

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-94-99

УДК 616.98:579.861.2

А.В. Еремкин, С.С. Ипатов, Г.В. Куклина, Д.В. Печенкин, А.А. Кытманов, О.В. Тихвинская,
С.Л. Кузнецов, А.С. Горшков, Н.Г. Хапаев

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ И ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СТАФИЛОКОККОВЫХ ЭНТЕРОТОКСИНОВ ТИПОВ А И В

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Киров,
Российская Федерация

Цель. Создание экспериментальных образцов иммуноферментных тест-систем и иммунохроматографических наборов реагентов для выявления стафилококковых энтеротоксинов типов А и В. **Материалы и методы.** В работе использованы гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к стафилококковым энтеротоксинам типов А и В, полученные в филиале ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров); мыши линии BALB/c; стафилококковые энтеротоксины типов А и В. Клетки гибридом культивировали в культуральных флаконах и в перитонеальной полости мышей линии BALB/c. Моноклональные антитела выделяли из асцитических жидкостей путем осаждения насыщенным раствором сульфата аммония с последующей очисткой ионообменной хроматографией. Полученные препараты моноклональных антител использовали для конструирования иммуноферментных тест-систем и иммунохроматографических наборов реагентов для выявления стафилококковых энтеротоксинов типов А и В. Специфические компоненты иммуноферментных тест-систем подвергали сублимационному высушиванию в защитной среде. **Результаты и обсуждение.** Сконструированы иммуноферментные тест-системы и иммунохроматографические наборы реагентов, позволяющие выявлять стафилококковые энтеротоксины типов А и В в концентрациях 0,5 нг/мл и более, в том числе в пробах продуктов питания.

Ключевые слова: стафилококковые энтеротоксины, иммуноферментные тест-системы, иммунохроматографические наборы реагентов.

Корреспондирующий автор: Печенкин Денис Валериевич, e-mail: 23527@mil.ru.

Для цитирования: Еремкин А.В., Ипатов С.С., Куклина Г.В., Печенкин Д.В., Кытманов А.А., Тихвинская О.В., Кузнецов С.Л., Горшков А.С., Хапаев Н.Г. Разработка иммуноферментных тест-систем и иммунохроматографических наборов реагентов, предназначенных для выявления стафилококковых энтеротоксинов типов А и В. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:94–99. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-94-99

Поступила 23.09.2020. Принята к публ. 30.10.2020.

A.V. Eremkin, S.S. Ipatov, G.V. Kuklina, D.V. Pechenkin, A.A. Kytmanov, O.V. Tikhvinskaya,
S.L. Kuznetsov, A.S. Gorshkov, N.G. Khapaev

Development of ELISA Test-Systems and Immune-Chromatographic Reagent Panel Designed for the Detection of Staphylococcal Enterotoxins of A and B Types

Affiliated Branch of the Federal State Budgetary Institution “48th Central Research Institute” of the Ministry of Defense
of the Russian Federation, Kirov, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was the development of experimental ELISA tests and lateral flow immunoassays for detection of staphylococcal enterotoxins, A and B types. **Materials and methods.** Hybridomas, producing monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxins A and B from State Collection of the Affiliated Branch of the “48th Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation, BALB/c mice and staphylococcal enterotoxins A and B were used in the research. Hybridoma cells were incubated in culture flasks and in the peritoneal cavity of BALB/c mice. Monoclonal antibodies were isolated from ascitic fluids through precipitation with saturated ammonium sulfate subsequently purified using ion-exchange chromatography. Obtained preparations of monoclonal antibodies were used for the construction of ELISA tests and immune-chromatographic reagent panels for the detection of staphylococcal enterotoxins A and B. Specific components of ELISA tests were lyophilized in protective media. **Results and discussion.** ELISA tests and lateral flow immunoassays which allow for detecting staphylococcal enterotoxins A and B at concentrations of 0.5 ng/ml and higher, including in food samples, have been constructed.

Key words: staphylococcal enterotoxins, ELISA tests, immune-chromatographic reagent panels.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Denis V. Pechenkin, e-mail: 23527@mil.ru.

Citation: Eremkin A.V., Ipatov S.S., Kuklina G.V., Pechenkin D.V., Kytmanov A.A., Tikhvinskaya O.V., Kuznetsov S.L., Gorshkov A.S., Khapaev N.G. Development of ELISA Test-Systems and Immune-Chromatographic Reagent Panel Designed for the Detection of Staphylococcal Enterotoxins of A and B Types. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 2:94–99. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-94-99

Received 23.09.2020. Accepted 30.10.2020.

