

УДК 579.842.14:577.213.3+57.083+579.672

КОМБИНИРОВАННЫЕ СИСТЕМЫ РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ И МЕМБРАННОЙ ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ ИЛИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК БАКТЕРИЙ *Salmonella enterica*

© 2025 г. Т. С. Серченя^{1,*}, Е. В. Охремчук², Л. Н. Валентович²,
В. С. Лапина¹, О. В. Свиридов¹

¹Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220084 Беларусь

²Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220084 Беларусь

*e-mail: serchenya@iboch.by

Поступила в редакцию 15.05.2024 г.

После доработки 05.11.2024 г.

Принята к публикации 13.11.2024 г.

Разработаны и исследованы комбинированные биоаналитические системы для детекции бактерий *Salmonella enterica* в молоке. Эти системы основаны на изотермической рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) фрагмента гена *invA* и детекции полученных ампликонов ДНК, содержащих остатки биотина и флуоресцеина на противоположных концах, экспрессной мембранной хроматографией на тест-полосках или иммуноферментным анализом (ИФА) в микропланшетах. Показано, что разработанные тест-системы специфичны, чувствительны и просты в применении. Для постановки RPA требуется 20 мин при температуре 40°C. Иммунохроматографическое выявление ампликонов обеспечивает экспресс-тестирование в течение 10 мин и возможный визуальный учет результата. ИФА проходит в течение 75 мин, позволяет анализировать большое количество проб, а также количественно оценить результат. Установлено, что биоаналитические системы характеризуются широкой специфичностью в отношении различных серотипов бактерий *S. enterica* подвида *enterica*, относящихся к серогруппам В, С, D и Е. Показано, что предел детекции геномной ДНК *S. enterica* в тест-системах составляет 0.5 фг. Предел обнаружения сальмонелл в искусственно загрязненных пробах молока составил 8×10^2 КОЕ/мл. После предварительного культивирования исследуемых проб в течение 6 ч этот показатель оказался равным 2×10^0 клеток на 25 г молока.

Ключевые слова: патогенные бактерии, *Salmonella enterica*, изотермическая полимеразная реакция, рекомбиназная полимеразная амплификация, иммунохроматографический анализ, иммуноферментный анализ, пищевая биобезопасность

DOI: 10.31857/S0555109925020091 EDN: EPBDAR

Загрязнение патогенными бактериями является проблемой, которую нельзя игнорировать при производстве и переработке пищевых продуктов, так как это наносит ущерб здоровью населения и влечет негативные экономические последствия для пищевой промышленности [1, 2]. Бактерии вида *Salmonella enterica* подвида *enterica* принадлежат к одному из наиболее распространенных зоонозных патогенов, вызывающему основное число вспышек инфекций пищевого происхождения, что приводит к отзыву продуктов из торговых

сетей [3, 4]. Главным потенциальным источником заражения являются продукты животного происхождения, хотя данные микроорганизмы могут быть обнаружены и на поверхности овощей и фруктов [2–4]. В большинстве стран (СНГ, Европейский Союз, США, Китай) установлены строгие нормативы и стандарты для обеспечения отсутствия сальмонелл в пищевых продуктах (ТР ТС № 021/2011 https://urfu.ru/fileadmin/user_upload/common_files/docs_units/oseb/TR_TS_021-2011_Tekhnicheskii_reglament_Tamozhennogo_sojuza_O

bezopasnosti_pishchevoi_produkcii.pdf; EC No 2160/2003 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex:32003R2160>; GB 29921-2021 https://www.svsr.cz/wp-content/files/obchodovani/GB_29921-2021.pdf) [5]. Стандартизированные быстрые и чувствительные методики обнаружения данных бактерий являются необходимым и важным инструментом контроля качества и обеспечения биобезопасности продуктов.

Традиционный культуральный метод для выявления бактерий до сих пор применяется на пищевых предприятиях и в испытательных лабораториях, но, как правило, является трудоемким и длительным, требующим от 3 до 4 сут для получения отрицательного результата и более 5 сут для подтверждения положительного заключения (ISO 6579:2002 <https://www.iso.org/standard/29315.html>; ГОСТ 31659-2012). При использовании этого метода может наблюдаться матрикс-эффект, когда тестируемые матрицы продуктов препятствуют обнаружению патогенов. Кроме того, некоторые патогенные микроорганизмы не культивируются, не всегда обеспечивается требуемая селективность и чувствительность. Существует также опасность образования большого количества отходов культуральных сред из-за множественных разбавлений исследуемых проб продуктов и проведения повторных тестов [6, 7].

Другим аналитическим методом обнаружения пищевых патогенов является иммунохимический анализ, основанный на применении специфических моно- или поликлональные антител к липо-сахаридам или белкам клеточной стенки бактерий [3, 4, 8, 9]. Такой иммуноанализ характеризуется хорошей чувствительностью и селективностью, является относительно быстрым и потенциально простым в исполнении. Одним из наиболее распространенных методов анализа на основе антител является иммуноферментный анализ (ИФА) [3, 4, 10]. В тоже время микропланшетный ИФА решает только часть задач, важных для обеспечения мониторинга пищевой продукции. Длительность классического ИФА составляет несколько часов, а его выполнение требует специального оборудования. Иммунохроматографический анализ (ИХА) на тест-полосках лишен этого недостатка [9, 11]. Однако детекция иммунных комплексов непосредственно по окраске связанной метки на тест-полоске приводит к тому, что ИХА может уступать по пределам обнаружения альтернативным методам и требует дальнейшего совершенствования при решении задач, связанных с необходимостью выявления низких концентраций аналитов. В ряде исследований авторы используют специальные подходы для снижения предела обнаружения за счет использования новых маркеров, способных усиливать обнаруживаемый сигнал [11].

Другим подходом для выявления патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах является

применение молекулярно-генетических методов, основанных на проведении амплификации для выявления ДНК бактерий. Классическая полимеразная цепная реакция (ПЦР) служит мощным инструментом детекции нуклеиновых кислот микроорганизмов в различных пищевых пробах. ПЦР значительно сокращает время обнаружения, увеличивает чувствительность и специфичность анализа, что повышает эффективность обнаружения пищевых патогенов [7, 12]. Ограничением данного метода является необходимость в специальном дорогостоящем лабораторном оборудовании для проведения повторяющихся циклов ПЦР при различных температурах (денатурация, отжиг праймеров, элонгация цепи). Кроме того, используемые в ПЦР ферменты могут ингибироваться компонентами матрикса исследуемых проб (растительными полисахаридами, протеинами и ионами кальция в молочных продуктах и другими химическими агентами) [13–15]. Таким образом, существующие в настоящее время и активно используемые аналитические методы либо требуют продолжительного доращивания микроорганизмов на селективных средах с многочасовым ожиданием получения результатов, либо инструментального тестирования в специализированных лабораториях при выполнении молекулярно-генетических методик.

В современных исследованиях для решения проблемы высокочувствительного выявления патогенных контаминант реализуются подходы, направленные на совершенствование молекулярно-генетических методов, которые прежде всего пригодны для выявления малых количеств аналитов. И в тоже время новые технологии должны отличаться методической простотой и экспрессностью для выполнения анализа, характеризующегося минимальным числом стадий и манипуляций, отсутствием зависимости от наличия высокотехнологичного оборудования, а также возможностью проведения тестирования непосредственно в местах отбора проб.

За последнее десятилетие увеличилось количество разработок новых и адаптации существующих методик амплификации нуклеиновых кислот для молекулярной диагностики, которые проводятся при одной температуре [3, 4, 16–18]. В настоящее время известно более 10 таких изотермических методов, среди которых рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA), петлевая изотермическая амплификация (LAMP), хеликазозависимая амплификация (HDA), амплификация по принципу “катящегося кольца” (RCA) и др. [19–22]. Во всех случаях изотермические системы вместо термоциклических этапов используют комплекс ферментов, позволяющих обходиться без стадии высокотемпературного плавления ДНК. Такие методики описаны и успешно применяются для обнаружения патогенных бактерий, грибов и вирусов [23–26]. Амплификация нуклеиновых кислот при

одной температуре значительно упрощает и стандартизует выполнение анализа в различающихся по технической оснащенности аналитических лабораториях и отвечает принципу РОС (point-of-care). При оптимально подобранных условиях изотермическая амплификация обеспечивает сопоставимые или даже более высокие показатели чувствительности и специфичности анализа в сравнении с традиционной ПЦР [3, 16, 24, 26].

