

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

БІААРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 579.842.14:577.112.4+57.083.8
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-2-141-153>

Поступила в редакцию 08.08.2024
Received 08.08.2024

Т. С. Серченя¹, А. А. Космач¹, В. С. Лапина¹, Т. Н. Бакаева², О. В. Свиридов¹

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

²Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии, Минск, Беларусь

СИСТЕМЫ КОНКУРЕНТНОГО ИММУНОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА БАКТЕРИЙ *SALMONELLA ENTERICA*, ВКЛЮЧАЮЩИЕ КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛ С ХЕЛАТОМ ЕВРОПИЯ

Аннотация. Разработаны и исследованы биоаналитические системы, специфичные к бактериям *Salmonella enterica* и основанные на иммунохимическом связывании антигенов липополисахарида (ЛПС) этих патогенных микроорганизмов моно- и поликлональными антителами, конъюгированными с комплексоном европия. Количественное определение клеток осуществлялось в системах иммуноанализа с детекцией на основе времяразрешенной флуоресценции (иммуноанализ с времяразрешенной флуоресценцией Eu^{3+} , лантанидный иммунофлуоресцентный анализ, ЛИФМА, DELFIA). В микропланшетной системе ЛИФМА с мечеными поликлональными антителами в растворе и белковым конъюгатом ЛПС на твердой фазе достигнуты следующие значения основных аналитических параметров: диапазон измеряемых концентраций клеток – от 10^4 до 10^7 КОЕ/мл, чувствительность $\text{IC}_{50} - 3 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, предел обнаружения (IC_{10}) – $1,5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, коэффициент вариации результатов измерений – от 4,5 до 8,0 %. Широкая специфичность данной биоаналитической системы позволяла обнаруживать *Salmonella enterica* различных серотипов. Показана возможность тестирования образцов культуральной среды и молока без предварительного разведения. Степень открытия проб, содержащих *S. enterica*, составила 88–110 %. Представленная разработка может служить основой практического набора реагентов для контроля присутствия бактерий *Salmonella enterica* в пищевой продукции.

Ключевые слова: патогенные бактерии, *Salmonella enterica*, конкурентный иммуноанализ, иммуноанализ с времяразрешенной флуориметрией

Для цитирования. Системы конкурентного иммунофлуориметрического анализа бактерий *Salmonella enterica*, включающие конъюгаты антител с хелатом европия / Т. С. Серченя, А. А. Космач, В. С. Лапина [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2025. – Т. 61, № 2. – С. 141–153. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-2-141-153>

T. S. Serchenya¹, A. A. Kasmach¹, V. S. Lapina¹, T. N. Bakayeva², O. V. Sviridov¹

¹Institute of Bioorganic Chemistry of the National National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

²Scientific Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology, Minsk, Belarus

SYSTEMS OF COMPETITIVE IMMUNOFLUOROMETRIC ASSAY OF *SALMONELLA ENTERICA* BACTERIA, COMPRISING CONJUGATES OF ANTIBODIES WITH EUROPIUM CHELATE

Abstract. Bioanalytical systems specific to *Salmonella enterica* bacteria have been developed and studied. The systems are based on the immunochemical binding of lipopolysaccharide (LPS) antigens of these pathogenic microorganisms to mono- and polyclonal antibodies conjugated with a europium chelate. The quantitative determination of the cells was carried out in immunoassay systems by measuring the Eu^{3+} time-resolved fluorescence (dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay, DELFIA) systems. In the DELFIA microplate system, comprising labeled polyclonal antibodies in solution and a LPS-protein conjugate on the solid-phase, the following analytical parameters were achieved: cell concentration measurement range – from 10^4 to 10^7 CFU/ml, sensitivity (IC_{50}) – $3 \cdot 10^5$ CFU/ml, the limit of detection (IC_{10}) – $1.5 \cdot 10^4$ CFU/ml, and the coefficient of variation – from 4.5 to 8.0 %. The broad specificity of this system enabled to detect *Salmonella enterica* of various serotypes. The possibility of testing samples of culture medium and milk without prior dilution was demonstrated. The recovery rate of samples containing *Salmonella enterica* was found to be 88–110 %. The presented development can serve as the basis for a practical kit of reagents to monitor *Salmonella enterica* bacteria in food products.

Keywords: pathogenic bacteria, *Salmonella enterica*, dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay (DELFI)

For citation. Serchenya T. S., Kasmach A. A., Lapina V. S., Bakayeva T. N., Sviridov O. V. Systems of competitive immunofluorometric assay of *Salmonella enterica* bacteria, comprising conjugates of antibodies with europium chelate. *Vestsi Natsyyanal'nei akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk*=*Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical series*, 2025, vol. 61, no. 2, pp. 141–153 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2025-61-2-141-153>

Введение. Заболевания, вызываемые патогенами пищевого происхождения, остаются серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире, несмотря на существующие и применяемые меры по обеспечению безопасности пищевых продуктов [1]. Одной из наиболее частых причин инфекций являются сальмонеллы, вызывающие вспышки заболеваний по всему миру, что приводит к огромным экономическим потерям и человеческим жертвам [1, 2]. По оценкам Всемирной организации здравоохранения в мире ежегодно регистрируется 93 млн случаев сальмонеллеза, уровень смертности составляет более 150 тыс. человек, причем две трети из них составляют дети до 5 лет [1–3]. Основным источником заражения человека являются продукты питания животного происхождения, включающие мясо, яйца, молочные продукты, а в развивающихся странах источником передачи этих бактерий может быть и вода [1, 3].

Сальмонеллы – это род грамотрицательных палочковидных бактерий, принадлежащих к семейству *Enterobacteriaceae*. Род *Salmonella* включает два вида: *Salmonella enterica* и *Salmonella bongori*. Вид *S. enterica* широко распространен у теплокровных животных и делится на шесть подвидов. Вид *S. bongori* органичен холонокровными животными и не является патогеном для человека. Каждый подвид *S. enterica* разделен на серотипы в соответствии с О- и Н-антигенной специфичностью штамма. Эта номенклатура отражает современное понимание таксономии *Salmonella* [1, 4]. В настоящее время идентифицировано 2 659 серотипов сальмонелл в соответствии со схемой Уайта–Кауфмана–Ле Минора (http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_En.pdf). Большинство из этих серотипов классифицируются как *S. enterica* subsp. *enterica* (подвид I), они вызывают до 99 % заболеваемости в мире у человека и теплокровных животных [1–4]. Установлено, что практически значимыми являются только 10–15 серотипов. Исследования показали, что отравления и пищевые инфекции чаще всего вызывают *S. enterica* серотипов Typhimurium, Enteritidis, Newport, Heidelberg, Derby, London, Virchow, Infantis, Agona [1–3]. Смертельные случаи чаще всего наблюдаются при инфицировании серотипами Enteritidis или Typhimurium [2].

