

УДК 577.182.22:57.083.3

ЗАВИСИМОСТЬ ГРУППОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЕНИЦИЛЛИНОВ В МОЛОКЕ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ И ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ПЕРЕКРЕСТНЫХ РЕАКЦИЙ АНТИБИОТИКОВ С ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

© 2024 г. О. С. Куприенко¹*, И. И. Вашкевич¹, А. И. Зильберман¹, О. В. Свиридов¹

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, 220084 Беларусь

*e-mail: kuprienko@iboch.by

Поступила в редакцию 17.05.2023 г.

После доработки 17.06.2023 г.

Принята к публикации 06.07.2023 г.

Исследовано влияние термодинамических и кинетических условий на взаимодействия специфических поликлональных антител с антибиотиками группы пенициллинов в системе прямого иммуноферментного анализа (ИФА). В перекрестных реакциях поликлональных антител с разными пенициллинами наблюдались минимальные различия при проведении иммунохимической реакции при 4 °С в течение 1 ч. Увеличение температуры и продолжительности анализа повышало реактивность антител только к амоксициллину и существенно увеличивало различия в чувствительности определения индивидуальных пенициллинов. В подобранных температурных и временных условиях проведения ИФА установлены следующие значения перекрестной реактивности антител: к пенициллину G — 90%, к ампициллину — 100%, к амоксициллину — 110%. Аналитическая чувствительность определения ампициллина составила 0.03 нг/мл, предел количественного определения ампициллина в молоке — 0.4 мкг/л. Предложенная система группоспецифического прямого ИФА использована для выявления в молоке семи антибиотиков группы пенициллинов — пенициллина G, ампициллина, амоксициллина, клоксациллина, оксациллина, диклоксациллина и нафциллина, нормативно контролируемых в продуктах питания и сырье животного происхождения.

Ключевые слова: перекрестная реактивность антител, иммуноферментный анализ, антибиотики, пенициллины

DOI: 10.31857/S0555109924010121, **EDN:** HBQNGZ

Пенициллины представляют собой группу противомикробных соединений, в основе химической структуры которых лежит 6-аминопенициллановая кислота. Эта базовая молекула состоит из двух конденсированных гетероциклических колец — пятичленного тиазолидинового и четырехчленного бета-лактаманного. Благодаря бета-лактаманному циклу реализуется бактерицидное действие пенициллинов. Механизм такого действия заключается в нековалентном связывании и последующей химической реакции с ферментами (пенициллинсвязывающими белками), участвующими в синтезе клеточной стенки бактерии. В результате химической модификации активного центра эти белки больше не могут выполнять свои функции, что ослабляет клеточную стенку и приводит в конечном итоге к гибели микроорганизма [1, 2].

Пенициллины широко используются не только для лечения заболеваний человека, но и в ветеринарной медицине и сельском хозяйстве [3, 4]. Остаточные количества этих противомикробных

субстанций могут присутствовать в пищевом сырье и продуктах питания животного происхождения, что приводит к их неконтролируемому потреблению и вызывает серьезные расстройства здоровья человека. Однако основная проблема заключается в том, что, поступая в организм в дозах существенно ниже терапевтических, пенициллины стимулируют возникновение у бактерий антибиотикорезистентности, которая горизонтально может передаваться между разными микроорганизмами [4–6]. Основными способами защиты бактерий от пенициллинов является экспрессия фермента бета-лактамазы, расщепляющего бета-лактаманное кольцо, и возникновение мутаций пенициллинсвязывающих белков, что исключает их взаимодействие с антибиотиками [7, 8].

В странах Таможенного союза, ЕАЭС, Европейского союза установлены максимально допустимые уровни (МДУ) остатков антимикробных препаратов, которые могут содержаться в переработанной пищевой продукции животного

происхождения [9, 10]. Для представителей группы пенициллинов — пеницилина G (бензилпенициллина), ампициллина и амоксициллина — МДУ в молоке составляет 4 мкг/кг, для остальных пенициллинов — 30 мкг/кг (табл. 1).

Предложены различные способы определения антимикробных препаратов в пищевой продукции. Часто используемым для этих целей физико-химическим методом является жидкостная хроматография с масс-спектрометрической детекцией [11–13]. Этот высокочувствительный метод позволяет определять индивидуальные бета-лактамы антибиотики [14–16]. Он предполагает проведение длительной и трудоемкой подготовки проб, требует дорогого оборудования и наличия высококвалифицированного персонала. Образцы анализируются методом жидкостной хроматографии по одному. Альтернативой этому методу являются чувствительные, относительно простые и недорогие биоаналитические методы (иммунохимические, биорецепторные), позволяющие одновременно проводить анализ большого числа проб. К таким методам относится, в частности, ИФА [17–21], который в зависимости от характеристик связывающего белка (антитела или белка-рецептора) может быть как моноспецифическим [22, 23], так и проявлять групповую специфичность [24–27]. Группоспецифический ИФА позволяет делать выводы о присутствии в исследуемом образце суммарного количества ряда соединений с родственными структурами [28].

