

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-83-88

УДК 616.98:579.842.15

Г.В. Куклина, С.С. Ипатов, Д.В. Печенкин, А.В. Еремкин, А.А. Кытманов, М.Ю. Дубровин,
А.С. Горшков**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ГИБРИДОМ-ПРОДУЦЕНТОВ
МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ШИГАПОДОБНЫМ ТОКСИНАМ I И II ТИПОВ**Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Киров,
Российская Федерация

Цель – получить и охарактеризовать гибридомы-продуценты моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов. **Материалы и методы.** В работе использованы препараты шигаподобных токсинов I и II типов, полученные в филиале ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров); мыши линии BALB/c; клетки миеломы SP2/0-Ag14. Гибридизацию спленоцитов иммунных мышей и миеломных клеток проводили по методике G. Kohler и C. Milstein в модификации De St. Fazekas и D. Scheidegger с использованием 50 % полиэтиленгликоля. Гибридные клеточные линии, продуцирующие специфические моноклональные антитела, клонировали методом лимитирующих разведений. Изучение ростовых и секреторных свойств гибридом проводили при культивировании *in vitro* и *in vivo*. Специфическую активность иммунных сывороток, культуральных и асцитических жидкостей гибридом исследовали методом непрямого иммуноферментного анализа. Моноклональные антитела из асцитических жидкостей выделяли осаждением сульфатом аммония с последующей очисткой ионообменной хроматографией. **Результаты и обсуждение.** Получена панель из 8 гибридом-продуцентов моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов. Гибридомы характеризуются стабильностью пролиферативной и антителопродуцирующей активности на протяжении десяти пассажей *in vitro* и трех пассажей *in vivo* (срок наблюдения). Полученные моноклональные антитела могут быть использованы для детекции иммуноферментным методом шигаподобных токсинов I и II типов. При этом минимальная выявляемая концентрация искомым анализом в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа составила 1 нг/мл. Показана возможность выявления шигаподобных токсинов без типовой дифференциации при использовании в иммуноферментном анализе полирецепторной смеси моноклональных антител для сенсibilизации планшета и полиспецифичной смеси иммунопероксидазных конъюгатов.

Ключевые слова: шигаподобные токсины, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ.

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

Для цитирования: Куклина Г.В., Ипатов С.С., Печенкин Д.В., Еремкин А.В., Кытманов А.А., Дубровин М.Ю., Горшков А.С. Получение и характеристика гибридом-продуцентов моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:83–88. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-83-88.

Поступила 23.09.2020. Отправлена на доработку 20.10.2020. Принята к публ. 30.10.2020.

G.V. Kuklina, S.S. Ipatov, D.V. Pechenkin, A.V. Eremkin, A.A. Kytmanov, M.Yu. Dubrovin,
A.S. Gorshkov**Obtaining and Characterization of Hybridomas Producing Monoclonal Antibodies
to Shiga-Like Toxins of I and II 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 – obtaining and characterization of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against I and II types of shiga-like toxins. **Materials and methods.** Shiga-like toxins obtained in “48th Central Research Institute” of Ministry of Defense of Russian Federation (Kirov), BALB/c mice, myeloma cells SP2/0-Ag14 were used in research. Immune splenocytes and SP2/0-Ag14 myeloma cells were fused according to G. Kohler and C. Milstein method in De St. Fazekas and D. Scheidegger modification using 50 % polyethylene glycol. Hybrid cell lines producing specific monoclonal antibodies were cloned by limited dilutions. Hybridomas growth and producing properties were studied *in vitro* and *in vivo*. Specific activity of immune sera, culture and ascitic fluids were studied by indirect ELISA. Monoclonal antibodies from ascitic fluids were precipitated by saturated ammonium sulfate, followed by ion exchange chromatography. **Results and discussion.** 8 hybridomas producing monoclonal antibodies against I and II types shiga-like toxins were obtained. Hybridomas are characterized by stable proliferation and antibody-producing activity during 10 passages *in vitro* and 3 passages *in vivo* (observation period). Obtained monoclonal antibodies can be used for ELISA detection of I and II types shiga-like toxins. Minimum detectable concentration of shiga-like toxins in sandwich ELISA is 1 ng/ml. The possibility of detecting shiga-like toxins without typical differentiation was shown when using in the enzyme immunoassay a polyreceptor mixture of monoclonal antibodies for sensitizing the plate and a polyspecific mixture of immunoperoxidase conjugates.

