

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 57.083.3
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-2-132-141>

Поступила в редакцию 14.11.2025
Received 14.11.2025

Е. П. Киселева, К. И. Михайлопуло, О. В. Свиридов

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

**КОНСТРУКЦИЯ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ
НОВОЙ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ
LISTERIA MONOCYTOGENES В МОЛОКЕ**

Аннотация. Разработана тест-система для обнаружения *Listeria monocytogenes* в культуральной среде, основанная на принципе конкурентного иммуноферментного анализа и имеющая аналитическую чувствительность $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. Тест-система отличается от известных аналогов (коммерческих и описанных в научных исследованиях) двумя конструктивными особенностями: цитозоль клеток *Listeria monocytogenes* (мембранно-свободная фракция) иммобилизован на твердой фазе; анализируемым биоматериалом является среда, в которой выращивались бактерии. Адаптация данной тест-системы к иммуноферментному анализу *Listeria monocytogenes* в молоке выявила выраженный матричный эффект, который не устранялся традиционными методами. При добавлении молока в калибровочные пробы непосредственно перед проведением иммуноферментного анализа сохранена аналитическая чувствительность, равная $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл.

Ключевые слова: конкурентный иммуноферментный анализ, *Listeria monocytogenes*, моноклональные антитела, молоко

Для цитирования. Киселева, Е. П. Конструкция и аналитические характеристики новой иммуноферментной системы для обнаружения *Listeria monocytogenes* в молоке / Е. П. Киселева, К. И. Михайлопуло, О. В. Свиридов // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сэрыя хімічных навук. – 2026. – Т. 62, № 2. – С. 132–141. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-2-132-141>

E. P. Kiseleva, K. I. Mikhailopulo, O. V. Sviridov

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

**DESIGN AND ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF A NEW ENZYME-LINKED
IMMUNOSORBENT ASSAY SYSTEM FOR THE DETECTION
OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN MILK**

Abstract. Detection of *Listeria monocytogenes* (LM) in foods is topical due to known cases of listeriosis epidemics. Immunochemical methods including ELISA are widely used for LM detection. Traditionally, commercial ELISA kits for LM detection in foods are based on sandwich technique, detect antigens of bacterial cell membrane, have analytical sensitivity $\sim 10^5$ CFU/mL, and the analyzed biomaterial is cells + medium. We elaborated competitive ELISA test for LM detection in foods with analytical sensitivity $1 \cdot 10^4$ CFU/mL. The test system differs from known analogues (commercial and described in research studies) by two design features: the membrane-free fraction of LM cells (cytosol) is immobilized on the solid phase; the analyzed biomaterial is the medium in which the bacteria were grown. Adaptation of this test system to the ELISA detection of LM in milk revealed a pronounced matrix effect that could not be eliminated by conventional methods. We addressed this issue by adding milk to the calibration samples immediately before performing the ELISA, maintaining an analytical sensitivity of $1 \cdot 10^4$ CFU/mL.

Keywords: competitive enzyme immunoassay, *Listeria monocytogenes*, monoclonal antibodies, milk

For citation. Kiseleva E. P., Mikhailopulo K. I., Sviridov O. V. Design and analytical characteristics of a new enzyme-linked immunosorbent assay system for the detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2026, vol. 62, no. 2, pp. 132–141 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-2-132-141>

Введение. Обнаружение *Listeria monocytogenes* (LM) в продуктах питания актуально в связи с известными случаями эпидемий листериоза [1–3]. Минимальная инфекционная доза LM составляет 100 колониеобразующих единиц (КОЕ) на грамм пищи; общая инфекционная доза LM для здорового человека находится в диапазоне 10^7 – 10^9 КОЕ/г, а диапазон риска заражения составляет 10^5 – 10^7 КОЕ/г [4]. В соответствии с принятыми нормами LM должна отсутствовать в образце массой 25 г готовой к употреблению пищи [5].

Для обнаружения LM широко используются иммунохимические методы, включая иммуноферментный анализ (ИФА). Традиционно коммерческие наборы, основанные на ИФА в формате «сэндвич», выявляют антигены LM, находящиеся в клеточной мембране бактерий. Анализируемый биоматериал представляет собой клетки и питательную среду. Подтверждением служат 11 коммерческих иммунохимических наборов реагентов для обнаружения *Listeria* spp. и/или LM в продуктах питания (Solus *Listeria* ELISA, Solus *Listeria monocytogenes* ELISA, TRANSIA Plate *Listeria* и др.), зарегистрированных во Французской ассоциации по стандартизации (Association Française de Normalisation, AFNOR), являющейся членом Международной организации по стандартизации от Франции [6]. Указанные наборы реагентов представляют собой ИФА-тесты в формате «сэндвич» с колориметрической/флуориметрической детекцией.

Как правило, аналитическая чувствительность описанных в литературе и коммерческих тест-систем для обнаружения LM в продуктах питания методом ИФА составляет 10^5 – 10^6 КОЕ/мл [7]. Более высокая чувствительность ИФА для обнаружения бактерии достигалась при использовании МАт, полученных в результате иммунизации мышей рекомбинантными белками LM, а именно интерналином G (предел обнаружения равен 32 нг/мг для белка InlG или 7 875,83 КОЕ/мл LM) [8], интерналином А и В (предел обнаружения 10^3 КОЕ/мл LM) [9], белком р60, секретируемым LM (предел обнаружения 10^3 КОЕ/мл LM) [10].

Ранее нами разработана тест-система для обнаружения LM в продуктах питания методом конкурентного ИФА с аналитической чувствительностью $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл и коэффициентом вариации 6 ± 2 % [11]. Для выявления бактерии использовали коммерческие моноклональные антитела (МАт) LZG7, взаимодействующие с неидентифицированным мембранным белком LM с молекулярной массой 23 кДа (Pr₂₃) (производитель МАт LZG7 использовал в качестве иммуногена целые клетки LM).