Ранее нами были получены высокоаффинные поликлональные антитела (ПАт) к пенициллинам, перекрестные реактивности (ПР) которых к пенициллину G, ампициллину и амоксициллину значительно различаются [29]. Это не позволяло использовать данные ПАт в предложенных условиях проведения реакций связывания антиген-антитело (37°C в течение 1 ч) в ИФА для определения с близкими чувствительностями трех основных пенициллинов. Из литературы [30–33] известно, что групповая специфичность анализа зависит от условий его проведения, таких как состав реакционной среды, соотношение иммунореагентов и их концентрации. Также замечено, что к существенным изменениям ПР антител приводит варьирование термодинамических и кинетических (температурных и временных) условий протекания иммунохимической реакции. Так, в результате увеличения продолжительности конкурентного твердофазного ИФА наблюдали существенное возрастание различий в специфичности анализа по отношению к представителям антибиотиков группы фторхинолонов [30]. В свою очередь авторами [33] отмечено, что уменьшение времени инкубации сближает величины ПР специфических антител к структурно похожим соединениям группы стероидных гормонов, а увеличение температуры проведения реакции, приводящее к ускорению наступления

Таблица 1. Нормативно контролируемые антибиотики группы пенициллинов

Наименование	Структурная формула	МДУ в молоке, мкг/кг
Пенициллин G (бензилпенициллин)		4
Ампициллин		4
Амоксициллин		4
Клоксациллин		30
Оксациллин		30
Диклоксациллин		30
Нафциллин		30

в системе равновесного состояния, наоборот усиливает различия в специфичности анализа.

Цель исследования — усиление ПР антител и выравнивание их чувствительности к разным пенициллинам, что позволит повысить аналитическую ценность полученных ПАт и разработать группоспецифичную систему ИФА для определения семи пенициллинов в продовольственном сырье и пищевой продукции.

МЕТОДИКА

В работе использовали реактивы фирмы “Sigma-Aldrich” (США) ампициллина и амоксициллина тригидраты, пенициллина G натриевую соль, оксациллина, клоксациллина, диклоксациллина и нафциллина натриевые соли моногидраты, бычий сывороточный альбумин (БСА), тетраметилбензидин (ТМБ). Tween-20 произведен “AppliChem GmbH” (Германия). Все вспомогательные реагенты (соли, кислоты, щелочи) были аналитической или химической чистоты.

Антисыворотка кролика, содержащая высокоаффинные ПАт к антибиотикам группы пенициллинов, получена в результате продолжительной иммунизации животных конъюгатом ампициллина с тиреоглобулином [29]. Продукты присоединения ампициллина и амоксициллина к пероксидазе из корней хрена Амп-ПХ, Амокс-ПХ, Ам-Ад-ПХ, Амокс-пФт-ПХ (Амп и Амокс обозначают остатки ампициллина и амоксициллина, Ад и пФт — остатки адипиновой и п-фталевой кислот) синтезированы ранее [29]. Антитела овцы против иммуноглобулинов кролика получены на опытном производстве Института биоорганической химии НАН Беларуси (Республика Беларусь).

Хромоген-субстратную смесь готовили непосредственно перед использованием, добавляя 1 часть 0.4 мМ раствора ТМБ в диметилсульфоксиде к 20 частям 3.0 мМ H_2O_2 в 0.04 М натрий-цитратном буфере (рН 4.0).

Конкурентный иммуноферментный анализ. В лунках полистирольного 96-луночного микропланшета (“ХЕМА”, Россия) сорбировали из 100 мкл раствора антивидовые антитела овцы к иммуноглобулинам кролика (5 мкг/мл) в 0.1 М $NaHCO_3$ в течение 18 ч при 4°C. Затем планшет промывали 0.05 М Na-фосфатным буфером (НФБ), рН 7.4, содержащим 0.15 М NaCl и 0.05% Tween-20, и блокировали не занятые антителами участки поверхности лунок раствором 5 г/л БСА. Далее в лунки вносили по 100 мкл сыворотки кролика, содержащей специфические к антибиотикам группы пенициллинов ПАт, в разведении 1 : 50000 в 0.05 М НФБ, рН 7.4, содержащем 0.15 М NaCl, 1 г/л БСА и 0.05% Tween-20. Инкубировали в течение 18 ч при 4°C. После трехкратной промывки 0.05 М НФБ, рН 7.4, с 0.05% Tween-20 использовали

