

ВЛИЯНИЕ СОМАТИЧЕСКОГО ЭКСТРАКТА ANISAKIS SIMPLEX L3 НА МИКРООРГАНИЗМЫ IN VITRO

О. И. ЛАЗАРЕВА, аспирант,
Т. Н. СИВКОВА, доктор биологических наук, доцент,
Т. С. ПРОХОРОВА, кандидат биологических наук, доцент,
Пермский государственный аграрно-технологический университет
имени академика Д. Н. Прянишникова

(614990, г. Пермь, ул. Петропавловская, д. 23, тел. 8 (342) 240-56-53),

В. К. БЕРЕЖКО, доктор биологических наук, профессор,

Л. А. НАПИСАНОВА, кандидат биологических наук,

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии
животных и растений имени К. И. Скрыбина ФАНО России

(117218, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28, тел. 8 (499) 124-56-55)

Ключевые слова: соматический экстракт, *Anisakis simplex* L3, метаболиты, бактерии, бациллы, бактериостатическое действие.

В статье рассматривается влияние соматического экстракта *Anisakis simplex* L3 на культуры клеток микроорганизмов in vitro. Ранее установлено, что под действием указанного экстракта нарушается и угнетается процесс деления эукариотических клеток. Сведений о механизмах взаимодействия соматических экстрактов гельминтов и микроорганизмов очень мало. Предполагается, что соматический экстракт из анизакид оказывает негативное влияние на микроорганизмы за счет входящих в его состав белковых компонентов и метаболитов. Целью исследования являлось изучение влияния экстракта на культуры клеток разнообразных микроорганизмов, как по морфологическим признакам, так и по устойчивости к факторам внешней среды. Экстракт готовили из личинок анизакид, извлеченных из замороженной путассу (*Micromesistius poutassou*), проверяли на стерильность и безвредность, определяли содержание белка. Для исследования использовали суточные культуры бактерий: микрококки *Micrococcus* sp., палочки *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella tiphimurium* и бациллы *Bacillus subtilis*. При культивировании микроорганизмов с дисками, пропитанными антигенным экстрактом анизакид, в термостате при +37° С через 12 часов выявлена зона задержки роста у *Micrococcus* sp., *E. coli* и *P. vulgaris*. На рост бактерий палочек *S. tiphimurium*, бацилл *B. subtilis* экстракт влияния не оказывал. Формирование выраженной зоны стерильности свидетельствует о наличии в составе белкового экстракта биологически-активных компонентов, обладающих бактериостатическим действием. Обсуждаются механизмы бактериостатического действия соматического экстракта.

EFFECT OF THE SOMATIC EXTRACT OF ANISAKIS SIMPLEX L3 TO MICROORGANISMS IN VITRO

О. И. ЛАЗАРЕВА, graduate student,
Т. Н. СИВКОВА, doctor of biological sciences associate professor,
Т. С. ПРОКХОРОВА, candidate of biological sciences, associate professor,
Perm State Agrarian-Technical University,

(23 Petropavlovskaya Str., 614099, Perm, phone 8 (342) 240-56-53),

В. К. БЕРЕЖКО, doctor of biological sciences, professor,

Л. А. НАПИСАНОВА, candidate of biological sciences, senior researcher,

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants
named after K. I. Skryabin of FASO of Russia

(28 B. Cheremushkinskaya, 117218, Moscow, phone 8 (499) 124-56-55)

Keywords: somatic extract, *Anisakis simplex* L3, metabolites, bacteria, bacilli, bacteriostatic action.

In the article, the influence of the somatic extract of *Anisakis simplex* L3 to the cultures of microorganism cells in vitro is considered. The somatic extract from *A. simplex* L3 disrupts and depresses the process of dividing eukaryotic cells was established earlier. There are very few data on the mechanisms of interactions of somatic extracts of helminths and microorganisms. Somatic extract anisakids renders a negative effect on microorganisms due to its constituent protein components and metabolites, it is supposed. Somatic extract from anisakids has a negative effect on microorganisms due to proteins and metabolites in its composition, it is assumed. The aim of the study was to study the effect extract on cell cultures of microorganisms diverse in morphology and resistance to environmental factors. The extract was prepared from the larvae of anisakids, the larvae were removed from frozen *Micromesistius poutassou*, then the extract was checked for sterility and harmlessness, the protein content was determined, then the disks were soaked with somatic extract. For the study, daily cultures bacteria were used: micrococci *Micrococcus* sp., of sticks *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella tiphimurium*, and bacilli *Bacillus subtilis*. Microorganisms were cultured with discs that contained an antigenic extract of anisakids in a thermostat at +37° C, after 12 hours, a growth retardation zone was detected in *Micrococcus* sp., *E. coli* and *P. vulgaris*. The extract had no effect on the growth of *S. tiphimurium*, *B. subtilis*. The sterility zone, which is formed temporarily, indicates that the extract contains biological active components acting bacteriostatically on microorganisms. The mechanisms of bacteriostatic action of the somatic extract of *Anisakis simplex* L3 on bacteria were by assumed.