Серологический вариант сальмонеллы – это ее биологический паспорт, который отражает антигенную структуру данной бактерии [1, 4–6]. Для идентификации и серологической диагностики сальмонелл используют два основных антигенных комплекса: О- и Н-антигены. Это структурные элементы бактериальной клетки. Соматические О-антигены термоустойчивы и представляют собой липополисахаридные (ЛПС) комплексы. Жгутиковые Н-антигены имеют белковую природу и термолабильны. У бактерий рода *Salmonella* также выделяют поверхностные и капсульные антигены под общим названием К-антиген. Эти антигены термочувствительны и состоят из капсульных полисахаридов, которые окружают клеточную стенку и могут покрывать О-антигены. Комбинация О- и Н-антигена определяет серотип. По общности соматического О-антигена сальмонеллы объединены в пять больших серогрупп: А, В, С, D, Е. Из сальмонелл, которые вызывают заболевания у человека и животных, около 95 % относятся к серогруппам А–Е [1, 3, 7], поэтому для выявления патогенных бактерий используются антитела к О-антигену сальмонелл именно этих групп.

Учитывая серьезную угрозу, которую представляют сальмонеллы для здоровья человека, своевременное выявление потенциального загрязнения этими патогенами является актуальным и востребованным для обеспечения биобезопасности пищевых продуктов. Оценка биобезопасности необходима на всех этапах пищевой цепи – от сельскохозяйственного производства до переработки и изготовления продуктов. Во многих странах мира введены меры профилактики и контроля [8]. В силу своей высокой патогенности сальмонеллы не должны присутствовать в пище. Максимально допустимый уровень (МДУ) для выявления в диагностических тестах составляет 1–3 КОЕ в 25 г тестируемого продукта [9].

Основные методологические стратегии обнаружения пищевого патогена *Salmonella enterica*, которые находят применение в практических лабораториях, состоят из микробиологических тестов, молекулярно-генетических анализов и иммунологических методов [7, 10]. В дополнение к этим способам в научных публикациях также развиваются и представлены разработки методик, основанных на взаимодействиях бактерий с аптамерами, бактериофагами, лектином [10, 11]. В исследованиях представлены также платформы для реализации анализа в виде биосенсоров [7, 12], описаны и электрохимические методы [13].

Микробиологические подходы, основанные на культивировании исследуемого материала на питательных средах, относятся к традиционным методам обнаружения клеток сальмонелл (так называемый золотой стандарт; ГОСТ 31659-2012, ISO 6579:2002) [14]. Эти подходы обеспечивают эффективную диагностику, однако требуют много времени (до 5–7 дней) и трудозатратны. Они не позволяют проводить быстрый мониторинг большого количества образцов на наличие возбудителя инфекции. Современный молекулярно-генетический метод обнаружения бактериальных возбудителей основан на выявлении ДНК микроорганизмов. Соответствующие методики включают полимеразную цепную реакцию (ПЦР), количественную ПЦР в реальном времени, петлевую изотермическую амплификацию [15, 16]. Имея высокую чувствительность и точность, эти подходы требуют наличия высокотехнологичного, дорогостоящего оборудования и специалистов с высокой квалификацией. Альтернативные диагностические методики основаны на иммуноаналитическом выявлении антигенов бактерий с применением специфических антител в первую очередь в системах иммуноферментного анализа (ИФА). В этих тестах преимущественно определяются ЛПС-антигены сальмонелл [17–19], описано также применение антител к белковым антигенам *S. enterica* [20, 21]. Иммуноаналитические системы представлены в виде сэндвич-конструкций [17, 18] или в конкурентном формате [19–22]. Согласно литературе пределы обнаружения для ИФА варьируются в диапазоне 10^5 – 10^6 КОЕ/мл [10, 23]. Иммуноанализ признан как простой, высокопроизводительный и высокоспецифичный метод и считается надежным скрининговым тестом [7, 10, 23], поэтому мы выбрали иммунохимический подход для разработки перспективного теста на *S. enterica* в пищевой продукции. В качестве метки для детекции взаимодействия антиген–антитело был исследован 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, 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 высокую чувствительность и широкий концентрационный диапазон определения аналита [24–26]. Системы ЛИФМА для обнаружения бактерий не описаны в литературе.

Целью данной работы были химический синтез, получение реагентных форм, изучение иммунохимических свойств компонентов и разработка систем ЛИФМА для количественного определения патогенных бактерий *Salmonella enterica*. Комплексное исследование включало сравнение таких систем по параметрам чувствительности, специфичности, пределу обнаружения патогена, стабильности при хранении, а также оценку устойчивости к матрикс-эффектам образцов пищевых продуктов. Эти результаты были необходимы для обоснованного выбора тест-системы, удовлетворяющей условиям практического применения.

Материалы и методы. Реактивы, препараты и приборы. В экспериментальной работе использовали трис, тритон X-100, триоктилфосфиноксид, β -нафтоилтрифторацетон, глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), проклин 300, тимеросаль, бычий сывороточный альбумин (БСА), липополисахарид (ЛПС) из *Salmonella Typhimurium* и *Enteritidis* (Sigma-Aldrich, США), хлорид натрия, Твин 20, уксусную кислоту (Merck, Германия), NaHCO_3 , сахарозу, сорбит, натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный, натрий фосфорнокислый однозамещенный 2-водный, гидроксид натрия, соляную кислоту (Riedel-de Haën, Германия), лактозу, декстран 70, этилендиаминтетрауксусную кислоту (AppliChem, Германия), сухой питательный бульон для накопления сальмонелл по Раппапорту–Вассилиадису (RVS-бульон) (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ), колонки с Sephadex G-25 (GE Healthcare, США). Применявшиеся реактивы отечественного производства

имели степень чистоты не ниже «ч. д. а.». Моноклональное антитело (МАт) клона 5D12A против корового антигена сальмонелл получено от ОАО «Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения» (Россия). Поликлональные антитела (ПАт) против *Salmonella enterica* (Goat anti-Salmonella CSA-Plus Antibody) с широкой групповой специфичностью против серогрупп А, В, С, D, Е, G и инаktivированные клетки *Salmonella* Typhimurium (положительный контроль, $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) были приобретены у The Native Antigen Compan (Великобритания). Поливалентная О-специфичная кроличья антисыворотка (Ас) против основных серогрупп (А, В, С, D, Е) сальмонелл поступила от ЗАО «ЭКОлаб» (Россия). Антивидовые антитела (антитела козы против иммуноглобулинов кролика) получены на Опытном производстве Института биоорганической химии НАН Беларуси. Конъюгат ЛПС-БСА был любезно предоставлен профессором Chuanlai Xu (Цзяннаньский университет, КНР). Для приготовления растворов использовали деионизированную воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм · см, полученную в модульной системе очистки воды Arium® pro VF фирмы Sartorius (Германия). При проведении иммунофлуориметрии в качестве твердофазных носителей использовали разборные полистирольные микропланшеты с 96 лунками от фирмы «Хема-медика» (Россия).

