

DOI: 10.7868/S3034574X26030105
УДК 579.869.1:577.213.3+57.083+579.672

Оригинальная статья

РЕКОМБИНАЗНАЯ ПОЛИМЕРАЗНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ В СОЧЕТАНИИ С МЕМБРАННОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ ИЛИ ИММУНОФЕРМЕНТНЫМ АНАЛИЗОМ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Т.С. Серченя^{1,*}, Е.В. Охремчук², Л.Н. Валентович²,
В.С. Лапина¹, Т.Н. Бакаева³, О.В. Свиридов¹

¹Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»
(Институт биоорганической химии НАН Беларуси), Минск, Республика Беларусь

²Государственное научное учреждение «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси»
(Институт микробиологии НАН Беларуси), Минск, Республика Беларусь

³Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии
Государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»,
Минск, Республика Беларусь

*E-mail: serchenya@iboch.by

Аннотация. Разработаны и исследованы высокочувствительные биоаналитические системы для обнаружения патогенных бактерий *Listeria monocytogenes*, контаминирующих продукты питания и вызывающих опасные заболевания пищевого происхождения. Эти системы сочетают изотермическую рекомбиназную полимеразную амплификацию (РПА) с мембранной хроматографией (ИХА) на тест-полосках или иммуноферментным анализом (ИФА) в микропланшетах. Предел обнаружения составил 1 фг/мкл геномной ДНК *L. monocytogenes*. Показано, что эффективность выделения ДНК оказывала влияние на предел обнаружения бактерий в тест-системах. Установлено, что выбранный фрагмент гена *bsh* для амплификации ДНК, ранее не применявшийся в РПА, специфичен для всех патогенных листерий. Кроме того, отсутствовали перекрестные реакции с другими пищевыми патогенами. В тест-системах достигнуты минимальные показатели продолжительности анализа. Подтверждена применимость тест-систем для выявления листерий в пищевых продуктах на примере проб молока. РПА-ИХА и РПА-ИФА позволили успешно обнаружить клетки *L. monocytogenes* в концентрации всего 8 КОЕ/мл. Предел обнаружения можно уменьшить до 2 клеток бактерии в 25 г исследуемой пробы продукта после проведения обогащения в течение 5 ч. Благодаря скорости и чувствительности предлагаемые тест-системы являются перспективным инструментом для контроля возможного присутствия *L. monocytogenes* в пищевых продуктах.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, рекомбиназная полимеразная амплификация, иммунохроматографический анализ, иммуноферментный анализ, молекулярная диагностика, пищевые патогены, пищевая биобезопасность

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект № X23РНФ-185).

© Т. С. Серченя, Е. В. Охремчук, Л. Н. Валентович, В. С. Лапина, Т. Н. Бакаева, О. В. Свиридов, 2026

¹ Сокращения: РПА — рекомбиназная полимеразная амплификация; ИХА — иммунохроматографический анализ; ИФА — иммуноферментный анализ; ПЦР — полимеразная цепная реакция; LAMP — петлевая изотермическая амплификация; HDA — хеликазозависимая амплификация; BSA — бычий сывороточный альбумин; ТМБ — 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

Соблюдение этических стандартов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них отсутствует конфликт интересов.

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи.

Ссылка для цитирования: Серченя Т.С., Охремчук Е.В., Валентович Л.Н., Лапина В.С., Бакаева Т.Н., Свиридов О.В. Рекомбиназная полимеразная амплификация в сочетании с мембранной хроматографией или иммуноферментным анализом для детекции патогенных бактерий *Listeria monocytogenes*. *Прикладная биохимия и микробиология / Applied biochemistry and microbiology*. 2026. Т. 62. № 3. С. 458–474. <https://doi.org/10.7868/S3034574X26030105>

DOI: 10.7868/S3034574X26030105

Original Article

RECOMBINASE POLYMERASE AMPLIFICATION COUPLED WITH MEMBRANE IMMUNOCHROMATOGRAPHY OR ENZYME-LINKED IMMUNOASSAY FOR DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA *LISTERIA MONOCYTOGENES*

T.S. Serchenya^{1,*}, K.U. Akhremchuk², L.N. Valentovich²,
V.S. Lapina¹, T.N. Bakayeva³, O.V. Sviridov¹

¹State Scientific Institution “Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus”,
Minsk, Republic of Belarus

²State Scientific Institution “Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus”,
Minsk, Republic of Belarus

³Scientific Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology of State Institution
“Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health”, Minsk, Republic of Belarus

*E-mail: serchenya@iboch.by

Abstract. Highly sensitive bioanalytical systems have been developed and assessed for the detection of the pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, which contaminates food products and causes dangerous foodborne illnesses. These systems integrate recombinase polymerase amplification (RPA) with lateral flow assay (LFA) on test strips or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in microplates. The detection limit was 1 fg/μl of *L. monocytogenes* genomic DNA. The efficiency of DNA extraction was shown to influence the detection limit of the bacteria in the test systems. The *bsh* gene fragment that was chosen for DNA amplification had not been used for RPA before, and it was found to be specific for all pathogenic *L. monocytogenes*. Additionally, no cross-reactions with other foodborne pathogens were observed. Minimum assay time was achieved with the use of the test systems. The effectiveness of the test systems for identifying *L. monocytogenes* in food was validated by using milk samples. The RPA-LFA and RPA-ELISA successfully detected *L. monocytogenes* cells at concentrations as low as 8 CFU/ml. The detection limit can be reduced to 2 bacterial cells per 25 g of sample after enrichment for 5 h. The proposed test systems are a promising tool for monitoring the potential presence of *L. monocytogenes* in food products, as they are both sensitive and rapid.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, recombinase polymerase amplification (RPA), lateral flow assay (LFA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), molecular diagnostics, foodborne pathogens, food biosafety

Funding. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (project № X23RNF-185).

Ethics declarations. This article does not contain any studies involving humans or animals.

Conflict of interests. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

Authors contribution. All authors made significant contributions to the concept development, conduct of the study, and preparation of the article.

For Citation: Serchenya T.S., Akhremchuk K.U., Valentovich L.N., Lapina V.S., Bakayeva T.N., Sviridov O.V. Recombinase polymerase amplification coupled with membrane immunochromatography or enzyme-linked immunoassay for detection of pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya / Applied biochemistry and microbiology*. 2026;62(3): 458–474. (In Russ.)
<https://doi.org/10.7868/S3034574X26030105>

ВВЕДЕНИЕ

Listeria monocytogenes — грамположительная, палочковидная, факультативно анаэробная бактерия [29] и один из опасных пищевых патогенов [19, 37]. Эта бактерия является возбудителем листериоза — редкого, но опасного инвазивного инфекционного заболевания с высокой вероятностью (до 20–30 %) летального исхода [19, 23, 29, 35, 40]. *L. monocytogenes* распространена в природе повсеместно и демонстрирует высокую устойчивость к различным условиям окружающей среды [19, 29, 37]. Эта бактерия способна выживать и размножаться в широком диапазоне значений температур (0,5–45 °C) и pH среды (4,3–9,8). Более того, *L. monocytogenes* способна прикрепляться к различным поверхностям, контактирующим с пищевыми продуктами, например, нержавеющей стали и полистиролу, и в виде биопленок сохранять жизнеспособность в течение нескольких месяцев или даже лет, выдерживать высокие концентрации соли, дезинфицирующих средств и антимикробных препаратов [25, 29, 35, 37]. Благодаря таким характеристикам этот патоген способен сохранять свою жизнеспособность в цепочке поставок продуктов питания, даже при условии их надлежащего охлаждения, что превращает эту бактерию в серьезную угрозу пищевой безопасности. Эти бактерии способны загрязнять разнообразные продукты питания, в особенности непастеризованное молоко и производимые из него молочные изделия, мягкие сыры, мясо и готовую к употреблению мясную продукцию, а также копченые и сырые морепродукты. Требования безопасности пищевых продуктов, принятые в большинстве стран, не допускают наличия *L. monocytogenes* [19, 23, 37]. Регламенты определяют отсутствие этого патогена в 25 г готовых к употреблению пищевых продуктов (<https://eesc.eaunion.org/upload/medialibrary/6ad/TR-TS-PishevayaProd.pdf>; <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2007/1441/oj/eng>; <https://eur-lex.europa.eu/oj/daily-view/L-series/default.html?&ojDate=21112024>; <https://www.codeofchina.com/standard/GB29921-2021.html>). Создание надежных, эффективных и быстрых методов тестирования с возможностью проведения анализа в местах отбора проб имеет большое значение для обеспечения биобезопасности пищевых продук-

тов и предотвращения попадания в торговые сети и употребления в пищу продуктов, зараженных *L. monocytogenes*.

В настоящее время существует несколько аналитических инструментов для обнаружения *L. monocytogenes*, включая традиционные методы бактериального культивирования, иммуноферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА), полимеразную цепную реакцию (ПЦР) [8, 15, 24, 28]. Последний из подходов является одним из самых распространенных и включает в себя традиционную ПЦР, мультиплексную ПЦР, анализ плавления с высоким разрешением, ПЦР в реальном времени [26, 31]. Тем не менее, для осуществления анализа и оценки реакции необходимы лабораторные условия, специализированное оборудование и квалифицированный персонал, что сдерживает использование таких методов для быстрого выявления пищевых патогенов. Кроме того, имеются сообщения, что используемые в ПЦР ферменты могут ингибироваться компонентами матрикса исследуемых проб (протеиназами, растительными полисахаридами, ионами кальция в молочных продуктах) [2, 27].