Eremkin A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3133-1921>
Ipatov S.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2881-4730>
Kuklina G.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5429-6295>
Pechenkin D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8277-3573>
Kytmanov A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0277-2226>

Tikhvinskaya O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8368-9648>
Kuznetsov S.L., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2705-8774>
Gorshkov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5164-3645>
Khapaev N.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9201-9803>

Пищевые токсикоинфекции (ПТИ) относятся к группе острых кишечных инфекций и представляют собой полиэтиологическую группу острых инфекционных заболеваний, возникающих при попадании в организм человека с пищей или жидкостью условно-патогенных бактерий и/или их токсинов.

Из широкого круга возбудителей ПТИ особое место занимает *Staphylococcus aureus*, штаммы которого продуцируют ряд энтеротоксинов (А, В, С, D, Е и др.) [1]. Отравление стафилококковыми энтеротоксинами происходит при употреблении в пищу зараженных молочных продуктов, молока, мяса животных и птиц, рыбы и других пищевых продуктов [2]. Симптомы отравления проявляются в интервале от получаса до 6 ч после заражения. Выздоровление обычно наступает в течение 24–48 ч [3]. Случаи стафилококковых отравлений носят спорадический характер, зачастую не регистрируются и, как правило, связаны с пунктами общественного питания [4, 5].

Накопление стафилококковых энтеротоксинов в продуктах питания обусловлено их инфицированием во время хранения или приготовления пищи ввиду широкого распространения энтеротоксигенных штаммов стафилококка в окружающей среде [5, 6]. При комнатной температуре энтеротоксины образуются примерно через 8 ч по достижении концентрации стафилококка 10^5 КОЕ на 1 г продукта, что примерно соответствует завершению логарифмической фазы роста [7]. Высокая резистентность энтеротоксинов к физическим факторам (устойчивость в широком диапазоне значений pH, способность выдерживать кипячение до 30 мин) приводит к тому, что большинство методов приготовления пищи не позволяют полностью избавиться от содержащихся в ней стафилококковых энтеротоксинов [5].

Наибольшую значимость среди стафилококковых энтеротоксинов имеют энтеротоксины типов А и В (SEA и SEB). Из них SEA занимает доминирующую позицию по частоте вызываемых пищевых отравлений [8, 9]. Данные о минимальной дозе стафилококковых энтеротоксинов, вызывающей интоксикацию у человека, значительно различаются [10, 11]. По данным одних исследований, токсичной является доза 3,5–4,0 мкг [12]. По сведениям других авторов, интоксикацию может вызвать попадание энтеротоксина в количестве: 0,1–0,2 мкг с молоком и молочными продуктами, 2 мкг с сыром, 6 мкг с другими продуктами [13–15].

К методам выявления стафилококковых энтеротоксинов и их продуцентов относятся иммунохимические, молекулярно-генетические и биологические методы. Биологические методы предполагают использование животных моделей и характеризуются низкой точностью и трудоемкостью [16]. Молекулярно-генетические методы подходят только для выявления генов, кодирующих синтез энтеротоксинов, у штаммов стафилококков, выделенных у пострадавших от пищевых отравлений или из пищевых продуктов [17]. Иммунохимические методы

являются наиболее чувствительными, быстрыми и достоверными для обнаружения стафилококковых энтеротоксинов. Среди них наибольшее распространение получили иммуоферментный (ИФА) и иммунохроматографический (ИХА) методы анализа [10].

В Российской Федерации (РФ) анализ пищевых продуктов на наличие стафилококковых энтеротоксинов регламентирован методическими указаниями МУК 4.2.2429-08 «Метод определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах» и дополнением к ним (МУК 4.2.2879-11). Согласно данным МУК, в России для выявления стафилококковых энтеротоксинов применяют наборы реагентов RIDASCREEN® SET A, B, C, D, E и SET Total (R-Biopharm, Германия), а также наборы реагентов VIDAS® Staph enterotoxin II (SET2) (BioMerieux, Франция). Они позволяют производить дифференцированное и недифференцированное определение энтеротоксинов типов А, В, С, D и Е и обладают чувствительностью 0,25 нг/мл.