Положительная рецензия подготовлена В. И. Плешаковой, доктором ветеринарных наук, профессором,
заведующей кафедрой ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазивных болезней
Омского государственного аграрного университета.

Введение

В зарубежной литературе имеются сведения о бактериостатическом действии нематод на микрофлору кишечника. Установлено, что бактериостатическими и антимикробными свойствами обладают их экскреторно-секреторные и соматические продукты [6, 16–18, 25–27].

Также известно, что соматический экстракт *Anisakis simplex* L3 является многокомпонентным составом, который содержит различные устойчивые белки (антигены) и пептиды [4, 12, 13], вызывающие патологические изменения в эукариотических клетках [4]. Сведений относительно бактериостатического действия соматического экстракта личинок анизакид практически нет. Есть сообщение, что добавление гомогената *Anisakis simplex* L3 ограничивает бактериальный рост [24]. Использование культур клеток бактерий в качестве моделей для изучения влияния экстракта на прокариотическую клетку не только доступно, недорого, но и не требует создания специальных дополнительных условий. Антимикробный эффект экстракта не изучен, поэтому полученные данные, возможно, окажутся полезными в поисках способов борьбы с патологическими последствиями воздействия гельминтов и микроорганизмов.

Цель и методика исследований

Целью нашего исследования являлось изучение степени активности антигенных компонентов соматического экстракта *Anisakis simplex* L3 в отношении культур грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов *in vitro*.

В задачи исследования входило получение антигенного экстракта *A. simplex* L3, приготовление дисков для определения его активности в отношении исследуемой микрофлоры.

Культуры клеток *Micrococcus sp.*, *E. coli*, *P. vulgaris* были спонтанно выделены из пищевых продуктов в лаборатории ГБУВК «Пермский ВДЦ». *S. tiphimurium* № 79 приобретен у ГИСК имени Л. А. Тарасевича (г. Москва). Бактерии *B. subtilis* штамма 12В получены из препарата «Споровит».

Результаты исследований

Извлеченных из тушек рыбы личинок *A. simplex* III стадии тщательно многократно промывали проточной водой, затем обрабатывали растворами антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и нистатин), стерильным физиологическим раствором и замораживали. После многократного замораживания и оттаивания личинок гомогенизировали, заливали стерильным забуференным физиологическим раствором (рН 7,2) в соотношении 1:3 и экстрагировали белки при температуре +4° С в течение 18 часов. После центрифугирования гомогенной массы из гельминтов при 12 000 оборотов в минуту полученный

соматический экстракт хранили при температуре –18° С [3].

Далее для обнаружения контаминации бактериями, грибами и микоплазмами пробу экстракта из личинок анизакид высевали на МПА, МПБ и МППБ. Для выявления грибковой контаминации антиген высевали на агар Сабуро. На микоплазменную контаминацию пробу экстракта высевали на универсальную плотную среду для выделения микоплазм. При обнаружении хотя бы одного из контаминантов партию экстракта считали нестерильной и в дальнейшей работе не использовали.

Для определения концентрации белка в полученном экстракте использовали биохимический полуавтоматический анализатор StatFax 1904+ (Awareness Technology, Inc.) и набор реактивов Spinreact, S.A. согласно инструкции при длине волны 540 нм. В качестве контроля использовали фосфатно-солевой буферный раствор. Содержание белка составляло 3,6 г/л.

