их активности в процессе хранения. Показана перспективность применения технологии фагового дисплея для получения антитетрациклиновых антител. С помощью метода дот-иммуноанализа показана возможность применения полученных фаговых антител для определения тетрациклина.

Ключевые слова: технология фагового дисплея, антитела, антибиотики

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-00309).

Для цитирования: Мартыненко А. В., Караваева О. А., Фомин А. С., Гулий О. И. Оптимизация технологии фагового дисплея для получения антител, специфичных к тетрациклину // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2024. Т. 24, вып. 2. С. 202–207. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2024-24-2-202-207>, EDN: XXJNWQ

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Optimization of phage display technology for obtaining antibodies specific to tetracycline

A. V. Martynenko¹, O. A. Karavaeva², A. S. Fomin², O. I. Guliy² ✉

¹Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

²Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, 13 Entuziastov Prospekt, Saratov 410049, Russia

Anzhelika V. Martynenko, lika_martynenko2002@mail.ru

Olga A. Karavaeva, helga1121@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0665-1846>

Alexander S. Fomin, strazth87@bk.ru

Olga I. Guliy, guliy_olga@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0541-0020>

Abstract. Large-scale production and use of antimicrobials in human, veterinary and agricultural applications has led to antibiotic contamination of water resources. Therefore, it is relevant to develop methods for monitoring the content of antibiotics, especially in water resources.



Biosensor methods are successful for the analysis of antibiotics. One of the main elements of a biosensor system is the selection of a recognition element. An alternative tool for selecting a sensitive element (recognition element) is phage display of antibodies, which makes it possible to obtain antibodies to low molecular weight antigens. The purpose of the work was to conduct research to develop and optimize the methodology for obtaining antibodies specific to tetracycline by using phage display technology, and to evaluate the possibility of their use for the indication of tetracycline. The work included studies of optimization of conditions for the production of phage antibodies specific to tetracycline, as well as the preservation of their activity during storage. The promise of using phage display technology for the production of anti-tetracycline antibodies has been shown. Using the dot immunoassay method, the possibility of using the obtained phage antibodies for tetracycline detection was shown.

Key words: phage display technology, antibodies, antibiotics

Acknowledgements: This work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 24-24-00309).

For citation: Martynenko A. V., Karavaeva O. A., Fomin A. S., Guliy O. I. Optimization of phage display technology for obtaining antibodies specific to tetracycline. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2024, vol. 24, iss. 2, pp. 202–207 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2024-24-2-202-207>, EDN: XXJNWQ

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

Интенсивное производство и применение антибиотиков в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве привело к загрязнению различных компонентов окружающей среды: поверхностных и грунтовых вод, питьевой воды, городских сточных вод, почвы, ила и т.д., что создает экологические проблемы для человечества. Важно отметить, что количественные показатели применения антибиотиков в животноводстве во всем мире превышают уровни потребления антибиотиков в медицине [1]. Ожидается, что к 2030 г. увеличение потребления антибактериальных препаратов достигнет более чем 100 000 т в год [2]. Ежегодное увеличение потребления антибиотиков приводит к их накоплению в окружающей среде и развитию антибактериальной резистентности. Загрязнение антибактериальными препаратами, попадающими в сточные воды, объединяет проблему загрязнения не только антибиотиками, но и различными биологически активными соединениями в целом (лекарства, метаболиты лекарств или эндокринные разрушители). Большинство неиспользованных антибиотиков, их метаболитов и остатков попадают в окружающую среду различными путями, что влияет на природные экосистемы. Вред, наносимый противомикробными препаратами, попавшими в сточные воды, представлен на рис. 1. Для предотвращения экологической катастрофы необходим постоянный мониторинг источников воды на содержание антибиотиков, поэтому важно разрабатывать быстрые и эффективные методы для контроля антибиотиков в водных ресурсах. В этом направлении большой потенциал принадлежит сенсорным системам анализа. Необходимым составляющим любой сенсорной системы является подбор чувстви-

тельного компонента (элемента распознавания). В качестве сенсорного составляющего датчика могут быть использованы антитела, микробные клетки, аптомеры, ферменты и др. [3, 4]. Антитела являются классическим инструментом распознавания, а специфичное взаимодействие антитело–антиген может применяться в сенсорных системах при определении антибиотиков.