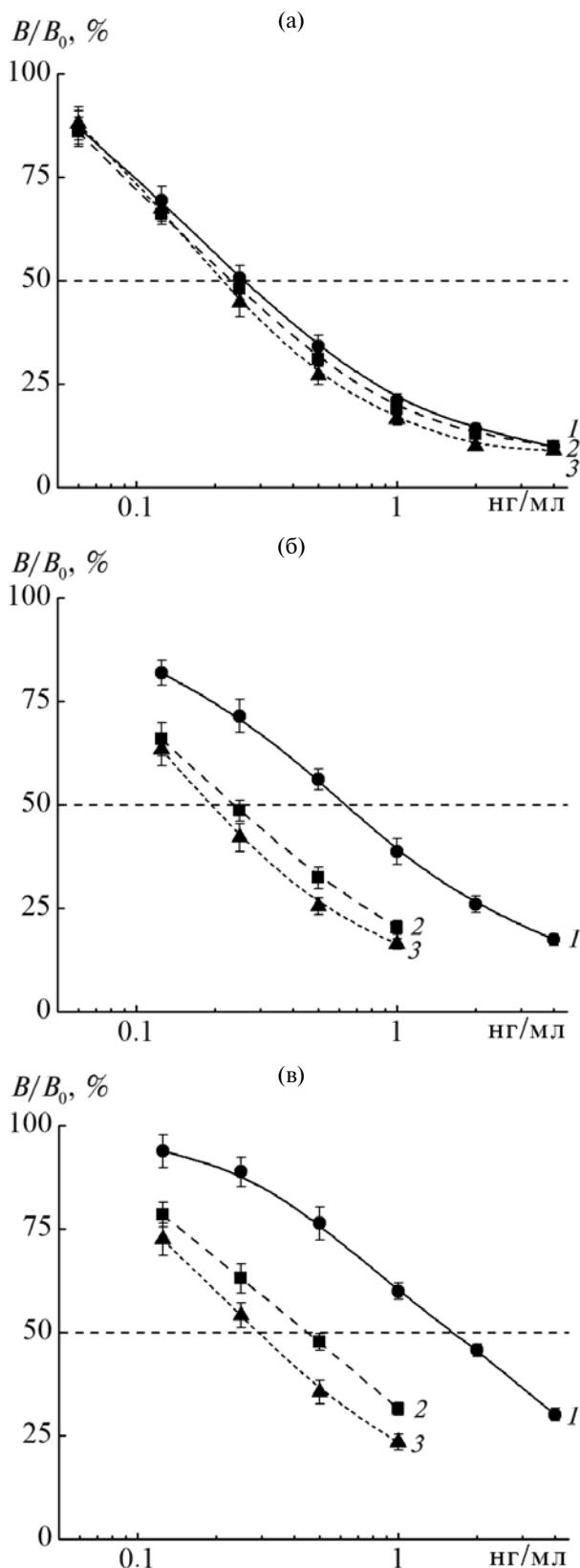


Рис. 1. Кривые ингибирования связывания конъюгата Ам-ПХ с ПАт в присутствии пенициллина G (1), ампициллина (2) или амоксициллина (3) при инкубации в течение 1 ч при температурах 4 (а), 25 (б) или 37°C (в).

функционализированные планшеты для проведения ИФА. Для этого в лунки планшета вносили 50 мкл раствора антибиотика группы пенициллинов или другого анализируемого раствора и 50 мкл конъюгата Амп-ПХ, Амокс-ПХ, Амп-Ад-ПХ или Амокс-пФТ-ПХ каждый в концентрации 0.1 мкг/мл. Для приготовления растворов антибиотиков и конъюгата требуемой концентрации использовали 0.05 М НФБ, рН 7.4, содержащий 0.15 М NaCl, 1 г/л БСА и 0.05% Tween-20. Инкубировали систему при температуре 4, 25 или 37°C в течение 1–18 ч. Затем содержимое лунок удаляли и промывали планшет как описано выше. В лунки вносили по 100 мкл хромоген-субстратной смеси и инкубировали при 25°C в течение 15 мин. Оставляли ферментативную реакцию добавлением 100 мкл 1 М H₂SO₄. Оптическую плотность растворов в лунках измеряли при 450 нм с использованием планшетного спектрофотометра SPECTROstar Nano (“BMG Labtech”, Германия).

Подготовка проб молока с добавками пенициллинов. Использовали молоко пастеризованное жирностью 3.2%, приобретенное в торговой сети. Отсутствие в молоке антибиотиков группы пенициллинов предварительно устанавливали с использованием тест-системы Penicillin Elisa (“EuroProxima”, Нидерланды). К 5 мл молока добавляли 50 мкл растворов пенициллина G, ампициллина или амоксициллина до конечной концентрации 4 мкг/л или вносили 50 мкл растворов других пенициллинов до конечной концентрации 30 мкг/л. Затем разводили аликвоты молока в 5 раз 0.05 М НФБ, рН 7.4, содержащим 0.15 М NaCl, 1 г/л БСА и 0.05% Tween-20, и использовали в ИФА пенициллинов.

Аналитические характеристики ИФА и обработка полученных результатов. Для построения градуировочного графика и получения характеристик ИФА использовали соотношение V/B_0 , в процентах, где V — измеренная оптическая плотность в лунке с раствором антибиотика группы пенициллинов, B_0 — оптическая плотность в лунке, в которую вместо раствора антибиотика вносили буферный раствор, не содержащий специфически связывающихся с ПАТ соединений. Градуировочный график ИФА представляет собой зависимость величины V/B_0 от десятичного логарифма концентрации антибиотика группы пенициллинов. Расчеты по градуировочному графику проводили по методу кусочно-линейной аппроксимации, используя уравнение вида $y = a \lg(x) + b$.

Перекрестную реактивность ПАТ к соединению X вычисляли по уравнению

$$\text{ПР}(X) = \frac{IC_{50}(\text{Амп})}{IC_{50}(X)},$$

где $IC_{50}(\text{Амп})$ и $IC_{50}(X)$ — концентрации ампициллина и соединения X в нг/мл, вызывающие 50%-ное ингибирование связывания конъюгата с ПАТ,

что проявляется как двукратное снижение детектируемого сигнала, при котором соотношение $V/B_0 = 50\%$.

