

Разработка и применение иммуномагнитных частиц на основе моноклональных антител для иммуноферментной детекции стафилококковых энтеротоксинов А и В в пищевых продуктах

А.Г.Шевяков, В.А.Яковлева, Е.А.Панферцев, Т.В.Решетняк, О.Н.Перовская, А.А.Болтунова, П.В.Соловьёв, Т.В.Фёдоров, А.Г.Королёва-Ушакова, С.Ф.Бикетов

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Московская область, Российская Федерация

Стафилококковые энтеротоксины А (SEA) и В (SEB), секретируемые коагулазоположительными бактериями *Staphylococcus aureus*, – известные этиологические агенты пищевых токсикоинфекций человека. При их детекции в пищевых продуктах важно устранять негативное влияние пищевой матрицы на специфичность и чувствительность используемой тест-системы. Целью данного исследования являлась разработка методики с использованием иммуномагнитной сепарации и иммуноферментного анализа для детекции стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах. Для решения поставленной задачи были получены моноклональные антитела, специфично взаимодействующие с SEA и SEB, на основе которых получены иммуномагнитные частицы для сепарации и концентрирования токсинов, разработана сэндвич-иммуноферментная тест-система для детекции токсинов. В результате удалось достигнуть ~80%-й извлекаемости энтеротоксинов после искусственной контаминации пищевых образцов с пределом детекции 10 нг на 100 г образца продукта.

Ключевые слова: стафилококковые энтеротоксины, *Staphylococcus aureus*, моноклональные антитела, иммуномагнитная сепарация, иммуноферментный анализ

Для цитирования: Шевяков А.Г., Яковлева В.А., Панферцев Е.А., Решетняк Т.В., Перовская О.Н., Болтунова А.А., Соловьёв П.В., Фёдоров Т.В., Королёва-Ушакова А.Г., Бикетов С.Ф. Разработка и применение иммуномагнитных частиц на основе моноклональных антител для иммуноферментной детекции стафилококковых энтеротоксинов А и В в пищевых продуктах. Бактериология. 2025; 10(4): 25–35. DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-25-35

Development and application of immunomagnetic particles based on monoclonal antibodies for enzyme-linked immunosorbent assay detection of staphylococcal enterotoxins A and B in food products

A.G.Shevyakov, V.A.Yakovleva, E.A.Panfertsev, T.V.Reshetnyak, O.N.Perovskaya, A.A.Boltunova, P.V.Solovyov, T.V.Fedorov, A.G.Koroleva-Ushakova, S.F.Biketov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Staphylococcal enterotoxins A (SEA) and B (SEB), secreted by coagulase-positive *Staphylococcus aureus*, are known etiologic agents of human foodborne illness. When detecting SEA and SEB in food products, it is important to eliminate the negative impact of the food matrix on the specificity and sensitivity of the test system used. The aim of this study was to develop a method using immunomagnetic separation and enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of staphylococcal enterotoxins in food products. To address this objective, monoclonal antibodies specifically interacting with SEA and SEB were obtained. These antibodies were used to produce immunomagnetic particles for the separation and concentration of toxins, and a sandwich

Для корреспонденции:

Шевяков Антон Георгиевич, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24

Телефон: (4967) 36-0147

E-mail: shevyakov@obolensk.org

ORCID: 0000-0002-0504-7073

Статья поступила 31.10.2025, принята к печати 25.12.2025

For correspondence:

Anton G. Shevyakov, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation

Phone: (4967) 36-0147

E-mail: shevyakov@obolensk.org

ORCID: 0000-0002-0504-7073

The article was received 31.10.2025, accepted for publication 25.12.2025

enzyme-linked immunosorbent assay system for toxin detection was developed. As a result, it was possible to achieve approximately 80% recovery of enterotoxins after artificial contamination of food samples with a detection limit of 10 ng per 100 g of product sample.

Key words: staphylococcal enterotoxins, *Staphylococcus aureus*, monoclonal antibodies, immunomagnetic separation, enzyme immunoassay

For citation: Shevyakov A.G., Yakovleva V.A., Panfertsev E.A., Reshetnyak T.V., Perovskaya O.N., Boltunova A.A., Solovyov P.V., Fedorov T.V., Koroleva-Ushakova A.G., Biketov S.F. Development and application of immunomagnetic particles based on monoclonal antibodies for enzyme-linked immunosorbent assay detection of staphylococcal enterotoxins A and B in food products. Bacteriology. 2025; 10(4): 25–35. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2025-4-25-35

Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) – спорообразующая неподвижная грамположительная коккобактерия. Относится к комменсальной микрофлоре человека, живущей на кожных покровах и слизистых. Является одним из самых распространенных патогенов. Патогенность *S. aureus* определяется способностью секретировать ряд белков, таких как металлопротеазы, α -гемолизин, стафилококковые энтеротоксины, токсин синдрома токсического шока, эксфолиативный токсин, лейкоцидин Пантона–Валентайна и некоторые другие белки. Энтеротоксины *S. aureus* (СЭТ) – широкая группа суперантигенов, обладающих высокой термостабильностью, приводящих к пищевым отравлениям с симптомами рвоты, болями в области кишечника, диареей, реже лихорадкой. В случае если популяция *S. aureus* достигает концентрации 10^4 КОЕ/мл(г) в продукте, она может продуцировать достаточное для отравления количество энтеротоксинов. Диапазон концентраций энтеротоксинов в пищевых продуктах, приводящих к развитию симптомов отравления, составляет 6–200 нг токсина на 1 г продукта в зависимости от его типа [1]. По оценкам, до 25% пищевых отравлений бактериальной природы ежегодно вызываются энтеротоксигенными *S. aureus* [2–4].

Для возникновения стафилококковой пищевой токсикоинфекции необходимо выполнение следующих условий: наличие источника инфекции, содержащего энтеротоксигенный штамм (сырые продукты, здоровые или больные носители); перенос бактерий от источника в пищевые продукты (несоблюдение гигиенических нормативов и практик); пищевые продукты, обеспечивающие благоприятные физико-химические условия для роста бактерий и накопления токсина (мясо, молочные продукты, овощи и пр.); температура и достаточное время для размножения патогена и накопления токсина; употребление контаминированной пищи, содержащей достаточное для возникновения симптомов отравления количество токсина. Руки персонала, работающего с пищевыми продуктами, являются наиболее частым источником контаминации [5].

Энтеротоксины стафилококков представляют собой группу из более чем 27 серологических типов белков различной степени сходства в структуре, функции и аминокислотной последовательности с молекулярной массой в диапазоне 19–30 кДа. Рвотное действие способны вызывать 19 из них. Первые пять энтеротоксинов – SEA, SEB, SEC, SED, и SEE – считаются классическими энтеротоксинами, способными вызывать пищевые отравления [6]. Важными особенностями СЭТ являются: термостабильность и кислотоустойчивость, стабильность после многократного замораживания и оттаивания, устойчивость к протеолитическим ферментам. Даже при условии полной элиминации бактериальных клеток

S. aureus в результате стерилизации активная форма СЭТ сохраняется и продукт продолжает представлять токсикологическую опасность.

Вследствие высокой эпидемиологической значимости СЭТ для их обнаружения предложены и разработаны разнообразные методы и подходы. Исторически первым является метод биопроб, где токсическое действие оценивается на животных. Данный метод обладает существенными недостатками в плане низкой чувствительности и специфичности, скорости получения результата, сложности в содержании животных и значительных индивидуальных вариациях. В настоящее время метод биопроб практически не применяется в рутинных исследованиях.

Молекулярно-генетические методы (полимеразная цепная реакция (ПЦР), полногеномное секвенирование, изотермическая амплификация) успешно применяются для детекции генов, кодирующих СЭТ в культурах *S. aureus* [7]. Тем не менее для успешного проведения анализа требуется выделение чистой культуры микроорганизма из образца. Кроме того, токсин сохраняется в продуктах и после элиминации жизнеспособных стафилококков [8].

Инструментальные методы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография и масс-спектрометрический анализ, позволяют с высокой чувствительностью (4–8 нг/г) и точностью определять биомолекулы, однако требуют сложного, дорогостоящего оборудования и высокой квалификации персонала [9]. Биосенсоры для детекции СЭТ используют антитела, аптамеры, молекулярно импринтированные полимеры, T-клеточные рецепторы и различные варианты преобразователей (оптические, электрохимические, пьезоэлектрические) [10]. Ford et al. предложили систему иммунохроматографической детекции на основе квантовых точек с приборной детекцией сигнала, обладающей пределом чувствительности на уровне 1,28 нг/мл для смыва с мясного продукта и 78 нг/мл для молока [11]. Для выделения токсина из сложной матрицы предложен метод твердофазной экстракции, позволяющий добиться чувствительности 0,025 нг/г SEA в образце обезжиренного молока объемом 60 мл [12].