Тест-система отличается от известных аналогов (коммерческих и описанных в научных исследованиях) двумя конструктивными особенностями: мембранно-свободная фракция клеток LM (МСФ, цитозоль) иммобилизована на твердой фазе; анализируемым биоматериалом является среда, в которой выращивались бактерии.

Указанные выше особенности тест-системы основаны на установлении пропорции распределения целевого антигена Pr₂₃ в системе цитозоль–мембрана клетки–среда, установленной методами прямого и конкурентного ИФА с использованием МАт LZG7 в качестве детектирующего реагента [11]. Приняв общее количество Pr₂₃ в системе равным 100 %, показано, что максимальная концентрация Pr₂₃ наблюдается в МСФ – 67,82–92,15 % в зависимости от серотипа LM (1/2a, 1/2c, 4b). Мембрана клетки содержит не более 2 % Pr₂₃, а среда – 6,83–30,83 % Pr₂₃ [11].

Преимуществами иммобилизации МСФ по сравнению с клетками или мембранами являются, во-первых, значительно более высокая концентрация антигена, чем в мембранах, а следовательно, и на поверхности клеток, во-вторых, истинный раствор, а не суспензия, что обеспечивает равномерность покрытия и снижает значения коэффициента вариации. Преимущества использования в качестве анализируемого биоматериала среды (в противоположность биоматериалу клетки + среда) те же, что указаны выше; результатом также является снижение значения коэффициента вариации.

Цель работы – адаптация тест-системы для обнаружения LM в молоке.

Материалы и методы. Бактерии. В работе использовали LM серотипов 4b, 1/2a и 1/2c, полученные в Республиканском научно-практическом центре эпидемиологии и микробиологии (Минск, Беларусь). Бактерии сначала выращивали на оксфордском агаре (Sigma-Aldrich, США), а затем высевали на среду триптон-соевый агар (ТСА) (Biomedia, Россия). Для каждой среды инкубацию проводили при температуре 37 ± 1 °C в течение 24 ± 3 ч. Бактерии смывали с чашек Петри 0,9%-м раствором NaCl.

Бактерии идентифицировали с помощью автоматического микробного анализатора VITEK-2 Compact (BioMérieux, SA, Франция). Подсчет клеток проводили с помощью камеры Горяева. Концентрация клеток в зависимости от серотипа составила $(0,4–0,9) \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

После промывки собранные бактерии инактивировали нагреванием при 80 °С в течение 20 мин, что подтверждалось отсутствием роста LM в указанных питательных средах. Бактерии хранили в 0,2%-м растворе мертиолята при температуре 4 °С для использования в ИФА.

Антитела. Использовали мАт LZG7 (Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения). На основании результатов, полученных с помощью электрофореза в 15 % SDS-ПААГ в восстанавливающих условиях с последующим иммуноблоттингом, производитель мАт LZG7 утверждает, что они взаимодействуют с неидентифицированным белком LM с молекулярной массой 23 кДа (далее Pr₂₃), присутствующим в лизате клеток и клеточной мембране.

Буферные растворы были такими же, как и в предыдущем исследовании [12]. Инкубационный буфер (ИБ) – 0,05 М Трис, pH 7,7; 0,15 М NaCl; 0,01 % Твин 20; 0,1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА); 0,1 % казеин-пептон; 0,1 % эуксил К-100. Промывочный буфер (ПБ) – 0,025 М Трис, pH 7,7; 0,15 М NaCl; 0,1 % Твин 20. Буфер для адсорбции (АБ) цитозоля LM в лунках микропланшета – 0,01 М фосфат натрия, pH 7,5. Раствор для стабилизации покрытия (РСП) – 0,05 М фосфат натрия, pH 7,5; 0,15 М NaCl; 5 % сахарозы; 2 % сорбита; 0,1 % БСА; 0,05 % Твин 20 и 0,1 % NaN₃.

Микропланшеты и их функционализация. Во всех тестах ИФА использовались микропланшеты Greiner Bio-One (арт. 762071, 12хF8, полистирол, F-дно, прозрачные, с высокой степенью связывания, Microlon® 600).

Функционализацию микропланшетов проводили следующим образом. МСФ одного из серотипов LM (1/2a, 1/2c, 4b), полученную как указано в работе [11], раствор в АБ, $D_{260} = 2,5$ в кювете с длиной оптического пути 1 см вносили в лунки микропланшета (100 мкл на лунку) и выдерживали при комнатной температуре в течение ночи. Содержимое лунок удаляли, планшет промывали пять раз по 250 мкл на лунку ПБ. РСП вносили во все лунки (200 мкл на лунку) и выдерживали при комнатной температуре в течение ночи. Содержимое лунок удаляли. Планшеты высушивали при комнатной температуре в течение ночи и запечатывали с помощью вакуумного упаковщика HVC-260T/1A (Hualian, Китай).

Конкурентный ИФА для детекции LM в культуральной среде. Калибровочные пробы ($n = 9$) готовили методом серийных разведений (коэффициент разведения 3). В качестве исходного материала использовались среда LM 1/2a, среда LM 1/2c, среда LM 4b и ИБ. Концентрации калибровочных проб – $(7,6 \cdot 10^3 – 5,0 \cdot 10^7)$ КОЕ/мл.

Раствор мАт LZG7 был приготовлен с использованием ИБ; концентрация составила 0,5 мкг/мл, что в два раза превышало конечную концентрацию, ожидаемую в лунке.