Методы изотермической амплификации разработаны как альтернатива традиционным подходам молекулярной диагностики в ответ на растущий спрос на быстрые тесты и необходимость соответствия принципу РОС (point-of-care), то есть возможности проведения анализа в полевых условиях. Самыми известными и распространенными из них являются рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА), петлевая изотермическая амплификация (LAMP) и хеликазозависимая амплификация (HDA) [7, 14, 21]. Во всех случаях изотермические системы вместо термоциклических этапов используют комплекс ферментов, позволяющих обходиться без стадии высокотемпературного плавления ДНК. Постоянная температура во время реакции сводит к минимуму потребность в дорогостоящем лабораторном оборудовании.

Для разработки биоаналитических систем в данном исследовании был выбран метод РПА. Он демонстрирует высокие показатели эффективности, чувствительности и специфичности [10, 21].

В сравнении с другими изотермическими методиками в РПА отсутствует необходимость проведения начальной денатурации или использования нескольких праймеров, амплификация фрагмента ДНК достигается за более короткие промежутки времени (5–20 мин) и при более низких температурах (37–42 °С) [10, 14, 21]. Эти характеристики можно рассматривать как преимущества, которые обуславливают разработку и внедрение практических тест-систем, основанных на РПА.

Методы оценки продуктов РПА включают флуоресцентный анализ в режиме реального времени, электрофорез в агарозном геле, электрохимические методы, хемиллюминесценцию и иммуноферментный анализ [9, 10, 30, 34]. Однако такие методики регистрации продуктов РПА все равно требуют специализированного оборудования. Другим подходом к детекции продуктов РПА является использование иммунохроматографических тест-полосок. Традиционная система ИХА включает тест-полоску, состоящую из нитроцеллюлозной мембраны с иммобилизованными специфическими реагентами в ее аналитической и контрольной зонах, и содержит меченные наночастицами золота антитела в подвижной жидкой фазе [18, 38]. Целевой анализ в анализируемом образце связывается с меченым антителом и под действием капиллярных сил перемещается вдоль тест-полоски. В аналитической зоне комплекс фиксируется, что сопровождается появлением окрашивания и обеспечивает визуальное выявление целевого соединения.

Комбинированные тест-системы, сочетающие изотермический метод амплификации и иммунодетекцию, описаны в литературе для обнаружения бактерий, вирусов, грибов и генов устойчивости к антибиотикам [16, 17, 32]. Такой анализ не нуждается в сложном лабораторном оборудовании, результат реакции можно наблюдать невооруженным глазом. Этот метод обладает потенциалом для высокочувствительного молекулярного тестирования непосредственно на месте отбора проб и заслуживает практического внедрения.

Цель нашего исследования — разработка и исследование методики обнаружения ДНК патогенных бактерий *L. monocytogenes* в форматах, отвечающих требованиям практического применения: рекомбиназная полимеразная амплификация в сочетании с мембранной хроматографией на тест-полосках или иммуноферментным анализом в микропланшетах.

МЕТОДИКА

Реагенты и материалы

В экспериментальной работе использовали трис, NaAuCl_4 , K_2CO_3 , бычий сывороточный альбумин (BSA), стрептавидин из бактерий *Streptomyces avidinii*, конъюгат стрептавидина с

пероксидазой, глицерин, 30%-ный водный раствор H_2O_2 , 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), тритон X-100, проклин 300 (Sigma-Aldrich, США); моноклональное антитело (МАТ) к флуоресцеину клона 2A3cc («Хайтест», Россия), кислоту лимонную моногидрат, хлорид магния, хлорид натрия, твин-20 (Merck, Германия); диметилсульфоксид (Applichem, Германия); NaHCO_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, сахарозу (Riedel-de-Haën, Германия). Антитела козы против иммуноглобулинов мыши были получены на УП «Хозрасчетное опытное производство 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).

Штаммы бактерий и выделение ДНК

В работе использовали ДНК 4 штаммов листерий, принадлежащих к трем серотипам: *L. monocytogenes* ATCC 19111 (серотип 1/2a), *L. monocytogenes* ATCC 7644 (серотип 1/2c), *L. monocytogenes* ATCC 975 (серотип 4b) и сертифицированный референсный образец IRMM-447 — геномная ДНК *L. monocytogenes* NCTC 11944 (серотип 4b). Штаммы *L. monocytogenes* предоставлены лабораторией клинической и экспериментальной микробиологии Научно-исследовательского института гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» (Беларусь). ДНК патогенов выделяли с помощью набора «РИБО-преп» («AmpliSens», РФ) и «Нуклеосорб А» (ОДО «Праймтех», Беларусь). Референсный образец ДНК IRMM-447, изготовленный Научным центром ЕС «Институт референсных материалов и измерений», был приобретен у Sigma-Aldrich (США).

Для подтверждения специфичности тест-систем также использовали ДНК *Escherichia coli* БИМ В-944 Г, *Staphylococcus aureus* БИМ В-1528 Г (Белорусская коллекция непатогенных микроорганизмов) и *Salmonella enterica* SL7207 (коллекция лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» Института микробиологии НАН Беларуси). Выделение ДНК проводили с помощью набора Bacteria DNA Preparation — Solution Kit (Jena Bioscience, Германия).

Дизайн праймеров для РПА L. monocytogenes

Поиск мишеней для конструирования праймеров проводили путем множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей различных серотипов *L. monocytogenes* на основе информации,

представленной в базе данных GenBank Национального центра биотехнологической информации США (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Для оценки специфичности праймеров и их проверки *in silico* использовали онлайн-инструмент Primer-BLAST. Для сравнения результатов *in silico* проверки использовались только матричные нуклеотидные последовательности бактерии *L. monocytogenes* с

уровнем сборки «хромосома» или «полный геном». Допускалось наличие только одного несовпадения последовательности праймера с матрицей. Мишенью для амплификации был выбран ген *bsh*. Для работы были синтезировали два праймера (ОДО «Праймтех», Беларусь). Разработанные праймеры (табл. 1) содержали метки биотина (Bt) и флуоресцеина (FAM).

Таблица 1. Характеристика праймеров к ДНК бактерий *L. monocytogenes* для РПА

Table 1. Characteristics of primers to *L. monocytogenes* bacterial DNA for RPA

Наименование	Последовательность (5'→3')	Метка, 5'-конец	Длина праймера, н.	ГЦ-содержание, %	Длина ампликона
LM-bsh33-F	tccatctttcacacattccactacaatagattc	Bt	33	36	177 п.н.
LM-bsh32-R	tttgaattattccgtggattcttggatcaatg	FAM	32	34	

Проведение рекомбиназной полимеразной амплификации

Для проведения амплификации применяли реагенты набора TwistAmp Liquid Basic (TwistDx, Великобритания), дНТФ («АртБиотех», Беларусь) и разработанные в настоящей работе праймеры к гену *bsh*. Концентрация Bt- и FAM-меченых праймеров в реакционной смеси была снижена до 0,1 мкМ по сравнению со стандартным протоколом для набора. Количество вносимой в реакцию матричной ДНК, выделенной из бактериальных культур, составило 0,4 нг/мкл. При этом вносили 1 мкл матрицы на 50 мкл реакционной смеси. При использовании ДНК, полученной из проб молока, вносили 2 мкл раствора на 50 мкл реакционной смеси. После кратковременного перемешивания реакционную смесь инкубировали при 40 °С в течение 15 мин. Для увеличения выхода целевого продукта в РПА после 4 мин инкубации проводили перемешивание переворачиванием реакционной смеси.

Концентрацию ампликонов устанавливали флуориметрически на приборе QFX Fluorometer (DeNovix, США). В качестве красителя использовали 0,5×ZUBR Green-1 (ОДО «Праймтех», Беларусь). Очистку продуктов РПА выполняли с помощью набора Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (New England Biolabs, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Продукты РПА 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.

После проведения реакции 1 мкл раствора смеси РПА вносили в 99 мкл 0,01 М трис-НСl, рН 7,5, 0,15 М NaCl (образцы для ИХА и ИФА). Чтобы избежать загрязнения при открывании пробирки с реакционной смесью, всегда тщательно следили, чтобы вся реакционная жидкость находилась на дне пробирки. Кроме того, анализ никогда не выполнялся в помещении, где проводился электрофорез.

Изготовление тест-полосок и функционализация наночастиц золота

Для изготовления тест-полосок использовали пластиковую подложку с нитроцеллюлозной мембраной CNPF-10, мембрану для образца GFB-R7L и верхнюю впитывающую мембрану AP045 (Advanced Microdevices, Индия). Нанесение реагентов на мембрану проводили с помощью автоматического диспенсера IsoFlow (ImageTechnology, США). Для формирования аналитической зоны в ИХА адсорбировали стрептавидин из раствора с концентрацией 0,5 мг/мл в 0,05 М натрий-фосфатный буфер, рН 7,4, 0,15 М NaCl, в контрольной зоне иммобилизовали иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши (0,2 мг/мл). Все растворы наносили по 1,2 мкл на 1 см ширины рабочей мембраны. Далее мембраны сушили при температуре 22–25 °С не менее 20 ч. Собирали мультимембранные композиты, из которых нарезают полоски шириной 3,5 мм при помощи автоматического гильотинного нарезчика IndexCutter 1 (Point A Technologies, США). Тест-полоски хранили в герметично запаянных пакетах из ламини-

рованной алюминиевой фольги с силикагелем в качестве осушителя.

Наночастицы золота синтезировали цитратным восстановлением золотохлористоводородной кислоты [12]. Для этого к 97,5 мл деионизированной воды добавляли 1 мл 1%-ного HAuCl_4 , доводили до кипения и при перемешивании добавляли 1,5 мл 1%-ного цитрата натрия. Смесь выдерживали при 100 °С в течение 25 мин, охлаждали и хранили при 4–6 °С.