Приготовление антигенных дисков. Стерильным антигеном-экстрактом *A. simplex* пропитывали диски из фильтровальной бумаги, которые затем использовали путем нанесения на чашки Петри с микробным газоном из культур *Micrococcus sp.*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. tiphimurium* и *B. subtilis*. Микробный газон готовили из суточных культур микроорганизмов, выращенных на скошенном агаре (МПА), которые затем смывали (каждый в отдельности) стерильным физиологическим раствором с поверхности скошенного МПА. Пробирки закрывали пробкой и, слегка взбалтывая, получали смывы культуры. Приготовленные суспензии инкубировали 20–40 минут в термостате при температуре +37° С. Определение количества микроорганизмов оценивали по степени мутности суспензии. Десять единиц соответствовало количеству микробных клеток в единице объема 5×10^8 . Для соблюдения бактериального стандарта мутности использовали отраслевые стандартные образцы ОСО 42-28-85, разработанные Государственным институтом стандартизации и контроля имени Л. А. Тарасевича.

Перед заполнением расплавленной средой чашки Петри устанавливали на строго горизонтальную поверхность. После заполнения чашки оставляли при комнатной температуре для застывания. Перед инокуляцией контролировали отсутствие конденсата жидкости на внутренней поверхности крышек. Приоткрытые чашки подсушивали при комнатной температуре в течение 10–15 мин. Инокулюмы микроорганизмов использовали в течение 15 минут после приготовления. Их наносили пипеткой на поверхность чашки Петри с питательной средой в объеме 1–2 мл, равномерно распределяли по поверхности покачиванием, выдерживали 15 минут для адапта-



Рис. 1. Зоны задержки роста культуры *Micrococcus sp.* вокруг диска с антигеном-экстрактом *A. simplex*.
Fig. 1. Zones of growth retardation *Micrococcus sp.* around the disk with antigen-extract *A. simplex*

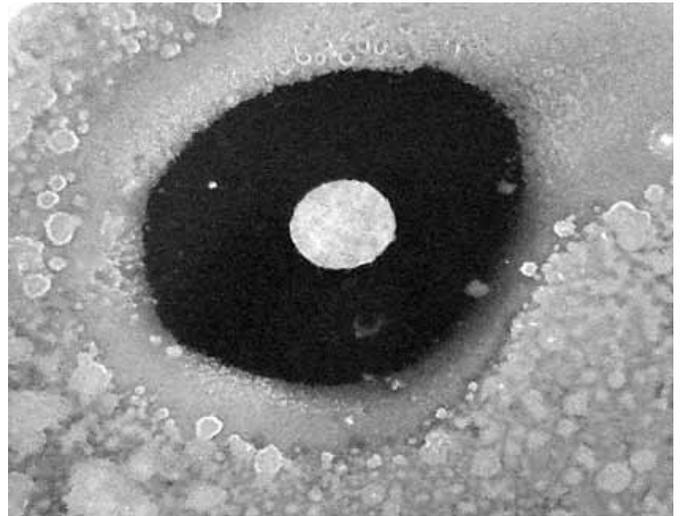


Рис. 2. Зоны стерильности культуры *E. coli* вокруг диска с антигеном-экстрактом *A. simplex*
Fig. 2. *E. coli* sterility zones around the disk with the antigen-extract of *A. simplex*

ции микроорганизмов, после чего избыток инокулюма удаляли. Не позднее чем через 15 минут после инокуляции на поверхность питательной среды наносили диски с антигеном-экстрактом *A. simplex*. Расстояние от диска до края чашки и между дисками оставляли 30–35 мм. Непосредственно после аппликации дисков чашки Петри помещали в термостат кверху дном и инкубировали при температуре +37° С в течение 12 и 24 часов.

После окончания инкубации чашки помещали кверху дном на темную матовую поверхность так, чтобы свет падал на них под углом в 45° (учет в отраженном свете). Диаметр зон задержки роста измеряли с точностью до 1 мм штангенциркулем или линейкой. При измерении зон задержки роста ориентировались на зону полного подавления видимого роста [1].

В процессе культивирования культур микроорганизмов с соматическим экстрактом *A. simplex* L3 установили различное проявление его ингибирующей активности. При культивировании *Micrococcus sp.* в течение 12 часов вокруг бумажных дисков формировались зоны задержки роста диаметром 1,52–1,64 см (рис. 1).

При культивировании бактерий *E. coli* с экстрактом в течение 12 часов вокруг бумажных дисков образовывались зоны стерильности диаметром 2,12–2,18 см (рис. 2).

После культивирования *P. vulgaris* в течение этого же периода времени вокруг бумажных дисков также установлены зоны временной задержки роста диаметром 1,58–1,63 см (рис. 3).

