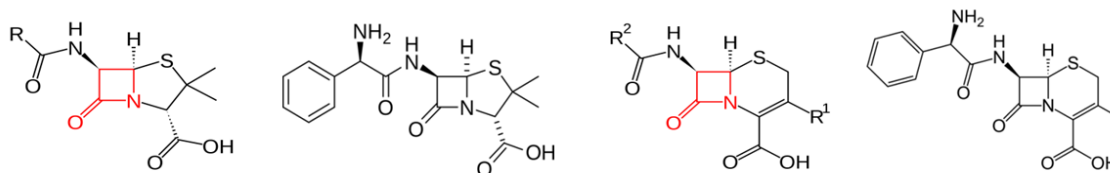


КОНСТРУКЦИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ КОНКУРЕНТНОГО РЕЦЕПТОРНОГО АНАЛИЗА БЕТА-ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Т.С. Серченя, И.В. Горбачева, И.И. Вашкевич, О.В. Свиридов

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Бета-лактамы являются давно известными, важными и наиболее широко применяемыми средствами антибактериальной химиотерапии для лечения инфекционных заболеваний в медицине и ветеринарии и стимуляции роста сельскохозяйственных животных и аквакультур. Этот класс антибиотиков включает, в частности, пенициллины и цефалоспорины, которые представляют собой гетероциклические соединения, имеющие четырехчленное бета-лактамное кольцо в своей структуре (рисунок 1). Механизм их антибактериального действия заключается в нарушении биосинтеза клеточной стенки микроорганизмов. Молекулярной мишенью этих антибиотиков является пенициллинсвязывающий белок (ПСВ), который является транспептидазой и катализирует сшивание пептидогликана клеточной стенки бактерий. ПСВ узнает бета-лактамное кольцо антибиотиков и химически взаимодействует с ним, что приводит к необратимому связыванию лиганда и подавлению функции этого бактериального фермента.



Пенициллины

Ампициллин

Цефалоспорины

Цефалексин

Рисунок 1 – Структурные формулы бета-лактамных антибиотиков

Неконтролируемое и избыточное использование пенициллинов и цефалоспоринов может приводить к появлению их остатков в пищевой продукции животного происхождения, что оказывает неблагоприятное влияние на здоровье человека, может вызывать аллергические и канцерогенные реакции, угнетение микрофлоры кишечника, дисбактериоз, а также способствует формированию микробной резистентности к этим лекарствам [1]. С целью обеспечения биобезопасности и минимизации рисков для здоровья человека во многих странах введена система контроля остаточных количеств бета-лактамных антибиотиков в продуктах питания и установлены максимально допустимые уровни (МДУ) их содержания. В странах Таможенного союза и Евросоюза концентрации бета-лактамов регулируются Техническим регламентом ТС «О безопасности пищевой продукции» [2] и директивой ЕС № 37/2010 [3]. В этих документах установлены МДУ для остатков бета-лактамов в молоке на уровне 4 мкг/кг для пенициллинов (пенициллин G, ампициллин, амоксициллин) и 50–100 мкг/кг для цефалоспоринов (цефоперазон, цефепима, цефалексин и цефтиофур).

Для обнаружения и количественного определения бета-лактамных антибиотиков в продуктах питания и биологических жидкостях используются различные методы [4], включающие микробиологические, инструментальные и биохимические тесты. Микробиологические методики являются длительными в исполнении и недостаточно специфичными. Инструментальные методы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография, жидкостная хроматография и масс-спектрометрия, обладают высокой чувствительностью и точностью. Однако их выполнение сопряжено с наличием дорогостоящего оборудования, работой высококвалифицированного персонала, сложной пробоподготовкой и невозможностью тестирования большого количества проб. Биохимические тесты, включающие иммунохимический и рецепторный анализ, являются эффективными скрининговыми подходами и характеризуются хорошей чувствительностью, широкой групповой специфичностью и высокой производительностью. Большинство описанных в литературе и применяемых на практике аналитических систем для определения антибиотиков в продуктах питания основаны на иммунохимической реакции антиген-антитело. Для разработки таких систем необходимы высокоаффинные антитела, получение которых часто является сложной задачей, особенно если важны их группоспецифичные свойства. И эта проблема актуальна для бета-лактамных антибиотиков.

Показано, что тест-системы на основе антител не могут одновременно выявлять все пенициллины или цефалоспорины в одном анализе, не говоря уже о межгрупповом узнавании этих соединений. Перспективным направлением разработок тест-систем для определения бета-лактамов является рецепторный анализ, который характеризуется высокой чувствительностью и широкой специфичностью, позволяя выявлять практически весь спектр пенициллиновых и цефалоспориновых антибиотиков. Это возможно благодаря уникальной способности рецепторного бактериального ПСБ проявлять высокое сродство к бета-лактамам различной структуры. В нашей работе поставлена цель получить и исследовать биохимические реагенты, разработать конструкцию и определить характеристики тест-системы гетерофазного рецепторного анализа пенициллинов и цефалоспоринов.

