

УДК 57.083

ИММУНОАНАЛИЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛНОРАЗМЕРНЫХ И ФАГОВЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ (ОБЗОР)

© 2024 г. О. И. Гулий^{1, *}, Л. А. Дыкман^{1, **}

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов — обособленное структурное подразделение
Федерального исследовательского центра “Саратовский научный центр Российской академии наук”,
Саратов, 410049 Россия

*e-mail: gulyi_olga@mail.ru

**e-mail: dykman_l@ibppm.ru

Поступила в редакцию 30.01.2024 г.

После доработки 21.02.2024 г.

Принята к публикации 28.02.2024 г.

Широкое применение антибиотиков, приводящее к антибиотикорезистентности и появлению антибиотиков в окружающей среде и продуктах питания, стимулирует развитие новых методов контроля антибактериальных препаратов в объектах окружающей среды. Одно из перспективных направлений по развитию методов определения антибиотиков принадлежит сенсорным технологиям. Ключевым моментом при развитии сенсорных систем является подбор чувствительного (распознающего) элемента. Одним из самых популярных методов распознавания антибиотиков является использование антител. В работе представлены основные иммуносенсорные системы, основанные на регистрации взаимодействия “антиген-антитело” и показаны преимущества и недостатки использования поликлональных и моноклональных антител. Отдельно описана возможность применения фаговых антител для определения антибиотиков.

Ключевые слова: антитела, антибиотики, иммуноанализ, фаговый дисплей, биосенсоры

DOI: 10.31857/S0555109924040016 EDN: SBJQUY

Распознавание биомолекул имеет решающее значение не только для своевременной диагностики соматических и инфекционных заболеваний, но и при контроле качества пищевых продуктов и экологическом мониторинге. Антибиотики — важный класс препаратов, предназначенных для лечения бактериальных заболеваний человека и животных, кроме того, антибиотики широко используются в сельском хозяйстве и пищевой промышленности с начала 1940 гг. Практика использования антибиотиков в ветеринарной медицине произвела революцию в отрасли. Антибиотики в основном используются для лечения инфекций, например, лечения респираторных и кишечных инфекций на ранней стадии жизни животных или для лечения бактериальных инфекций, таких как мастит, на взрослой стадии [1]. Кроме того, антибиотики активно применяются в качестве корма в субтерапевтических концентрациях для ускорения роста животных. Злоупотребление антибиотиками создало серьезную угрозу экологии, поскольку антибиотики и продукты их деградации попадают в объекты окружающей среды. Повсеместное

распространение антибиотиков приводит к ухудшению здоровья и качества жизни человека.

Одним из важнейших мероприятий, направленных на ограничение распространения антибиотиков в окружающей среде является мониторинг остатков антибактериальных препаратов. В связи с этим актуальной является проблема контроля содержания антибиотиков в лекарственных формах, а также их определение в биологических жидкостях, в продуктах питания, сточных водах фармацевтических предприятий и других объектах. Стандартные методы определения антибиотиков обладают высокой чувствительностью, но требуют трудоемких этапов предварительной обработки образца, что увеличивает их стоимость. Поэтому разрабатываются новые технологии, направленные на экспресс-анализ антибиотиков. Одной из наиболее перспективных технологий для экспресс-анализа антигенов являются биосенсоры. Биосенсорные методы анализа имеют довольно широкое применение и постепенно становятся неотъемлемой частью клинической диагностики и экологического мониторинга. Решающей задачей при разработке биосенсоров является

подбор биоселективного агента (элемента распознавания), который обеспечивает специфичное связывание с целевым аналитом, которое фиксируется датчиком. В качестве узнающих биоспецифических молекул в биосенсорах чаще всего используют антитела, поскольку специфичное взаимодействие антиген-антитело обеспечивает уникальную избирательность и высокую чувствительность сенсоров, которые характеризуются простотой использования, надежностью, малым временем отклика. Иммуноаналитические тест-системы являются одним из самых удобных методом мониторинга таких соединений, как антибиотики, гормоны, витамины, нейромедиаторы, пестициды и др. в крови людей и животных, в мясных и молочных продуктах, в культуральных средах [2, 3].

В статье приводится обзор современных методов определения антибиотиков с помощью иммуносенсорных систем на основе полноразмерных (поликлональных, моноклональных) и фаговых антител. Хотя в обзоре и не приведена полная характеристика всех существующих разработок по иммунодетекции антибиотиков, в ней подробно обсуждаются различные распространенные методы иммуноанализа, их преимущества и недостатки в отношении обнаружения широкого спектра антибиотиков разных групп.

АНТИБИОТИКИ И ВАЖНОСТЬ ИХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Антибактериальные препараты являются одним из наиболее важных препаратов, используемых в здравоохранении. Однако их эффективному применению препятствует огромное и широко распространенное во всем мире явление бактериальной резистентности. Бактериальная антибиотикорезистентность ускоряется из-за неконтролируемого и иногда неадекватного применения противомикробных препаратов в медицине, широкого использования в ветеринарии, а также присутствия антибактериальных препаратов в окружающей среде и продуктах питания. В результате возникает необходимость активизации поиска новых препаратов антибиотиков и ограничения их распространения в окружающей среде.

В последнее время внимание человечества обращено на безопасность пищевых продуктов, ожидается, что к 2030 г. потребление антибактериальных препаратов достигнет более чем 100000 тонн в год [4]. Большое количество неиспользованных антибиотиков, их метаболитов и остатков попадают различными путями в окружающую среду, что влияет на природные экосистемы, а также способствует развитию антибиотикорезистентности бактерий.

Антибиотики применяют не только для лечения в медицине и ветеринарии, но и в качестве стимуляторов роста скота, при транспортировке

продуктов питания, в пчеловодстве [5]. Остатки антибиотиков являются ключевым объектом мониторинга качества пищевых продуктов. Чрезмерное попадание антибактериальных препаратов через пищу приводит к онкологическим заболеваниям, повреждению репродуктивной системы или тератогенности [6]. Небезопасная пища обычно содержит один или несколько антибиотиков. За счет синергизма сосуществование нескольких антибиотиков в одном продукте может повысить их токсичность, поэтому важно разрабатывать методы, способные определять несколько антибиотиков в одной пробе [7].

В мясе, печени, почках, молоке, твороге, сметане, сыре, яйцах, рыбе, меде и других продуктах питания достаточно часто обнаруживают остаточные количества антибиотиков, что предопределяет необходимость проведения выборочного, периодического или систематического их контроля. При реализации программ по обеспечению продовольственной безопасности особое внимание уделяют качеству молока как стратегически важного продукта питания. На его пищевую ценность влияет множество факторов, прежде всего, состояние здоровья животных, от которых оно было получено. Срок годности молока, как сырья для производства готовой продукции, весьма непродолжителен. Поэтому своевременный и повсеместный контроль наличия в молоке остаточных количеств ветеринарных препаратов, в том числе антибиотиков, считается приоритетной задачей. Важность контроля содержания антибиотиков невозможно переоценить по той причине, что молочные продукты используются в качестве ингредиентов при производстве разнообразных продуктов питания, в том числе для детей [8]. В связи с этим проблема определения содержания антибиотиков и их метаболитов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды представляется весьма актуальной.

Для определения антибиотиков используют стандартные, успешно зарекомендовавшие себя методы анализа, такие как: микробиологические, спектрофотометрические, флуориметрические, хемилюминесцентные, различные варианты хроматографических методов, в том числе высокоэффективную жидкостную хроматографию и хромато-масс-спектрометрию, инверсионную вольтамперометрию, электроаналитическое определение с модифицированными электродами, поверхностный плазмонный резонанс, биохимические методы (капиллярный электрофорез), колориметрические методы и др. [9–12]. Основные аналитические методы, используемые для определения антибиотиков, представлены на рис. 1 [1].

Несмотря на значительное количество разработанных методов определения антибиотиков, одной из наиболее перспективных технологий для экспресс-анализа антибактериальных препаратов



Рис. 1. Аналитические методы определения антибиотиков [1].