Калибровочные пробы B₁–B₉ добавляли в соответствующие лунки планшета (по 50 мкл на лунку, в дубликатах). ИБ добавляли в одну пару лунок (по 50 мкл на лунку, проба B₀). Раствор мАт LZG7 добавляли во все лунки B_n и B₀ (по 50 мкл на лунку) с помощью многоканальной пипетки.

Микропланшет оставляли на ночь при комнатной температуре (1-й этап ИФА). Содержимое лунок удаляли, а лунки промывали ПБ (по 250 мкл на лунку) три раза.

В каждую лунку добавляли по 100 мкл раствора конъюгата «поликлональные Ат козы против иммуноглобулинов мыши–пероксидаза хрена» (GaM-HRP) (Sigma-Aldrich, США) с заранее выбранным титром и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С (2-й этап ИФА). Содержимое лунок удаляли, а планшет промывали, как описано выше.

Ферментативная реакция HRP была проведена и остановлена, значения оптической плотности при длине волны 450 нм (density, D_{450}) раствора в лунках были измерены [12]. Для каждой серии лунок значения B_n/B₀ (%) были рассчитаны в Excel. Была проведена серия из трех независимых экспериментов одним и тем же исследователем.

Конкурентный ИФА для детекции LM в молоке. В работе использовали семь образцов молока, произведенного в Республике Беларусь: молоко питьевое стерилизованное для детского питания жирностью 3,2 % (ОАО «Рогачевский молочноконсервный комбинат», Рогачев (образец 1), ОАО «Беллакт», Волковыск (образец 2), ОАО «Минский молочный завод № 3», Минск

(образец 5)), молоко питьевое ультрапастеризованное для детского питания жирностью 3,5 % (ОАО «Бабушкина крынка», Могилев (образец 4)), молоко питьевое стерилизованное жирностью 3,2 % (ОАО «Бабушкина крынка», Могилев (образец 3)), молоко питьевое пастеризованное «Минская марка» жирностью 3,3 % (ОАО «Минский молочный завод № 1», Минск (образец 6)), молоко питьевое ультрапастеризованное «Брест-Литовск» жирностью 3,6 % (ОАО «Савушкин продукт», Брест (образец 7)).

Из молока удаляли жир. Для этого по 10 мл каждого вида молока помещали в центрифужные пробирки и центрифугировали при 4 800 g в течение 15 мин при температуре 10 °С на центрифуге Beckman Coulter Microfuge 18 (Sigma, Германия). Жировую пленку с поверхности молока удаляли шпателем.

Каждый вид обезжиренного молока разливали в отдельные флаконы по 2 мл и лиофилизировали с помощью сушки Free Zone 12 Dryer (Labconco, США). Непосредственно перед ИФА образцы обезжиренного молока восстанавливали, добавляя в каждый флакон по 2 мл дистиллированной воды и перемешивая до полного растворения.

Помимо ИБ, состав которого указан выше, использовали буферные растворы, отличающиеся наличием дополнительных компонентов или иной концентрацией уже присутствующих в ИБ компонентов, а именно: 0,1 % Твин (ИБ1), 0,1 % дезоксихолат натрия (ИБ2), 0,35 М NaCl (ИБ3).

В каждый ИБ (ИБ, ИБ1, ИБ2, ИБ3) добавляли восстановленное обезжиренное молоко до концентрации 10 % в конечном объеме. Растворы ИБ, содержащие 1 и 0,2 % обезжиренного молока, готовили методом серийных разведений. Растворы обозначали как ИБ+ОМ, ИБ1+ОМ, ИБ2+ОМ, ИБ3+ОМ, где концентрация обезжиренного молока указывалась в процентах.

Использовали те же функционализированные микропланшеты. Калибровочные пробы (B_0 , B_1 – B_9), приготовленные с использованием вышеупомянутых ИБ (ИБ, ИБ1, ИБ2, ИБ3), добавляли в соответствующие лунки планшета (по 50 мкл на лунку, в двух повторах) в соответствии с ранее разработанной схемой. Раствор МАТ LZG7 (во всех случаях в ИБ) добавляли во все лунки B_n и B_0 (по 50 мкл на лунку, 0,25 мкг/мл МАТ в конечном объеме в лунке) с помощью многоканальной пипетки.

Микропланшет оставляли на ночь при комнатной температуре (1-я стадия ИФА). Содержимое лунок удаляли; лунки промывали и завершали ИФА, как описано выше. Для каждой серии лунок значения B_n/B_0 (%) рассчитывали в Excel. Была проведена серия из трех независимых экспериментов одним и тем же исследователем.

Аналитическая чувствительность (нижний предел обнаружения) и коэффициент вариации конкурентного ИФА-теста. Аналитическую чувствительность (нижний предел обнаружения) ИФА-теста определяли с помощью графика в координатах $Oy - D_{450}$, Ox – концентрация клеток, КОЕ/мл. Сначала рассчитывали значения стандартного отклонения (standard deviation, SD) по формуле (1) для препаратов «среда», соответствующих концентрации клеток LM, равной $5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, в каждой повторности по 12:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (B_i - \bar{B})^2}{n - 1}}, \quad (1)$$

где B_i – значение D_{450} каждого измерения в лунках с образцом; $\bar{B}$ – среднее арифметическое значение D_{450} в лунках с образцом; n – количество измерений.

Далее строили калибровочный график в системе координат $Oy - D_{450}$, Ox – концентрация аналита, lg (КОЕ/мл), и от точки B_0 вниз по оси Oy откладывали отрезок, равный $3 \cdot SD$. Через полученную точку проводили прямую, параллельную оси Ox , до пересечения с калибровочной кривой. Координата этой точки на оси Ox соответствовала искомому значению аналитической чувствительности.