Концентрации пенициллинов в образцах молока с добавками определяли по градуировочному графику в расчете на ампициллин. Предел количественного определения (ПКО) ампициллина в молоке рассчитывали как концентрацию ампициллина в мкг/л, эквивалентную среднему из 10 измеренных значений концентрации антибиотика в чистом молоке ($C_{\text{ср}}$) плюс шестикратная величина стандартного отклонения измерения содержания ампициллина в данном эксперименте ($C_{\text{ср}} + 6 \text{ SD}$).

Аналитическую чувствительность ИФА определяли как концентрацию ампициллина в нг/мл, при которой связывание конъюгата Амп-ПХ с ПАТ отличается от B_0 на двукратную величину стандартного отклонения B_0 ($B_0 - 2 \text{ SD}$) [34] при количестве измерений, равном 10. Аналитическую чувствительность рассчитывали по уравнению прямой $y = ax + b$, проведенной по точкам градуировочного графика, соответствующим концентрациям ампициллина 0, 0.06 и 0.13 нг/мл.

В таблицах и на рисунках приводятся значения средних арифметических из трех определений. Планки погрешностей обозначают среднеквадратичное отклонение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние условий проведения иммунохимической реакции на ПР ПАТ к пенициллинам исследовали в системе прямого конкурентного ИФА. ПАТ были биоспецифически иммобилизованы на внутренней поверхности лунок полистирольного микропланшета. Антибиотики группы пенициллинов и ферментный конъюгат Амп-ПХ присутствовали в лунках в виде растворов. Иммунохимическую реакцию с участием ПАТ, свободных пенициллинов и конъюгата проводили при трех температурах 4, 25 или 37°C в течение периода от 1 до 18 ч. Сравнивали параметры кривых ингибирования связывания пероксидазного конъюгата с иммобилизованными ПАТ в присутствии антибиотиков группы пенициллинов, определяли величину IC_{50} в выбранных условиях инкубации.

Исследование влияния термодинамических условий. Изменение температуры протекания иммунохимической реакции по-разному влияло на взаимодействие трех пенициллинов со специфически ПАТ (рис. 1). Наибольший эффект повышение температуры оказывало на связывание с ПАТ пенициллина G. Величина IC_{50} этого антибиотика при 4°C составила 0.26 ± 0.01 нг/мл, при 25°C — 0.64 ± 0.02 нг/мл, при 37°C — 1.63 ± 0.05 нг/мл. Для ампициллина и амоксициллина влияние температуры проявлялось в меньшей степени. Значения IC_{50} ампициллина и амоксициллина при 4°C были

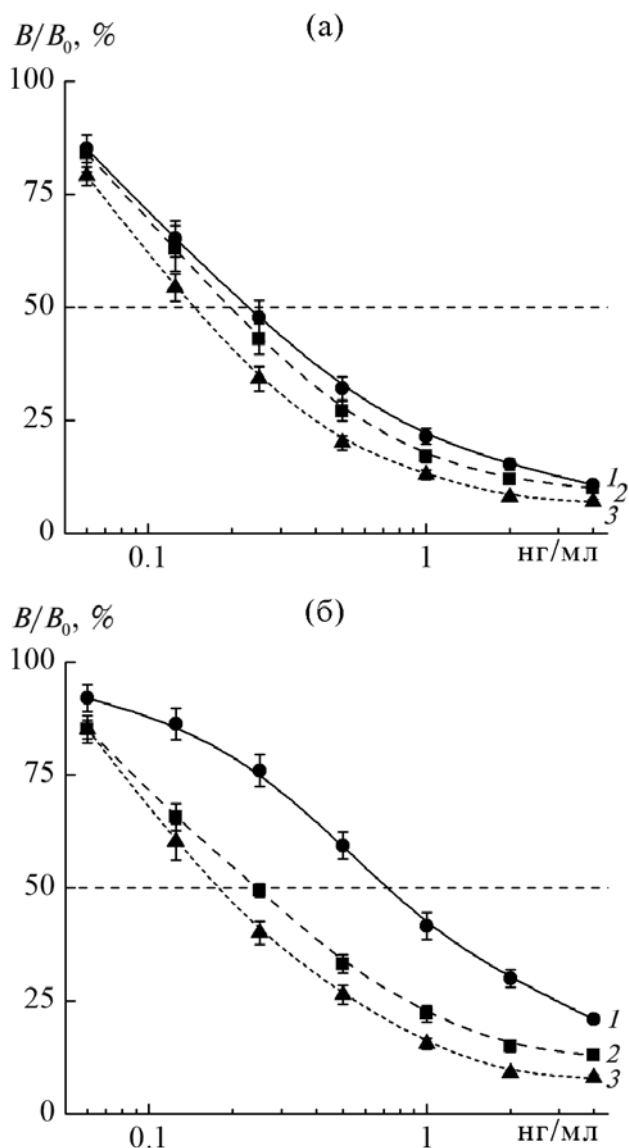


Рис. 2. Кривые ингибирования связывания конъюгата АмП-ПХ с ПАт в присутствии пеницилина G (1), ампициллина (2) или амоксициллина (3) при инкубации в течение 2 ч (а) или 18 ч (б) при температуре 4°C.