В разработке комбинированных тест-систем детекции *S. enterica* из существующих методик изотермической амплификации была выбрана RPA. Этот выбор основан на том, что RPA представляет собой наиболее быстрый (15–30 мин) и чувствительный метод амплификации целевых последовательностей ДНК. Реакция может проходить даже при комнатной температуре (25°C), но оптимальным все же является диапазон 37–42°C [17, 19, 27]. Принцип метода заключается в следующем. Макромолекулы рекомбиназы связываются с синтезированными мечеными праймерами и после внесения в реакционную смесь сканируют ДНК в поисках комплементарных праймерам участков. После их обнаружения рекомбиназа инициирует процесс расплетания двухцепочечной молекулы ДНК и присоединения праймеров. Расплетенную нить ДНК стабилизируют SSB-белки, и полимеразы начинают синтез. В результате нескольких циклов такой реакции образуются двухцепочечные фрагменты ДНК с метками на противоположных концах [3, 19, 28, 29]. Этот метод является достаточно простым в постановке (небольшие количества и легкость практических манипуляций) и гибким, что должно способствовать его внедрению в практику испытательных лабораторий. RPA можно комбинировать с экспрессными методами ИХА на тест-полосках или высокопроизводительным ИФА в микропланшетах. Этот метод требует только одной пары праймеров (в отличие, например, от LAMP) и в результате RPA получается гомогенный продукт в виде двухцепочечного фрагмента ДНК заданной длины. Более того, в нескольких исследованиях показано, что RPA толерантна к фоновой ДНК и к большинству ингибиторов ПЦР [19, 27, 30].

Цель работы — разработка и исследование методики рекомбиназной амплификации в комбинации с ИХА или с ИФА для количественного определения ДНК бактерий *S. enterica* в форматах, отвечающих требованиям практического применения.

МЕТОДИКА

Реагенты и материалы. В экспериментальной работе использовали моноклональное антитело к флуоресцеину клона 2A3cc (“Хайтест”, Россия), стрептавидин из *Streptomyces avidinii*, бычий сывороточный альбумин (BSA), трис, HAuCl_4 ,

30%-ный водный раствор H_2O_2 , 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), тритон X-100, проклин 300, глицерин (“Sigma-Aldrich”, США); кислоту лимонную моногидрат, хлорид натрия, хлорид магния, твин-20 (“Merck”, Германия); диметилсульфоксид (“Applichem”, Германия); NaHCO_3 , сахарозу (“Riedel-de-Haën”, Германия); колонки с Sephadex G-25 (“GE Healthcare”, США). Остальные использованные реактивы отечественных и российских производителей — $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaOH , HCl , H_2SO_4 — 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 Arium® pro VF фирмы “Sartorius” (Германия).

Получение ДНК бактерий *S. enterica*. В исследовании использовали ДНК сальмонелл различных серотипов. Препараты ДНК пяти патогенных штаммов *Salmonella* серотипов Typhimurium, Enteritidis, London, Newport, Derby и непатогенного штамма *S. enterica* серотип Typhimurium SL7202 получали как описано в работе [31]. Препарат ДНК непатогенного штамма *S. enterica* серотип Typhimurium SL7202 выделяли из суточной культуры бактерий с помощью набора “Нуклеосорб А” (“Праймтех”, Беларусь). Препараты ДНК пяти патогенных штаммов, выделенные с помощью набора “АртДНК легкий” (“АртБиоТех”, Беларусь), предоставлены из коллекции лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии Министерства здравоохранения Республики Беларусь. В качестве положительного контроля использовали стандарт микробной ДНК *S. enterica* MBD0005 (“Sigma-Aldrich”, США).

Разработка специфичных к ДНК *S. enterica* праймеров. Поиск наиболее консервативных участков для конструирования праймеров проводили путем множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей гена *invA* (M90846.1) различных серотипов сальмонелл при использовании информации о геномах, представленной в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). При создании праймеров учитывали рекомендации для олигонуклеотидов, используемых в RPA [17, 19]. Специфичность праймеров оценивали с помощью онлайн-инструмента Primer-BLAST. Были синтезировали два праймера (“Праймтех”, Беларусь). Прямой праймер (SE-*invA*30-F) содержал биотиновую метку (Bt), обратный праймер (SE-*invA*30-R) получен с флуоресцеиновой меткой

(FAM) (табл. 1). Метки были введены по 5'-концу олигонуклеотидов.

Проведение рекомбиназной полимеразной амплификации для получения меченых специфических фрагментов ДНК *S. enterica*. Реакцию проводили с помощью реагентов из набора TwistAmp Liquid Basic ("TwistDx", Великобритания) и дНТФ ("АртБиотех", Беларусь). Использовали шесть ДНК-матриц бактерии *S. enterica*. Добавляли 1 мкл матричной ДНК на 50 мкл реакционной смеси. В стандартный протокол набора были внесены некоторые изменения. В исследуемой RPA время инкубации составило 20 мин, температура — 40°C, концентрация праймеров — 0.15 мкМ. Эти оптимальные температурно-временные условия RPA установлены в экспериментах по проведению реакции в диапазонах температур 37–42°C и времени инкубации 5–30 мин. При выборе концентрации праймеров в реакционной смеси их тестировали в диапазоне 0.15–0.48 мкМ. Для увеличения выхода целевого продукта в RPA после 4 мин инкубации проводили перемешивание переворачиванием реакционной смеси.

Очистку продуктов RPA выполняли с помощью набора Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (T1030, "New England Biolabs", США) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию ампликонов устанавливали флуориметрически на приборе QFX Fluorometer ("DeNovix", США). В качестве красителя использовали 0.5× ZUBR Green-1 ("Праймтех", Беларусь).

Продукты RPA анализировали электрофоретически в 0.8%-ном агарозном геле с бромистым этидием (0.5 мкг/мл) при напряженности электрического поля 8–10 В/см. В качестве стандарта молекулярной массы ДНК использовали GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ("Thermo Fisher Scientific", США). Визуализацию результатов осуществляли с помощью прибора для цифровой фотодокументации Bio-Rad ChemiDoc MP System ("Bio-Rad", США), полученные изображения обрабатывали с использованием программы "Bio-Rad Image Lab 5.0".

Иммунохроматографический анализ ампликонов ДНК *S. enterica*. Иммуноаналитические системы на основе тест-полосок разрабатывали с использованием комплекта мембран из набора MDI Easypack ("Advanced Microdevices", Индия). В работе применяли нитроцеллюлозную мембрану CNPF с размером пор 10 мкм, мембрану для

образца GFB-R7L и верхнюю впитывающую мембрану AP045. Наночастицы золота синтезировали цитратным восстановлением золотохлористоводородной кислоты по методу Френса [32]. Далее наночастицы функционализировали путем иммобилизации на них стрептавидина или моноклонального антитела к флуоресцеину. Концентрации белков для адсорбции выбирали фотометрически по флокуляционной кривой, как описано в публикации [33].

Для синтеза биотинилированного альбумина использовали N-оксисукцинимидный эфир биотинил-ε-аминокапроновой кислоты, применяя 10-кратный мольный избыток реагента по отношению к белку согласно методике [34]. Далее удаляли не вступившее в реакцию с белком производное биотина гель-фильтрацией на Sephadex G-25.

Специфические реагенты наносили на нитроцеллюлозную мембрану при помощи автоматического диспенсера IsoFlow ("ImagenetTechnology", США). В системе ИХА-1 в аналитической зоне тест-полоски адсорбировали стрептавидин из раствора 0.05 М натрий-фосфатный буфер (НФБ), pH 7.4, 0.15 М NaCl с концентрацией 0.5 мг/мл, а контрольную зону формировали путем иммобилизации антивидовых антител (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши) из раствора с концентрацией 0.2 мг/мл.