Коэффициент вариации (coefficient of variation, CV, относительное стандартное отклонение, %), рассчитывали по формуле (2):

$$CV = SD / \bar{B} \cdot 100, \quad (2)$$

где SD – стандартное отклонение; $\bar{B}$ – среднее арифметическое значение D_{450} в лунках с образцом.

Результаты и их обсуждение. Конструкция тест-системы для конкурентного ИФА ЛМ. Использовались серотипы LM 4b, 1/2a и 1/2c (Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Беларусь), поскольку они представляют собой большинство клинических изолятов и изолятов из образцов продуктов питания, продаваемых в розничных магазинах. Для выявления ЛМ использовали мАт LZG7 (Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Россия). Производитель мАт LZG7 заявляет, что они взаимодействуют с неидентифицированным мембранным белком ЛМ с молекулярной массой 23 кДа (Pr_{23}).

Конструкция тест-системы представлена на рис. 1. МСФ иммобилизовали на твердой фазе в заранее подобранном разведении (титр 1/50 от исходного препарата МСФ). На 1-й стадии анализа МСФ инкубировали с мАт LZG7 (в заранее подобранной концентрации 0,25 мкг/мл) в присутствии конкуратора (калибровочные пробы или анализируемые образцы (среда)). На 2-й стадии анализа детектировали мАт LZG7 в составе иммунных комплексов с иммобилизованным Pr_{23} с использованием конъюгата GaM-HRP. Количество иммунных комплексов на твердой фазе было обратно пропорционально концентрации Pr_{23} в калибровочных пробах или анализируемых образцах.

Калибровочные графики тест-системы для обнаружения ЛМ в культуральной среде методом конкурентного ИФА представлены на рис. 2. Очевидно, что высокая аналитическая чувствительность, равная $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, достигалась на 1-й стадии ИФА при комнатной температуре в течение ночи. Более быстрый анализ, популярный среди потребителей коммерческих ИФА-наборов для детекции патогенов в продуктах питания (1-я стадия ИФА при 37 °C в течение 2 ч), приводил к снижению аналитической чувствительности до $4 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, типичной для аналогичных тест-систем, описанных в других работах в соответствии с обзором [7].

Конкурентный ИФА для обнаружения ЛМ в молоке. Адаптируя ИФА-тест для использования специалистами по контролю качества пищи, остановились на молоке, поскольку молоко и молочные продукты наряду с мясными занимают первые места в списке продуктов, вызывающих зарегистрированные вспышки листериоза [7, 13].

Согласно инструкциям по применению коммерческих наборов реагентов для обнаружения листерий в продуктах питания методом ИФА (например, BACSpec *Listeria* и Solus *Listeria* ELISA [6]) выращивание бактерий осуществляется в два этапа.

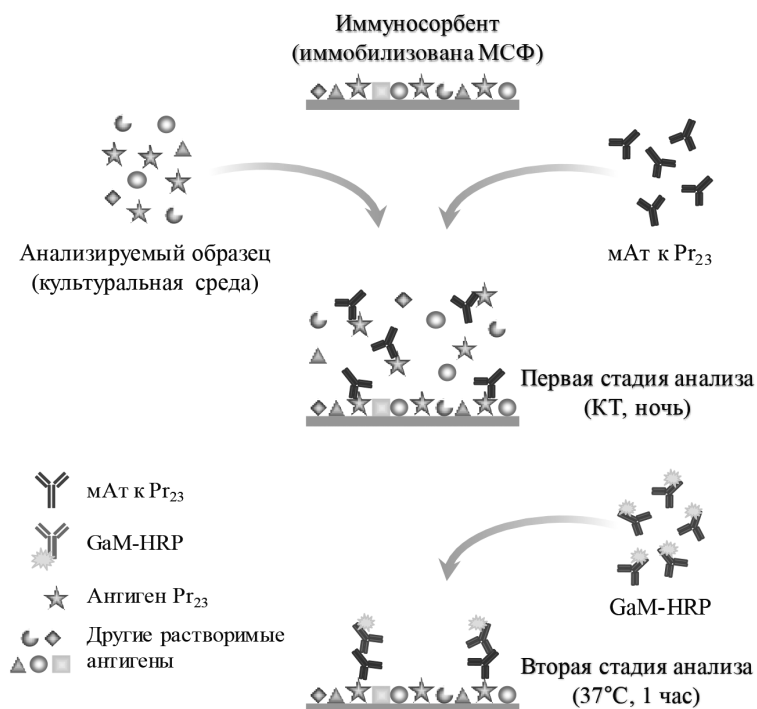


Рис. 1. Конструкция тест-системы для обнаружения ЛМ в культуральной среде методом конкурентного ИФА

Fig. 1. Design of a test system for detecting LM in a culture medium by competitive ELISA