0.23 ± 0.03 и 0.21 ± 0.02 нг/мл, при 25°C — 0.24 ± 0.02 и 0.19 ± 0.01 нг/мл, при 37°C — 0.45 ± 0.02 и 0.29 ± 0.02 нг/мл соответственно.

Наиболее близкие друг к другу значения величины IC_{50} для пеницилина G, ампициллина и амоксициллина наблюдались при 4°C. Очевидно, что эти условия, определяемых сродством антибиотиков к ПАт при данной температуре, являются предпочтительными для группоспецифичной системы ИФА.

Исследование влияние кинетических условий. Исследование влияния кинетических условий протекания иммунохимической реакции на аналитические характеристики ИФА пеницилина G,

ампициллина и амоксициллина проводили в ходе инкубации при выбранной температуре 4°C в течение 1, 2 и 18 ч (рис. 2). Увеличение времени инкубации с 1 до 2 ч приводило к уменьшению величин IC_{50} . Для пеницилина G, ампициллина и амоксициллина этот параметр составил соответственно 0.23 ± 0.01 нг/мл, 0.20 ± 0.02 и 0.15 ± 0.01 нг/мл. Дальнейшее увеличение продолжительности инкубации до 18 ч привело к увеличению IC_{50} . Наиболее сильно влияние времени инкубации отразилось на ИФА пеницилина G: параметр IC_{50} увеличился до 0.72 ± 0.04 нг/мл, что почти в три раза больше соответствующей величины в случае инкубации 1 ч при 4°C.

Уменьшение времени инкубации при 4°C до 30 мин приводило к существенному увеличению разброса (коэффициента вариации) получаемых результатов, поэтому далее эти результаты не обсуждаются.

Расчет ПР специфических ПАт. На основании средних значений величин IC_{50} была рассчитана ПР специфических ПАт для различных условий выполнения ИФА (табл. 2). При проведении ИФА при 4°C в течение 1 ч различия в ПР к пенициллину G, ампициллину и амоксициллину минимальны и составляют от 90 до 110%. Увеличение температуры протекания иммунохимической реакции в ИФА приводило к уменьшению ПР ПАт и к другим антибиотикам группы пенициллинов оксациллину, клоксациллину, нафциллину, диклоксациллину. В отдельном эксперименте было показано, что ПР используемых специфических ПАт менее 0.01% по отношению к ампициллину с гидролизованном бета-лактамом циклом (гидролиз проводили как описано в [35], выдерживая раствор ампициллина в 0.2 М NaOH при 37°C в течение 2 ч) и к цефалексину, представителю бета-лактамов антибиотиков из группы цефалоспоринов.

Исследование стабильности антибиотиков группы пенициллинов в условиях ИФА. Ухудшение связывания антибиотиков с ПАт при увеличении времени или возрастании температуры, при которых проводилась иммунохимическая реакция, могло обуславливаться частичным расщеплением бета-лактамового цикла пенициллинов. В контрольном эксперименте растворы пеницилина G, ампициллина и амоксициллина выдерживали при 4°C в течение 18 ч или при 37°C в течение 1 ч, а затем использовали в ИФА. При этом не наблюдали различий в связывании хранившихся и свежеприготовленных растворов пенициллинов с ПАт (табл. 3). Поскольку ПАт не взаимодействовали с пеницилинами, имеющими гидролизованное бета-лактамовое кольцо, то полученные результаты свидетельствовали о том, что хранение пенициллинов, а значит и проведение ИФА в выбранных условиях не приводило к гидролизу антибиотиков. Следовательно, наблюдаемые изменения параметров ИФА

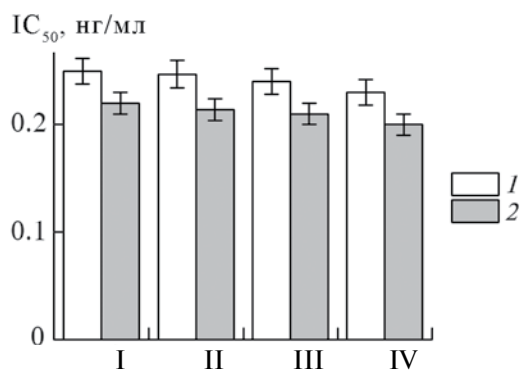


Рис. 3. Значения параметра IC₅₀ для пенициллина G (1) и амоксициллина (2) при использовании различных конъюгатов пенициллинов с ПХ (инкубация в течение 1 ч при 4°С). I — Амп-ПХ; II — Амокс-ПХ; III — Амп-Ад-ПХ; IV — Амокс-пФТ-ПХ.