Иммунологические методы (иммуноферментный анализ (ИФА), иммунофлуоресцентный анализ), использующие специфические антитела, отличаются простотой и скоростью постановки. Суть этих методов анализа заключается в специфическом взаимодействии молекулы иммуноглобулина с молекулой антигена. Основным типом используемых иммуноглобулинов является IgG. В зависимости от поставленной задачи возможно использование поликлональных и моноклональных антител (МКА). Применение МКА обычно обеспечивает большую специфичность и стандартизованность тест-систем. Однако иммунологические методы обла-

дают определенными ограничениями – чувствительны к примесям и некоторым компонентам анализируемой матрицы, обладают относительно низкой чувствительностью в сравнении с инструментальными методами.

В последние годы иммуномагнитная сепарация (ИМС) на основе магнитных частиц (МЧ), содержащих на поверхности химически связанные молекулы антител, находит все большее применение в диагностике патогенных микроорганизмов и их токсинов [13]. МЧ для сепарации обычно представляют из себя полимерные микросферы, состоящие из полистирола и включений оксида железа (III), обладающие суперпарамагнитными свойствами. Благодаря многофункциональной поверхности частиц они могут конъюгироваться с широким спектром лигандов, помимо антител. В отличие от обычного твердофазного иммуноанализа на микропланшете, МЧ обеспечивают существенно большую площадь рабочей поверхности для связывания аналита. Магнитоуправляемость обеспечивает возможность гомогенной дисперсии в исследуемом растворе при отсутствии магнитного поля и эффективной сепарации исследуемого аналита из сложной матрицы с одновременным концентрированием при наведении внешнего магнитного поля [14]. Таким образом удается убрать фоновую микрофлору, ингибиторы, механические примеси, другие виды загрязнений, негативно влияющие на последующий анализ. Важное преимущество иммуномагнитной сепарации – отсутствие необходимости в сложном оборудовании, достаточно обычного постоянного магнита. В то же время есть возможность автоматизировать процесс сепарации с использованием сложных роботизированных систем. Благодаря легкой масштабируемости можно подбирать объемы анализируемых образцов в широком диапазоне, в отличие от планшетного анализа, где объем образца ограничен вместимостью лунки. Успешное применение ИМС описано для детекции *Escherichia coli* O157:H7 [15], *Vibrio parahaemolyticus* [16], *Salmonella enteritidis* [17], вируса птичьего гриппа [18], *S. aureus* [19]. Коммерческие наборы для ИМС патогенных микроорганизмов производят фирмы Dynal (Норвегия), bioMérieux (Франция), VICAM (США).

В России процедура контроля СЭТ в пищевых продуктах описана в МУК 4.2.2429-08 на примере коммерческого ИФА-набора RIDASCREEN® SET Total (R-Biopharm, Германия). Согласно МУК тест-система должна обеспечивать диапазон обнаружения СЭТ 0,2–2,0 мкг/кг (0,2–2,0 нг СЭТ/г продукта) [20]. Международный стандарт ISO 19020:2017(E) предъявляет к используемым тест-системам требования по специфичности и чувствительности на уровне ≥90%, предел детекции LOD₅₀ должен быть не менее 0,06 нг СЭТ/г продукта, что соответствует 6 нг СЭТ в 100 г анализируемого образца. Примерно 6,1 нг SEA необходимо употребить для появления симптомов отравления на основе усредненных данных по 36 случаям. Особенностью предлагаемой в стандарте процедуры анализа является предварительное концентрирование анализируемого раствора на диализной мембране (6–8 кДа) с помощью ПЭГ-20000 в течение 18 ч [21]. Система VIDAS® SET2 (bioMérieux, Франция) использует ИФА с флуоресцентной детекцией и позволяет автоматизировать анализ для увеличения количества исследуемых образцов. Тем не менее чувствительность системы не одно-

родна и для некоторых типов пищевых продуктов не укладывается в требования ISO 19020:2017(E). Аналогичные проблемы характерны для систем Tecra VIA (3М, США) [22] и RIDASCREEN SET Total [8].

Таким образом, основным инструментом определения СЭТ при контроле продуктов питания является иммуноанализ с различными вариантами предварительной пробоподготовки.

Целью настоящего исследования являлось конструирование новых иммуномагнитных частиц и изучение возможности применения иммуномагнитной сепарации в качестве пробоподготовки для повышения эффективности определения стафилококковых энтеротоксинов А и В в пищевых продуктах.

Материалы и методы

Получение рекомбинантных SEA и SEB

Гены *sea* и *seb*, кодирующие синтез токсинов SEA и SEB, клонированы с помощью ПЦР из ДНК штаммов *S. aureus* 5 и *S. aureus* B-7903 соответственно. Праймеры для ПЦР-клонирования синтезированы и очищены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в ООО «Синтол», Москва (табл. 1).

В структуру ДНК рекомбинантных генов *sea* и *seb* включены сайты рестрикции NdeI и XhoI для клонирования в экспрессирующий вектор *pET32b* (Novagen, США). Полученные рекомбинантные конструкции содержат рамку считывания, включающую метку 6×His на С-концевом фрагменте, обеспечивающую возможность иммунодетекции и металлохелатной хроматографии синтезированного рекомбинантного белка.

Аmplификацию проводили при следующих условиях: денатурация при 95°C в течение 30 с, отжиг при 50°C в течение 30 с, элонгация при 72°C в течение 90 с, 30 циклов. Последняя стадия элонгации – 4 мин.

Рекомбинантными плазмидами pETSEA и pETSEB трансформировали штамм-продуцент *E. coli* BL21(DE3). Пилотную экспрессию рекомбинантных энтеротоксинов проводили в качалочных колбах объемом 750 мл. Для выделения рекомбинантных белков клетки *E. coli* BL21(DE3)-pETSEA и *E. coli* BL21(DE3)-pETSEB штаммов-продуцентов выращивали при температуре 37°C в жидкой аэрируемой среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) и 0,2% глюкозы. Индукцию экспрессии проводили при достижении оптической плотности культурального бульона A600 = 0,7 добавлением до 1 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Культивирование продолжали в течение 4 ч при 30°C. Клеточную суспензию после индукции центрифугировали при 7000 г в течение 10 мин при температуре 4°C.

Таблица 1. Праймеры для ПЦР клонирования генов *sea* и *seb*
Table 1. Primers for PCR cloning of the *sea* and *seb* genes

Праймер / Primer	Последовательность / Sequence	Продукт, п.о. / Product, base pairs
Fsea	5' - ttt ggc ata tga aaa aaa cag cat tta c-3'	774
Rsea	5' -tta act cga gac ttg tat ata aat ata tat c-3'	
Fseb	5' -ttaaggc ata tgt ata ata gat tat ttg ttt cac g-3'	801
Rseb	5' - ttaaggc tcg agc ttt ttc ttt gtc gta aga taa ac-3'	

Полученную биомассу ресуспендировали в лизирующем буферном растворе (20 мМ фосфата натрия pH 7,5, 500 мМ NaCl, 10 мМ имидазола, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF), 1 мг/мл лизоцима). Бактерии разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора при амплитуде 80% с импульсами 20 с и перерывом 30 с на льду. Полученный дезинтеграт центрифугировали при 12 000 г в течение 30 мин при температуре 4°C. Супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и наносили на 5 мл хроматографическую колонку HisTrap с сорбентом Ni-NTA. Промывку колонки проводили рабочим буферным раствором с 60 мМ имидазола. Элюирование рекомбинантных белков проводили градиентом имидазола 50–500 мМ в течение 30 мин на скорости 1 мл/мин. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и проводили рехроматографию на ионообменном сорбенте CM-сефароза (GE, США). Элюирование целевого белка проводили градиентом NaCl 0–500 мМ в рабочем буферном растворе. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и переводили в фосфатно-солевой буфер (ФСБ) гель-фильтрационной хроматографией на колонке с сефарозой G-25 (GE, США). Концентрацию полученного рекомбинантного белка определяли по методу с бигинхоиновой кислотой BCA (ThermoFisher, США).

Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и иммуноблоттинг

Денатурирующий гель-электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия образцов антигенов и иммуноблоттинг проводили по стандартной методике [23, 24] в камере Mini-PROTEAN Tetra cell (Bio-Rad, США).