Спустя 24 часа культивирования данная зона стерильности во всех случаях исчезала.

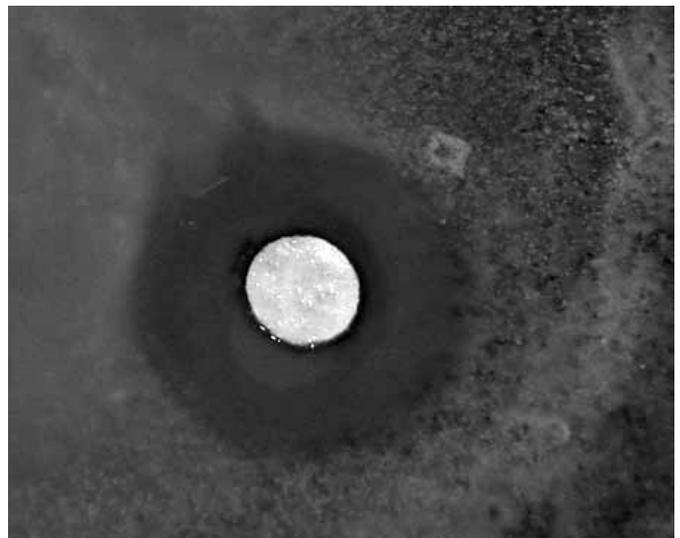


Рис. 3. Зоны временной задержки роста культуры *P. vulgaris* вокруг диска с антигеном-экстрактом *A. simplex*
Fig. 3. Zones of temporary growth retardation of *P. vulgaris* around the disk with the antigen-extract of *A. simplex*

Проведенные нами исследования позволили установить бактериостатическое действие экстракта из анизакид в течение 12 часов. Следовательно, в экстракте содержатся активные вещества, вызывающие временный бактериостаз грамотрицательной и грамположительной облигатной микрофлоры, предположительно за счет нарушения обмена энергии и веществ. В нашем случае нарушения этих процессов проявились у *Micrococcus sp.*, *E. coli*, *P. vulgaris*.

Проведенные ранее эксперименты *in vivo* в отношении эукариотических организмов показали, что в активно делящихся клетках красного костного мозга и сперматогенного эпителия лабораторных мышей после однократного внутрибрюшинного введения соматического экстракта из анизакид нарушается процесс формирования микротрубочек веретена

деления. Это явление сопровождается появлением патологических фигур в виде многополюсных митозов, отставанием и преждевременным расхождением отдельных хромосом в метафазе и анафазе, а также нарушением структуры самих хромосом, проявляющейся формированием «хромосомных мостов». Такие процессы вызывают образование анэуплоидных и патологических клеток, в норме лизирующихся в организме. Однако воздействие экстракта приводило к появлению патологических форм клеток в периферической крови и нарушению сперматогенеза, в результате чего самцы экспериментальных мышей становились бесплодными [4]. По всей видимости, аналогичные процессы могут происходить и в прокариотических клетках, что негативно отражается на скорости их деления. В то же время при микроскопии мазков изменения в морфологии клеток в эксперименте и контроле мы не зафиксировали.

Нельзя не отметить, что ткани и органы гельминтов могут содержать собственную бактериальную флору, которую они переносят, способную также влиять на микроорганизмы [18]. Так, наличие в кишечнике личинок *Anisakis* бактерии *Photobacterium phosphoreum* и *Shewanella sp.*, вызывающих порчу рыбы и рыбопродуктов, напротив, благоприятно сказывается на сроках ее хранения. Ученые объясняют данный факт специфическими метаболическими свойствами гельминтов, вызывающих снижение рН, что приводит к торможению роста и снижению количества гнилостной микрофлоры [24]. Однако в случае воздействия соматического экстракта из анизакид подобное действие исключается, так как белковый экстракт оставался стерильным, следовательно, за процесс воздействия на клетки прокариот ответственность лежит непосредственно на белковых компонентах самого гельминта.