Альтернативным способом получения специфичных антител является фаговый дисплей, позволяющий получать антитела к низкомолекулярным антигенам (гаптенам). Суть технологии фагового дисплея антител состоит в получении высокоаффинных фаговых антител, т.е. фагов, экспонирующих в составе своей оболочки антитела или их фрагменты, обладающих высокой специфичностью к целевому антигену. Основными этапами данной технологии являются: конструирование фаговой библиотеки или выбор из уже имеющихся; процедура биопэннинга – обогащение фаговой библиотеки при помощи аффинной селекции [5–8]. Общая схема конструирования фрагментов антител фаговой библиотеки представлена на рис. 2 [5].

Многочисленные исследования подтверждают высокую чувствительность детекции анализа с помощью фаговых антител в отличие от других типов антител. Так, например, описана возможность применения фаговых антител при определении бактерий [9], вирусов [10], диагностически важных антигенов: ферритина [11], силимарина [12], диминазина [13] и др.

Успех в применении фаговых антител в качестве сенсорного элемента датчика зависит от предварительной отработки метода их наработки и тестирования. Цель данной работы заключалась в проведении исследований по отработке и оптимизации методики получения антител, специфичных к антибиотикам, с использованием технологии фагового дисплея.

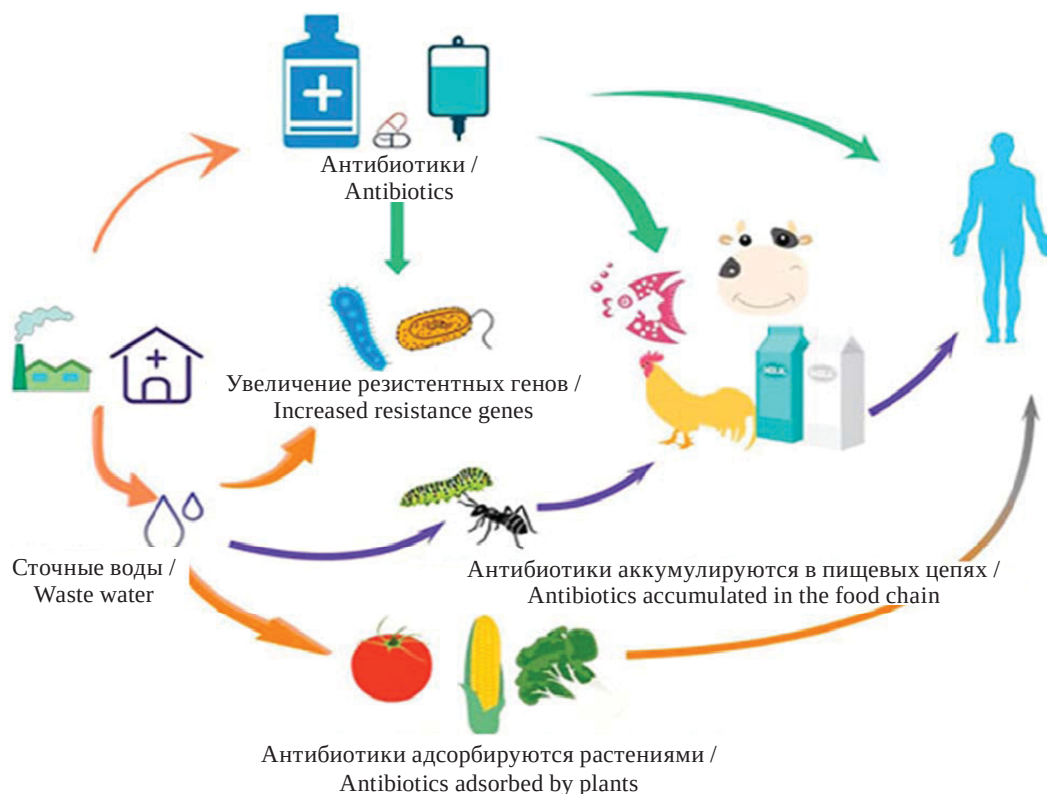


Рис. 1. Вред, наносимый противомикробными препаратами, попавшими в сточные воды
 Fig. 1. Harm caused by antimicrobials released into wastewater