В России на данный момент отсутствуют отечественные средства для выявления стафилококковых энтеротоксинов, а перечень проводимых работ в этом направлении крайне ограничен. Учитывая вышеизложенное, а также тот факт, что среди стафилококковых энтеротоксинов наиболее значимыми являются энтеротоксины А и В, на долю которых приходится большая часть пищевых отравлений, **целью** наших исследований являлось конструирование лабораторно-экспериментальных образцов иммуоферментных тест-систем (ИФТС) и иммунохроматографических наборов реагентов (ИХНР) для выявления SEA и SEB.

Материалы и методы

Для получения препаратов моноклональных антител (МКАТ) к SEA использовали культуры гибридом 328F8F5 и 329A11F6, а для получения МКАТ к SEB – культуры гибридом 357A8C1 и 357E10E9. Гибридные клеточные линии получены ранее в филиале ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров). Нарботку гибридных клеток осуществляли в культуральных флаконах T25 (TPP, Швеция) в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), содержащей 10 % фетальной телячьей сыворотки (Gibco, Германия). Клетки гибридом вводили мышам линии BALB/c внутрибрюшинно в дозах от 1 до 2 млн клеток. Мышам-реципиентам за 10 дней до инокуляции культур в брюшную полость вводили по 0,5 мл пристана (Sigma-Aldrich, США). В случае развития у мышей выраженного асцита производили забор перитонеального экссудата.

Иммуноглобулины из асцитических жидкостей выделяли путем высаливания насыщенным 40 % раствором сульфата аммония. Очистку иммуноглобулинов осуществляли методом ионообменной хроматографии на колонке с DEAE Toyopearl (Tosoh

Bioscience, США). Специфическую активность МКАТ к стафилококковым энтеротоксинам определяли методом непрямого ИФА.

Синтез конъюгатов иммуноглобулинов с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) осуществляли по методу Р.К. Nakane и А. Kawaoui [18]. Рабочее разведение конъюгатов определяли методом «шахматного титрования» [19]. Иммунологически активные компоненты ИФТС лиофильно высушивали в защитной среде, содержащей 5 % сахарозы.

Наночастицы коллоидного золота (НЧКЗ) получали по методу Френса [20]. Для приготовления конъюгата растворы МКАТ и НЧКЗ смешивали и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем в смесь добавляли 4 % раствор ПЭГ-40000, перемешивали и инкубировали еще 15 мин при комнатной температуре.

Конъюгат осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин. К осадку добавляли стабилизирующий буферный раствор до исходного объема и ресуспендировали. Процедуру отмывки повторяли 2 раза. Конъюгат наносили на подложку для конъюгата GFSP 103000 (Millipore, США). На нитроцеллюлозной мембране TYPE-CNPF-SN12 (MDI, Индия) формировали тестовую и контрольную зону путем нанесения МКАТ к стафилококковым энтеротоксинам и антимышиных кроличьих антител. Подложки с нанесенным конъюгатом и готовые рабочие мембраны сушили в вакууме при 40 °C.

Для оценки чувствительности разработанных ИФТС и ИХНР использовали различные концентрации SEA и SEB. Изучение специфичности проводили в отношении токсина синдрома токсического шока (TSST-1), шигаподобных токсинов I и II типов (Stx1 и Stx2), ботулинического токсина типа А (БТА) и холерного токсина (ХТ).

Оценку воспроизводимости результатов анализа, обеспечиваемых ИФТС и ИХНР, проводили путем исследования 20 повторностей образцов соответствующих стафилококковых энтеротоксинов в минимальных выявляемых концентрациях.

Выявление SEA и SEB в жидких и твердых пищевых продуктах проводили с использованием разработанных ИФТС и ИХНР согласно инструкциям по их применению. Для исследования чувствительности ИФТС и ИХНР к серии проб молока (2,7 % жирность, ГОСТ 31450-2013) и сыра (50 % жир-

ность, ГОСТ 11041-88) добавляли препараты очищенных SEA и SEB до конечных концентраций энтеротоксинов 20, 10, 5, 2, 1, 0,5 и 0,25 нг/мл (1 нг на 1 г продукта в случае сыра). Подготовку проб молока и сыра, содержащих энтеротоксины, осуществляли в соответствии с МУК 4.2.2429-08, пункт 6.2.1 (б, в) – «экстракция стафилококковых энтеротоксинов из сыров» и «экстракция стафилококковых энтеротоксинов из жидких продуктов и сухих молочных продуктов».