являются биосенсорные системы. Биосенсоры позволяют проводить качественный и количественный анализ антибиотиков, что делает их весьма востребованными при необходимости крупномасштабного анализа антибактериальных препаратов. Биосенсоры различной конструкции и техники применялись для поиска антибактериальных веществ в объектах окружающей среды и пищевых продуктов.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БИОСЕНСОРАХ

Согласно действующему определению Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry), биосенсор представляет собой автономный интегрированный биорецептор/преобразователь, устройство, предназначенное для получения выборочной количественной или полуквантитативной аналитической информации с использованием элемента биораспознавания [13]. Биосенсорные системы можно разделить в зависимости от типа биологически чувствительного элемента на три группы: ферментные, аффинные и клеточно-тканевые [14, 15]. В качестве элемента биораспознавания в биосенсорах используются следующие компоненты: ферменты, антигены, антитела, гормоны, клетки, органеллы и др. Общая схема сенсора представлена на рис. 2. Биосенсоры обладают высоким потенциалом для обнаружения антибиотиков из-за их высокой специфичности, являются идеальным аналитическим инструментом для быстрого получения информации о составе сложных систем.

Остаточные количества антибиотиков в пищевых продуктах могут привести к серьезным проблемам со здоровьем и безопасностью человеческого организма. Быстрый и своевременный анализ антибиотиков с использованием простых и чувствительных методов пользуется большим спросом. Биосенсоры, в том числе на основе

наноматериалов, представляют собой аналитическое оборудование с полезными характеристиками, такими как простота, низкая цена, возможность установки на месте, высокая точность и чувствительность для обнаружения аналитов [16, 17].

К молекулам распознавания в составе биосенсоров предъявляются высокие требования. Лиганды должны быть высокоспецифичными, стабильными и экономичными в производстве. Принцип образования комплекса антиген-антитело широко используется в методах иммуноанализа для определения остаточных количеств антибиотиков, особенно в качестве рутинных скрининговых методов. Среди иммунохимических методов, применяемых, в том числе, для детекции антибиотиков, ранее активно использовали радиоиммунологический и иммунофлуоресцентный анализы. В настоящее время чаще применяют различные варианты иммуноферментного анализа (ИФА), а также твердофазного иммуноанализа (дот-блот, иммунохроматография) [18]. Антитела активно используются как датчики биоаффинных взаимодействий в различных сенсорных системах, успешно применяются для разработки разнообразных биочипов и биосенсоров. Этот же принцип широко применяется при конструировании биосенсоров. Аффинные биосенсоры являются одной из бурно развивающихся областей иммуноанализа, где ключевым моментом является регистрация формирования комплекса антиген-антитело [19, 20]. Группа биосенсоров (используемых, в том числе, для определения антибиотиков), основанная на использовании иммунохимических реакций биораспознавания получила название иммуносенсоры.

Иммуносенсоры – устройства, состоящие из специфичного антитела (антигена), связанного с преобразователем, и электронного устройства, отображающего сигнал о связывании с

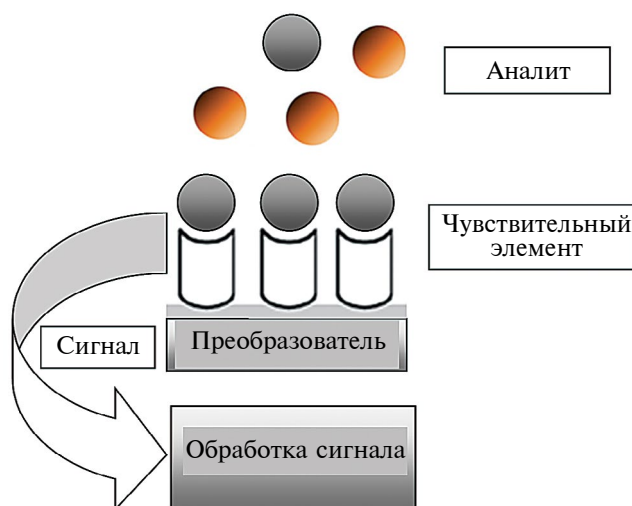


Рис. 2. Общая схема биосенсора.

соответствующим лигандом. С 1980-х годов активно развивается разработка биосенсоров для скрининга остатков антибиотиков, первыми биорецепторами которых являлись антитела [21]. Наиболее часто применяемые иммуносенсоры — электрохимический и оптический, последний чаще всего является биосенсором поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Хотя иммуносенсоры очень селективны, скорость анализа зависит от времени инкубации, необходимого для образования комплекса антиген-антитело [22, 23].

Иммуносенсоры используются для оценки качества лекарственных препаратов, то есть для качественного и количественного определения веществ в анализируемой пробе после реакции связывания антигена со специфичными антителами и последующей детекции. Качественный анализ позволяет получить положительный или отрицательный результат содержания антигена или антитела в исследуемом веществе. При проведении количественного анализа определяют содержание того или иного антигена или антитела в исследуемом веществе с использованием калибровочного графика.

Специфические взаимодействия антиген-антитело обеспечивают уникальную избирательность и высокую чувствительность иммуносенсоров, простоту в использовании, надежность, малое время отклика. Основные принципы современных методов иммуноанализа представлены в обзорах [18, 20, 24].

АНТИТЕЛА ДЛЯ ИММУНОАНАЛИЗА

Антитела — широко распространенный инструмент современной биохимии и микробиологии, специфичное взаимодействие антиген-антитело лежит в основе разнообразных иммунохимических реакций [25]. Высокоаффинные антитела, связывающие антигены, используются в качестве

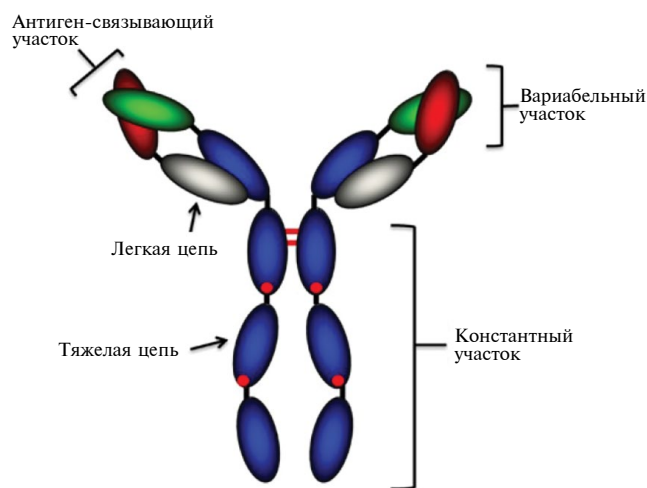


Рис. 3. Структура антител [26].

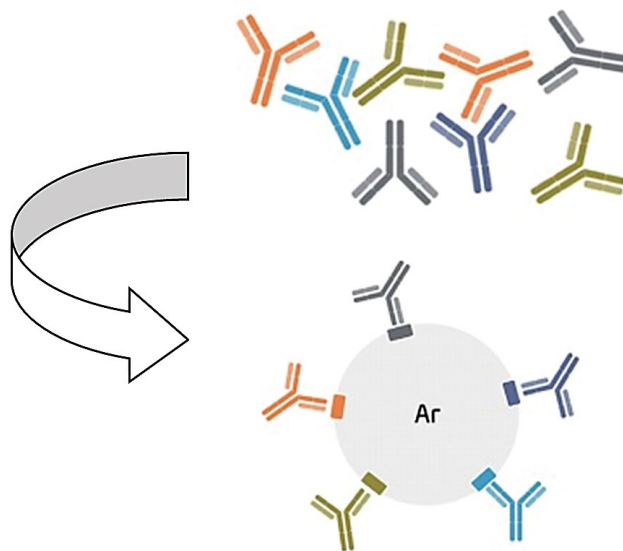


Рис. 4. Общая схема действия поликлональных антител с анализируемым агентом.

чувствительного компонента большинства иммуносенсоров. Антитела в зависимости от технологии получения могут быть поликлональными, моноклональными и рекомбинантными.

Антитела, образующиеся в сыворотке крови в разных клонах В-лимфоцитов и связывающиеся с различными антигенными детерминантами (эпитопами) молекулы-мишени (антигеном), называют поликлональными антителами. Структура антител представлена на рис. 3 [26].

Поликлональные антитела широко используются в иммунодиагностике и для их получения иммунизируют лабораторных животных. Активность поликлональных антител представляет собой комбинацию антител различного антигенсвязывающего действия, что делает иммунохимический метод менее чувствительным. Присущая поликлональным антителам вариabельность объясняется разным иммунным статусом экспериментальных животных. Поликлональные антитела продуцируются многочисленными клонами. Общая схема взаимодействия поликлональных антител с анализируемым агентом представлена на рис. 4.