Получение моноклональных антител

Для работы использовали полученные ранее рекомбинантные SEA и SEB. Работа с животными проводилась в соответствии с протоколом комиссии по биоэтике ФБУН ГНЦ ПМБ. Животные содержались в отдельных боксах по 5 особей при естественном освещении и свободном доступе к воде и питанию. Мышей линии balb/c иммунизировали подкожным введением эмульсий антигенов в полном адьюванте Фрейнда по 50 мкг на животное для праймирования. Бустериммунизации проводили с интервалом в 28 дней подкожным введением суспензии гидроксида алюминия с 20 мкг антигенов на животное. В дальнейшую работу брали животных с титром специфической сыворотки в ИФА с рекомбинантными СЭТ не менее 1:100 000.

Гибридизация

Наращивание миеломных клеток Sp2/0-Ag14 проводили в среде RDF (смесь 1:1 сред RPMI-1640 и DMEM/F-12 (Панэко, Россия)) с добавлением 10% ФБС (HyClone, США) в углекислотном инкубаторе при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Слияние миеломных клеток Sp2/0-Ag14 и спленоцитов иммунных мышей проводили по методике, описанной ранее [25]. После слияния суспензию клеток переносили в 96-луночные планшеты с селекционной средой и фидерным слоем перитонеальных макрофагов. После селекции гибридов и замены селекционной среды на ростовую RDF с 20% ФБС проводили проверку секреции и специфичности МКА гибридом-продуцентов методом непрямого твердофазного ИФА.

Клетки из лунок с интенсивной реакцией в ИФА клонировали методом лимитирующих разведений.

Наработка и очистка МКА

Клетки гибридом-продуцентов культивировали на питательной среде RDF с добавлением 10% ФБС в культуральных флаконах T-300 до концентрации клеток 5·10⁶/мл. Клетки и дебрис осаждали центрифугировали на 450 г в течение 5 мин. Белковую фракцию культуральной жидкости (КЖ) осаждали высаливанием сульфатом аммония 50% насыщения в течение 24 ч при температуре 4°C. Полученный осадок отделяли центрифугированием на 8000 г в течение 15 мин. Осадок растворяли в 100 мМ натрий-фосфатном буферном растворе pH 8,6 (ФБ). Вносили 1 мМ PMSF, 1 мМ ЭДТА, центрифугировали при 12 000 г в течение 15 мин. Супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и переводили в ФБ гель-фильтрационной хроматографией на сорбенте сефароза G-25 (GE, США).

Полученную белковую фракцию КЖ в ФБ наносили на хроматографическую колонку с белок А-сефарозой (BioToolomics, Англия) со скоростью 0,5 мл/мин. После промывки тремя колоночными объемами ФБ МКА элюировали с помощью 0,1 М цитратного буферного раствора pH 3,0 с последующей нейтрализацией элюата до pH 7 раствором 2 М NaOH. Элюат переводили в ФСБ pH 7,4 гель-фильтрационной хроматографией на сорбенте сефароза G-25. Специфическую активность очищенных МА проверяли с помощью твердофазного ИФА.

Биотинилирование МКА проводили гидроксисукцинимидным эфиром биотина [26]. Для этого к 1 мл раствора МКА с концентрацией 2 мг/мл добавляли 50 мкл раствора 5 мМ NHS-эфира биотина и инкубировали 1 ч при комнатной температуре в темноте. Затем остатки несвязавшегося эфира биотина убирали гель-фильтрационной хроматографией на сорбенте сефароза G-25. Рабочее разведение полученного конъюгата МКА-биотин определяли титрованием в непрямом ИФА с рекомбинантными СЭТ.

Иммуноферментный анализ

В работе использовали три вида ИФА – непрямой, конкурентный и сэндвич-ИФА.

Контроль способности МКА связываться с нативными токсинами проводили с помощью конкурентного ИФА. В работе использовали стерильные бульоны ВНИ, полученные после культивирования штаммов *S. aureus* в течение 24 ч. В лунки планшета для ИФА (Nunc, США) вносили по 100 мкл rSeA и rSeB с концентрацией 1000 нг/мл в 0,01 М карбонатном буфере pH 9,6 и инкубировали при температуре +4°C в течение 18 ч. Неспецифические места связывания лунок блокировали внесением 5%-го раствора сухого обезжиренного молока с инкубированием в течение 60 мин при температуре 37°C. Планшеты промывали ФСБ с 0,05% Твин-20 (ФСБ-Т) трижды, добавляли по 100 мкл стерильных бульонов *S. aureus*, в которых двукратным разведением титровали КЖ исследуемых гибридом с разведения 1:200 в ФСБ-Т, инкубировали в течение 60 мин. Планшет промывали трижды ФСБ-Т, добавляли по 100 мкл антимишинных кроличьих иммуноглобулинов, конъюгированных с пероксидазой хрена в рабочем разведении, инкубировали 60 мин. После промывки

вали планшет ФСБ-Т 5 раз и вносили по 100 мкл раствора пероксидазного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Реакцию останавливали через 5 мин. добавлением 50 мкл 1 М раствора H_2SO_4 . Результат учитывали на планшетном спектрофотометре Varioskan LUX (ThermoScientific, США) при $\lambda = 450$ нм.

Оптимизацию условий твердофазного непрямого и сэндвич-ИФА проводили в соответствии с рекомендациями [27, 28].

Конъюгирование МКА с магнитными наночастицами

Для карбоксилированных частиц использовали карбодимидный метод активации поверхности. На основе ранее полученных результатов оптимальное количество МКА для конъюгирования с МЧ составляет 10 мкг на мг МЧ. В микропробирку отбирали 400 мкл (100 мг) суспензии МЧ (СМР0600С, VDO, Китай) дважды промывали 1 мл буферного раствора MEST (0,1 М MES pH 6,0, 0,15 М NaCl, 0,1% Triton x-100). К отмытым частицам добавляли 200 мкл активирующего буферного раствора (10 мг/мл EDC в MEST), тщательно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре с постоянным перемешиванием в течение 30 мин. Активированные МЧ дважды отмывали на магнитном штативе буфером MEST и после ресуспендирования в 4 мл MEST переносили в центрифужную пробирку объемом 15 мл, после чего добавляли 1000 мкг МКА. Полученную смесь тщательно перемешивали и инкубировали при постоянном перемешивании при комнатной температуре 2 ч. Затем к суспензии МЧ добавляли раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) до конечной концентрации 0,05% и продолжали инкубировать 45 мин, после чего полученный конъюгат, далее обозначаемый как ИМЧ, трижды отмывали ФСБ-Т и переводили в 4 мл буферного раствора хранения (10 мМ трис-Cl pH 7,4, 1% БСА, 0,5% Твин-20, проклин 300 1%).

Для гидроксильных МЧ (VDO, Китай) первоначально поверхность активировали с помощью глицидилоксипропилтриэтоксисилана (ГОПТС) [26]. Аликвота МЧ отмывалась 97%-м раствором этанола. Готовился 2%-й раствор ГОПТС в 97%-м этаноле и МЧ инкубировали 2 ч с перемешиванием. Далее частицы отмывали трижды в ФСБ, после чего к отмытым частицам добавляли 1 мл МКА в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере pH 9,6 в концентрации 100 мкг/мл, инкубировали при комнатной температуре с перемешиванием 1 ч. Для инактивации свободных эпокси групп в пробирку добавляли по 0,1 мл 0,1 М этаноламина pH 9,0 и инкубировали еще 30 мин. Готовые ИМЧ трижды отмывали ФСБ-Т и ресуспендировали в буферном растворе хранения.

Иммуномагнитная сепарация энтеротоксинов

Подготовку проб жидких образцов проводили по рекомендации МУК 4.2.2429-08. Для имитации контаминирования СЭТ в образцы вносили 100; 10; 1; 0,1 нг SEA и SEB. Образец (25 мл молока) закисляли до pH 3,5–4,0 добавлением концентрированной соляной кислоты, выдерживали 10 мин и центрифугировали при 9000 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Супернатант переносили в новую пробирку, добавлением 5 М NaOH доводили pH до 7–8 и повторно центрифугировали при тех же условиях. К

полученному супернатанту добавляли ИМЧ. Процедуру ИМС проводили по ранее описанной методике [14]. К 25 мл супернатанта добавляли 50 мкл ИМЧ, инкубировали при комнатной температуре с перемешиванием в течение 60 мин. Осаждали ИМЧ в магнитном штативе и ресуспендировали в 1 мл ФСБ-Т, переносили в микропробирку. Осаждение и отмывку ИМЧ 1 мл ФСБ-Т повторяли дважды. Для элюции антигена ИМЧ ресуспендировали в 100 мкл ФСБ-Т и нагревали до 98°C в течение 10 мин. После осаждения ИМЧ супернатант использовали для постановки сэндвич-ИФА по описанной ранее методике.