В системе ИХА-2 аналитическая зона тест-полоски образовывалась в результате иммобилизации моноклонального антитела к флуоресцеину из раствора 0.05 М НФБ, pH 7.4, 0.15 М NaCl с концентрацией 1 мг/мл. В контрольной зоне адсорбировали биотинилированный альбумин в концентрации 0.8 мг/мл. Далее все мембраны сушили при температуре 20–25°C не менее 20 ч. Подготовленные мембраны собирали в мульти-мембранный комплекс, состоящий из нитроцеллюлозной и впитывающей мембран и подложки для исследуемого образца. Функционализированные тест-полоски нарезали шириной 3.5 мм при помощи автоматического гильотинного резчика IndexCutter 1 ("Point A Technologies", США) и хранили в герметично запаянных пакетах из ламинированной алюминиевой фольги с силикагелем в качестве осушителя.

При проведении анализа в лунки инертного пластмассового микропланшета ("Nerbe Plus", Германия) вносили функционализированные на-

Таблица 1. Характеристика праймеров для RPA *Salmonella enterica*

№	Наименование	Последовательность	Длина ампликона
1	SE-invA30-F	Bt-5'-tataacattcactgacttgctatctgctat-3'	190 п.н.
2	SE-invA30-R	FAM-5'-agcctccgctaatttgatggatctcattac-3'	

Подписи к рисункам к статье Серченя с соавт.

ночастицы золота с моноклональным антителом к флуоресцеину или со стрептавидином и добавляли ампликоны ДНК в возрастающих концентрациях в диапазоне 0.15–10.0 нМ. Эти реагенты выдерживали в течение 3 мин и далее в лунки помещали готовые тест-полоски соответственно для ИХА-1 или ИХА-2. Хроматографию проводили в течение 7 мин и визуально регистрировали окрашивание.

Иммуноферментный анализ ампликонов ДНК *S. enterica*. Продукты RPA исследовали в двух системах ИФА. Для постановки иммуноанализа в качестве твердофазных носителей использовали разборные полистирольные 96-луночные микропланшеты от фирмы “Хема-медика” (Россия). Ферментный конъюгат стрептавидина приобретали у компании “Sigma-Aldrich” (США). Конъюгат антитела к флуоресцеину с высокоочищенной ($R_z \geq 3.0$) пероксидазой из корней хрена (“Диам”, Россия) синтезировали путем окисления углеводных цепей фермента периодатом натрия, присоединения иммуноглобулина с образованием основания Шиффа и стабилизацией конъюгата восстановлением двойной связи борогидридом натрия.

В системе ИФА-1 в лунках микропланшета адсорбировали антивидовые антитела (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши) из 0.1 М NaHCO_3 , pH 8.3. Далее иммунохимически иммобилизовали моноклональное антитело к флуоресцеину клон 2A3cc путем внесения во все лунки по 100 мкл раствора с концентрацией 0.1 мкг/мл в 0.05 М трис-HCl, pH 7.5, содержащем 0.15 М NaCl, 0.05%-ный Твин 20, 1 мг/мл BSA, 2% сахарозу, 0.01%-ный проклин 300. Выдерживали планшет при 4–8°C в течение 18 ч. Калибровочные растворы готовили на основе полученных ампликонов в диапазоне концентраций 0.0005–0.2 нМ в 0.05 М трис-HCl, pH 7.5, содержащем 0.15 М NaCl, 0.05%-ный Твин 20, 1 мг/мл BSA, 0.01%-ный проклина 300. В анализе в лунки вносили по 50 мкл растворов исследуемых ампликонов и по 50 мкл раствора конъюгата стрептавидина с пероксидазой в титре 1 : 4000. Планшет инкубировали в течение 1 ч при температуре 25°C в термостате. Непрореагировавшие компоненты удаляли и промывали планшет с использованием промывочного раствора (0.01 М трис-HCl, pH 7.5, 0.15 М NaCl, 0.05%-ный Твин 20). Далее в лунки вносили по 100 мкл хромоген-субстратной смеси, содержащей ТМБ и перекись водорода (0.1 М натрий-цитратный буфер, pH 4.2, 3 мМ H_2O_2 и 1 мМ ТМБ), и инкубировали микропланшет в течение 15 мин при 25°C в термостате.

Ферментативную реакцию останавливали добавлением в лунки по 100 мкл 5%-ной H_2SO_4 . Измерение оптической плотности (ОП) в лунках планшета проводили с помощью автоматического микропланшетного фотометра SPECTROstar Nano (Германия) при длине волны 450 нм. После измерения строили график зависимости ОП при 450 нм

(ось ординат, линейная) от концентрации ампликона ДНК в нМ (ось абсцисс, логарифмическая), используя аппроксимацию $y = a \cdot \lg(x) + b$.

В системе ИФА-2 в лунках микропланшета иммобилизовали стрептавидин путем внесения по 100 мкл раствора с концентрацией 5 мкг/мл в 0.1 М NaHCO_3 , pH 8.3, и инкубировали планшет при 4–8°C в течение 18 ч. При проведении анализа в лунки добавляли по 50 мкл растворов исследуемых ампликонов в диапазоне концентраций 0.01–5.0 нМ и по 50 мкл раствора конъюгата моноклонального антитела к флуоресцеину с пероксидазой в титре 1 : 2000. Инкубировали планшет в течение 1 ч при температуре 25°C в термостате. Далее проводили ИФА и измерения как описано выше.

Значение предела обнаружения в ИФА-системах определяли из калибровочных графиков как абсциссу точки ($B_0 + 3 SD$).

Эксперименты по исследованию взаимодействия ампликонов в сэндвич-системах ИФА проводили не менее чем в трех повторах. Данные обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel. На графиках планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение (SD).

Оценка предела обнаружения ДНК *S. enterica* в разработанных системах. Для установления предела детекции в разработанных системах проводили RPA с использованием геномной ДНК *S. enterica* SL7207. Ее добавляли в реакционную смесь (50 мкл) в объеме 1 мкл с содержанием ДНК в диапазоне 0.5 фг–5.0 нг (0.5 фг, 5 фг, 50 фг, 500 фг, 5 пг, 50 пг, 500 пг, 5 нг). Далее проводили RPA в выбранных условиях. Продукты реакции исследовали в ИФА-1 и ИХА-1. Предел обнаружения устанавливали, как минимальную концентрацию ДНК сальмонелл, детектируемую в тест-системе.

Оценка предела детекции бактерий *S. enterica* в молоке. Пределы обнаружения бактерий *S. enterica* в молоке определяли после его искусственного загрязнения путем внесения бактерий *S. enterica* SL7207. Клетки культивировали в течение 18 ч при 37°C с аэрацией 200 об./мин в бульоне LB (“Condalab”, Испания). Количество клеток в культуре устанавливали с помощью камеры Горяева. Затем клетки разводили бульоном LB и вносили в стерилизованное молоко с массовой долей жира 3.2% и в восстановленное пастеризованное обезжиренное молоко с получением конечных концентраций микробных клеток 2×10^0 , 2×10^1 , 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 КОЕ (колониеобразующая единица)/25 мл молока. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную среду LB. Клетки выдерживали в молоке при перемешивании в течение 10 мин при 37°C. После чего добавляли во все пробы 225 мл бульона LB [5, 35], предварительного нагретого до 37°C. Пробу с содержанием клеток 2×10^0

КОЕ/25 мл молока инкубировали в течение 0, 3, 6 и 10 ч при 37°C. Далее из этих проб для оценки влияния времени обогащения и из проб без обогащения в каждый отдельный момент времени отбирали аликвоту объемом 1 мл. Отобранные образцы трижды отмывали с помощью стерильной деионизированной воды, после чего центрифугировали в течение 1 мин при 12000 g и ресуспендировали осадок в 100 мкл деионизированной воды. Затем пробы выдерживали при 100°C в течение 10 мин и центрифугировали в течение 30 с при 12000 g. Супернатант использовали для постановки RPA. Далее реакционную смесь разводили в 100 раз и исследовали в ИФА-1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведено исследование с целью разработки методики изотермической амплификации RPA в комбинации с экспресс-анализом на тест-полосках или высокопроизводительным микропланшетным ИФА и предложены тест-системы для детекции патогенных бактерий *S. enterica* в молоке.