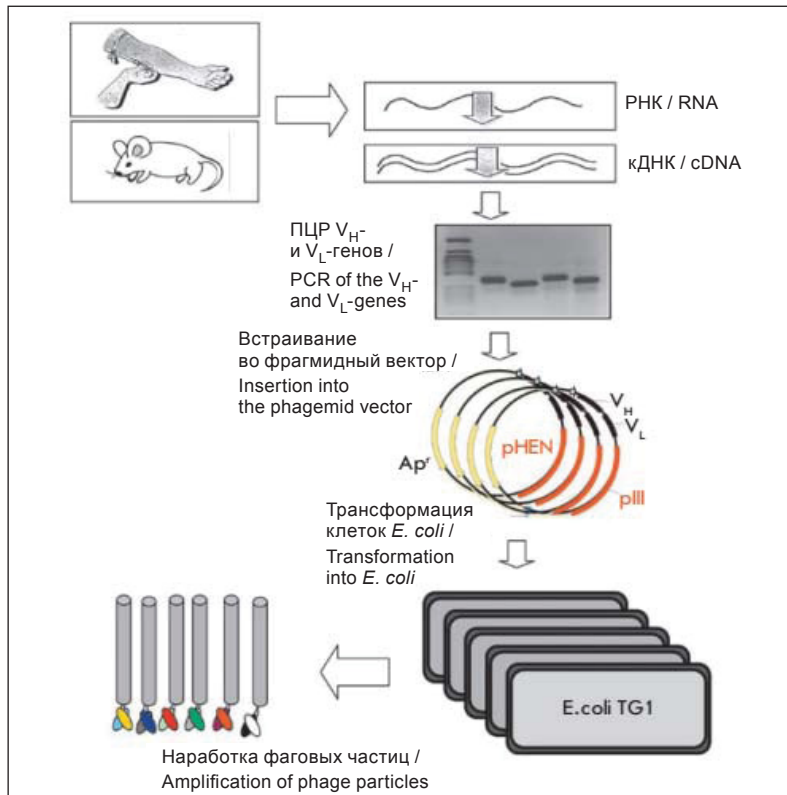


Рис. 2. Схема конструирования фрагментов антител фаговой библиотеки [5]
 Fig. 2. Scheme for constructing antibody fragments of a phage library [5]



Материалы и методы

В работе использованы бактерии *Escherichia coli* штамма TG1, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Россия) (<http://collection.ibppm.ru>) и выращивали на жидкой питательной среде 2xTY, как описано в работе [14].

Для отбора фаговых антител в качестве антигена использовали антибиотик тетрациклин (Sigma, США).

Фаговая библиотека антител овцы представлена профессором Университета г. Абердин (Великобритания) Уильямом Харрисом [15]. В работе использовали хелперный бактериофаг M13K07 (Stratagene, Швеция).

Методика получения фаговых антител подробно описана в работе [14].

Концентрацию фаговых частиц определяли спектрофотометрически, как описано в [7], на спектрофотометре UV-VIS Specord BS 250 (Analytik Jena, Германия) в Центре коллективного пользования (ЦКП) научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Метод дот-иммуноанализа применяли для оценки специфичности антител, титр определяли по методике [16].

Наночастицы золота получали по методу Frens [17], с использованием реакции восстановления золотохлористоводородной кислоты (Aldrich, США) цитратом натрия (Fluka, Швейцария). Наночастицы контролировали по фотометрической калибровке, с помощью трансмиссионной электронной микроскопии и регистрации динамического рассеяния света, как описано [18], в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Методика дот-иммуноанализа подробно описана в работе [14]. Антибиотик наносили на мембрану (0,5; 1; 2; 4, 6, 12, 25, 50 и 100 мкг/мл) и блокировку мембраны проводили в течение 1 ч 2% сухим молоком, разведенным в фосфатном буферном растворе (pH 7.0). После окрашивания мембрану промывали в фосфатном буфере и высушивали.

