

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 579.842.14:577.213.3+57.083+543.06
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-4-314-325>

Поступила в редакцию 17.11.2023
Received 17.11.2023

**Т. С. Серченя¹, Е. В. Охремчук², Л. Н. Валентович²,
В. С. Лапина¹, О. В. Свиридов¹**

¹Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
²Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

**КОМБИНИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
И ИММУНОАНАЛИЗА С ВРЕМЯРАЗРЕШЕННОЙ ФЛУОРИМЕТРИЕЙ
ИЛИ МЕМБРАННОЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЕЙ
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК БАКТЕРИЙ
*SALMONELLA ENTERICA***

Аннотация. Разработаны и исследованы четыре модельные биоаналитические системы, специфичные к бактериям *Salmonella enterica*, в которых в результате полимеразной цепной реакции (ПЦР) продуцировался содержащий остатки биотина и флуоресцеина ампликон ДНК. Это позволило иммобилизовать ампликон в функционализированной твердой фазе и биоспецифически пометить хелатом европия в микропланшетах или золотыми наночастицами на хроматографической мембране. Количественная детекция модифицированной ДНК осуществлялась в системах иммуноанализа с времяразрешенной флуоресценцией Eu^{3+} (лантанидный иммунофлуоресцентный анализ, ЛИФМА, DELFIA) или с фотометрией окрашенной зоны на хроматографической полоске (ИХА). Разработаны и исследованы три пары праймеров для получения выбранных фрагментов гена *invA*, присутствующего в геномах всех патогенных сальмонелл. Установлена их пригодность для тест-систем. В микропланшетной системе ЛИФМА диапазон определяемых концентраций полученного ампликона ДНК составил 0,01–10,0 нМ, а предел обнаружения оказался равным 2 пМ. Предел визуальной детекции ампликонов ДНК в ИХА составил 0,05 нМ. Показана возможность проведения тестирования ампликонов без дополнительного выделения ДНК в чистом виде из реакционной смеси. Установлена высокая специфичность разработанных биоаналитических систем для детекции *Salmonella enterica* различных серотипов.

Ключевые слова: патогенные бактерии, *Salmonella enterica*, полимеразная цепная реакция, иммуноанализ с времяразрешенной флуориметрией, иммунохроматографический анализ

Для цитирования. Комбинированные системы полимеразной цепной реакции и иммуноанализа с времяразрешенной флуориметрией или мембранной иммунохроматографией для количественного определения ДНК бактерий *Salmonella enterica* / Т. С. Серченя [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2024. – Т. 60, № 4. – С. 314–325. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-4-314-325>

T. S. Serchenya¹, K. U. Akhremchuk², L. N. Valentovich², V. S. Lapina¹, O. V. Sviridov¹

¹Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
²Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

**COMBINED SYSTEMS OF POLYMERASE CHAIN REACTION AND A TIME-RESOLVED
FLUORESCENCE IMMUNOASSAY OR MEMBRANE IMMUNOCHROMATOGRAPHY FOR
QUANTITATIVE DETERMINATION OF *SALMONELLA ENTERICA* BACTERIAL DNA**

Abstract. Four model bioanalytical systems specific for *Salmonella enterica* have been developed and studied, in which a polymerase chain reaction (PCR) produced a DNA amplicon containing biotin and fluorescein residues. This enabled to immobilize the amplicon on a functionalized solid phase and to label it biospecifically with europium chelate in microplates or gold nanoparticles on a chromatographic membrane. Quantitative detection of the modified DNA was carried out in immunoassay systems by measuring the Eu^{3+} time-resolved fluorescence (dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay, DELFIA) or by photometry of the colored zone on the chromatographic strip (LFA). Three pairs of primers were developed and examined to obtain selected fragments of the *invA* gene, which is present in the genomes of all pathogenic *Salmonella*

enterica. The fragments proved to be suitable for the test systems. In the microplate DELFIA system, the concentration range of DNA amplicon quantification was found to be 0.01–10.0 nM, and a detection limit was 2 pM. The limit of DNA visual detection in LFA was 0.05 nM. The possibility of testing the amplicons without additional isolation of pure DNA from the reaction mixture was demonstrated. The high specificity of the developed bioanalytical systems for the detection of various *Salmonella enterica* serotypes was demonstrated.

Keywords: pathogenic bacteria, *Salmonella enterica*, polymerase chain reaction, dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay, lateral flow assay

For citation. Serchenya T. S., Akhremchuk K. U., Valentovich L. N., Lapina V. S., Sviridov O. V. Combined systems of polymerase chain reaction and a time-resolved fluorescence immunoassay or membrane immunochromatography for quantitative determination of *Salmonella enterica* bacterial DNA. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya khimichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2024, vol. 60, no. 4, pp. 314–325 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-4-314-325>

Введение. Продовольственное сырье и пищевые продукты могут содержать вредные органические соединения и патогенные микроорганизмы, выявление или количественное определение которых является предметом научных исследований и практических разработок биоорганической химии, микробиологии и пищевой аналитики. Одними из наиболее значимых патогенов являются бактерии рода *Salmonella*, так как при попадании в организм человека с продуктами питания они вызывают тяжелое поражение пищеварительной системы, поэтому их быстрое и чувствительное обнаружение является важным фактором обеспечения биологической безопасности продуктов питания.

Принятым в качестве стандарта для обнаружения микроорганизмов, в том числе представителей рода *Salmonella*, является культуральный метод, проведение которого требует длительного времени (до нескольких дней) и множества трудоемких манипуляций без гарантии достижения нужных характеристик селективности и чувствительности (ГОСТ 31659-2012 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*») [1].

В связи с этим регулярно появляются и внедряются в практику пищевой микробиологии ускоренные методы выявления в продуктах питания и продовольственном сырье бактерий рода *Salmonella* [2]. Среди них быстротой, специфичностью и чувствительностью выделяется иммунохимический анализ, направленный на клеточные антигены, и молекулярно-генетический тест, основанный на детекции бактериальной ДНК. Так, описаны иммуноферментное определение (ИФА) сальмонелл в формате микропланшетной сэндвич-системы [3, 4] и конкурентный иммунохроматографический анализ (ИХА) этих бактерий [5]. Экспресс-метод выявления сальмонелл и других микроорганизмов с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени [6] в настоящее время широко применяется в лабораторной практике (ГОСТ Р 52833-2007 (ИСО 22174:2005) «Микробиология пищевой продукции и кормов для животных, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения»). Мишенью служат специфичные фрагменты нуклеиновых кислот патогена, процесс анализа осуществляется в амплификаторе, который выполняет циклы нагрева и охлаждения образца в заданном диапазоне температур и регистрирует флуоресценцию, интенсивность которой соответствует количеству образовавшихся ампликонов ДНК сальмонелл. Суммарно метод включает три обязательных этапа: неселективное обогащение исследуемого образца, которое позволяет исключить ложноположительные результаты при детекции ДНК нежизнеспособных клеток; пробоподготовку (экстракция ДНК из обогащенной культуры); детекцию ДНК сальмонеллы в автоматическом режиме на термоциклере.

Вместе с тем потребность лабораторной практики в упрощении и удешевлении процесса тестирования бактериальной ДНК привела к развитию альтернативного подхода, объединяющего селективность и чувствительность ПЦР с простотой и высокой производительностью иммунохимической детекции меченого ампликона. Известны системы ПЦР–ИФА с ферментно-колориметрическим определением продукта ПЦР [7, 8], тогда как комбинированные ДНК-иммуноаналитические системы, включающие детекцию золотыми наночастицами в ходе ИХА, применительно к сальмонеллам чаще исследуются в комбинации с изотермическими методами амплификации нуклеиновых кислот [9, 10].

