

Куклина Г.В., Печенкин Д.В., Ипатов С.С., Еремкин А.В., Кытманов А.А., Тихвинская О.В.

## Конструирование иммуноферментной моноклональной тест-системы для выявления шигаподобных токсинов I и II типов

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 610000, г. Киров, Российская Федерация

**Введение.** Целью работы являлось конструирование иммуноферментной моноклональной тест-системы для выявления шигаподобных токсинов I и II типов и оценка ее диагностических свойств.

**Материал и методы.** В работе использованы гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к шигаподобным токсинам I и II типов, полученные в филиале ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров); мыши линии BALB/c; шигаподобные токсины I и II типов. 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 для выявления шигаподобных токсинов I и II типов. Специфические компоненты иммуноферментных тест-систем подвергали сублимационному высушиванию в защитной среде.

**Результаты и обсуждение.** В результате проведенных исследований осуществлена наработка и очистка препаративных количеств моноклональных антител к шигаподобным токсинам I и II типов; проведен выбор моноклональных антител для сорбции на твердой фазе и для синтеза иммунопероксидазных конъюгатов.

**Заключение.** Сконструирована экспериментальная иммуноферментная тест-система, позволяющая в сэндвич-варианте иммуноферментного анализа выявлять шигаподобные токсины I и II типов в концентрации 1 нг/мл и более.

**Ключевые слова:** шигаподобные токсины; моноклональные антитела; тест-система; иммуноферментный анализ

**Для цитирования:** Куклина Г.В., Печенкин Д.В., Ипатов С.С., Еремкин А.В., Кытманов А.А., Тихвинская О.В. Конструирование иммуноферментной моноклональной тест-системы для выявления шигаподобных токсинов I и II типов. *Токсикологический вестник*. 2021; 29(5): 43-48. DOI: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-5-43-48>

**Для корреспонденции:** Печенкин Денис Валериевич, кандидат мед. наук, начальник научно-исследовательского отдела ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 610000, г. Киров, Россия. E-mail: 23527@mil.ru

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Участие авторов:** Куклина Г.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста, статистический анализ, редактирование; Печенкин Д.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста, редактирование; Ипатов С.С. – сбор и обработка материала, написание текста, редактирование; Еремкин А.В. – концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование; Кытманов А.А. – сбор и обработка материала, статистический анализ, написание текста, редактирование. Все соавторы – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Поступила в редакцию 2021 / Принята в печать 20 сентября 2021 / Опубликовано 30 октября 2021

Kuklina G.V., Pechenkin D.V., Ipatov S.S., Eremkin A.V., Kytmanov A.A., Tikhvinskaya O.V.

# Development of enzyme immunoassay for detecting I and II types of shiga-like toxins

Affiliated Branch of the Federal State Budgetary Institution «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, 610000, Russian Federation

**Introduction.** The aim of the work was development of enzyme immunoassay for detecting I and II types of shiga-like toxins and assessment of its diagnostic properties.

**Materials and methods.** For the research, we used hybridomas producing monoclonal antibodies to shiga-like toxins of types I and II, obtained at the branch of the Federal State Budgetary Institution “48 Central Research Institute” of the Ministry of Defense of Russian Federation (Kirov); BALB/c mice; shiga-like toxins of types I and II. Hybridoma cells were cultured in culture flasks and in the peritoneal cavity of BALB/c mice. Monoclonal antibodies were isolated from ascitic fluids by precipitation with a saturated solution of ammonium sulfate, followed by purification by ion exchange chromatography. The obtained preparations of monoclonal antibodies were used to develop enzyme immunoassay for the detection of shiga-like toxins of types I and II. Specific components of enzyme immunoassay were freeze-dried in a protective environment.

**Results.** As a result of research, preparative quantities of monoclonal antibodies against I and II types of shiga-like toxins were obtained and purified; selection of monoclonal antibodies for sorption on the solid phase and for the synthesis of immunoperoxidase conjugates was carried out.

**Conclusion.** Experimental enzyme immunoassay allowing to identify 1 ng/ml I and II types of shiga-like toxins in «sandwich»-ELISA was developed.