Key words: shiga-like toxins, monoclonal antibodies, and enzyme linked immunosorbent assay.

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

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

Citation: Kuklina G.V., Ipatov S.S., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A., Dubrovin M.Yu., Gorschkov A.S. Obtaining and Characterization of Hybridomas Producing Monoclonal Antibodies to Shiga-Like Toxins of I and II Types. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:83–88. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-83-88.

Received 23.09.2020. Revised 20.10.2020. Accepted 30.10.2020.

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

Kytmanov A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0277-2226>
Dubrovin M.Y., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9171-1603>
Gorshkov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5164-3645>

Одной из наиболее значимых групп бактериальных токсинов является семейство шигаподобных токсинов (Stx), которое включает шигеллезный токсин, продуцируемый *Shigella dysenteriae*, а также шигаподобные токсины I и II типов (Stx1 и Stx2). Основными природными продуцентами Stx1 и Stx2 являются шигатоксинпродуцирующие штаммы *Escherichia coli* (STEC) [1].

Представители семейства Stx имеют сходную молекулярную структуру, для которой характерно наличие одной субъединицы А (~32 кДа) и пяти субъединиц В (~7,7 кДа каждая). В субъединице А выделяют также связанные между собой дисульфидной связью фрагменты А1 и А2, которые разделяются после проникновения в клетку-мишень, после чего фрагмент А1 блокирует синтез белка в клетке [2].

Клинически для инфекционного процесса, вызванного STEC, характерно развитие диареи с явлениями геморрагического колита [3, 4]. Примерно в 5 % случаев колиту сопутствует системный гемолиз, что приводит к развитию гемолитико-уремического синдрома. Особенно высокий уровень летальности при этом наблюдается у новорожденных детей [5]. Отмечено, что наиболее часто гемолитико-уремический синдром ассоциирован с продукцией шигаподобного токсина второго типа – Stx2, что обуславливает актуальность разработки средств лабораторной диагностики Stx2 и шигаподобных токсинов в целом [6].

Вспышки заболеваний, вызываемых STEC, происходят регулярно. Как правило, частой причиной вспышек является кишечная палочка серотипа O157. В то же время наиболее известной является вспышка 2011 г. в Европе, вызванная кишечной палочкой серотипа O104:H4. По данным Всемирной организации здравоохранения, в результате этой вспышки погибло 53 человека [7, 8].

На современном этапе развития средств диагностики шигаподобных токсинов значительное место занимают иммунохимические средства. Они представлены как на зарубежном, так и на отечественном рынке. Фирма R-Biopharm AG (Германия) производит и реализует наборы мультиплексного иммунохроматографического анализа для одновременного выявления Stx1, Stx2 и специфического антигена O157 – RIDA®QUICK Verotoxin/O157 Combi. Этот же производитель предлагает набор RIDASCREEN® Verotoxin для иммуноферментного полуколичественного выявления шигаподобных токсинов.

Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации разработаны и утвержде-

ны к применению методические указания по лабораторной диагностике заболеваний, вызываемых *E. coli*, продуцирующих шигаподобные токсины – инфекции в пищевых продуктах, – МУК 4.2.2963-11. Данные МУК предусматривают использование диагностических наборов для латекс-агглютинации производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Россия) и иммунохроматографических наборов DUOPATH®Verotoxins (Merck Millipore, США).

Таким образом, наиболее востребованными средствами диагностики шигаподобных токсинов на сегодняшний день являются иммунохимические наборы реагентов. Для создания современных средств иммунодиагностики оптимальным вариантом является использование моноклональных антител (МКАТ). Главным источником МКАТ по-прежнему остаются гибридные клеточные линии.

В рамках настоящей работы проведен комплекс исследований по получению гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к шигаподобным токсинам I и II типов, и исследование возможности использования МКАТ в иммунохимических тестах, предназначенных для выявления Stx1 и Stx2.

Материалы и методы

В работе использованы препараты шигаподобных токсинов, полученные из культуральных жидкостей культур *E. coli* следующих штаммов: рекомбинантный – продуцент Stx1; RKI № 112027 (серотип O104:H4) – продуцент Stx2. Специфическую активность препаратов шигаподобных токсинов контролировали в иммуноферментном тесте RIDASCREEN®Verotoxin (R-Biopharm AG, Германия) и в иммунохроматографическом экспресс-тесте DUOPATH®Verotoxin (Merck Millipore, США). Концентрацию белка во всех случаях определяли по методу Лоури [9].

