

УДК 615.074

ГРУППОВОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОГЛИКОЗИДОВ С ПОМОЩЬЮ ИФА ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

И.А. Гальвидис¹, К.М. Буркин^{1,2}, М.А. Буркин¹¹ НИИВС им. И.И. Мечникова», Москва, Россия² МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Аминогликозиды (АГ) представляют собой большую группу природных и полусинтетических антибиотиков с широким спектром антимикробной активности в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. В настоящее время несколько представителей семейства аминогликозидов – гентамицин (ГМ), неомицин В (НМ), паромомицин (ПМ), канамицин (КМ), апрамицин (АП) и стрептомицин (СТМ) (Рис. 1) – одобрены для лечения инфекционных заболеваний животных, и для них установлены максимально допустимые уровни содержания в продукции животноводства [1]. В связи с этим для контроля безопасности продуктов питания и определения остаточного содержания в них АГ необходим эффективный и надежный анализ.

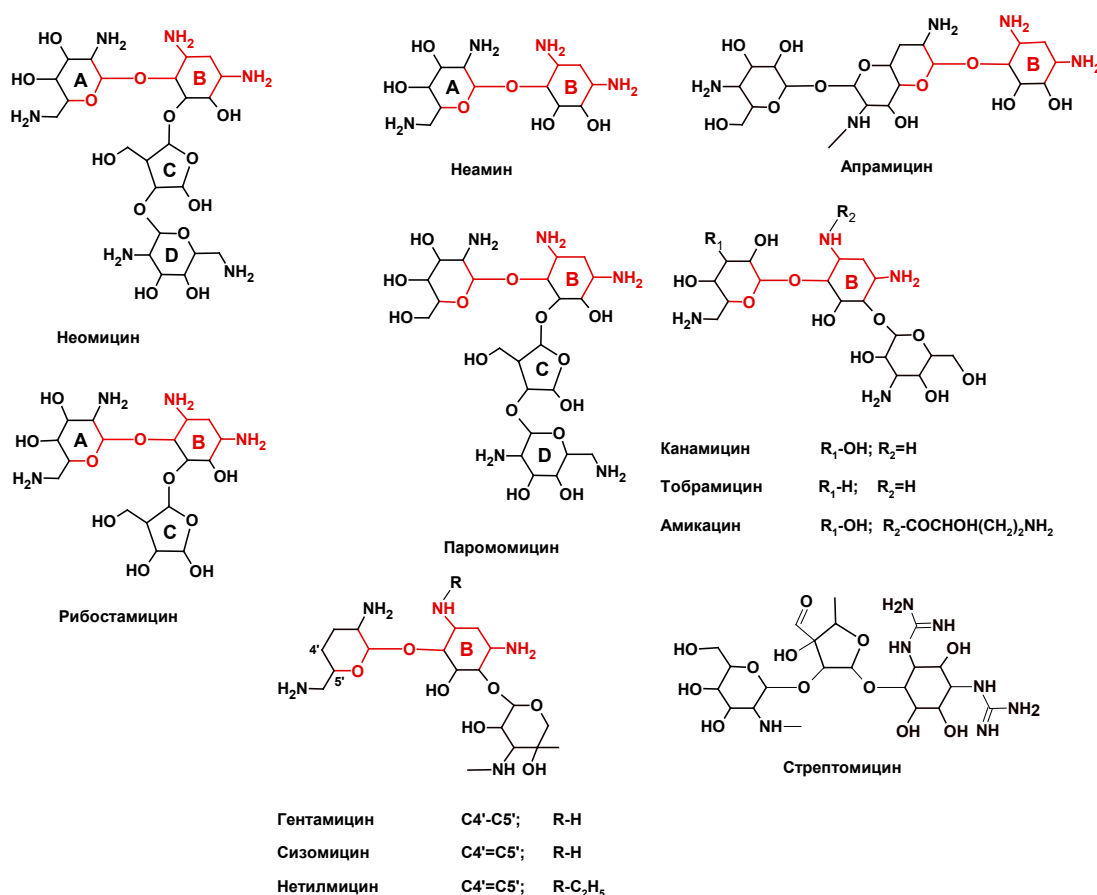


Рисунок 1. Структурные формулы аминогликозидов

В настоящем исследовании для одновременного обнаружения пяти упомянутых АГ в пищевых продуктах предложен иммуоферментный анализ с групповой специфичностью. Поликлональные кроличьи антитела были получены к конъюгированному с бычьим сывороточным альбумином (БСА) рибостамицину (РС), что определило их специфичность к общему фрагменту большинства АГ, 2-дезоксистрептамину (2-ДОС) и возможность распознавания целого ряда АГ. Разработанный групп-специфичный анализ был применен для обнаружения аминогликозидов в мёде [2].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Неомицин В, рибостамицин, неамин (НА), паромомицин, канамицин, тобрамицин (ТМ), амикацин (АМ), гентамицин, нетилмицин (НТМ), сизомицин (СЗМ), генетицин (ГЦ), апрамицин и стрептомицин были приобретены у ХИММЕД (Москва, Россия). В работе использовали БСА, полный адъювант Фрейнда, 1,6 – гександиамин, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодииимид (ЭДК), периодат натрия и борогидрид натрия (Sigma-Aldrich, Saint Louis, МО, США), желатин (ЖЕЛ) (Bio-Rad, Hercules, Калифорния, США), сахарозу (Serva, Германия), фосфатно-солевой буфер с 0.05 % твин 20 (ФСБ-Т) и двухкомпонентный раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) Биосервис (Москва, Россия), козы анти тела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (АК-ПХ) (ИМТЭК, Москва, Россия). Образцы меда были приобретены в местных торговых точках г. Москвы.

Приготовление конъюгатов. Два типа конъюгатов для иммунизации были приготовлены на основе РС и БСА – без и с использованием спейсера С6 между гаптеном и белковым носителем. РС обрабатывали периодатом натрия для окисления гидроксильных фрагментов рибозы до реакционноспособных альдегидных групп, а затем связывали с аминами БСА посредством восстановительного аминирования. Для удаления несвязанного РС проводили диализ. С использованием аналогичной процедуры был синтезирован конъюгат ЖЕЛ-РС для иммобилизации на планшетах.

Для приготовления БСА-С6-РС сначала модифицировали БСА 1,6 – гександиамином. БСА активировали с помощью ЭДК в течение 30 минут, а затем добавляли 1,6 – гександиамин и перемешивали в течение 2 часов. Модифицированный белок очищали от избыточных реагентов в ходе диализа, и полученный БСА-С6-NH₂ конъюгировали с периодат-окисленным РС в процессе восстановительного аминирования.

Иммунизация и подготовка антител. БСА-РС и БСА-С6-РС были использованы в качестве иммуногенов. Кроликам (2,0–2,5 кг) вводили подкожно в 10–15 точек спины 0,1 мг иммуногена, эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда. Такие же дозы иммуногенов в физиологическом растворе вводили ежемесячно для повторных иммунизаций. Через неделю после каждой инъекции для контроля иммунного ответа брали образец крови из латеральных вен уха кроликов. Полученные антисыворотки хранили в глицерине (1:1, v/v.) при -15 °С до тестирования в ИФА.