Результаты и их обсуждение

В 1999 г. в ИБФРМ РАН был передан фаговый дисплей антител овцы, протоколы и методические рекомендации по применению данной технологии [15].

В качестве антибактериального препарата использовали тетрациклин (представитель те-

трациклинов). Выбор тетрациклина обусловлен тем, что объем его продаж занимает 1-е место от всех реализуемых антибактериальных препаратов (в соответствии с данными на 2021 г.) [19], поэтому весьма актуальным является развитие методов контроля тетрациклина в окружающей среде, особенно в водных ресурсах.

В результате проведенных исследований подобраны оптимальные условия для проведения отбора антител, специфичных к тетрациклину, а именно:

- мембрана для иммобилизации антибиотика;
- концентрация антибиотика для обеспечения его максимальной иммобилизации на мембране;
- температура при иммобилизации препарата на мембране;
- время диализа фаговой суспензии;
- pH буферного раствора при проведении диализа фаговой суспензии;
- анализ сохранения активности полученных фаговых антител в процессе хранения;
- проверка специфичности фаговых антител методом дот- иммуноанализа.

Полученные в работе антитетрациклиновые фаговые антитела использовали для определения тетрациклина в водных растворах. Установлено, что фаговые антитела позволяют определять тетрациклин в водных растворах методом дот-иммуноанализа (нижний предел детекции составляет 1 мкг/мл). Антитетрациклиновые фаговые антитела сохраняют свою активность в отношении тетрациклина в процессе хранения в течение 5 месяцев. С помощью метода дот-иммуноанализа показана специфичность антитетрациклиновых фаговых антител к определяемому антибиотику.

Заключение

Технология фагового дисплея является предпочтительным выбором для производства рекомбинантных антител в большинстве лабораторий, поскольку обеспечивает быструю и экономичную наработку антител с использованием нитевидного бактериофага. Как уже было сказано, производство рекомбинантных антител включает несколько этапов, но все они проводятся *in vitro*, и отсутствует необходимость проведения экспериментов с привлечением животных. Это основное и важное преимущество данной технологии по сравнению с традиционными методами получения антител.



Еще одним преимуществом фагового дисплея является меньшее время, необходимое для продукции антител. Обычные методы требуют иммунизации, которая может занять несколько недель или месяцев, чтобы вызвать достаточный иммунный ответ для выработки антител, что делает фаговый дисплей эффективным в долгосрочной перспективе. В представленном исследовании отработаны технические приемы применения технологии фагового дисплея для получения антител, специфичных к тетрациклину, изучены условия сохранения их активности и установлена возможность их применения для определения тетрациклина методом дот-иммуноанализа.