Принцип действия комбинированных систем основан на получении в системе RPA ампликона ДНК *S. enterica*, несущего два низкомолекулярных органических лиганда на противоположных концах, и последующем формировании в системе детекции меченого сэндвич-комплекса между этим ампликоном и двумя лигандсвязывающими белками, один — на твердой фазе, другой — в растворе.

В разработанной и изученной в работе комбинации методов ампликоны содержали остатки биотина и флуоресцеина и в тест-системах детекции взаимодействовали соответственно с биотинсвязывающим белком стрептавидином и с моноклональным антителом к флуоресцеину. В качестве твердофазных платформ для выявления синтезированных ампликонов ДНК были выбраны хроматографические мембраны (тест-полоски), обеспечивающие быстрый бесприборный анализ, и полностью разборные пластмассовые микропланшеты, которые после функционализации позволяют выполнять количественное определение с высокой производительностью (96 или 384 лунок). В качестве детектируемых меток на белковых молекулах в сэндвич-комплексе использовали наночастицы золота в мембранной хроматографии или пероксидазу из корней хрена в микропланшетном формате ИФА.

Разработка праймеров и проведение RPA для получения меченых ампликонов ДНК *S. enterica*. При разработке RPA исследованы и выбраны последовательности праймеров для амплификации ДНК различных серотипов *Salmonella enterica* подвида *enterica*. В качестве меток для этих олигонуклеотидов использовали остатки флуоресцеина и биотина, которые присоединяли по 5'-концам.

Последовательности праймеров разрабатывали, учитывая возможность выявления большинства серотипов *S. enterica* подвида *enterica* и руководствуясь условиями пригодности для проведения RPA. В качестве мишени для амплификации был выбран фрагмент гена *invA*. В молекулярной диагностике ген *invA* используется давно, и он хорошо себя зарекомендовал в качестве мишени для детекции ДНК сальмонелл [36–38]. Этот ген присутствует в ряде штаммов сальмонелл, и показано, что его изменение ведет к 100-кратному снижению вирулентности *S. enterica* [38]. Известно [37], что продукты генов *invA*, *B*, *C*, *D* необходимы для инвазии сальмонелл через эпителиальные клетки кишечника. Inv-белки являются факторами патогенности, что считается важным фактом при детекции патогенных бактерий.

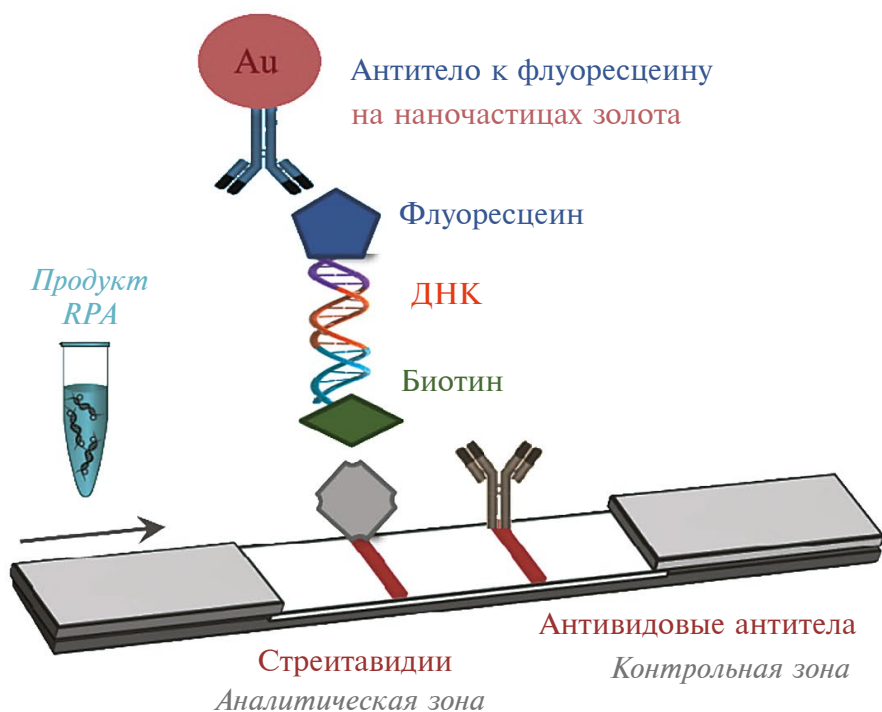
В настоящей работе проводили выравнивание последовательностей гена *invA* из геномов *S. enterica*, депонированных в базе данных GenBank. И в результате такого анализа были установлены наиболее консервативные регионы данного генетического локуса и разработаны праймеры длиной 30 н., позволяющие синтезировать фрагмент гена длиной 190 п.н. (табл. 1). Показано *in silico*, что праймеры специфично связываются с ДНК различных серотипов *S. enterica*.

Для проведения RPA использовали матричную ДНК сальмонелл, синтезированные праймеры и набор TwistDx, содержащий в качестве основных специфических реагентов рекомбиназу UvsX, большой фрагмент Bsu-полимеразы и SSB-белки gp32 фага T4. Для оптимизации RPA в стандартный протокол набора были внесены модификации. В работе исследовали температурно-временные условия проведения реакции и количество добавляемых реагентов. Было показано, что оптимальной является инкубация реакционной смеси в течение 20 мин при температуре 40°C. Концентрация каждого из праймеров в реакционной смеси была снижена до 0.15 мкМ.

С использованием оптимизированного протокола RPA получали двухцепочечные фрагменты ДНК сальмонелл с биотиновой и флуоресцеиновой метками на противоположных концах для дальнейшего исследования в системах детекции. Наличие целевых продуктов изотермической амплификации подтверждали путем электрофоретического анализа нуклеиновых кислот в агарозном геле.

Мембранная хроматография на тест-полосках и микропланшетный ИФА меченых ампликонов ДНК *S. enterica*. Схема конструкций экспресс-анализа на тест-полосках представлена на рис. 1. В аналитической системе происходит связывание ампликонов ДНК с моноклональным антителом к флуоресцеину, функционализированным наночастицами золота, и далее этот комплекс движется вдоль по-

(a)



(б)

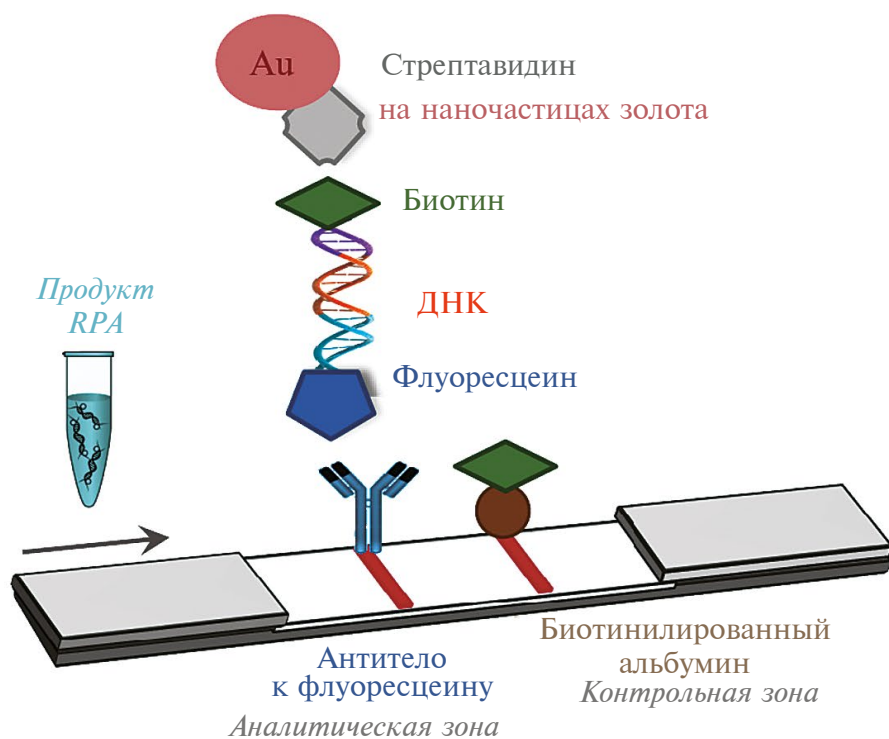


Рис. 1. Схемы конструкции мембранных систем ИХА-1 (а) и ИХА-2 (б).