Улучшение аналитических характеристик комбинации молекулярно-генетического и микропланшетного иммунохимического методов возможно путем замены колориметрической детекции продукта ПЦР его флуориметрической регистрацией. В этом отношении особенно эффек-

тивной может быть лантанидная метка иммунореагента в комбинированной системе, например органический комплекс иона европия, способный к долгоживущей флуоресценции с высоким квантовым выходом и большим стоксовым сдвигом. На этих уникальных физических свойствах редкоземельных металлов основан лантанидный иммунофлуориметрический анализ (ЛИФМА или DELFIA), в котором используется отложенная во времени регистрация флуоресцентного сигнала в длинноволновой области видимого спектра в условиях затухшей фоновой флуоресценции. Благодаря этому ЛИФМА объединил в себе очень хорошую чувствительность и широкий динамический диапазон определения аналита [11–13], которым может быть и органическая молекула, конъюгированная с ДНК в составе ампликона.

Насколько нам известно, системы ПЦР–ЛИФМА ранее не исследовались, поэтому в нашей работе поставлена цель получить биореагенты и оптимизировать их взаимодействие в микропланшетной системе ПЦР–ЛИФМА, специфичной для бактерий *Salmonella enterica*. Кроме того, предполагалось экспериментально сравнить полученные результаты с биоаналитическими характеристиками системы повышенной экспрессности ПЦР–ИХА, включающей те же базовые реагенты, но взаимодействующие на хроматографической мембране с визуальным или фотометрическим определением меченого ампликона ДНК *S. enterica*. Обе эти модельные системы мы рассматриваем как прототипы адаптированных к практике систем, построенных на комбинации методов изотермической рекомбиназной полимеразной амплификации и ИФА или ИХА. Разработка и применение таких систем для выявления сальмонелл в молочной продукции будут представлены в следующей статье.

Материалы и методы. *Реактивы, препараты и приборы.* В экспериментальной работе использовали стрептавидин из *Streptomyces avidinii*, бычий сывороточный альбумин, трис, тритон X-100, проклин 300, триоктилфосфиноксид, β -нафтоилтрифторацетон, N-оксисукцинимидный эфир биотинил- ϵ -аминокапроновой кислоты (Sigma-Aldrich, США), моноклональное антитело к флуоресцеину клона 2A3с («Хайтест», РФ), хлорид натрия, хлорид магния, твин-20, кислоту лимонную моногидрат (Merck, Германия), NaHCO_3 , сахарозу (Riedel-de Haën, Германия), колонки с Sephadex G-25 (GE Healthcare, США). Применявшиеся реактивы отечественных и российских производителей (натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный, гидроокись натрия, соляная кислота) имели классификацию не ниже «ч. д. а.». Антитела козы против иммуноглобулинов мыши были получены на опытном производстве Института биоорганической химии НАН Беларуси.

Для приготовления растворов использовали деионизированную воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм · см, полученную в модульной системе очистки воды Agium® pro VF фирмы Sartorius (Германия).

Получение нуклеиновых кислот бактерий Salmonella enterica. В работе использовали шесть вариантов ДНК сальмонелл. Препарат ДНК непатогенного штамма *S. enterica* серотипа Typhimurium SL7202 получали из ночной культуры бактерий с помощью набора для выделения ДНК «Нуклеосорб А» (ОДО «Праймтех», Беларусь) в соответствии с инструкцией. Очищенные ДНК пяти патогенных штаммов *Salmonella* (серотипы Typhimurium, Enteritidis, London, Newport и Derby) предоставлены РНПЦ эпидемиологии и микробиологии.

Разработка праймеров, специфичных к ДНК Salmonella enterica. На основе множественного выравнивания гена *invA* (M90846.1) из базы данных GenBank с аналогичными генами депонированных геномов сальмонелл различных сероваров выбирали наиболее консервативные участки, к которым и подбирали праймеры. Специфичность разрабатываемых праймеров проверялась с помощью онлайн инструмента Primer-BLAST.

Проведение ПЦР для получения меченых специфических фрагментов ДНК Salmonella. Такие фрагменты нарабатывали путем постановки ПЦР на шести матрицах ДНК бактерий *S. enterica* серотипов Typhimurium, Enteritidis, London, Newport, Derby и непатогенного штамма SL7207 серотипа Typhimurium. Эти штаммы представляют серогруппы В, С, D и Е. Ампликоны ДНК, меченные флуоресцеином (FAM) и биотином (Bt) на противоположных концах, получали в ПЦР с применением четырех праймеров (ОДО «Праймтех», Беларусь). Использовали один прямой праймер (SE-*invA*-F) с флуоресцеиновой меткой (FAM) и три обратных праймера (SE-*invA*-R1, SE-*invA*-R2 и SE-*invA*-R3) с биотином (Bt), присоединенным посредством длинного ПЭГ-линкера (табл.).

Характеристика пар праймеров к ДНК бактерий *Salmonella enterica*
The characteristics of primer pairs for the DNA of *Salmonella enterica*

Наименование	Последовательность	Длина ампликона и обозначение
SE- <i>invA</i> -F SE- <i>invA</i> -R1	5'-Bt-ttctactgacttgctatctgc-3' 5'-FAM-tctgtctctcttactgctg-3'	115 п. н. FR1
SE- <i>invA</i> -F SE- <i>invA</i> -R2	5'-Bt-ttctactgacttgctatctgc-3' 5'-FAM-tccgctaattgatggatctc-3'	180 п. н. FR2
SE- <i>invA</i> -F SE- <i>invA</i> -R3	5'-Bt-ttctactgacttgctatctgc-3' 5'-FAM-tggcagctaccttctctcag-3'	215 п. н. FR3

Состав реакционной смеси (40 мкл): 1 × смесь реагентов ArtMix с урацил-ДНК-гликозилазой (ООО «АртБиоТех», Беларусь), по 0,1 мкМ праймеров SE-*invA*-F и SE-*invA*-R (варианты 1, 2 или 3), 20–50 нг матричной ДНК, деионизированная вода – до конечного объема. Программа реакции: 1) первичная денатурация – 95 °С, 2 мин; 2) денатурация – 95 °С, 10 с, отжиг – 55 °С, 15 с, элонгация – 67 °С, 15 с; 35 циклов; 3) финальная элонгация – 67 °С, 2 мин. Продукты ПЦР анализировали путем электрофореза в 0,8%-м агарозном геле с бромистым этидием (0,5 мкг/мл) при напряженности электрического поля 8–10 В/см. В качестве стандартов молекулярной массы ДНК использовали GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Результаты визуализировали с помощью системы цифровой фотодокументации Bio-Rad ChemiDoc MP System, полученное изображение обрабатывали, применяя программу Bio-Rad Image Lab 5.0.

Очистку продуктов ПЦР проводили с помощью набора Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию ампликонов устанавливали флуориметрически в приборе QFX Fluorometer (DeNovix, США). В качестве красителя использовали ZUBR Green-1 (ОДО «Праймтех», Беларусь).

Лантанидный иммунофлуориметрический анализ. После амплификации исследовали ПЦР-продукты в двух системах ЛИФМА. При проведении иммунофлуориметрии в качестве твердофазных носителей использовали разборные полистирольные микропланшеты с 96 лунками от фирмы «Хема-медика» (Россия). Конъюгаты стрептавидина и антитела к флуоресцеину с комплексонатом европия синтезировали [13].