Список литературы

1. Lu M. Y., Kao W. C., Belkin S., Cheng J. Y. A smartphone-based whole-cell array sensor for detection of antibiotics in milk // *Sensors (Basel)*. 2019. Vol. 19. P. 3882. <https://doi.org/10.3390/s19183882>
2. Van Boeckel T. P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B. T., Levin S. A., Robinson T. P., Teillant A., Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial use in food animals // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. Vol. 112, № 18. P. 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
3. Purohit B., Vernekar P. R., Shetti N. P., Chandra P. Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis // *Sens. Int.* 2020. Vol. 1. P. 100040. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100040>
4. Guliy O. I., Bunin V. D. Electrooptical analysis as sensing system for detection and diagnostics bacterial cells, in the book, biointerface engineering: Prospects in medical diagnostics and drug delivery // Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2020. Vol. 11. P. 233–254. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4790-4_11
5. Тукунова Н. В., Морозова В. В. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител // *Acta Naturae (русскаяязычная версия)*. 2009. Т. 1, № 3. С. 22–31.
6. Smith G. P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface // *Science*. 1985. Vol. 228. P. 1315–1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>
7. Smith G. P., Scott J. K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage // *Methods in enzymology*. 1993. Vol. 217. P. 228–257. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17065-d](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)17065-d)
8. McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., Chiswell D. J. Phage antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains // *Nature*. 1990. Vol. 348. P. 552–554. <https://doi.org/10.1038/348552a0>
9. Гулий О. И., Евстигнеева С. С., Дыкман Л. А. Использование фаговых антител для определения микробных клеток (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2023. Т. 59, № 2. С. 150–166. <https://doi.org/10.31857/S0555109923020083>
10. Guliy O. I., Evstigneeva S. S., Khanadeev V. A., Dykman L. A. Antibody phage display technology for sensor-based virus detection: Current status and future prospects // *Biosensors*. 2023. Vol. 13. P. 640. <https://doi.org/10.3390/bios13060640>
11. Staroverov S. A., Volkov A. A., Fomin A. S., Laskavuy V. N., Mezhenyuy P. V., Kozlov S. V., Larionov S. V., Fedorov M. V., Dykman L. A., Guliy O. I. The usage of phage mini-antibodies as a means of detecting ferritin concentration in animal blood serum // *J. Immunoassay Immunochem*. 2015. Vol. 36. P. 100–110. <https://doi.org/10.1080/15321819.2014.899257>
12. Staroverov S. A., Kozlov S. V., Fomin A. S., Gabalov K. P., Khanadeev V. A., Soldatov D. A., Domnitsky I. Y., Dykman L. A., Akchurin S. V., Guliy O. I. Synthesis of silymarin-selenium nanoparticle conjugate and examination of its biological activity *in vitro* // *ADMET DMPK*. 2021. Vol. 9. P. 255–266. <https://doi.org/10.5599/admet.1023>. eCollection 2021.
13. Staroverov S. A., Sidorkin V. A., Fomin A. S., Shchyogolev S. Y., Dykman L. A. Biodynamic parameters of micellar diminazene in sheep erythrocytes and blood plasma // *J. Vet. Sci.* 2011. Vol. 12. P. 303–307. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.4.303>
14. Гулий О. И., Алсовэйдю А. К. М., Фомин А. С., Габалов К. П., Староверов С. А., Караваяева О. А. Фаговые антитела как биорецепторы для определения ампициллина // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2022. Т. 58. С. 513–519. <https://doi.org/10.31857/S0555109922050087>
15. Charlton K. A., Moyle S., Porter A. J., Harris W. J. The isolation of super-sensitive anti-hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep // *The Journal of Immunology*. 2000. Vol. 164. P. 6221–6229. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(01\)00192-0](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(01)00192-0)
16. Shah K., Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): The basics // *Br. J. Hosp. Med. (Lond)*. 2016. Vol. 77, № 7. P. 98–101. <https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>
17. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions // *Nat. Phys. Sci.* 1973. Vol. 241. P. 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
18. Guliy O. I., Zaitsev B. D., Burygin G. L., Karavaeva O. A., Fomin A. S., Staroverov S. A., Borodina I. A. Prospects for the use of gold nanoparticles to increase the sensitivity of an acoustic sensor in the detection of microbial cells // *Ultrasound Med. Biol.* 2020. Vol. 46. P. 1727–1737. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.014>
19. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018 Trends from 2010 to 2018. Tenth



ESVAC report. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf. (дата обращения: 19.03.2023).