Получение клеток *Salmonella enterica*. Из коллекции патогенных микроорганизмов лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии Научно-исследовательского института гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии (Минск, Беларусь) получены инаktivированные штаммы бактерий: *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. London*, *S. Newport*, *S. Derby*, *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) в концентрации $5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

Бактерии *Salmonella enterica* различных серотипов выращивали на селективной среде висмут-сульфит агар (Оболensk, Россия) при температуре 37 °С в течение 24 ч. Все штаммы сформировали характерные колонии черные с коричневым или темно-зеленым оттенком с металлическим блеском и окрашиванием среды под колониями в черный цвет. Далее проводили посев на среду трипказо-соевый агар (Оболensk, Россия) с целью получения изолированных колоний. Проводили выращивание колонии в течение 16–20 ч при температуре 37–39 °С и проверяли на чистоту роста с помощью микроскопии мазков, окрашенных по Грамму. Установлено, что в поле светового микроскопа морфология бактерий была типичной для рода *Salmonella*. Бактерии представляли собой грамотрицательные палочки с закругленными концами, располагались одиночно, попарно, небольшими скоплениями неопределенной формы. Затем отбирали не менее 6–8 колоний, переносили их бактериологической петлей на мясо-пептонном агаре (МПА) и выращивали 16–20 ч при температуре 37–39 °С. Суточные агаровые культуры использовали для получения бактериальных суспензий. Концентрацию бактерий определяли чашечным методом и с помощью денситометра DEN-1 (BioSan, Латвия). Инаktivировали бактерии нагреванием при температуре 80–85 °С в течение 20 мин. В пробы добавляли тимеросаль до концентрации 0,2 % и хранили клетки при 4 °С. Для контроля качества инаktivации проводили высевы полученной суспензии сальмонелл на МПА в чашках Петри и выдерживали в условиях термостата при 37 °С в течение трех суток. При этом рост сальмонелл в чашках Петри отсутствовал во всех испытуемых контрольных образцах.

Синтез и характеристика конъюгатов антител с хелатом европия. Конъюгаты антител с комплексоном европия синтезировали по методике [25]. К растворам МАт клона 5D12A (конъюгат 1), ПАт (конъюгат 2) и антивидовых антител (антитела козы против иммуноглобулинов кролика – конъюгат 3) в 0,1 М NaHCO₃, pH 8,3, с концентрацией иммуноглобулинов 2 мг/мл и объемом 0,3 мл добавляли по 0,1 мл свежеприготовленного раствора комплексной европиевой соли N1-[2-(п-(сукцинимидилкарбокси) бензоил-амино)этиламида]диэтилентриаминпентауксусной кислоты с концентрацией 4 мг/мл. Полученные растворы тщательно перемешивались и инкубировались при температуре 4 °С в течение 18 ч. Для очистки конъюгатов проводили гель-фильтрацию на колонке (1 × 30 см) с сорбентом Superose 12 в установке для быстрой жидкостной хроматографии белков (FPLC) при скорости элюирования 10 мл/ч. Колонку уравнивали 0,05 М трис-HCl, pH 7,8, 0,15 М NaCl. Фракции, содержащие отдельные конъюгаты 1–3, объединяли. По поглощению при 280 нм определяли концентрации антител, используя коэффициент экстинкции 1,35 г⁻¹·л·см⁻¹. Содержание ионов европия в конъюгатах устанавливали по калибро-

вочной кривой, полученной с использованием стандартных растворов с точными концентрациями (0,01; 0,02; 0,1; 0,2; 1,0 и 2,0 нМ) Eu^{3+} . Для этого растворы конъюгатов и стандартные растворы вносили в лунки микропланшета и добавляли диссоциативно-усиливающий раствор, содержащий 50 мкМ триоктилфосфиноксид, 15 мкМ β -нафтоилтрифторацетон и 0,1 % тритон X-100. Планшет инкубировали в течение 30 мин при температуре 25 °С и проводили измерение времязрешенной флуоресценции (TRF) с помощью микропланшетного флуориметра DELFIA 1234 фирмы Wallac Oy (Финляндия). Степень включения Eu^{3+} в молекулы иммуноглобулинов рассчитывали как мольное соотношение Eu^{3+} /белок.

Лантанидный иммунофлуориметрический анализ. В системах ЛИФМА в лунках микропланшета иммобилизовали конъюгат ЛПС-БСА путем внесения во все лунки по 100 мкл раствора с концентрацией 0,25 мкг/мл в 0,1 М NaHCO_3 и инкубации при 4–8 °С в течение 18 ч. Таким образом готовили твердую фазу с ЛПС из *Salmonella enterica* серотипа Typhimurium и с инактивированными клетками *Salmonella enterica* серотипа Typhimurium. Для иммобилизации ЛПС использовали раствор с концентрацией 0,25 мкг/мл, суспензию *S. enterica* готовили с содержанием клеток $5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл. При выборе условий иммобилизации варьировали концентрации ЛПС-БСА и ЛПС в диапазоне 0,1–1,0 мкг/мл, клеток *S. enterica* – $1 \cdot 10^7$ – $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Стабилизацию проводили добавлением во все лунки по 150 мкл 0,05 М трис- HCl , pH 7,5, содержащего 0,15 М NaCl , 0,05 % Твин 20, 1 мг/мл БСА, 2 % сахарозу, 2 % сорбит, 0,01 % проклин 300, и выдерживанием планшета при 4–8 °С в течение 18 ч.

Калибровочные растворы готовили на основе инактивированных клеток *S. enterica* серотипа Typhimurium в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл в 0,05 М трис- HCl , pH 7,5, содержащем 0,15 М NaCl , 0,05 % твин 20, 1 мг/мл БСА, 0,01 % проклин 300. При тестировании также использовали калибровочные пробы, приготовленные с использованием инактивированных клеток *S. Typhimurium* положительного контроля (The Native Antigen Company). При проведении анализа в лунки вносили по 50 мкл калибровочных растворов или исследуемых проб и по 50 мкл европиевого конъюгата МАт 5D12А (тест-система ЛИФМА-1) или ПАт (ЛИФМА-2) в концентрации 0,5 мкг/мл. Инкубировали планшет в течение 1 ч при температуре 25 °С в термостате. Далее удаляли непрореагировавшие компоненты и промывали планшет с использованием промывочного раствора (0,01 М трис- HCl , pH 7,5, 0,15 М NaCl , 0,05 % Твин 20). 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 со встряхиванием при 20–25 °С. Проводили измерение флуоресценции при длинах волн возбуждения 320 нм и регистрации 615 нм с временной задержкой 400 мкс.

В тест-системе с использованием антисыворотки против *S. enterica* (ЛИФМА-3) анализ проводили в две стадии. На первой вносили по 50 мкл растворов проб и по 50 мкл раствора Ас в титре 1 : 250, проводили инкубацию в течение 1 ч при температуре 25 °С в термостате. На второй стадии после промывки в лунки добавляли по 100 мкл раствора конъюгата антивидовых антител (антитела овцы против иммуноглобулинов кролика) с комплексоном европия в концентрации 0,4 мкг/мл, инкубировали планшет 40 мин при 25 °С в термостате. Далее промывали планшет, инкубировали с диссоциативно-усиливающим раствором и проводили TRF-спектроскопию, как описано выше.

Рассчитывали соотношение F/F_0 в %, где F_0 – интенсивность TRF в отсутствие клеток *S. enterica* в растворе, F – интенсивность TRF в присутствии возрастающих концентраций клеток *S. enterica*. Калибровочные графики зависимости конкурентного связывания от концентраций *S. enterica* в калибровочных пробах строили в координатах: F/F_0 в % (ось ординат, линейная) и концентрация в КОЕ/мл (ось абсцисс, логарифмическая), используя аппроксимацию $y = a \cdot \lg(x) + b$.