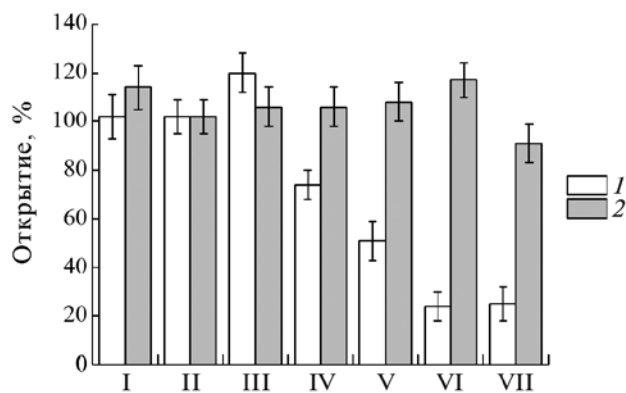


Рис. 4. Полнота выявления антибиотиков группы пенициллинов (%), добавленных в образцы молока. Приведены значения, полученные методом ИФА (1) и пересчитанные с учетом ПР специфических ПАТ (2). I — пенициллин G; II — ампициллин; III — амоксициллин; IV — оксациллин; V — флоксациллин; VI — диклоксациллин; VII — нафциллин.

при варьировании временных и температурных условий проведения иммунохимической реакции обусловлены кинетическими и термодинамическими особенностями взаимодействия индивидуальных пенициллинов с ПАТ.

Наблюдаемые эффекты времени и температуры на ПР специфических ПАТ связаны с существенно большим сродством данных антител к ампициллину и амоксициллину, чем к другим антибиотикам группы пенициллинов. Как указывалось ранее [30, 33], проведение иммуноанализа в равновесных условиях сводит к минимуму взаимодействие антител с низкоаффинными перекрестно реагирующими соединениями. В настоящем эксперименте наиболее ярко это проявилось для пенициллина G при увеличении времени инкубации до 18 ч и при проведении иммунохимической реакции при повышенной температуре, ускоряющей наступление

равновесного состояния в системе. Уменьшение времени инкубации и снижение температуры уравнивало ПР антител к нескольким антибиотикам группы пенициллинов.

Использование в ИФА различных конъюгатов.

Ранее было установлено, что аналитические параметры прямого ИФА зависят от вида использованного пероксидазного конъюгата [29]. В настоящей работе были применены ранее синтезированные ферментные конъюгаты ампициллина и амоксициллина, в которых антибиотики напрямую присоединены к ПХ (Амп-ПХ и Амокс-ПХ) или через остатки адипиновой или п-фталевой кислот (Амп-Ад-ПХ или Амокс-пФТ-ПХ). Инкубацию на стадии иммунохимического взаимодействия в системе прямого ИФА проводили при 4°С в течение 1 ч. Выявлены некоторые различия в величинах IC₅₀ при использовании разных конъюгатов

Таблица 2. Перекрестные реакции ПАТ к антибиотикам группы пенициллинов при различных условиях проведения иммунохимической реакции

Соединение	ПР, %				
	1 ч			2 ч	18 ч
	+4°С	+25°С	+37°С	+4°С	
Амоксициллин	110	126	155	133	133
Ампициллин	100	100	100	100	100
Пенициллин G	90	38	28	86	33
Оксациллин	70	—	53	—	—
Флоксациллин	47	25	24	—	—
Нафциллин	29	—	15	—	—
Диклоксациллин	18	17	7	—	—
Цефалексин	< 0.01	< 0.01	< 0.01	—	—
Гидролизованный ампициллин	< 0.01	< 0.01	< 0.01	—	—

Примечание: “—” — определение не проводилось.

Таблица 3. Ингибирование связывания конъюгата Амп-ПХ с ПАт в присутствии антибиотиков, хранившихся в различных условиях

Раствор антибиотика, 0.4 нг/мл	$B/B_0, \%$		
	свежеприготовленный раствор антибиотика	раствор антибиотика, хранившийся	
		18 ч при 4°C	1 ч при 37°C
Пенициллин G	37 ± 3	37 ± 2	37 ± 3
Ампициллин	40 ± 2	–	41 ± 3
Амоксициллин	31 ± 3	–	30 ± 2

Примечание: “–” – определение не проводилось.

(рис. 3), однако соотношения IC_{50} (пенициллин G)/ IC_{50} (амоксициллин) оказались одинаковыми. Структура использованных конъюгатов не оказала влияния на ПР ПАт к пенициллинам.

Определение пенициллинов в молоке. ИФА в подобранных условиях инкубации использовали для определения пенициллинов в пробах молока. Для построения градуировочного графика применяли растворы ампициллина с концентрациями от 0.06 до 4 нг/мл. Аналитическая чувствительность ИФА составила 0.03 нг/мл, ПКО ампициллина в молоке оказалась равным 0.4 мкг/л. По градуировочному графику рассчитали количество пенициллинов в образцах молока, содержащих антибиотики в концентрациях, равных МДУ. Полученные результаты приведены в табл. 4. В пробах с добавками нафциллина, диклоксациллина, клоксациллина и оксациллина полнота выявления пенициллинов составила от 23 до 74% (рис. 4), что связано со специфичностью ИФА к этим антибиотикам. Найденные концентрации пенициллинов в молоке пересчитывали с использованием соответствующих значений ПР специфических ПАт (табл. 2). Результаты приведены в табл. 4 и на рис. 4. Полнота выявления антибиотиков в пробах молока с учетом специфичности ИФА составила от 91 до 117%.