**Keywords:** *shiga-like toxins; monoclonal antibodies; enzyme immunoassay; ELISA*

**For citation:** Kuklina G.V., Pechenkin D.V., Ipatov S.S., Eremkin A.V., Kytmanov A.A., Tikhvinskaya O.V. Development of enzyme immunoassay for detecting I and II types of shiga-like toxins. *Toksikologicheskii vestnik (Toxicological Review)*. 2021; 29(5): 43-48. DOI: <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2021-29-5-43-48> (in Russian)

**For correspondence:** Denis V. Pechenkin, Ph.D. in Medicine, Head of Research Department Affiliated Branch of the Federal State Budgetary Institution «48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Kirov, 610000, Russian Federation, 610000, Kirov, Russia. E-mail: 23527@mil.ru

## Information about the authors:

Kuklina G.V., <https://orcid.org/0000-0002-5429-6295>Ipatov S.S., <https://orcid.org/0000-0002-2881-4730>Kytmanov A.A., <https://orcid.org/0000-0003-0277-2226>Pechenkin D.V., <https://orcid.org/0000-0001-8277-3573>Eremkin A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3133-1921>Tikhvinskaya O.V., <https://orcid.org/0000-0001-8368-9648>

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interest.

**Funding.** The study had no sponsorship.

**Author contribution:** Kuklina G.V. – concept and design of the study, collection and processing of material, text writing, statistical analysis, editing; Pechenkin D.V. – concept and design of the study, collection and processing of material, text writing, editing; Ipatov S.S. – collection and processing of material, text writing, editing; Eremkin A.V. – research concept and design, text writing, editing; Kytmanov A.A. – collection and processing of material, statistical analysis, text writing, editing. All co-authors – approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article.

Received: , 2021 / Accepted: September 20, 2021 / Published: October 30, 2021

## Введение

Среди острых кишечных инфекций особое место занимают так называемые STEC-инфекции, вызываемые шига-токсинпродуцирующими штаммами *Escherichia coli* (STEC от англ. shiga toxin-producing *Escherichia coli*). STEC-инфекции распространены во многих странах мира и регистрируются в виде вспышек с охватом большого числа людей – от десятков до нескольких тысяч [1, 2]. Как правило, причина вспышек – кишечная па-

лочка серотипа O157. В то же время наиболее известна вспышка 2011 г. в Европе, вызванная кишечной палочкой штамма O104:H4. По данным ВОЗ, в результате этой вспышки погибло 53 человека [3, 4].

Ключевым фактором патогенности STEC-штаммов кишечной палочки являются шигаподобные токсины, которые оказывают выраженное нейротоксическое действие, нарушая прежде всего функционирование центральной нервной системы. Проявляется это синдромом интоксикации и нарушением всех

видов обмена веществ, примерно в 5% случаев поражение шигаподобными токсинами приводит к развитию гемолитико-уремического синдрома, что представляет серьезную угрозу жизни, особенно для пожилых людей и детей [5–7].

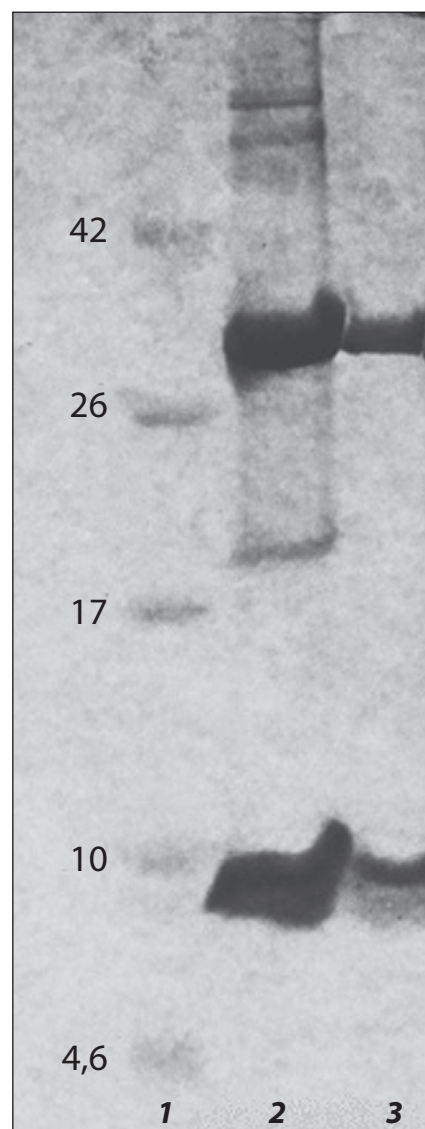
Шигаподобные токсины подразделяют на I и II типы (Stx1 и Stx2, от *англ.* shiga toxin). Штаммы STEC способны продуцировать либо Stx1, или Stx2, либо оба типа токсинов одновременно. Продукция шигаподобных токсинов является наиболее общим критерием для определения данной группы бактерий.