Гибридизацию спленоцитов иммунизированных животных с клетками миеломы Sp2/0-Ag14 проводили на четвертые сутки после заключительной иммунизации с использованием 50 % раствора полиэтиленгликоля ПЭГ 1450 (Sigma-Aldrich, США) [10, 11].

Исследование специфической активности гипериммунных сывороток, культуральных и асцитических жидкостей проводили методом непрямого ИФА [12]. Планшеты NUNC™ (Thermo Scientific, Дания) для постановки ИФА сенсibilizировали шигаподобными токсинами в концентрации 10 мкг/мл. Сыворотки для исследования готовили путем последовательных двукратных разведений

от 1:1000 до 1:512000, культуральные жидкости – от 1:50 до 1:6400, асцитические жидкости – от 1:10000 до 1:10240000. Антивидовой иммунопероксидазный конъюгат против иммуноглобулинов мыши (Sigma-Aldrich, США) применяли в рабочем разведении. Для выявления продуктов реакции использовали субстратно-индикаторную смесь на основе ортофенилендиамина (Sigma-Aldrich, США). Результаты реакции учитывали путем определения оптической плотности субстратно-индикаторной смеси на планшетном фотометре.

Для получения асцитических жидкостей мышам линии BALB/с интраперитонеально вводили по 0,5 мл минерального масла Pristane (Sigma-Aldrich, США), а через 14 суток – 2 млн гибридных клеток.

Иммуноглобулины из асцитических жидкостей выделяли осаждением насыщенным раствором сульфата аммония с последующей очисткой ионообменной хроматографией на DEAE Toyopearl (Tosoh Bioscience, США).

Синтез иммунопероксидазных конъюгатов (ИПК) осуществляли методом периодатного окисления [13].

Для определения минимальных выявляемых концентраций (чувствительности ИФА) использовали последовательные двукратные разведения препаратов шигаподобных токсинов от 128 до 1 нг/мл. Для выполнения сэндвич-варианта ИФА иммунологические планшеты сенсibilизировали различными МКАТ в концентрации 20 мкг/мл. Для сенсibilизации планшета также использовали коммерческие МКАТ к В-субъединицам Stx1 и Stx2 (MyBioSource, США, кат. № MBS146695, MBS146696). На следующем этапе в планшеты вносили приготовленные разведения шигаподобных токсинов, а затем синтезированные ИПК в рабочем разведении. Далее постановку ИФА осуществляли, как описано выше.

Работы с лабораторными животными проводились в соответствии с международными этическими нормами, законодательством Российской Федерации и нормативными документами учреждения.

Результаты и обсуждение

С целью получения гибридом-продуцентов моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов иммунизацию мышей линии BALB/с проводили путем подкожного введения возрастающих доз препаратов анатоксинов (Stx1, Stx2). Иммунизация линейных мышей шигаподобными анатоксинами обеспечила титры специфических антител в крови опытных животных на уровне 1:64000 и 1:128000. Животных с максимальным уровнем сероконверсии использовали в качестве источника иммунных спленоцитов в опытах по гибридизации.

Всего проведено по два эксперимента по гибридизации для каждого типа токсина. В результате опытов по слиянию иммунных спленоцитов и миеломных клеток получены 15 популяций гибридных

клеток, продуцирующих антитела к шигаподобному токсину I типа, и 18 популяций – к шигаподобному токсину II типа. С целью отбора наиболее перспективных для клонирования растущих гибридных клеток оценивали их морфологию, пролиферативную активность, а также способность сохранять высокий уровень синтеза специфических антител. По результатам ИФА наиболее выраженный уровень продукции МКАТ к Stx1 в титрах от 1:400 до 1:1600 отмечен у гибридных клеточных линий 368D5, 383D5, 383F4, 384A10, а к Stx2 – у 361D6, 363B3, 365E11, 366E6. Клонирование культур гибридных клеток проводили методом лимитирующих разведений из расчета одна клетка на лунку. Клонирование повторяли не менее двух раз, отбирая на каждой стадии клоны с наибольшей пролиферативной активностью и устойчивым синтезом специфических антител. В результате клонирований от 95 до 100 % клеток в популяциях стабильно продуцировали антитела к шигаподобным токсинам.