Работами, проведенными ранее зарубежными специалистами, было выявлено наличие антибактериальных факторов у нематод. Tagg [25] подтвердил наличие антибактериальных факторов у *A. suum* и у множества других видов. Wardlaw et al. [26], Kato [16] установили бактерицидную активность жидкости из полости тела *Ascaris suum*, Andersson et al. [6] антимикробную активность *Ascaris lumbricoides* против грамположительных микроорганизмов. Eberle R., Brattig N. W., et al. [11] изолировали из экскреторно-секреторных продуктов *Onchocerca ochengi* 36 антимикробных кандидата, из которых 3 пептида и 33 пептидные смеси, активных в отношении *E. coli*. Abner, et al. [5] проводили опыты *in vitro* и установили, что пептиды экскреторно-секреторных продуктов *Trichuris suis* размером менее 10 кДа активны в отношении *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, и *Campylobacter jejuni*. Drake, et al. [10] выделили из экскреторно-секреторных продуктов *Trichuris*

trichiura и *T. Muris* белки 47 и 43 кДа, вызывающие разрушение липидного слоя мембран и формирование пор.

Известно, что антимикробные пептиды делятся на две группы. Первые – низкомолекулярные катионные пептиды. Они нарушают структуру и функции цитоплазматической мембраны, нарушая проницаемость и формируя ионные каналы. Вторые, цекропины, высокомолекулярные белки, состоящие из 30 и более аминокислот, литические ферменты и белки, связывающие питательные вещества, и белки, содержащие сайты против микробных макромолекул, приводящие к разрушению мембран, лектины, лизоцим и другие [18]. Однако Joо H. S., Fu C. I., et al. [15] считают, что независимо от размера молекул антимикробных пептидов, их механизмы идентичны: происходит связывание с поверхностью цитоплазматической мембраны бактериальной клетки, образование пор и уничтожение микроорганизма. Есть сведения, что процессу лизиса, вызванного низкомолекулярными катионными пептидами, обладающими антимикробной активностью, подвергаются как микробные, так и эукариотические клетки [2].

Возможно, в состав белков анизакид входят компоненты, обладающие ингибирующим действием.

Так, в составе экскреторно-секреторных продуктов анизакид обнаружены ферменты и антиоксиданты, молекулы ингибиторов протеаз, лектины, белки теплового шока, муцины и регуляторы цитокинов [17]. Потенциально из этих веществ антимикробным действием могут обладать лектины и белки теплового шока.

Из экскреторно-секреторных белков, соматических антигенов личиночных стадий и кутикулярных белков *A. simplex* L3 [7] описаны 103 белка с молекулярной массой от 3 до 200 кДа [12]. Среди них есть устойчивые к многим факторам: *Ani s 1* (21,2 кДа), *Ani s 4* (15,6 кДа), *Ani s 5* (16,6 кДа), *Ani s 8* (16,1 кДа), *Ani s 9* (15,5 кДа), *Ani s 10* (23,3 кДа), *Ani s 11.0101* (30кДа) [17], которые также можно принять за антимикробные пептиды.

Экстракт *A. simplex* содержит множество структурных, мышечных, регуляторных, транспортных белков, катаболических ферментов, участвующих в процессах метаболизма углеводов и аминокислот, а также белков, связанных с дезинтоксикацией, и других различных биологических функций [12].

Соматический антигенный экстракт не оказывал бактериостатического действия на патогенную грамотрицательную микрофлору, представленную *S. Tiphimurium*, и на облигатную грамположительную *B. subtilis*. Вероятно, этот факт можно объяснить тем, что у бактерий существуют механизмы резистентности к антимикробным пептидам, которые основаны на изменении физико-химических

свойств поверхностных молекул цитоплазматических мембран [15], что можно рассматривать и в отношении пептидов анизакид. Вообще описано несколько стратегий устойчивости бактерий. Первая – внеклеточная диссоциация: бактерии при взаимодействии с антимикробными пептидами секретируют белки-протеазы, которые обладают в отношении их протеолитической активностью. Так, грамположительные бактерии выделяют металлопротеазы, сериновые эндопептидазы и цистеиновые протеазы [21], а грамотрицательные, такие как *E. coli*, *S. typhimurium* – аспарат протеазу, *Proteus mirabilis* – металлопротеазу [8]. Также возможна и внутриклеточная протеолитическая диссоциация, разрушение грамотрицательными бактериями антимикробных пептидов, попавших в клетку с транспортными белками [23]. Третья – грамотрицательные и грамположительные бактерии содержат поверхностные капсульные белки, связывающие антимикробные пептиды. У грамположительных бактерий и бацилл есть тейхоевые кислоты, увеличивающие плотность клеточной стенки, электрическую стабильность, тем самым отталкивают и снижают поверхностную проницаемость. Подобно грамположительным бактериям, у грамотрицательных *S. typhimurium*, *E. coli* есть липополисахарид, уменьшающий отрицательный заряд клеточной стенки и снижающий ее проницаемость. У грамотрицательных бактерий также самая длинная полисахаридная цепь – О-антиген, обеспечивающий дополнительный барьер к антимикробным пептидам [22]. При взаимодействии антимикробных пептидов с цитоплазматической мембраной бактерий срабатывают механизмы для снижения притяжения. Так, для бацилл и грамположительных характерно наличие интегральных белков, обеспечивающих электростатическое отталкивание [19]. Но даже в случае присоединения антимикробных пептидов к цитоплазматической мембране бактерий, они могут их удалить, используя специальные комплексы сопротивления – насосы, также существующие у многих грамотрицательных микроорганизмов [9] и бацилл. По последним данным у грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе и у *S. typhimurium*, идентифицирована система, регулирующая экспрессию генов, участвующих в регуляции устойчивости к анти-