Статистическая обработка результатов

Все эксперименты выполнены в трех повторах, данные приведены в формате «среднее значение \pm стандартное отклонение». Статистический анализ проводили в программах MS Excell, Graphpad Prism V10. Статистическую значимость различий групп данных оценивали с помощью t-теста Стьюдента и значение достоверности $p = 0,05$ использовали как критерий достоверности.

Результаты

Выделение рекомбинантных СЭТ

В результате трансформирования сконструированными рекомбинантными плазмидами получены штаммы-продуценты рекомбинантных энтеротоксинов А и В *E. coli* BI21(DE3)-pETSEA и *E. coli* BI21(DE3)-pETSEB. Проведено депонирование штаммов-продуцентов в Государственную коллекцию штаммов ФБУН ГНЦ ПМБ под номерами В-10838 (SEA) и В-10904 (SEB).

После оптимизации условий экспрессии и очистки получены препараты рекомбинантных СЭТ А и В с электрофоретической чистотой >90%, которые использовали для получения специфических мышиных МКА (рис. 1).

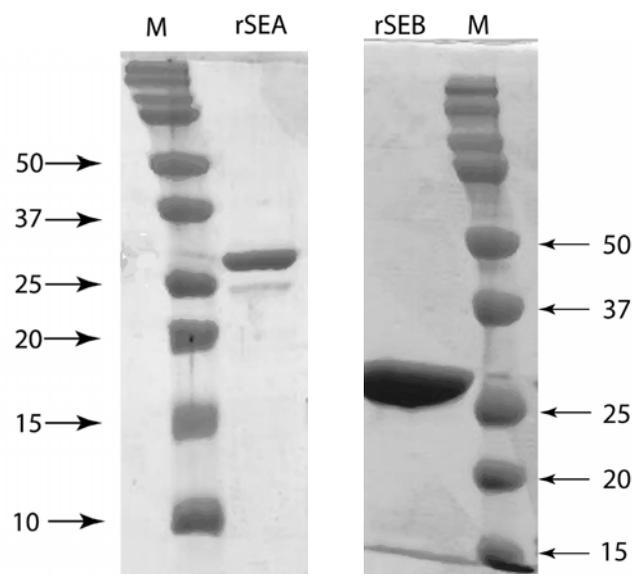


Рис. 1. SDS-PAGE препаратов рекомбинантных СЭТ с окраской кумасси: А) rSEA в 7,5%-м геле; В) rSEB в 12%-м геле. Маркеры молекулярного веса BioRad (США).

Fig. 1. SDS-PAGE of recombinant SET preparations with Coomassie staining of A. rSEA in 7.5% gel and B. rSEB in 12% gel. Molecular weight markers BioRad (USA).

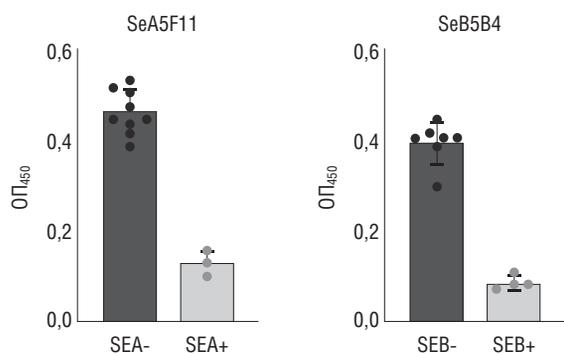


Рис. 2. Конкурентный ИФА для МКА SeA5F11 и SeB5B4 с бульонами *S. aureus*. ОП – оптическая плотность при $\lambda = 450$ нм.
 Fig. 2. Competitive ELISA for mAbs SeA5F11 and SeB5B4 with *S. aureus* broths. ОП – optical density at $\lambda = 450$ nm.

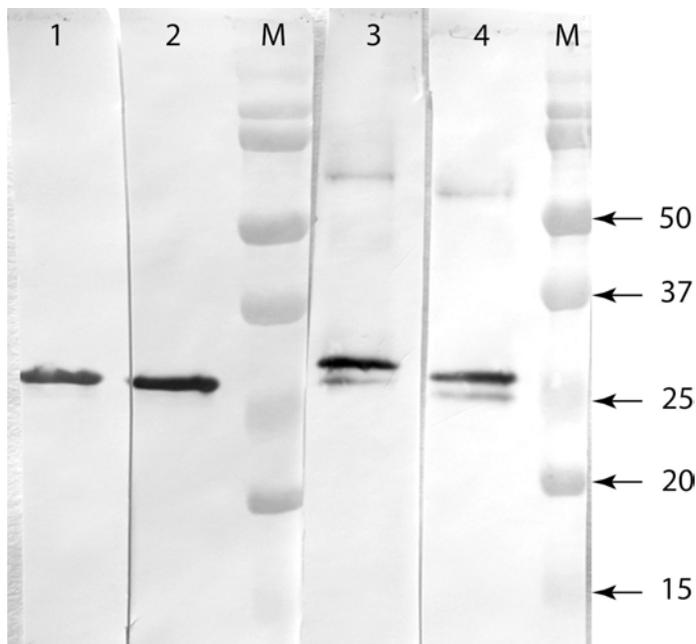


Рис. 3. Иммуноблот МКА с SEA и SEB: 1 – SeA5F11, 2 – SeA4G8, 3 – SeB5B4, 4 – SeB6G5, M – маркеры молекулярного веса (Bio-Rad, США).
 Fig. 3. Immunoblot of mAbs with SEA and SEB: 1 – SeA5F11, 2 – SeA4G8, 3 – SeB5B4, 4 – SeB6G5, M – molecular weight markers (Bio-Rad, USA).

Получение моноклональных антител

В результате серии последовательных бустер-иммунизации удалось добиться интенсивного гуморального ответа у экспериментальных животных. В конце эксперимента титр специфической сыворотки мышей превышал 1:100 000.

После слияния иммунных спленоцитов с миеломными клетками получено более 600 гибридом, растущих в селекционной среде. Из них 21 продуцировали МКА, специфично реагирующие с нативными СЭТ в конкурентном ИФА (рис. 2).

При получении специфических МКА к СЭТ необходимо учитывать возможную перекрестную реакцию для вариантов токсинов SEA/SEN и SEB/SEC. Полученные и отобранные для исследования МКА перекрестной реактивностью не обладают.

После наработки и очистки МКА проводили биотинилирование и проверку пар антител в сэндвич-ИФА. Среди исследованных МКА отобраны две пары, пригодные для разработ-

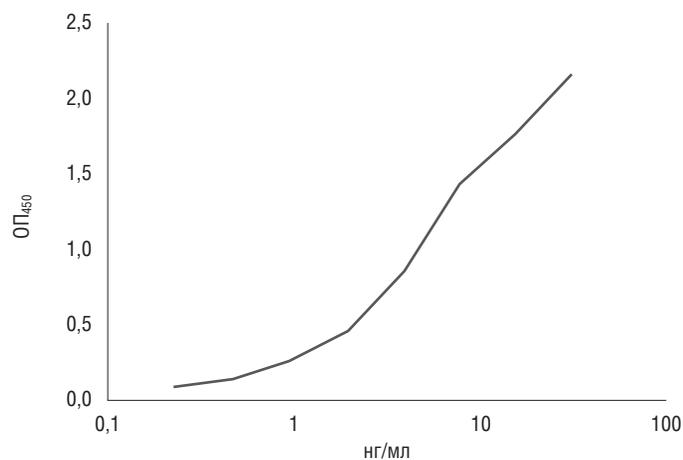
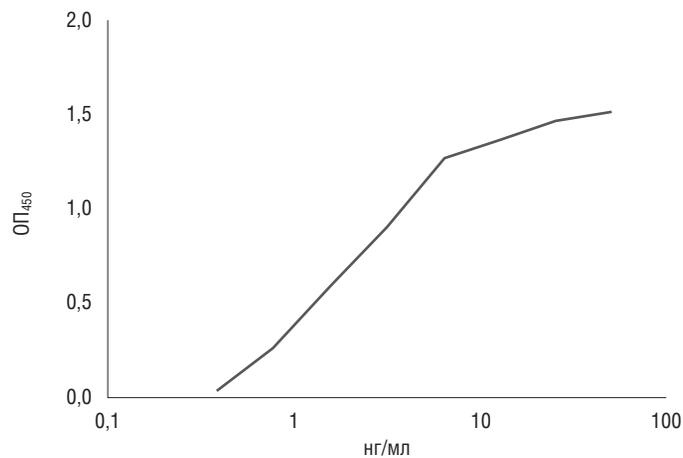


Рис. 4. Графики титровки СЭТ в сэндвич-ИФА после оптимизации условий для пар МКА: а) SeA5F11/SeA4G8-биотин; б) SeB6G5/SeB5B4-биотин. Приведены значения после вычитания поглощения в лунках с отрицательными контролями. ОП – оптическая плотность при $\lambda = 450$ нм.