лоски и взаимодействует с бактериальным белком стрептавидином, иммобилизованным в аналитической зоне тест-полоски (рис. 1а). В контрольной зоне хроматографической мембраны адсорбированы антивидовые антитела (иммуноглобулины овцы против иммуноглобулинов мыши), которые связывают специфические антитела к флуоресцеину на наночастицах золота и позволяют оценить правильность протекания теста. В аналитической зоне тест-полоски после прохождения ИХА оказывается иммобилизованным сэндвич-комплекс “антитело к флуоресцеину — модифицированный ампликон — стрептавидин”. Он адсорбирован на твердой фазе за счет взаимодействия между стрептавидином и его специфическим лигандом биотинином и содержит экспонированную в раствор золотую метку, вследствие иммунохимического связывания флуоресцеина в роли антигена с меченым антителом. По золотой метке можно визуально установить факт прохождения RPA и наличие амплифицированных участков ДНК.

При проведении микропланшетного ИФА также происходит формирование тройного комплекса из стрептавидина, иммобилизованного на твердой фазе в лунках микропланшета, и находящихся в жидкой фазе ампликона ДНК и моноклонального антитела к флуоресцеину, конъюгированного с пероксидазой хрена. Этот анализ проходит в одну стадию. Благодаря ферментной метке можно оценить уровень связывания ампликона в единицах ОП.

В работе также исследовали системы, в которых формирование комплекса происходило в обратном порядке. Тогда на твердой фазе иммобилизовали моноклональное антитело к флуоресцеину, в растворе находился стрептавидин в составе конъюгата с ферментом или с наночастицами золота (рис. 1б). В данном случае в контрольной зоне тест-полоски иммобилизовали биотинилированный альбумин, который взаимодействует со стрептавидином на наночастицах золота.

Выбор длительности стадий в комбинированных системах был основан на минимизации времени проведения анализа с целью ускорения получения результатов. Этого удалось достичь в сравнении с ранее опубликованными данными [28, 29]. Время анализа в мембранохроматографической системе составляет 10 мин и включает в себя добавление ампликона ДНК к коллоидному конъюгату с инкубацией этих реагентов (3 мин) и процесс прохождения потока вдоль тест-полоски (7 мин). В микропланшетном формате анализ занимает 75 мин и включает инкубацию системы в течение 1 ч и ферментативное окрашивание в течение 15 мин.

Аналитические характеристики разработанных тест-систем оценивали с использованием полученных ампликонов ДНК *S. enterica* (рис. 2 и 3). Как видно из рис. 2, диапазон измерения концентраций ампликонов в мембранных тест-системах находится в пределах 0.03–10 нМ. Предел обнаружения в тест-системе ИХА-1 с иммобилизованным стрептавидином на твердой фазе и использованием меченых наночастицами золота антител к флуоресцеину составил 0.03 нМ. В ИХА-2 с обратным порядком расположения связывающих белков в гетерофазной системе этот параметр имел значение 0.3 нМ. В планшетных тест-системах диапазон определяемых концентраций был 0.0005–0.2 нМ. Предел обнаружения в системе ИФА-1 составил 0.15 пМ в случае иммобилизации антител к флуоресцеину на твердой фазе и использования конъюгата стрептавидин-пероксидаза. Предел обнаружения в системе ИФА-2 при использовании твердофазного стрептавидина и конъюгата антитела к флуоресцеину с пероксидазой оказался равным 5 пМ. Таким образом, для дальнейшей работы можно выбрать системы для детекции продуктов RPA, характеризующиеся наибольшей чувствительностью анализа. В настоящем исследовании это тест-системы ИХА-1 и ИФА-1.

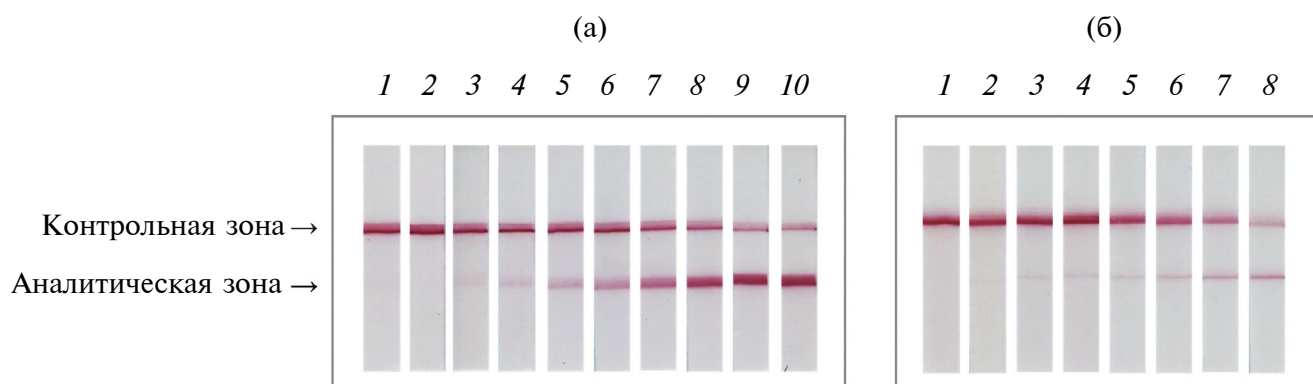


Рис. 2. Связывание FAM/Bt-ампликонов фрагмента гена *invA* бактерий *S. enterica* с антителом к флуоресцеину и стрептавидином в системах ИХА-1 (а) и ИХА-2 (б): а — 1–10 — концентрация ампликона ДНК 0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 и 5 нМ; б — 1–8 — концентрация ампликона ДНК 0, 0.15, 0.3, 0.5, 1.0, 2.5, 5 и 10 нМ.

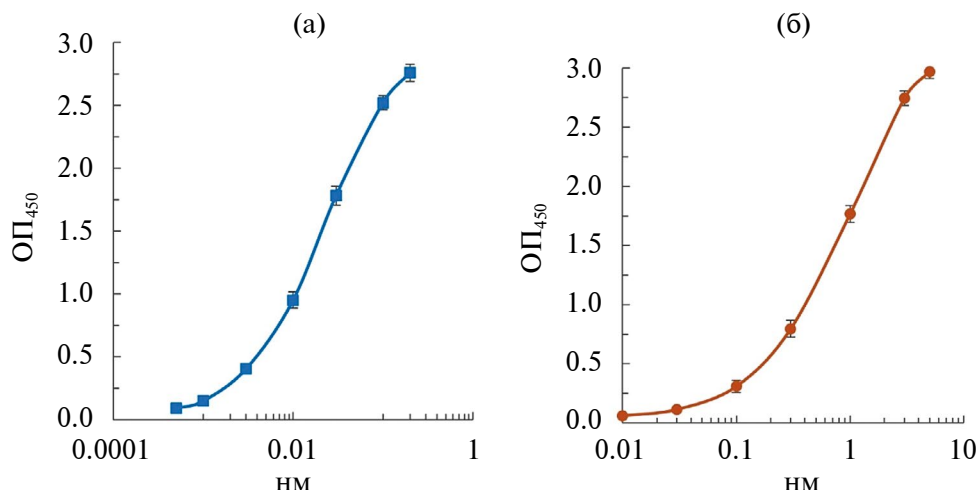


Рис. 3. Графики концентрационной зависимости связывания меченого ампликона ДНК *S. enterica* со стрептавидином и антителом к флуоресцину в системах ИФА-1 (а) и ИФА-2 (б).