Таким образом, в результате проведенных гибридизаций и последующих клонирований получены гибридомы-продуценты моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов. Гибридные клетки размножали путем пассирования в культуральных планшетах и культуральных флаконах возрастающего объема. При этом минимальная посевная концентрация клеток составила 100 и 200 тыс. в 1 мл, а антителопродуцирующая активность на протяжении десяти пассажей *in vitro* сохранялась на уровне титров антител в ИФА от 1:400 до 1:1600 (табл. 1). Пролиферирующие *in vitro* гибридные клетки вводили внутрибрюшинно мышам линии BALB/с. В результате получены асцитические жидкости, характеризующиеся титрами специфических антител в ИФА от 1:640000 до 1:5120000. Следует отметить, что на протяжении трех пассажей *in vivo* (количество проведенных нами исследований) гибридные клетки стабильно синтезировали антитела.

В серии экспериментов по определению чувствительности сэндвич-варианта ИФА при выявлении шигаподобных токсинов I и II типов использованы все возможные сочетания МКАТ для сенсibilизации планшета и в составе ИПК. Как видно из данных табл. 2, результат ИФА отрицателен при одновременном использовании МКАТ, продуцируемых гибридомой 383F4, в сенситине и конъюгате. Остальные сочетания МКАТ к шигаподобному токсину I типа позволяют выявлять методом ИФА Stx1 в концентрациях от 1 до 32 нг/мл. При этом наибольшую чувствительность анализа обеспечивают пары МКАТ «сенситин – конъюгат»: 383F4–384A10, 384A10–383F4, 384A10–384A10. При использовании в качестве антител захвата коммерческих МКАТ к В-субъединице шигаподобного токсина I типа (MyBioSource, США) получены результаты чувствительности ИФА того же порядка.

Результаты исследования чувствительности сэндвич-варианта ИФА при выявлении шигапо-

Таблица 1 / Table 1

Характеристики гибридом-продуцентов моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов

Features of hybridomas producing monoclonal antibodies to shiga-like toxins of I and II types

Наименование гибридомы-продуцента МКАТ Hybridoma-producer of monoclonal antibodies (MCAb)	Специфичность МКАТ MCAb specificity	Минимальная посевная концентрация, тыс. клеток в 1 мл Minimum inoculum concentration, thous. of cells per 1 ml	Титр МКАТ в культуральной жидкости MCAb titer in culture liquid	Титр МКАТ в асцитической жидкости MCAb titer in ascitic liquid
368D5	Stx1	100	1:1600	1:5120000
383D5		200	1:400	1:1280000
383F4		200	1:400	1:1280000
384A10		200	1:800	1:1280000
361D6	Stx2	200	1:800	1:2560000
363B3		100	1:1600	1:5120000
365E11		200	1:800	1:2560000
366E6		200	1:400	1:640000

Таблица 2 / Table 2

Чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении шигаподобного токсина I типа

Sensitivity of ELISA when detecting shiga-like toxin of type I

Антитела, используемые для сенсibilизации планшета Antibodies used for plate sensibilization	Минимальная выявляемая концентрация шигаподобного токсина I типа в ИФА при использовании ИПК на основе антител, нг/мл (n=7) Minimum detected concentration of shiga-like toxin (type I) in ELISA using antibody-based immunoperoxidase conjugates, ng/ml (n=7)			
	МКАТ368D5 MCAb 368D5	МКАТ383D5 MCAb 383D5	МКАТ383F4 MCAb 383F4	МКАТ384A10 MCAb 384A10
МКАТ 368D5 MCAb 368D5	32	8	2	4
МКАТ 383D5 MCAb 383D5	16	16	2	2
МКАТ 383F4 MCAb 383F4	2	2	—	1
МКАТ 384A10 MCAb 384A10	2	2	1	1
1В	8	8	4	8

Примечание: в таблице приведены медианы минимальных выявляемых концентраций; «—» – результат ИФА отрицательный; 1В – МКАТ MyBioSource (США) к В-субъединице шигаподобного токсина I типа.

Note: the table shows the medians of the minimum detectable concentrations; “—” – the ELISA result is negative; 1В – MCAb MyBioSource (USA) to the B-subunit of type I shiga-like toxin.