Fig. 4. Titration graphs of SET in sandwich ELISA after optimization of conditions for pairs of mAbs a) SeA5F11/SeA4G8-biotin and b) SeB6G5/SeB5B4-biotin. Values are given after subtracting the absorbance in wells with negative controls. ОП – optical density at $\lambda = 450$ nm.

ки диагностических тест-систем на токсины SEA и SEB: SeA5F11 и SeA4G8, SeB5B4 и SeB6G5 (рис. 3).

Согласно полученным результатам, LOD₅₀ SEA для пары SeA5F11/SeA4G8 составляет 1 нг/мл, для пары SeB5B4/SeB6G5 – 0,5 нг/мл (рис. 4).

При исследовании стерильных бульонов, полученных после культивирования различных штаммов *S. aureus* в течение 24 ч, в сэндвич-ИФА получена полная корреляция результата анализа с генотипом токсигенности штамма (табл. 2).

Конъюгирование моноклональных антител с магнитными частицами

Один из самых распространенных методов иммобилизации аминокислотных лигандов на поверхности карбоксилированных частиц является карбодимидный (рис. 5). В результате реакции между молекулой МКА и поверхностью МЧ образуется стабильная амидная связь –CO-NH-. Реакция чувствительна к условиям, образующееся активное промежуточное соединение достаточно быстро гидролизует с потерей способности к конъюгированию.

Таблица 2. Значение ОП450 в сэндвич-ИФА для бульонов штаммов *S. aureus*
Table 2. OD450 value in sandwich ELISA for broths of *S. aureus* strains

№	Штамм / Strain	Генотип / Genotype	мАт SeA5F11/ SeA4G8	мАт SeB5B4/ SeB6G5
1	B-16306	sea, selk, selq	0,759 (0,07)	0,007
2	B-11903	sea	0,187 (0,06)	0,007
3	B-10049	seh	0,005	0,000
4	B-11895	sea	0,272 (0,06)	0,000
5	B-8476	seb, sep	0,000	2,258 (0,25)
6	B-15934	tox-	0,001	0,000
7	B-8776	sea, seb, seh	0,845 (0,16)	3,251 (0,20)
8	B-7774	tox-	0,071	0,015
9	B-7778	sea	0,276 (0,04)	0,012
10	B-15938	tox-	0,041	0,000
11	B-7093	seb, seh	0,066	2,876 (0,20)
12	B-8380	seb, sep	0,006	2,380 (0,23)
13	B-7362	sea, sec	0,690 (0,15)	0,000
14	B-7772	sed, sej, ser	0,061	0,000

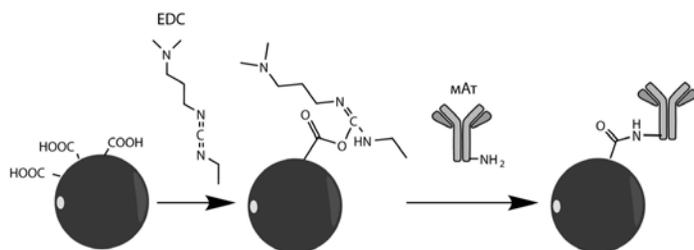


Рис. 5. Схема процесса конъюгирования карбоксилированных магнитных наночастиц с МКА.
Fig. 5. Schematic diagram of the process of conjugation of carboxylated magnetic nanoparticles with mAb.

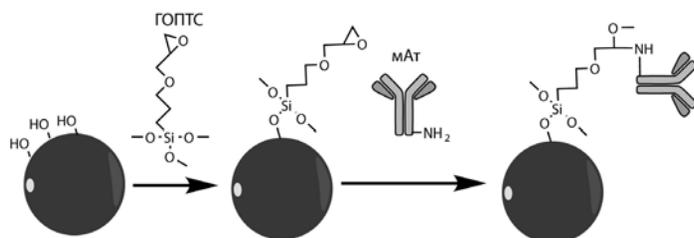


Рис. 6. Схема конъюгирования МКА с силанизированными магнитными частицами. ГОПТС – глицидилоксипропилтриэтоксисилан.
Fig. 6. Scheme of mAb conjugation with silanized magnetic particles. GOPTS – glycidyloxypopyl triethoxysilane.

Другая опция модификация поверхности – использование эпоксисиланов (ГОПТС). Поверхность исходных МЧ содержит гидроксильные группы, к которым ковалентно пришивается эпоксисилан. Полученное производное содержит активную эпокси-группу, которая в реакции с раскрытием трехчленного оксиранового цикла реагирует с лигандами, содержащими amino-, thio- и гидроксигруппы (рис. 6).

К преимуществу этого метода можно отнести то, что синтез МЧ с поверхностными гидроксильными группами проще, чем с карбоксильными. Магнитные частицы такого типа широко используются для выделения ДНК и доступны в России.

Иммуномагнитная сепарация

При разработке метода ИМС важно учитывать физические параметры МЧ, раствора, магнита. В процессе магнитофореза ИМЧ постоянный магнит находится у стенки центрифужной пробирки. На суспензию ИМЧ в растворе в это время действуют несколько факторов: магнитное поле магнита, вязкое сопротивление раствора, гравитация, плавучесть ИМЧ. При существенном превышении действия магнитного поля над всеми другими факторами ИМЧ движутся в сторону магнита и фиксируются на внутренней стенке пробирки. На скорость этого движения значимое влияние может оказать только вязкость окружающего раствора.

Для определения оптимального времени ИМС проводили спектрофотометрическое сканирование суспензии МЧ в магнитном штативе. Согласно полученным результатам, минимально достаточное время магнетизации ИМС составляет 11–12 мин (рис. 7).

При аспирации супернатанта вязкое сопротивление жидкости воздействует на пристеночный слой ИМЧ, в результате чего может произойти их редисперсия и потеря вместе с супернатантом. Учитывая, что сила сопротивления тела в жидкости прямо пропорциональна его площади, в процессе ИМС следует добиваться уменьшения распределения МЧ по

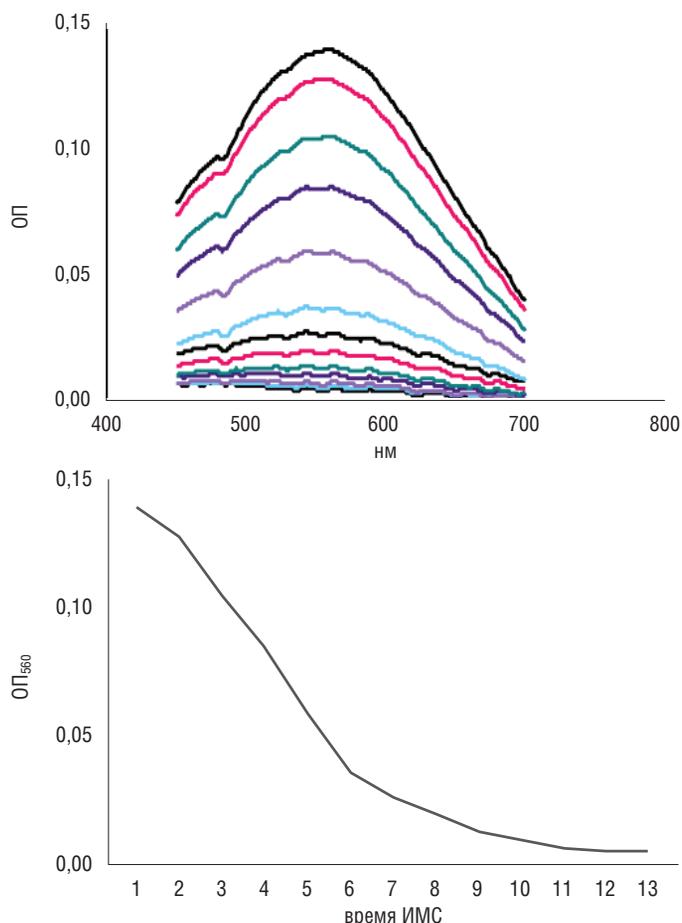


Рис. 7. Оценка оптимального времени магнетизации в процессе ИМС: А) спектрофотометрический спектр суспензии в диапазоне 450–700 нм; Б) график зависимости поглощения суспензии ИМЧ в магнитном штативе от времени при $\lambda = 560$ нм.
Fig. 7. Evaluation of the optimal magnetization time in the IMC process: A) spectrophotometric spectrum of the suspension in the range of 450–700 nm; B; graph of the absorption of the IMC suspension in a magnetic stand as a function of time at $\lambda = 560$ nm.