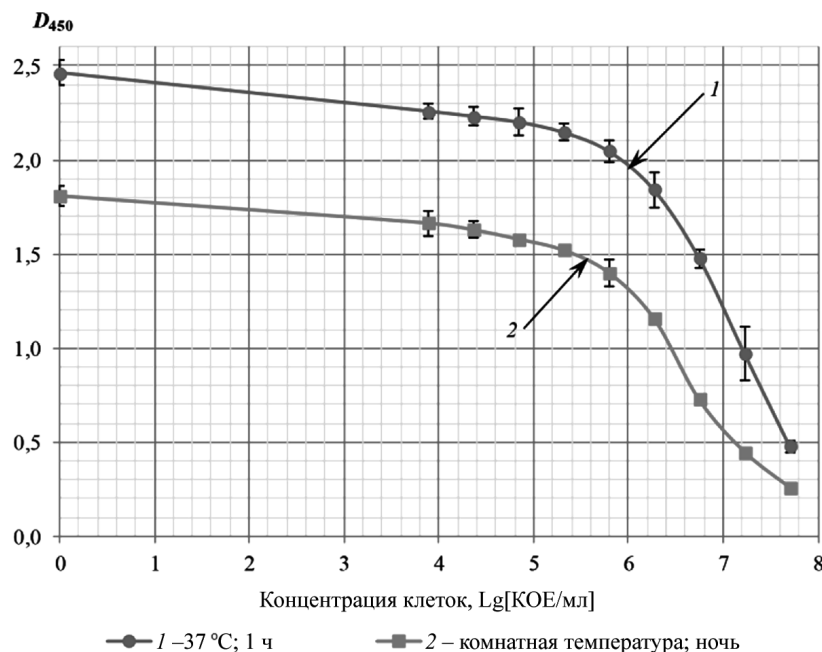


Рис. 2. Калибровочные графики конкурентного ИФА для обнаружения ЛМ в культуральной среде (МСФ серотипа 1/2а ЛМ была иммобилизована; 1-ю стадию ИФА (образование иммунных комплексов) проводили при температуре 37 °С в течение 1 ч со встряхиванием (1) или при комнатной температуре в течение ночи без встряхивания (2); значения SD рассчитывали стандартным методом; значения 3SD использовали для расчета аналитической чувствительности графическим методом)

Fig. 2. Calibration curves of competitive ELISA for LM detection in culture medium (membrane free fraction of 1/2a LM serotype was immobilized; the first stage of ELISA (immune complex formation) was performed at 37 °C for 1 hour with shaking (1) or at room temperature overnight without shaking (2); SD values were calculated using the standard method; 3SD values were used to calculate analytical sensitivity using the graphical method)

На первом этапе (предварительное обогащение) x граммов исследуемого образца гомогенизируют и инкубируют в течение 24 ± 2 ч в 9х мл среды Listeria Half-Fraser Broth при температуре 30 ± 1 °С (концентрация образца продукта питания составляет 10 %). На втором (селективное обогащение) – 0,2 мл/0,25 мл обогащенного образца (BACSpec Listeria/Solus Listeria ELISA) переносят в 10 мл Rapid Enrichment Listeria Media (RELM) и инкубируют в течение 24 ± 2 ч при температуре 30 ± 1 °С (концентрация образца продукта питания составляет 0,2–0,25 %). Затем в лунки ИФА-планшета вносят по 0,1 мл каждого прокипяченного охлажденного образца.

Исследовалось влияние молока на взаимодействие мАт LZG7 с иммобилизованным Pr₃₅, содержащимся в МСФ ЛМ. Для этого каждый из семи видов обезжиренного молока добавляли в ИБ (концентрация обезжиренного молока в конечном объеме 0,2, 1 и 10 %), после чего эти растворы вносили в лунки планшета с иммобилизованной МСФ ЛМ 1/2а в количестве 50 мкл на лунку. Затем в каждую лунку добавляли мАт LZG7 (по 50 мкл на лунку, в ИБ, в концентрации 0,25 мкг/мл, выбранной в качестве оптимальной). Оказалось, что обезжиренное молоко в концентрации 0,2, 1 и 10 % вызывает значительное снижение связывания мАт LZG7 с иммобилизованным Pr₃₅, содержащимся в МСФ ЛМ, причем количественный эффект снижения одинаков для 1 и 10 % обезжиренного молока. При всех концентрациях обезжиренного молока его эффект почти не зависит от образца молока ($n = 7$) (рис. 3, а).

Наблюдаемое явление известно как матричный эффект, то есть влияние компонентов образца, кроме целевого анализата, на результаты анализа. Мы предположили, что компоненты молока неспецифически взаимодействуют с иммобилизованным антигеном/другими компонентами иммобилизованного МСФ/мАт LZG7, предотвращая образование иммунного комплекса. Традиционным методом снижения неспецифических взаимодействий в ИФА является использование относительно высоких концентраций NaCl (0,35 против 0,15 М) и детергентов (0,2 % Твин