Использование поликлональных антител имеет следующие недостатки при их применении в диагностике:

- содержание отдельных антител в поликлональном препарате может варьировать от одной партии к другой;
- поликлональные антитела нельзя применять, если необходимо различить две подобные мишени, например, когда патогенная (мишень) и

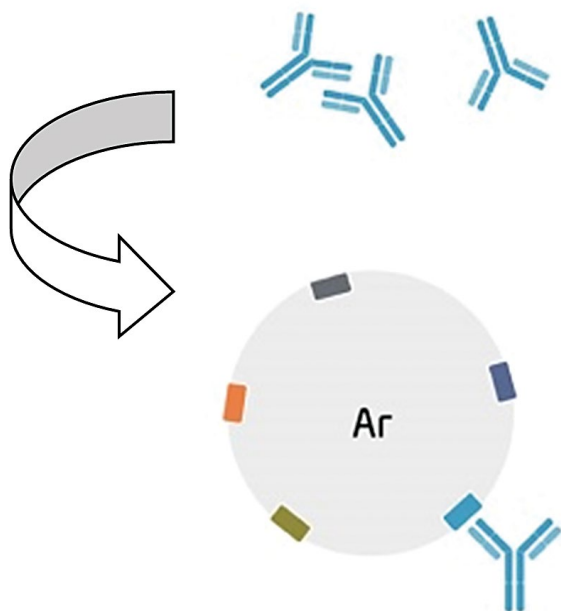


Рис. 5. Общая схема действия моноклональных антител с анализируемым агентом.

непатогенная (не-мишень) формы различаются единственной детерминантой.

Несмотря на указанные недостатки поликлональные антитела широко используются в иммунодиагностике и лабораторных исследованиях, прежде всего из-за низкой стоимости их получения, также для поиска вариантов белка, если неизвестно, какой именно эпитоп открыт для связывания с антителами.

В дополнение к поликлональным были разработаны препараты антител, специфичных к одной определенной антигенной детерминанте, то есть препараты моноклональных антител. Моноклональные антитела синтезируются одним клоном, происходящим от одного предшественника плазматической клетки, направлены только против одного конкретного эпитопа иммуногенного вещества, идентичны по своему строению, относятся к одному классу/изотипу/аллотипу иммуноглобулинов, имеют одинаковую структуру лиганд-связывающего сайта и обладают одинаковыми специфичностью и родством, как показано на рис. 5.

Преимущество моноклональных антител заключается в возможности стандартизации препаратов антител. Определенная клеточная линия гибридомы при производстве моноклональных антител обеспечивает стабильное производство антител и не зависит от статуса животного, как в случае с поликлональными антителами. Моноклональные антитела используют в аналитических и прикладных исследованиях для отработанных методик и стандартных задач (изготовление лекарств, иммунодиагностика и проч.). Важнейший фактор, определяющий широкое использование моноклональных

антител в различных областях заключается в их уникальной специфичности к определенному эпитопу.

У гибридомной технологии, несмотря на преимущества, есть ограничения: низкая иммуногенность некоторых целевых молекул, высокая стоимость наработки, непредсказуемый иммунный ответ в связи с происхождением антител от грызунов, большие временные затраты и потребность в клетках миеломы [27].

Рекомбинантные антитела представляют собой моноклональные антитела, генерируемые *in vitro* (без использования животных) посредством технологии рекомбинантных ДНК. Рекомбинантные антитела преодолевают многие ограничения, свойственные обычным моноклональным антителам [28]:

- рекомбинантные антитела могут быть получены против нестабильных, токсичных, летучих, иммуносупрессивных или неиммуногенных антигенов;
- рекомбинантные антитела могут быть сконструированы так, чтобы иметь аффинность от пикомолярного до фемтомолярного диапазона;
- производство рекомбинантных антител занимает приблизительно от 2 до 8 нед, в то время как при иммунизации животных весь процесс займет более 4 месяцев;
- нет надобности в содержании животных;
- в отличие от клеточных линий гибридомы, запасы рекомбинантных антител не имеют риска истощения.

Развитие технологий дисплеев (фаговых, бактериальных, дрожжевых, рибосомных и мРНК) стало отправной точкой для продукции различных форматов рекомбинантных антител с необходимыми характеристиками. Рекомбинантные антитела, такие как Fab-фрагменты или антитела с одноцепочечным вариабельным фрагментом (scFv) по сравнению с полноразмерными природными антителами, имеют меньшую молекулярную массу и повышенную молекулярную подвижность, что обеспечивает им более легкий доступ к эпитопу антигена. Это делает их альтернативой классическим моноклональным антителам.

Метод фагового дисплея — эффективный метод выделения моноклональных антител с высокой аффинностью к целевой молекуле. Метод фагового дисплея основан на манипуляциях с генами покровных белков нитевидных фагов — в основном M13 и Fd. Антитела, полученные с помощью фагового дисплея, проходят несколько этапов отбора по аффинности и могут использоваться в качестве селективных рецепторов в биосенсорах [29]. Показано, что фаговые библиотеки представляют собой богатый источник фрагментов антител, связывающихся с белковыми и гликопротеиновыми антигенами с наномолярным родством и высокой специфичностью. Поэтому фаговые антитела

используются в диагностике из-за их специфичности и аффинности. Многие платформы, такие как иммунохроматографический анализ, ИФА и иммунофлуоресценция, позволяют быстро и точно идентифицировать целевые антигены, обнаруженные в образце [29].

Огромный потенциал комбинаторных фаговых библиотек открывает беспрецедентную возможность обнаруживать бактерии, вирусы и токсины, игнорируя использование трудоемких диагностических процедур. Одним из важных компонентов при проектировании биосенсора является выбор подходящего сенсорного элемента. Фаговый дисплей фрагментов антител является перспективным методом получения стабильных сенсорных элементов. Фаговые антитела высокоэффективны при обнаружении желаемого аналита; они имеют преимущества перед природными иммуноглобулинами и в ряде случаев перед их растворимыми фрагментами. Сама технология дешевая и быстрая, и она позволяет быстро получить репертуар фрагментов антител посредством саморепликации фага. Этот репертуар можно даже расширить за счет искусственного синтеза. Другим важным преимуществом фаговых антител является возможность создания гибридных молекул с маркерными белками, что позволяет эффективно детектировать иммунохимические реакции. Кроме того, с появлением фагового дисплея появилась возможность вырабатывать антитела к гаптенам, в том числе антибиотикам.

ПОЛНОРАЗМЕРНЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Загрязнение пищевых продуктов остатками антибиотиков стало всемирной проблемой из-за интенсивного и неправильного использования антибиотиков. Разработка быстрых, высокопроизводительных, простых и экономичных методов скрининга для обнаружения остатков антибиотиков является важным требованием в качестве альтернативы традиционным анализам. Иммуноанализ является широко распространенным перспективным методом, способным достичь условий аналитических методов при оценке защиты пищевых продуктов и окружающей среды [18, 30].

Ранее часто для определения антибиотиков использовали радиоиммунологический и иммунофлуоресцентный анализы. Так описан радиоиммунологический анализ для обнаружения остатков левомецетина (хлорамфеникола) в яйцах, молоке и мясе. Для тканей и других пищевых продуктов животных, получавших левомецетин (кур, коров, свиней), предел обнаружения составил около 200 нг/кг [31]. Этот же антибиотик было предложено определять методами иммунохемилюминесцентной детекции на мембранных носителях [32] и иммунодот-анализа [33].

Также иммунодот-анализ использовали для детекции антибиотиков группы аминогликозидов (гентамицина, неомицина, канамицина), линкозамидов (клиндамицина, линкомицина), фторхинолонов (пемфлосацина, энрофлоксацина, ципрофлоксацина, норфлоксацина) [34–37]. Фторхинолоновый антибиотик левофлоксацин также было предложено определять методом флуоресцентно-поляризационного иммуноанализа, предел обнаружения составил 0.5 нг/мл [38].

Для детекции антибиотика из группы трициклических гликопептидов ванкомицина разработан гомогенный конкурентный иммуноанализ турбидиметрического ингибирования [39]. Антитела и частицы латекса связываются, образуя агрегаты, которые увеличивают мутность раствора. Свободное лекарственное средство из образца конкурирует за антитела, тем самым снижая скорость агрегации частиц. Скорость агрегации обратно пропорциональна концентрации препарата в образце.