На сегодняшний день наиболее востребованными и рекомендованными к применению средствами диагностики заболеваний, вызываемых *E. coli*, продуцирующими шигаподобные токсины, являются иммунохимические наборы реагентов [8]. Одним из распространённых иммунологических методов детекции бактериальных токсинов является иммуноферментный анализ, обладающий высокой чувствительностью, стандартностью и экспрессностью, простой в исполнении и применимый в любой лаборатории. В связи с вышеизложенным, а также учитывая тот факт, что в Российской Федерации на данный момент отсутствует производство отечественных иммуноферментных тест-систем для выявления шигаподобных токсинов, исследования по созданию таких средств диагностики являются актуальным направлением для медицинской науки и практики.

## Материал и методы

В работе использованы микробные культуры из Государственной коллекции микроорганизмов филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров). Работы с микроорганизмами проводились в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.3118-13 «Работа с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

Для получения контрольных образцов шигаподобных токсинов I и II типов использовали следующие штаммы кишечной палочки: рекомбинантный – продуцент Stx1; природный – RKI № 112027 (серотип O104:H4) – продуцент Stx2. Микробные культуры выращивали в среде CAYE (Merck, Германия) в течение 18 ч при температуре 36 °С. С целью индукции процесса токсинообразования через 1 ч культивирования в среду добавляли митомицин до конечной концентрации 250 нг/мл. Выделение токсинов из фугатов



Электорофореграмма препаратов, содержащих шигаподобные токсины: дорожка 1 – маркеры молекулярных масс (кДа); дорожка 2 – образец препарата Stx1; дорожка 3 – образец препарата Stx2.

SDS-PAAG of I and II types shiga-like toxins: lane 1 – Molecular weight marker (kDa); lane 2 – Stx 1 preparative; lane 3 – Stx 2 preparative.

культуральных жидкостей проводили осаждением белка сульфатом аммония при насыщении 65%, очистку токсинов – с использованием системы «ActaPrime Plus» (GE Healthcare, США), методами гидрофобной, ионообменной и эксклюзионной хроматографии.

Исследование белкового профиля образцов шигаподобных токсинов осуществляли методом электрофореза в 10% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Laemmli U.K. [9] Окраску белков в геле проводили раствором Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma-Aldrich, США). Результаты электрофореза, представленные на рисунке, показывают высокую чистоту исследуемых

токсинных препаратов (95%). При этом молекулярные массы субъединиц А и В, из которых они состоят, примерно равны 8 и 30 кДа, что соответствует данным литературы о строении Stx1 и Stx2 [10].

Специфическую активность образцов шигаподобных токсинов контролировали в иммуноферментном тесте RIDASCREEN® Verotoxin (R-Biopharm AG, Германия) и в иммунохроматографическом тесте DUOPATH® Verotoxin (Merck Millipore, США) в соответствии с инструкциями фирм-изготовителей. Концентрацию белка во всех случаях определяли по методу Лоури [11].

Для получения препаративных количеств моноклональных антител (МКАТ) к шигаподобным токсинам I и II типов были использованы следующие гибридные клеточные линии из Государственной коллекции микроорганизмов филиала ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров): 383F4, 384A10 – продуценты МКАТ к Stx1; 365E11, 366E6 – продуценты МКАТ к Stx2. Для накопления МКАТ *in vitro* гибридные клетки выводили из состояния криоанабиоза и культивировали во флаконах T-75 в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США) с 10% фетальной телячьей сывороткой (Биолот, Россия), 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия (Sigma-Aldrich, США) при температуре 37 °С в атмосфере 5% углекислого газа и 80% влажности. Количество клеток поддерживали в диапазоне  $2 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$  в 1 мл. Контроль антителопродукции проводили в непрямом твердофазном ИФА по общепринятой методике [12].