В разработанной биоаналитической системе реализован принцип непрямого конкурентного анализа (рисунок 2). Основой анализа является лиганд-рецепторное взаимодействие бета-лактамов и ПСБ (рекомбинантный PSB2 из *Streptococcus pneumoniae* R6). На твердой фазе иммобилизован конъюгат бета-лактама с инертным белком. В ходе анализа в лунки вносят бета-лактамы в возрастающих концентрациях и ПСБ в комплексе с моноклональным антителом к этому рецепторному белку. При инкубации происходит обусловленное конкуренцией распределение ПСБ между конъюгированным бета-лактамом на твердой фазе и свободным бета-лактамом в жидкой фазе в составе калибровочных или исследуемых проб. Выявление иммобилизованного комплекса происходит за счет конъюгата антивидовых антител с пероксидазой из корней хрена. Таким образом, на внутренней поверхности лунки микропланшета формируется многокомпонентный комплекс, включающий адсорбированный белковый конъюгат бета-лактама и последовательно связанные силами биологического сродства ПСБ, антитело к ПСБ и антивидовое антитело с ковалентно присоединенной пероксидазой. Ферментативная активность этого комплекса детектируется с помощью хромоген-субстратного раствора, содержащего 3,3', 5,5' – тетраметилбензидин (ТМБ) и перекись водорода. Интенсивность образующейся окраски обратно пропорциональна концентрации антибиотика в калибровочных и исследуемых пробах. Оптическая плотность растворов в лунках измеряется при длине волны 450 нм, и на основании полученных данных строится калибровочная кривая зависимости конкурентного связывания V_i/V_0 в % (ось ординат, линейная) от концентраций бета-лактама в калибровочных пробах в нг/мл (ось абсцисс, логарифмическая), где V_0 – оптическая плотность в отсутствие бета-лактама в растворе, V_i – оптическая плотность в присутствии возрастающих концентраций бета-лактама в растворе. По калибровочному графику рассчитывается концентрация аналита в исследуемых пробах.

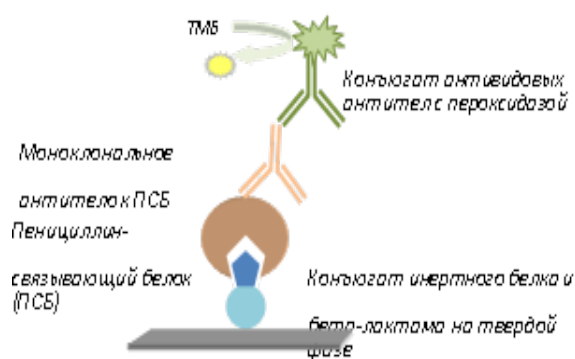


Рисунок 2 – Конструкция тест-системы непрямого конкурентного рецепторного анализа бета-лактамов

Конъюгаты бета-лактамов с инертным белком для адсорбции на твердой фазе синтезировали на основе альбумина человека, используя ампициллин и цефалексин в качестве гаптенных. Выбор этих представителей пенициллинов и цефалоспоринов обусловлен наличием в их структуре реакционноспособной аминогруппы в боковой цепи, не затрагивающей бета-лактамное кольцо.

Для создания конструкции тест-системы нами синтезированы и исследованы твердофазные конъюгаты бета-лактамов, охарактеризованы основные реагенты и изучены лигандсвязывающие свойства рецепторного белка. Анализ проводили в 96-луночных микропланшетах (ООО «Хема-медика», Россия). В работе использовали ПСБ и моноклональное антитело к нему («Glory Sciences Co., Ltd», Китай), конъюгат антивидовых антител (иммуноглобулины козы против иммуноглобулинов мыши) с пероксидазой («Sigma-Aldrich», США) и применяли препараты антибиотиков пенициллинового (пенициллин G, ампициллин, амоксициллин) и цефалоспоринового рядов (цефалексин, цефтиофул, цефоперазон, цефепим) («Sigma-Aldrich», США).

По этой группе и проводили биоконъюгирование с белковой молекулой методом активированных эфиров с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) – карбодиимид гидрохлорида и N-гидроксисульфосукцинимид («Thermo Fisher Scientific», США). Полученные конъюгаты характеризовали с помощью MALDI-TOF и спектрофотометрически. Было установлено, что присоединение гаптена вызывает гипсохромный сдвиг максимума и увеличение интенсивности поглощения белка в ближней ультрафиолетовой области. Из анализа спектров MALDI-TOF найдено, что содержание антибиотиков в белке составило 18 и 15 моль на моль белка соответственно для цефалексина и ампициллина. Связывающие свойства полученных конъюгатов исследовали в системах рецепторного анализа. Установлено, что происходит взаимодействие ПСБ с его лигандами на твердой фазе. При этом конъюгированный ампициллин характеризуется более высокой активностью по сравнению с цефалексином в составе его белкового конъюгата, что выражается в больших количествах связанного рецептора в единицах оптической плотности при 450 нм, оно составило соответственно 2,0 и 1,5.