Особенность методов электрохимического анализа состоит в том, что в анализируемую систему не вводятся какие-либо химические реагенты, а используются процессы, связанные с переносом ионов или электронов. Перспективы использования электрохимического анализа для определения антибиотикочувствительности продемонстрированы в работах [24, 40, 41]. Привлекательность электрохимических методов для определения антибиотиков обусловлена их низкой общей стоимостью, быстрым временем анализа и возможностью миниатюризации аналитической платформы [41–43].

Так, например, в работе [44] описан электрохимический биосенсор на основе аффинности для безметочного обнаружения остатков цефтиофура в образцах мяса. Датчик использует иммуноанализ на самособранных монослоях для нацеливания на антибиотик с помощью электрохимической импедансной спектроскопии для исследования межфазных емкостных изменений, когда цефтиофур связывается с поверхностью датчика. Разные модификации электрохимических сенсорных систем разработаны для определения левомецетина [45, 46].

Магнитные наночастицы, модифицированные хитозаном, также использовались для создания простых и недорогих электрохимических иммуносенсоров с моноклональными антителами против антибиотиков. Магнитные наночастицы обладают хорошей биосовместимостью, низкой токсичностью и высоким переносом электронов; пленки хитозана использованы из-за их высокой механической прочности [47]. Разработан электрохимический биосенсор для определения пенициллина G путем иммобилизации антител к пенициллину в поддерживаемой двухслойной липидной мембране, модифицированной наночастицами золота [48].

Возможности амперометрического определения тетрациклина с помощью амперометрического магнитоиммуносенсора, включающего использование селективного захватывающего антитела, иммобилизованного на поверхности магнитных шариков, функционализированных белком G, и угольных электродов с трафаретной печатью показаны в работе [49]. Был представлен амперометрический иммуносенсорный метод определения β -лактамных антибиотиков в сыворотке и моче человека. Этот метод оказался очень чувствительным, дешевым и воспроизводимым; значение предела обнаружения составило около 10–11 М [50]. Отдельные направления применения антител в качестве распознающих компонентов связано с развитием иммуносенсоров на основе трафаретного углеродного рабочего электрода [51], а также комбинирования с пьезоэлектрическим резонатором [52–54]. Принципы конкурентного иммуноанализа реализованы в иммуносенсоре на основе интегрированной микро-электромеханической системы, содержащей восемь золотых микроэлектродов (μ WE) для определения тетрациклина [55].

Согласно данным, представленным в работе [1] оптические биосенсоры на основе ППР довольно часто используются для обнаружения или количественного определения остатков антибактериальных или противомикробных препаратов в пищевой промышленности. Использование метода ППР является предпочтительным выбором из-за его надежности и высокой чувствительности, а также практичности с точки зрения высокой производительности, надежности и экономической эффективности. Оптические иммуносенсоры для скрининга остатков ампициллина описаны в работах [56, 57]. Разновидности сенсорной ППР-системы для определения антибиотиков на основе как прямого (с иммобилизацией антитела), так и конкурентного (с иммобилизацией антигена) методов описаны в работе [58]. Некоторые другие виды иммуносенсоров описаны в работах [24, 59, 60].

Широко распространенным методом детекции антибиотиков является ИФА. Его использовали, в частности, для определения антибиотиков аминокликозидного ряда (канамицина и тобрамицина) [61–65], а также тетрациклина [66].

В настоящее время наиболее популярным методом определения антибиотиков в биологических средах и объектах окружающей среды становится иммунохроматографический анализ [67]. С его помощью детектируют антибиотики ряда хинолонов, тетрациклинов, β -лактамов, сульфонамидов, левомицетина, стрептомицина и др. [68]. В частности иммунохроматографический анализ использовали для определения энрофлоксацина [69], цефалексина [70], офлоксацина [71], линкомицина [72], неомицина [73], тетрациклина [74], пенициллина [75]. Разработаны иммунохроматографические тесты

для одновременного обнаружения сразу нескольких антибиотиков в одном образце [76–79].

Иммунохроматографический анализ (также называемый lateral flow immunoassay, strip test) представляет собой иммунохимический тест, основанный на хроматографии (разделения компонентов образца на основе различий в их движении через сорбент) и иммуноанализе, предназначенного для определения наличия или отсутствия целевого аналита. Он основан на том же принципе, что и другие твердофазные иммунохимические методы анализа (ИФА дот-блот, дипстик-тест), с тем отличием, что иммунологическая реакция осуществляется на хроматографической бумаге за счет капиллярного действия. Для иммунохроматографического анализа используются две разновидности специфических антител против антигена — меченные и нативные. Когда жидкий образец наносят на подложку для образцов, антиген в образце образует иммунокомплекс с меченым красителем антителом. Комплекс антиген-антитело мигрирует вместе с жидким образцом и вступает в контакт с немеченым антителом, иммобилизованным на мембране, с последующим образованием иммунокомплекса. По мере того, как все больше и больше комплексов антиген-антитело останавливаются на тестовой линии, она дает окрашенную полосу, которая свидетельствует о присутствии искомого антигена в образце. Поскольку жидкость образца проходит через мембрану очень быстро, это позволяет определить наличие или отсутствие антигена в течение ~15 мин [67].

Для усиления чувствительности анализа предложен способ, сочетающий недорогой, простой, быстрый иммунохроматографический анализ с методом гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). С помощью этого способа разработаны методики определения как отдельных антибиотиков, так и нескольких антибиотиков в одном образце [80–83].

Ведутся исследования по развитию современных иммуносенсоров для определения аминокликозидов [84]. Так, например, для количественного определения неомицина предложено использовать поликлональные антитела, иммобилизованные на бумажной полоске, модифицированной одностенными нанотрубками [85]. Предел обнаружения составляет 0.04 нг/мл, относительно широкий линейный диапазон обнаружения от 0.2 до 125 нг/мл.

Новым направлением исследований является развитие иммуносенсоров для одновременного определения нескольких антибиотиков [20, 86]. Так, например, в работе [87] показана возможность одновременного обнаружения тетрациклина, стрептомицина и пенициллина в молоке с использованием в качестве узнающего компонента антител, с пределом детекции 5 пг/мл для каждого из исследуемых препаратов. В табл. 1 представлены

Таблица 1. Варианты иммуносенсоров для определения ряда антибиотиков с использованием поликлональных и моноклональных антител

Антибиотик	Тип антител	Метод	Предел (диапазон) определения	Ссылки
Левомецитин	Поликлональные	Радиоиммунологический анализ	200 нг/кг	[31]
Левомецитин	Поликлональные	Хемилюминесцентный иммуноанализ	0.01 – 100 нг/мл	[32]
Энрофлоксацин Ципрофлоксацин Норфлоксацин	Поликлональные	Дот-иммуноанализ	20 мкг/кг	[36]
Фторхинолоны	Поликлональные	ИФА Дот-иммуноанализ	≤10 мкг/кг (ИФА) ≤20 мкг/кг (дот-анализ)	[37]
Левовфлоксацин	Поликлональные	Флуоресцентно-поляризационный иммуноанализ	0.5 нг/мл	[38]
Тетрациклин	Моноклональные	Электрохимический иммуносенсор	0.006 мкг/л Диапазон 0.05 – 100 нг/мл	[42]
Ампициллин	Анти-ампициллиновые антитела	Электрохимический иммуносенсор	0.028 мкг/мл Диапазон 0.0325 – 64 мкг/мл	[43]
Цефтиофур	Антитела к цефтиофору	Электрохимический иммуносенсор	0.01 нг/мл	[44]
Левомецитин	Моноклональные	Амперометрический иммуносенсор	3.2×10^{-3} – 3.2×10^6 нг/л	[45]
Тетрациклин	Моноклональные	Электрохимический иммуносенсор	0.03 мкг/л Диапазон 0.08 – 1 нг/мл	[47]
Пенициллин G	Моноклональные	Электрохимический иммуносенсор	2.7×10^{-4} нг/л Диапазон 3.34×10^{-3} – 3.34×10^3 нг/л	[48]
Тетрациклин	Поликлональные	Амперометрический иммуносенсор	44 нг/мл	[49]
Пенициллин G	Моноклональные	Амперометрический иммуносенсор	10^{-11} М	[50]
Тетрациклин	Поликлональные	Электрохимический иммуносенсор	≤ 1.0 мкг/кг	[51]
Полимиксин Тетрациклин	Поликлональные	Пьезоэлектрический иммуносенсор	25 – 450 нг/мл	[52]
Левовфлоксацин Ципрофлоксацин	Поликлональные	Пьезоэлектрический иммуносенсор	8 – 21 нг/мл	[53]
Ципрофлоксацин	Поликлональные	Пьезоэлектрический иммуносенсор	5 – 400 нг/мл	[54]
Тетрациклин	Поликлональные	Электрохимический иммуносенсор	1.2 пг/мл Диапазон 0.1 – 1000 пг/мл	[55]