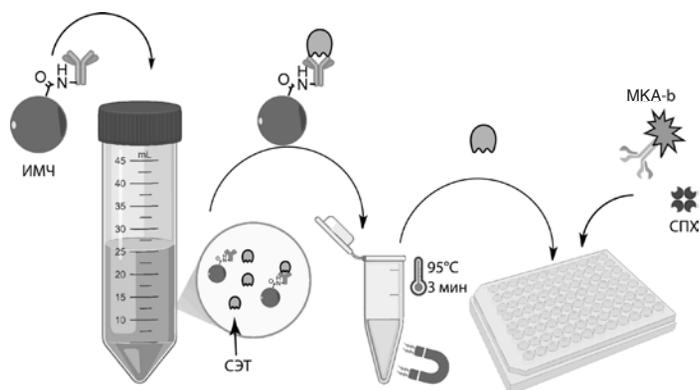


Рис. 8. Иммуномагнитная сепарация СЭТ из жидкого образца объемом 25 мл. СЭТ – стафилококковый энтеротоксин, ИМЧ – иммуномагнитные частицы, МКА -b – биотинилированные вторые моноклональные антитела, СПХ – стрептавидин-пероксидаза хрена.

Fig. 8. Immunomagnetic separation of SET from a 25 ml liquid sample. SET – staphylococcal enterotoxin, IMP – immunomagnetic particles, mAb-b – biotinylated second monoclonal antibodies, SPH – streptavidin-horseradish peroxidase.

стенке пробирки. Добиться этого возможно применением нескольких стадий магнетизации с магнитами уменьшающегося размера. В таком случае ИМЧ будут собираться в соответствии с размерами магнитного поля. Более простой способ уменьшения занимаемой ИМЧ площади заключается во вращении пробирки вокруг оси, что приводит к сборки ИМЧ в узкую вертикальную полоску.

Многие пищевые продукты содержат загустители (крахмал, ксантаны и др.), что приводит к увеличению вязкости экстракта и пропорциональному снижению скорости диффузии ИМЧ в магнитном поле. Для вязких продуктов следует использовать более длительное время инкубирования в магнитном штативе или усиливать напряженность магнитного поля заменой магнитом большей силы. Также имеет значение диаметр емкости, содержащей суспензию ИМЧ: чем

больше диаметр, тем больший путь необходимо преодолеть МЧ для сбора на прилегающей к магниту стенке.

Разработанная нами система ИМС-ИФА схематично представлена на рис. 8. Согласно МУК 4.2.2429-08 для концентрирования анализируемой пробы допускается использование трихлоруксусной кислоты. В стандарте ISO 19020:2017(E) используется концентрирование в диализной камере с помощью ПЭГ-20000. В нашей работе предлагается альтернативный вариант концентрирования СЭТ с помощью ИМС.

После концентрирования СЭТ и перевода в раствор меньшего объема с одновременным освобождением от потенциальных ингибиторов проводится сэндвич-ИФА-детекция.

Результаты проведенного исследования представлены в табл. 3. Извлекаемость токсинов SEA и SEB с помощью ИМС составила ~80% от внесенного в пробу количества. Показана возможность надежной детекции токсинов SEA и SEB при концентрации 0,4 нг/мл в пробе.

Полученные на основе карбоксилированных МЧ конъюгаты демонстрируют более высокие результаты в сравнении с гидроксильными частицами. Это явление можно объяснить наличием у этих МЧ остаточной намагниченности, в результате чего они быстрее агрегируют с уменьшением площади рабочей поверхности.

Заключение

Для успешного определения СЭТ большое значение имеет извлечение токсинов из матрицы пищевых продуктов в раствор с последующей детекцией токсинов в полученном экстракте. С учетом низкого предела детекции требуется использование методов с высокой чувствительностью и специфичностью. Этим требованиям удовлетворяет иммуноанализ на основе моноклональных антител. Дополнительное улучшение чувствительности определения можно достичь с помощью ИМС.

Таблица 3. Интерпретация результатов исследования ИМС-ИФА проб молока объемом 25 мл
 Table 3. Interpretation of the results of the IMS-ELISA study of 25 ml milk samples

Проба / Sample	Экстракт без ИМС / Extract without IMS	Результат / Result	к-ИМЧ значение ОП ₄₅₀ / k-IMP OD ₄₅₀ value	Результат к-ИМЧ / OP ₄₅₀ value	э-ИМЧ значение ОП ₄₅₀ / e-IMCh OD ₄₅₀ value	Результат / Result
Молоко без СЭТ / Milk without SET	0,09 (0,02)	–	0,09 (0,02)	–	0,09 (0,02)	–
Молоко SEA 0,1 нг (0,004 нг/мл) / Milk SEA 0.1 ng (0.004 ng/ml)	0,09 (0,02)	–	0,08 (0,03)	–	0,1 (0,02)	–
Молоко SEA 1 нг (0,04 нг/мл) / Milk SEA 1 ng (0.04 ng/ml)	0,1 (0,03)	–	0,15 (0,05)	±	0,09 (0,03)	–
Молоко SEA 10 нг (0,4 нг/мл) / Milk SEA 10 ng (0.4 ng/ml)	0,12 (0,02)	–	1,01 (0,18)	+	0,89 (0,11)	+
Молоко SEA 100 нг (4 нг/мл) / Milk SEA 100 ng (4 ng/ml)	0,61 (0,15)	+	1,47 (0,21)	+	1,21 (0,32)	+
Молоко SEB 0,1 нг (0,004 нг/мл) / Milk SEB 0.1 ng (0.004 ng/ml)	0,09 (0,02)	–	0,09 (0,01)	–	0,09 (0,02)	–
Молоко SEB 1 нг (0,04 нг/мл) / Milk SEB 1 ng (0.04 ng/ml)	0,09 (0,02)	–	0,21 (0,1)	±	0,12 (0,04)	–
Молоко SEB 10 нг (0,4 нг/мл) / Milk SEB 10 ng (0.4 ng/ml)	0,11 (0,03)	–	1,51 (0,22)	+	1,03 (0,16)	+
Молоко SEB 100 нг (4 нг/мл) / Milk SEB 100 ng (4 ng/ml)	0,74 (0,14)	+	2,23 (0,27)	+	1,92 (0,21)	+

В результате проведенной работы нами продемонстрирована возможность использования ИМС для обнаружения контаминации пищевых продуктов СЭТ с помощью сэндвич-ИФА. Преимуществами метода являются простота, скорость выполнения анализа, стоимость компонентов и их доступность. Дальнейшая работа направлена на повышение эффективности извлечения ИМС из раствора в процессе магнитофореза, оптимизацию сочетания ИМС-ИФА по времени и трудозатратам.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках Государственного задания 1.1.13.