В системе ЛИФМА-1 в лунках микропланшета иммобилизовали моноклональное антитело к флуоресцеину клонa 2A3сс путем внесения во все лунки по 100 мкл раствора с концентрацией 5 мкг/мл в 0,1 М NaHCO₃ и инкубации при 4–8 °С в течение 18 ч. Стабилизацию проводили добавлением во все лунки по 150 мкл 0,05 М трис-НСl, рН 7,5, содержащего 0,15 М NaCl, 0,05 % Твин 20, 1 мг/мл БСА, 2 % сахарозы, 0,01 % проклина 300, и выдерживанием планшета при 4–8 °С в течение 18 ч. Калибровочные растворы готовили на основе ампликонов в диапазоне концентраций 0,01–10,0 нМ в 0,05 М трис-НСl, рН 7,5, содержащем 0,15 М NaCl, 0,05 % Твин 20, 1 мг/мл БСА, 0,01 % проклина 300. При проведении анализа в лунки вносили по 100 мкл растворов ампликонов и инкубировали планшеты в течение 1 ч при температуре 25 °С в термостате. Далее удаляли непрореагировавшие компоненты и промывали планшеты с использованием промывочного раствора (0,01 М трис-НСl, рН 7,5, 0,15 М NaCl, 0,05 % Твин 20). На второй стадии в лунки вносили по 100 мкл раствора конъюгата стрептавидина с комплексонатом европия в концентрации 0,2 мкг/мл и инкубировали планшеты в течение 1 ч при температуре 25 °С в термостате. Далее удаляли непрореагировавшие компоненты и промывали планшеты. В лунки вносили по 100 мкл диссоциативно-усиливающего раствора, содержащего 50 мкМ триоктилфосфиноксид, 15 мкМ β-нафтоилтрифторацетон и 0,1 % тритон X-100, и инкубировали 20 мин при встряхивании при 20–25 °С. Проводили измерение флуоресценции при длинах волн возбуждения 320 нм и регистрации 615 нм с временной задержкой 400 мкс с помощью микропланшетного флуориметра DELFIA 1234 (Wallac Oy, Финляндия). Строили график зависимости интенсивности времяразрешенной флуоресценции (TRF) – F в отн. ед. (ось ординат, линейная) от концентрации ампликона ДНК в нМ (ось абсцисс, логарифмическая), используя аппроксимацию $y = a \cdot \lg(x) + b$.

В системе ЛИФМА-2 в лунках микропланшета иммобилизовали стрептавидин внесением во все лунки по 100 мкл раствора с концентрацией 5 мкг/мл в 0,1 М NaHCO_3 и инкубацией при 4–8 °С в течение 18 ч. Стабилизацию выполняли, как описано выше. При проведении анализа в лунки добавляли по 100 мкл растворов ампликонов в диапазоне концентраций 0,025–10,0 нМ и инкубировали планшет в течение 1 ч при температуре 25 °С в термостате. После удаления непрореагировавших компонентов и промывки на второй стадии в лунки вносили по 100 мкл раствора конъюгата моноклонального антитела к флуоресцеину с комплексоном европия в концентрации 0,5 мкг/мл. Проводили инкубацию в течение 1 ч при температуре 25 °С в термостате. Далее промывали планшет, инкубировали с диссоциативно-усиливающим раствором, проводили TRF-спектроскопию и строили график, как описано выше.

Значение минимальной достоверно измеряемой концентрации в тест-системах получали из модельных калибровочных графиков как абсциссу точки ($B_0 + 2 SD$).

Все эксперименты по исследованию связывания ампликонов проводили не менее чем в трех повторах. Данные обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel. На графиках и в таблицах планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение (SD).

Иммунохроматографический анализ. Системы иммуноанализа на тест-полосках конструировали с применением комплекта мембран из набора MDI EasyPack (Advanced Microdevices, Индия), использовали нитроцеллюлозную мембрану CNPF с размером пор 10 мкм, мембрану для образца GFB-R7L и верхнюю впитывающую мембрану AP045. Наночастицы золота получали восстановлением золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия по методу Френса [14]. Функционализацию наночастиц осуществляли путем адсорбции на них моноклонального антитела к флуоресцеину или стрептавидина в концентрациях, выбранных по фотометрическим данным [15]. Биотинилированный альбумин синтезировали по универсальной методике [16] с помощью N-оксисукцинимидного эфира биотинил-ε-аминокапроновой кислоты при 10-кратном мольном избытке реагента по отношению к белку. Не вступившее в реакцию с белком производное биотина удаляли гель-фильтрацией на Sephadex G-25.

На нитроцеллюлозную мембрану наносили реагенты с помощью автоматического диспенсера IsoFlow (ImageneTechnology, США). В системе ИХА-1 в аналитической зоне тест-полоски иммобилизовали моноклональное антитело к флуоресцеину из раствора с концентрацией 1 мг/мл, а контрольную зону формировали путем нанесения биотинилированного альбумина из раствора с концентрацией 0,8 мг/мл. В системе ИХА-2 аналитическую зону тест-полоски готовили путем адсорбции стрептавидина из раствора с концентрацией 0,5 мг/мл, а в контрольной зоне иммобилизовали антивидовые антитела (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши) из раствора с концентрацией 0,2 мг/мл. Далее все мембраны сушили на воздухе при температуре 20–25 °С не менее 20 ч. Затем собирали их в мультимембранный композит вместе с подложкой для исследуемой пробы и впитывающей мембраной. Готовые тест-полоски нарезали шириной 3,5 мм с помощью автоматического гильотинного нарезчика IndexCutter 1 (A PointTechnologies, США).

При проведении анализа в лунки инертного пластмассового микропланшета вносили функционализированные наночастицы золота с моноклональным антителом к флуоресцеину или со стрептавидином и добавляли ампликоны ДНК в возрастающих концентрациях в диапазоне 0, 0,01–10,0 нМ. Эти реагенты выдерживали в течение 3 мин и далее в лунки помещали изготовленные тест-полоски. Хроматографию проводили в течение 7 мин и далее визуально регистрировали окрашивание.

Результаты и их обсуждение. ПЦР является признанным методом быстрой, чувствительной и высокопродуктивной амплификации специфических последовательностей ДНК и часто может являться методом выбора для обнаружения нуклеиновых кислот, присутствующих в очень низких концентрациях в биологических образцах. Необходимость такого эффективного способа детекции и количественного определения полученных продуктов амплификации привели к объединению ПЦР с иммуноанализом, реализуемым в микропланшетном варианте или на тест-полосках.

Представленные в нашей работе комбинированные системы ПЦР–ЛИФМА и ПЦР–ИХА для выявления ДНК бактерий *Salmonella enterica* предполагают получение ампликонов ДНК, меченных с противоположных концов биотином и флуоресцеином, и последующий иммуноана-

лиз синтезированных ампликонов посредством сэндвич-связывания двух меток в функционализированных лунках микропланшета или на тест-полосках с участием биотинсвязывающего белка стрептавидина и моноклонального антитела к флуоресцеину. Примером может служить образующийся тройной комплекс «моноклональное антитело к FAM – меченая ДНК – стрептавидин». Такие комбинированные системы позволяют проводить анализ в течение одного дня и являются очень гибким и универсальным инструментом. В микропланшетных форматах можно одновременно исследовать до 96 или 384 образцов. Комбинированные системы, включающие ИХА, позволяют проводить детектирующий анализ продолжительностью не более 10 мин. Кроме того, эти методики не требуют дорогостоящего оборудования и могут применяться в лабораториях, не располагающих термоциклером для ПЦР в реальном времени.