Таблица 1. Окончание

Антибиотик	Тип антител	Метод	Предел (диапазон) определения	Ссылки
Ампициллин	Моноклональные	ППР иммуносенсор	0.087 мкг/л	[56]
Ампициллин	Моноклональные	ППР иммуносенсор	7.4×10^{-10} г/мл	[57]
Ампициллин	Моноклональные	ППР иммуносенсор	$10^{-3} - 10^{-1}$ М	[58]
Левифлоксацин	Поликлональные	Флуоресцентно-поляризационный иммуноанализ	1.0 нг/мл Диапазон 2.5–50 нг/мл	[59]
Тетрациклин	Поликлональные	Электрохимический иммуносенсор	0.01 мкг/л Диапазон 1–200 мкг/л	[60]
Канамицин	Моноклональные	ИФА	0.2 нг/мл	[62]
Канамицин Тобрамицин	Моноклональные	ИФА	0.83 нг/мл	[63]
Хинолоны Тетрациклины β-Лактамы Левомецетин Стрептомицин	Моноклональные	Иммунохроматография	1.2–80 нг/мл	[68]
Энрофлоксацин	Моноклональные	Иммунохроматография	0.935 мкг/кг	[69]
Цефалексин	Моноклональные	Иммунохроматография	0.39 мкг/кг	[70]
Офлоксацин	Моноклональные	Иммунохроматография	30 пг/мл	[71]
Линкомицин	Моноклональные	Иммунохроматография	0.008–0.8 нг/мл	[72]
Неомицин	Моноклональные	Иммунохроматография	0.1–10 нг/мл	[73]
Тетрациклин	Моноклональные	Иммунохроматография	2 мкг/л	[74]
Офлоксацин Левомецетин Стрептомицин	Моноклональные	Иммунохроматография	0.12–0.3 нг/мл	[76]
Ципрофлоксацин Левомецетин	Моноклональные	Иммунохроматография	20 пг/мл – 0.5 нг/мл	[77]
Канамицин	Анти-канамициновые антитела	ГКР иммуносенсор	2 пг/мл	[80]
Неомицин	Моноклональные	Иммунохроматография + ГКР	0.216 пг/мл	[80]
Левомецетин	Моноклональные	Иммунохроматография + ГКР	0.20 нг/мл	[82]
Неомицин	Поликлональные	Электрохимический иммуносенсор	0.04 нг/мл Диапазон 0.2–125 нг/мл	[85]

различные варианты иммуносенсоров для определения ряда антибиотиков с использованием поликлональных и моноклональных антител.

Отметим, что по чувствительности анализа иммунологические методы определения антибиотиков сопоставимы с традиционно используемыми микробиологическими и хроматографическими методами. Стандартный диапазон концентраций всех методов (0.1–100 нг/мл) охватывает диапазон концентраций рутинной дозы антибиотиков, который отвечает клиническим потребностям. Иммунологические методы хорошо коррелируют с традиционными методами (коэффициент корреляции > 0.9), при этом они проще в использовании, обладают хорошей производительностью, более экологичны, экономичны и практичны для больницы первичного звена, где нет дорогостоящего оборудования. Поскольку имеется широкая номенклатура коммерчески доступных реагентов, иммунологические методы являются часто используемыми методами обнаружения антибиотиков в клинике [88]. Из недостатков этих методов следует отметить большее количество образца, требуемое для анализа, несколько меньшую чувствительность и специфичность (во многом из-за большого размера молекулы иммуноглобулина по сравнению с молекулами антибиотиков) по сравнению хроматографическими методами. При этом биосенсоры — относительно новые аналитические инструменты — помогают избежать этих недостатков для простого, быстрого, недорогого, высокопроизводительного, специфичного и чувствительного обнаружения антибиотиков *in situ* [61, 89]. Помимо этого, наблюдается важная тенденция к миниатюризации скрининговых систем (чипы, микрочипы), а также к автоматизации. По этим причинам будущие разработки должны также включать новые исследования в области нанотехнологий для обеспечения контроля безопасности пищевых продуктов и объектов окружающей среды [90, 91].

Как видно из представленных данных, в иммуносенсорах для определения антибиотиков активно используются как поликлональные, так и моноклональные антитела, при этом разработанные системы направлены на обнаружение следовых количеств определенных антибиотиков. При всех достоинствах используемых антител, в последнее время все большее внимание уделяется антителам фагового происхождения и их применению для детекции различных биомолекул.

ФАГОВЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Иммуноанализ — это надежный, эффективный и точный метод анализа низкомолекулярных веществ (в том числе антибиотиков), которые могут присутствовать в пищевых продуктах. Однако

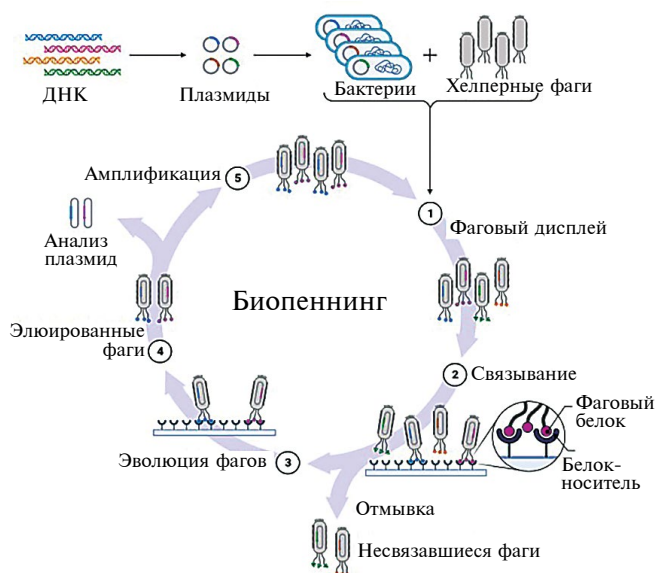


Рис. 6. Схема аффинной селекции антител из фаговой библиотеки [93].

традиционные поликлональные и моноклональные антитела ограничены использованием животных. С постепенным применением метода фагового дисплея в качестве эффективной технологии селекции *in vitro*, вариабельные одноцепочечные фрагменты иммуноглобулинов (scFv) представляют собой интересную альтернативу традиционным антителам. С использованием эффективно созданных исходных библиотек scFv и специально разработанных схем биопеннинга можно получать scFv, обладающие специфическими способностями распознавания. Рациональная стратегия мутагенеза еще больше повышает аффинность scFv и позволяет ей достичь уровня, которого невозможно достичь при иммунизации. Наконец, соответствующие меры прокариотической экспрессии обеспечивают стабильное и эффективное производство scFv [92].

Большой научный интерес представляет фаговый дисплей, направленный на получение и разработку антител к известным антигенам. Данная технология является выгодной заменой гибридной технологии, т.к. фаговая система заменяет все этапы работы по иммунизации животных и удалению селезенки простыми процедурами манипулирования с ДНК и бактериями, сокращая время получения стабильных клонов, продуцирующих антитела, с месяцев до недель и удешевляя процесс [28]. В дальнейшем, полученные таким образом антитела, могут быть использованы в качестве селективных рецепторов биосенсоров, т.к. они проходят несколько этапов отбора по аффинности — биопеннинга.

Биопеннинг — это метод, используемый для скрининга и отбора библиотек фагового дисплея

на наличие антител, которые специфически связываются с желаемой мишенью. Этот процесс включает в себя несколько этапов выделения и амплификации вариантов связывания, исключая при этом неспецифическое связывание. Ключевыми этапами биопэннинга являются: иммобилизация интересующего лиганда на твердой подложке, нанесение библиотеки фагового дисплея на твердую подложку, промывка для удаления несвязывающихся клонов, элюирование оставшихся связавшихся фагов с твердой подложки, повторная обработка, реамплификация элюированных фагов посредством бактериальной инфекции, повторение процесса, по меньшей мере, в течение трех раундов для обогащения вариантов связывания и исключения любых неспецифических связывающихся агентов, скрининг элюированных фагов из последнего раунда для идентификации и выделения клонов со специфическим связыванием (рис. 6). Каждый раунд биопэннинга увеличивает долю специфически связывающихся клонов в библиотеке фагового дисплея [93].