Анализ очищенных и неочищенных меченых ампликонов ДНК *S. enterica*. Изучено возможное влияние компонентов реакционной смеси РПА на специфическое взаимодействие ампликонов ДНК *S. enterica* с твердофазными и растворенными белковыми реагентами в разработанных биоаналитических системах. Ампликоны ДНК получали на матричных ДНК различных серотипов сальмонелл. Препараты использовали непосредственно после проведения РПА без дополнительной очистки и ампликоны ДНК, очищенные с помощью специфической сорбции-десорбции на оксиде кремния. Концентрацию полученных ампликонов в препаратах определяли флуориметрически и далее оценивали их взаимодействие в системе ИФА-1. Результаты представлены на рис. 4. Наблюдалось незначительное уменьшение связывание в единицах ОП при использовании очищенных ампликонов, что могло быть обусловлено небольшими

изменениями их концентрации после выделения в чистом виде. При этом ампликоны характеризовались практически идентичными взаимодействиями внутри групп I и II. Можно заключить, что для анализа не требовалась дополнительная очистка ампликонов ДНК перед проведением их детекции.

Специфичность разрабатываемых тест-систем. Важной характеристикой биоаналитических систем для определения бактерий *S. enterica* является их специфичность. В случае сальмонелл важно обнаружить большинство патогенных бактерий этого рода в продуктах питания. Для обеспечения такой широкой специфичности были выбраны оптимальные праймеры для РПА, и их возможности изучены в практических системах амплификации. Проводились реакции РПА с использованием ДНК различных серотипов в качестве матриц и добавлением разработанных праймеров, а также реагентов набора TwistDx. Концентрации полученных ампликонов определяли флуориметрически. Далее оценивали синтезированные ампликоны по связыванию с твердофазными антителами к флуоресцину и со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой, в системе ИФА-1. В исследовании использовали пять наиболее распространенных серотипов сальмонелл: Typhimurium, Enteritidis, London, Newport и Derby [2–4], а также непатогенный штамм SL7207. Выбранные серотипы относились к четырем основным серогруппам *S. enterica*, вызывающим 99% сальмонеллез у людей и теплокровных животных, а именно В, С, D, Е. Деление сальмонелл на серологические группы основано на характеристиках соматического О-антигена. К группе В относятся серотипы Typhimurium и Derby, к группе С — Newport, к группе D — Enteritidis, к группе Е — London [2, 39]. Отрицательным контролем служила ДНК бактерий *Escherichia coli*. Результаты, представленные на рис. 5, показывают практически одинаковые

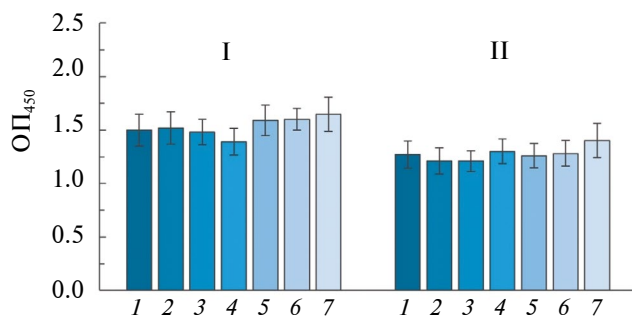


Рис. 4. Взаимодействие ампликонов ДНК *S. enterica* (0.015 нМ) без дополнительной очистки после РПА (I) и очищенных колоночной хроматографией (II) в системе ИФА-1: 1 — Typhimurium, 2 — Enteritidis, 3 — London, 4 — Newport, 5 — Derby, 6 — непатогенный штамм SL7207, 7 — стандарт ДНК *S. enterica*.

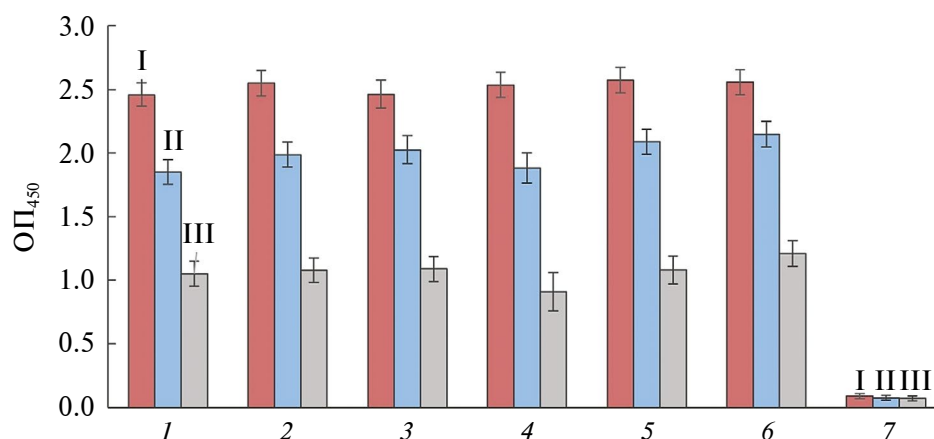


Рис. 5. Связывание FAM/Bt-ампликонов фрагмента гена *invA* различных серотипов *S. enterica* в концентрациях 0.1 нМ (I), 0.03 нМ (II) и 0.01 нМ (III) в системе ИФА-1: 1 — Typhimurium, 2 — Enteritidis, 3 — London, 4 — Newport, 5 — Derby, 6 — непатогенный штамм SL7207, 7 — *E.coli*.

характеристики выявления ампликонов, полученных при использовании ДНК сальмонелл различных серотипов в тест-системе в представленном диапазоне концентраций. Таким образом, установлена широкая специфичность разработанной тест-системы.

Оценка предела детекции геномной ДНК *S. enterica*. Была проведена оценка минимального количества геномной ДНК, которое можно обнаружить тест-системами ИХА-1 и ИФА-1. Для этого была сделана серия разведений ДНК в диапазоне от 0.5 фг до 5 нг, содержащихся в 1 мкл пробы для внесения в реакционную смесь, и проведена RPA. По окончании реакции оценили концентрации ампликонов ДНК по градуировочному графику ИФА-1 и по связыванию в ИХА-1 (рис. 6). Было показано, что даже 0.5 фг исходной матричной ДНК можно детектировать с помощью разработанных ИХА и ИФА. Полученное значение соответствовало 7–9 геном-эквивалентам в зависимости от серо-

типа сальмонелл. Установленный предел детекции геномной ДНК *S. enterica* для разработанных тест-систем оказался ниже пределов, представленных в публикациях [17, 24, 29, 40].

Применение тест-систем для анализа продуктов питания. Для проверки возможности практического применения разработанных тест-систем и оценки предела детекции клеток *S. enterica* в продуктах питания были выполнены эксперименты с использованием проб молока из коммерческой сети. Согласно установленным нормативам безопасности (ТР ТС № 021/2011 https://urfu.ru/fileadmin/user_upload/common_files/docs_units/oseb/TR_TS_021-2011_Tekhnicheskii_reglament_Tamozhennogo_sojuzha_O_bezopasnosti_pishchevoi_produkcii.pdf; EC No 2160/2003 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex:32003R2160>; GB 29921-2021 https://www.svsr.cz/wp-content/files/obchodovani/GB_29921-2021.pdf), сальмонеллы не должны обнаруживаться

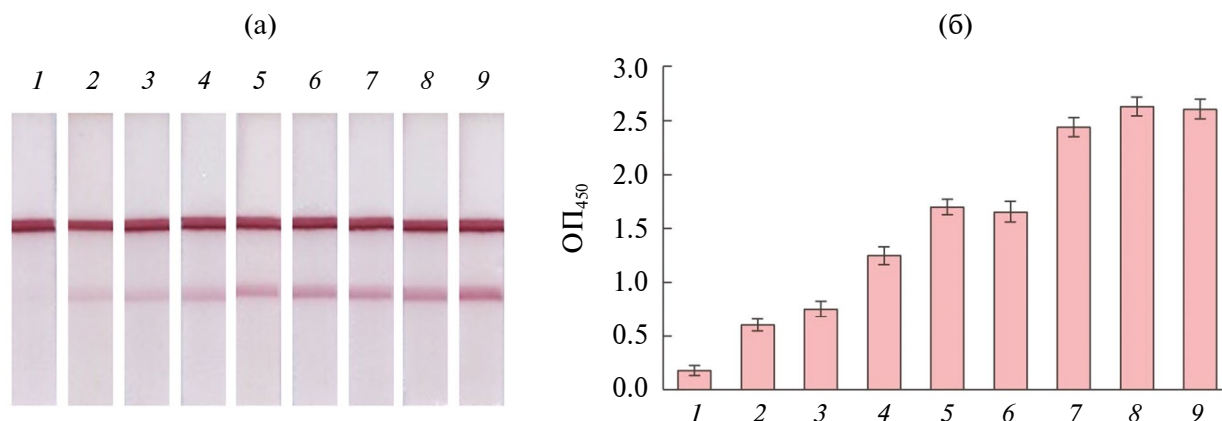


Рис. 6. Определение предела детекции ДНК *S. enterica* в комбинированных системах RPA с ИХА-1 (а) и ИФА-1 (б): 1–9 — концентрация ДНК в реакционной смеси RPA 0, 0.5, 5, 50, 500 фг, 5 пг, 50 пг, 500 пг и 5 нг.

