

Флуоресцентный поляризационный иммуноанализ для экспрессного контроля содержания антибиотиков: разработка и характеристика на примере хлорамфеникола

С. А. ЕРЕМИН¹, О. Ю. ХАН¹, В. В. ПИСАРЕВ², Е. А. ЗВЕРЕВА³, А. В. ЖЕРДЕВ³, Б. Б. ДЗАНТИЕВ³

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва

² Научно-производственный центр «Пробиотек», Москва

³ Институт биохимии им. А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Fluorescence Polarization Immunoassay, for Express Control of Antibiotic Levels: Design and Characteristics for Chloramphenicol, as an Example

S. A. EREMIN¹, O. YU. KHAN¹, V. V. PISAREV², E. A. ZVEREVA³, A. V. ZHERDEV³, B. B. DZANTIEV³

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

² Scientific-Production Center «Probiotek», Moscow

³ A. N. Bakh Institute of Biochemistry, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» Russian Academy of Sciences, Moscow

Рассмотрены особенности флуоресцентного поляризационного иммуноанализа (ФПИА) как средства экспрессного контроля наличия и содержания антибиотиков в различных видах проб, его преимущества по сравнению с другими аналитическими методами. На примере детекции антибиотика хлорамфеникола рассмотрены этапы разработки аналитической методики, определения её параметров. Анализ основан на конкурентном взаимодействии антител против хлорамфеникола с конъюгатом хлорамфеникол-флуорофор и потенциально содержащимся в тестируемой пробе свободным антибиотиком. Представлены экспериментальные результаты сравнения методик ФПИА хлорамфеникола, реализованных с использованием двух конъюгатов, которые отличаются длиной мостикового участка между функциональными группами антибиотика и флуорофора (флуоресцеина). Охарактеризованы требования к выбору концентраций антител и конъюгата, обеспечивающих высокочувствительную детекцию. Предел обнаружения хлорамфеникола при использовании разработанного ФПИА — 10 нг/мл, диапазон определяемых концентраций — от 20 нг/мл до 10 мкг/мл. Время определения — 10 мин.

Ключевые слова: хлорамфеникол, иммуноанализ, флуоресцентный поляризационный иммуноанализ.

Characteristics of the fluorescence polarization immunoassay (FPIA) as a mean for express control of antibiotic levels in various specimens and its advantages vs. other analytical tests are described. The developmental stages of the analytical procedure and its parameters are considered for chloramphenicol as an example. The analysis is based on competitive interaction of anti-chloramphenicol antibodies with the chloramphenicol-fluorophore conjugate and the potential free chloramphenicol in the specimen. The experimental results of the comparison of the chloramphenicol FPIA with the use of two conjugates differing in the length of the bridge length between the antibiotic functional groups and fluorophore (fluorescein) are presented. The requirements to the choice of the antibody and conjugate concentrations providing highly sensitive detection are characterized. The detection limit of chloramphenicol in the FPIA was 10 ng/ml and the determination of the concentrations ranged from 20 ng/ml to 10 mcg/ml. The time of the assay was 10 min.

Key words: chloramphenicol, immunoassay, fluorescence polarization immunoassay.

Введение

В настоящее время крайне востребованы высокочувствительные и производительные методы детекции антибиотиков. Это связано как с их медицинским применением (выбор индивидуальных терапевтических доз), так и с сопоставимым по объемам использованием в ветеринарии. Неконтролируемое применение антибиотиков в животноводстве для лечения и профилактики забо-

леваний приводит к загрязнению продуктов питания животного происхождения остаточными количествами соответствующих препаратов [1, 2] и их негативному воздействию на здоровье человека — возникновению аллергических реакций, развитию дисбактериозов и др. [3]. Важным последствием циркуляции антибиотиков в низких концентрациях в биосфере является распространение штаммов микроорганизмов, резистентных к действию лекарственных средств, что осложняет борьбу с инфекционными заболеваниями [4].

Для детекции антибиотиков реализуются преимущественно две группы подходов — хромато-

© Коллектив авторов, 2016

Адрес для корреспонденции: 119992 Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В.Ломоносова, Химический факультет

графические и иммунохимические. Хроматографические методы позволяют проводить измерения с высокой точностью, но требуют специального дорогостоящего оборудования и сложной пробоподготовки [5–7]. В связи с этим для высокопроизводительного скрининга востребованы иммунохимические методы, сочетающие чувствительность и специфичность, но при этом реализуемые с использованием сравнительно простого приборного обеспечения, с минимальной пробоподготовкой и позволяющие одновременно характеризовать несколько десятков и даже сотен проб [8, 9]. Следует, однако, заметить, что доминирующие в настоящее время иммунохимические методы детекции антибиотиков — микропланшетный иммуоферментный анализ (ИФА) и иммунохроматографический анализ (ИХА) с использованием тест-полосок — имеют свои ограничения. В случае ИФА это существенное время, требуемое для получения результатов тестирования — 1–2 ч. Иммунохроматографические же тесты в традиционном исполнении предназначены лишь для качественного заключения о превышении определённой концентрации аналита в пробе и не позволяют проводить количественный анализ [10].