Фаговые антитела успешно используются для терапии [94, 95], для индикации вирусов [93, 96], бактерий и биомаркеров [27, 97]. Развитие технологии фаговой инженерии привело к созданию нового типа библиотек фагового дисплея, которые обладают огромным ресурсом диагностических/обнаруживающих зондов и универсальной конструкцией [27].

Для определения фармакодинамики лекарственных средств в организме хорошим инструментом является фаговый дисплей антител, позволяющий получать антитела к низкомолекулярным антигенам (гаптенам). В частности, с применением этой технологии были получены и апробированы в различных методах иммуноанализа фаговые антитела, специфичные к ампициллину [98] и канамицину [99]. С помощью метода дот-иммуноанализа показана их специфичность к определяемому антибиотику.

Метод конкурентного флуоресцентного поляризационного анализа с использованием фаговых антител был разработан для определения ветеринарного антибиотика моненсина, который широко применяется в кормах для жвачных животных. Чувствительность метода составила 0.03 мкМ [100].

Был разработан воспроизводимый конкурентный ИФА для определения ципрофлоксацина с использованием магнитных шариков в качестве носителя фаговых антител. Этот анализ показал пределы обнаружения и количественного определения 9.3 нМ и 33 нМ соответственно [101]. Метод непрямого конкурентного ИФА с использованием фаговых антител был предложен для детекции ципрофлоксацина в пищевых продуктах животного происхождения [102]. Этот же метод применяли для обнаружения макролидных антибиотиков

в целях мониторинга безопасности пищевых продуктов [103] и определения левомицетина в морепродуктах [104]. scFv против ампициллина было предложено применять в методе ИФА в качестве диагностического реагента при использовании антибиотиков у человека и животных, в качестве модели эффекта экспрессии в *Escherichia coli* молекул, связывающих антибиотики, а также для направленной эволюции в сторону высокой устойчивости к антибиотикам [105].

Для контроля лекарственной аллергии и создания диагностических тестов на β -лактамный антибиотик амоксициллин был разработан хемиллюминесцентный иммуноанализ с использованием фаговых антител [106].

* * *

Неадекватное применение антибактериальных препаратов ускорило явление бактериальной резистентности, что является огромной проблемой для здоровья человека и окружающей среды. Для обнаружения антибиотиков и их метаболитов в различных объектах окружающей среды перспективным направлением является использование современных методик иммуноанализа и биосенсорики [107].

Предложено большое количество коммерчески доступных реагентов и аналитических наборов для иммуноанализа антибиотиков. Так ИФА, являясь одним из наиболее часто используемых клинических методов определения антибиотиков, может использоваться для быстрого тестирования образцов с применением обычных биохимических анализаторов и коммерческих наборов [88]. В частности, коммерческие ИФА наборы для определения ряда антибиотиков выпускает фирма PerkinElmer (США), Roche Diagnostics (Швейцария), Siemens Healthineers (ФРГ) и др. [104, 108]. Также в последние годы различные коммерческие стрип-тесты на основе иммунохроматографического метода были произведены несколькими компаниями под разными торговыми названиями (Bioo AuroFlow™, PerkinElmer; Charm ROSA, CHARM Science, США; IDEXX SNAP, ThermoFisher Scientific, США). Такие тесты выявляют многочисленные антибиотики с высокими пороговыми значениями [89, 90]. Для анализа с использованием метода ППР широко используются аналитические системы Biacore™ (“Cytiva”, Швеция), SPReeta (“Texas Instruments”, США) и BioSuplar (“Mivitec”, ФРГ) [22, 58]. На основе иммунофлуоресцентного анализа была разработана мультифункциональная платформа Extensio (“Unisensor”, Бельгия), которая позволяет определить остаточные уровни 98 антибиотиков [8].

Разрабатываются новые модели иммуноанализа с применением машинного обучения и интеллектуальных наномашин [109, 110]. Учитывая преимущества разработки и применения иммунобиосенсоров в области детекции антибиотиков, в этом

обзоре представлены данные об использовании и перспективах применения биосенсоров для обнаружения антибактериальных веществ в окружающей среде и пищевых продуктах.

За последние три десятилетия поликлональные и моноклональные антитела стали наиболее важными классами биоспецифичных компонентов сенсорных систем при обнаружении антибиотиков. Разработка антител была ускорена благодаря технологиям рекомбинантной ДНК, которые позволили гуманизировать мышинные моноклональные антитела, сделать их пригодными для применения в качестве селективного агента. Фаговый дисплей антител — первая и наиболее широко используемая технология селекции *in vitro*. Он оказался надежной и универсальной платформой для получения антител. Учитывая высокую специфичность фаговых антител к антибиотикам, в дальнейшем они смогут составить конкуренцию антителам нефаговой природы при использовании в биосенсорах.

ФИНАНСИРОВАНИЕ. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 24-24-00309.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ. В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pauter K., Szultka-Młyńska M., Buszewski B. // *Molecules* 2020. V. 25. 2556. <https://doi.org/10.3390/molecules25112556>
2. Новые методы иммуноанализа / Ред. У.П. Коллинз, М.: Мир, 1991. 279 с. (Complementary Immunoassays / Ed. Collins, W.P., Chichester: Wiley&Sons, 1988.)
3. Mukhametova L.I., Eremin S.A. // *Front. Biosci. (Elite Ed)*. 2024. V. 16. 4. <https://doi.org/10.31083/j.fbe1601004>
4. Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson, T.P. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
5. Ayankojo A.G., Reut J., Nguyen V.B.C., Boroznjak R., Syritski V. // *Biosensors*. 2022. V. 12. 441. <https://doi.org/10.3390/bios12070441>
6. Ko E.-B., Hwang K.-A., Choi K.-C. // *Reprod. Toxicol.* 2019. V. 90. P. 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.08.006>
7. Fungo G.B.N., Uy J.C.W., Porciuncula K.L.J., Candelario C.M.A., Chua D.P.S., Gutierrez T.A.D. et al. // *Phage* 2023. V. 4. P. 55–67. <https://doi.org/10.1089/phage.2023.0007>
8. Соколова О. // *Животноводство России*. 2021. № 7. С. 34–36.
9. Курничная В.К., Касьяненко Г.Р., Киселева Т.В. // *Пищевая промышленность*. 2013. № 9. С. 60–63.
10. Zhang X., Wang J., Wu Q., Li L., Wang Y., Yang H. // *Molecules* 2019. V. 24. 1902. <https://doi.org/10.3390/molecules24101902>
11. Кулапина Е.Г., Баринаова О.В., Кулапина О.И., Умц И.А., Снесарева С.В. // *Антибиотики и химиотерапия*. 2009. Т. 54. С. 53–60.
12. Guliy O.I., Zaitsev B.D., Borodina I.A. In: *Nanobioanalytical Approaches to Medical Diagnostics*. / Eds. P.K. Maurya, P. Chandra. Sawston: Woodhead Publishing, 2022. P. 143–177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85147-3.00004-9>
13. Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S. // *Biosens. Bioelectron.* 2001. V. 16. P. 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
14. Leca-Bouvier B.D., Blum L.J. *Recognition Receptors in Biosensors* / Ed M. Zourob. New York: Springer, 2010. P. 177–220. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0919-0_4
15. Moreira F., Dutra R., Noronha J., Sales G. // *Biosens. Bioelectron.* 2014. V. 56. P. 217–222. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.052>
16. Dezhakam E., Tavakkol M., Kafili T., Nozohouri E., Naseri A., Khalilzadeh B., Rahbarghazi R. // *Food Chem.* 2024. V. 439. 138145. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138145>
17. Reder-Christ K., Bendas G. // *Sensors* 2011. V. 11. P. 9450–9466. <https://doi.org/10.3390/s111009450>
18. Ahmed S., Ning J., Peng D., Chen T., Ahmad I., Ali et al. // *Food Agric. Immunol.* 2020. V. 31. P. 268–290. <https://doi.org/10.1080/09540105.2019.1707171>
19. Rudenko N., Fursova K., Shepelyakovskaya A., Karatovskaya A., Brovko F. // *Sensors*. 2021. V. 21. 7614. <https://doi.org/10.3390/s21227614>
20. Lu N., Chen J., Rao Z., Guo B., Xu Y. // *Biosensors* 2023. V. 13. 850. <https://doi.org/10.3390/bios13090850>
21. Gaudin V. // *Biosens Bioelectron.* 2017. V. 90. P. 363–377. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.005>
22. Fernandez F., Hegnerova K., Piliarik M., Sanchez-Baeza F., Homola J., Marco M.P. // *Biosens Bioelectron.* 2010. V. 26. P. 1231–1238. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.012>
23. Fernandez F., Pinacho D.G., Sanchez-Baeza F., Marco M.P. // *J. Agric. Food Chem.* 2011. V. 59. P. 5036–5043. <https://doi.org/10.1021/jf1048035>

24. Pollap A., Kochana J. // Biosensors. 2019. V. 9. 61. <https://doi.org/0.3390/bios9020061>
25. Антитела. Методы / Ред. Д. Кэпти. М.: Мир, 1991.
26. Sharma S., Byrne H., O'Kennedy R.J. // Essays Biochem. 2016. V. 60. P. 9–18. <https://doi.org/10.1042/EBC20150002>
27. Petrenko V.A. // Viruses 2018. V. 10. 311. <https://doi.org/10.3390/v10060311>
28. Тукунова Н.В., Морозова В.В. // Acta Nat. 2009. Т. 1. С. 22–31. <https://doi.org/10.32607/20758251-2009-1-3-20-28>
29. Guliy O.I., Evstigneeva S.S., Dykman L.A. // Biosens. Bioelectron. 2023. V. 222. 114909. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114909>
30. Xiao X., Hu S., Lai X., Peng J., Lai W. // Trends Food Sci. Technol. 2021. V. 111. P. 68–88. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.045>
31. Arnold D., Somogyi A. // J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1985. V. 68. P. 984–990.
32. Самсонова Ж.В., Рубцова М.Ю., Чикишева Л.В., Егоров А.М. // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. Т. 43. С. 396–398.
33. Федотова Е.С., Щербаков А.А., Сидоркин В.А., Староверов С.А., Дыкман Л.А., Василенко О.А. // Ветеринария 2007. № 6. С. 57–58.
34. Дыкман, Л.А., Сумарока, М.В., Староверов, С.А., Зайцева, И.С., Богатырев, В.А. // Известия РАН. Сер. биол. 2004. Т. 31. С. 86–91.
35. Дыкман Л.А., Староверов С.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю. // Российские нанотехнологии. 2010. Т. 5. С. 58–68. <https://doi.org/10.1134/S1995078010110029>
36. Sui J.X., Lin H., Cao L.M., Li Z.X. // Food Agr. Immunol. 2009. V. 20. P. 125–137. <https://doi.org/10.1080/09540100902889936>
37. Cao L., Sui J., Kong D., Li Z., Lin H. // Food Anal. Methods. 2011. V. 4. P. 517–524. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9196-2>
38. Sui J., Lin H., Xu Y., Cao L. // Food Anal. Methods 2011. V. 4. P. 245–250. <https://doi.org/10.1007/s12161-010-9137-5>
39. Gunther M., Saxinger L., Gray M., LeGatt D. // Ann. Pharmacother. 2013. V. 47. e19. <https://doi.org/10.1345/aph.1R566>
40. Islam R., Luu H.T.L., Kuss S. // J. Electrochem. Soc. 2020. V. 167. 045501. <https://doi.org/0.1149/1945-7111/ab6ff3>
41. Raykova M.R., Corrigan D.K., Holdsworth M., Henriquez F.L., Ward A.C. // Biosensors. 2021. V. 11. 232. <https://doi.org/0.3390/bios11070232>
42. Que X., Chen X., Fu L., Lai W., Zhuang J., Chen G., Tang D. // J. Electroanal. Chem. 2013. V. 704. P. 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2013.06.023>
43. Yadav A.K., Verma D., Lakshmi G.B.V.S., Eremin S., Solanki P.R. // Food Chem. 2021. V. 363. 130245. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130245>
44. Stevenson H.S., Shetty S.S., Thomas N.J., Dhamu V.N., Bhide A., Prasad S. // ACS Omega 2019. V. 4. P. 6324–6330. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03534>
45. Tomassetti M., Angeloni R., Martini E., Castrucci M., Campanella L. // Sens. Actuators B Chem. 2018. V. 255. P. 1545–1552. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.08.166>
46. El-Moghazy A.Y., Zhao C., Istamboulie G., Amaly N., Si Y., Noguer T., Sun G. // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 117. P. 838–844. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.025>
47. Liu X., Zheng S., Hu Y., Li Z., Luo F., He Z. // Food Anal. Methods 2016. V. 9. P. 2972–2978. <https://doi.org/10.1007/s12161-016-0480-z>
48. Li H., Xu B., Wang D., Zhou Y., Zhang H., Xia W., Xu S., Li Y. // J. Biotechnol. 2015. V. 203. P. 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.03.013>
49. Conzuelo F., Gamella M., Campuzano S., Reviejo A.J., Pingarrón J.M. // Anal. Chim. Acta 2012. V. 737. P. 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.051>
50. Merola G., Martini E., Tomassetti M., Campanella L. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2015. V. 106. P. 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.005>
51. Faridah S., Hazana R., Gayah A. R., Norzaili Z., Azima A., Nur Azura M. S., Zamri I. // Mal. J. Anim. Sci. 2012. V. 15. P. 67–80.
52. Шинко Е.И., Фарафонова О.В., Ермолаева Т.Н. // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2021. Т. 87. С. 11–16. <https://doi.org/10.26896/1028-6861-2021-87-12-12-17>
53. Shinko E.I., Farafonova O.V., Shanin I.A., Eremin S.A., Ermolaeva T.N. // Anal. Lett. 2022. V. 55. P. 1164–1177 <https://doi.org/10.1080/00032719.2021.1991364>
54. Bizina E.V., Farafonova O.V., Zolotareva N.I., Grazhulene S.S., Ermolaeva T.N. // J. Anal. Chem. 2022. V. 77. P. 458–465. <https://doi.org/10.1134/S1061934822040049>
55. Hassani E.A.E., N., Baraket A., Boudjaoui S., Neto E.T.T., Bausells J., El Bari, N. et al. // Biosens. Bioelectron. 2019. V. 130. P. 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.052>
56. Tomassetti M., Merola G., Martini E., Campanella L., Sanzò G., Favero G., Mazzei F. // Sensors 2017. V. 17. 819. <https://doi.org/10.3390/s17040819>

57. Chaudhari P.P., Chau L.K., Tseng Y.T., Huang C.-J., Chen Y.-L. // *Microchim. Acta* 2020. V. 187. 396. <https://doi.org/10.1007/s00604-020-04381-w>
58. Tomassetti M., Conta G., Campanella L., Favero G., Sanzò G., Mazzei F., Antiochia R. // *Biosensors* 2016. V. 6. 22. <https://doi.org/10.3390/bios6020022>
59. Shanin I.A., Shaimardanov A.R., Thai N.T.D., Eremin S.A. // *J. Anal. Chem.* 2015. V. 70. P. 712–717. <https://doi.org/10.1134/S1061934815060167>
60. Prusty A.K., Bhand S. // *J. Electroanal. Chem.* 2020. V. 863. 114055. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114055>
61. Mungroo N.A., Neethirajan S. // *Biosensors* 2014. V. 4. P. 472–493. <https://doi.org/10.3390/bios4040472>
62. Watanabe H., Satake A., Kido Y., Tsuji A. // *Analyst* 1999. V. 124. P. 1611–1615. <https://doi.org/10.1039/A906026J>
63. Chen Y.Q., Wang Z., Wang Z., Tang S., Zhu Y., Xiao X. // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 2944–2952. <https://doi.org/10.1021/jf703602b>
64. Hoppentocht M., Akkeman O.W., Voerman A.-J., Greijdanus B., Touw D.J., Alffenaar J.-W.C. // *J. App. Bioanal.* 2015. V. 1. P. 123–127. <https://doi.org/10.17145/jab.15.020>
65. Dijkstra J.A., Voerman A.J., Greijdanus B., Touw D.J., Alffenaar J.W.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. P. 4646–4651. <https://doi.org/10.1128/AAC.03025-15>
66. Gaurav A., Gill J.P.S., Aulakh R.S., Bedi J.S. // *Vet. World* 2014. V. 7. P. 26–29. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.26-29>
67. Li G., Li Q., Wang X., Liu X., Zhang Y., Li R., Guo J., Zhang G. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2023. V. 242. 125186. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125186>
68. Han M., Gong L., Wang J., Zhang X., Jin Y., Zhao et al. // *Sens. Actuators B* 2019. V. 292. P. 94–104. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.019>
69. Zhao Y., Zhang G., Liu Q., Teng M., Yang J., Wang J. // *J. Agric. Food Chem.* 2008. V. 56. P. 12138–12142. <https://doi.org/10.1021/jf802648z>
70. Chen L., Wang Z., Ferreri M., Su J., Han B. // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. P. 4674–4679. <https://doi.org/10.1021/jf900433d>
71. Byzova N.A., Smirnova N.I., Zherdev A.V., Eremin S.A., Shanin I.A., Lei H.-T., Sun Y., Dzantiev B.B. // *Talanta* 2014. V. 119. P. 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.10.054>
72. Hendrickson O.D., Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. // *J. Food Sci. Technol.* 2021. V. 58. P. 292–301. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04541-z>
73. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Popravko D.S., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. // *J. Chromatogr. B* 2020. V. 1141. 122014. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122014>
74. Sheng W., Chang Q., Shi Y., Duan W., Zhang Y., Wang S. // *Microchim. Acta* 2018. V. 185. 404. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2945-9>
75. Prakashan D., Kolhe P., Gandhi S. // *Food Chem.* 2024. V. 439. 138120. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.138120>
76. Taranova N.A., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 63. P. 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.049>
77. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Shanin I.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *J. Sci. Food Agric.* 2019. V. 99. P. 3834–3842. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9605>
78. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Godjevargova T., Xu C., Dzantiev B.B. // *Food Chem.* 2020. V. 318. 126510. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126510>
79. Li Y., Li J., Huang H., Jian D., Shan Y., Wang S., Liu F. // *Food Control* 2021. V. 130. 108256. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108256>
80. Zengin A., Tamer U., Caykara T. // *Anal. Chim. Acta* 2014. V. 817. P. 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.01.042>
81. Shi Q., Huang J., Sun Y., Yin M., Hu M., Hu X., Zhang Z., Zhang G. // *Spectrochim. Acta A* 2018. V. 197. P. 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.11.045>
82. Shi Q., Huang J., Sun Y., Deng R., Teng M., Li Q. et al. // *Microchim. Acta* 2018. V. 185. 84. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2556-x>
83. Pan Y., Fei D., Liu P., Guo X., Peng L., Wang Y., Xu N., Wei X. // *Food Anal. Methods* 2021. V. 14. P. 2642–2650. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02091-4>
84. Li Z., Liu Y., Chen X., Wang Y., Niu H., Li F., et al. // *Foods* 2023. V. 12. 1587. <https://doi.org/10.3390/foods12081587>
85. Wu X., Kuanga H., Hao C., Xing C., Wang L., Xu C. // *Biosens. Bioelectron.* 2012. V. 33. P. 309–312. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.01.017>
86. Conzuelo F., Campuzano S., Gamella M., Pinacho D.G., Reviejo A.J., Marco M.P., Pingarrón J.M. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 50. P. 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.06.019>
87. Song E., Yu M.; Wang Y.; Hu W.; Cheng D.; Swihart M.T.; Song Y. // *Biosens. Bioelectron.* 2015, 72, 320–325. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.05.018>
88. Cheng X., Ma J., Su J. // *Molecules* 2022. V. 27. 7319. <https://doi.org/10.3390/molecules27217319>
89. Majdinasab M., Mishra R.K., Tang X., Marty J.L. // *Trends Anal. Chem.* 2020. V. 127. 115883. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115883>
90. Cháfer-Pericás C., Maquieira Á., Puchades R. // *Trends Anal. Chem.* 2010. V. 29. P. 1038–1049. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.004>

91. Chen T., Cheng G., Ahmed S., Wang Y., Wang X., Hao H., Yuan Z. // *Talanta* 2017. V. 175. P. 435–442.
<https://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.044>
92. Li L., Wu S., Si Y., Li H., Yin X., Peng D. // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2022. V. 21. P. 4354–4377.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.13018>
93. Mustafa M.I., Mohammed A. // *SLAS Discov.* 2024. V. 29. 100140.
<https://doi.org/10.1016/j.slasd.2024.01.001>
94. Frenzel A., Schirrmann T., Hust M. // *mAbs* 2016. V. 8. P. 1177–1194.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1212149>
95. Majewska J., Kaźmierczak Z., Lahutta K., Lecion D., Szymczak A., Miernikiewicz P. et al. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. 2607.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02607>
96. Petrenko V.A., Gillespie J.W., De Plano L.M., Shokhen M.A. // *Viruses*. 2022. V. 14. 384.
<https://doi.org/10.3390/v14020384>
97. Petrenko, V.A. // *Viruses*. 2024. V. 16. 277.
<https://doi.org/10.3390/v16020277>
98. Гулий О.И., Алсовэиди А.К.М., Фомин А.С., Габалов К.П., Староверов С.А., Караваева О.А. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2022. Т. 58. С. 513–519.
<https://doi.org/10.1134/S0003683822050088>
99. Гулий О.И., Евстигнеева С.С., Староверов С.А., Фомин А.С., Караваева О.А. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2023. Т. 59. С. 512–519.
100. Makvandi-Nejad S., Sheedy C., Veldhuis L., Richard G., Hall J.C. // *J. Immunol. Methods* 2010. V. 360. P. 103–118.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.06.015>
101. Gomes F.B.M.B., Riedstra S., Ferreira J.P.M. // *J. Immunol. Methods*. 2010. V. 358. P. 17–22.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2010.03.021>
102. Wang F., Li N., Zhang Y., Sun X., Hu M., Zhao Y., Fan J. // *Foods* 2021. V. 10. 1933.
<https://doi.org/10.3390/foods10081933>
103. Li L., Wang X., Hou R., Wang Y., Wang X., Xie C. et al. // *Food Control*. 2022. V. 133. 108571.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108571>
104. Swofford C.A., Nordeen S.A., Chen L., Desai M.M., Chen J., Springs et al. // *Protein Sci.* 2022. V. 31. e4457.
105. Burmester J., Spinelli S., Pugliese L., Krebber A., Honegger A., Jung S. et al. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 309. P. 671–685.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4663>
106. Quintero-Campos P., Gozalbo-Rovira R., Rodríguez-Díaz J., Maquieira Á., Morais S. // *Anal. Chem.* 2023. V. 95. P. 12113–12121.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c02284>
107. Wentao D., Mian L., Qingsheng B., Zhonglin Z., Chao Y., Shuying L. // *Biotechnol. Bull.* 2013. V. 6. P. 70–74.
108. Sandúa A., Sanmamed M.F., Rodríguez M., Ancizu-Marckert J., Gúrpide A., Perez-Gracia et al. // *Clin. Chim. Acta* 2023. V. 543. 117303.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2023.117303>
109. Sarma D., Marak M.R., Chetia I., Badwaik L.S., Nath P. // *Phys. Scr.* 2024. V. 99. 026006.
<https://doi.org/10.1088/1402-4896/ad1c7f>
110. Xu X., Li T., Liu Y., Zhou L., Li Y., Luo Y. et al. // *Small*. 2024. V. 20. e2309502.
<https://doi.org/10.1002/smll.202309502>

Immunoassay Using Full-Length and Phage Antibodies for Antibiotic Detection

O. I. Guliy^{a, *}, L. A. Dykman^{a, **}

^a*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms – Research Institution Saratov Federal Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Saratov, 410049 Russia*

^{*}*e-mail: guliy_olga@mail.ru*

^{**}*e-mail: dykman_l@ibppm.ru*

The widespread use of antibiotics, leading to antibiotic resistance and the appearance of antibiotics in the environment and food, stimulates the development of new methods for monitoring antibacterial drugs in environmental objects. One of the promising areas for the development of methods for determining antibiotics belongs to sensor technologies. The key point in the development of sensory systems is the selection of a sensitive (recognizing) element. One of the most popular methods for recognizing antibiotics is the use of antibodies. The work presents the main immunosensory systems based on recording the “antigen-antibody” interaction and shows the advantages and disadvantages of polyclonal and monoclonal antibodies. The possibility of using phage antibodies to determine of antibiotics is described separately.

Keywords: antibodies, antibiotics, phage display, biosensors