Функционализацию наночастиц золота проводили путем иммобилизации на них моноклонального антитела к флуоресцеину. Оптимальные концентрации этих реагентов для иммобилизации устанавливали фотометрически по кривой флокуляции и имеющимся рекомендациям [5, 33]. Перед адсорбцией на наночастицы золота препарат антител диализовали против 1000-кратного объема 0,01 М трис- HCl , pH 8,5, в течение 2 ч при 4 °С. К раствору наночастиц ($D_{520}=1,0$ о.е.) добавляли 0,1 М K_2CO_3 до достижения pH 8,5 и вносили антитела в выбранной концентрации. Смеси инкубировали при перемешивании в течение 1 ч при 25 °С. Далее вносили раствор BSA до концентрации 0,25 % и инкубировали 45 мин при 25 °С. Наночастицы золота с иммобилизованными на них мАт осаждали центрифугированием при 8 000 g в течение 30 мин при 4 °С. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в 0,1 М Трис- HCl , pH 8,5, содержащем 1 %-ный BSA, 0,05 %-ный твин 20, 1 %-ную сахарозу, 0,05 %-ный NaN_3 , и хранили при 4–6 °С.

Проведение ИХА и регистрация его результатов

При проведении анализа в лунки инертного пластмассового микропланшета (Nerbe Plus, Германия) вносили меченные наночастицами золота моноклональные антитела к флуоресцеину и добавляли ампликоны ДНК в возрастающих концентрациях в диапазоне 0,0075–4,0 нМ. Реагенты выдерживали в течение 3 мин при комнатной температуре. Готовые тест-полоски в вертикальном положении помещали в лунки. Хроматографию проводили в течение 7 мин. Результат контролировали визуально по окрашиванию в аналитической и контрольной зонах тест-полоски и инструментально по цифровому изображению тест-полоски на сканере Epson Perfection V550 (Seiko Epson Corporation, Япония). Для количественной оценки взаимодействия рассчитывали интегральную интенсивность окрашивания аналитической и контрольной зон с использованием программы GelAnalyzer.

Строили калибровочные графики зависимости связывания (В), выражающегося интенсивностью окрашивания в аналитической зоне тест-полоски, от концентрации ампликона ДНК в калибровочных пробах в следующих координатах: В (интен-

сивность окрашивания) в относительных единицах (ось ординат, линейная) и концентрация в нМ (ось абсцисс, логарифмическая). Эти эксперименты проводили не менее чем в трех повторностях. Предел обнаружения в инструментальном ИХА определяли как ($V_0+3\cdot SD$). Предел визуального обнаружения устанавливали как концентрацию при самом слабом окрашенном сигнале в аналитической зоне.

*Методика проведения иммуоферментного анализа ампликонов ДНК *L. monocytogenes**

В качестве твердофазных носителей использовали разборные полистирольные 96-луночные микропланшеты от фирмы «Хема-медика» (Россия). В лунках микропланшета иммобилизовали мАт к флуоресцеину клона 2А3с путем внесения по 100 мкл раствора с концентрацией 0,1 мкг/мл в лунки с предварительно адсорбированными иммуноглобулинами козы против иммуноглобулинов мыши (5 мкг/мл в 0,1 М NaHCO_3 , pH 8,3). Калибровочные растворы готовили на основе полученных ампликонов в диапазоне концентраций 0,5–100,0 пМ. При проведении анализа вносили в лунки по 50 мкл растворов исследуемых ампликонов и по 50 мкл раствора конъюгата стрептавидина с пероксидазой в титре 1:5 000. Инкубацию проводили 1 ч при температуре 25 °С. Непрореагировавшие компоненты удаляли, 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). Планшет инкубировали в течение 15 мин при 25 °С. Ферментативную реакцию останавливали добавлением в лунки по 100 мкл 5%-ной H_2SO_4 . Измерение оптической плотности при длине волны 450 нм (D_{450}) в лунках планшета проводили с помощью автоматического микропланшетного фотометра SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Германия). Строили график зависимости D_{450} (ось ординат, линейная) от концентрации ампликона ДНК в нМ (ось абсцисс, логарифмическая), используя аппроксимацию $y=a\cdot\lg(x)+b$.

Предел обнаружения в ИФА-системе рассчитывали из калибровочного графика как абсциссу точки ($V_0+3\cdot SD$). Эксперименты проводили не менее чем в трех повторностях. Данные обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel. На графиках и в таблицах планки погрешностей обозначают как среднеквадратичное отклонение (SD).

Оценка специфичности в РПА-ИХА и РПА-ИФА

Для установления специфичности анализа в комбинированных тест-системах проводили РПА в выбранных условиях с использованием 4 пре-

паратов ДНК *L. monocytogenes* и 3 ДНК бактерий, не относящихся к *L. monocytogenes*. Детектировали продукты амплификации в ИХА и ИФА.

*Оценка предела обнаружения ДНК *L. monocytogenes* в РПА-ИХА и РПА-ИФА*

Для установления предела обнаружения готовили серию разведений референсного образца геномной ДНК листерий NCTC 11944 и проводили РПА с содержанием матрицы в диапазоне 0,2 фг — 100,0 пг (0,2 фг, 0,5 фг, 1 фг, 2 фг, 5 фг, 10 фг, 100 фг, 1 пг, 10 пг, 100 пг) в 1 мкл добавленной в реакционную смесь пробы ДНК. После РПА продукты амплификации разводили в 200 и 400 раз и исследовали в ИХА и ИФА. Предел обнаружения устанавливали как минимальную концентрацию ДНК, выявляемую в тест-системах.

*Оценка предела обнаружения бактериальных клеток *L. monocytogenes* в пробах молока*

Пищевые продукты (молоко цельное с жирностью 3,2 % и молоко сухое обезжиренное) для анализа были приобретены в торговой сети. Пределы обнаружения клеток *L. monocytogenes* в пробах молока оценивали после его искусственного загрязнения путем внесения исследуемых бактерий.

Клетки *L. monocytogenes* ATCC 19111 (серотип 1/2a) культивировали на триптиказо-соевом агаре в термостате при 37 °С в течение 24 ч. Количество клеток в культуре устанавливали чашечным методом и контролировали с помощью денситометра DEN-1 (BioSan, Латвия) при длине волны 550 нм. Готовили суспензию бактерий плотностью 0,5 по стандарту мутности МакФарланда, что соответствует концентрации *L. monocytogenes* $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ (колониеобразующая единица)/мл. Затем клетки разводили бульоном Фрайзера (селективная среда для обогащения листерий) и вносили в стерилизованное молоко. Количество бактерии в пробах 25 мл молока составило $2 \cdot 10^0$, $2 \cdot 10^1$, $2 \cdot 10^2$, $2 \cdot 10^3$, $2 \cdot 10^4$, $2 \cdot 10^5$, $2 \cdot 10^6$ КОЕ. Далее клетки выдерживали в молоке 10 мин с перемешиванием при 37 °С и добавляли в каждую пробу по 225 мл бульона LB (<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>), предварительно нагретого до 37 °С. Инкубировали полученные смеси при 37 °С в течение 0, 3, 5, 7 и 24 ч. В каждый указанный момент времени отбирали из исследуемых проб аликвоту объемом 1 мл. Выделяли ДНК из всех отобранных проб двумя способами. Применяли температурную обработку (кипячение) и сорбентный метод. Для выделения ДНК методом кипячения отобранные пробы дважды отмывали с помощью стерильной деионизированной

воды. Для этого проводили центрифугирование при 10 000 g в течение 2 мин, к осадку добавляли стерильную воду и еще раз повторяли процедуру отделения. Затем ресуспендировали осадок в 100 мкл деионизированной воды. Пробы выдерживали при 100 °С в течение 20 мин, центрифугировали 1 мин при 10 000 g. Супернатант использовали для постановки РПА. Сорбентное выделение проводили с использованием набора «АртНК Экстракт» («АртБиоТех», Беларусь) согласно инструкции производителя. Препараты ДНК использовали для постановки РПА. Далее реакционную смесь разводили в 300 раз и исследовали в ИХА и ИФА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Принцип работы разработанных тест-систем

Разработана чувствительная и специфичная тест-система, сочетающая изотермическую реакцию РПА и мембранную хроматографию, для обнаружения патогенных бактерий *L. monocytogenes* в молоке. Эта система объединяет в себе преимущества молекулярно-генетического тестирования и иммунохимической детекции. Она соответствует принципу РОС и может применяться на местах отбора проб. Последовательные процедуры тестирования схематично представлены на рис. 1. Принцип действия комбинированной тест-системы заключается в следующем. После экстракции и добавления ДНК в реакционную смесь запускается РПА. Меченые праймеры связываются с рекомбиназой и сканируют ДНК в поисках комплементарных участков, рекомбиназный комплекс инициирует расплетание цепи ДНК, SSB-белки стабилизируют вытесненную цепь ДНК, ДНК-полимераза с цепь-вытесняющей активностью начинает синтез. В результате циклического повторения данного процесса образуются двухцепочечные копии фрагмента гена с лигандной и антигенной метками на противоположных концах, благодаря которым становится возможной их биоспецифическая детекция. Анализ меченых ампликонов проводился в ИХА, где белки, способные связывать метки, иммобилизованы на твердой фазе тест-полоски и на наночастицах золота. В результате взаимодействия образуется тройной комплекс, который иммобилизован в аналитической зоне тест-полоски. Результат анализа можно оценивать визуально по окрашиванию. Комбинированная система позволяет получать результат всего за 22 мин, так как амплификация занимает 15 мин, а детекция — 7 мин. Методика не требует дорогостоящего оборудования и может применяться в лабораториях, не располагающих термоциклером для ПЦР с детекцией в реальном времени.