Получение и свойства меченых ампликонов ДНК Salmonella. Первым этапом в создании представленных комбинированных систем являлась разработка универсальных праймеров к ДНК различных сероваров и подвидов *S. enterica*. В качестве мишени для амплификации был выбран фрагмент гена *invA*. Группа генов, к которой относится *invA*, была описана в 1989 г. J. E. Galán с коллегами. Известно, что продукты генов *invA*, *B*, *C*, *D* участвуют в проникновении клеток сальмонелл в клетки кишечного эпителия хозяина [17]. Иными словами, *inv*-белки являются факторами патогенности, что считается важным фактом при детекции болезнетворных бактерий. Ген *invA* используется для молекулярной диагностики с 1990 г. и хорошо себя зарекомендовал в качестве мишени для детекции нуклеиновых кислот сальмонелл [18].

На основе высококонсервативных участков гена *invA* (M90846.1) были разработаны четыре праймера, использование которых позволяет получить три различающихся по длине фрагмента гена *invA*. Длина участка определяется выбором одного из трех обратных праймеров (табл. 1). В работе методом ПЦР с использованием разработанных праймеров на матрицах шести препаратов ДНК бактерий *S. enterica* серотипов Typhimurium, Enteritidis, London, Newport, Derby и непатогенного штамма SL7207 серотипа Typhimurium получены ампликоны FR1, FR2 и FR3 размером соответственно 115, 180 и 215 п. н. (рис. 1).

Полученные нуклеотидные последовательности с противоположных сторон несут метки Вt и FAM. Соответствие полученных ампликонов ожидаемым продуктам подтверждено электрофоретически. Для проверки необходимости очистки фрагментов ДНК от компонентов реакционной смеси все ампликоны были получены в очищенной и неочищенной формах.

Микропланшетный ЛИФМА меченой ДНК Salmonella enterica. Для проведения иммуноанализа с TRF-спектроскопией были получены, исследованы и выбраны твердофазные реагенты

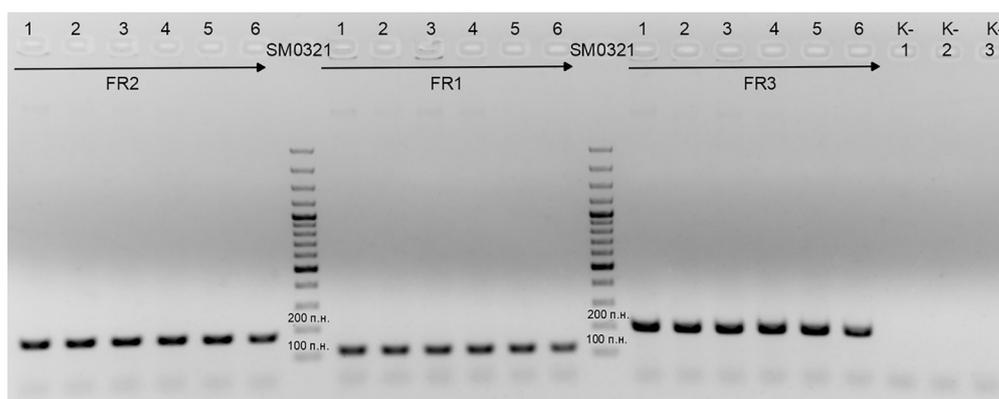


Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов FR1, FR2 и FR3 фрагмента гена *invA* бактерий *Salmonella enterica* различных серотипов: 1 – London, 2 – Newport, 3 – Derby, 4 – Enteritidis, 5 – Typhimurium, 6 – непатогенный штамм SL7207, К- отрицательный контроль ПЦР без добавления матричной ДНК с различными парами праймеров 1–3, SM0321 – стандарт молекулярной массы ДНК

Fig. 1. The electrophoregram of amplicons FR1, FR2 and FR3 of the *invA* gene fragment of various *Salmonella enterica* serotypes: 1 – London, 2 – Newport, 3 – Derby, 4 – Enteritidis, 5 – Typhimurium, 6 – attenuated strains SL7207, К- negative control of PCR without adding template DNA with different primer pairs 1–3, SM0321 – DNA molecular weight standard

и водорастворимые конъюгаты биомолекул с хелатом редкоземельного элемента (лантанида) Eu^{3+} , способного к долгоживущей флуоресценции, а также были оптимизированы условия проведения ЛИФМА. В микропланшете иммобилизовали связывающий реагент, специфичный к одной из меток ампликона ДНК, а главными компонентами жидкой фазы были сам ампликон и другой связывающий реагент для второй метки ДНК, конъюгированный с комплексонатом европия. В таких гетерофазных системах происходило сэндвич-связывание со стрептавидином и антителом к флуоресцеину ампликона ДНК за счет введенных в его структуру указанных лиганда и антигена. Выявление иммобилизованного трехкомпонентного комплекса происходило за счет лантанидной метки. Схемы двух исследуемых систем ЛИФМА и модель калибровочного графика для определения *Salmonella enterica* показаны на рис. 2. Представлены данные, полученные на основе калибровочных проб, для приготовления которых использован продукт амплификации FR2, синтезированный на ДНК-матрице сальмонелл серотипа Typhimurium. Как видно, диапазон определяемых концентраций ДНК является широким и составляет 0,01–10,0 нМ для ЛИФМА-1 и 0,025–10,0 нМ для ЛИФМА-2.

Установлено, что значения минимальной достоверно определяемой концентрации ДНК (аналог предела обнаружения) равны 2 пМ для системы ЛИФМА-1 (иммобилизованное антитело к флуоресцеину) и 5 пМ – для ЛИФМА-2 (иммобилизованный стрептавидин) и характеризуют высокую аналитическую чувствительность обеих систем.