Процедура ИФА. Конкурентный анализ проводился по классической методике. ЖЕЛ-РС наносили на полистироловые 96-луночные планшеты Costar и оставляли на ночь. Неадсорбированный конъюгат отмывали с использованием ФСБ-Т. Следующий конкурентный этап (1 ч, 25 °С) включал взаимодействие с иммобилизованным антигеном рабочего раствора антител (0,1 мл) в присутствии 0,1 мл стандартных растворов АГ (0,1 мл, 1 пг/мл – 1 мкг/мл, (В) и 0 мкг/мл, (В₀)) в ФСБ-Т или 0,1 мл тестируемого образца. После отмывки связанные с иммобилизованным ЖЕЛ-РС антитела детектировали с помощью АК-ПХ (1 ч, 37 °С). Окрашенный продукт, образовавшийся в результате ферментативной реакции с субстратной смесью ТМБ (0,5 ч, 25 °С), регистрировали при 450 нм на планшетном ридере StatFax 2100 (Awareness Technologies, США).

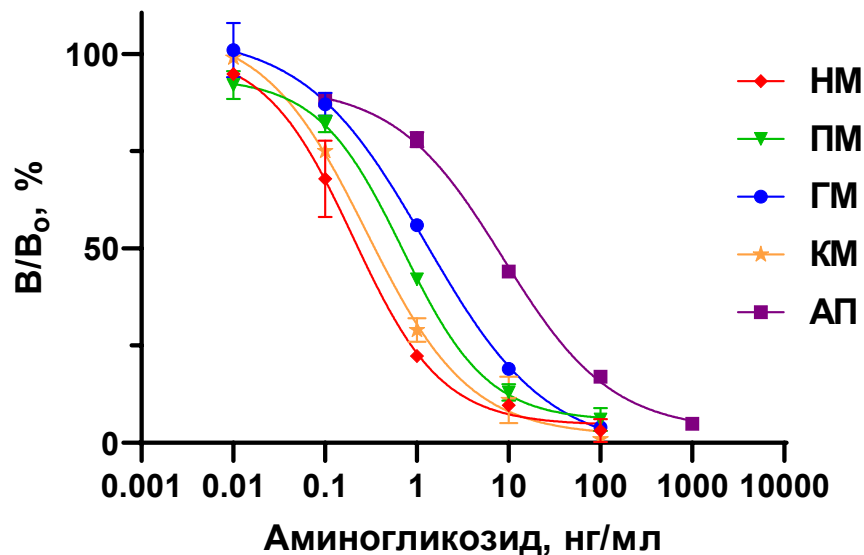
Зависимость относительного связывания антител (В/В₀) от концентраций аналита выражали в виде калибровочных кривых. Перекрестную реактивность для каждого представителя АГ рассчитывали как отношение концентраций 50 %-ного ингибирования IC₅₀ НМ/IC₅₀ АГ. Рабочим диапазоном анализа считали область концентраций IC₂₀-IC₈₀, а предел обнаружения (ПО) был рассчитан как В₀ – 3×SD.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез иммуногена и получение антител. В большинстве публикаций, посвященных иммуноанализу АГ, иммуногены, антигены, ферментные конъюгаты или трейсеры были получены карбодииимидным или глутаральдегидным методами с участием аминогрупп АГ [3–7]. При этом, из-за наличия нескольких (3–6) аминогрупп в молекулах АГ возможно образование конъюгатов с переменной ориентацией гаптена.

В настоящем исследовании РС был выбран в качестве иммунизирующего гаптена из-за следующих преимуществ: будучи трисахаридом, РС имеет размер молекулы, сопоставимый с большинством АГ; три кольца РС А-В-С (Рис. 1) идентичны таковым у НМ; окислению периодатом подвержены преимущественно вицинальные гидроксильные группы, поэтому при конъюгировании с белком мы смогли задействовать С-фрагмент РС, который обеспечивал строгую ориентацию гаптена на носителе с благоприятной презентацией фрагмента 2-ДОС. Полученные БСА-РС и БСА-С6-РС сравнивали, чтобы выявить, какая конструкция иммуногена обеспечит лучшую презентацию общего фрагмента молекул АГ и индукцию групп-специфического ответа.