ся в 25 г пищевого продукта или сырья, поэтому предел детекции принят как 1–3 КОЕ на 25 г. Отметим, что высокие требования к контролю загрязнения пищевых продуктов сальмонеллами приняты потому, что даже одна микробная клетка может вызывать инфицирование человека.

В работе готовили искусственно загрязненные пробы молока, анализировали их или же проводили стадию обогащения в течение 0–10 ч. Для подготовки проб перед выполнением анализа в молоко добавляли бактерии *S. enterica* SL7207 в концентрации 2×10^0 на 25 г продукта (или 0.08 КОЕ/мл) и проверяли необходимость стадии обогащения среды этими бактериями в течение 0, 3, 6 и 10 ч при указанной самой минимальной концентрации исследуемых микроорганизмов в продукте. Далее полученные пробы исследовали в комбинированной системе РРА-ИФА. Для выделения бактериальной ДНК из проб молока перед проведением РРА использовали метод отмывки проб с последующим кипячением. Такой подход прост в реализации и снимает необходимость применения специализированных наборов для выделения нуклеиновых кислот. После РРА пробы разводили в 100 раз и тестировали в ИФА-1. Результаты представлены на рис. 7. Найдено, что при содержании *S. enterica* 2×10^0 на 25 г молока выявление бактерии разработанной тест-системой происходит при условии предварительного культивирования продукта в течение 6 ч (рис. 7а). Для установления предела детекции в разработанной системе без предварительной стадии обогащения готовили пробы молока, содержащие бактерии *S. enterica* в диапа-

зоне концентраций 2×10^0 – 2×10^6 клеток на 25 г. Как видно из рис. 7б, связывание в тест-системе нарастало при содержании исследуемых бактерий 2×10^4 /25 г, то есть предел обнаружения в данном случае составил 8×10^2 КОЕ/мл.

Полученные значения предела обнаружения *S. enterica* в молоке и при применении в качестве мишени для амплификации фрагмента гена *invA* оказались ниже, чем представленные в публикациях [18, 41, 42].

Таким образом, разработанная тест-система дает надежные результаты обнаружения бактерий в искусственно загрязненных образцах молока. Однако этап предварительного обогащения необходим, если уровень загрязнения патогеном *Salmonella enterica* является крайне низким.

В результате исследования разработаны комбинированные системы РРА-ИХА и РРА-ИФА для выявления и количественного определения патогенных бактерий *S. enterica* в молоке. Представленные в работе биоаналитические системы являются хорошим выбором для обнаружения бактерий *Salmonella enterica* подвида *enterica* в молоке, так как они специфичны, чувствительны и просты в исполнении. Показано, что при постановке РРА происходила амплификация только геномной ДНК *S. enterica*. Установлена эффективность анализа в отношении детекции различных серотипов *S. enterica*, относящихся к серогруппам В, С, Д и Е. Предел детекции геномной ДНК *S. enterica* в тест-системах РРА-ИХА и РРА-ИФА составил

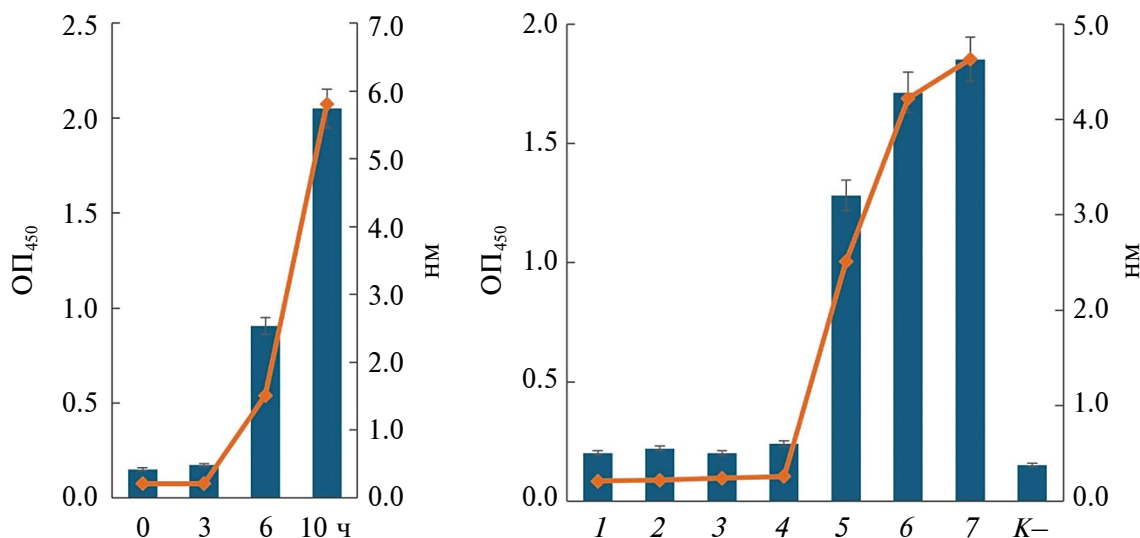


Рис. 7. Определение предела детекции бактерий *S. enterica* в молоке: а — связывание в ИФА-1 продуктов РРА после стадии обогащения в течение 0–10 ч для пробы молока, содержащей *S. enterica* SL7207 в концентрации 2×10^0 на 25 г продукта; б — связывание в ИФА-1 продуктов РРА из проб молока, содержащих различные концентрации *S. enterica* SL7207, без проведения стадии обогащения: 1–7 — концентрация клеток *S. enterica* в пробах на 25 г молока 2×10^0 (1), 2×10^1 (2), 2×10^2 (3), 2×10^3 (4), 2×10^4 (5), 2×10^5 (6), 2×10^6 (7); К — проба отрицательного контроля.

0.5 фг, содержащихся в 1 мкл пробы для внесения в реакционную смесь. Предел обнаружения сальмонелл в искусственно загрязненных пробах молока оказался равным 8×10^2 КОЕ/мл. После предварительного культивирования исследуемых проб в течение 6 ч этот показатель составил 2×10^0 клеток на 25 г молока. Описанные тест-системы могут стать основой практических наборов реагентов для экспрессного обнаружения патогенных бактерий *S. enterica* в молоке.