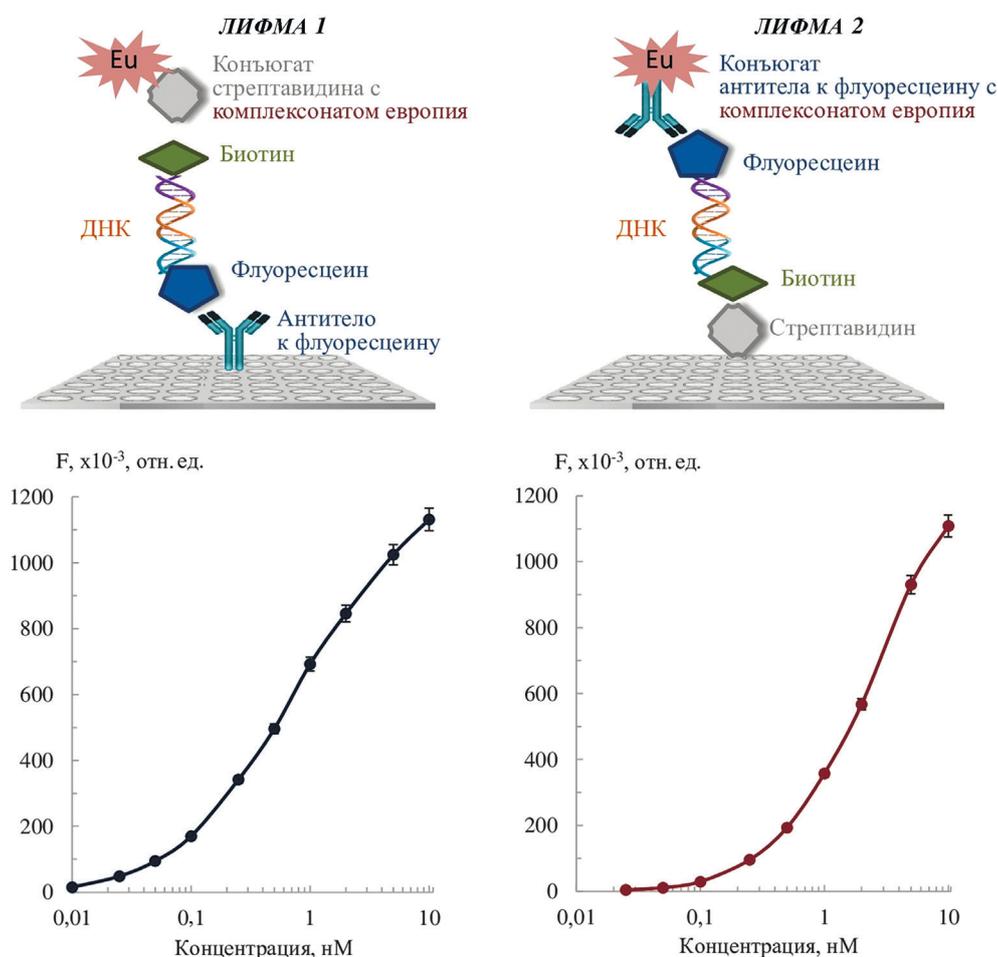
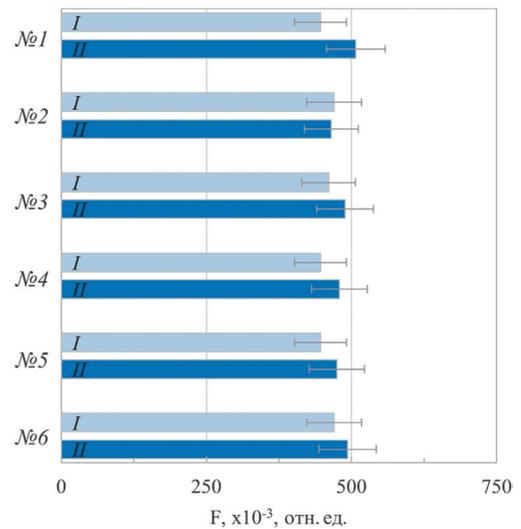


Рис. 2. Схемы систем ЛИФМА-1 и ЛИФМА-2 и концентрационные зависимости связывания меченого ампликона ДНК FR2 со стрептавидином и антителом к флуоресцеину в этих системах, F – интенсивность времяразрешенной флуоресценции (TRF)

Fig. 2. Schemes of the DELFIA-1 and DELFIA-2 systems and concentration dependences of the binding of the labelled DNA amplicon FR2 with streptavidin and antibody to fluorescein in these systems, F – time-resolved fluorescence (TRF) intensity

Рис. 3. Связывание очищенных (I) и не прошедших дополнительную очистку (II) ампликонов ДНК FR2 (0,5 нМ), полученных с использованием ДНК *S. enterica* серотипов Typhimurium (№ 1), Enteritidis (№ 2), London (№ 3), Newport (№ 4), Derby (№ 5) и непатогенного штамма SL7207 (№ 6) в системе ЛИФМА-1, F – интенсивность TRF

Fig. 3. The binding of purified (I) and unpurified (II) FR2 DNA amplicons (0.5 нМ) obtained using DNA from *S. enterica* serotypes Typhimurium (№ 1), Enteritidis (№ 2), London (№ 3), Newport (№ 4), Derby (№ 5) and non-pathogenic strain SL7207 (№ 6) in the DELFIA-1 system, F – TRF intensity



Далее система ЛИФМА-1 применялась для сравнения взаимодействий ампликонов, полученных при применении разных вариантов пар праймеров и при использовании ДНК пяти серотипов патогенных сальмонелл в различных условиях биоанализа.

После проведения ПЦР в реакционной смеси кроме необходимого ампликона ДНК находятся также внесенные в избытке непрореагировавшие праймеры и ДНК-полимераза. Эти компоненты смеси могут обуславливать помехи определению ДНК, и тогда возникает необходимость очистки полученного ампликона. В связи с этим проведено сравнительное исследование очищенных и неочищенных продуктов амплификации FR1–FR3 для всех изученных в нашей работе ДНК сальмонелл. Результаты для ампликонов FR2 представлены на рис. 3, такие же данные получены для FR1 и FR3. Установлено, что не вступившие в реакцию компоненты ПЦР-смеси не оказывают значимого влияния на биоспецифические взаимодействия в системе ЛИФМА, так как связывание ампликонов в составе исходной смеси и ампликонов после их очистки характеризовалось практически одинаковыми сигналами TRF-спектроскопии. Аналогичные результаты получены при проведении ИХА: интенсивности окрашенных полос на мембране после хроматографии очищенных и неочищенных ампликонов не различались. Таким образом, системы ЛИФМА и ИХА позволяют проводить анализ продуктов ПЦР без получения ампликонов ДНК в чистом виде.

Показано, что в ряду синтезированных ампликонов FR1, FR2 и FR3 всех исследуемых ДНК с увеличением длины олигонуклеотида от 115 п. н. до 215 п. н. происходит некоторое уменьшение сэндвич-связывания в системе ЛИФМА. На рис. 4 показано, что одинаковые концентрации FR1–FR3 ДНК сальмонелл серотипа Typhimurium дают разные интенсивности TRF. Такая же зависимость эффективности связывания от длины цепи найдена для ампликонов ДНК всех шести исследуемых сальмонелл.

Для оценки специфичности комбинированной системы ПЦР–ЛИФМА в отношении различных серотипов сальмонелл проведено тестирование с использованием ДНК пяти серотипов этой бактерии. Выбор сероваров осуществляли по двум критериям: принадлежности к различ-

F, x10⁻³, отн. ед.

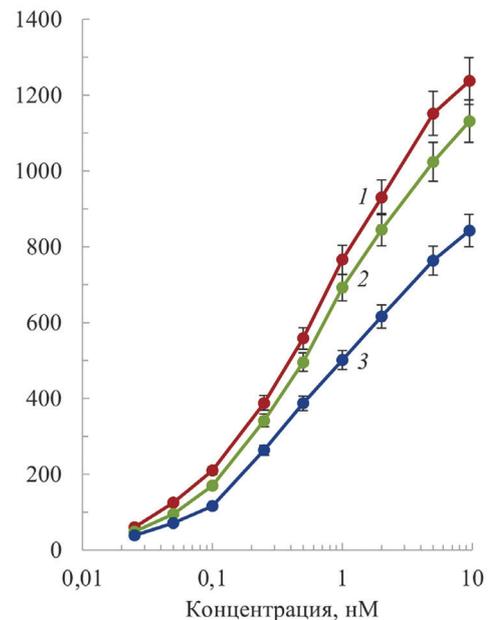


Рис. 4. Связывание ампликонов ДНК FR1 (I), FR2 (2), FR3 (3) в системе ЛИФМА-1, F – интенсивность TRF

Fig. 4. The binding of DNA amplicons FR1 (I), FR2 (2) and FR3 (3) in the DELFIA-1 system, F – TRF intensity

ным серогруппам сальмонелл (в нашем случае это В, С, D и E) и факту наибольшей встречаемости и распространенности среди патогенных сальмонелл. Такой подход позволяет оценить возможность использования тест-системы для решения практических задач полного выявления этих патогенных бактерий в пищевой продукции.