Выполнены исследования для обеспечения надлежащих условий протекания лиганд-рецепторного взаимодействия в тест-системе и выбраны оптимальные концентрации всех биохимических реагентов, белково-солевые составы и значения pH буферных растворов, а также температурные и временные режимы реакции связывания. Проведена сравнительная характеристика применения полученных белковых конъюгатов бета-лактамов в качестве твердофазных лигандов. По результатам оптимизации конъюгированный антибиотик иммобилизовали в концентрации 0,1 нг/мл. Оптимальный для тест-системы комплекс между ПСБ и моноклональным антителом к нему формировался при мольном соотношении рецептора и иммуноглобулина, равным 2:1. Установлено, что наилучшими для протекания гетерофазного лиганд-рецепторного взаимодействия являются среды с pH 7,4, температура инкубации 20–25° С и выдерживание системы в течение 0,5–1 ч.

Таблица – Параметры калибровочных кривых при использовании различных стандартных растворов бета-лактаменных антибиотиков для конкурентного ингибирования связывания ПСБ с ампициллином на твердой фазе

Стандарт	IC ₅₀ , нг/мл	Диапазон концентраций, нг/мл	ПР, %
Пенициллин G	0,35±0,05	0,03 – 6,0	145,7
Ампициллин	0,51±0,04	0,03 – 9,0	100,0
Амоксициллин	0,52±0,04	0,03 – 9,0	98,0
Цефалексин	60,0±1,0	3,0 – 900,0	0,85
Цефалеразон	0,85±0,10	0,03 – 9,0	60,0
Цефтиофул	2,61±0,05	0,30 – 90,0	19,6
Цефепим	1,35±0,03	0,03 – 60,0	37,8

Для определения аналитических и биохимических характеристик одной из разработанных версий тест-системы, включающей конъюгированный ампициллин в качестве твердофазного лиганда ПСБ, проведено сравнительное исследование с использованием различных антибиотиков в качестве стандартных препаратов (калибраторов). Калибровочные кривые получены для семи наиболее применяемых в сельскохозяйственной практике бета-лактаменных антибиотиков (трех пенициллинов и четырех цефалоспоринов). Результаты представлены в таблице. Чувствительность метода оценивали по IC₅₀, что соответствует концентрации антибиотика в растворе, обеспечивающей 50 % ингибирование связывания рецептора с твердофазным лигандом. Перекрестную реактивность (ПР) рассчитывали по формуле: ПР (%) = IC₅₀(ампициллин)/ IC₅₀(другие антибиотики)·100. Установлено, что связывающая активность бета-лактаменных антибиотиков по отношению к рецептору уменьшается в следующем ряду пенициллин G > ампициллин > амоксициллин > цефалеразон > цефепим > цефтиофул > цефалексин. Калибровочная кривая для ампициллина характеризуется хорошей линейностью в диапазоне концентраций 0,03–9,0 нг/мл и IC₅₀ = 0,51±0,05 нг/мл (n=3). Калибровочные графики, полученные для других бета-лактамов, характеризовались IC₅₀ в широком диапазоне 0,35–60,0 нг/мл, а перекрестная реактивность составила 0,85–145,7 %.

Для установления аналитических параметров тест-системы и соответствия ее назначению выполнено сравнительное исследование с использованием проб молока и коммерческого иммуноферментного набора Penicillin ELISA («EuroProxima B.V.», Нидерланды) для определения пенициллинов.

В работе проведено тестирование образцов цельного сырого молока, не содержащих пенициллины. Также были приготовлены «положительные» образцы путем внесения в молоко ампициллина, пенициллина G и амоксициллина в диапазоне концентраций 0,25–1,0 нг/мл, тщательного перемешивания и выдерживания для равномерного распределения антибиотиков в молочном матриксе. При постановке рецепторного и иммуноферментного анализов образцы молока обезжиривали и разводили в 2 раза соответствующим буферным раствором. Показана хорошая корреляция результатов, получаемых с помощью разработанной рецепторноферментной системы и коммерческого иммуноферментного набора. Коэффициент вариации результатов измерений разработанной тест-системой не превышал 10 %, а открытие добавок различных антибиотиков составило 98,4±2,1 %, 108,4±3,2 % и 96,8±2,3 % соответственно для проб с ампициллином, пенициллином G и амоксициллином.

Таким образом, разработанная тест-система имеет показатели чувствительности, прецизионности и групповой специфичности в отношении пенициллинов и цефалоспоринов, удовлетворяющие современным требованиям к скрининговым системам биоанализа и может служить основой нового набора реагентов для контроля содержания бета-лактамовых антибиотиков в пищевой продукции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mitchell J.M. [et al.] Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance (1998) *J Food Protect.* V. 61. P. 742-756.
2. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии 13.02.2018 № 28 (2018) О максимально допустимых уровнях остатков ветеринарных лекарственных средств (фармакологически активных веществ), которые могут содержаться в переработанной пищевой продукции животного происхождения, в том числе в сырье, и методиках их определения. <http://pravo.by/document/?guid=3871&p0=F91800044>
3. European Commission. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. (2010) *Official Journal of the European Union*, L 15/10, https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_en.pdf.
4. Kantiani L., Farre M., Barcelo D. Analytical methodologies for the detection of b-lactam antibiotics in milk and feed samples (2009) *Trends in Analytical Chemistry.* V. 28 (6). P. 729–744.