Financial support

The work was carried out as part of State Task 1.1.13

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

- Cieza MYR, Bonsaglia ECR, Rall VLM, Santos MVD, Silva NCC. Staphylococcal Enterotoxins: Description and Importance in Food. *Pathogens*. 2024 Aug 9;13(8):676. DOI: 10.3390/pathogens13080676
- Feng X, Zhou D, Xie G, Xu H. Recombinase aided amplification combined with lectin-magnetic separation for detection of *Staphylococcus aureus* in food samples. *International Dairy Journal*. 2026;172:106437. DOI: 10.1016/j.idairyj.2025.106437
- Hennekinne J-A. *Staphylococcus aureus* as a Leading Cause of Foodborne Outbreaks Worldwide. *Staphylococcus aureus*, Elsevier; 2018;129-46. DOI: 10.1016/B978-0-12-809671-0-00007-3
- Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Jul;36(4):815-36. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x
- Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Biomed Res Int*. 2014;2014:827965. DOI: 10.1155/2014/827965
- Lefebvre D, Blanco-Valle K, Hennekinne JA, Simon S, Fenaille F, Becher F, et al. Multiplex Detection of 24 Staphylococcal Enterotoxins in Culture Supernatant Using Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry. *Toxins (Basel)*. 2022 Mar 31;14(4):249. DOI: 10.3390/toxins14040249
- Wei X, Wang W, Wang T, Yang Y, Guo Y, Long L, et al. Detection of *Staphylococcus* Enterotoxin sea and seb in Milk Samples by Duplex Droplet Digital PCR. *J Food Prot*. 2025 Jul 21;88(8):100569. DOI: 10.1016/j.jfp.2025.100569
- Mairi A, Ibrahim NA, Idres T, Touati A. A Comprehensive Review of Detection Methods for *Staphylococcus aureus* and Its Enterotoxins in Food: From Traditional to Emerging Technologies. *Toxins (Basel)*. 2025 Jun 23;17(7):319. DOI: 10.3390/toxins17070319
- Andjelkovic M, Tsilia V, Rajkovic A, De Cremer K, Van Loco J. Application of LC-MS/MS MRM to Determine Staphylococcal Enterotoxins (SEB and SEA) in Milk. *Toxins (Basel)*. 2016 Apr 20;8(4):118. DOI: 10.3390/toxins8040118
- Li Q, Dou L, Zhang Y, Luo L, Yang H, Wen K, et al. A comprehensive review on the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in food samples. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2024 Jan;23(1):e13264. DOI: 10.1111/1541-4337.13264
- Ford LP, Sutton SB, Mitchell DR, Bruno JG. Ultrasensitive Staphylococcal Enterotoxin B Quantum Dot-Based Lateral Flow Immunoassays for Rapid Testing of Poultry Rinsates and Milk. *J Fluoresc*. 2025 Aug 23. DOI: 10.1007/s10895-025-04526-1
- Fujikawa H, Hirayama W. Solid-phase extraction of staphylococcal enterotoxin A in dairy products using an ion exchange resin. *Food Control*. 2017;73:720-5. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.09.024
- Dester E, Alocilja E. Current Methods for Extraction and Concentration of Foodborne Bacteria with Glycan-Coated Magnetic Nanoparticles: A Review. *Biosensors (Basel)*. 2022 Feb 11;12(2):112. DOI: 10.3390/bios12020112
- Ветчинин СС, Шевяков АГ, Яковлева ВА, Миронова РИ, Бикетов СФ. Применение иммуномагнитной сепарации для ускоренного обнаружения клеток *F. tularensis* в образцах почвы с помощью иммунохроматографического теста. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(3):219-24. DOI: 10.36233/0372-9311-348
- Wen Y, Tan Y, Zhao L, Lv X, Lin L, Liang D, et al. Rapid on-site detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in lettuce using immunomagnetic separation combined with PMAxx-LAMP and nucleic acid lateral flow strip. *Microchemical Journal* 2022;178:107348. DOI: 10.1016/j.microc.2022.107348
- Jiang W, Ren Y, Han X, Xue J, Shan T, Chen Z, et al. Recombinase polymerase amplification-lateral flow (RPA-LF) assay combined with immunomagnetic separation for rapid visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. *Anal Bioanal Chem*. 2020 May;412(12):2903-2914. DOI: 10.1007/s00216-020-02532-9
- Bai M, Wang Y, Zhang C, Wang Y, Wei J, Liao X, et al. Nanobody-based immunomagnetic separation platform for rapid isolation and detection of *Salmonella enteritidis* in food samples. *Food Chem*. 2023 Oct 30;424:136416. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136416
- Noh EB, Heo GB, Lee KN, Kang YM, An SH, Kim N, et al. Subtype specific virus enrichment with immunomagnetic separation method followed by NGS unravels the mixture of H5 and H9 avian influenza virus. *J Virol Methods*. 2023 Oct;320:114773. DOI: 10.1016/j.jviromet.2023.114773
- Liu X, Guo Z, Qiao Y, Zhang S, Han W, Li X, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* via IgY-based immunomagnetic separation and a phage lysin LysGH15-based colloidal gold immunochromatographic assay. *J Adv Res*. 2025 Nov;77:257-264. DOI: 10.1016/j.jare.2025.01.034
- МУК 4.2.2429-08. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Метод определения стафилококковых энтеротоксинов в пищевых продуктах. 2008.
- Nia Y, Lombard B, Gentil S, Neveux L, Mutel I, Guillier F, et al. Development and validation of the Standard method EN ISO 19020 – microbiology of the food chain – Horizontal method for the immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins in foodstuffs. *Int J Food Microbiol*. 2021 Sep 16;354:109319. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109319
- Park CE, Akhtar M, Rayman MK. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl Environ Microbiol*. 1992 Aug;58(8):2509-12. DOI: 10.1128/aem.58.8.2509-2512.1992
- Westermeier R. *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations*. Fifth edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2016.
- Kurien BT, Scofield RH, editors. *Protein Gel Detection and Imaging: Methods and Protocols*. vol. 1853. New York, NY: Springer New York; 2018. DOI: 10.1007/978-1-4939-8745-0
- Ветчинин СС, Шевяков АГ, Федюкина ГН, Баранова ЕВ, Бикетов СФ. Получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к белку NS1 вируса Зика. *Биоорганическая химия*. 2019;45(2):173-83. DOI: 10.1134/S0132342319010196
- Hermanson GT. *Bioconjugate Techniques*. 3rd ed. Elsevier; 2013. DOI: 10.1016/C2009-0-64240-9
- Hnasko R, editor. *ELISA: Methods and Protocols*. vol. 1318. New York, NY: Springer New York; 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-2742-5
- Crowther JR. *The ELISA Guidebook*. vol. 516. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. DOI: 10.1007/978-1-60327-254-4