В качестве положительных контрольных образцов (К+) использовали препараты очищенных SEA и SEB. Отрицательными контрольными образцами (К-) служили пробы молока и сыра без добавления стафилококковых энтеротоксинов.

На этапах работы с животными исследования соответствовали международным этическим нормам, законодательству Российской Федерации и нормативным документам учреждения.

Результаты и обсуждение

В серии предварительных экспериментов установлено, что наибольшую чувствительность ИФА при выявлении SEA и SEB обеспечивают сочетания МКАТ 329A11F6-328F8F5 и 357A8C1-357E10E9, используемые соответственно для сенсibilизации планшетов и для синтеза иммунопероксидазных конъюгатов. Указанные МКАТ наработаны *in vitro* и *in vivo*. Иммуноглобулины из асцитических жидкостей выделены и очищены методом ионообменной хроматографии. Полученные препараты МКАТ характеризовались титрами антител в ИФА от 1:2500000 и выше и содержанием белка 7,8 мг/мл и более (табл. 1).

Полученные препараты МКАТ использовались для изготовления лабораторно-экспериментальных образцов ИФТС и ИХНР для выявления SEA и SEB. МКАТ 329A11F6 и 357A8C1 использовались для сенсibilизации планшетов и формирования тестовых зон на нитроцеллюлозной мембране; МКАТ 328F8F5 и 357E10E9 – для синтеза иммунопероксидазных конъюгатов и конъюгатов антител с НЧКЗ.

Результаты оценки чувствительности и специфичности разработанных лабораторно-экспериментальных образцов ИФТС и ИХНР для выявления SEA представлены в табл. 2.

Таблица 1 / Table 1

Характеристики препаратов моноклональных антител к стафилококковым энтеротоксинам типов А и В

Characteristics of monoclonal antibodies against staphylococcal enterotoxins of A and B types

Наименование препарата МКАТ Name of monoclonal antibodies (MCAb) preparation	Специфичность МКАТ Specificity of MCAb	Специфическая активность в ИФА, титр антител Specific activity in ELISA, antibody titer	Концентрация белка, мг/мл Protein concentration, mg/ml
328F8F5	SEA	1:5000000	10,0
329A11F6		1:5000000	7,8
357A8C1	SEB	1:2500000	9,3
357E10E9		1:5000000	12,0

Таблица 2 / Table 2

Чувствительность и специфичность лабораторно-экспериментальных образцов иммуноферментных тест-систем и иммунохроматографических наборов реагентов для выявления стафилококкового энтеротоксина типа А
Sensitivity and specificity of laboratory-experimental samples of ELISA test-systems and immunochromatographic reagent kits for the detection of type A staphylococcal enterotoxin

Наименование токсина Toxin name	Минимальная выявляемая концентрация токсина (нг/мл, n=5) при использовании Minimum detectable concentration of toxin (ng/ml, n=5), when using	
	ИФТС ELISA test-system	ИХНР immune-chromatographic reagent panel
SEA	0,5	10,0
SEB	>10000	>10000
TSST-1	>10000	>10000
Stx1	>100000	>100000
Stx2	>100000	>100000
БТА/botulinic toxin A	>100000	>100000
ХТ/cholera toxin	>100000	>100000

Примечания: в таблице представлены медианы минимальных выявляемых концентраций; n – количество определений.

Note: the table shows the medians of the minimum detectable concentrations; n – the number of measurements.

Таблица 3 / Table 3

Чувствительность и специфичность лабораторно-экспериментальных образцов иммуноферментных тест-систем и иммунохроматографических наборов реагентов для выявления стафилококкового энтеротоксина типа В
Sensitivity and specificity of laboratory-experimental samples of ELISA test-systems and immunochromatographic reagent kits for the detection of type B staphylococcal enterotoxin

Наименование токсина Toxin name	Минимальная выявляемая концентрация токсина (нг/мл, n=5) при использовании Minimum detectable concentration of toxin (ng/ml, n=5), when using	
	ИФТС ELISA test-system	ИХНР Immune-chromatographic reagent panel
SEB	0,5	1,0
SEA	>10000	>10000
TSST-1	>10000	>10000
Stx1	>100000	>100000
Stx2	>100000	>100000
БТА/botulinic toxin A	>100000	>100000
ХТ/cholera toxin	>100000	>100000

Примечания: в таблице представлены медианы минимальных выявляемых концентраций; n – количество определений.