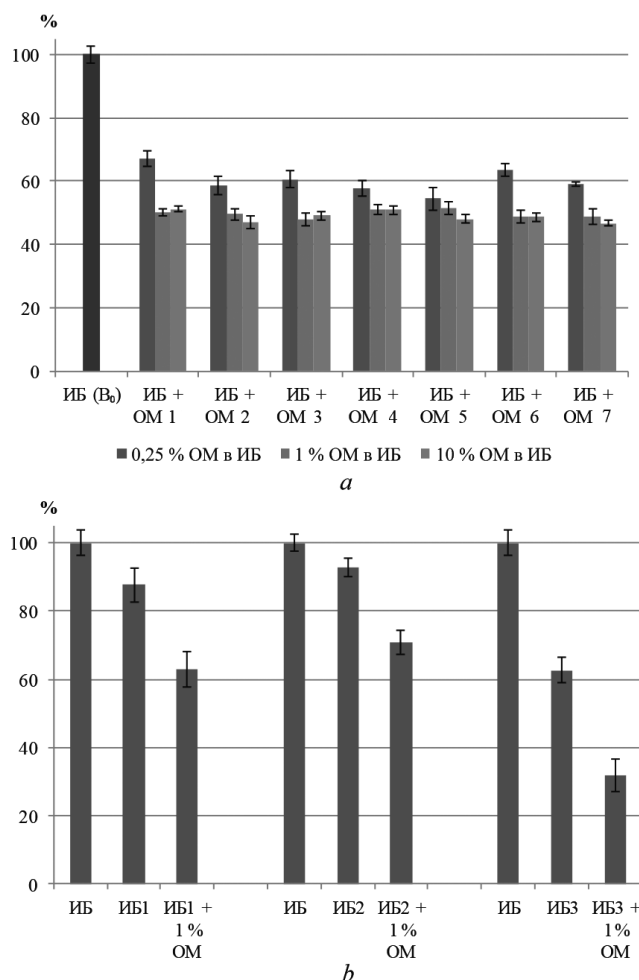


Рис. 3. Зависимость значений D_{450} в лунках, соответствующих точке B_0 калибровочного графика, от состава ИБ (*b*) и наличия 1 % обезжиренного молока в жидкой фазе (*a*, *b*) (значение D_{450} в лунках с ИБ принимали за 100 %; ИБ1–ИБ3 – инкубационные буферные растворы, отличающиеся от ИБ наличием дополнительных компонентов или иной концентрацией компонентов, уже присутствующих в ИБ, а именно 0,1 % Твин (ИБ1), 0,1 % дезоксихолат натрия (ИБ2), 0,35 М NaCl (ИБ3); ОМ – обезжиренное молоко, смесь 7 образцов молока, производимого в Республике Беларусь)

Fig. 3. Dependence of D_{450} values in the wells corresponding to point B_0 of the calibration graph on the composition of the IB (*b*) and the presence of 1 % milk in the liquid phase (*a*, *b*) (the D_{450} value in wells containing IB was taken as 100 %; IB1–IB3 – are incubation buffer solutions that differ from IB by the presence of additional components or a different concentration of components already present in the IB, namely 0.1% Tween (IB1), 0.1 % sodium deoxycholate (IB2), 0.35 M NaCl (IB3); 1 % skim milk ((7 types of milk produced in the Republic of Belarus) used as a component of IB1–IB3)

20/дезоксихолат натрия против 0,01 % Твин 20). В результате ослабляются ионные (NaCl) и гидрофобные (детергенты) взаимодействия.

По нашему мнению, указанные выше изменения состава ИБ приведут к снижению связывания мАт LZG7 с иммобилизованным Pr_{35} (фактически – к снижению D_{450}), однако последующее добавление обезжиренного молока уже не окажет влияния на образование иммунного комплекса. Действительно, изменение состава ИБ приводило к снижению связывания мАт с иммобилизованным Pr_{35} , содержащимся в МСФ LM, но добавление обезжиренного молока в систему приводило к дополнительному снижению D_{450} (рис. 3, *b*).

Поскольку семь образцов молока (и, предположительно, другие виды молока) в концентрации 1 % оказывают сходное действие на образование иммунного комплекса, было решено сделать молоко в этой концентрации (в нашем случае смесь семи образцов обезжиренного молока) компонентом ИБ при приготовлении калибровочных проб. Была выбрана именно эта концентрация обезжиренного молока в калибровочных пробах, так как более высокая его концентрация не приводит к дополнительному снижению значений D_{450} (см. рис. 3, *a*). Схема пробоподготовки, предшествующей обнаружению LM в молоке методом конкурентного ИФА, представлена на рис. 4.

Кроме того, при выборе 1 % обезжиренного молока в качестве компонента ИБ, уменьшается фактор разбавления среды, содержащей листерии, в пять раз по сравнению с обычно используемым (1 : 10 : 10 (рис. 4) против 1 : 10 : 50 в наборах BACSpec *Listeria* и Solus *Listeria* ELISA [6]), и увеличивается концентрация среды, содержащей Pr_{35} , в лунке. В результате возрастает вероятность того, что концентрация Pr_{35} (пропорциональная концентрации LM, КОЕ/мл), находящегося в лунке в составе анализируемого образца, попадет в рабочий диапазон калибровочного графика.



Рис. 4. Схема пробоподготовки, предшествующей обнаружению LM в молоке методом конкурентного ИФА

Fig. 4. Scheme of sample preparation preceding the detection of LM in milk by competitive ELISA

Калибровочные графики, полученные с использованием калибровочных проб, содержащих ИБ с 1 % обезжиренного молока и ИБ без обезжиренного молока, представлены на рис. 5. Аналитическая чувствительность ИФА в обоих случаях совпадает, а увеличение сигнала (D_{450}), относительно невысокого по меркам ИФА, может быть достигнуто за счет увеличения концентрации конъюгата GaM-HRP, используемого для обнаружения мАт LZG7, связавшегося с иммобилизованным Pr₂₃.