Далее в работе сравнивались количественные показатели биоаналитического выявления синтезированных ампликонов ДНК в каждой группе FR1, FR2 и FR3 для выбора оптимальной пары праймеров. В каждой группе получали меченые ампликоны с использованием ДНК *Salmonella enterica*, принадлежащих к пяти серотипам и четырем серогруппам. Результаты представлены на рис. 5. Установлено, что происходит почти идентичное выявление сальмонелл внутри каждой из трех групп ампликонов. При этом коэффициент вариации значений связывания в единицах интенсивности TRF в каждой из групп не превышает 12 %. Наиболее сходные показатели взаимодействия в детектирующей системе характерны для ампликонов в группах FR2 и FR3, где коэффициент вариации составил соответственно 5 и 7 %. Таким образом, по критериям силы взаимодействия в системе и специфичности связывания в группе наиболее подходящими для практических целей являются ампликоны FR2. Эти данные позволяют выбрать участок ДНК *Salmonella enterica* для рекомбиназной полимеразной амплификации с целью последующей разработки ее комбинации с системами детекции.

Иммунохроматографический анализ меченой ДНК Salmonella enterica. Иммунохроматографическая детекция ампликонов ДНК совмещает экспрессность и хорошую чувствительность определения, поэтому находит широкое применение [19–21]. Мы исследовали две системы мембранной иммунохроматографии. В системах ИХА-1 и ИХА-2 ампликоны ДНК, содержащие на противоположных концах остатки биотина и флуоресцеина, образуют коллоидные комплексы соответственно со стрептавидином или антителом к флуоресцеину, мечеными наночастицами золота. Далее эти комплексы мигрируют по мембране и связываются соответственно с антителом к флуоресцеину или стрептавидином, иммобилизованными в аналитической зоне, образуя окрашенную полосу. Интенсивность окраски зависит от концентрации ампликона, внесенного в систему. Известно, что даже небольшие структурные изменения аналита могут влиять на его распознавание связывающим агентом на мембране и менять чувствительность анализа [21]. Для оценки эффективности комплексообразования в латеральном потоке мы исследовали в двух системах мембранной иммунохроматографии три группы ампликонов FR1, FR2 и FR3, наработанных на шести матрицах ДНК *Salmonella enterica*. В ходе предварительной инкубации коллоидного

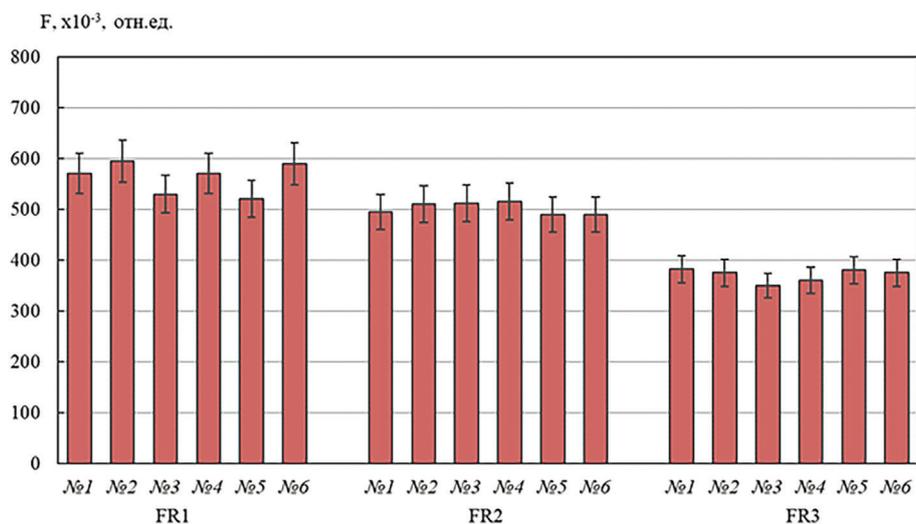


Рис. 5. Связывание FAM/Bt-ампликонов FR1–FR3 (0,5 нМ) фрагмента гена *invA* различных серотипов *Salmonella enterica* в системе ЛИФМА-1: № 1 – Typhymurium, № 2 – Enteritidis, № 3 – London, № 4 – Newport, № 5 – Derby, № 6 – непатогенный штамм SL7207

Fig. 5. The binding of FAM/Bt amplicons FR1–FR3 (0.5 nM) of the *invA* gene fragment of various *Salmonella enterica* serotypes in the DELFIA-1 system: № 1 – Typhymurium, № 2 – Enteritidis, № 3 – London, № 4 – Newport, № 5 – Derby, № 6 – attenuated strains SL7207

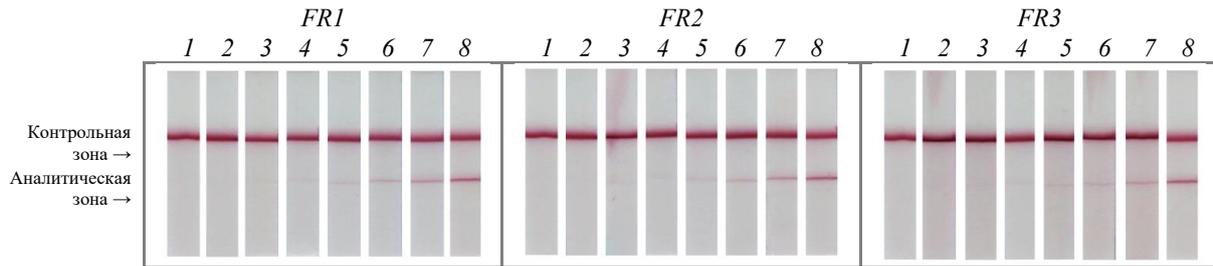


Рис. 6. Связывание FAM/Bt-ампликонов FR1–FR3 фрагмента гена *invA* бактерий *Salmonella enterica* в системе ИХА-1: 1–8 – концентрация ампликона ДНК 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5 и 10 нМ

Fig. 6. The binding of FAM/Bt amplicons FR1–FR3 of the *invA* gene fragment of *Salmonella enterica* in the LFA-1 system: 1–8 – DNA amplicon concentration 0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5 and 10 nM

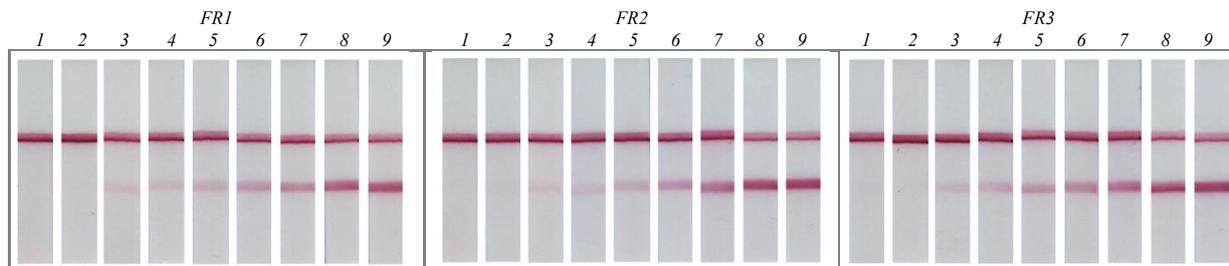


Рис. 7. Связывание FAM/Bt-ампликонов FR1–FR3 фрагмента гена *invA* бактерий *Salmonella enterica* в системе ИХА-2: 1–9 – концентрация ампликона ДНК 0, 0,01, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2 и 5 нМ