Note: the table shows the medians of the minimum detectable concentrations; n – the number of measurements.

Таблица 4 / Table 4

Чувствительность лабораторно-экспериментальных образцов иммуноферментных тест-систем и иммунохроматографических наборов реагентов при выявлении стафилококковых энтеротоксинов А и В в пищевых продуктах
Sensitivity of laboratory and experimental samples of ELISA test-systems and immunochromatographic reagent kits for the detection of staphylococcal enterotoxins A and B in food

Наименование средств иммуноанализа Type of immune test	Минимальная выявляемая концентрация (нг/мл) стафилококковых энтеротоксинов при исследовании различных проб (n=5) Minimum detectable concentration (ng/ml) of staphylococcal enterotoxins when investigating different samples (n=5)							
	SEA (K+)	SEB (K+)	сыр + SEA cheese + SEA	сыр + SEB cheese + SEB	сыр (K-) cheese (K-)	молоко + SEA milk + SEA	молоко + SEB milk + SEB	молоко (K-) milk (K-)
ИФТС для выявления SEA ELISA test-systems for SEA detection	0,5	>10000	0,5	>10000	–	0,5	>10000	–
ИФТС для выявления SEB ELISA test-systems for SEB detection	>10000	0,5	>10000	0,5	–	>10000	0,5	–
ИХНР для выявления SEA Immune-chromatographic reagent kits for SEA detection	10	>10000	10	>10000	–	10	>10000	–
ИХНР для выявления SEB Immune-chromatographic reagent kits for SEB detection	>10000	1	>10000	1	–	>10000	1	–

Примечания: в таблице представлены медианы минимальных выявляемых концентраций; n – количество определений; «–» – отрицательный результат анализа.

Note: the table presents the medians of the minimum detectable concentrations; n – the number of measurements; “–” – negative test results.

Результаты оценки чувствительности и специфичности разработанных ИФТС и ИХНР для выявления SEB представлены в табл. 3.

Лабораторно-экспериментальные образцы ИФТС обеспечивают выявление SEA и SEB в концентрации 0,5 нг/мл и более, лабораторно-экспериментальные серии ИХНР обеспечивают выявление SEA и SEB с порогом чувствительности 10 нг/мл и 1 нг/мл соответственно. Разработанные ИФТС и ИХНР не дают взаимных перекрестных реакций при исследовании SEA и SEB, а также TSST-1 в концентрации 10 мкг/мл и ложноположительных результатов при исследовании гетерологичных токсинов в концентрации 100 мкг/мл и обеспечивают 100 % воспроизводимость результатов анализа.

Исследования по выявлению SEA и SEB в продуктах питания с использованием ИФТС и ИХНР показали, что разработанные средства иммуноанализа сохраняют свои диагностические характеристики при анализе проб, содержащих стафилококковые энтеротоксины, и не дают ложноположительных результатов при исследовании отрицательных контрольных образцов (табл. 4).

Таким образом, в ходе проведенных исследований наработаны МКАТ *in vivo*, из полученных асцитических жидкостей выделены и очищены иммуноглобулины, на основе которых сконструированы ИФТС и ИХНР для выявления SEA и SEB. Изготовленные лабораторно-экспериментальные образцы ИФТС позволяют выявлять SEA и SEB в концентрации 0,5 нг/мл и более, в то время как ИХНР обладают чувствительностью при выявлении SEA и SEB 10 нг/мл и 1 нг/мл соответственно. Разработанные лабораторно-экспериментальные ИФТС и ИХНР перспективны для последующей регистрации в качестве медицинских изделий для диагностики *in vitro*.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Pinchuk I.V., Beswick E.J., Reyes V.E. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins*. 2010; 2(8):2177–97. DOI: 10.3390/toxins 2082177.
2. Tamarapu S., McKillip J.L., Drake M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J. Food Prot.* 2001; 64(5):664–8. DOI: 10.4315/0362-028x-64.5.664.
3. Hu D.-L., Nakane A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. *Eur. J. Pharmacol.* 2014; 722:95–107. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.08.050.
4. Ercoli L., Gallina S., Nia Y., Auvray F., Primavilla S., Guidi F., Pierucci B., Graziotti C., Decastelli L., Scuota S. Investigation of a staphylococcal food poisoning outbreak from a Chantilly cream dessert, in Umbria (Italy). *Foodborne Pathog. Dis.* 2017; 14(7):407–13. DOI: 10.1089/fpd.2016.2267.
5. Mossong J., Decruyenaere F., Moris G., Ragimbeau C., Olinger C.M., Johler S., Perrin M., Hau P., Weicherding P. Investigation of a staphylococcal food poisoning outbreak combining case-control, traditional typing and whole genome sequencing methods, Luxembourg, June 2014. *Euro Surveill.* 2015; 20(45):pii=30059. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.45.30059.
6. Gill D.M. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol. Rev.* 1982; 46(1):86–94.
7. Ostyn A., Guillier F., Pruffer A.-L., Papinaud I., Messio S., Krys S., Lombard B., Hennekinne J.-A. Intra-laboratory validation of