Оценка специфичности исследуемых антител против *Salmonella enterica*. В иммунофлуориметрических экспериментах по характеристике специфичности исследуемых антител (МАт, ПАт, Ас) против сальмонелл готовили калибровочные пробы на основе клеток различных серотипов *S. enterica*, включающих Typhimurium, Enteritidis, London, Newport, Derby и непатогенный штамм SL7207, или путем внесения отрицательного контроля *Listeria monocytogenes*. Калибровочные пробы содержали клетки в диапазоне концентраций от $1 \cdot 10^4$ до $1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл в 0,05 М

трис-НCl, pH 7,5, содержащем 0,15 М NaCl, 0,05 % Твин 20, 1 мг/мл БСА, 0,01 % проклин 300. Проводили ЛИФМА с использованием указанных антител, как описано выше, и интерпретировали относительное связывание F/F_0 для каждой калибровочной кривой.

Расчет аналитических параметров и обработка результатов ЛИФМА. Рассчитывали аналитические показатели калибровочных графиков, полученных при использовании различных меченных антител в растворе и твердофазных антигенов. Общую чувствительность метода оценивали по графически определенной величине IC_{50} , которая соответствует концентрации бактериальных клеток *S. enterica*, вызывающей 50%-е ингибирование связывания антител с антигеном (уменьшение F_0 вдвое). Предел обнаружения (аналитическая чувствительность, минимальная достоверно измеряемая концентрация) в ЛИФМА определяли как IC_{10} (ингибирование на 10 %). Для проверки качества выполнения измерений рассчитывали значения коэффициента вариации (К. В.). К. В. определяли между параллельными результатами измерений одной и той же градуировочной или исследуемой пробы (сходимость, повторяемость). Параметр степень открытия проб рассчитывали как отношение концентрации *S. enterica*, измеренной по калибровочной кривой, к концентрации *S. enterica*, созданной внесением клеток в пробу.

Все эксперименты по исследованию иммунохимического взаимодействия *S. enterica* и антител проводили не менее чем в трех повторах. Обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel. На калибровочных графиках и в таблицах планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение (SD).

Исследование стабильности иммунохимических свойств инаktivированных клеток Salmonella enterica при хранении. Готовили пробы инаktivированных клеток *S. Typhimurium* в выбранных стабилизирующих буферных растворах. Для хранения при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ без замораживания пробы *S. enterica* разводили в 0,05 М НФБ, pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, 50 % глицерин, 0,05 % тимеросаль (буфер 1) и 0,05 М НФБ, pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, 50 % глицерин, 1 мг/мл БСА, 0,05 % тимеросаль (буфер 2). Для хранения при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ пробы инаktivированных клеток сальмонелл разводили в 0,05 М НФБ, pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, 5 % сахарозу, 0,05 % тимеросаль (буфер 3) и 0,05 М НФБ, pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, 5 % декстран 70, 0,05 % тимеросаль (буфер 4); 0,05 М НФБ, pH 7,4, содержащем 0,15 М NaCl, 1 мг/мл БСА, 5 % лактозу, 0,05 % тимеросаль (буфер 5). Далее пробы в буферах 3–5 лиофилизировали. Полученные растворы исследовали также непосредственно после приготовления и лиофилизации. Пробы в указанных буферных растворах 1, 2 и 3–5 выдерживали при температурах соответственно $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1–6 месяцев и осуществляли контроль по истечении 1, 3 и 6 месяцев. Количественное определение активных антигенов клеток проводили в ЛИФМА и рассчитывали концентрацию в пробах по калибровочной кривой. В экспериментах применяли препарат положительного контроля инаktivированных клеток *S. Typhimurium*. Иммунореактивность клеток определяли в системе ЛИФМА, включающей меченные ПАТ в растворе и ЛПС-БСА на твердой фазе, как описано выше. Показателем устойчивости клеток в ходе хранения служила их остаточная иммунореактивность как отношение концентрации клеток в пробе, найденной в процессе хранения, к исходной концентрации.

Исследование матрикс-эффекта при тестировании проб продуктов в разрабатываемой ЛИФМА-системе. В качестве матрикса использовали питательную среду RVS-бульон и молоко жирностью 3,2 %, а также разбавленную форму этого молока, полученную разведением в 10 раз буферным раствором для калибровочных проб. В выбранные матриксы добавляли инаktivированные клетки *S. Typhimurium* в диапазоне концентраций $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, перемешивали и выдерживали для равномерного распределения. Проводили анализ в системе ЛИФМА-2 на основе меченных ПАТ и твердофазного ЛПС-БСА, как описано выше. При проведении ЛИФМА молоко обезжиривали. Для этого образец объемом 10 мл центрифугировали при 2 000 g в течение 10 мин при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, удаляли шпателем верхний жировой слой и отбирали аликвоту объемом 200 мкл для анализа.

Результаты и их обсуждение. В представленном исследовании использовали коммерчески доступные специфические реагенты – моноклональные и поликлональные антитела, выделенные в чистом виде или в составе антисыворотки, к бактериям вида *Salmonella enterica* подвида

enterica для разработки тест-систем конкурентного иммунофлуориметрического анализа этих патогенных бактерий в пищевых продуктах. Для выявления большого круга данных патогенов бактерий были выбраны МАт и ПАт, так как МАт часто позволяет в анализе добиться высокой специфичности, а тест-системы на основе ПАт потенциально обладают более высокой чувствительностью [7, 10]. Исследуемые МАт взаимодействуют с коровым антигеном, в то время как ПАт и антитела в составе Ас направлены на О-антигены ЛПС *S. enterica*. Антигенсвязывающие свойства сальмонелл-специфичных МАт и ПАт исследовали в системах ЛИФМА. Лантанидные метки позволяют разработать чувствительные системы с широким диапазоном определяемых концентраций аналитов. Принцип действия разрабатываемых систем состоит в конкурентном распределении антител между антигеном *S. enterica*, иммобилизованным на твердой фазе, и антигеном в растворе в составе калибровочных или исследуемых проб. Для детекции иммунохимического взаимодействия очищенные антитела (МАт и ПАт) конъюгировали с хелатом европия. Анализ в этих системах проходил в одну стадию. В тест-системе, включающей антисыворотку против *S. enterica*, аналитический процесс состоял из двух стадий, и выявление связавшихся антител проводили за счет конъюгата антивидовых антител с комплексоном европия. В каждой из трех исследованных тест-систем на твердой фазе иммобилизовали три варианта антигенов *S. enterica*: конъюгат БСА с ЛПС из серотипа Typhimurium, свободный ЛПС из *S. Typhimurium* и инактивированные клетки *S. Typhimurium* из буфера. В качестве калибровочных проб использовали суспензии инактивированных клеток *S. enterica*.