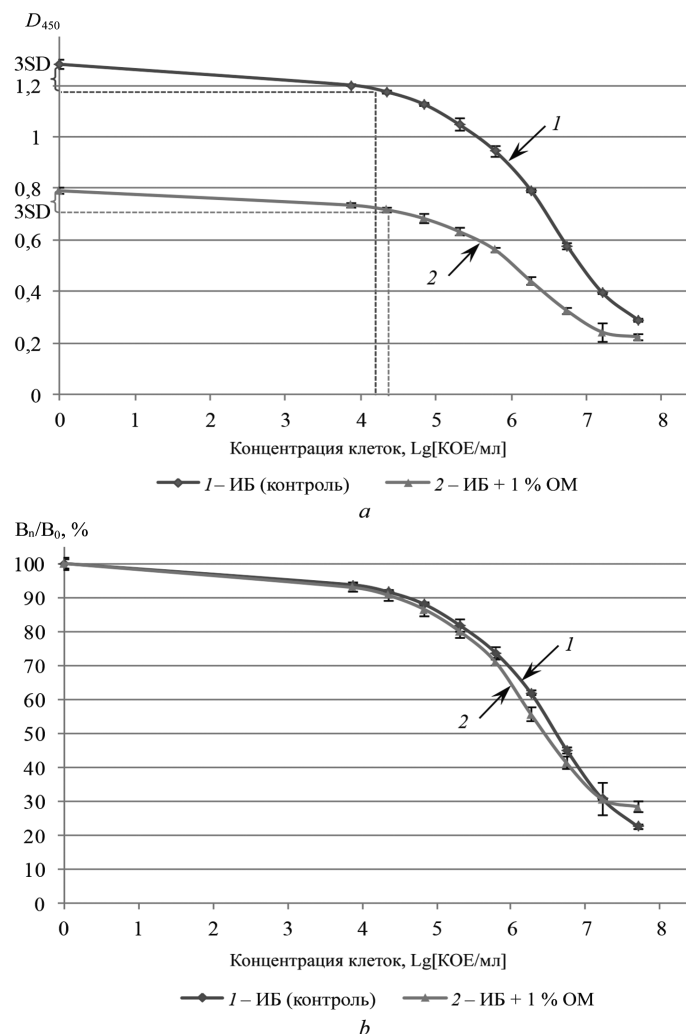


Рис. 5. Калибровочные кривые конкурентного ИФА для детекции LM в молоке, представленные в двух системах координат (а и б) (значения SD рассчитывали стандартным методом; значения 3SD использовали для расчета аналитической чувствительности графическим методом (а, 1, 2); МСФ LM 1/2a иммобилизовали на твердой фазе, анализируемым биоматериалом служила среда LM 1/2a; калибровочные пробы готовили с использованием ИБ (1, контроль) и ИБ, содержащего 1 % обезжиренного молока (2))

Fig. 5. Calibration curves of competitive ELISA for detection of LM in milk, presented in two coordinate systems (a and b) (SD values were calculated using the standard method; 3SD values were used to calculate the analytical sensitivity using the graphical method (a, 1, 2); LM 1/2a membrane free fraction was immobilized on a solid phase, the analyzed biomaterial was LM 1/2a medium. Calibration samples were prepared using IB (1, control) and IB containing 1 % milk (2))

Заклучение. Ранее нами была разработана тест-система для обнаружения ЛМ в продуктах питания методом конкурентного ИФА, имеющая высокую аналитическую чувствительность, равную $\sim 10^4$ КОЕ/мл. Тест-система отличается от известных аналогов (коммерческих и описанных в научных исследованиях) двумя конструктивными особенностями: МСФ клеток ЛМ иммобилизована на твердой фазе; анализируемым биоматериалом служит среда, в которой выращивались бактерии.

Адаптируя тест ИФА для определения качества продуктов питания, использовали молоко.

Обнаружено что молоко в исследуемых образцах оказывает выраженный матричный эффект на взаимодействие антител с иммобилизованным антигеном, который невозможно устранить традиционными подходами, используемыми в ИФА. Матричный эффект был устранен при добавлении в ИБ 1 % обезжиренного молока. Выбор последнего в качестве компонента ИБ позволяет снизить кратность разведения среды, содержащей ЛМ из исследуемого молока, в пять раз, тем самым увеличивая вероятность того, что концентрация ЛМ, находящейся в лунке в составе анализируемого образца, попадет в рабочий диапазон калибровочного графика. Аналитическая чувствительность ИФА почти не изменилась по сравнению с ИФА в ИБ без молока и составила $\sim 10^4$ КОЕ/мл.

Список использованных источников

1. Listeriosis – Annual Epidemiological Report for 2022 // European Centre for Disease Prevention and Control. – 2024. – URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/listeriosis-annual-epidemiological-report-2022> (date of access: 14.10.2025).
2. The epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China / W. Li, L. Bai, P. Fu [et al.] // Foodborne Pathogens and Disease. – 2018. – Vol. 15. – P. 459–466. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2409>
3. Listeriosis outbreak in South Africa: a comparative analysis with previously reported cases worldwide / C.-D. K. Tchat-chouang, J. Fri, M. de Santi [et al.] // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 135. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010135>
4. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments / R. L. Buchanan, L. G. M. Gorris, M. M. Hayman [et al.] // Food Control. – 2017. – Vol. 75. – P. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
5. Commission regulation (EU) 2024/2895 of 20 November 2024 amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards *Listeria monocytogenes* // Official Journal of the European Union. – 2024/2895. – URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32024R2895> (date of access: 14.10.2025).
6. Validation of Alternative Analysis Methods – Application to Foodstuffs (NF102). – Iss. on 06-05-2025. – URL: <https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2025/05/List-valid-2025-05-06.pdf>. (date of access: 14.10.2025).
7. Recent advances in the detection of *Listeria monocytogenes* / P. Adhikari, N. Florien, S. Gupta, A. Kaushal // Bacterial Infectious Diseases Annual Volume 2023 / eds.: K. Garbacz, T. Jarzembowski. – IntechOpen, 2023. <https://doi.org/10.5772/intechopen.109948>
8. Development of an internalin-based double-antibody sandwich quantitative ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes* in slaughterhouse environments / Q. Cao, W. Shi, Y. Wei [et al.] // Frontiers in Veterinary Science. – 2025. – Vol. 12. – P. 1517845. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1517845>
9. Detection of *Listeria monocytogenes* using an immunochromatographic point of care test based on anti-internalin A and B antibodies and a nano-biotinylated detection complex / L. Lopes-Luz, M. Mendonça, M. B. Fogaça [et al.] // LWT – Food Science and Technology. – 2023. – Vol. 188. – Art. 115336. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115336>
10. Development of a highly specific sandwich ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes*, an important food-borne pathogen / J. Couture, C. Morissette, S. d'Auria, M. Lacroix // Microbiology Research International. – 2014. – Vol. 2, № 4. – P. 46–52. – URL: <https://www.netjournals.org/pdf/MRI/2014/4/14-017.pdf> (date of access: 14.10.2025).
11. Kiseleva, E. New test system for detection of *Listeria monocytogenes* in foods by competitive ELISA: features of solid phase preparation and analysis conditions / E. Kiseleva, K. Mikhailopulo, O. Sviridov // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : материалы XIV Междунар. науч. конф., Минск, 2–7 июня 2025 г. – Мн. : Бел. навука, 2025. – С. 147–149.
12. Kiseleva, E. Detection of *Salmonella* by competitive ELISA of lipopolysaccharide secreted into the culture medium / E. Kiseleva, K. Mikhailopulo, O. Sviridov // Analytical Biochemistry. – 2025. – Vol. 697. – Art. 115695. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2024.115695>
13. *Listeria monocytogenes* in food production and food safety: a review / I. O. Adebesein, S. O. Amoka, C. R. Olomoko [et al.] // Journal of Food Science and Nutrition Therapy. – 2024. – Vol. 10, № 1. – P. 057–068. <https://doi.org/10.17352/jfsnt.000050>