добного токсина II типа представлены в табл. 3. Использование различных сочетаний МКАТ в сенситивности и составе ИПК, в том числе использование для сенсibilизации планшета антител к В-субъединице шигаподобного токсина II типа (MyBioSource, США), обеспечивает выявление в ИФА Stx2 в концентрациях от 1 до 16 нг/мл. При этом максимальная чувствительность проведенного анализа получена с использованием МКАТ 365E11 как в сенситивности, так и в составе ИПК.

На заключительном этапе исследований представлялось необходимым оценить возможность использования МКАТ, продуцируемых полученными гибридными клеточными линиями, для выявления шигаподобных токсинов обоих типов (без дифференциации) при выполнении одной постановки им-

муноферментного анализа. Для этого иммунологический планшет сенсibilизировали равновесной по концентрации белка смесью МКАТ 384A10 (к Stx1) и МКАТ 365E11 (к Stx2). Процедуру сэндвич-варианта анализа выполняли так, как описано выше, в качестве аналитов использовали различные разведения шигаподобных токсинов обоих типов. Для выявления связавшихся токсинов применяли равнообъемную смесь иммунопероксидазных конъюгатов, взятых в разведениях, в два раза превышающих рабочие. В постановке ИФА использованы ИПК на основе МКАТ 383F4 (к Stx1) и на основе МКАТ 365E11 (к Stx2). Результаты данного эксперимента подтвердили возможность одновременного выявления шигаподобных токсинов I и II типов в концентрациях 1 нг/мл и выше в одной постановке ИФА.

Таблица 3 / Table 3

Чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении шигаподобного токсина II типа
Sensitivity of ELISA when detecting shiga-like-toxin of type II

Антитела, используемые для сенсibilизации планшета Antibodies used for plate sensibilization	Минимальная выявляемая концентрация шигаподобного токсина II типа в ИФА при использовании ИПК на основе антител, нг/мл (n=7) Minimum detected concentration of shiga-like toxin (type II) in ELISA using antibody-based immunoperoxidase conjugates, ng/ml (n=7)			
	MKAT361D6 MCAb 361D6	MKAT363B3 MCAb 363B3	MKAT365E11 MCAb 365E11	MKAT366E6 MCAb366E6
MKAT 361D6 MCAb 361D6	4	4	4	8
MKAT 363B3 MCAb 363B3	4	16	4	8
MKAT 365E11 MCAb 365E11	4	2	1	4
MKAT 366E6 MCAb366E6	4	4	2	4
2B	2	8	4	4

Примечание: в таблице приведены медианы минимальных выявляемых концентраций; 2B – MKAT MyBioSource (США) к В-субъединице шигаподобного токсина II типа.

Note: the table shows the medians of the minimum detectable concentrations; 2B – MCAb MyBioSource (USA) to the B-subunit of type II shiga-like toxin.

В результате проведенных исследований получены по четыре гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к шигаподобным токсинам I и II типов и сохраняющие стабильность основных свойств на протяжении десяти пассажей *in vitro* и трех пассажей *in vivo*. Получены моноклональные антитела, позволяющие в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа выявлять шигаподобные токсины I и II типов в концентрации 1 нг/мл и более.

Показана возможность выявления шигаподобных токсинов без типовой дифференциации при использовании в ИФА полирецепторной смеси МКAT для сенсibilизации планшета и полиспецифичной смеси иммунопероксидазных конъюгатов.

Гибридомы-продуценты и моноклональные антитела планируется использовать для изготовления иммунохимических наборов реагентов для выявления шигаподобных токсинов I и II типов.

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

Список литературы

1. Melton-Celsa A.R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol. Spectr.* 2014; 2(4):EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.
2. Szewczak A.A., Moore P.B., Chang Y.L., Wool I.G. The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1993; 90(20):9581–5. DOI: 0.1073/pnas.90.20.9581.
3. Gyles C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 2007; 85(13):E45–E62. DOI: 10.2527/jas.2006-508.
4. Paletta A.C.C., Castro V.S., Conte-Junior C.A. Shiga toxin-producing and enteroaggregative *Escherichia coli* in animal, foods and humans: pathogenicity mechanisms, detection methods, and epidemiology. *Curr. Microbiol.* 2020; 77(4):612–20. DOI: 10.1007/s00284-019-01842-1.
5. Taylor C.M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr. Nephrol.* 2008; 23(9):1425–31. DOI: 10.1007/s00467-008-0820-3.