Для проведения иммуноанализа в комбинации с TRF-спектроскопией были синтезированы и исследованы конъюгаты биомолекул (МАт и ПАт против *S. enterica*, антивидовые антитела) с хелатом редкоземельного элемента (лантанида) Eu^{3+} . Для синтеза применяли реагент, состоящий из двух функционально значимых частей, а именно комплексономата Eu^{3+} и N-сукцинимидного эфира, соединенных алифатическим участком. Комплексономат ответственен за флуоресцентный сигнал в ЛИФМА. N-сукцинимидный эфир ацилирует ϵ -аминогруппы лизина в молекуле белка. Для очистки конъюгатов от химически не связанного комплексономата Eu^{3+} применяли гель-фильтрацию. Времяразрешенную флуоресценцию очищенных конъюгатов измеряли в диссоциативно-усиливающем растворе и рассчитывали удельное содержание комплексономата европия в составе антител по методике с использованием растворов с точным содержанием Eu^{3+} [25]. Молярная степень включения лантанидохелата в исследуемые специфические МАт и ПАт и антивидовые антитела составила соответственно 8, 9 и 10. Полученные значения удовлетворяют требованиям, предъявляемым к меченым реагентам в ЛИФМА.

Для получения надлежащих аналитических характеристик разрабатываемых тест-систем проводили экспериментальную работу по выбору оптимальных условий проведения иммунохимического взаимодействия специфических компонентов. В результате конъюгат ЛПС-БСА и индивидуальный ЛПС иммобилизовали на твердой фазе из растворов с концентрацией 0,25 мг/мл, содержание клеток в суспензии для адсорбции составляло $5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, а конъюгаты антител с комплексономатом европия использовали в концентрациях 0,5 мкг/мл. При этом диапазон концентраций калибровочных проб составлял $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл.

Биоаналитические характеристики тест-систем, включающих меченные комплексономатом европия антитела и различные твердофазные антигены *Salmonella enterica* в оптимальных условиях, представлены в табл. 1. Как видно, наибольшие показатели связывания F_0 в относительных единицах TRF для исследуемых специфических антител в отсутствие антигена *S. enterica* в растворе достигаются при иммобилизации в лунках микропланшета конъюгата ЛПС-БСА или свободного ЛПС. В этих случаях значения F_0 находятся в пределах $(325\text{--}675) \cdot 10^3$ отн. ед., что удовлетворяет требованиям к значениям этого параметра для практических тест-систем. Значения параметра чувствительности IC_{50} были сходными для твердофазной иммобилизации БСА-ЛПС или ЛПС в каждой отдельной тест-системе и составили соответственно $(0,75 \text{ и } 1,0) \cdot 10^6$ КОЕ/мл в системе с МАт, $(0,3 \text{ и } 0,5) \cdot 10^6$ КОЕ/мл – с ПАт и $(0,6 \text{ и } 1,0) \cdot 10^6$ КОЕ/мл – с Ас. Как видно, наилучшие значения IC_{50} достигаются в тест-системе ЛИФМА-2 с применением как ЛПС-БСА, так и ЛПС на твердой фазе. Предел детекции (IC_{10}) в этой системе ЛИФМА, содержащей меченные комплексономатом европия ПАт и твердофазный ЛПС-БСА, составил $1,5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. В системе

с МАт и ЛПС-БСА предел детекции был равен $8 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, а в случае комбинации Ас и ЛПС-БСА – $3 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. Для всех тест-систем коэффициент вариации результатов измерений находился в пределах от 4,5 до 9,2 %. Таким образом, наилучшими параметрами иммунохимического связывания (F_0), чувствительности (IC_{50}) и предела детекции характеризуется тест-система ЛИФМА-2, содержащая меченные комплексоном европия ПАт и твердофазный ЛПС-БСА.

Т а б л и ц а 1. Биоаналитические характеристики иммунофлуориметрических тест-систем, включающих меченные комплексоном европия антитела и различные твердофазные антигены *Salmonella enterica*

Table 1. The bioanalytical characteristics of immunofluorimetric test systems, comprising europium complexonate labeled antibodies and various solid-phase antigens of *Salmonella enterica*

Тест-система	Компоненты		Параметры			
	Антитело	Твердая фаза	$F_0 \cdot 10^{-3}$, отн. ед.	$IC_{50} \cdot 10^{-6}$, КОЕ/мл	Предел детекции, $\times 10^{-5}$, КОЕ/мл	К. В., %
ЛИФМА-1	МАт	ЛПС-БСА	505	0,75	0,8	5,7
		ЛПС	520	1,0	0,9	6,4
		Клетки	346	2,0	1,3	9,2
ЛИФМА-2	ПАт	ЛПС-БСА	626	0,3	0,15	4,5
		ЛПС	430	0,5	0,5	5,2
		Клетки	401	1,6	0,9	8,0
ЛИФМА-3	Ас	ЛПС-БСА	325	0,6	0,3	5,1
		ЛПС	675	1,0	0,8	5,8
		Клетки	225	3,2	1,6	8,8

Для оценки специфичности исследуемых ЛИФМА-систем проведено тестирование с использованием инактивированных клеток шести серотипов сальмонелл и отрицательного контроля. Выбор серотипов для исследования проводили по критерию принадлежности к различным серогруппам и по факту наиболее частой встречаемости в группе как причины сальмонеллезов [1–4]. Полученные результаты представлены на рис. 1. Установлено, что все исследуемые антитела, как выделенные в чистом виде и конъюгированные с лантанидохелатом МАт и ПАт, так и в составе антисыворотки, позволяли детектировать бактерии *S. enterica* серотипов, относящихся к наиболее распространенным серогруппам В–Е. К группе В относятся серотипы Typhimurium и Derby, а также непатогенный штамм, к группе С – Newport, к группе D – Enteritidis, к группе Е – London. Деление *S. enterica* на серологические группы основано на сходности характеристик соматического О-антигена у серотипов данной группы, поэтому иммуноаналитическое выявление одного

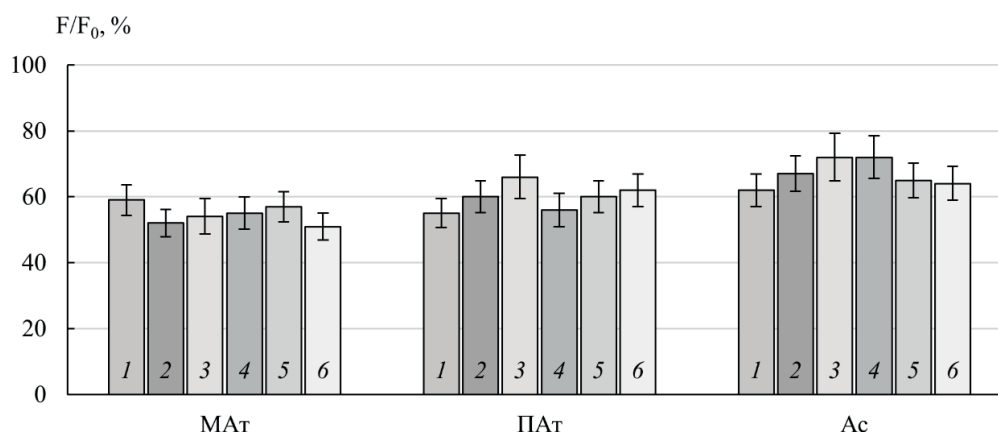


Рис. 1. Характеристика специфичности взаимодействия исследуемых антител с различными серотипами *Salmonella enterica* в ЛИФМА-системах: 1 – Typhimurium, 2 – Enteritidis, 3 – London, 4 – Newport, 5 – Derby, 6 – непатогенный штамм SL7207

Fig. 1. The specificity of the studied antibodies interaction with various *Salmonella enterica* serotypes in DELFIA systems: 1 – Typhimurium, 2 – Enteritidis, 3 – London, 4 – Newport, 5 – Derby, 6 – attenuated strain SL7207

из представителей позволяет утверждать о детекции всей группы. В работе показано, что конкурентное связывание меченных МАт с *S. enterica* в концентрации $5 \cdot 10^5$ КОЕ/мл находится в пределах 58–61 % для различных серотипов. Взаимодействие ПАт, конъюгированных с комплексонатом европия, и антисыворотки с *S. enterica* различных серотипов в концентрации $2 \cdot 10^5$ КОЕ/мл варьировалось в диапазонах 58–65 и 61–75 % соответственно. Полученные значения для каждой тест-системы находились в пределах, обусловленных коэффициентом вариации результатов измерений данной системой. Сходные значения связывания клеток различных серотипов *S. enterica* исследуемыми антителами в каждой отдельной системе свидетельствуют о широкой групповой специфичности анализа. Это позволяет рекомендовать представленные тест-системы для решения практических задач полного выявления сальмонелл в пищевой продукции.