микробным пептидам [15]. Несмотря на то что из литературных данных известно, что защитные механизмы устойчивости к антимикробным пептидам присутствуют у многих микробов, они сработали не у всех исследуемых представителей в отношении пептидов анизакид. Подобный эффект устойчивости мы ожидали от *P. vulgaris*, так как известно, что он также обладает сильными протеолитическими свойствами [8, 21]. Midha A., Schlosser J., et al. [18] установили, что к соматическим продуктам *A. suum*, к антибактериальным компонентам более чувствительна грамположительная микрофлора *S. aureus* и *B. subtilis*, менее чувствительна или не чувствительна грамотрицательная *E. coli* и *P. vulgaris*.

Бактериостатическое действие гельминтов потенциально возможно использовать для лечения некоторых инфекционных заболеваний [14, 18, 20]. Эти данные основываются на том, что гельминты имеют природные механизмы устойчивости к бактериальным популяциям. Данные механизмы необходимо исследовать в связи с растущей антибиотикоустойчивостью и фармакологической устойчивостью патогенов. По последним данным известно, что экскреторно-секреторные белки анизакид возможно использовать для лечения иммунных, а в перспективе и аллергических заболеваний [17]. Поэтому необходимо не только изучение влияния бактерий на продукты нематод, но и наоборот, что в последующем может стать целью разработки антибактериальных и антигельминтных средств [18].

Выводы. Рекомендации

Полученные в ходе нашего эксперимента данные подтверждают антагонистические отношения белковых продуктов личинок *Anisakis simplex* L3 и микроорганизмов, согласующихся с литературными данными. В результате исследования выявлена различная степень активности антигенов соматического экстракта из анизакид на культуры микроорганизмов, наибольшее влияние экстракт оказал на культуры палочек *E. coli* и микрококков *Micrococcus* sp.

Полученные результаты можно использовать для разработки модели бактериальных клеток как тест объектов для оценки антигенной активности соматических, экскреторно-секреторных экстрактов и метаболитов различных гельминтов.

Литература

1. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания. – М. : Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.
2. Волкова Л. В., Гришина Т. А., Волков А. Г. Низкомолекулярные катионные пептиды лейкоцитов, индуцированные различными антигенами // Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология. 2015. № 4. С. 35–48.
3. Сивкова Т. Н. Получение и характеристика антигенов гельминтов: учебно-методическое пособие. – Пермь : Изд-во Пермской ГСХА, 2009. – 14 с.