В предложенном нами группоспецифичном ИФА расчет количества конкретного пенициллина в исследуемой пробе может быть осуществлен только в том случае, когда известно, какое соединение содержится в образце, например в том случае, если

ветеринарной службой предоставлены сведения о фармсубстанции, использованной для лечения продуктивных животных. При отсутствии такой информации необходимо выбрать критерий для интерпретации результатов скринингового ИФА. Данные, представленные в табл. 4 и на рис. 4, позволили сделать такой выбор. Если было получено значение суммарной концентрации пенициллинов в молоке менее 4 мкг/л (в расчете на ампициллин), то в анализируемом образце содержание семи нормируемых пенициллинов не превышает установленный МДУ. Если ИФА показал значение более 4 мкг/л, то следует провести подтверждающий анализ инструментальным методом с определением концентраций индивидуальных пенициллинов.

Таким образом, найдены условия повышения ПР высокоаффинных ПАт для ИФА, позволяющие определять, в частности, пенициллин G, ампициллин и амоксициллин со специфичностью от 90 до 110% в диапазоне концентраций от 0.06 до 4 нг/мл с аналитической чувствительностью по ампициллину 0.03 нг/мл. Найденное значение ПКО ампициллина в молоке составило 0.4 мкг/л, что в 10 раз меньше МДУ. Скрининг образцов молока с использованием описанной системы ИФА дает возможность с высокой точностью сделать доказательный вывод о непревышении МДУ для семи нормируемых антибиотиков группы пенициллинов.

Таблица 4. Результаты ИФА образцов молока, контаминированных одним из пенициллинов на уровне МДУ

Антибиотик	Внесено, мкг/л	Определенная концентрация, мкг/л	
		по графику, в расчете на ампициллин	с учетом ПР
Пенициллин G	4	4.1 ± 0.4	4.6 ± 0.4
Ампициллин	4	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3
Амоксициллин	4	4.8 ± 0.4	4.3 ± 0.3
Клоксациллин	30	15.2 ± 1.2	32.3 ± 2.6
Оксациллин	30	22.3 ± 1.3	31.9 ± 2.6
Диклоксациллин	30	7.3 ± 0.4	36.7 ± 2.5
Нафциллин	30	7.4 ± 0.5	27.4 ± 2.2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller E. L. // *J. Midwifery Women's Health*. 2002. V. 47. № 6. P. 426–434.
[https://doi.org/10.1016/s1526-9523\(02\)00330-6](https://doi.org/10.1016/s1526-9523(02)00330-6)
2. Nathwani D., Wood M. J. // *Drugs*. 1993. V. 45. № 6. P. 866–894.
<https://doi.org/10.2165/00003495-199345060-00002>
3. Шульга Н. Н., Шульга И. С., Плавшак Л. П. // Тенденции развития науки и образования. 2019. Т. 46. № 5. С. 32–35.
<https://doi.org/10.18411/lj-01-2019-98>
4. Sazykin I. S., Khmelevtsova L. E., Seliverstova E. Y., Sazykina M. A. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021. V. 57. № 1. P. 20–30.
<https://doi.org/10.1134/S0003683821010166>
5. Berendonk T. U., Manaia C. M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., Cytryn E., Walsh F., et al. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 13. P. 310–317.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
6. Шевелева С. А., Хотимченко С. А., Минаева Л. П., Смотрина Ю. В. // Вопросы питания. 2021. Т. 90. № 3. С. 50–57.
<https://doi.org/10.33029/0042-8833-2021-90-3-50-57>
7. Van Hoek A. H.A.M., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A. P., Aarts H. J.M. // *Front. Microbiol.* 2011. V. 2. Article 203.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
8. Mikhaleva T. V., Ilyasov P. V., Zakharova O. I. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55. № 2. P. 99–106.
<https://doi.org/10.1134/S000368381902011X>
9. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13 февраля 2018 г. № 28.
docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01217013/clc-d_15022018_28
10. European Commission. Council 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. // *Official Journal of the European Union*. 2010. L 15/10.
11. Barros S. C., Silva A. S., Torres D. // *Antibiotics* 2023. V. 12. № 2. P. 202.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12020202>
12. Moga A., Vergara-Barberán M., Lerma-García M.J., Carrasco-Correa E.J., Herrero-Martínez J.M., Simó-Alfonso E.F. // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2021. V. 20. № 2. P. 1681–1716.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12702>
13. Marazuela M. D., Bogialli S. // *Anal. Chim. Acta*. 2009. Vol. 645. № 1–2. P. 5–17.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.031>
14. Holstege D. M., Puschner B., Whitehead G., Galey F. D. // *J. Agric. Food Chem.* 2002. V. 50. № 2. P. 406–411.
<https://doi.org/10.1021/jf010994s>
15. Pugajeva I., Ikkere L. E., Judjallo E., Bartkevics V. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019. V. 166. P. 252–263.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.01.024>
16. Bessaire T., Mujahid C., Beck A., Tarres A., Savoy M. C., Woo P. M. et al. // *Food Addit. Contam. Part A*. 2018. V. 35. № 4. P. 661–673.
<https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1426891>
17. Dzantiev B. B., Byzova N. A., Urusov A. E., Zherdev A. V. // *Trends Anal. Chem.* 2014. V. 55. P. 81–93.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.11.007>
18. Reig M., Toldrá F. // *Meat Sci.* 2008. V. 78. № 1–2. P. 60–67.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.029>
19. Duffy G. F., Moore E. J. // *Anal. Lett.* 2017. V. 50. № 1. P. 1–32.
<https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1167900>
20. Xu F., Ren K., Yang Y. Z., Guo J. P., Ma G. P., Liu Y. M. et al. // *J. Integ. Agric.* 2015. V. 14. № 11. P. 2282–2295.
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61121-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61121-2)
21. Serchenya T. S., Semizhon P. A., Schaslionak A. P., Harbachova I. V., Vashkevich I. I., Sviridov O. V. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2023. V. 59. № 1. P. 79–92.
<https://doi.org/10.1134/S0003683823010106>
22. Samsonova Z. V., Shchelokova O. S., Ivanova N. L., Rubtsova M. Y., Egorov A. M. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2005. V. 41. № 6. P. 589–595.
<https://doi.org/10.1007/s10438-005-0107-4>
23. Bacigalupo M. A., Meroni G., Secundo F., Lelli R. // *Talanta*. 2008. V. 77. № 1. P. 126–130.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.057>
24. Jiao S. N., Wang P., Zhao G. X., Zhang H. C., Liu J., Wang J. P. // *J. Environ. Sci. Health B*. 2013. V. 48. № 6. P. 486–494.
<https://doi.org/10.1080/03601234.2013.761908>
25. Zeng K., Zhang J., Wang Y., Wang Z. H., Zhang S. X., Wu C. M. et al. // *Biomed. Environ. Sci.* 2013. V. 26. № 2. P. 100–109.
<https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.02.004>
26. Peng, J., Cheng, G., Huang, L., Wang Y., Hao H., Peng D. et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 8925–8933.
<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7311-5>
27. Serchenya T. S., Harbachova I. V., Sviridov O. V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2022. V. 48. № 1. P. 85–95.
<https://doi.org/10.1134/S1068162022010125>
28. Shanin I. A., Eremin S. A., Zvereva E. A., Zherdev A. V., Dzantiev B. B., Sviridov O. V. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2019. V. 55. № 5. P. 563–569.
<https://doi.org/10.1134/S0003683819050132>
29. Kuprienko O. S., Serchenya T. S., Vashkevich I. I., Harbachova I. V., Zilberman A. I., Sviridov O. V. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2022. V. 48. № 1. P. 105–114.
<https://doi.org/10.1134/S106816202201006X>
30. Sotnikov D. V., Zherdev A. V., Zvereva E. A., Eremin S. A., Dzantiev B. B. // *Appl. Sci.* 2021. V. 11. № 14. Article 6581.
<https://doi.org/10.3390/app11146581>
31. Boutten B., Ezan E., Mamas S., Dray F. // *Clin. Chem.* 1991. V. 37. № 3. P. 394–397.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/37.3.394>
32. Sulea T., Rohani N., Baardsnes J., Corbeil C. R., Deprez C., Cepero-Donates Y. et al. // *MABs*. 2020. Vol. 12. № 1. Article 1682866.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1682866>
33. Miller J. J., Valdes R. // *Clin. Chem.* 1991. V. 37. № 2. P. 144–153.
<https://doi.org/10.1093/clinchem/37.2.144>