Сравнение аналитических характеристик трех представленных ЛИФМА-систем для количественного определения патогенных микроорганизмов, содержащих моно- и поликлональные антитела и различные твердофазные антигены *S. enterica*, позволяет сделать следующие выводы. По специфичности все разработанные тест-системы имеют показатели широкой кросс-реактивности в отношении различных серотипов сальмонелл, относящихся к серогруппам В–Е. По продолжительности анализа предпочтительными являются системы одностадийного ЛИФМА, содержащие меченные специфические МАт и ПАт к *S. enterica* и отличающиеся от тест-системы с применением Ас, где флуориметрическая детекция протекает на второй стадии. По всему комплексу технико-аналитических параметров, включающих предел обнаружения, чувствительность, специфичность, диапазон измеряемых концентраций и время анализа, наилучшие результаты показала ЛИФМА-система на основе меченных комплексонатом европия ПАт и твердофазного конъюгата ЛПС-БСА. Калибровочный график этой системы с использованием проб с известными концентрациями *S. enterica* серотипа Typhimurium показан на рис. 2. Широкий диапазон определяемых концентраций ($0,3 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл) включает линейный участок от $1 \cdot 10^4$ до $3 \cdot 10^6$ КОЕ/мл.

Для установления условий сохранения иммунореактивности клеток сальмонелл при их применении в качестве калибровочных проб в биоаналитических системах выдерживали бактерии *S. enterica* серотипа Typhimurium в стабилизирующих буферных растворах (табл. 2). Кроме того, изучены условия хранения клеток *S. enterica* при -20°C без проведения стадии замораживания-размораживания с использованием буферных растворов, содержащих 50 % глицерин (буферы 1 и 2). Установлено, что добавление БСА в такой буферный раствор увеличивает степень сохранения иммунореактивности клеток с 88 до 98 % в течение 6 месяцев. Важным приемом приготовления реагентных форм компонентов иммуноаналитических систем является их лиофильное высушивание. Для лиофилизации бактериальных клеток исследовали растворы, содержащие стабилизирующие белковые и небелковые наполнители и консервирующие добавки (буферы 3–5). Оптимальным буферным раствором для сохранения антигенных свойств клеток *S. enterica* в процессе сушки из замороженного состояния и последующего хранения оказался буфер 3, содержащий 5 % сахарозу (см. табл. 2). Показано, что эта среда обеспечивает сохранение до 99 % антигенных свойств *S. enterica*, подвергнутых лиофилизации и затем выдерживаемых в течение 6 месяцев.

Для оценки матрикс-эффекта проб в ЛИФМА и проверки возможности анализа образцов без предварительного их разведения исследовали в качестве матриксов питательную среду для культивирования клеток сальмонелл (RVS-бульон), молоко жирностью 3,2 % и его разведенную

Таблица 2. Влияние условий и продолжительности хранения на иммунохимическую активность клеток *Salmonella enterica*

Table 2. Influence of storage conditions and duration on the immunochemical activity of *Salmonella enterica* cells

Среда и условия хранения		Активность, %		
		1 месяц	3 месяца	6 месяцев
Буфер 1	-18°C	90 ± 1	88 ± 2	88 ± 2
Буфер 2	-18°C	98 ± 1	99 ± 1	98 ± 1
Буфер 3	Лиофилизация	100 ± 1	99 ± 1	99 ± 1
Буфер 4	Лиофилизация	79 ± 1	78 ± 1	74 ± 1
Буфер 5	Лиофилизация	85 ± 1	82 ± 1	80 ± 1

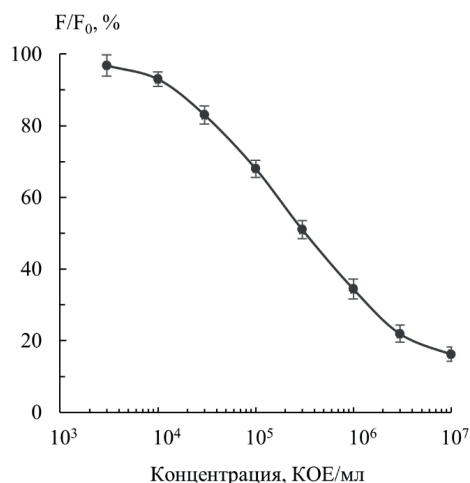


Рис. 2. Калибровочный график ЛИФМА *Salmonella enterica* (F – интенсивность времяразрешенной флуоресценции (TRF))

Fig. 2. The calibration curve of DELFIA of *Salmonella enterica* (F – time-resolved fluorescence (TRF) intensity)

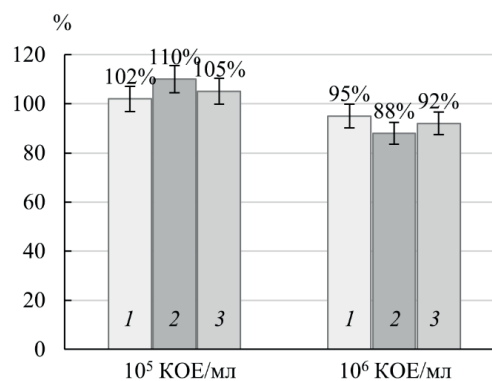


Рис. 3. Влияние матрикса на степень открытия проб с *Salmonella enterica* в ЛИФМА-системе: 1 – питательная среда RVS-бульон, 2 – молоко, 3 – молоко, разведенное 10 раз

Fig. 3. Matrix influence on the recovery rate of the samples with *Salmonella enterica* in the DELFIA system: 1 – medium RVS-broth, 2 – milk, 3 – milk diluted 1 : 10

форму. Отметим, что в RVS-среде происходит дорастивание клеток сальмонелл для более надежного их выявления в иммунохимических системах при тестировании различных продуктов, поэтому данная среда является универсальным матриксом. В выбранные матриксы добавляли инактивированные клетки *S. Typhimurium* в концентрациях $1 \cdot 10^5$ и $1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл и проводили ЛИФМА. Установлено, что степень открытия бактерий в искусственно загрязненных пробах на основе культуральной среды, цельного молока и разведенного молока находилась в диапазонах соответственно 95–102, 88–110 и 92–105 % (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии значимого матрикс-эффекта сред в разработанной ЛИФМА-системе и удовлетворяют требованиям к уровню открытия аналита тест-системами практического назначения.