Fig. 7. The binding of FAM/Bt amplicons FR1–FR3 of the *invA* gene fragment of *Salmonella enterica* in the LFA-2 system: 1–9 – DNA amplicon concentration 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 and 5 nM

раствора в лунке микропланшета иммобилизованные на наночастицах золота стрептавидин или антитело к флуоресцеину связывались с ампликонами ДНК за счет наличия на их противоположных концах остатков биотина и флуоресцеина, а далее протекала хроматография на тест-полоске, содержащей соответственно антитело к флуоресцеину или стрептавидин в аналитической зоне. Установлено, что визуальные пределы детекции для ампликонов FR1–FR3 почти не различаются. На рис. 6 и 7 представлены результаты взаимодействия в системе, включающей ампликоны FR1–FR3, которые получены на матрице ДНК сальмонелл серовара *Typhimurium*. Данные для ампликонов, наработанных на ДНК-матрицах всех других исследуемых серотипов, были идентичными. В системе ИХА-1 на твердой фазе иммобилизовали антитело к флуоресцеину. Как видно из рис. 6, предел визуальной детекции не превышал 0,5–1,0 нМ. В конструкции с иммобилизованным на твердой фазе стрептавидином предел визуальной детекции составил 0,05 нМ (см. рис. 7).

Таким образом, решением для лучшей чувствительности анализа является применение второй системы, когда стрептавидин иммобилизован на тест-полоске, а антитело к флуоресцеину адсорбировано на наночастицах золота. Вся процедура занимает 10 мин, что добавляет быстроту к высокой чувствительности анализа.

Заключение. Для контроля биобезопасности пищевых продуктов необходимы быстрые, чувствительные и специфичные методы обнаружения патогенных бактерий, таких как сальмонеллы. В настоящем исследовании представлена разработка комбинированных систем ПЦР–ЛИФМА и ПЦР–ИХА для определения ДНК *Salmonella enterica*, в которых аналитическая стадия детекции проводится в высокопроизводительном 96-луночном микропланшетном формате или в виде быстрой иммунохроматографии с регистрацией интенсивности сигнала времяразрешенной флуоресценции (ЛИФМА) либо окрашивания зоны на тест-полоске (ИХА).

Разработаны и исследованы праймеры для получения трех отличающихся по длине фрагментов гена *invA*, присутствующего в геномах всех патогенных сальмонелл. Проведено сравнение ампликонов, полученных на основе ДНК наиболее значимых серотипов патогенных сальмонелл, и выбрана оптимальная пара праймеров. Наилучшими показателями сходства характеризова-

лись ампликоны FR2 размером 180 п. н., синтезированные на матрицах ДНК пяти серотипов сальмонелл, относящихся к четырем различным серогруппам *Salmonella enterica*.

В биоаналитических системах синтезированные ампликоны ДНК, несущие на противоположных концах флуоресцеиновую и биотиновую метки, оказались способными к формированию сэндвич-комплексов в равновесных условиях на твердой фазе в лунках микропланшета и в условиях латерального потока на тест-полосках. Установлено, что для ПЦР–ЛИФМА диапазон определяемых концентраций является широким и составляет 0,01–10 нМ, а предел обнаружения характеризуется значением 2 пМ. Предел визуальной детекции для ПЦР–ИХА равен 0,05 нМ. Показана возможность корректной детекции ампликонов без их выделения в чистом виде из реакционной смеси после ПЦР. Установлена высокая специфичность биоаналитических систем в отношении различных серотипов бактерий *Salmonella enterica*.

В итоге создан научный задел планируемой разработки комбинированных систем рекомбинантной полимеразной амплификации ДНК сальмонелл и иммуноферментной или иммунохроматографической детекции, адаптированных к практическому использованию.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект РНФ–БРФФИ № X23РНФ–185).

Авторы благодарны заведующему лабораторией клинической и экспериментальной микробиологии РНПЦ эпидемиологии и микробиологии академику Л. П. Титову.

Acknowledgements. This work has been done with the financial support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (RNF-BRFFR project № X23RNF-185).

The authors are grateful to the head of the laboratory of clinical and experimental microbiology of the Republican Scientific and Practical Center of Epidemiology and Microbiology, academician L. P. Titov.

Список используемых источников

1. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* / J. Y. D'Aoust [et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 1992. – Vol. 16, № 1. – P. 41–50. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90124-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90124-1)
2. Соколов, Д. М. Ускоренные методы выявления бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах и сырье. / Д. М. Соколов, М. С. Соколова // Вопр. питания. – 2013. – № 1. – С. 33–40.
3. Choi, D. Sandwich capture ELISA by a murine monoclonal antibody against a genus-specific LPS epitope for the detection of different common serotypes of *Salmonellas* / D. Choi, R. S. Tsang, M. H. Ng // J. Appl. Bacteriol. – 1992. – Vol. 72, № 2. – P. 134–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01814.x>
4. Monoclonal antibody-based cross-reactive sandwich ELISA for the detection of *Salmonella* spp. in milk samples / X. Wu [et al.] // Anal. Methods. – 2015. – Vol. 7, № 21. – P. 9047–9053. <https://doi.org/10.1039/C5AY01923K>
5. Gold nanoparticle-based strip sensor for multiple detection of twelve *Salmonella* strains with a genus-specific lipopolysaccharide antibody / W. Wang [et al.] // Sci. China Mater. – 2016. – Vol. 59, № 8. – P. 665–674. <https://doi.org/10.1007/s40843-016-5077-0>
6. A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms / P. Rajapaksha [et al.] // Analyst. – 2019. – Vol. 144, № 2. – P. 396–411. <https://doi.org/10.1039/c8an01488d>
7. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the *rfbS* gene from serogroup D *Salmonellae*: a rapid screening prototype / J. M. Luk [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1997. – Vol. 35, № 3. – P. 714–718. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.3.714-718.1997>
8. Qualitative PCR-ELISA protocol for the detection and typing of viral genomes / M. Musiani [et al.] // Nat. Protoc. – 2007. – Vol. 2, № 10. – P. 2502–2510. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.311>
9. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella* bacteria / H.-B. Liu [et al.] // J. Dairy Sci. – 2017. – Vol. 100, № 9. – P. 7016–7025. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12566>
10. Sensitive and rapid visual detection of *Salmonella* Typhimurium in milk based on recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks / J. Hu [et al.] // J. Microbiol. Methods. – 2019. – Vol. 158. – P. 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.01.018>
11. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays / I. Hemmilä [et al.] // Anal. Biochem. – 1984. – Vol. 137, № 2. – P. 335–343. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90095-2)
12. Гарбуз, О. С. Лантанидный иммунофлуориметрический анализ: научные основы и технические принципы / О. С. Гарбуз, О. В. Свиридов // ARSmedica. – 2011. – № 13. – С. 51–61.
13. Функционализированные металлохелаты на основе диэтилендиамина тетрауксусной кислоты для химической модификации белков и малых биомолекул / О. С. Куприенко [и др.] // Биоорг. химия. – 2015. – Т. 41, № 6. – С. 675–685. <https://doi.org/10.7868/S013234231506007X>
14. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions / G. Frens // Nat. Phys. Sci. – 1973. – Vol. 241, № 105. – P. 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
15. Lateral flow immunoassay for rapid qualitative and quantitative control of the veterinary drug bacitracin in milk / N. A. Byzova [et al.] // Microchem. J. – 2020. – Vol. 156. – Article 104884. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104884>
16. Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques / G. T. Hermanson. – Elsevier, 1996. – 814 p. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-f](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-f)
17. Galán, J. E. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells / J. E. Galán, R. Curtiss // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86, № 16. – P. 6383–6387. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6383>
18. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella* / K. Rahn [et al.] // Mol. Cell. Probes. – 1992. – Vol. 6, № 4. – P. 271–279. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-f](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-f)
19. Nucleic acid lateral flow assay with recombinase polymerase amplification: solutions for high-sensitive detection of RNA virus // A. V. Ivanov [et al.] // Talanta. – 2020. – Vol. 210. – Article 120616. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120616>
20. Moon, Y.-J. A review of isothermal amplification methods and food-origin inhibitors against detecting food-borne pathogens / Y.-J. Moon, S.-Y. Lee, S.-W. Oh // Foods. – 2022. – Vol. 11, № 3. – P. 322–337. <https://doi.org/10.3390/foods11030322>
21. An overview for the nanoparticles-based quantitative lateral flow assay // Z. Wang [et al.] // Small methods. – 2022. – Vol. 6, № 1. – Article 2101143. <https://doi.org/10.1002/smt.202101143>