the Ridascreen SET Total kit for detecting staphylococcal enterotoxins SEA to SEE in cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 2011; 52(5):468–74. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03025.x.

8. Veras J.F., do Carmo L.S., Tong L.C., Shupp J.W., Cummings C., Dos Santos D.A., Cerqueira M.M.O.P., Cantini A., Nicoli J.R., Jett M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* 2008; 12(4):410–5. DOI: 10.1016/j.ijid.2007.09.018.

9. Fries B.C., Varshney A.K. Bacterial toxins-staphylococcal enterotoxin B. *Microbiol. Spectr.* 2013; 1(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.AID-0002-2012.

10. Любавина И.А., Бровко Ф.А., Валякина Т.И., Вертиев Ю.В., Гришин Е.В. Методы экспресс-анализа стафилококкового энтеротоксина А в продуктах питания. *Биоорганическая химия*. 2014; 40(2):186–95. DOI: 10.7868/S0132342314020109.

11. Levine W.C., Bennett R.W., Choi Y., Henning K.J., Rager J.R., Hendricks K.A., Hopkins D.P., Gunn R.A., Griffin P.M. Staphylococcal food poisoning caused by imported canned mushrooms. *J. Infect. Dis.* 1996; 173(5):1263–7. DOI: 10.1093/infdis/173.5.1263.

12. Bergdoll M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle M.P., editor. Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1989. P. 463–523.

13. Asao T., Kumeda Y., Kawai T., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H., Kozaki S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 2003; 130(1):33–40. DOI: 10.1017/S0950268802007951.

14. Evenson M., Hinds M., Bernstein R., Bergdoll M. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* 1988; 7:311–6.

15. Do Carmo L.S., Cummings C., Linardi V.R., Dias R.S., De Souza J.M., De Sena M.J., Dos Santos D.A., Shupp J.W., Pereira R.K., Jett M. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. *Foodborne Pathog. Dis.* 2004; 1(4):241–6. DOI: 10.1089/fpd.2004.1.241.

16. Флюер Ф.С. Методы определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах. *Вопросы питания*. 2010; 79(1):66–73.

17. Boerema J.A., Clements R., Brightwell G. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* 2006; 107(2):192–201. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.008.

18. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–91. DOI: 10.1177/22.12.1084.

19. Кэтти Д., редактор. Антитела. Методы: Кн. 1: пер. с англ. М.: Мир; 1991. 287 с.

20. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science.* 1973; 241(105):20–2. DOI: 10.1038/PHYSCI241020A0.