Разработанные подходы планируется использовать для создания комбинированных систем для обнаружения патогенных бактерий *Listeria monocytogenes*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект РНФ-БРФФИ X23РНФ-185).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа выполнена без привлечения людей или животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fung F., Wang H.S., Menon S. // Biomed. J. 2018. V. 41 № 2. P. 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.003>
2. Mkangara M. // Int. J. Food Sci. 2023 V. 2023. 8899596. <https://doi.org/10.1155/2023/8899596>
3. Lin L., Zheng Q., Lin J., Yuk H.-G., Guo L. // Eur. Food Res. Technol. 2020. V. 246. P. 373–395. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03423-9>
4. Wang M., Zhang Y., Tian F., Liu X., Du S., Ren G. // Foods. 2021. V. 10. № 10. P. 2402. <https://doi.org/10.3390/foods10102402>
5. “Salmonella”, Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 22. / Ed. G.W. Latimer. Oxford University Press, 2023. P. C17–256–C17–259. <https://doi.org/10.1093/9780197610145.003.2282>
6. De Boer E., Beumer R.R. // Int. J. Food Microbiol. 1999. V. 50. P. 119–130. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00081-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00081-1)
7. Techathuvanan C., Draughon F.A., D’Souza D.H. // J. Food Prot. 2011. V. 74. P. 294–301. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-306>
8. Gao D., Yu J., Dai X., Tian Y., Sun J., Xu X., Cai X. // Poult. Sci. 2023. V. 102. 102513. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102513>
9. Wang W., Liu L., Song S., Tang L., Kuang H., Xu C. // Sensors. 2015. V. 15. P. 5281–5292. <https://doi.org/10.3390/s150305281>
10. Kuhn K.G., Falkenhorst G., Ceper T.H., Dalby T., Ethelberg S., Mølbak K., Krogfelt K.A. // J. Med. Microbiol. 2012. V. 61. P. 1–7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034447-0>
11. Hendrickson O.D., Byzova N.A., Safenkova I.V., Panferov V.G., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. // Nanomaterials (Basel). 2023. V. 13. № 23. P. 3074. <https://doi.org/10.3390/nano13233074>
12. Zhang H.Q., Li H.N., Zhu H.L., Pekarek J., Podesva P., Chang, H.L., Neuzil P. // Sens. Actuator B-Chem. 2019. V. 298. P. 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126924>
13. Sidstedt M., Rådström P., Hedman J. // Anal. Bioanal. Chem. 2020. V. 412. № 9. P. 2009–2023. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02490-2>
14. Bickley J., Short J.K., McDowell D.G., Parkes H.C. // Lett. Appl. Microbiol. 1996. V. 22. № 2. P. 153–158. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01131.x>
15. Powell H.A., Gooding C.M., Garrett S.D., Lund B.M., Mckee R.A. // Lett. Appl. Microbiol. 1994. V. 8. № 1. P. 59–61. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1994.tb00802.x>
16. Ivanov A.V., Safenkova I.V., Drenova N.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Biosensors. 2022. V. 12. P. 1174. <https://doi.org/10.3390/bios12121174>
17. Hu J., Huang R., Sun Y., Wei X., Wang Y., Jiang C. et al. // J. Microbiol. Methods. 2019. V. 158. P. 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.01.018>
18. Chen J., Liu X., Chen J., Guo Z., Wang Y., Chen G. et al. // Food Anal. Methods. 2019. V. 12. P. 1791–1798. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01526-3>
19. Daher R.K., Stewart G., Boissinot M., Bergeron M.G. // Clin. Chem. 2016. V. 62. P. 947–958. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245829>
20. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. // Nucleic Acids Res. 2000. V. 28. № 12. P. E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
21. Barreda-García S., Miranda-Castro R., de-Los-Santos-Álvarez N., Miranda-Ordieres A.J., Lobo-Castañón M.J. // Anal. Bioanal. Chem. 2018. V. 410. № 3. P. 679–693. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0620-3>
22. Le B.H., Seo Y.J. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2018. V. 28. P. 2035–2038. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.058>
23. Ivanov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Talanta. 2020. V. 210. P. 120616. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120616>
24. Zhao L., Wang J., Sun X.X., Wang J., Chen Z., Xu X. et al. // Front Cell Infect. Microbiol. 2021. V. 11. P. 631921. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.631921>
25. Ahmed A., van der Linden H., Hartskeerl R.A. // Int. J. Environ. Res. Public Health. 2014. V. 11. P. 4953–4964. <https://doi.org/10.3390/ijerph110504953>

26. Kim J.Y., Lee J.-L. // J. Food Saf. 2016. V. 36. P. 402–411.
<https://doi.org/10.1111/jfs.12261>
27. Li J., Ma B., Fang J., Zhi A., Chen E., Xu Y., Sun C., Zhang M. // Foods. 2020. V. 9. № 1. P. 27.
<https://doi.org/10.3390/foods9010027>
28. Liao C., Pan L., Tan M., Zhou Z., Long S., Yi X. et al. // Front. Bioeng. Biotechnol. 2024. V. 12. 1379939.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1379939>
29. Liu R., Wang Z., Liu X., Chen A., Yang S. // Poult. Sci. 2020. V. 99. № 12. P. 7225–7232.
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.10.020>
30. Santiago-Felipe S., Tortajada-Genaro L.A., Morais S., Puchades R., Maquieira A. // Food Chem. 2015. V. 174. P. 509–515.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.080>
31. Serchenya T.S., Akhremchuk K.U., Valentovich L.N., Lapina V.S., Sviridov O.V. // Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series. 2024. V. 60. № 4. P. 314–325 (in Russian).
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-4-314-325>
32. Frens G. // Nature Physical Science. 1973. V. 241. P. 20–22.
<https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
33. Byzova N.A., Serchenya T.S., Vashkevich I.I., Zherdev A.V., Sviridov O.V., Dzantiev B.B. // Microchemical Journal. 2020. V. 156. Article 104884.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104884>
34. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. Elsevier. 1996. P. 377–380.
35. Wallace H.A., Wang H., Jacobson A., Ge B., Zhang G., Hammack T. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 5: Salmonella. 2023.
<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam>
36. Rahn K., De Grandis S.A., Clarke R.C., McEwen S.A., Galán J.E., Ginocchio C. et al. // Mol. Cell Probes. 1992. V. 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)
37. Galán J.E., Curtiss R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 16. P. 6383–6387.
<https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6383>
38. González-Escalona N., Brown E.W., Zhang G. // Food Res. Int. 2012. V. 48. P. 202–208.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.03.009>
39. Brenner F.W., Villar R.G., Angulo F.J., Tauxe R., Swaminathan B. // J. Clin. Microbiol. 2000. V. 38. № 7. P. 2465–2467.
<https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000>
40. Gao W., Huang H., Zhu P., Yan X., Fan J., Jiang J., Xu J. // Bioprocess Biosyst. Eng. 2018 V. 41. № 5. P. 603–611.
<https://doi.org/10.1007/s00449-018-1895-2>
41. Choi G., Jung J.H., Park B.H., Oh S.J., Seo J.H., Choi J.S., Kim D.H., Seo T.S. // Lab on a Chip. 2016. V. 16. № 12. P. 2309–2316.
<https://doi.org/10.1039/c6lc00329j>
42. Yang Q., Wang F., Jones K.L., Meng J., Prinyawiwatkul W., Ge B. // Food Microbiol. 2015. V. 46. P. 485–493.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.011>

Combined Systems of Recombinase Polymerase Amplification and Membrane Immunochromatography or Enzyme Linked Immunoassay for Quantitative Determination of *Salmonella enterica* Bacterial DNA

T. S. Serchenya^{a,*}, K. U. Akhremchuk^b, L. N. Valentovich^b, V. S. Lapina^a, and O. V. Sviridov^a

^aInstitute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220084 Belarus

^bInstitute of Microbiology of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220084 Belarus

*e-mail: serchenya@tut.by

The combined bioanalytical systems for the detection of *Salmonella enterica* bacteria in milk have been developed and studied. These test systems are based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA) of a fragment of the *invA* gene and detection of the DNA amplicons containing biotin and fluorescein residues by a rapid membrane chromatography on test strips or an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in microplates. It was shown that the developed test systems are specific, sensitive and easy to perform. The RPA procedure requires 20 min at a temperature of 40°C. The immunochromatographic detection of amplicons provides rapid testing within 10 min as well as possible visual recording of the result. ELISA takes 75 min, allows to analyze a large number of samples and quantify the result. It has been established that the developed bioanalytical systems are characterized by broad specificity for various serotypes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*, belonging to serogroups B, C, D and E. The detection limit of genomic DNA of *S. enterica* in the test systems was 0.5 fg. The detection limit of *Salmonella enterica* bacteria in artificially contaminated milk samples was 8×10^2 CFU/ml. After enrichment for 6 h, the detection limit proved to be 2×10^0 CFU per 25 g of milk.

Keywords: pathogenic bacteria, *Salmonella enterica*, isothermal amplification, recombinase polymerase amplification (RPA), enzyme linked immunoassay (ELISA), lateral flow assay (LFA), food biosafety