Закключение. Для обнаружения сальмонелл в продуктах питания разработаны три микропланшетные тест-системы ЛИФМА с высокочувствительной детекцией времяразрешенной флуориметрией. Они основаны на узнавании и специфическом связывании липополисахаридных антигенов *Salmonella enterica* моно- и поликлональными антителами. Конструкции биоаналитических систем предусматривают конкурентное взаимодействие клеточных антигенов в жидкой фазе и свободного или конъюгированного ЛПС из сальмонелл, иммобилизованного на твердой фазе, с растворенными чистыми антителами, мечеными комплексоном европия, или с анти-сывороткой и последующей детекцией антивидовым антителом, содержащим такую же метку. Описаны синтезы и свойства конъюгатов БСА-ЛПС и иммуноглобулин-органический комплекс Eu^{3+} . Проведено сравнение аналитических характеристик систем ЛИФМА, основанных на применении МАт, ПАт и Ас. По результатам экспериментов предложена тест-система, содержащая меченные ПАт и иммобилизованный конъюгат БСА-ЛПС, как основа набора реагентов для практического применения. При этом получаемый аналитический результат в отличие от коммерческих тестов является количественным. Анализ проходит в одну стадию в течение 1 ч при 25 °С. Рабочий диапазон измеряемых концентраций бактерий для этой системы составил 10^4 – 10^7 КОЕ/мл, предел детекции равен $1,5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл. Установлена широкая специфичность тест-системы в отношении *Salmonella enterica* различных серотипов. Показана возможность проведения тестирования без предварительного разведения исследуемых образцов. Степень открытия *S. enterica* в искусственно загрязненной культуральной среде или в молоке варьировалась от 88 до 110 %. Таким образом, технико-аналитические характеристики системы ЛИФМА с конструкцией ПАт/ЛПС-БСА отвечают требованиям к практическим наборам реагентов для выявления *Salmonella enterica*.

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

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

Список используемых источников

1. Salmonellosis: An Overview of Epidemiology, Pathogenesis, and Innovative Approaches to Mitigate the Antimicrobial Resistant Infections / B. Lamichhane, A. M. M. Mawad, M. Saleh [et al.] // *Antibiotics* (Basel). – 2024. – Vol. 13, № 1. – P. 76. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010076>
2. Chlebicz, A. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review / A. Chlebicz, K. Śliżewska // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2018. – Vol. 15, № 5. – P. 863. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>
3. The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections / R. Balasubramanian, J. Im, J.-S. Lee [et al.] // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. – 2019. – Vol. 15, № 6. – P. 1421–1426. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1504717>
4. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme / S. Issenhuth-Jeanjean, P. Roggentin, M. Mikoleit [et al.] // *Research in Microbiology*. – 2014. – Vol. 165, № 7. – P. 526–530. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>
5. Grimont, P. Antigenic Formulae of the *Salmonella* serovars / P. Grimont, F.-X. Weill. – 9th ed. – Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institute Pasteur, 2007. – 166 p.
6. Чугунова, Е. О. Антигенная структура сальмонелл / Е. О. Чугунова, Н. А. Татарникова, О. Г. Мауль // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 11–9. – P. 1971–1974.
7. Overview of Rapid Detection Methods for *Salmonella* in Foods: Progress and Challenges / M. Wang, Y. Zhang, F. Tian [et al.] // *Foods*. – 2021. – Vol. 10, № 10. – P. 2402. <https://doi.org/10.3390/foods10102402>
8. Mkangara, M. Prevention and Control of Human *Salmonella enterica* Infections: An Implication in Food Safety / M. Mkangara // *International Journal of Food Science*. – 2023. – Vol. 2023. – P. 1–26. <https://doi.org/10.1155/2023/8899596>
9. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 5: *Salmonella* / M. Wang, H. Wang, A. Jacobson [et al.]. – FDA, 2024. – URL: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella> (date of access: 31.07.2024).
10. A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms / P. Rajapaksha, A. Elbourne, S. Gangadoo [et al.] // *Analyst*. – 2019. – Vol. 144, № 2. – P. 396–411. <https://doi.org/10.1039/C8AN01488D>
11. Paniel, N. Detection of *Salmonella* in Food Matrices, from Conventional Methods to Recent Aptamer-Sensing Technologies / N. Paniel, T. Nogueir // *Foods*. – 2019. – Vol. 8, № 9. – P. 371. <https://doi.org/10.3390/foods8090371>
12. Shen, Y. Biosensors for rapid detection of *Salmonella* in food: A review / Y. Shen, L. Xu, Y. Li // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2021. – Vol. 20, № 1. – P. 149–197. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12662>
13. Brainina, K. Z. Hybrid Electrochemical/Magnetic Assay for *Salmonella* Typhimurium Detection / K. Z. Brainina, A. N. Kozitsina, Y. A. Glazyrina // *IEEE Sensors Journal*. – 2010. – Vol. 10, № 11. – P. 1699–1704. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2010.2046410>
14. D'Aoust, J.-Y. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* / J.-Y. D'Aoust, A. M. Sewell, D. W. Warburton // *International Journal of Food Microbiology*. – 1992. – Vol. 16, № 1. – P. 41–50. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90124-L](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90124-L)
15. Revealing the secrets of PCR / H. Zhang, H. Li, H. Zhu [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2019. – Vol. 298. – P. 126924. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126924>
16. Zhong, J. Isothermal Amplification Technologies for the Detection of Foodborne Pathogens / J. Zhong, X. Zhao // *Food Analytical Methods*. – 2018. – Vol. 11. – P. 1543–1560. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1177-2>
17. 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 // *Journal of Applied Bacteriology*. – 1992. – Vol. 72, № 2. – P. 134–138. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01814.x>
18. Monoclonal antibody-based cross-reactive sandwich ELISA for the detection of *Salmonella* spp. in milk samples / X. Wu, W. Wang, L. Liu [et al.] // *Analytical Methods*. – 2015. – Vol. 7, № 21. – P. 9047–9053. <https://doi.org/10.1039/C5AY01923K>
19. Киселева, Е. П. Новая тест-система для детекции сальмонелл в пище методом конкурентного иммуноферментного анализа / Е. П. Киселева, К. И. Михайлопуло, О. В. Свиридов // *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук*. – 2025. – Т. 70, № 1. – С. 55–68. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-1-55-68>
20. Establishment of indirect ELISA method for *Salmonella* antibody detection from ducks based on PagN protein / S. Hou, S. Wang, X. Zhao [et al.] // *BMC Veterinary Research*. – 2022. – Vol. 18, № 1. – P. 424. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03519-7>
21. Production of recombinant flagellin to develop ELISA-based detection of *Salmonella* Enteritidis / S. A. Mirhosseini, A. A. I. Fooladi, J. Amani, H. Sedighian // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2017. – Vol. 48, № 4. – P. 774–781. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.033>
22. Gold nanoparticle-based strip sensor for multiple detection of twelve *Salmonella* strains with a genus-specific lipopolysaccharide antibody / W. Wang, L. Liu, S. Song [et al.] // *Science China Materials*. – 2016. – Vol. 59, № 8. – P. 665–674. <https://doi.org/10.1007/s40843-016-5077-0>
23. Detecting non-typhoid *Salmonella* in humans by ELISAs: a literature review / K.G. Kuhn, G. Falkenhorst, T. H. Ceper [et al.] // *Journal of Medical Microbiology*. – 2012. – Vol. 61, № 1. – P. 1–7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034447-0>

24. Гарбуз, О. С. Лантанидный иммунофлуориметрический анализ: научные основы и технические принципы / О. С. Гарбуз, О. В. Свиридов // *ARSmedica*. – 2011. – № 13. – С. 51–61.