34. Sheehan C., He J., Smith M. The Immunoassay Handbook. 4 Ed. /Ed. D. Wild. Amsterdam: Elsevier, 2013. P. 395–402. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097037-0.00026-9>
35. Komova N. S., Berlina A. N., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. // Orient. J. Chem. 2020. V. 36. № 1. P. 21–25. <https://doi.org/10.13005/ojc/360103>

Dependence of the Group Specificity of Immunoenzyme Determination of Penicillins in Milk on the Temperature and Duration of Antibiotic Cross Reactions with Polyclonal Antibodies

O. S. Kuprienko^{a, *}, I. I. Vashkevich^a, A. I. Zilberman^a, and O. V. Sviridov^a

^a*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220084, Belarus*

**e-mail: kuprienko@iboch.by*

The influence of thermodynamic and kinetic conditions on the interaction of polyclonal antibodies to penicillins with the antibiotics of a penicillin group was studied in the system of a direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Minimum differences in the cross reactions of the polyclonal antibodies with different penicillins were observed when the ELISA was carried out at 4°C for 1 hour. An increase in temperature and duration of the assay led to an increase in antibodies reactivity only to amoxicillin, and significantly enhanced differences among the sensitivities of individual penicillins determination. Under the chosen assay conditions, the following antibodies cross-reactivity values were obtained: to penicillin G — 90%, to ampicillin — 100%, to amoxicillin — 110%. The analytical sensitivity was 0.03 ng/mL for ampicillin, and the limit of ampicillin quantification in milk was 0.4 µg/L. The developed group-specific ELISA was used for the determination in milk of seven penicillins that are regulatory controlled in foods and raw materials of animal origin — penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, oxacillin, dicloxacillin and nafcillin.

Keywords: antibody cross-reactivity, enzyme-linked immunosorbent assay, antibiotics, penicillins