Накопление МКАТ *in vivo* проводили в перитонеальной полости мышей линии BALB/c. Клетки гибридом вводили мышам-реципиентам внутривентриально предварительно праймированным минеральным маслом в дозе 2 млн Ед. Появление асцитов регистрировали на 7–10-е сутки, а отбор асцитических жидкостей производили на 10–14-е сутки в соответствии со скоростью развития каждой отдельной асцитной опухоли.

Имуноглобулины из асцитических жидкостей выделяли осаждением насыщенным раствором сульфата аммония (Thermo, США) в объёмном соотношении 1:1 при температуре 22 °С в течение 30 мин. Образовавшиеся преципитаты осаждали центрифугированием и диализовали против 0,1 М фосфатного буферного раствора (ФБР) с рН 7,5. Окончательную очистку антител проводили методом

ионообменной хроматографии с использованием системы «ActaPrime Plus» на колонке «HiPrep DEAE FF 16/10» (3 мл/мин, посадочный буферный раствор – 0,05 М ФБР с рН 7,5, градиентная элюция – повышением концентрации ФБР от 0,1 до 0,5 М).

Синтез иммунопероксидазных конъюгатов (ИПК) осуществляли по методике, предложенной P.Nakane [13]. Рабочее разведение ИПК определяли методом шахматного титрования [12].

## Результаты и обсуждение

Одной из главных задач при конструировании иммуноферментных тест-систем является выбор подходящей пары антител, обеспечивающих максимальную чувствительность анализа при выявлении исследуемого аналита. С этой целью в сэндвич-варианте ИФА были изучены различные комбинации доступных антител, когда одно из них иммобилизовали на твёрдой фазе, а другое метили детектирующим агентом. Для проведения анализа в лунки иммунологического планшета вносили по 100 мкл равновесных по белку смесей МКАТ к шигаподобным токсинам I и II типов в концентрации 20 мкг/мл и инкубировали при температуре 4 °С в течение 18 ч. Трижды отмывали фосфатно-солевым буферным раствором с добавлением 0,05% Tween 20 (ФСБ-Т), каждый раз внося в лунки планшета по 300 мкл отмывающего раствора. Затем в лунки вносили по 100 мкл последовательных двукратных разведений контрольных образцов шигаподобных токсинов, инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч. После этого лунки планшета трижды отмывали раствором ФСБ-Т и вносили в лунки по 100 мкл равнообъёмных смесей иммунопероксидазных конъюгатов, взятых в разведениях в два раза превышающих рабочие. Планшет инкубировали 1 ч в тех же условиях, затем трижды отмывали ФСБ-Т и вносили по 100 мкл субстратно-хромогенной смеси на основе ортофенилендиамина (Sigma-Aldrich, США). Ферментативную реакцию останавливают через 20 мин добавлением в лунки по 100 мкл 1 М серной кислоты. Положительную реакцию оценивали по появлению желто-коричневого окрашивания раствора. Измерение оптической плотности (ОП) реакционной смеси в лунках планшета проводили на фотометре при длине волны 492 нм. Результаты ИФА принимали к учёту в том случае, если ОП реакционной смеси в

**Чувствительность иммуноферментного анализа при выявлении шигаподобных токсинов I и II типов****Sensitivity of ELISA detection of I and II types shiga-like toxins**

Моноклональные антитела		Минимальная выявляемая концентрация шигаподобного токсина ..., нг/мл (медиана, n = 7)	
сорбированные на твёрдой фазе	меченые пероксидазой хрена	I типа	II типа
383F4, 365E11	384A10, 365E11	1,0	1,0
	384A10, 366E6	1,0	4,0
383F4, 366E6	384A10, 365E11	1,0	2,0
	384A10, 366E6	1,0	4,0
384A10, 365E11	383F4, 365E11	1,0	1,0
	383F4, 366E6	1,0	4,0
384A10, 366E6	383F4, 365E11	1,0	2,0
	383F4, 366E6	1,0	4,0

лунках с исследуемыми пробами превышала величину 0,3. При этом ОП реакционной смеси в условиях отсутствия аналита в пробе (фоновые значения ИПК) не должны превышать величину 0,15.