Антитела к БСА-РС продемонстрировали умеренную чувствительность (НМ, $IC_{50} = 10$ нг/мл) и высокую селективность в отношении НМ с относительно низкой перекрестной реактивностью (<5 %) для ГМ, КМ и АП. Применение спейсера С6 в иммуногене способствовало лучшему представлению 2-ДОС эпитопа и индукции антител с распознаванием широкого спектра различных АГ. Кроме того, анти-БСА-С6-РС антитела продемонстрировали лучшую чувствительность (НМ, $IC_{50} = 0,2$ нг/мл). Таким образом, последующие исследования проводились с использованием антител к БСА-С6-РС.



Аминогликозид	IC_{50} , нг/мл	Диапазон измерения IC_{20} – IC_{80} , нг/мл	Предел определения, нг/мл	Предел определения в мёде, мкг/кг
НМ	0.2	0.03–2.1	0.02	1.0
ПМ	0.7	0.08–7.1	0.05	2.5
ГМ	1.5	0.15–13.3	0.11	5.5
КМ	0.35	0.05–3.9	0.04	2.0
АП	6.8	0.5–96.8	0.23	11.5

Рисунок 2. Стандартные кривые и аналитические параметры ИФА-системы для группового определения аминогликозидов в мёде. Взаимодействие анти-БСА-РС с антигеном ЖЕЛ-РС в 5 % растворе сахарозы в качестве имитатора мёда. Предел обнаружения в 5 % растворе сахарозы определяли согласно $ПО = B_0 - 3 \times SD$.

Исследование специфичности анализа и выбора иммунореагентов. Среди нескольких исследованных вариантов конкурентного анализа наиболее широким спектром распознавания характеризовался гомологичный формат анализа [2]. Для оценки его специфичности была изучена панель следующих АГ, и была определена их перекрестная реактивность: НА (625 %), РС (250 %), НМ (100 %), КМ (47,5 %), ПМ (17,3 %). ГМ (9,0 %), ТМ (7,8 %), АП (1,7 %), СЗМ (1,2 %), АМ (<0,1 %), ГЦ (<0,1 %), СТМ (<0,1 %) и НТМ (<0,1 %). Большинство из этих анализов используются в медицинской и ветеринарной областях, однако для использования в животноводстве регламентированы только НМ, ПМ, ГМ, КМ, АП и СТМ [1].

Определение АГ в мёде и выбор имитатора матрицы. Мед – это сложный продукт, состоящий из углеводов (75–80 %), витаминов, белков, ферментов, органических кислот, микроэлементов, включений и других компонентов. Эти компоненты могут вызывать помехи в ходе иммунохимической реакции и препятствовать корректному измерению аналита. В связи с этим, выделение АГ из мёда обычно является трудоемкой и длительной процедурой. В качестве альтернативного подхода в данной работе рассмотрено использование имитаторов матрикс-эффекта мёда на связывание антител.

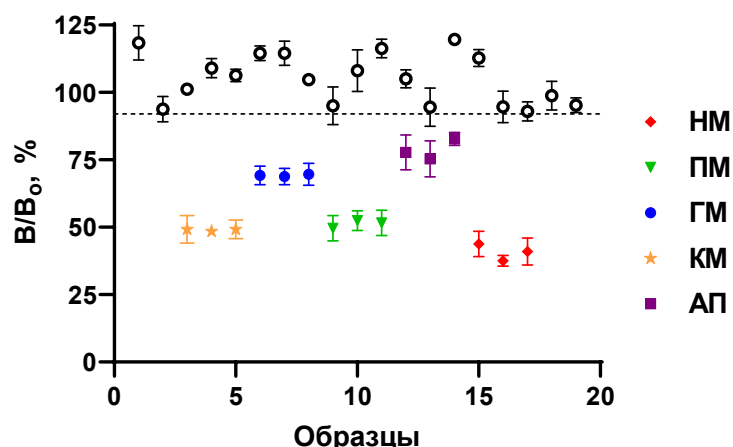


Рисунок 3. Обнаружение АГ в образцах меда с использованием группового ИФА. Каждый символ соответствует среднему относительному связыванию, и ошибка – получена для отдельного образца меда, проанализированного в трех экземплярах. Пустые символы представляют отдельные пустые образцы меда (липовый, гречишный и цветочный), а заполненные символы представляют те же самые образцы, содержащие АГ на уровне 40 мг/кг (уровень аналогичный МДУ для СТМ, принятый в некоторых странах). Пунктирная линия соответствует пределу определения анализа, полученного для имитатора матрикса (5 % сахароза-ФСБ-Т)