References

1. Cieza MYR, Bonsaglia ECR, Rall VLM, Santos MVD, Silva NCC. Staphylococcal Enterotoxins: Description and Importance in Food. *Pathogens*. 2024 Aug 9;13(8):676. DOI: 10.3390/pathogens13080676
2. Feng X, Zhou D, Xie G, Xu H. Recombinase aided amplification combined with lectin-magnetic separation for detection of *Staphylococcus aureus* in food samples. *International Dairy Journal*. 2026;172:106437. DOI: 10.1016/j.idairyj.2025.106437
3. Hennekinne J-A. *Staphylococcus aureus* as a Leading Cause of Foodborne Outbreaks Worldwide. *Staphylococcus aureus*, Elsevier; 2018;129-46. DOI: 10.1016/B978-0-12-809671-0-00007-3
4. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Jul;36(4):815-36. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x
5. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *Biomed Res Int*. 2014;2014:827965. DOI: 10.1155/2014/827965
6. Lefebvre D, Blanco-Valle K, Hennekinne JA, Simon S, Fenaille F, Becher F, et al. Multiplex Detection of 24 Staphylococcal Enterotoxins in Culture Supernatant Using Liquid Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry. *Toxins (Basel)*. 2022 Mar 31;14(4):249. DOI: 10.3390/toxins14040249
7. Wei X, Wang W, Wang T, Yang Y, Guo Y, Long L, et al. Detection of *Staphylococcus Enterotoxin sea* and *seb* in Milk Samples by Duplex Droplet Digital PCR. *J Food Prot*. 2025 Jul 21;88(8):100569. DOI: 10.1016/j.jfp.2025.100569
8. Mairi A, Ibrahim NA, Idres T, Touati A. A Comprehensive Review of Detection Methods for *Staphylococcus aureus* and Its Enterotoxins in Food: From Traditional to Emerging Technologies. *Toxins (Basel)*. 2025 Jun 23;17(7):319. DOI: 10.3390/toxins17070319
9. Andjelkovic M, Tsilia V, Rajkovic A, De Cremer K, Van Loco J. Application of LC-MS/MS MRM to Determine Staphylococcal Enterotoxins (SEB and SEA) in Milk. *Toxins (Basel)*. 2016 Apr 20;8(4):118. DOI: 10.3390/toxins8040118
10. Li Q, Dou L, Zhang Y, Luo L, Yang H, Wen K, et al. A comprehensive review on the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in food samples. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2024 Jan;23(1):e13264. DOI: 10.1111/1541-4337.13264
11. Ford LP, Sutton SB, Mitchell DR, Bruno JG. Ultrasensitive Staphylococcal Enterotoxin B Quantum Dot-Based Lateral Flow Immunoassays for Rapid Testing of Poultry Rinsates and Milk. *J Fluoresc*. 2025 Aug 23. DOI: 10.1007/s10895-025-04526-1
12. Fujikawa H, Hirayama W. Solid-phase extraction of staphylococcal enterotoxin A in dairy products using an ion exchange resin. *Food Control*. 2017;73:720-5. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.09.024
13. Dester E, Alocilja E. Current Methods for Extraction and Concentration of Foodborne Bacteria with Glycan-Coated Magnetic Nanoparticles: A Review. *Biosensors (Basel)*. 2022 Feb 11;12(2):112. DOI: 10.3390/bios12020112
14. Vetchinin SS, Sheviakov AG, Jakovleva VA, Mironova RI, Biketov SF. Application of immunomagnetic separation for accelerated detection of *F. tularensis* cells in soil samples using an immunochromatographic test. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(3):219-24. DOI: 10.36233/0372-9311-348 (In Russian).
15. Wen Y, Tan Y, Zhao L, Lv X, Lin L, Liang D, et al. Rapid on-site detection of viable *Escherichia coli* O157: H7 in lettuce using immunomagnetic separation combined with PMAxx-LAMP and nucleic acid lateral flow strip. *Microchemical Journal* 2022;178:107348. DOI: 10.1016/j.microc.2022.107348
16. Jiang W, Ren Y, Han X, Xue J, Shan T, Chen Z, et al. Recombinase polymerase amplification-lateral flow (RPA-LF) assay combined with immunomagnetic separation for rapid visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. *Anal Bioanal Chem*. 2020 May;412(12):2903-2914. DOI: 10.1007/s00216-020-02532-9
17. Bai M, Wang Y, Zhang C, Wang Y, Wei J, Liao X, et al. Nanobody-based immunomagnetic separation platform for rapid isolation and detection of *Salmonella enteritidis* in food samples. *Food Chem*. 2023 Oct 30;424:136416. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136416
18. Noh EB, Heo GB, Lee KN, Kang YM, An SH, Kim N, et al. Subtype specific virus enrichment with immunomagnetic separation method followed by NGS unravels the mixture of H5 and H9 avian influenza virus. *J Virol Methods*. 2023 Oct;320:114773. DOI: 10.1016/j.jviromet.2023.114773
19. Liu X, Guo Z, Qiao Y, Zhang S, Han W, Li X, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* via IgY-based immunomagnetic separation and a phage lysin LysGH15-based colloidal gold immunochromatographic assay. *J Adv Res*. 2025 Nov;77:257-264. DOI: 10.1016/j.jare.2025.01.034
20. MUK 4.2.2429-08. Control methods. Biological and microbiological factors. Method for determination of staphylococcal enterotoxins in food products. 2008. (In Russian).
21. Nia Y, Lombard B, Gentil S, Neveux L, Mutel I, Guillier F, et al. Development and validation of the Standard method EN ISO 19020 – microbiology of the food chain – Horizontal method for the immunoenzymatic detection of staphylococcal enterotoxins in foodstuffs. *Int J Food Microbiol*. 2021 Sep 16;354:109319. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109319
22. Park CE, Akhtar M, Rayman MK. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl Environ Microbiol*. 1992 Aug;58(8):2509-12. DOI: 10.1128/aem.58.8.2509-2512.1992
23. Westermeier R. Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations. Fifth edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2016.
24. Kurien BT, Scofield RH, editors. Protein Gel Detection and Imaging: Methods and Protocols. vol. 1853. New York, NY: Springer New York; 2018. DOI: 10.1007/978-1-4939-8745-0
25. Vetchinin SS, Shevyakov AG, Fediukina GN, Baranova EV, Biketov SF. Designing hybridomas producing monoclonal antibodies to the NS1 protein of Zika virus. *Russ J Bioorg Chem*. 2019;45(2):173-83. DOI: 10.1134/S0132342319010196 (In Russian).
26. Hermanson GT. Bioconjugate Techniques. 3rd ed. Elsevier; 2013. DOI: 10.1016/C2009-0-64240-9
27. Hnasko R, editor. ELISA: Methods and Protocols. vol. 1318. New York, NY: Springer New York; 2015. DOI: 10.1007/978-1-4939-2742-5
28. Crowther JR. The ELISA Guidebook. vol. 516. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. DOI: 10.1007/978-1-60327-254-4

Информация о соавторах:

Яковлева Вера Александровна, младший сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Панферцев Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0001-6778-934X

Решетняк Татьяна Викторовна, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Перовская Ольга Николаевна, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Болтунова Анастасия Антоновна, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Соловьёв Павел Владимирович, кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Фёдоров Тарас Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Королёва-Ушакова Анжела Григорьевна, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ORCID: 0000-0003-1179-6895

Information about co-authors:

Vera A. Yakovleva, Junior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Evgeny A. Panfertsev, PhD, MD, Senior Researcher Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
ORCID: 0000-0001-6778-934X

Tatyana V. Reshetnyak, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Olga N. Perovskaya, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Anastasia A. Boltunova, Junior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Pavel V. Solovoyov, PhD in Biological Sciences, Deputy Director for Research, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Taras V. Fedorov, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

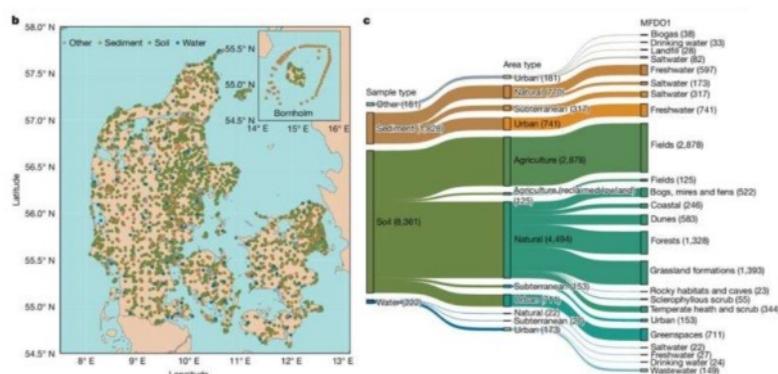
Angela G. Koroleva-Ushakova, Junior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey F. Biketov, PhD in Biological Sciences, Leading Researcher Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
ORCID: 0000-0003-1179-6895

НОВОСТИ НАУКИ

Впервые составлена карта микробиома целой страны

За последние 20 лет был достигнут значительный прогресс в выявлении микробиомов, лежащих в основе процессов в естественной и связанной с человеком среде. Недавние крупномасштабные метагеномные исследования зарегистрировали разнообразие микробной жизни в океанах, в кишечнике человека и на Земле, с компиляциями, охватывающими тысячи общедоступных наборов данных. Однако, несмотря на их широкий охват, этим исследованиям часто не хватает функциональной информации, а их места взятия образцов часто распределены неравномерно, ограничены в разрешении или отсутствуют метаданные. В данной публикации представлен *Microflora Danica* – атлас датских экологических микробиомов, охватывающий 10 683 метагенома дробного типа и 450 почти полноразмерных наборов данных 16S и 18S рПНК, связанных с пятиуровневой схемой классификации местообитаний. Показано, что, хотя нарушенные человеком местообитания имеют высокое альфа-разнообразие, виды встречаются повторно, что выявляет скрытую однородность. Это подчеркивает роль природных систем в поддержании общего видового (гамма) разнообразия и подчеркивает необходимость разработки национальных базовых показателей для отслеживания реакции микроорганизмов на землепользование и изменение климата. В связи с этим ученые сосредоточили исследование набора данных на нитрификаторах – функциональной группе, тесно связанной с изменением климата и имеющей важнейшее значение для основного вида землепользования Дании – сельского хозяйства. Было идентифицировано несколько линий, кодирующих ключевые гены нитрификаторов, и раскрыто влияние нарушения земель на численность как хорошо изученных, так и не охарактеризованных групп нитрификаторов, что может иметь потенциальное влияние на выбросы N₂O. *Microflora Danica* предлагает уникальный ресурс для решения фундаментальных вопросов микробной экологии, касающихся факторов, определяющих разнообразие, распределение и функционирование микроорганизмов.



Singleton CM, Jensen TBN, Delogu F, Knudsen KS, Sørensen EA, Jørgensen VR, et al.; *Microflora Danica Consortium*. The *Microflora Danica* atlas of Danish environmental microbiomes. *Nature*. 2025 Dec 3. DOI: 10.1038/s41586-025-09794-2