References

- Lu M. Y., Kao W. C., Belkin S., Cheng J. Y. A smart-phone-based whole-cell array sensor for detection of antibiotics in milk. *Sensors (Basel)*, 2019, vol. 19, pp. 3882. <https://doi.org/10.3390/s19183882>
- Van Boeckel T. P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B. T., Levin S. A., Robinson T. P., Teillant A., Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, vol. 112, no. 18, pp. 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Purohit B., Vernekar P. R., Shetti N. P., Chandra P. Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis. *Sens. Int.*, 2020, vol. 1, pp. 100040. <https://doi.org/10.1016/j.sintl.2020.100040>
- Guliy O. I., Bunin V. D. Electrooptical analysis as sensing system for detection and diagnostics bacterial cells, in the book, biointerface engineering: Prospects in medical diagnostics and drug delivery. *Springer Nature Singapore Pte Ltd.*, 2020, vol. 11, pp. 233–254. https://doi.org/10.1007/978-981-15-4790-4_11
- Tikunova N. V., Morozova V. V. Phage Display on the base of filamentous bacteriophages: Application for recombinant antibodies selection. *Acta Nat.*, 2009, vol. 1, pp. 20–28 (in Russian).
- Smith G. P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 1985, vol. 228, pp. 1315–1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>
- Smith G. P., Scott J. K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods in Enzymology*, 1993, vol. 217, pp. 228–257. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17065-d](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)17065-d)
- McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., Chiswell D. J. Phage antibodies: Filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*, 1990, vol. 348, pp. 552–554. <https://doi.org/10.1038/348552a0>
- Guliy O. I., Evstigneeva S. S., Dykman L. A. The use of phage antibodies for microbial cell detection. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2022, vol. 58, no. 1, pp. 32–46 (in Russian). <https://doi.org/10.31857/S0555109923020083>
- Guliy O. I., Evstigneeva S. S., Khanadeev V. A., Dykman L. A. Antibody phage display technology for sensor-based virus detection: Current status and future prospects. *Biosensors*, 2023, vol. 13, pp. 640. <https://doi.org/10.3390/bios13060640>
- Staroverov S. A., Volkov A. A., Fomin A. S., Laskavuy V. N., Mezhenyy P. V., Kozlov S. V., Larionov S. V., Fedorov M. V., Dykman L. A., Guliy O. I. The usage of phage mini-antibodies as a means of detecting ferritin concentration in animal blood serum. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2015, vol. 36, pp. 100–110. <https://doi.org/10.1080/15321819.2014.899257>
- Staroverov S. A., Kozlov S. V., Fomin A. S., Gabalov K. P., Khanadeev V. A., Soldatov D. A., Domnitsky I. Y., Dykman L. A., Akchurin S. V., Guliy O. I. Synthesis of silymarin-selenium nanoparticle conjugate and examination of its biological activity *in vitro*. *ADMET DMPK*, 2021, vol. 9, pp. 255–266. <https://doi.org/10.5599/admet.1023>. eCollection 2021.
- Staroverov S. A., Sidorkin V. A., Fomin A. S., Shchyogolev S. Y., Dykman L. A. Biodynamic parameters of micellar diminazene in sheep erythrocytes and blood plasma. *J. Vet. Sci.*, 2011, vol. 12, pp. 303–307. <https://doi.org/10.4142/jvs.2011.12.4.303>
- Guliy O. I., Alsowaidi A. K., Fomin A. S., Gabalov K. P., Staroverov S. A., Karavaeva O. A. Phage antibodies as bioreceptors for ampicillin detection. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2022, vol. 58, pp. 646–651 (in Russian). <https://doi.org/10.31857/S0555109922050087>
- Charlton K. A., Moyle S., Porter A. J., Harris W. J. The isolation of super-sensitive anti-hapten antibodies from combinatorial antibody libraries derived from sheep. *The Journal of Immunology*, 2000, vol. 164, pp. 6221–6229. [https://doi.org/10.1016/s0956-5663\(01\)00192-0](https://doi.org/10.1016/s0956-5663(01)00192-0)
- Shah K., Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): The basics. *Br. J. Hosp. Med. (Lond.)*, 2016, vol. 77, no. 7, pp. 98–101. <https://doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>
- Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.*, 1973, vol. 241, pp. 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
- Guliy O. I., Zaitsev B. D., Burygin G. L., Karavaeva O. A., Fomin A. S., Staroverov S. A., Borodina I. A. Prospects for the use of gold nanoparticles to increase the sensitivity of an acoustic sensor in the detection of microbial cells. *Ultrasound Med. Biol.*, 2020, vol. 46, pp. 1727–1737. <https://doi.org/10.1016/j.ultras-medbio.2020.03.014>
- Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018 Trends from 2010 to 2018. *Tenth ESVAC report*. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf (accessed Mach 15, 2023).

Поступила в редакцию: 02.12.2023; одобрена после рецензирования 12.02.2024; принята к публикации 13.02.2024
The article was submitted 02.12.2023; approved after reviewing 12.02.2024; accepted for publication 13.02.2024