References

1. D'Aoust J. Y., Sewell A. M., Warburton D. W. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 1992, no. 16, vol. 1, pp. 41–50. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90124-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90124-1)
2. Sokolov D. M., Sokolov M. S. Rapid methods for the genus *Salmonella* bacteria detection. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*, 2013, no. 1, pp. 33–40 (in Russian).
3. Choi D., Tsang R. S., Ng M. H. Sandwich capture ELISA by a murine monoclonal antibody against a genus-specific LPS epitope for the detection of different common serotypes of *Salmonellas*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1992, vol. 72, no. 2, pp. 134–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01814.x>
4. Wu X., Wang W., Liu L., Kuang H., Xu C. Monoclonal antibody-based cross-reactive sandwich ELISA for the detection of *Salmonella* spp. in milk samples. *Analytical Methods*, 2015, vol. 7, no. 21, pp. 9047–9053. <https://doi.org/10.1039/C5AY01923K>
5. Wang W., Liu L., Song S., Xu L., Kuang H., Zhu J., Xu C. Gold nanoparticle-based strip sensor for multiple detection of twelve *Salmonella* strains with a genus-specific lipopolysaccharide antibody. *Science China Materials*, 2016, vol. 59, no. 8, pp. 665–674. <https://doi.org/10.1007/s40843-016-5077-0>
6. Rajapaksha P., Elbourne A., Gangadoo S., Brown, R., Cozzolino D., Chapman J. A Review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *Analyst*, 2019, vol. 144, no. 2, pp. 396–411. <https://doi.org/10.1039/c8an01488d>
7. Luk J. M., Kongmuang U., Tsang R. S., Lindberg A. A. An enzyme-linked immunosorbent assay to detect PCR products of the *rfbS* gene from serogroup D *Salmonellae*: a rapid screening prototype. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, vol. 35, no. 3, pp. 714–718. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.3.714-718.1997>
8. Musiani M., Venturoli S., Gallinella G., Zerbini M. Qualitative PCR-ELISA protocol for the detection and typing of viral genomes. *Nature Protocols*, 2007, vol. 2, no. 10, pp. 2502–2510. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.311>
9. Liu H.-B., Zang Y.-X., Du X.-J., Li P., Wang S. Development of an isothermal amplification-based assay for the rapid visual detection of *Salmonella* bacteria. *Journal of Dairy Science*, 2017, vol. 100, no. 9, pp. 7016–7025. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12566>
10. Hu J., Huang R., Sun Y., Wei X., Wang Y., Jiang C., Geng Y., Sun X., Jing J., Gao H., Wang Z., Dong C. Sensitive and rapid visual detection of *Salmonella* Typhimurium in milk based on recombinase polymerase amplification with lateral flow dipsticks. *Journal of Microbiological Methods*, 2019, vol. 158, pp. 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.01.018>
11. Hemmilä I., Dakubu S., Mukkala V. M., Siitari H., Lövgren T. Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays. *Analytical Biochemistry*, 1984, vol. 137, no. 2, pp. 335–343. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90095-2)
12. Garbuz O. S., Sviridov O. V. Lanthanide immunofluorimetric assay: scientific background and technical principles. *ARSmedica*, 2011, no. 13, pp. 51–61 (in Russian).
13. Kuprienko O. S., Dubovskaya L. V., Shabunya P. S., Fatyhova S. A., Sviridov O. V. Functionalized metal chelates based on diethylene-triaminetetraacetic acids for chemical modification of proteins and small biomolecules. *Bioorganicheskaja himiya. = Bioorganic Chemistry*, 2015, vol. 41, no. 6, pp. 675–685 (in Russian). <https://doi.org/10.7868/S013234231506007X>
14. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science*, 1973, vol. 241, no. 105, pp. 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
15. Byzova N. A., Serchenya T. S., Vashkevich I. I., Zherdev A. V., Sviridov O. V., Dzantiev B. B. Lateral flow immunoassay for rapid qualitative and quantitative control of the veterinary drug bacitracin in milk. *Microchemical Journal*, 2020, vol. 156, article 104884. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104884>
16. Hermanson G. T. *Bioconjugate Techniques*. Elsevier, 1996. 814 p. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-f](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-f)
17. Galán J. E., Curtiss R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, vol. 86, no. 16, pp. 6383–6387. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6383>
18. Rahn K., De Grandis S. A., Clarke R. C., McEwen S. A., Galán J. E., Ginocchio C., Curtiss R., Gyles C. L. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 1992, vol. 6, no. 4, pp. 271–279. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-f](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-f)
19. Ivanov A. V., Safenkova I. V., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Nucleic acid lateral flow assay with recombinase polymerase amplification: solutions for high-sensitive detection of RNA virus. *Talanta*, 2020, vol. 210, article 120616. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120616>
20. Moon Y.-J., Lee S.-Y., Oh S.-W. A review of isothermal amplification methods and food-origin inhibitors against detecting foodborne pathogens. *Foods*, 2022, vol. 11, no. 3, pp. 322–337. <https://doi.org/10.3390/foods11030322>
21. Wang Z., Zhao J., Xu X., Guo L., Xu L., Sun M., Hu S., Kuang H., Xu C., Li A. An Overview for the nanoparticles-based quantitative lateral flow assay. *Small methods*, 2022, vol. 6, no. 1, article 2101143. <https://doi.org/10.1002/smt.202101143>

Информация об авторах

Серченя Татьяна Сергеевна – кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: serchenya@iboch.by

Охремчук Екатерина Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: katerina_akhr@bio.bsu.by

Валентович Леонид Николаевич – кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by

Лапина Виктория Сергеевна – младший научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lapina@iboch.by

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

Information about the authors

Serchenya Tatyana S. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: serchenya@iboch.by

Akhremchuk Katsiaryna U. – Ph. D. (Biology), Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: katerina_akhr@bio.bsu.by

Valentovich Leonid N. – Ph. D. (Biology), Head of Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by

Lapina Victoria S. – Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lapina@iboch.by

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