References

1. Pinchuk I.V., Beswick E.J., Reyes V.E. Staphylococcal Enterotoxins. *Toxins*. 2010; 2(8):2177–97. DOI: 10.3390/toxins 2082177.
2. Tamarapu S., McKillip J.L., Drake M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. *J. Food Prot.* 2001; 64(5):664–8. DOI: 10.4315/0362-028x-64.5.664.
3. Hu D.-L., Nakane A. Mechanisms of staphylococcal enterotoxin-induced emesis. *Eur. J. Pharmacol.* 2014; 722:95–107. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.08.050.
4. Ercoli L., Gallina S., Nia Y., Auvray F., Primavilla S., Guidi F., Pierucci B., Graziotti C., Decastelli L., Scuota S. Investigation of a staphylococcal food poisoning outbreak from a Chantilly cream dessert, in Umbria (Italy). *Foodborne Pathog. Dis.* 2017; 14(7):407–13. DOI: 10.1089/fpd.2016.2267.
5. Mossong J., Decruyenaere F., Moris G., Ragimbeau C., Olinger C.M., Johler S., Perrin M., Hau P., Weicherding P. Investigation of a staphylococcal food poisoning outbreak combining case-control, traditional typing and whole genome sequencing methods, Luxembourg, June 2014. *Euro Surveill.* 2015; 20(45):pii=30059. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2015.20.45.30059.
6. Gill D.M. Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol. Rev.* 1982; 46(1):86–94.
7. Ostyn A., Guillier F., Pruffer A.-L., Papinaud I., Messio S., Krys S., Lombard B., Hennekinne J.-A. Intra-laboratory validation of the Ridascreen SET Total kit for detecting staphylococcal enterotoxins SEA to SEE in cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 2011; 52(5):468–74. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2011.03025.x.
8. Veras J.F., do Carmo L.S., Tong L.C., Shupp J.W., Cummings C., Dos Santos D.A., Cerqueira M.M.O.P., Cantini A., Nicoli J.R.,

- Jett M. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *Int. J. Infect. Dis.* 2008; 12(4):410–5. DOI: 10.1016/j.ijid.2007.09.018.
9. Fries B.C., Varshney A.K. Bacterial toxins-staphylococcal enterotoxin B. *Microbiol. Spectr.* 2013; 1(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.AID-0002-2012.
10. Lubavina I.A., Brovko F.A., Valyakina T.I., Vertiev Yu.V., Grishin E.V. [Methods of express analysis of staphylococcal enterotoxin A in food products]. *Bioorganicheskaya Khimiya. [Bioorganic Chemistry]*. 2014; 40(2):186–95. DOI: 10.7868/S0132342314020109.
11. Levine W.C., Bennett R.W., Choi Y., Henning K.J., Rager J.R., Hendricks K.A., Hopkins D.P., Gunn R.A., Griffin P.M. Staphylococcal food poisoning caused by imported canned mushrooms. *J. Infect. Dis.* 1996; 173(5):1263–7. DOI: 10.1093/infdis/173.5.1263.
12. Bergdoll M.S. Staphylococcus aureus. In: Doyle M.P., editor. Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1989. P. 463–523.
13. Asao T., Kumeda Y., Kawai T., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H., Kozaki S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol. Infect.* 2003; 130(1):33–40. DOI: 10.1017/s0950268802007951.
14. Evenson M., Hinds M., Bernstein R., Bergdoll M. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* 1988; 7:311–6.
15. Do Carmo L.S., Cummings C., Linardi V.R., Dias R.S., De Souza J.M., De Sena M.J., Dos Santos D.A., Shupp J.W., Pereira R.K., Jett M. A case study of a massive staphylococcal food poisoning incident. *Foodborne Pathog. Dis.* 2004; 1(4):241–6. DOI: 10.1089/fpd.2004.1.241.
16. Fluer F.S. Methods of detection of staphylococcal enterotoxins in food products. *Voprosy Pitaniya. [Problems of Nutrition]*. 2010; 79(1):66–73.
17. Boerema J.A., Clements R., Brightwell G. Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of Staphylococcus aureus. *Int. J. Food Microbiol.* 2006; 107(2):192–201. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.008.
18. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–91. DOI: 10.1177/22.12.1084.
19. Ketty D, editor. [Antibodies, Methods]. Translated from English. Moscow: Mir, 1991. Vol. 1. 287 p.
20. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science.* 1973; 241(105):20–2. DOI: 10.1038/PHYSCI241020A0.

Authors:

Eremkin A.V., Ipatov S.S., Kuklina G.V., Pechenkin D.V., Kytmanov A.A., Tikhvinskaya O.V., Kuznetsov S.L., Gorshkov A.S., Khapaev N.G. Affiliated Branch of the Federal State Budgetary Institution “48th Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Kirov, Russian Federation. E-mail: 23527@mil.ru.

Об авторах:

Еремкин А.В., Ипатов С.С., Куклина Г.В., Печенкин Д.В., Кытманов А.А., Тихвинская О.В., Кузнецов С.Л., Горшков А.С., Хапаев Н.Г. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, Киров. E-mail: 23527@mil.ru.