References

1. European Centre for Disease Prevention and Control. *Listeriosis- Annual Epidemiological Report for 2022*. 2024. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/listeriosis-annual-epidemiological-report-2022> (accessed 14 October 2025).
2. Li W., Bai L., Fu P., Han H., Liu J., Guo Y. The epidemiology of *Listeria monocytogenes* in China. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2018, vol. 15, pp. 459–466. <https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2409>
3. Tchatchouang C.-D. K., Fri J., de Santi M., Brandi G., Schiavano G.F., Amagliani G., Ateba C.N. Listeriosis outbreak in South Africa: a comparative analysis with previously reported cases worldwide. *Microorganisms*, 2020, vol. 8, art. 135. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010135>
4. Buchanan R. L., Gorris L. G. M., Hayman M. M., Jackson T. C., Whiting R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 2017, vol. 75, pp. 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>
5. Commission regulation (EU) 2024/2895 of 20 November 2024 amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards *Listeria monocytogenes*. *Official Journal of the European Union*, 2024/2895. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32024R2895> (accessed 14 October 2025).
6. *Validation of Alternative Analysis Methods - Application to Foodstuffs (NF102)*. Issue 06-05-2025. Available at: <https://nf-validation.afnor.org/wp-content/uploads/2025/05/List-valid-2025-05-06.pdf>. (accessed 14 October 2025).
7. Adhikari P., Florian N., Gupta S., Kaushal A. Recent advances in the detection of *Listeria monocytogenes*. Garbacz K., Jarzembowski T. (eds). *Bacterial Infectious Diseases*. IntechOpen, 2023. <https://doi.org/10.5772/intechopen.109948>
8. Cao Q., Shi W., Wei Y., Wang J., Wang Z., Chong Q., Guo Q., Zhang K., Gai W., Gou H., Xue H. Development of an internalin-based double-antibody sandwich quantitative ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes* in slaughterhouse environments. *Frontiers in Veterinary Science*, 2025, vol. 12, art. 1517845. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1517845>
9. Lopes-Luz L., Mendonça M., Fogaça M. B., Saavedra D. P., Bentivoglio-Silva Br. G., Conceição F. R., de Araújo Stefani M. M., Kipnis A., Bühner-Sékula S. Detection of *Listeria monocytogenes* using an immunochromatographic point of care test based on anti-internalin A and B antibodies and a nano-biotinylated detection complex. *LWT – Food Science and Technology*, 2023, vol. 188, art. 115336. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115336>
10. Couture J., Morissette C., d'Auria S., Lacroix M. Development of a highly specific sandwich ELISA for the detection of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Microbiology Research International*, 2014, vol. 2, no. 4, pp. 46–52. Available at: <https://www.netjournals.org/pdf/MRI/2014/4/14-017.pdf> (accessed 14 October 2025).
11. Kiseleva E., Mikhailopulo K., Sviridov O. New test system for detection of *Listeria monocytogenes* in foods by competitive ELISA: features of solid phase preparation and analysis conditions. *Mikrobnye biotekhnologii: fundamentalnye i prikladnye aspekty. Mater. XIV Mezhdunarodnoj nauchnoj konferencii* [Microbial biotechnology: fundamental and applied aspects. Proceedings of the XIV International Scientific Conference, Minsk, June 2–7, 2025]. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2025, pp. 147–149 (in Russian).
12. Kiseleva E., Mikhailopulo K., Sviridov O. Detection of *Salmonella* by competitive ELISA of lipopolysaccharide secreted into the culture medium. *Analytical Biochemistry*, 2025, vol. 697, art. 115695. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2024.115695>
13. Adebisin I. O., Amoka S. O., Olomoko C. R., Olubunmi O. H., Balogun A.O. *Listeria monocytogenes* in food production and food safety: a review. *Journal of Food Science and Nutrition Therapy*, 2024, vol. 10, pp. 057–068. <https://doi.org/10.17352/jfsnt.000050>

Информация об авторах

Киселева Елена Павловна – кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: epkiseleva@iboch.by

Михайлопуло Константин Игоревич – старший научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: k.mikhailopulo@iboch.by

Свиридов Олег Васильевич – доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sviridov@iboch.by

Information about the authors

Kiseleva Elena P. – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: epkiseleva@iboch.by

Mikhailopulo Konstantin I. – Senior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: k.mikhailopulo@iboch.by

Sviridov Oleg V. – Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Head of Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sviridov@iboch.by