По результатам данного эксперимента определено, что наибольшая чувствительность ИФА достигалась при использовании в качестве лигандов, сорбируемых на твердой фазе, смеси МКАТ 383F4 и 365E11, а в качестве детектирующих антител для получения иммунопероксидазных конъюгатов МКАТ – 384A10 и 365E11. Использование других комбинаций, в состав которых входили МКАТ 366E6, приводило к снижению чувствительности анализа при выявлении шигаподобного токсина II типа (см. таблицу). Поэтому для дальнейшей работы была выбрана комбинация, которая обеспечила наиболее высокий аналитический сигнал при выявлении как Stx1, так и Stx2.

В экспериментах по оптимизации условий подготовки твердой фазы было изучено влияние концентрации антител на чувствительность иммуноферментного анализа. Установлено, что повышение чувствительности ИФА достигается при увеличении концентрации иммобилизуемой на твердой фазе смеси МКАТ 383F4 и 365E11 от 5,0 до 20,0 мкг/мл. Дальнейшее повышение концентрации сорбируемых антител приводило к увеличению фонового сигнала ИПК в условиях отсутствия анализируемых шигаподобных токсинов в пробе.

По результатам проведенных исследований были сконструированы эксперименталь-

ные образцы иммуноферментной тест-системы, позволяющей выявлять контрольные образцы шигаподобных токсинов I и II типов в концентрации 1,0 нг/мл и более. Для приготовления готовых форм тест-системы иммунологически активные компоненты переводили в защитную среду высушивания, содержащую 5% сахарозы, и подвергали лиофильному высушиванию. Комплектация сконструированной тест-системы унифицирована в соответствии с иммуноферментными тест-системами, изготавливаемыми в филиале ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (г. Киров). В состав тест-системы были включены в готовом виде или в виде полуфабрикатов все иммунохимические реагенты, необходимые для постановки твердофазного иммуноферментного анализа, за исключением дистиллированной воды. Тест-системы включали в себя следующие компоненты: иммуноглобулины против шигаподобных токсинов I и II типов; конъюгат иммунопероксидазный против шигаподобных токсинов I и II типов; инактивированный шигаподобный токсин (положительный контрольный образец); навеска солей для приготовления фосфатно-солевого буферного раствора; 20% раствор твин-20; концентрат цитратно-перекисного раствора; навеска ортофенилендиамина; 1 М раствор серной кислоты; планшет полистироловый для постановки иммуноферментного анализа (96 лунок); инструкция по применению.

Экспериментальная тест-система была опробована для определения уровня продукции шигаподобных токсинов штаммами

*E. coli* O157:H7 и O104:H4. Постановку ИФА осуществляли, как описано выше. В качестве исследуемых проб использовали культуральные жидкости вышеуказанных эшерихий. Фугаты культуральных жидкостей исследовали в разведениях от 1:1000, к 1:2000, к 1:4000, ..., до 1:2 048 000. Полуколичественную оценку результатов в данном случае проводили путем соотношения регистрационных сигналов ОП исследуемых проб с диапазонами концентраций контрольных образцов. Для этого делали серии последовательных двукратных разведений контрольных препаратов шигаподобных токсинов с известной концентрацией антигена и строили калибровочную кривую. Количество разведений определяется количеством необходимых диапазонов анализируемых концентраций. Каждое разведение соответствует своему пределу обнаружения антигена. Пользуясь калибровочной кривой, зная ОП исследуемой пробы, рассчитывали концентрацию искомого антигена в анализируемой пробе.

Результаты проведенного иммуноферментного анализа выявили содержание шигаподобных токсинов во всех исследованных образцах фугатов культуральных жидкостей шига-токсинпродуцирующих штаммов патогенных эшерихий в диапазоне концентраций от 20 до 60 мкг/мл.

## Заключение

Показана принципиальная возможность одновременного выявления шигаподобных токсинов I и II типов (без дифференциации) при использовании полирецепторной смеси моноклональных антител для сорбции на твердой фазе и полиспецифичной смеси иммунопероксидазных конъюгатов.