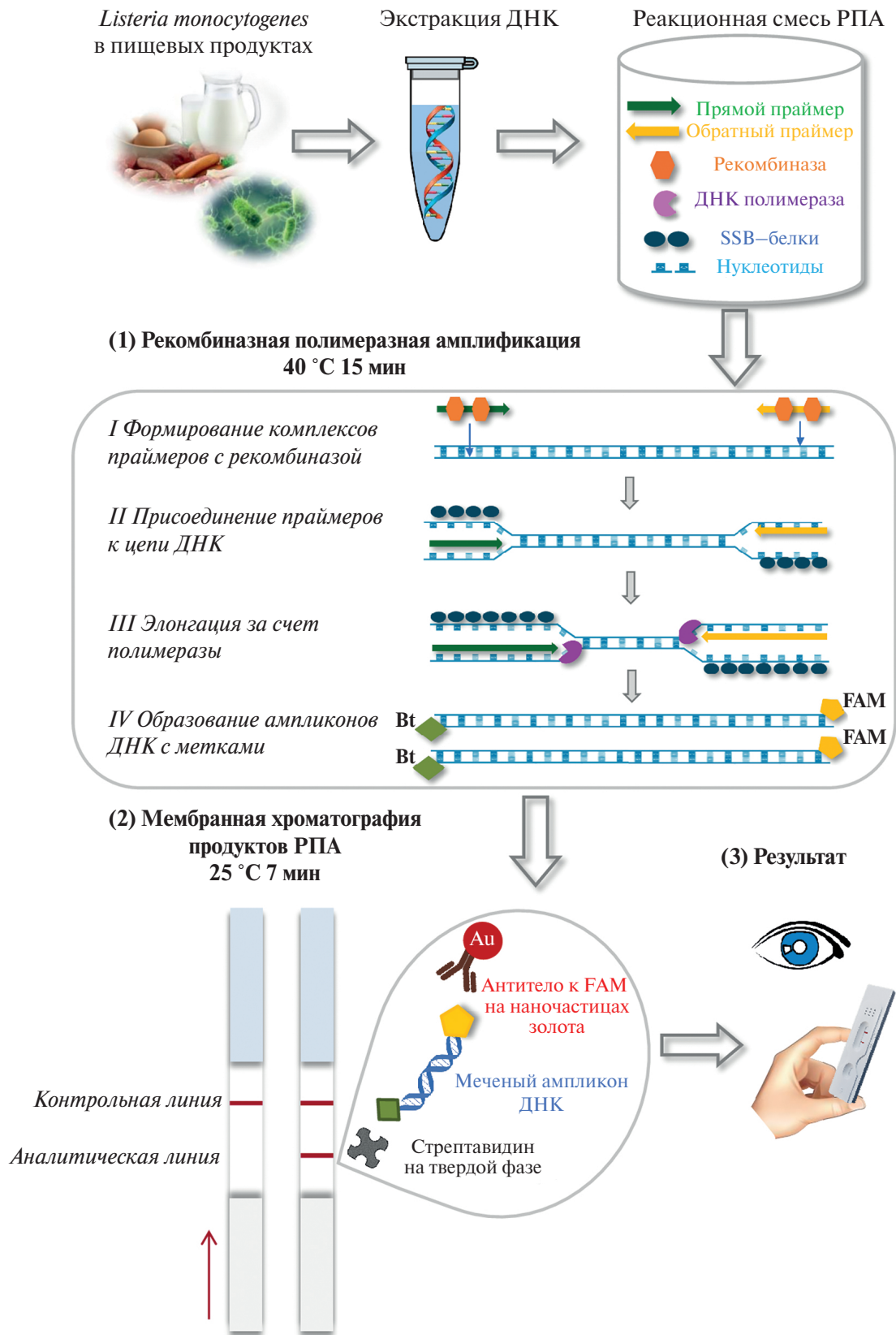


Рис. 1. Схема анализа в комбинированной тест-системе РПА-ИХА
Fig. 1. The assay scheme of the combined test system RPA-LFA

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРОВ

Важным условием проведения амплификации ДНК тестируемого анализатора является разработка праймеров, обеспечивающих специфическую и эффективную наработку выбранного фрагмента ДНК. На данный момент описанные праймеры для выявления ДНК *L. monocytogenes* охватывают лишь ограниченное число серотипов этой патогенной бактерии [1, 11, 13, 36, 39]. При этом большинство регулирующих органов по безопасности пищевых продуктов во всем мире считают все штаммы *L. monocytogenes* одинаково патогенными [22]. Таким образом, актуальной является разработка новых вариантов олигонуклеотидов, универсаль-

ных в отношении патогенных вариантов листерий и пригодных для проведения РПА.

В настоящей работе в качестве мишени для амплификации ДНК листерий был выбран фрагмент гена *bsh* (рис. 2). Этот ген кодирует гидролазу желчных кислот, которая позволяет листериям выживать в желудочно-кишечном тракте и характерна только для патогенных видов листерий. Продукт гена *bsh* — фермент BSH — играет важную роль в патогенности *L. monocytogenes*, поскольку соли желчных кислот в желудочно-кишечном тракте могут подавлять рост бактерий, а гидролиз данных солей обеспечивает листериям преимущество в выживании и развитии инфекции.

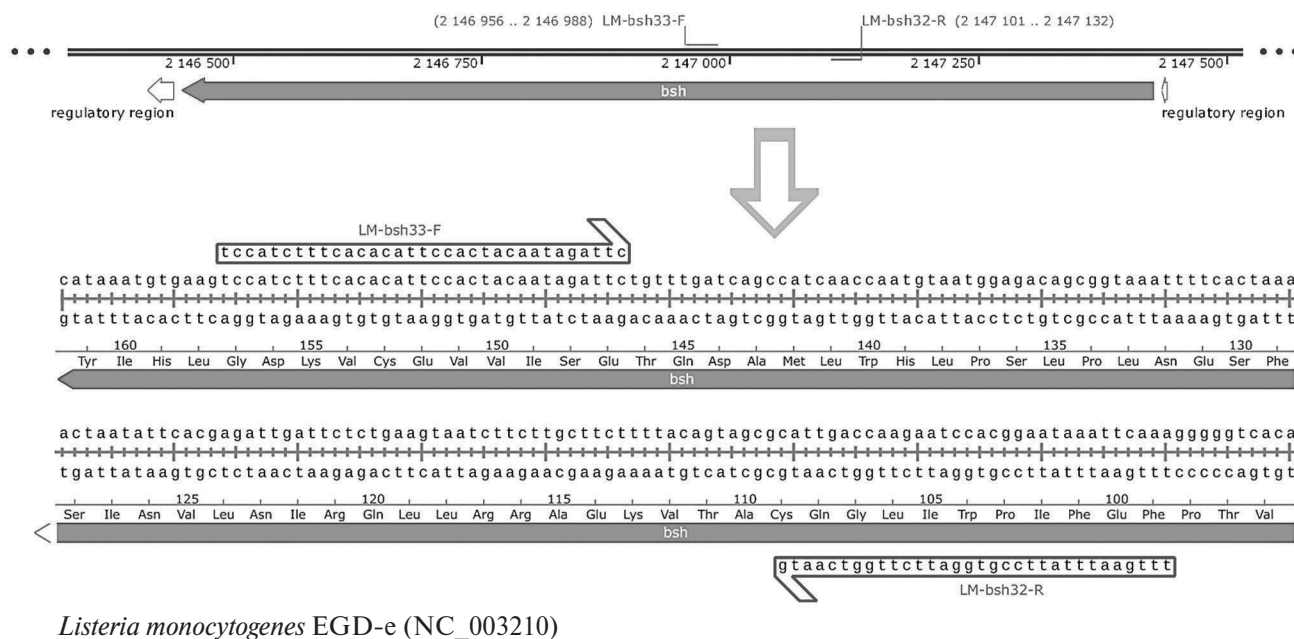


Рис. 2. Последовательность гена *bsh* и соответствующие последовательности РПА-праймеров
Fig. 2. The *bsh* gene sequence and the corresponding RPA primer sequences

Фрагмент гена *bsh* является перспективной мишенью для амплификации ДНК патогенных вариантов *L. monocytogenes* и ранее не применялся для РПА. В сравнении с описанными в литературе праймерами к генам *plcA* или *hlyA* [1, 11, 13, 36, 39], амплификация фрагмента гена *bsh* позволяет выявить больший спектр вирулентных вариантов *L. monocytogenes*, что было подтверждено в данной работе *in silico* при проверке со всеми известными на данный момент последовательностями живых организмов. Так, количество потенциальных мишеней среди известных геномов *L. monocytogenes* при использовании разработанных праймеров составило 675. Для представленных в публикациях

праймеров к генам *plcA* или *hlyA* это число составило 15 [11], 236 [39], 295 [13], 563 [36] или 661 [1].

Разработаны и исследованы нуклеотидные последовательности двух праймеров для синтеза меченых фрагментов ДНК бактерий *L. monocytogenes*. Применение этих праймеров приводило к образованию продукта амплификации размером 177 п.н., несущего биотиновую и флуоресцеиновую метки на 5'-концах двухцепочечной ДНК. Электрофореграмма ампликонов фрагмента гена *bsh*, полученных после РПА с использованием ДНК *L. monocytogenes* различных серотипов (1/2a, 1/2c и 4b), приведена на рис. 3.

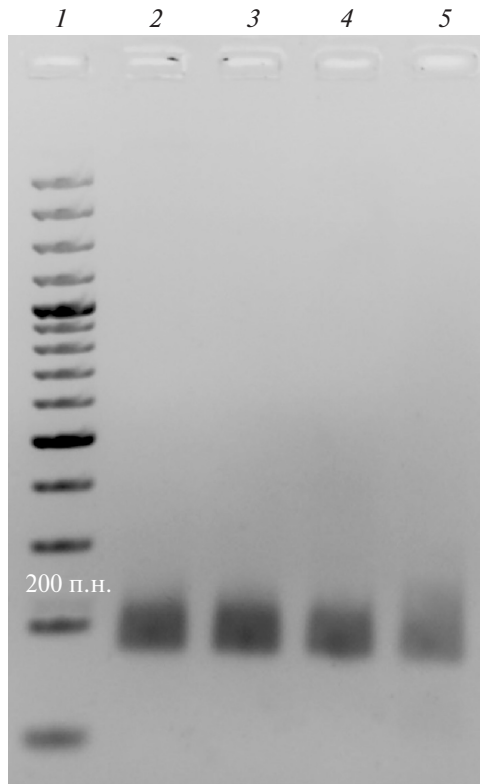


Рис. 3. Электрофореграмма ампликонов фрагмента гена *bsh* бактерий *L. monocytogenes* различных серотипов: 1 — маркер молекулярного веса GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, 2 — *L. monocytogenes* серотип 1/2a (ATCC 19115), 3 — *L. monocytogenes* серотип 1/2c (ATCC 7644), 4 — *L. monocytogenes* серотип 4b (ATCC 975), 5 — референсный образец ДНК IRMM-447

Fig. 3. Electropherogram of the *bsh* gene fragment amplicons from *L. monocytogenes* different serotypes: 1 — molecular weight marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, 2 — *L. monocytogenes* serotype 1/2a (ATCC 19115), 3 — *L. monocytogenes* serotype 1/2c (ATCC 7644), 4 — *L. monocytogenes* serotype 4b (ATCC 975), 5 — certified reference material IRMM-447 (serotype 4b, NCTC 11994)

Рекомбиназная полимеразная амплификация

РПА проводили с использованием специфических реагентов из набора Twist Dx, включающих рекомбиназу UvsX, полимеразу Bsu и SSB-белки Gr32 фага T4, к которым добавляли разработанные праймеры и препараты ДНК *L. monocytogenes*. В работе были оптимизированы температурно-временные и объемно-концентрационные условия реакции РПА. В сравнительных экспериментах изучено влияние температуры (37–42 °С), времени инкубации (5–30 мин) и концентрации праймеров (0,1–0,4 мкМ) в реакционной смеси на количество целевого РПА-продукта. Найдено, что наибольший выход продукта амплификации наблюдался при концентрации праймеров 0,1 мкМ. Показано, что оптимальной температурой является 40 °С,

время реакции сокращено до 15 мин (данные не приведены). Уменьшение времени проведения амплификации с 20–40 мин (рекомендованная продолжительность анализа в стандартном протоколе) до 15 мин приводило к снижению количества образуемого целевого фрагмента ДНК, однако его было достаточно для визуального обнаружения методом электрофоретического анализа и для детекции путем ИХА и ИФА. Таким образом, в работе при сохранении надлежащих параметров тест-систем была достигнута минимальная продолжительность амплификации в сравнении с другими тестами РПА-ИХА для выявления бактерий *L. monocytogenes*, представленными в литературе, в которых анализ проводили при 37–40 °С в течение 20–40 мин [1, 13, 36, 39].

Для установления характеристик разработанных комбинированных тест-систем РПА-ИХА и РПА-ИФА использовали очищенные препараты ДНК различных серотипов листерий (1/2a, 1/2c и 4b) и ДНК бактерий, не принадлежащих к роду *Listeria*. Исследовали обнаружение ДНК в растворе и бактериальных клеток *L. monocytogenes* в искусственно зараженных пробах для оценки специфичности анализа и пределов детекции.

Иммунохроматографический анализ

После проведения РПА осуществляли детекцию полученных продуктов амплификации на тест-полоске. Для разработки ИХА-системы готовили меченные наночастицами золота моноклональные антитела к флуоресцеину, которые в анализе находились в жидкой фазе, и иммобилизовали в аналитической зоне тест-полоски бактериальный биотинсвязывающий белок стрептавидин. Были выполнены соответствующие эксперименты и оптимизированы концентрации этих реагентов в системе. При проведении ИХА в латеральном потоке происходит связывание синтезированных в РПА фрагментов ДНК, содержащих остатки биотина и флуоресцеина на 5'-концах, с антителами к флуоресцеину и с твердофазным стрептавидином. Так образуется тройной комплекс, который оказывается иммобилизованным в аналитической зоне тест-полоски. За счет наночастиц золота наблюдалось окрашивание и обеспечивался визуальный контроль прохождения реакции. Интенсивность окраски зависит от концентрации ампликона ДНК. Калибровочный график и внешний вид тест-полосок после взаимодействия различных концентраций ампликонов, полученных на матрице ДНК *L. monocytogenes*, представлен на рис. 4. Диапазон определяемых концентраций составил 0,0075–4,0 нМ. Установлено, что визуальный предел обнаружения в ИХА равен 15 пМ, инструментальный предел детекции оказался равным 7,5 пМ. Представленная концентрационная зависимость связывания ампликонов была общей для всех те-

стируемых препаратов ДНК *L. monocytogenes*. Таким образом, подтверждена способность системы выявлять ДНК различных серотипов *L. monocytogenes*

(1/2а, 1/2с и 4b). Процедура ИХА занимала не более 10 мин, что добавляет экспрессность к высокой чувствительности анализа.

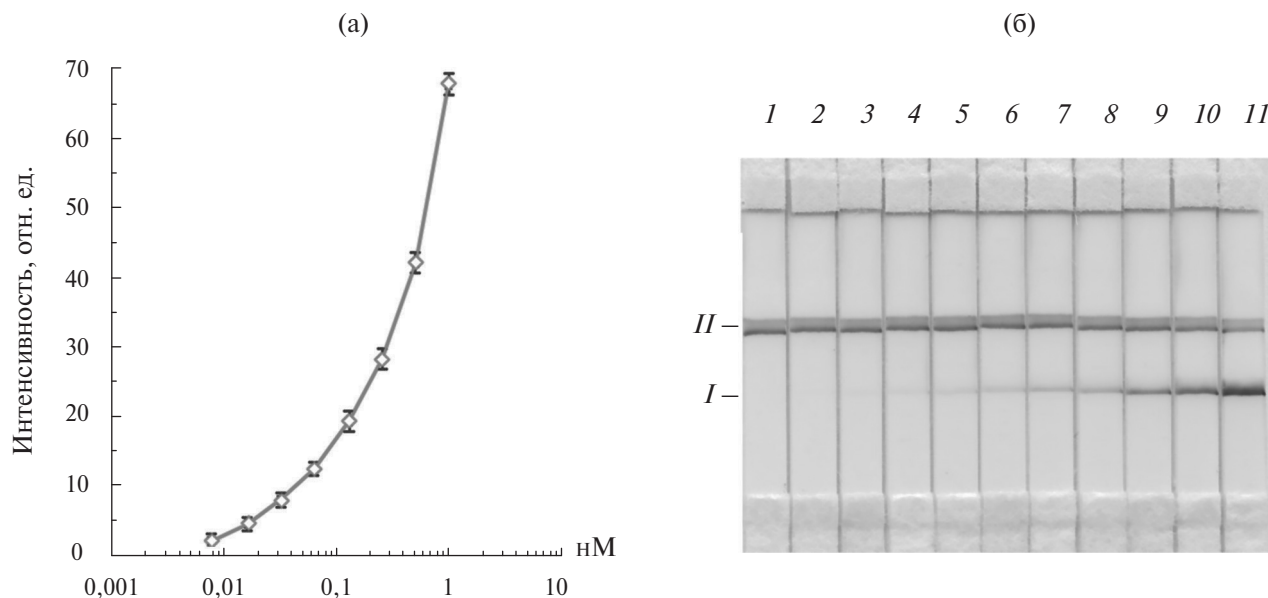


Рис. 4. График зависимости интенсивности окрашивания в аналитической зоне тест-полоски от концентрации ампликона ДНК *L. monocytogenes* в ИХА-системе (а) и внешний вид тест-полосок после анализа (б): I–II — концентрация ампликона ДНК 0, 0,0075, 0,015, 0,03, 0,06, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 и 4,0 нМ. I — аналитическая зона тест-полоски, II — контрольная зона тест-полоски

Fig. 4. Graph of the dependence of the staining intensity in the analytical zone of the test strip on the concentration of the *L. monocytogenes* DNA amplicon in the LFA system (a) and the appearance of the test strips after assay (b): 1–11 — DNA amplicon concentration 0, 0.0075, 0.015, 0.03, 0.06, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 and 4.0 nM. I — analytical zone of the test strip, II — control zone of the test strip

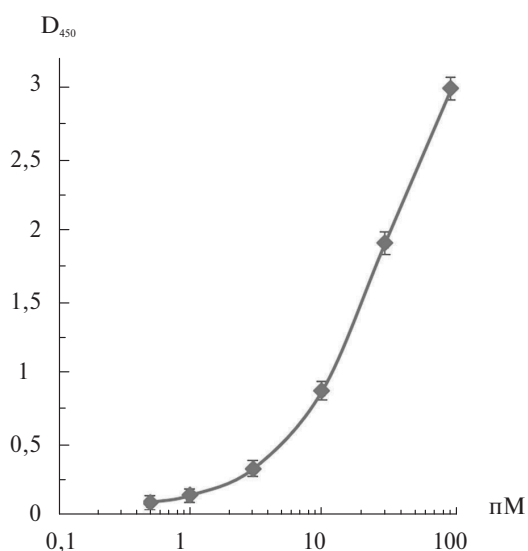


Рис. 5. График концентрационной зависимости связывания меченого ампликона ДНК *L. monocytogenes* со стрептавидином и антителом к флуоресцеину в ИФА-системе

Fig. 5. The concentration dependence graph of the binding of labeled *L. monocytogenes* DNA amplicon with streptavidin and an antibody to fluorescein in the ELISA system

Иммуноферментный анализ

В работе была исследована микропланшетная система для детекции ампликонов ДНК. Такой формат является высокопроизводительным и позволяет одновременно исследовать до 96 или 384 образцов. В ИФА на твердой фазе иммобилизовали моноклональные антитела к флуоресцеину и в качестве детектирующего реагента использовали конъюгат стрептавидина с пероксидазой. При анализе происходило взаимодействие компонентов и образование твердофазного сэндвич комплекса, как и в случае ИХА. Концентрационная зависимость взаимодействия FAM/Вt-ампликонов фрагмента гена *bsh* бактерии *L. monocytogenes* с упомянутыми связывающими белками представлена на рис. 5. Диапазон определяемых концентраций составил 0,5–100,0 пМ. Предел обнаружения оказался равным 0,5 пМ. Проведение ИФА занимает до 75 мин.

Специфичность и чувствительность анализа в РПА-ИХА и РПА-ИФА

Важными характеристиками аналитических систем, дающих возможность их практического

применения, являются специфичность и чувствительность. Специфичность разработанных комбинированных систем исследовали с использованием ДНК различных серотипов листерий и ДНК других бактерий, часто встречающихся в качестве контаминирующих агентов в пищевых продуктах — *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* и *Staphylococcus aureus*.

В настоящее время вид *L. monocytogenes* включает 14 серотипов [19, 20, 29, 37]. В работе использовали наиболее часто идентифицируемые и вызывающие до 95 % случаев заражения человека серотипы листерий [35]. Показано, что серотип 1/2a чаще всего выделяется из пищевых продуктов и на предприя-

тиях по их переработке, тогда как именно серотип 4b ответственен за большинство вспышек и спорадических случаев листериоза [3, 4, 6, 23].

Результаты оценки специфичности в тест-системах РПА-ИХА и РПА-ИФА представлены на рис. 6. Показаны идентичность характеристик выявления ампликонов, полученных при использовании ДНК бактерий *L. monocytogenes* серотипов 1/2a, 1/2c, 4b, и отсутствие реактивности в отношении других исследованных бактериальных патогенов. Эти данные свидетельствуют о высокой специфичности анализа, что является принципиальным для практических тест-систем.

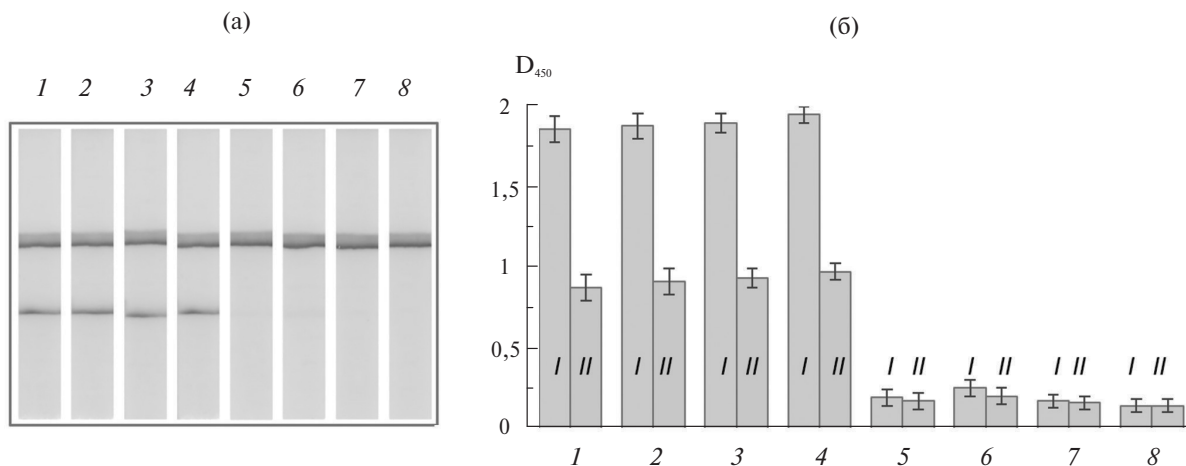


Рис. 6. Оценка специфичности взаимодействия в системах РПА-ИХА и РПА-ИФА при использовании ДНК различных серотипов *L. monocytogenes* и других бактерий (1–8): а — внешний вид тест-полосок после проведения ИХА; б — связывание FAM/Bt-ампликонов в концентрациях 0,03 нМ (I) и 0,01 нМ (II) в ИФА. 1 — 1/2a, ATCC 19111; 2 — 1/2c, ATCC 7644; 3 — 4b, ATCC 975; 4 — 4b, NCTC 11944, сертифицированный референсный препарат ДНК IRMM-447; 5 — *S. aureus*; 6 — *E. coli*; 7 — *S. enterica*; 8 — отрицательный контроль

Fig. 6. Evaluation of the interaction specificity in the RPA-LFA and RPA-ELISA systems using *L. monocytogenes* DNA of different serotypes and other bacteria (1–8): a — appearance of the test strips after LFA; b — binding of FAM/Bt amplicons at concentrations of 0.03 nM (I) and 0.01 nM (II) in ELISA. 1 — 1/2a, ATCC 19111; 2 — 1/2c, ATCC 7644; 3 — 4b, ATCC 975; 4 — 4b, NCTC 11944, certified reference material of DNA IRMM-447; 5 — *S. aureus*; 6 — *E. coli*; 7 — *S. enterica*; 8 — negative control

Чувствительность анализа оценивали как предел обнаружения геномной ДНК в тест-системах РПА-ИХА и РПА-ИФА. Для этого добавляли возрастающие количества ДНК *L. monocytogenes* в диапазоне 0,2 фг — 100 пг, содержащиеся в 1 мкл исследуемой пробы, в реакционную смесь РПА и проводили анализ. Установлено, что предел детекции (или минимальная определяемая концентрация) ДНК *L. monocytogenes* в тест-системах РПА-ИХА и РПА-ИФА составляла 1 фг/мкл (рис. 7). Это значение соответствовало 0,3 геном-эквивалентам, содержащимся в 50 мкл реакционной смеси. Полученные данные о чувствительности анализа превосходили значения, представленные в литературе для немногочисленных комбинированных систем РПА-ИХА: 100 фг геномной ДНК/ 50 мкл реакционной смеси [39],

10 пг/ 50 мкл [13], 300–310 фг/мкл [11, 36] или 1,1 пг/мкл [1]. Необходимо также отметить, что предел обнаружения в настоящем исследовании оказался значительно более низким, чем у метода ПЦР [8, 24, 26]. Возможными причинами достигнутого существенного выигрыша в пределе обнаружения по сравнению с результатами, представленными в литературе, является оптимальный выбор условий и реагентов для молекулярно-генетического и иммунохимического анализов. К ним могут относиться мишень для амплификации ДНК (фрагмент гена *bsh*) в РПА, оптимальная длина праймеров (праймеры короче 30 н. могут снижать эффективность реакции), объем реакционной смеси, а также конструкция иммунохимической системы детекции и высокий аффинитет использованного в ней антитела.

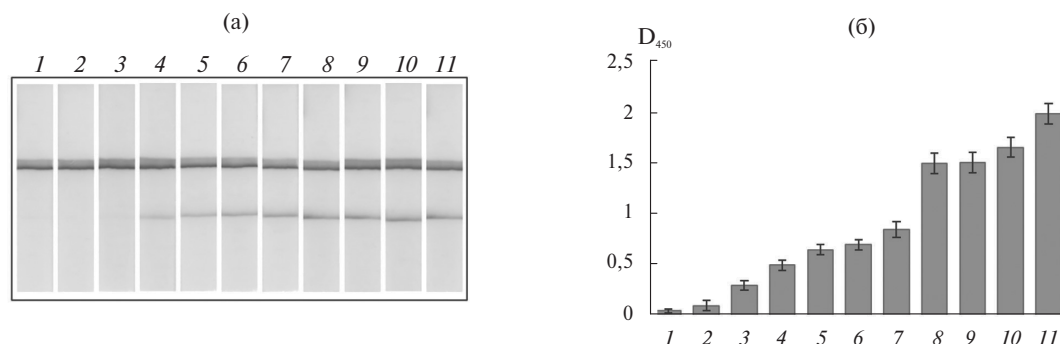


Рис. 7. Определение предела обнаружения геномной ДНК *L. monocytogenes* в разработанных системах РПА-ИХА и РПА-ИФА: а — внешний вид тест-полосок после проведения ИХА; б — связывание FAM/Bt-ампликонов в ИФА. 1–11 — содержание ДНК *L. monocytogenes* в реакционной смеси РПА 0, 0,2 фг, 0,5 фг, 1 фг, 2 фг, 5 фг, 10 фг, 100 фг, 1 пг, 10 пг, 100 пг

Fig. 7. Determination of the detection limit of *L. monocytogenes* genomic DNA in the developed RPA-LFA and RPA-ELISA systems: a — appearance of test strips after LFA; b — binding of FAM/Bt amplicons in ELISA. 1–11 — the content of *L. monocytogenes* DNA in the RPA reaction mixture 0, 0.2 fg, 0.5 fg, 1 fg, 2 fg, 5 fg, 10 fg, 100 fg, 1 pg, 10 pg, 100 pg

Выявление бактерий *L. monocytogenes* в продуктах

Для установления предела обнаружения клеток бактерий *L. monocytogenes* в продуктах с использованием тест-систем РПА-ИХА и РПА-ИФА готовили пробы молока с искусственно внесенными исследуемыми бактериями. Использовали молоко жирностью 3,2 % и обезжиренное молоко из коммерческой торговой сети.

Для установления возможности тестирования минимального регламентированного содержания исследуемых бактерий, которое составляет 1–3 клетки в 25 г продукта, проводили стадию доращивания и культивировали бактерии в молоке с

добавлением 225 мл среды. Концентрация клеток составила 0,008 КОЕ/мл. Такая пробоподготовка предложена в регламентирующих документах для молекулярно-генетических методов исследования (<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-10-detection-listeria-monocytogenes-foods-and-environmental-samples-and-enumeration>). Стадию обогащения осуществляли в течение 3–24 ч. В каждый отдельный момент времени отбирали пробу, выделяли ДНК сорбентным методом и проводили анализ в РПА-ИХА и РПА-ИФА. Найдено, что 5 ч инкубации достаточно для последующего выявления этого минимального содержания *L. monocytogenes* в молоке (рис. 8а и 9а).

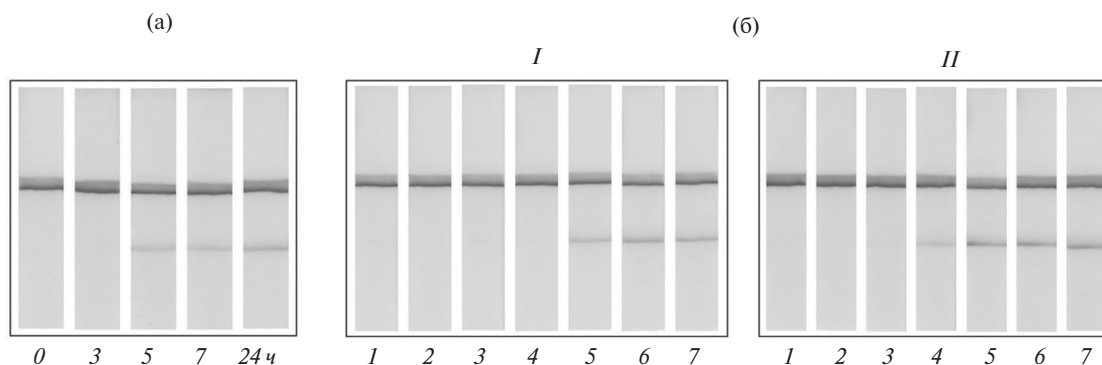


Рис. 8. Определение предела обнаружения бактерий *L. monocytogenes* в молоке в разработанной системе РПА-ИХА: а — внешний вид тест-полосок после анализа проб, содержащих *L. monocytogenes* в количестве 2 клетки на 25 г продукта, при проведении стадии обогащения в течение 0–24 ч; б — внешний вид тест-полосок после РПА-ИХА в искусственно загрязненных пробах молока с бактериями *L. monocytogenes* в возрастающих концентрациях (1–7) без стадии обогащения при применении различных способов выделения ДНК перед РПА (I, II); 1–7 — концентрация клеток *L. monocytogenes* в пробах разбавленного средой молока 0,008, 0,08, 0,8, 8, 80, 800, 8000 КОЕ/мл. I — выделение ДНК кипячением, II — выделение ДНК сорбентным способом

Fig. 8. Determination of the detection limit of *L. monocytogenes* bacteria in milk in the developed RPA-LFA system: a — appearance of test strips after assay of samples containing *L. monocytogenes* in the amount of 2 cells per 25 g of product, during the enrichment stage for 0–24 h; b — appearance of test strips after RPA-LFA in artificially contaminated milk samples with *L. monocytogenes* bacteria in increasing concentrations (1–7) without the enrichment stage when using different methods of DNA extraction before RPA (I, II); 1–7 — concentration of *L. monocytogenes* cells in samples of milk diluted with medium 0.008, 0.08, 0.8, 8, 80, 800, 8000 CFU/ml. I — DNA extraction by boiling, II — DNA extraction by the sorbent method

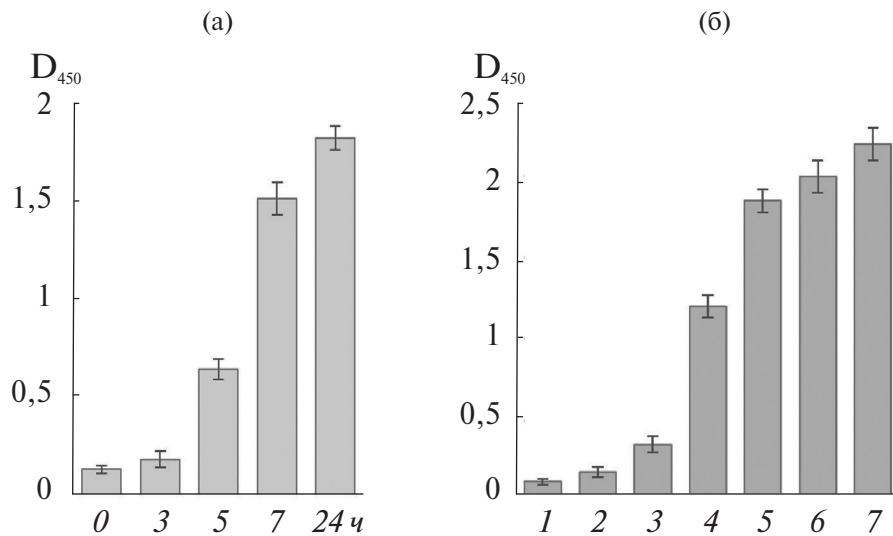


Рис. 9. Определение предела обнаружения клеток *L. monocytogenes* в молоке в разработанной системе РПА-ИФА: а — связывание продуктов РПА после стадии обогащения в течение 0–24 ч для пробы молока, содержащей 2 клетки бактерии на 25 г продукта; б — связывание продуктов РПА из проб молока, содержащих различные концентрации *L. monocytogenes*, без стадии обогащения, 1–7 — концентрация клеток *L. monocytogenes* в пробах разбавленного средой молока 0,008, 0,08, 0,8, 8,0, 80, 800, 8000 КОЕ/мл

Fig. 9. Determination of the detection limit of *L. monocytogenes* cells in milk in the developed RPA-ELISA system: a — binding of RPA products after the enrichment stage for 0–24 h using milk samples containing 2 bacterial cells per 25 g of product; b — binding of RPA products from milk samples containing different concentrations of *L. monocytogenes*, without the enrichment stage, 1–7 — concentration of *L. monocytogenes* cells in milk samples of diluted with medium 0.008, 0.08, 0.8, 8.0, 80, 800, 8000 CFU/ml

Для установления предела обнаружения клеток *L. monocytogenes* без проведения стадии обогащения, общепринятой для большинства методов выявления патогенных бактерий, применяли те же приготовленные пробы молока (25 мл), разбавленные средой (объемом 225 мл). При этом добавляли клетки *L. monocytogenes* в диапазоне $2 \cdot 10^0$ – $2 \cdot 10^6$ на 25 г продукта, так что концентрация бактерий находилась в диапазоне 0,008–8 000 КОЕ/мл в пробах разбавленного молока для тестирования. Для экстракции ДНК из отобранных проб перед проведением анализа было проведено сравнительное исследование двух способов, включающих температурную обработку (кипячение) и сорбентный метод. Результаты тестирования проб после РПА-ИХА и РПА-ИФА представлены на рисунках 8(б) и 9(б). Показано, что эффективность выделения ДНК оказывала влияние на предел обнаружения бактерии в тест-системах. Применение сорбентного метода экстракции ДНК привело к повышению чувствительности анализа в 10 раз по сравнению с использованием метода кипячения. Предел обнаружения клеток *L. monocytogenes* в разработанных тест-системах оказался равным 8 КОЕ/мл.

Полученные значения предела детекции бактерий в молоке и предела обнаружения ДНК в растворе в этом исследовании, где в качестве мишени для амплификации был выбран фрагмент гена *bsh*, оказались

ниже, чем представленные данные в работах с использованием праймеров к фрагментам генов *hlyA* или *plcA* [1, 11, 13, 36, 39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методики быстрого и эффективного обнаружения пищевых патогенов играют ключевую и жизненно важную роль в профилактике и контроле заболеваний и обеспечении биобезопасности продуктов питания. РПА — это инновационная изотермическая технология амплификации нуклеиновых кислот, способная быстро нарабатывать выбранные фрагменты ДНК исследуемой бактерии при достаточно низких температурах. РПА обладает такими преимуществами, как простота, скорость, точность и удобство в эксплуатации. Интеграция этой методики с иммуноанализом расширяет ее практическое применение для обнаружения пищевых патогенов.

В результате исследования предложены биоаналитические системы для обнаружения патогенных бактерий *L. monocytogenes*, сочетающие изотермическую РПА с ИХА на тест-полосках или ИФА в микропланшетах. Разработанные тест-системы характеризовались высокой чувствительностью анализа, широкой специфичностью в отношении различных серотипов патогенных бактерий *L. monocytogenes* и позволяли надежно выявлять присутствие этого патогена в за-

грязненных пробах молока. Представленные комбинированные системы РПА-ИХА и РПА-ИФА могут служить прототипами практических наборов реагентов для экспрессного или высокопроизводительного обнаружения патогенных бактерий *L. monocytogenes* в пищевых продуктах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Azinheiro S., Carvalho J., Prado M., Garrido-Maestu A. Application of recombinase polymerase amplification with lateral flow for a naked-eye detection of *Listeria monocytogenes* on food processing surfaces. *Foods*, 2020, vol. 9, no. 9, P. 1249. <https://doi.org/10.3390/foods9091249>
2. Bickley J., Short J.K., McDowell D.G., Parkes H.C. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1996, vol. 22, no. 2, P. 153–158. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1996.tb01131.x>
3. Borucki M.K., Call D.R. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, no. 12, P. 5537–5540. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5537-5540.2003>
4. Burall L.S., Grim C.J., Datta A.R. A clade of *Listeria monocytogenes* serotype 4b variant strains linked to recent listeriosis outbreaks associated with produce from a defined geographic region in the US. *PLoS ONE*, 2017, vol. 12, no. 5, Article e0176912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176912>
5. Byzova N.A., Serchenya T.S., Vashkevich I.I., Zherdev A.V., Sviridov O.V., Dzantiev B.B. Lateral flow immunoassay for rapid qualitative and quantitative control of the veterinary drug bacitracin in milk. *Microchemical Journal*, 2020, vol. 156, Article 104884. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104884>
6. Camargo A.C., Vallim D.C., Hofer E., Nero L.A. Molecular serogrouping of *Listeria monocytogenes* from Brazil using PCR. *J. Food Prot.*, 2016, vol. 79, no. 1, P. 144–147. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-294>
7. Chemisova O.S., Tsyulina O.A., Truhachev A.L., Noskov A.K. Comparative analysis of methods for isothermal amplification of nucleic acids. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2022, vol. 99, no. 1, P. 126–138. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-176>
8. Chen J.-Q., Healey S., Regan P., Laksanalamai P., Hu Z. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Sci. Hum. Wellness*, 2017, vol. 6, no. 2, P. 39–59. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2017.03.001>
9. Cobzariu M.A., Lobo-Castañón M.J., Miranda-Castro R. Enzyme-assisted isothermal amplification of nucleic acids on the electrode surface. *Curr. Opin. Electrochem.*, 2023, vol. 40, Article 101322. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2023.101322>
10. Daher R.K., Stewart G., Boissinot M., Bergeron M.G. Recombinase polymerase amplification for diagnostic applications. *Clinical Chemistry*, 2016, vol. 62, no. 7, P. 947–958. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.245829>
11. Du X.J., Zang Y.X., Liu H.B., Li P., Wang S. Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip for *Listeria monocytogenes* detection in food. *J. Food Sci.*, 2018, vol. 83, no. 4, P. 1041–1047. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14078>
12. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature Physical Science*, 1973, vol. 241, P. 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>
13. Gao W., Huang H., Zhang Y., Zhu P., Yan X., Fan J., Chen X. Recombinase polymerase amplification-based assay for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Anal. Methods.*, 2017, vol. 10, P. 1972–1981. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0775-0>
14. Glökler J., Lim T.S., Ida J., Frohme M. Isothermal amplifications – a comprehensive review on current methods. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 2021, vol. 56, no. 6, P. 543–586. <https://doi.org/10.1080/10409238.2021.1937927>
15. Hendrickson O.D., Byzova N.A., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Prussian-blue-nanozyme-enhanced simultaneous immunochromatographic control of two relevant bacterial pathogens in milk. *Foods*, 2024, vol. 13, P. 3032. <https://doi.org/10.3390/foods131930322>
16. Ivanov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Nucleic acid lateral flow assay with recombinase polymerase amplification: Solutions for highly sensitive detection of RNA virus. *Talanta*, 2020, vol. 210, Article 120616. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120616>
17. Ivanov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. The potential use of isothermal amplification assays for in-field diagnostics of plant pathogens. *Plants. (Basel)*, 2021, vol. 10, no. 11, P. 2424. <https://doi.org/10.3390/plants10112424>

18. Kakkar S., Gupta P., Yadav S.P.S., Raj D., Singh G., Chauhan S., et al. Lateral flow assays: Progress and evolution of recent trends in point-of-care applications. *Materials Today Bio.*, 2024, vol. 28, Article 101188. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101188>
19. Lanni L., Morena V., Scattareggia Marchese A., Destro G., Ferioli M., et al. Challenge test as special tool to estimate the dynamic of *Listeria monocytogenes* and other foodborne pathogens. *Foods*, 2022, vol. 11, no. 1, P. 32. <https://doi.org/10.3390/foods11010032>
20. Li F., Ye Q., Chen M., Zhou B., Xiang X., Wang C., et al. Mining of novel target genes through pan-genome analysis for multiplex PCR differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serotypes. *Int. J. Food Microbiol.*, 2021, vol. 339, Article 109026. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109026>
21. Lobato I.M., O'Sullivan C.K. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2018, vol. 98, P. 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
22. Luciani M., Krasteva I., Schirone M., D'Onofrio F., Iannetti L., Torresi M., et al. Adaptive strategies of *Listeria monocytogenes*: An in-depth analysis of the virulent strain involved in an outbreak in Italy through quantitative proteomics. *Int. J. Food Microbiol.*, 2025, vol. 427, Article 110951. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110951>
23. Nunes B., Barata A.R., Oliveira R., Guedes H., Almeida C., Silva G.J., et al. Occurrence and diversity of *Listeria monocytogenes* in Portuguese dairy farms. *The Microbe*, 2024, vol. 3, Article 100063. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100063>
24. Osek J., Lachtara B., Wieczorek K. *Listeria monocytogenes* in foods – From culture identification to whole-genome characteristics. *Food Science & Nutrition*, 2022, vol. 10, no. 9, P. 2825–2854. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2910>
25. Osek J., Wieczorek K.J. Why does *Listeria monocytogenes* survive in food and food-production environments? *Vet. Res.*, 2023, vol. 67, no. 4, P. 537–544. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2023-0068>
26. Postollec F., Falentin H., Pavan S., Combrisson J., Sohier D. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. *Food Microbiology*, 2011, vol. 28, no. 5, P. 848–861. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.02.008>
27. Powell H.A., Gooding C.M., Garrett S.D., Lund B.M., Mckee R.A. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1994, vol. 8, no. 1, P. 59–61. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1994.tb00802.x>
28. 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, P. 396–411. <https://doi.org/10.1039/C8AN01488D>
29. Ravindhiran R., Sivarajan K., Sekar J.N., Murugesan R., Dhandapani K. *Listeria monocytogenes* an emerging pathogen: a comprehensive overview on listeriosis, virulence determinants, detection, and anti-listerial interventions. *Microb Ecol*, 2023, vol. 86, P. 2231–2251. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02269-9>
30. Santiago-Felipe S., Tortajada-Genaro L.A., Puchades R., Maquieira A. Recombinase polymerase and enzyme-linked immunosorbent assay as a DNA amplification-detection strategy for food analysis. *Anal. Chim. Acta*, 2014, vol. 811, P. 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.12.017>
31. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2024, vol. 60, no. 4, pp. 314–325. (In Russ.). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2024-60-4-314-325>
32. Serchenya T.S., Akhremchuk K.U., Valentovich L.N., Lapina V.S., Sviridov O.V. Combined systems of recombinase polymerase amplification and membrane immunochromatography or enzyme-linked immunoassay for quantitative determination of *Salmonella enterica* bacterial DNA. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2025, vol. 61, no. 2, P. 429–440. <https://doi.org/10.1134/S0003683824605249>
33. Serchenya T.S., Harbachova I.V., Vashkevich I.I., Sviridov O.V. Immunoassay systems for detection and quantitative determination of cefalexin. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2024, vol. 60, no. 6, P. 1416–1427. <https://doi.org/10.1134/S0003683824605638>
34. Shang Y., Xing G., Lin H., Sun Y., Chen S., Lin J.-M. Development of nucleic acid extraction and real-time recombinase polymerase amplification (RPA) assay integrated microfluidic biosensor for multiplex detection of foodborne bacteria. *Food Control*, 2024, vol. 155, Article 110047. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110047>
35. Swaminathan B., Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 2007, vol. 9, no. 10, P. 1236–1243. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.011>
36. Tran H.T., Tran D.H., Pham T.N.M., Phung H.T.T. Direct recombinase polymerase amplification assay for accurate and rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.*, 2022, vol. 11, no. 5, Article e4749. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.4749>

37. Tuytschaever T., Raes K., Sampers I. *Listeria monocytogenes* in food businesses: from persistence strategies to intervention/prevention strategies: a review. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf*, 2023, vol. 22, no. 5, P. 3910–3950. <http://hdl.handle.net/1854/LU-01HARSNKQBF651CWGV9T5AQT8K>
38. Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Towards lateral flow quantitative assays: detection approaches. *Biosensors*, 2019, vol. 9, no. 3, P. 89. <https://doi.org/10.3390/bios9030089>
39. Wang L., Zhao P., Si X., Li J., Dai X., Zhang K., et al. Rapid and specific detection of *Listeria monocytogenes* with an isothermal amplification and lateral flow strip combined method that eliminates false-positive signals from primer-dimers. *Front. Microbiol.*, 2020, vol. 10, Article 2959. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02959>
40. Wilking H., Lachmann R., Holzer A., Halbedel S., Flieger A., Stark K. Ongoing high incidence and case-fatality rates for invasive listeriosis, Germany, 2010–2019. *Emerg Infect Dis*, 2021, vol. 27, no. 9, P. 2485–2488. <https://doi.org/10.3201/eid2709.210068>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Серченя Татьяна Сергеевна — канд. хим. наук, доцент, ведущий научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
E-mail: serchenya@iboch.by

Охремчук Екатерина Владимировна — канд. биол. наук, научный сотрудник, Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
E-mail: katerina_akhr@bio.bsu.by

Валентович Леонид Николаевич — канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией, Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by

Лапина Виктория Сергеевна — научный сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
E-mail: lapina@iboch.by

Бакаева Татьяна Николаевна — научный сотрудник, Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии Государственного учреждения «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь
E-mail: tanya.solo@mail.ru

Свиридов Олег Васильевич — д-р хим. наук, профессор, заведующий лабораторией химии белковых гормонов. Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
E-mail: sviridov@iboch.by

Поступила в редакцию 29.09.2025

После доработки 30.10.2025

Принята к публикации 05.02.2026

ABOUT THE AUTHORS

Serchenya, Tatyana S. — Cand. Sc. (Chemistry), Assistant professor, Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
E-mail: serchenya@iboch.by

Akhremchuk, Katsiaryna U. — Cand. Sc. (Biology), Researcher, Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
E-mail: katerina_akhr@bio.bsu.by

Valentovich, Leonid N. — Cand. Sc. (Biology), Head of Laboratory, Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
E-mail: valentovich@mbio.bas-net.by

Lapina, Victorya S. — Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
E-mail: lapina@iboch.by

Bakayeva, Tatsiana N. — Researcher, Scientific Research Institute of Hygiene, Toxicology, Epidemiology, Virology and Microbiology of State Institution «Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health», Minsk, Republic of Belarus
E-mail: tanya.solo@mail.ru

Sviridov, Oleg V. — Ph.D. (Chemistry), Professor, Head of Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
E-mail: sviridov@iboch.by

Received September 29, 2025

Revised October 30, 2025

Accepted February 05, 2026