4. Сивкова Т. Н., Бережко В. К. Кариопатическое и патоморфологическое действие продуктов метаболизма личинок анизакид: монография. – Пермь : Изд-во Пермской ГСХА, 2011. – 132 с.
5. Abner S. R., et al. *Trichuris suis*: detection of antibacterial activity in excretory-secretory products from adults. *Exp. Parasitol.* 2001. No. 99. Pp. 26–36.
6. Andersson M., Boman A., Boman H. H. *Ascaris* nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003. No. 60. Pp. 599–606.
7. Audicana M. T., Kennedy M. W. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin Microbiol. Rev.* 2008. No. 21. Pp. 360–379.
8. Belas R., Manos J., Suvanasthi R. *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 2004. No. 72. Pp. 5159–5167.
9. Delmar J. A., Su C. C., Yu E. W. Bacterial multidrug efflux transporters. *Annu. Rev. Biophys.* 2014. No. 43. Pp. 93–117.
10. Drake L., et al. The major secreted product of the whipworm, *Trichuris*, is a pore-forming protein. *Proc. Biol. Sci.* 1994. No. 257. Pp. 255–261.
11. Eberle R., et al. Isolation, identification and functional profile of excretory-secretory peptides from *Onchocerca ochengi*. *Acta Trop.* 2015. No. 142. Pp. 156–166.
12. Fæste C. K., et al. Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*. *EuPA Open Proteomics.* 2014. No. 4. Pp. 140–155.
13. Fæste C. K. Fish feed as source of potentially allergenic peptides from the fish parasite *Anisakis simplex* (S.L.). *Animal feed science and technology.* Elsevier Science Publishing Company, Inc. 2015. No. 202. Pp. 52–61.
14. Haarder S., et al. Effect of ES products from *Anisakis* (Nematoda: Anisakidae) on experimentally induced colitis in adult zebra fish. *Parasite Immunol.* 2017. Vol. 39, I. 10. DOI 10.1111/pim.12456.
15. Joo H. S., Fu C. I., Otto M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2016. No. 26. 371 (1695). Pp. 1–11. DOI 10.1098/rstb.2015.0292.
16. Kato Y. Humoral defense of the nematode *Ascaris suum*: antibacterial, bacteriolytic and agglutinating activities in the body fluid. *Zoolog. Sci.* 1995. No. 12. Pp. 225–230.
17. Mehrdana F., Buchmann K. Excretory/secretory products of anisakid nematodes: biological and pathological roles. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2017. No. 59:42. Pp. 1–12. DOI 10.1186/s13028-017-0310-3.
18. Midha A., Schlosser J., Hartmann S. Reciprocal Interactions between Nematodes and Their Microbial Environments. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2017. Vol. 7:144. Pp. 1–20. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00144.
19. Peschel A., et al. Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor Mpr F is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J. Exp. Med.* 2001. No. 193. Pp. 1067–1076.
20. Reynolds L. A., Finlay B. B., Maizels R. M. Cohabitation in the intestine: interactions between helminth parasites, bacterial microbiota and host immunity. *Journal of immunology.* 2015. 195. No. 9. Pp. 4059–4066.
21. Schmidtchen A., et al. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* 2002. 46. Pp. 157–168.
22. Silhavy T. J., Kahne D., Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010 2 (5):a000414. DOI 10.1101/cshperspect.a000414.
23. Shelton C. L. Sap transporter mediated import and subsequent degradation of antimicrobial peptides in *Haemophilus*. *PLoS Pathog.* 2011 7(11):e1002360. DOI 10.1371/journal.ppat.1002360.
24. Svanevik C. S., Lunestad B.T., Levsen A. Effect of *Anisakis simplex* (sl) larvae on the spoilage rate and shelf-life of fish mince products under laboratory conditions. *Food Control.* 2014. No. 46. Pp. 121–126.
25. Tarr D. E. K. Distribution and characteristics of ABFs, cecropins, nemapores, and lysozymes in nematodes. *Dev. Comp. Immunol.* 2012. No. 36. Pp. 502–520.
26. Wardlaw A. C., Forsyth L. M., Crompton D. W. Bactericidal activity in the pig roundworm *Ascaris suum*. *J. Appl. Bacteriol.* 1994. No. 76. Pp. 36–41.
27. Zhang H., et al. In vitro antimicrobial properties of recombinant ASABF, an antimicrobial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. No. 44. Pp. 2701–2705.

References

1. Methodical instructions 4.2.1890-04. Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs, Methodical instructions, Moscow: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Russian Ministry of Health, 2004.
2. Volkova L. V., Grishina T. A., Volkov A. G. Low-molecular cationic peptides of leukocytes induced by various antigens. *Bulletin of Perm National Research Polytechnic University. Chemical technology and biotechnology.* 2015. No. 4. Pp. 35–48.

3. Sivkova T. N. Obtaining and characterization of helminths antigens: an educational-methodical manual Perm State Agricultural Academy. Perm: Publishing house of Perm State Agricultural Academy, 2009. – 14 p.
4. Sivkova T. N., Berezhko V. K. Karyopatic and pathomorphological action of metabolic products of anisakid larvae: monograph. Perm: Publishing house of Perm State Agricultural Academy, 2011. – 132 p.
5. Abner S. R., et al. *Trichuris suis*: detection of antibacterial activity in excretory-secretory products from adults. Exp. Parasitol. 2001. No. 99. Pp. 26–36.
6. Andersson M., Boman A., Boman H. H. *Ascaris* nematodes from pig and human make three antibacterial peptides: isolation of cecropin P1 and two ASABF peptides. Cell. Mol. Life Sci. 2003. No. 60. Pp. 599–606.
7. Audicana M. T., Kennedy M. W. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. Clin Microbiol. Rev. 2008. No. 21. Pp. 360–379.
8. Belas R., Manos J., Suvanasthi R. *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. Infect. Immun. 2004. No. 72. Pp. 5159–5167.
9. Delmar J. A., Su C. C., Yu E. W. Bacterial multidrug efflux transporters. Annu. Rev. Biophys. 2014. No. 43. Pp. 93–117.
10. Drake L., et al. The major secreted product of the whipworm, *Trichuris*, is a pore-forming protein. Proc. Biol. Sci. 1994. No. 257. Pp. 255–261.
11. Eberle R., et al. Isolation, identification and functional profile of excretory-secretory peptides from *Onchocerca ochengi*. Acta Trop. 2015. No. 142. Pp. 156–166.
12. Fæste C. K., et al. Characterisation of potential novel allergens in the fish parasite *Anisakis simplex*. EuPA Open Proteomics. 2014. No. 4. Pp. 140–155.
13. Fæste C. K. Fish feed as source of potentially allergenic peptides from the fish parasite *Anisakis simplex* (S.L.). Animal feed science and technology. Elsevier Science Publishing Company, Inc. 2015. No. 202. Pp. 52–61.
14. Haarder S., et al. Effect of ES products from *Anisakis* (Nematoda: Anisakidae) on experimentally induced colitis in adult zebra fish. Parasite Immunol. 2017. Vol. 39, I. 10. DOI 10.1111/pim.12456.
15. Joo H. S., Fu C. I., Otto M. Bacterial strategies of resistance to antimicrobial peptides. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2016. No. 26. 371 (1695). Pp. 1–11. DOI 10.1098/rstb.2015.0292.
16. Kato Y. Humoral defense of the nematode *Ascaris suum*: antibacterial, bacteriolytic and agglutinating activities in the body fluid. Zool. Sci. 1995. No. 12. Pp. 225–230.
17. Mehrdana F., Buchmann K. Excretory/secretory products of anisakid nematodes: biological and pathological roles. Acta Veterinaria Scandinavica. 2017. No. 59:42. Pp. 1–12. DOI 10.1186/s13028-017-0310-3.
18. Midha A., Schlosser J., Hartmann S. Reciprocal Interactions between Nematodes and Their Microbial Environments. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2017. Vol. 7:144. Pp. 1–20. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00144.
19. Peschel A., et al. Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor Mpr F is based on modification of membrane lipids with L-lysine. J. Exp. Med. 2001. No. 193. Pp. 1067–1076.
20. Reynolds L. A., Finlay B. B., Maizels R. M. Cohabitation in the intestine: interactions between helminth parasites, bacterial microbiota and host immunity. Journal of immunology. 2015. 195. No. 9. Pp. 4059–4066.
21. Schmidtchen A., et al. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. Mol. Microbiol. 2002. 46. Pp. 157–168.
22. Silhavy T. J., Kahne D., Walker S. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2010 2 (5):a000414. DOI 10.1101/cshperspect.a000414.
23. Shelton C. L. Sap transporter mediated import and subsequent degradation of antimicrobial peptides in Haemophilus. PLoS Pathog. 2011 7(11):e1002360. DOI 10.1371/journal.ppat.1002360.
24. Svanevik C. S., Lunestad B.T., Levsen A. Effect of *Anisakis simplex* (sl) larvae on the spoilage rate and shelf-life of fish mince products under laboratory conditions. Food Control. 2014. No. 46. Pp. 121–126.
25. Tarr D. E. K. Distribution and characteristics of ABFs, cecropins, nemapores, and lysozymes in nematodes. Dev. Comp. Immunol. 2012. No. 36. Pp. 502–520.
26. Wardlaw A. C., Forsyth L. M., Crompton D. W. Bactericidal activity in the pig roundworm *Ascaris suum*. J. Appl. Bacteriol. 1994. No. 76. Pp. 36–41.
27. Zhang H., et al. In vitro antimicrobial properties of recombinant ASABF, an antimicrobial peptide isolated from the nematode *Ascaris suum*. Antimicrob. Agents Chemother. 2000. No. 44. Pp. 2701–2705.