6. Joseph A., Cointe A., Kurkdjian P.M., Rafat C., Hertig A. Shiga toxin-associated hemolytic uraemic syndrome: a narrative review. *Toxins (Basel)*. 2020; 12(2):67. DOI: 10.3390/toxins2020067.

7. *E. coli*: Rapid Response in a crisis. European Food Safety Authority. [Электронный ресурс]. URL: www.efsa.europa.eu/en/press/news/120711 (дата обращения 10.07.2020).

8. Онищенко Г.Г., Дятлов И.А., Светоч Э.А., Воложанцев Н.В., Баннов В.А., Карцев Н.Н., Борзенков В.Н., Фурсова Н.К., Шемякин И.Г., Богун А.Г., Кисличкина А.А., Попова А.В., Мякина В.П., Теймуразов М.Г., Полосенко О.В., Кафтырева Л.А., Макарова М.А., Матвеева З.Н., Гречанинова Т.А., Григорьева Н.С., Кича Е.В., Забалуева Г.В., Кутасова Т.Б., Коржаев Ю.Н., Башкетова Н.С., Бушманова О.Н., Сталевская А.В., Чхинджерия И.Г., Жебрун А.Б. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсинпродуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году. *Вестник РАМН*. 2015; 1:70–81. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1234.

9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.

10. De StGroth S.F., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods*. 1980; 35(1-2):1–21. DOI: 10.1016/0022-1759(80)90146-5.

11. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256(5517):495–7. DOI: 10.1038/256495a0.

12. Кэтти Д., редактор. Антитела. Методы: Кн. 2: пер. с англ. М.: Мир; 1991. 384 с.

13. 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.

References

1. Melton-Celsa A.R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol. Spectr.* 2014; 2(4):EHEC-0024-2013. DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.
2. Szewczak A.A., Moore P.B., Chang Y.L., Wool I.G. The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1993; 90(20):9581–5. DOI: 0.1073/pnas.90.20.9581.
3. Gyles C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 2007; 85(13):E45–E62. DOI: 10.2527/jas.2006-508.
4. Paletta A.C.C., Castro V.S., Conte-Junior C.A. Shiga toxin-producing and enteroaggregative *Escherichia coli* in animal, foods and humans: pathogenicity mechanisms, detection methods, and epidemiology. *Curr. Microbiol.* 2020; 77(4):612–20. DOI: 10.1007/s00284-019-01842-1.
5. Taylor C.M. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolytic uraemic syndrome.

Pediatr. Nephrol. 2008; 23(9):1425–31. DOI: 10.1007/s00467-008-0820-3.

6. Joseph A., Cointe A., Kurkdjian P.M., Rafat C., Hertig A. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: a narrative review. *Toxins (Basel)*. 2020; 12(2):67. DOI: 10.3390/toxins12020067.

7. *E. coli*: Rapid Response in a crisis. European Food Safety Authority. (Cited 10 Jul 2020). [Internet]. Available from: www.efsa.europa.eu/en/press/news/120711.

8. Onishenko G., Dyatlov I., Svetoch N., Volozhantsev N.V., Bannov V.A., Kartsev N.N., Borzenkov V.N., Fursova N.K., Shemyakin I.G., Bogun A.G., Kislichkina A.A., Popova A.V., Myakinina V.P., Teimurazov M.G., Polosenko O.V., Kaftyreva L.A., Makarova M.A., Matveeva Z.N., Grechaninova T.A., Grigor'eva N.S., Kicha E.V., Zabalueva G.V., Kutasova T.B., Korzhaev Yu.N., Bashketova N.S., Bushmanova O.N., Stalevskaya A.V., Chkhinzheria I.G., Zhebrun A.B. [Molecular genetic characteristics of shiga-toxins released during a food outbreak in St. Petersburg in 2013]. *Vestnik Rossijskoj Akademii Meditsinskikh Nauk [Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences]*. 2015; 1:70–81. DOI: 10.15690/vramn.v70i1.1234.

9. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.

10. De StGroth S.F., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods*. 1980;

35(1-2):1–21. DOI: 10.1016/0022-1759(80)90146-5.

11. Kohler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256(5517):495–7. DOI: 10.1038/256495a0.

12. Ketty D, editor. [Antibodies. Methods: Book 2. Translated from English]. Moscow: "Mir"; 1991. Vol. 2: 384 p.

13. 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.

Authors:

Kuklina G.V., Ipatov S.S., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kytmanov A.A., Dubrovin M.Yu., Gorshkov A.S. 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:

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