образом, разработанный тест был способен выявить загрязнение мёда 9 АГ, из которых 5 одобрены для использования у сельскохозяйственных животных (НМ, ПМ, ГМ, КМ и АП), на уровне 10 мкг/кг, а также НА, РС, СЗМ и ТМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан новый непрямой конкурентный ИФА для группового выявления аминогликозидов. Впервые в качестве иммунизирующего гаптена для получения антител против 2-ДОС, общего фрагмента большого количества АГ, использован РС. Анализ позволял обнаружить широкий спектр представителей аминогликозидов, включая НМ, РС, НА, ПМ, ГМ, СЗМ, КМ, ТМ и АП, с пределом их определения 0,02–0,2 нг/мл. Для анализа меда был разработан имитатор матрикс-эффекта, позволяющий значительно упростить пробоподготовку исследуемого материала. Анализ образца меда позволил выявлять любой из упомянутых ветеринарных АГ в меде на уровне 10 мкг/кг.

ЛИТЕРАТУРА

1. EC Council Regulation (EU) № 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin // Off J Eur Union. – 2009. – V. 15. – P. 1–72.
2. Galvidis I.A. et al. Group-specific detection of 2-deoxystreptamine aminoglycosides in honey based on antibodies against ribostamycin // Analytical Methods. – 2019. – V. 11. – № 36. – P. 4620–4628.
3. Thompson S.G., Burd J.F. Substrate-labeled fluorescent immunoassay for amikacin in human serum // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1980. – V. 18. – № 2. – P. 264–268.
4. Li C. et al. Detection of kanamycin and gentamicin residues in animal-derived food using IgY antibody based ic-ELISA and FPIA // Food chemistry. – 2017. – V. 227. – P. 48–54.
5. Galvidis I.A., Burkin M.A. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the aminoglycoside antibiotic kanamycin in foodstuffs // Russian journal of bioorganic chemistry. – 2010. – V. 36. – № 6. – P. 722–729.
6. Haasnoot W. et al. Immunochemical detection of aminoglycosides in milk and kidney // Analyst 1999. V. 124. – № 3. – P. 301–305.
7. Peng J. et al. Multiplex lateral flow immunoassay for five antibiotics detection based on gold nanoparticle aggregations // RSC advances. – 2016. – V. 6. – № 10. – P. 7798–7805.

В качестве имитатора меда была выбрана сахароза, поскольку она оказывала влияние на связывание антител, подобное меду. Обнаружена взаимосвязь между растворами мёда и растворами сахарозы, проявляющими одинаковый матрикс-эффект. Две пары с эквивалентным эффектом представляли растворы: 1/20 мёд = 20 % сахароза и 1/50 мёд = 5 % сахароза. Из-за неудобства работы с высоковязким 20 %-ным раствором сахарозы последний вариант был выбран как более предпочтительный.

Определение АГ в мёде могло быть выполнено количественно, если искомый анализ известен. Для количественного определения АГ в меде образец развели в 50 раз в ФСБ-Т и получали стандартную кривую АГ в 5 % сахарозе-ФСБ-Т (Рис. 2).

Если анализ неизвестен, разработанный для групповой ИФА использовался в качестве скринингового теста. В этом случае анализируемый образец считался загрязненным, если он вызвал связывание антител ниже порогового уровня (cut-off, Рис. 3). Таким