Сконструирована экспериментальная иммуноферментная моноклональная тест-система для выявления шигаподобных токсинов I и II типов с чувствительностью обнаружения 1,0 нг/мл. Разработанная тест-система позволяет проводить полуколичественное определение шигаподобных токсинов в культурах патогенных эшерихий.

## ЛИТЕРАТУРА

(пп. 1–3, 5–7, 9–11, 13 см. в References)

- Онищенко Г.Г., Дятлов И.А., Светоч Н.В. Молекулярно-генетическая характеристика шига-токсинпродуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году. *Вестник РАМН*. 2015; 1: 70-80.
- Мук 4.2.2963-11. Методические указания по лабораторной диагностике заболеваний, вызываемых *Escherichia coli*, продуцирующих шига-токсины (STEC-культуры) и обнаружению возбудителей STEC-инфекций в пищевых продуктах. Москва, 2011. <https://www.docs.cntd.ru/document/1200094087>.
- Д. Кэйти, ред. *Антитела. Методы*. Кн. 1. М.: Мир, 1991.
- Melton-Celsa A.R. Shiga toxin (Stx). Classification, structure, and Function. *Microbiol Spectr*. 2014; 2(2): 23. <https://doi.org/10.1128/9781555818791.ch3>
- Joseph A., Cointe A., Mariani Kurkdjian P. Shiga Toxin-Associated hemolytic uremic syndrome: A narrative review. *Toxins (Basel)*. 2020; 12: 67. <https://doi.org/10.3390/toxins12020067>
- E. coli*: Rapid Response in a crisis. European Food Safety Authority. Available at: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/120711>.
- Onishenko G., Dyatlov I., Svetoch N. Molecular genetic characteristics of shiga-toxins released during a food outbreak in St.Petersburg in 2013. *Vestnik RAMN*. 2015; 1: 70-80. (in Russian)
- Gyles C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J. Anim. Sci*. 2007; 85: 45-62.
- Paletta A.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*. 2019: 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00284-019-01842-1>.
- Taylor M.C. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1-induced haemolytic uraemic syndrome. *Pediatr. Nephrol*. 2008; 23: 1425-31.
- Guidelines 4.2.2963-11 for laboratory diagnosis of diseases caused by *Escherichia coli* producing shiga toxins (STEC-cultures) and the detection of pathogens STEC-infections in food products. Moscow, 2011. Available at: <https://www.docs.cntd.ru/document/1200094087>. (in Russian)
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227 (5259): 680-85.
- Szewczak A.A., Moore P.B., Chan Y.L. The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90: 9581-85.
- 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.
- D. Kettyu, ed. *Antibodies. Methods*. Vol. 1 [Antitela. Metody. Kn. 1]. Translated from English. Moscow: Mirbeau; 1991. (in Russian)
- Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated. *J. Histochem. Cytochem*. 1974; 22(12): 1084-91.

## REFERENCES

### ОБ АВТОРАХ:

**Галина Викторовна Куклина (Kuklina Galina Viktorovna)**, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела Филиала ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны РФ, 610000, г. Киров, Россия. E-mail:

**Печенкин Денис Валериевич (Pechenkin Denis Valerievich)**, кандидат медицинских наук, начальник научно-исследовательского отдела Филиала ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны РФ, 610000, г. Киров, Россия. E-mail: 23527@mil.ru

**Ипатов Сергей Сергеевич (Ipatov Sergei Sergeevich)**, младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела Филиала ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны РФ, 610000, г. Киров, Россия. E-mail:

**Еремкин Андрей Валентинович (Eremkin Andrei Valentinovich)**, кандидат биологических наук, начальник группы – заместитель начальника научно-исследовательского отдела Филиала ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны РФ, 610000, г. Киров, Россия. E-mail:

**Кытманов Алексей Александрович (Kytmanov Aleksei Aleksandrovich)**, кандидат биологических наук, научный сотрудник научно-исследовательского отдела Филиала ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны РФ, 610000, г. Киров, Россия. E-mail:

**Тихвинская Оксана Викторовна (Tikhvinskaya Oksana Viktorovna)**, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела Филиала ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны РФ, 610000, г. Киров, Россия. E-mail: