

ISSN 1029-8940 (Print)  
ISSN 2524-230X (Online)  
УДК 57.083.3  
<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-1-55-68>

Поступила в редакцию 28.06.2024  
Received 28.06.2024

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

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

## **НОВАЯ ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ НАЛИЧИЯ САЛЬМОНЕЛЛ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ МЕТОДОМ КОНКУРЕНТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА**

**Аннотация.** Детекция сальмонелл в продуктах питания является актуальной в связи с известными случаями эпидемии сальмонеллеза. С этой целью широко применяют иммунохимические методы, в частности, иммуноферментный анализ (ИФА). По традиции в ИФА сальмонелл используют антитела к липополисахариду (ЛПС), который принято считать основным структурным компонентом наружной мембраны клетки грамотрицательных бактерий. Для взаимодействия с антителами доступен кор (консервативный элемент ЛПС, общий для всех сальмонелл) и О-антиген (гипервариабельный элемент ЛПС). Метод ИФА с использованием коммерческого моноклонального антитела (МАТ) 5D12A (к кору ЛПС) или МАТ 10D9H (к общему эпитопу О-антигена сальмонелл серогрупп А, В и D) показал, что в культуре сальмонелл, полученной в ходе пробоподготовки, традиционной для анализа этих бактерий в продуктах питания, ЛПС присутствует главным образом в среде (не менее 90 %). Установлено, что дополнение стандартной процедуры пробоподготовки центрифугированием с целью отделения бактерий от среды и последующий анализ именно среды позволяют расширить рабочий диапазон тест-системы в сторону более низких концентраций ЛПС и повысить аналитическую чувствительность. Показано, что иммобилизация в лунках микропланшетного иммуносорбента конъюгата бычий сывороточный альбумин (БСА)-ЛПС позволяет получить более однородное покрытие, чем иммобилизация ЛПС как такового. Созданы конструкции двух тест-систем для детекции сальмонелл в продуктах питания методом конкурентного ИФА ЛПС, секретированного в культуральную среду. В каждой из двух тест-систем на твердой фазе иммобилизован конъюгат БСА-ЛПС, а в жидкой фазе находятся либо МАТ 5D12A, либо МАТ 10D9H. Чувствительность анализа для каждой из тест-систем соответствует  $10^5$  КОЕ/мл. Тест-система на основе МАТ 5D12A, специфичных к кору ЛПС, имеет преимущество: позволяет детектировать все сальмонеллы, независимо от серотипа.

**Ключевые слова:** конкурентный иммуноферментный анализ, сальмонелла, липополисахарид, моноклональные антитела

**Для цитирования:** Киселева, Е. П. Новая тест-система для детекции наличия сальмонелл в пищевых продуктах методом конкурентного иммуноферментного анализа / Е. П. Киселева, К. И. Михайлопуло, О. В. Свиридов // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2025. – Т. 70, № 1. – С. 55–68. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2025-70-1-55-68>

**Elena P. Kiseleva, Konstantin I. Mikhailopulo, Oleg V. Sviridov**

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

## **A NEW TEST SYSTEM FOR *SALMONELLA* DETECTION IN FOOD PRODUCTS BY COMPETITIVE IMMUNOASSAY**

**Abstract.** Detecting *Salmonella* in foods is topical due to the known cases of salmonellosis epidemics. Immunochemical methods including enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) have been widely used in *Salmonella* detection. Traditionally, ELISA of *Salmonella* is based on detecting lipopolysaccharide (LPS), which is considered to be the main structural component of the outer membrane of the cell of Gram-negative bacteria. Core (conservative LPS element common to all *Salmonella*) and O-antigen (hypervariable LPS element) are available for interaction with antibodies. It was shown using commercial MAbs 5D12A (to the core of LPS) or MAb 10D9H (to the common epitope of the O-antigen of *Salmonella* serogroups A, B and D) that in the *Salmonella* culture obtained during sample preparation, traditional for the analysis of these bacteria in foods, LPS is present mainly outside cells, in the medium (no less than 90 %). It has been found that the addition of centrifugation to the standard sample preparation procedure to separate bacteria from the medium and a subsequent analysis of the medium can expand the test-system working range towards lower LPS concentrations and increase the analytical sensitivity. It has been shown that immobilization of the bovine serum albumin (BSA)-LPS conjugate in the wells of a microplate immunosorbent allows one to obtain a more homogeneous coating than immobilization of LPS itself. We have elaborated 2 test systems for *Salmonella* detection in foods by competitive ELISA of LPS secreted in medium. In each of the two test

systems, the BSA-LPS conjugate is immobilized on the solid phase, and in the liquid phase there are either MAb 5D12A or MAb 10D9H. The sensitivity of the analysis for each test system is  $10^5$  CFU/ml. The test system based on MAb 5D12A is advantageous since it allows detecting all *Salmonella* regardless of serotype.

**Keywords:** competitive enzyme immunoassay, salmonella, lipopolysaccharide, monoclonal antibodies

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

**Введение.** По данным мировой статистики, ежегодно регистрируется примерно от 200 млн до 1 млрд случаев сальмонеллеза. И 85 % заболеваний связано именно с употреблением пищи, загрязненной сальмонеллой [1, 2]. Практически любая пища может быть заражена сальмонеллой, которая сохраняет жизнеспособность при хранении. В одних продуктах во время их приготовления (жарка, тушение и т. д.) сальмонелла погибает под воздействием высоких температур, другие продукты питания (например, овощи и фрукты) можно дезинфицировать посредством мытья. Однако многие продукты поступают к потребителю уже готовыми к употреблению, и если в них присутствует сальмонелла, то ее невозможно уничтожить. Время выживания сальмонелл в таких продуктах может составлять 8–12 месяцев [3]. А для развития заболевания необходимо наличие всего лишь 7–8 log<sub>10</sub> сальмонелл [4]. Поэтому проверка продуктов питания на наличие сальмонеллы чрезвычайно важна.

Сальмонеллы – палочкообразные с закругленными краями, грамотрицательные, не образующие споры и капсулы, в основном подвижные бактерии, имеющие диаметр от 0,7 до 1,5 мкм и длину от 2 до 5 мкм, со жгутиками, распределенными по всей поверхности клетки. Сальмонеллы являются хемотрофами, факультативными анаэробами и относятся к факультативным внутриклеточным патогенам. Бактерии рода *Salmonella* относятся к семейству *Enterobacteriaceae*. В соответствии с современной номенклатурой род *Salmonella* включает 2 вида: *Salmonella enterica* и *Salmonella bongori*. Вид *Salmonella enterica* содержит 6 подвигов: **I** *S. enterica*, **II** *S. salamae*, **IIIa** *S. arizonae*, **IIIb** *S. diarizonae*, **IV** *S. houtenae*, **VI** *S. indica* (*S. bongori* ранее считалась подвигом **V**). Только *S. Enterica* subsp. *enterica* (**I**) патогенна для человека и теплокровных животных, остальные подвиды *S. enterica* и *S. bongori* (**V**) являются патогенами холоднокровных животных или обитают вне организма [5].

Каждый подвид сальмонелл имеет множество серотипов, т. е. групп микроорганизмов с одинаковым составом поверхностных антигенов. Серотипирование сальмонелл основано на разнообразии О-антигена (одна из трех составных частей липополисахарида (ЛПС)), и Н-антигена (часть флагеллы (жгутика)). У сальмонелл имеется 46 разновидностей О-антигенов и 114 разновидностей Н-антигенов, которые в различных комбинациях составляют более 2600 зарегистрированных серотипов [5]. Абсолютно ясно, что создание универсальной тест-системы для детекции сальмонелл, основанной на использовании антител к О-антигену, представляет серьезную проблему.

Большинство серотипов сальмонелл относятся к *S. enterica* subsp. **I** (*S. enterica enterica*). Именно эта бактерия является причиной различных инфекционных заболеваний человека, в том числе тифа (*S. enterica enterica* серотип *typhi*, в упрощенном виде *S. typhi*), паратифа (*S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B, *S. paratyphi* C) и сальмонеллеза (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. agona*, *S. heidelberg*, *S. newport* и др.). Наиболее распространенными серогруппами О-антигена *S. enterica enterica* являются А, В, С1, С2, D и Е; штаммы этих серогрупп вызывают примерно 99 % сальмонеллезных инфекций у людей и теплокровных животных [6, 7].

Наиболее развернутая и логичная классификация методов обнаружения сальмонелл представлена в работе М. S. Awang с соавт. [8]. Она включает: (1) метод микробиологического культивирования, (2) иммунологические методы, (3) молекулярные методы, (4) методы масс-спектрометрии, (5) методы спектроскопии, (6) метод оптического фенотипирования и (7) методы детекции с использованием электрохимических биосенсоров. Методы 1–3 лежат в основе коммерческих наборов реагентов для идентификации сальмонелл в продуктах питания [9].

История создания тест-систем для детекции сальмонелл в продуктах питания методом иммуноферментного анализа (ИФА) восходит к 1980-м гг. [10]. Как правило, в коммерческих тест-

системах для ИФА сальмонелл используются коммерческие моноклональные антитела (МАТ), специфичные к ЛПС [9, 11]; в немногочисленных публикациях рассматривается возможность использования МАТ к флагеллину [12]. Следует отметить отсутствие коммерческих тест-систем для определения сальмонелл, основанных на методе конкурентного ИФА. Данная ситуация объясняется трудностью получения однородного и стабильного при хранении покрытия полистирольных микропланшетов с использованием водных растворов ЛПС, что будет подробно обсуждаться ниже. В научных изданиях присутствует единственная работа, посвященная детекции сальмонелл конкурентной иммунохроматографией [13], в которой ЛПС иммобилизован на бумажном носителе в виде конъюгата с бычьим сывороточным альбумином (БСА), а для выявления ЛПС используются МАТ к кору, являющемуся консервативной частью ЛПС и имеющему одинаковую структуру у всех сальмонелл. Проблема создания тест-систем для детекции сальмонелл методом конкурентного ИФА трудноразрешима даже с использованием конъюгата БСА-ЛПС, так как авторы цитируемой выше статьи [13] применяли указанный конъюгат только для иммунизации животных с целью получения МАТ и разработали с их использованием тест-систему, основанную на принципе «сэндвич»-анализа [14].

При применении коммерческих тест-систем для количественного определения сальмонелл в продуктах питания проводится стандартная процедура пробоподготовки: образец анализируемого продукта вносится в культуральную среду. В ходе роста культуры сальмонелл происходит амплификация антигенов бактерий, выявляемых с помощью специфических антител. Культура сальмонелл представляет собой почти гомогенную суспензию, но после ее термообработки, направленной на лишение бактерий жизнеспособности, клетки оседают и образуют мелкодисперсный осадок, легко всплывающий при перемещении колбы с культурой. При отборе пробы для внесения в лунки планшета для ИФА в ее составе могут оказаться как среда, так и клетки в непредсказуемой пропорции.

В соответствии с классическими представлениями ЛПС является основным структурным компонентом (до 90 %) наружной мембраны клетки сальмонелл и других грамотрицательных бактерий. Вместе с тем специалистам в области биомедицинских исследований давно известен факт секреции ЛПС в составе так называемых везикул наружной мембраны (ВНМ), а выяснению механизмов их биогенеза посвящены многочисленные работы [15–19].

В основе современных публикаций о выделении ЛПС [20, 21] лежит водная экстракция горячим фенолом целевого вещества из клеток бактерий. База метода – работа О. Westphal, К. Jann [22]. В работе Е. Sarmikasoglou, А. Р. Faciola [23] представлен обзор других известных методов экстракции ЛПС, но в любом случае исходным биологическим материалом являются именно клетки бактерий. Биотехнологи только недавно обратили внимание на факт присутствия ЛПС вне клетки. В 2021 г. появилась статья М. Р. Назирова с соавт. [24], в которой показано, что выделение ЛПС другого грамотрицательного микроорганизма *Bordetella pertussis* целесообразно проводить из культуральной среды, а не из клеток, так как его содержание в среде намного выше.

Цель работы – создать иммуноферментные тест-системы для количественного определения сальмонелл в продуктах питания методом конкурентного ИФА с улучшенными параметрами. Достижение цели осуществлялось посредством решения нескольких задач. Во-первых, создание гомогенного покрытия полистирольных микропланшетов с иммобилизованным антигеном. Во-вторых, изучение распределения ЛПС в системе «клетка-среда» и на основе полученных результатов создание усовершенствованной процедуры пробоподготовки для использования в ИФА фракции, содержащей максимальное количество ЛПС. В-третьих, использование для детекции ЛПС МАТ к кору, который является консервативным элементом ЛПС, общим для всех сальмонелл и отличающимся от аналогичной составной части ЛПС других грамотрицательных бактерий.

**Материалы и методы исследования.** Бактерии. Использовали *Salmonella enterica enterica*, серотипы *derby* (I), *typhimurium* (II), *typhimurium* SL7207 (III), *newport* (IV), *enteridis* (V), *london* (VI), полученные в РНПЦ эпидемиологии и микробиологии Минздрава Республики Беларусь (I, II, IV–VI) и в Институте микробиологии НАН Беларуси (III). Бактерии растили на селективной среде для выделения сальмонелл висмут-сульфит агар (АО «НПО «Микроген», РФ), а затем на среде трипказо-соевый (TSA) агар («Биомедиа», РФ) при температуре  $37 \pm 1$  °C

в течение  $24 \pm 3$  ч для каждой среды, смывали с чашек 0,9 % NaCl. Идентификацию сальмонелл серотипов I–VI проводили с использованием автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Compact (BioMerieux SA, Франция). Бактерии лишали жизнеспособности нагреванием при 60 °C в течение 15 мин. Добавляли тимеросаль до концентрации 0,2 % и хранили при температуре 4 °C. Полноту инактивации определяли высевом на указанные выше питательные среды. Концентрацию бактерий определяли в камере Горяева.

*Антитела.* МАТ 5D12А и 10D9Н (Bio-Rad, США).

*Антигены.* ЛПС из *Salmonella enterica enterica*, серотип *typhimurium* (Sigma-Aldrich, США).

*Конъюгат БСА-ЛПС.* Для синтеза конъюгата БСА-ЛПС был выбрана схема, аналогичная описанной в работе X. Wu с соавт. [14]. Для удаления избытка реагентов и побочных продуктов реакции реакционную смесь обессоливали на колонке HiTrap Desalting, 5 мл (GE, США), уравновешенной 0,2 М раствором NaCl, содержащим 0,1 % NaN<sub>3</sub>. Концентрацию БСА в составе конъюгата определяли спектрофотометрически, принимая удельный коэффициент экстинкции  $A_{1 \text{ мг/мл}, 280 \text{ нм}, 1 \text{ см}}$  равным 0,67. К конъюгату БСА-ЛПС добавляли глицерин до концентрации 50 % и хранили при температуре –20 °C.

*Приготовление микропланшетов с иммобилизованным антигеном.* Иммобилизовали БСА-ЛПС из раствора 0,01 М НФБ, pH 7,5, с концентрацией 2 мкг/мл (по БСА) при комнатной температуре (КТ) в течение ночи, из расчета 0,1 мл на лунку. Иммобилизовали ЛПС *Salmonella enterica enterica* серотип *typhimurium* (Sigma-Aldrich, США) из растворов 0,01 М НФБ, pH 7,5, 0,1 М NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,3 и 0,1 М глицина, pH 2,0, содержащих 0,1 % NaN<sub>3</sub> каждый, с концентрациями ЛПС 0,25–1 мкг/мл при КТ в течение ночи, из расчета 0,1 мл на лунку. При иммобилизации ЛПС были соблюдены все предосторожности, указанные в инструкции по эксплуатации коммерческого препарата ЛПС.

Удаляли содержимое лунок. В каждую лунку вносили по 200 мкл раствора для стабилизации иммобилизованного антигена следующего состава: 0,05 М НФБ, pH 7,5, 0,15 М NaCl, 5 % сахара, 2 % сорбит, 0,1 % БСА, 0,05 % Твин 20, 0,1 % NaN<sub>3</sub>. Выдерживали при КТ в течение ночи. Удаляли содержимое лунок переворачиванием планшета. Сушили планшеты при КТ в течение ночи. Запечатывали с использованием вакуумного упаковщика HVC-260T/1A (Hualian, Китай).

*Приготовление препаратов «среда», «клетки», «среда + клетки».* Перемешивали препараты клеток, хранившиеся при температуре 4 °C, вручную, переворачивая герметично закрытые флаконы не менее 100 раз. Для разведения клеток использовали (инкубационный буфер (ИнБ) следующего состава: 0,05 М Трис, pH 7,7, 0,15 М NaCl, 0,05 % Твин 20, 0,1 % БСА, 0,1 % пептон казеиновый, 0,1 % NaN<sub>3</sub>, 0,1 % зуксил К-100. Готовили две серии растворов равного объема (объем А, мл), содержащих  $1,2 \cdot (10^5\text{--}10^8)$  КОЕ/мл клеток бактерий (серии 1 и 2, эппендорфы № 1–11 в каждой серии). Каждая серия также включала эппендорф № 12, содержащий А мл ИнБ.

Готовили соосадитель. В ИнБ добавляли муку пшеничную высший сорт (премиум) (ОАО «Лидахлебопродукт», РБ) из расчета 0,07 г на 1 мл, энергично перемешивали 1 мин на встряхивателе Vortex V-1 plus (Biosan, Латвия) и оставляли на 1 мин. Легкая фракция муки находилась в виде суспензии над осадком, состоящим из тяжелой фракции муки. Переносили суспензию в отдельную пробирку и вносили в каждый эппендорф серий 1 и 2 из расчета 1:9, мл/мл; перед внесением в каждый эппендорф суспензию перемешивали на встряхивателе в течение 30 с.

Эппендорфы серий 1 и 2 центрифугировали при ускорении 1000 g 20 мин при КТ с использованием центрифуги Microfuge 18 (Beckman Coulter, США). Каждый эппендорф серии 1 перемешивали на встряхивателе до образования гомогенной суспензии (препарат «супернатант + клетки»). Из эппендорфов серии 2 отбирали надосадочную жидкость (А мл) в отдельные пробирки (серия 3), подписанные соответствующим образом (препарат «среда»). В каждый эппендорф серии 2 с осадком вносили А мл ИнБ и перемешивали на встряхивателе до образования гомогенной суспензии (препарат «клетки»).

*ИФА.* В соответствующие лунки планшета с иммобилизованным конъюгатом БСА-ЛПС (или ЛПС) вносили по 100 мкл (в дублях) каждого препарата («среда», «клетки», «среда + клетки») в соответствии с предварительно составленной схемой. Непосредственно перед внесением препаратов «клетки» и «среда + клетки» в лунки каждый эппендорф (№ 1–12) перемешивали 30 с на встряхивателе.

В каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МАТ 5D12А (или МАТ 10D9Н) в ИнБ с концентрацией МАТ, в 6 раз превышающей ту, которая должна находиться в окончательном объеме в лунке. Выдерживали при КТ 2 ч (1-я стадия ИФА). Удаляли содержимое лунок переворачиванием планшета. Промывали планшет промывочным буфером (ПБ) следующего состава: 0,025 М Трис, рН 7,7, 0,15 М NaCl, 0,1 % Твин 20, 5 раз из расчета 250 мкл на лунку.

В каждую лунку вносили 100 мкл раствора конъюгата поликлональных антител козы против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой из корней хрена (Goat anti-mouse – horseradish peroxidase, GAM-HRP) (Sigma-Aldrich, США) с предварительно подобранным титром. Выдерживали 1 ч при КТ (2-я стадия ИФА). Удаляли содержимое лунок и промывали планшет, как указано выше.

В каждую лунку вносили 100 мкл раствора 1-Step™ TMB ELISA Substrate Solutions (Thermo Fisher Scientific, США), содержащего 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (хромоген) и пероксид водорода (субстрат HRP), и выдерживали 10–20 мин при КТ. Останавливали реакцию HRP внесением в каждую лунку 100 мкл 4,8 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Определяли оптическую плотность раствора в лунках с использованием микропланшетного ридера iMark™ (Bio-Rad, США) под управлением программы MPM 6.exe. Для каждой серии лунок производили расчет значений V<sub>n</sub>/V<sub>0</sub>, % средствами Microsoft Excel.

*Аналитическая чувствительность и коэффициент вариации.* Аналитическую чувствительность (нижний предел обнаружения) ИФА-теста определяли с помощью графика в координатах OY – ОП<sub>450</sub>, OX – концентрация клеток (КОЕ/мл). Сначала рассчитывали значение стандартного отклонения (standard deviation, SD) по формуле для препаратов «среда» и «среда + клетки», соответствующих концентрации клеток 10<sup>7</sup> КОЕ/мл, каждый в 12 повторах.

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

где B<sub>i</sub> – значение ОП<sub>450</sub> в каждой из лунок с образцом;  $\bar{B}$  – среднее арифметическое значение ОП<sub>450</sub> в каждой из лунок с образцом; n – количество измерений.

Затем вдоль оси OY от точки B<sub>0</sub> откладывали отрезок, равный значению 3SD. Через полученную точку проводили линию, параллельную оси OX, до пересечения с калибровочной кривой. Координата этой точки на оси OX соответствует значению аналитической чувствительности.

Коэффициент вариации (КВ, относительное стандартное отклонение (%)) рассчитывали по формуле

$$КВ = SD / \bar{B} \cdot 100.$$

**Результаты и их обсуждение.** Мы предлагаем следующую конструкцию тест-системы для детекции сальмонелл в продуктах питания методом конкурентного ИФА. На твердой фазе иммобилизован антиген (в данном случае ЛПС). В жидкой фазе находится аналогичный антиген (в составе анализируемого биоматериала или в составе калибраторов) и специфические МАТ. На 1-й стадии ИФА антитела образуют иммунные комплексы с иммобилизованным и находящимся в жидкой фазе антигеном. Последние удаляются из системы в ходе промывки лунок. На 2-й стадии ИФА происходит детекция МАТ, находящегося в составе иммунных комплексов с иммобилизованным антигеном, с использованием конъюгата антител животных против иммуноглобулинов мыши, меченных ферментом. Количество МАТ, связавшегося с иммобилизованным антигеном, обратно пропорционально концентрации антигена в жидкой фазе.

В соответствии с поставленными задачами мы изучили возможность создания гомогенного и стабильного при хранении покрытия полистирольных микропланшетов для конкурентного ИФА сальмонелл. Мы иммобилизовали ЛПС (из растворов с различными значениями рН) и конъюгат БСА-ЛПС (из раствора, традиционно используемого для иммобилизации большинства белков), каждый препарат в серии из 13 лунок, достаточной для статистической обработки результатов. При иммобилизации ЛПС были соблюдены все предосторожности, содержащиеся в инструкции по эксплуатации коммерческого препарата ЛПС, с целью предотвращения агрегации ЛПС в растворе. Данные представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Зависимость качества функционализированных микропланшетов от иммобилизованного вещества и условий его иммобилизации

Table 1. Dependence of the quality of functionalized microplates on the immobilized substance and the conditions of its immobilization

Параметры ИФА	Способ приготовления твердой фазы			
	БСА-ЛПС	ЛПС		
	0,01 М НФБ, рН 7,4	0,01 М НФБ, рН 7,4	0,1 М NaHCO <sub>3</sub> , рН 8,3	0,1 М глицин, рН 2
Минимальное значение ОП <sub>450</sub>	0,83	0,84	1,09	0,60
Максимальное значение ОП <sub>450</sub>	1,05	1,34	1,56	1,06
Среднее значение ОП <sub>450</sub> ± 3SD (n = 13)	0,94 ± 0,23	1,09 ± 0,40	1,28 ± 0,53	0,84 ± 0,45
КВ, %	8	13	18	15

П р и м е ч а н и е. Для детекции ЛПС использовали МАТ 5D12А.

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что иммобилизация конъюгата БСА-ЛПС позволяет получить более однородное покрытие (КВ = 8 %) по сравнению с иммобилизацией ЛПС как такового (КВ = 13–18 %). Очевидна также зависимость количества иммунных комплексов на твердой фазе от рН раствора для иммобилизации ЛПС.

При интерпретации результатов мы принимали во внимание известное свойство ЛПС образовывать различные супрамолекулярные структуры [25], обусловленное химическим строением этого вещества. Молекула ЛПС состоит из трех областей: липид А, основной регион, или кор (внутренний кор плюс внешний кор), и О-антиген [26]. Только последний экспонирован во внешнюю среду и состоит из повторяющихся мотивов (3–7 моносахаридов), число которых может достигать 40. Алифатические цепи жирных кислот и фосфорилированные сахара в составе липида А, карбоксильные группы уникального моносахарида 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты и фосфозтаноламин в составе внутреннего кора непосредственно участвуют в образовании супрамолекулярных структур ЛПС в водных растворах [25]. Рентгеноструктурные исследования показывают, что агрегаты ЛПС могут иметь пластинчатую, кубическую или перевернутую гексагональную конформацию [27]. Факторами, влияющими на структуру и молекулярную массу агрегатов ЛПС в водных растворах, являются двухвалентные ионы, неионные детергенты, температура, рН и ионная сила раствора [26].

Известно, что в результате агрегации ЛПС утрачивает способность к образованию специфических комплексов с выявляющими реагентами, например, антителами в ИФА или фактором С атлантического мечехвостого краба *Limulus polyphemus* в LAL-тесте (*Limulus amoebocyte lysate test*), проводимом для определения пирогенности лекарственных препаратов. О значении явления недооткрытия (маскировки) ЛПС для производителей биофармацевтических препаратов свидетельствуют многочисленные публикации на данную тему [28–31] и проведение в 2016 г. международной конференции Low Endotoxin Recovery/Masking (Munich/Bernried, Germany).

Исходя из данных табл. 1, во всех последующих экспериментах мы использовали микропланшеты с иммобилизованным конъюгатом БСА-ЛПС. Изучение распределения ЛПС в системе «клетка-среда» проводили по схеме, представленной на рис. 1.

Мы использовали два МАТ, одно из которых было специфично к общему эпитопу О-антигена ЛПС сальмонелл серогрупп А, В и D (МАТ 10D9Н), а именно антигену «0–12» [2-D-манноза (1–4) I-рамноза (1–3)D-галактоза], а другое – к кору ЛПС (МАТ 5D12А). При выборе МАТ учитывали, что (1) все бактерии рода *Salmonella* содержат только один вид кора, который отличается от такового других грамтрицательных бактерий, (2) известно очень много вариантов О-антигена, (3) существуют мутанты сальмонелл, лишённые О-антигена («грубый» фенотип или R-фенотип) [32–34]. На этом основании мы считали, что МАТ к кору имеет преимущество по сравнению с МАТ к О-антигену в качестве выявляющего реагента в универсальной тест-системе, пригодной для детекции всех сальмонелл.

В лунках планшета с иммобилизованным конъюгатом БСА-ЛПС на 1-й стадии анализа в жидкой фазе находились МАТ 5D12А или МАТ 10D9Н и один из трех препаратов («среда»,

«клетки», «среда + клетки»). Концентрация ЛПС в каждом препарате соответствует концентрации клеток  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. Результаты анализа для препаратов «среда» и «клетки» представлены в табл. 2. Чем меньше значение  $V_n/V_0$ , %, тем больше концентрация ЛПС в препарате.

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что ЛПС в препарате «клетки» на поздней стационарной фазе роста значительно меньше, чем в препарате «среда». Значения  $V_n/V_0$ , %, рассчитанные для препарата «среда + клетки», практически совпадают с таковыми для препарата «среда» (данные не представлены), что подтверждает данный вывод. Кроме того, данные табл. 2 (символ \*) показывают, что МАТ 10D9Н действительно не взаимодействует с сальмонеллами серогрупп С и Е, а значит, использование этого МАТ в ИФА сальмонелл в продуктах питания может привести к ложноотрицательным результатам. Напротив, МАТ 5D12А позволяет выявлять все сальмонеллы, включая бактерии редких серогрупп.

На рис. 2 – калибровочные графики конкурентного ИФА сальмонелл, выполненного с использованием МАТ 5D12А в двух концентрациях. Стрелками обозначены границы рабочего диапазона для препаратов «среда», «клетки» и «среда + клетки».

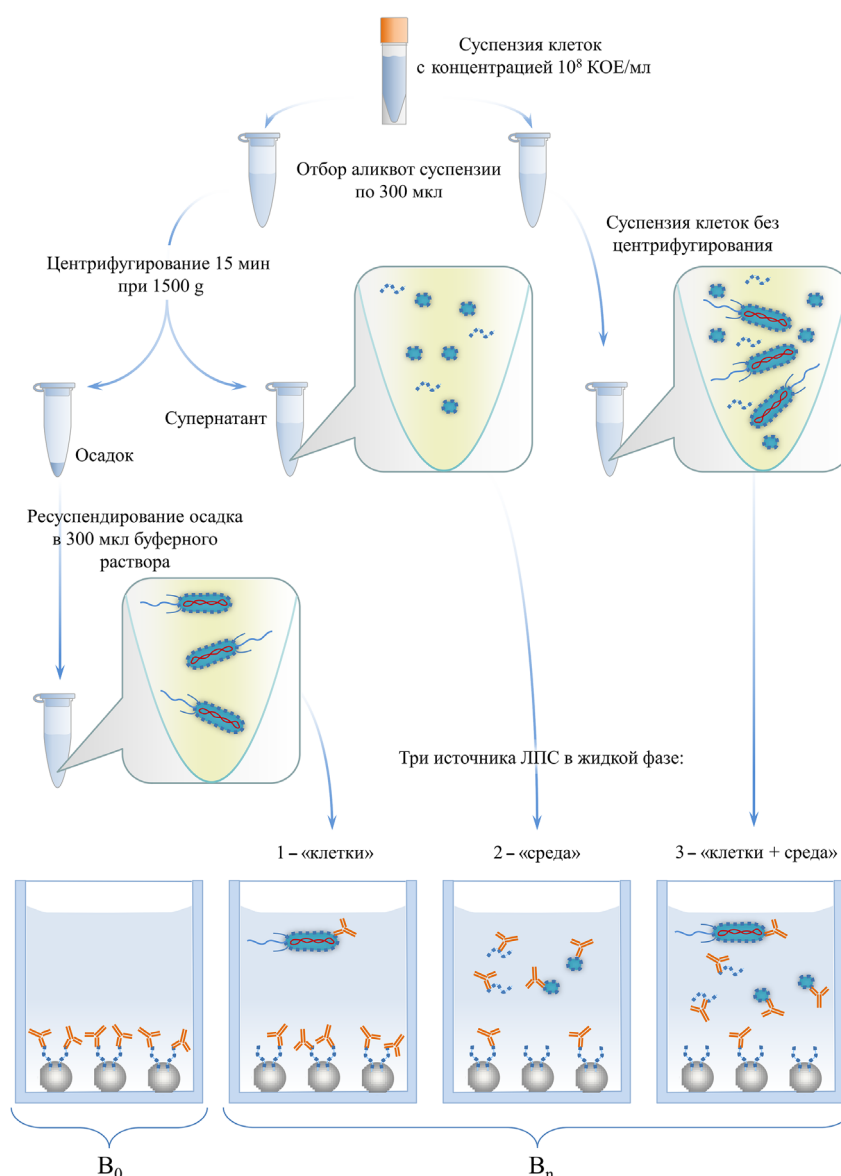


Рис. 1. Схема проведения конкурентного ИФА сальмонелл и пробоподготовки, предшествующей анализу.

1–3 – биоматериал, используемый в качестве источника ЛПС

Fig. 1. Scheme of competitive ELISA of *Salmonella* and sample preparation. 1–3 – biomaterial used as a source of LPS

Таблица 2. Результаты определения ЛПС сальмонелл ( $B_n/B_0$ , %) в препаратах «среда» и «клетки» методом конкурентного ИФАTable 2. Results of detection of *Salmonella* LPS ( $B_n/B_0$ , %) in “medium” and “cell” preparations by competitive ELISA

Сальмонелла (серотип)	Антитело и анализируемый биоматериал			
	MAT 5D12A		MAT 10D9H	
	«среда»	«клетки»	«среда»	«клетки»
<i>S. derby</i> (B)	17,43	70,41	17,05	73,85
<i>S. typhimurium</i> (B)	19,91	83,07	26,97	90,40
<i>S. typhimurium</i> SL7207 (B)	22,93	61,69	32,21	87,22
<i>S. newport</i> (C)	15,34	71,80	93,66*	96,88*
<i>S. enteridis</i> (D)	20,76	72,49	23,98	81,02
<i>S. london</i> (E)	19,13	81,21	94,37*	97,86*

Примечание. \* – концентрация ЛПС в каждом препарате «среда» и «клетки» соответствует концентрации бактерий  $1 \cdot 10^8$  КОЕ/мл.

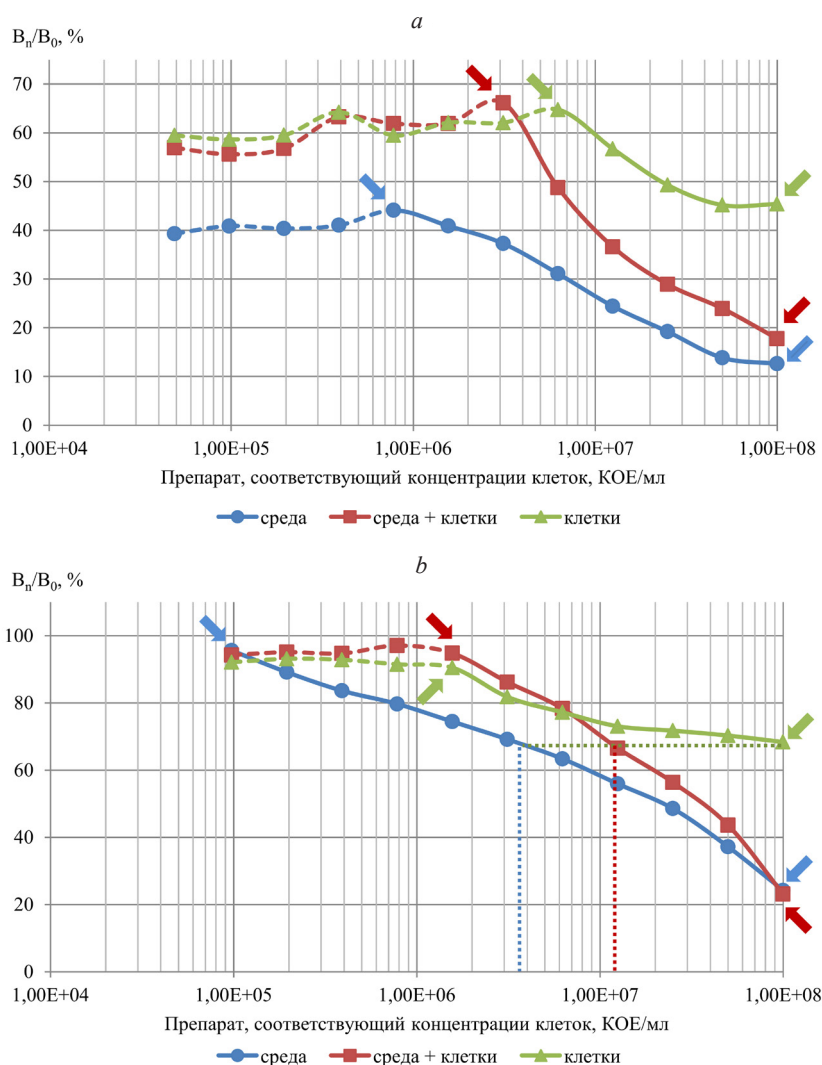


Рис. 2. Калибровочные графики конкурентного ИФА сальмонелл, основанного на использовании МАb 5D12A, специфичного к кору; *a* и *b* – концентрации МАb 5D12A 350 нг/мл и 1500 нг/мл соответственно. Использован штамм VII, *S. typhimurium* SL7207. Стрелками обозначен рабочий диапазон каждого калибровочного графика

Fig. 2. Calibration graphs of competitive ELISA of *Salmonella* based on using core-specific MAб 5D12A; *a* and *b* – concentrations of MAб 5D12A equal to 350 ng/mL and 1500 ng/mL, respectively. *S. typhimurium* SL7207 (strain VII) was used. The arrows indicate the working range of each calibration curve



Рис. 2 иллюстрирует важный методический аспект, а именно необходимость тщательного выбора концентрации МАТ в связи с существенным влиянием этого показателя на параметры калибровочного графика (табл. 3). Оптимальной является концентрация МАТ 5D12A, равная 1500 нг/мл (рис. 2, *b*).

Как видно из данных табл. 3, увеличение концентрации МАТ 5D12A в 4 раза (350–1500 нг/мл в окончательном объеме жидкости в лунке) приводит к смещению нижней границы рабочего диапазона (в 8 и 2 раза для препаратов «среда» и «среда + клетки» соответственно), расширяя его.

Таблица 3. Зависимость параметров калибровочного графика от концентрации МАТ 5D12A

Table 3. Dependence of the parameters of the calibration graph on the concentration of MAb 5D12A

Препарат	Концентрация МАТ 5D12A			
	1500 нг/мл		350 нг/мл	
	нижняя граница рабочего диапазона	$V_n/V_0$ , %, где $V$ соответствует $10^8$ КОЕ/мл	нижняя граница рабочего диапазона	$V_n/V_0$ , %, где $V$ соответствует $10^8$ КОЕ/мл
«среда»	$10^5$	23	$8 \cdot 10^5$	17,8
«среда + клетки»	$1,5 \cdot 10^6$	24	$3 \cdot 10^6$	12,6

При этом изменяется параметр  $V_n/V_0$ , %, соответствующий минимальной значимой концентрации клеток, в сторону увеличения, что придает нормальный вид калибровочному графику. Так,  $V_n/V_0 = 44$  % (рис. 2, *a*) и  $V_n/V_0 = 95$  % (рис. 2, *b*) для обозначенных синей стрелкой точек графиков, соответствующих нижней границе рабочего диапазона в случае препарата «среда». По мере увеличения концентрации МАТ 5D12A значение  $V_0$  и параметр  $V_n/V_0$ , %, соответствующий максимальной концентрации биоматериала, увеличиваются незначительно, и это показывает, что выбор оптимальной концентрации МАТ нельзя осуществлять на основе определения только этих критериев, как это делают по традиции.

Аналитическую чувствительность тест-системы (минимальную концентрацию бактериальных клеток (в КОЕ/мл), которую можно обнаружить с помощью данного теста) определяли графически в координатах ось  $OX$  ( $OP_{450}$ ), ось  $OY$  – концентрация клеток (КОЕ/мл) с использованием значения  $3SD$ , рассчитанного, как указано в разделе «Материалы и методы».

Аналитическая чувствительность тест-системы на основе МАТ 5D12A составляет  $2,3 \cdot 10^5$  КОЕ/мл и  $2,9 \cdot 10^6$  КОЕ/мл для препаратов «среда» и «среда + клетки» соответственно. Сравнение значений позволяет считать, что именно препарат «среда» должен быть использован в качестве анализируемого биоматериала при создании коммерческого набора реагентов для детекции сальмонелл в продуктах питания. Традиционная процедура пробоподготовки при этом дополняется стадией осаждения клеток центрифугированием при ускорении 800 g непосредственно после лишения их жизнеспособности нагреванием.

Корреляция значений двух массивов данных, соответствующих значениям параметра  $V_n/V_0$ , %, рассчитанных для препарата «среда» и для традиционно используемого в коммерческих наборах реагентов препарата «среда + клетки», составляет 94 %. Для сравнения: корреляция аналогичных массивов данных в парах препаратов «среда»–«клетки» и «среда + клетки»–«клетки» составляет 49 и 59 % соответственно. Эти данные являются дополнительным аргументом в пользу использования препарата «среда» в качестве анализируемого биоматериала при создании коммерческого набора реагентов.

На рис. 3 представлены калибровочные графики, полученные с использованием МАТ 10D9H к O-антигену.

Основные параметры калибровочного графика, построенного на основе препарата «среда» при оптимальной концентрации МАТ 10D9H (рис. 3), соответствуют таковым, полученным при оптимальной концентрации МАТ 5D12A (табл. 3). Нижняя граница рабочего диапазона соответствует  $10^5$  («среда») и  $8 \cdot 10^5$  («среда + клетки»).

Аналитическую чувствительность тест-системы на основе МАТ 10D9H определяли экспериментально и рассчитывали подобно тому, как указано выше для МАТ 5D12A. Значения аналитической чувствительности равны  $2,4 \cdot 10^5$  КОЕ/мл («среда») и  $3,1 \cdot 10^6$  КОЕ/мл («среда + клетки»).

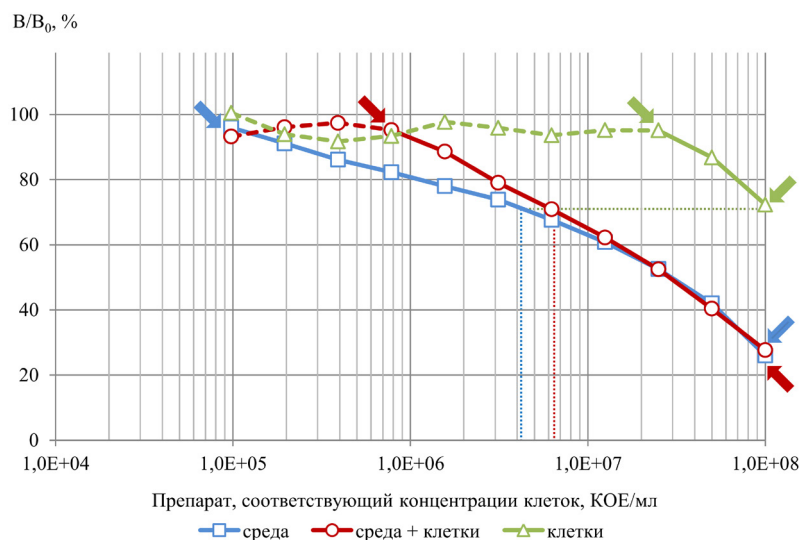


Рис. 3. Калибровочные графики конкурентного ИФА сальмонелл, основанного на использовании МАТ 10D9Н, специфичного О-антигену. Концентрация МАТ 10D9Н – 20 нг/мл. Использован штамм VII, *S. typhimurium* SL7207. Стрелками обозначен рабочий диапазон каждого калибровочного графика

Fig. 3. Calibration graphs of competitive ELISA of *Salmonella* based on using a BSA-LPS conjugate immobilized on the solid phase and MAb 10D9H in the liquid phase. *S. typhimurium* SL7207 (strain VII) was used. MAb 10D9H concentration is 20 ng/ml. The arrows indicate the working range of each calibration curve

После оптимизации условий ИФА возникает возможность количественно сравнить содержание ЛПС в препаратах «среда» и «клетки». С этой целью использовали калибровочные графики, представленные на рис. 2, *b* и рис. 3. Через точку графика, построенного для препарата «клетки», со значением ОХ, равным  $10^8$  КОЕ/мл, проводили линию, параллельную оси ОХ и пересекающую графики «среда» и «среда + клетки». Из точек пересечения линий с соответствующими графиками опускали перпендикуляры на ось ОХ. Получили значения  $3,5 \cdot 10^6$  КОЕ/мл («среда») и  $1,1 \cdot 10^7$  КОЕ/мл («среда + клетки») (рис. 2, *b*), а также  $4 \cdot 10^6$  («среда») и  $7 \cdot 10^6$  («среда + клетки») (рис. 3). Как видим, содержание ЛПС в клетках составляет менее 10 % от такового в среде, что объясняет данные, представленные в табл. 2.

Таким образом, мы создали конструкции двух тест-систем (на основе МАТ 5D12А и МАТ 10D9Н) для количественного определения сальмонелл в продуктах питания посредством конкурентного ИФА ЛПС, секретированного бактериями в среду. Калибровочные графики представлены на рис. 4. Аналитическая чувствительность для каждой из тест-систем соответствует  $\sim 10^5$  КОЕ/мл.

**Закключение.** Методом ИФА с использованием коммерческого МАТ 5D12А (к кору ЛПС) или МАТ 10D9Н (к общему эпитопу О-антигена сальмонелл серогрупп А, В и D) показано, что в культуре сальмонелл, полученной в ходе пробоподготовки, традиционно используемой в коммерческих наборах реагентов для анализа этих бактерий в продуктах питания, ЛПС присутствует главным образом в среде. В клетках содержание ЛПС, способного к взаимодействию с МАТ, составляет менее 10 % от такового в среде.

Установлено, что дополнение стандартной процедуры пробоподготовки центрифугированием с целью отделения бактерий от среды и последующий анализ именно среды позволяют улучшить параметры тест-системы, а именно расширить рабочий диапазон в сторону более низких концентраций ЛПС и повысить аналитическую чувствительность.

Показано, что иммобилизация в лунках микропланшетного иммуносорбента конъюгата БСА-ЛПС позволяет получить более однородное покрытие, чем иммобилизация ЛПС как такового. Ориентация ЛПС на твердой фазе является рН-зависимой.

Созданы конструкции двух тест-систем для детекции сальмонелл в продуктах питания методом конкурентного ИФА ЛПС, секретированного бактериями в культуральную среду. В каждой

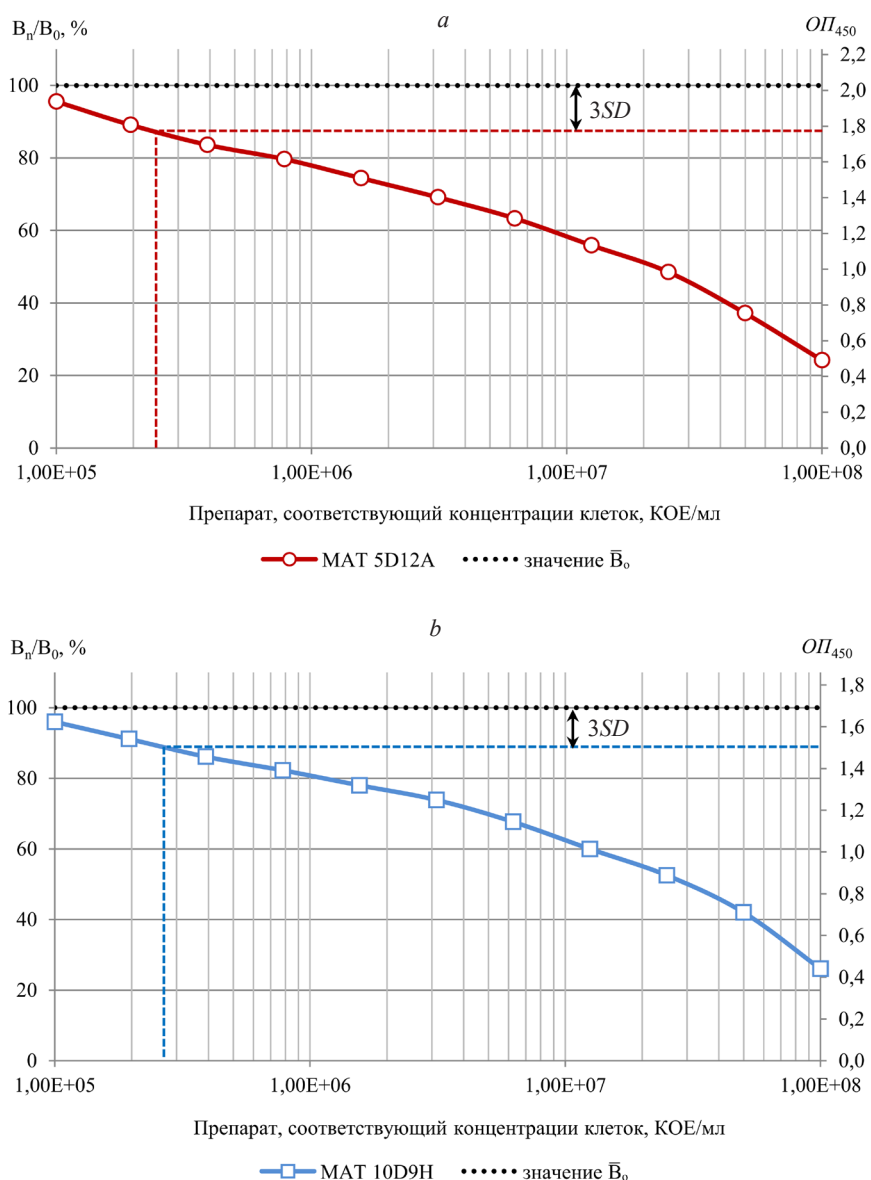


Рис. 4. Калибровочные графики конкурентного ИФА ЛПС, секретированного бактериями в культуральную среду.

Использовали иммобилизованный на твердой фазе конъюгат БСА-ЛПС, находящиеся в жидкой фазе MAT 5D12A (a) или MAT 10D9H (b) и *S. typhimurium* SL7207 (VII)

Fig. 4. Calibration graphs of competitive ELISA for LPS secreted by bacteria into the culture medium. We used the BSA-LPS conjugate immobilized on the solid phase, MAб 5D12A (a) or MAб 10D9H (b) in the liquid phase, and *S. typhimurium* SL7207 (VII)

тест-системе на твердой фазе иммобилизован конъюгат БСА-ЛПС, а пробоподготовка включает осаждение клеток бактерий центрифугированием. Тест-системы отличаются антителами (MAT 5D12A, специфичное к кору ЛПС, или MAT 10D9H, специфичное к общему эпитопу О-антигена сальмонелл серогрупп А, В и D), находящимися в жидкой фазе. Чувствительность анализа для каждой из тест-систем соответствует  $10^5$  КОЕ/мл. Тест-система на основе MAT 5D12A имеет преимущество, а именно позволяет детектировать все сальмонеллы независимо от серотипа.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Благодарности.** Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект РНФ-БРФФИ X23РНФ-185).

**Acknowledgements.** This work was financially supported by the Belarusian Republican Foundation for Basic Research (RNF-BRFFR project X23RNF-185).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Characteristics of non-typhoidal *Salmonella* gastroenteritis in Taiwanese children: a 9-year period retrospective medical record review / Y.-T. Hung, C.-J. Lay, C.-L. Wang, M. Koo // *Journal of Infection and Public Health*. – 2017. – Vol. 10, N 5. – P. 518–521. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.09.018>
2. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. isolated from poultry: A global overview / R. E. Castro-Vargas, M. P. Herrera-Sánchez, R. Rodríguez-Hernández, I. S. Rondón-Barragán // *Veterinary World*. – 2020. – Vol. 13, N 10. – P. 2070–2084. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2070-2084>
3. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods / R. Podolak, E. Enache, W. Stone [et al.] // *Journal of Food Protection*. – 2010. – Vol. 73, N 10. – P. 1919–1936. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.10.1919>
4. Epidemiology, pathogenesis, genosero-typing, antimicrobial resistance, and prevention and control of non-typhoidal *Salmonella* serovars / G. Arya, R. Holtzlander, J. Robertson [et al.] // *Current Clinical Microbiology Reports*. – 2017. – Vol. 4. – P. 43–53. <https://doi.org/10.1007/s40588-017-0057-7>
5. *Salmonella* nomenclature / F. W. Brenner, R. G. Villar, F. J. Angulo [et al.] // *Journal of clinical microbiology*. – 2000. – Vol. 38, N 7. – P. 2465–2467. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.7.2465-2467.2000>
6. Popoff, M. Y. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision / M. Y. Popoff, L. Le Minor // *World Health Organization, Collaborating Centre of Reference and Research on Salmonella Institute Pasteur*. – Paris, France. 1997.
7. Characteristic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* from gastroenteritis / Y. Luo, W. Yi, Y. Yao [et al.] // *The Journal of Infection and Chemotherapy*. – 2018. – Vol. 24, N 4. – P. 251–255. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2017.11.003>
8. Advancement in *Salmonella* detection methods: from conventional to electrochemical-based sensing detection / M. S. Awang, Y. Bustami, H. H. Hamzah [et al.] // *Biosensors*. – 2021. – Vol. 11, N 9. – Art. 346. <https://doi.org/10.3390/bios11090346>
9. NF VALIDATION, Validation of alternative analysis methods – application to foodstuffs (NF102). List valid on 11<sup>th</sup> March-2024. – Iss. on 18-12-2023. – 77 p. – URL: <https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2024/03/List-valid-2024-03-11.pdf> (date of access: 09.12.2024).
10. Cox, N. A. *Salmonella* methodology update / N. A. Cox // *Poultry Science*. – 1988. – Vol. 67, N 6. – P. 921–927. <https://doi.org/10.3382/ps.0670921>
11. Detecting non-typhoid *Salmonella* in humans by ELISAs: a literature review / K. G. Kuhn, G. Falkenhorst, T. N. Ceper [et al.] // *Journal of Medical Microbiology*. – 2012. – Vol. 61, N 1. – P. 1–7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034447-0>
12. Production of recombinant flagellin to develop ELISA-based detection of *Salmonella enteritidis* / S. A. Mirhosseini, A. A. Fooladi, J. Amani, H. Sedighian // *Brazilian journal of microbiology*. – 2017. – Vol. 48, N 4. – P. 774–781. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.033>
13. Gold nanoparticle-based strip sensor for multiple detection of twelve *Salmonella* strains with a genus-specific lipopolysaccharide antibody / W. Wang, L. Liu, S. Song [et al.] // *Science China Materials*. – 2016. – Vol. 59. – P. 665–674. <https://doi.org/10.1007/s40843-016-5077-0>
14. Monoclonal antibody-based cross-reactive sandwich ELISA for the detection of *Salmonella* spp. in milk samples / X. Wu, W. Wang, L. Liu [et al.] // *Analytical Methods*. – 2015. – Vol. 7, N 21. – P. 9047–9053. <https://doi.org/10.1039/c5ay01923k>
15. The discovery of the role of outer membrane vesicles against bacteria / S. Combo, S. Mendes, K. M. Nielsen [et al.] // *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, N 10. – Art. 2399. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102399>
16. Schwegheimer, C. Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria / C. Schwegheimer, C. J. Sullivan, M. J. Kuehn // *Biochemistry*. – 2013. – Vol. 52, N 18. – P. 3031–3040. <https://doi.org/10.1021/bi400164t>
17. Schwegheimer, C. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions / C. Schwegheimer, M. J. Kuehn // *Nature Reviews Microbiology*. – 2015. – Vol. 13. – P. 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>
18. Outer membrane vesicles of Gram-negative bacteria: an outlook on biogenesis / E. D. Avila-Calderón, M. D. S. Ruiz-Palma, Ma. G. Aguilera-Arreola [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – Vol. 12. – Art. 557902. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557902>
19. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria / S. Roier, F. G. Zingl, F. Cakar [et al.] // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – Art. 10515. <https://doi.org/10.1038/ncomms10515>
20. Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* / S. Re-zania, N. Amirmozaffari, B. Tabarraei [et al.] // *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. – 2011. – Vol. 3, N 1. – P. 3–9.
21. Al-AAlim, A. M. Extraction and purification of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (local isolate) and study its pyrogenic activity / A. M. Al-AAlim, A. A. Al-ledani, M. A. Hamad // *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. – 2022. – Vol. 36, N 1. – P. 45–51. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2021.128963.1614>
22. Westphal, O. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure / O. Westphal, K. Jann // *Methods in Carbohydrate Chemistry*. – 1965. – Vol. 5. – P. 83–91.
23. Sarmikasoglou, E. Ruminant lipopolysaccharides analysis: uncharted waters with promising signs / E. Sarmikasoglou, A. P. Faciola // *Animals (Basel)*. – 2021. – Vol. 11, N 1. – Art. 195. <https://doi.org/10.3390/ani11010195>
24. Количественное определение липополисахарида *B. pertussis* / М. Р. Назиров, А. В. Поддубиков, В. Г. Кукес [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2021. – Т. 172, № 12. – С. 716–718.
25. Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin / W. Richter, V. Vogel, J. Howe [et al.] // *Innate Immunity*. – 2010. – Vol. 17, N 5. – P. 427–438. <https://doi.org/10.1177/1753425910372434>

26. Heterogeneity of lipopolysaccharide as source of variability in bioassays and LPS-binding proteins as remedy / A. C. Fux, C. C. Melo, S. Michelini [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – Art. 8395. <https://doi.org/10.3390/ijms24098395>
27. Gorman, A. Lipopolysaccharide structure and the phenomenon of low endotoxin recovery / A. Gorman, A. P. Golovanov // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2022. – Vol. 180. – P. 289–230. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.10.006>
28. Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity / K. Brandenburg, H. Mayer, M. N. J. Koch [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. – 1993. – Vol. 218. – P. 555–563. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18409.x>
29. Masking of endotoxin in surfactant samples: Effects on *Limulus*-based detection systems / J. Reich, P. Lang, H. Grallert, H. Motschmann // *Biologicals*. – 2016. – Vol. 44, N 5. – P. 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.04.012>
30. Low endotoxin recovery – masking of naturally occurring endotoxin / J. Reich, F. A. Weyer, H. Tamura [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20, N 4. – Art. 838. <https://doi.org/10.3390/ijms20040838>
31. Biological activity of masked endotoxin / H. Schwarz, J. Gornicec, T. Neuper [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – Art. 44750. <https://doi.org/10.1038/srep44750>
32. Lerouge, I. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant microbe interactions / I. Lerouge, J. Vanderleyden // *FEMS Microbiology Reviews*, – 2001. – Vol. 26, N 1. – P. 17–47. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00597.x>
33. Whitfield, C. Lipopolysaccharide O-antigens – bacterial glycans made to measure / C. Whitfield, M. W. Danielle, S. D. Kelly // *Journal of Biological Chemistry*. – 2020. – Vol. 295, N 31. – P. 10593–10609. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev120.009402>
34. Rice, A. Atomistic scale effects of lipopolysaccharide modifications on bacterial outer membrane defenses / A. Rice, J. Wereszczynski // *Biophysical Journal*. – 2018. – Vol. 114, N 6. – P. 1389–1399. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.006>

## References

1. Hung Y.-T., Lay C.-J., Wang C.-L., Koo M. Characteristics of non-typhoidal *Salmonella* *astroenteritis* in Taiwanese children: a 9-year period retrospective medical record review. *Journal of Infection and Public Health*, 2017, vol. 10, no. 5, pp. 518–521. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.09.018>
2. Castro-Vargas R. E., Herrera-Sánchez M. P., Rodríguez-Hernández R., Rondón-Barragán I. S. Antibiotic resistance in *Salmonella* spp. Isolated from poultry: A global overview. *Veterinary World*, 2020, vol. 13, no. 10, pp. 2070–2084. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.2070-2084>
3. Podolak R., Enache E., Stone W., Black D. G., Elliott P. H. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal of Food Protection*, 2010, vol. 73, no. 10, pp. 1919–1936. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.10.1919>
4. Arya G., Holtslander R., Robertson J., Yoshida C., Harris J., Parmley J., Nichani A., Johnson R., Poppe C. Epidemiology, pathogenesis, genoserotyping, antimicrobial resistance, and prevention and control of non-typhoidal *Salmonella* serovars. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2017, vol. 4, pp. 43–53. <https://doi.org/10.1007/s40588-017-0057-7>
5. Brenner F. W., Villar R. G., Angulo F. J., Tauxe R., Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. *Journal of clinical microbiology*. 2000, vol. 38, no. 7, pp. 2465–2467. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.7.2465-2467.2000>
6. Popoff M. Y., Le Minor L. *Antigenic Formulas of the Salmonella Serovars, 7th Revision, 1997*. W. H. O. Collaborating Centre of Reference and Research on Salmonella Institute Pasteur, Paris, France.
7. Luo Y., Yi W., Yao Y., Zhu N., Qin P. Characteristic diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella* from gastroenteritis. *The Journal of Infection and Chemotherapy*, 2018, vol. 24, no. 4, pp. 251–255. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2017.11.003>
8. Awang M. S., Bustami Y., Hamzah H. H., Zambry N. S., Najib M. A., Khalid M. F., Aziah I., Manaf A. A. Advancement in *Salmonella* detection methods: from conventional to electrochemical-based sensing detection. *Biosensors*, 2021, vol. 11, no. 9, art. 346. <https://doi.org/10.3390/bios11090346>
9. NF VALIDATION, Validation of alternative analysis methods – application to foodstuffs (NF102). List valid on 11<sup>th</sup> March-2024. Iss. on 18-12-2023. 77 p. Available at: <https://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2024/03/List-valid-2024-03-11.pdf> (accessed 09.12.2024).
10. Cox N. A. *Salmonella* methodology update. *Poultry Science*, 1988, vol. 67, no. 6, pp. 921–927. <https://doi.org/10.3382/ps.0670921>
11. Kuhn K. G., Falkenhorst G., Ceper T. H., Dalby T., Ethelberg S., Mølbak K., Krogfelt K. A. Detecting non-typhoid *Salmonella* in humans by ELISAs: a literature review. *Journal of Medical Microbiology*, 2012, vol. 61, no. 1, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034447-0>
12. Mirhosseini S. A., Fooladi A. A., Amani J., Sedighian H. Production of recombinant flagellin to develop ELISA-based detection of *Salmonella enteritidis*. *Brazilian journal of microbiology*, 2017, vol. 48, no. 4, pp. 774–781. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.033>
13. Wang W., Liu L., Song S., Xu L., Kuang H., Zhu J., Xu C. Gold nanoparticle-based strip sensor for multiple detection of twelve *Salmonella* strains with a genus-specific lipopolysaccharide antibody. *Science China Materials*, 2016, vol. 59, pp. 665–674. <https://doi.org/10.1007/s40843-016-5077-0>
14. Wu X., Wang W., Liu L., Kuang H., Xu C. Monoclonal antibody-based cross-reactive sandwich ELISA for the detection of *Salmonella* spp. in milk samples. *Analytical Methods*, 2015, vol. 7, no. 21, pp. 9047–9053. <https://doi.org/10.1039/c5ay01923k>

15. Combo S., Mendes S., Nielsen K. M., da Silva G. J., Domingues S. The discovery of the role of outer membrane vesicles against bacteria. *Biomedicines*, 2022, vol. 10, no. 10, art. 2399. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10102399>
16. Schwegheimer C., Sullivan C. J., Kuehn M. J. Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria. *Biochemistry*, 2013, vol. 52, no. 18, pp. 3031–3040. <https://doi.org/10.1021/bi400164t>
17. Schwegheimer C., Kuehn M. J. Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, vol. 13, pp. 605–619. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>
18. Avila-Calderón E. D., Ruiz-Palma M. D. S., Aguilera-Arreola Ma. G., Velázquez-Guadarrama N., Ruiz E. A., Gomez-Lunar Z., Witonsky S., Contreras-Rodríguez A. Outer membrane vesicles of Gram-negative bacteria: an outlook on biogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 2021, vol. 12, art. 557902. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557902>
19. Roier S., Zingl F. G., Cakar F., Durakovic S., Kohl P., Eichmann T. O., Klug L., Gadermaier B., Weinzerl K., Prassl R., Lass A., Daum G., Reidl G., Feldman M. F., Schild S. A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nature Communications*, 2016, vol. 7, art. 10515. <https://doi.org/10.1038/ncomms10515>
20. Rezania S., Amirmozaffari N., Tabarraei B., Jeddi-Tehrani M., Zarei O., Alizadeh R., Masjedian F., Zarnani A. H. Extraction, purification and characterization of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2011, vol. 3, no. 1, pp. 3–9.
21. Al-Aalim A. M., Al-Iedani A. A., Hamad M. A. Extraction and purification of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (local isolate) and study its pyrogenic activity. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 2022, vol. 36, no. 1, pp. 45–51. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2021.128963.1614>
22. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1965, vol. 5, pp. 83–91.
23. Sarmikasoglou E., Faciola A. P. Ruminant lipopolysaccharides analysis: uncharted waters with promising signs. *Animals (Basel)*, 2021, vol. 11, no. 1, art. 195. <https://doi.org/10.3390/ani11010195>
24. Nazirov M. R., Poddubikov A. V., Kukes V. G., Sidorov N. G., Parfenova O. K. Quantitative determination of *B. pertussis* lipopolysaccharide. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 2021, vol. 12, pp. 716–718 (in Russian).
25. Richter W., Vogel V., Steiniger F., Brauser A., Koch M. H. J., Roessle M., Gutschmann T., Garidel P., Mäntele W., Brandenburg K. Morphology, size distribution, and aggregate structure of lipopolysaccharide and lipid A dispersions from enterobacterial origin. *Innate Immunity*, 2010, vol. 17, no. 5, pp. 427–438. <https://doi.org/10.1177/1753425910372434>
26. Fux A. C., Melo C. C., Michelini S., Swartzwelter B. J., Neusch A., Italiani P., Himly M. Heterogeneity of lipopolysaccharide as source of variability in bioassays and LPS-binding proteins as remedy. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 24, art. 8395. <https://doi.org/10.3390/ijms24098395>
27. Gorman A., Golovanov A. P. Lipopolysaccharide structure and the phenomenon of low endotoxin recovery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2022, vol. 180, pp. 289–230. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.10.006>
28. Brandenburg K., Mayer H., Koch M. N. J., Weckesser J., Rietschel E. T., Seydel U. Influence of the supramolecular structure of free lipid A on its biological activity. *European Journal of Biochemistry*, 1993, vol. 218, pp. 555–563. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18409.x>
29. Reich J., Lang P., Grallert H., Motschmann H. Masking of endotoxin in surfactant samples: Effects on *Limulus*-based detection systems. *Biologicals*, 2016, vol. 44, no. 5, pp. 417–422. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.04.012>
30. Reich J., Weyer F. A., Tamura H., Nagaoka I., Motschmann H. Low endotoxin recovery – masking of naturally occurring endotoxin. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, vol. 20, no. 4, art. 838. <https://doi.org/10.3390/ijms20040838>
31. Schwarz H., Gornicec J., Neuper T., Parigiani M. A., Wallner M., Duschl A., Horejs-Hoeck J. Biological activity of masked endotoxin. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, art. 44750. <https://doi.org/10.1038/srep44750>
32. Lerouge I., Vanderleyden J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant microbe interactions. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, vol. 26, no. 1, pp. 17–47. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00597.x>
33. Whitfield C., Danielle M. W., Kelly S. D. Lipopolysaccharide O-antigens – bacterial glycans made to measure. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, vol. 295, no. 31, pp. 10593–10609. <https://doi.org/10.1074/jbc.rev120.009402>
34. Rice A., Wereszczynski J. Atomistic scale effects of lipopolysaccharide modifications on bacterial outer membrane defenses. *Biophysical Journal*, 2018, vol. 114, no. 6, pp. 1389–1399. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.006>

### Информация об авторах

Киселева Елена Павловна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220141, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: epkiseleva@iboch.by

Михайлопуло Константин Игоревич – ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: k.mikhailopulo@iboch.by

Свиридов Олег Васильевич – д-р хим. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sviridov@iboch.by

### Information about the authors

Elena P. Kiseleva – Ph. D. (Chem.), Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: epkiseleva@iboch.by

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

Oleg V. Sviridov – D. Sc. (Chem.), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sviridov@iboch.by