25. Функционализированные металлохелаты на основе диэтилентриаминтетрауксусной кислоты для химической модификации белков и малых биомолекул / О. С. Купrienko, Л. В. Дубовская, П. С. Шабуня [и др.] // *Биоорганическая химия*. – 2015. – Т. 41, № 6. – С. 675–685. <https://doi.org/10.7868/S013234231506007X>

26. Комбинированные системы полимеразной цепной реакции и иммуноанализа с времяразрешенной флуориметрией или мембранной иммунохроматографией для количественного определения ДНК бактерий *Salmonella enterica* / Т. С. Серченя, Е. В. Охремчук, Л. Н. Валентович [и др.] // *Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сэрыя хімічных навук*. – 2024. – Т. 60, № 4. – С. 314–325. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-4-314-325>

References

1. Lamichhane B., Mawad A. M. M., Saleh M., Kelley W. G., Harrington P. J., Lovestad C. W., Amezcua J., Sarhan M. M., El Zowalaty M. E., Ramadan H., Morgan M., Helmy Y. A. Salmonellosis: An Overview of Epidemiology, Pathogenesis, and Innovative Approaches to Mitigate the Antimicrobial Resistant Infections. *Antibiotics (Basel)*, 2024, vol. 13, no. 1, pp. 76. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010076>

2. Chlebicz A., Śliżewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, vol. 15, no. 5, pp. 863. <https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>

3. Balasubramanian R., Im J., Lee J.-S., Jeon H. J., Mogeni O. D., Kim J. H., Rakotozandrindrainy R., Baker S., Marks F. The global burden and epidemiology of invasive non-typhoidal *Salmonella* infections. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2019, vol. 15, no. 6, pp. 1421–1426. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1504717>

4. Issenhuth-Jeanjean S., Roggentin P., Mikoleit M., Guibourdenche M., de Pinna E., Nair S., Fields P. I., Weill F.-X. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, 2014, vol. 165, no. 7, pp. 526–530. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.004>

5. Grimont P., Weill F.-X. *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars. (9th ed.)*. Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institute Pasteur, 2007. 166 p.

6. Chugunova E. O., Tatarnikova N. A., Maul O. G. Antigenic structure of *Salmonellas*. *Fundamental'nye Issledovaniya = Fundamental research*, 2014, no. 11–9, pp. 1971–1974 (in Russian).

7. Wang M., Zhang Y., Tian F., Liu X., Du S., Ren G. Overview of Rapid Detection Methods for *Salmonella* in Foods: Progress and Challenges. *Foods*, 2021, vol. 10, no. 10, pp. 2402. <https://doi.org/10.3390/foods10102402>

8. Mkangara M. Prevention and Control of Human *Salmonella enterica* Infections: An Implication in Food Safety. *International Journal of Food Science*, 2023, vol. 2023, pp. 1–26. <https://doi.org/10.1155/2023/8899596>

9. Wang M., Zhang Y., Tian F., Liu X., Du S., Ren G. *Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 5: Salmonella*. FDA, 2024. Available: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella> (accessed 31 July 2024).

10. 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>

11. Paniel N., Noguer T. Detection of *Salmonella* in Food Matrices, from Conventional Methods to Recent Aptamer-Sensing Technologies. *Foods*, 2019, vol. 8, no. 9, pp. 371. <https://doi.org/10.3390/foods8090371>

12. Shen Y., Xu L., Li Y. Biosensors for rapid detection of *Salmonella* in food: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, vol. 20, no. 1, pp. 149–197. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12662>

13. Brainina K. Z., Kozitsina A. N., Glazyrina Y. A. Hybrid Electrochemical/Magnetic Assay for *Salmonella* Typhimurium Detection. *IEEE Sensors Journal*, 2010, vol. 10, no. 11, pp. 1699–1704. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2010.2046410>

14. D'Aoust J.-Y., Sewell A. M., Warburton D. W. A comparison of standard cultural methods for the detection of food-borne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*, 1992, vol. 16, no. 1, pp. 41–50. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90124-L](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90124-L)

15. Zhang H., Li H., Zhu H., Pekárek J., Podešva P., Chang H., Neuzil P. Revealing the secrets of PCR. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, vol. 298, pp. 126924. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126924>

16. Zhong J., Zhao X. Isothermal Amplification Technologies for the Detection of Foodborne Pathogens. *Food Analytical Methods*, 2018, vol. 11, pp. 1543–1560. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1177-2>

17. 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>

18. 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>

19. Kiseleva E. P., Mikhailopolov K. I., Sviridov O. V. A new test system for *Salmonella* detection in food products by competitive immunoassay. *Vestsi Natsyional'nai akademii navuk Belarusi. Seryya biyalagichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2025, vol. 70, no. 1, pp. 55–68 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-1-55-68>

20. Hou S., Wang S., Zhao X., Li W., Gao J., Wang Y., Zhang R., Gong L., Jiang S., Zhu Y. Establishment of indirect ELISA method for *Salmonella* antibody detection from ducks based on PagN protein. *BMC Veterinary Research*, 2022, vol. 18, no. 1, pp. 424. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03519-7>

21. Mirhosseini S. A., Fooladi A. A. I., Aman J. Production of recombinant flagellin to develop ELISA-based detection of *Salmonella* Enteritidis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2017, vol. 48, no. 4, pp. 774–781. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.033>
22. 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>
23. Kuhn K. G., Falkenhorst G., Ceper T. H., Dalby T., Ethelberg S., Mølbak K., Krogfelt K. A. Detecting non-typhoid *Salmonella* in humans by ELISAs: a literature review. *Journal of Medical Microbiology*, 2012, vol. 61, no. 1, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.033>
24. Garbuz O. S., Sviridov O. V. Lanthanide immunofluorimetric assay: scientific background and technical principles. *ARSmedica*, 2011, no. 13, pp. 51–61 (in Russian).
25. Kuprienko O. S., Dubovskaya L. V., Shabunya P. S., Fatykhova S. A., Sviridov O. V. Functionalized metal chelates based on diethylenetriaminetetraacetic acids for chemical modification of proteins and small biomolecules. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2015, vol. 41, no. 6, pp. 607–616. <https://doi.org/10.1134/s1068162015060072>
26. 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. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = 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>

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

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

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

Бакаева Татьяна Николаевна – научный сотрудник. Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии (ул. Филимонова, 23, 220114, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tanya.solo@mail.ru

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

Kosmach Anastasia A. – 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: kosmach_aa@iboch.by

Lapina Victorya S. – 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

Bakayeva Tatsiana N. – Researcher. Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tanya.solo@mail.ru

Sviridov Oleg V. – D. Sc. (Chemistry), Professor, Head of the 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