В этом отношении перспективны разработки иммуноаналитических методов, сочетающих экспрессность с возможностью количественного определения, но при этом не требующих сложного несерийного приборного обеспечения и трудоёмких аналитических процедур. Таким решением, показавшим эффективность при контроле разнообразных биологически активных соединений, является флуоресцентный поляризационный иммуноанализ (ФПИА). ФПИА относится к гомогенным методам анализа и основывается на явлении поляризации флуоресценции, которое обусловлено одновременным протеканием в растворе процессов поглощения и испускания света молекулами флуорофора и их вращением [11, 12]. При облучении реакционной среды плоскополяризованным возбуждающим светом степень поляризации флуоресценции зависит от того, находится ли флуорофор в свободном виде (высокая скорость вращения молекулы, низкая остаточная поляризация) или в комплексе с антителом (низкая скорость вращения крупного комплекса, высокая поляризация), что позволяет измерять концентрацию аналита в пробе. В качестве источника плоскополяризованного света и регистратора флуоресценции могут быть использованы различные серийно выпускаемые приборы, существующие как в стационарном, так и в переносном исполнении.

Достоинствами ФПИА являются: достаточно высокая чувствительность и специфичность, хорошая воспроизводимость, отсутствие трудоём-

кой пробоподготовки, экспрессность и производительность анализа. Следует также отметить простоту перехода от минимального количества необходимых исходных реагентов — стандарт антибиотика, флуорофор и специфические (поли- или моноклональные) антитела — к практической реализации аналитической методики, состоящей лишь в синтезе конъюгата флуорофор-антибиотик (трейсер) и последовательном выборе используемых концентраций реагентов.

В настоящей статье на примере иммунодетекции хлорамфеникола представлены все стадии такой разработки и характеристики аналитической методики. Экспрессный контроль содержания хлорамфеникола крайне востребован. Хотя обнаружение серьёзных побочных эффектов привело к законодательным ограничениям применения данного препарата и введению официальных требований к его максимально допустимым уровням в пищевой продукции [3, 13], хлорамфеникол вследствие широкого спектра антибактериальной активности и дешевизны продолжает активно использоваться в лечебных и профилактических целях.

Данная разработка продолжает цикл исследований, проводимых на Химическом факультете МГУ и направленных на создание комплекса тест-систем для мониторинга содержания антибиотиков, основанных на принципе ФПИА. Разработки методик ФПИА антибиотиков других классов представлены в ранее вышедших публикациях [14–18]. Дополнение этого ряда тест-систем данной разработкой обеспечивает возможность комплексного мониторинга антибиотиков основных классов.

Материал и методы

Химические реагенты. Для проведения синтезов и разработки методики были использованы химические реактивы отечественного (марки ос.ч. и х.ч.) и импортного («Sigma») производства. Овечьи поликлональные антитела против хлорамфеникола были любезно предоставлены проф. Р. Абукнеша (R. Abuknesha), Великобритания.

Исходный концентрированный раствор хлорамфеникола для хранения готовили в дистиллированной воде. Для проведения ФПИА растворы реагентов разбавляли 2,5 мМ боратным буфером, pH 8,0, содержащим 0,1% азида натрия.

Оборудование. Поляризацию флуоресценции регистрировали в кюветках с помощью поляризационного флуориметра «Beacon 2000» (Panvera, США). Длина волны возбуждения — 480 нм, эмиссии — 520 нм.

Получение конъюгатов хлорамфеникол-флуорофор. Использовали флуорофоры флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) и этилендиаминфлуоресцеинизотиоцианат (ЭДФ). Их конъюгацию с хлорамфениколом проводили в соответствии с [17]. Продолжительность взаимодействия — 2 ч при комнатной температуре. Для разделения продуктов реакции методом тонкослойной хроматографии применяли пластины «Silufol», Чехия; элюент — смесь метанола и хлороформа в объемном соотношении 1:4.

Определение оптимального разведения трейсера. В 10 кюветках проводили последовательное двукратное разведение

трейсера в 0,1 мл боратного буфера, начиная с разведения 1:100. В кюветы добавляли по 0,4 мл того же буфера и затем измеряли интенсивность флуоресценции и её поляризацию.

Определение оптимального разведения антител. В 10 кюветках проводили последовательное двукратное разведение антител в 0,1 мл боратного буфера, начиная с разведения 1:20. В кюветы добавляли по 0,3 мл раствора трейсера в ранее выбранном разведении и по 0,1 мл буфера, после чего измеряли поляризацию флуоресценции.

Методика ФПИА: построение градуировочного графика и тестирование проб. В кюветы к 0,1 мл стандартного раствора хлорамфеникола (или тестируемой пробы) добавляли по 0,3 мл раствора трейсера и по 0,1 мл антител в ранее выбранных разведениях, затем измеряли поляризацию флуоресценции.

Однореагентный ФПИА проводили в соответствии с [19]. Для приготовления исходного реагента — комплекса трейсер-антитело — смешивали равные объёмы рабочих разведений трейсера и антител, разбавляли буфером в 5 раз и оставляли реагент на ночь в холодильнике, чтобы обеспечить достижение химического равновесия.

При проведении анализа в кюветы к 0,1 мл стандартного раствора хлорамфеникола (или тестируемой пробы) добавляли 0,4 мл однореагентного раствора, инкубировали при комнатной температуре 10 мин и измеряли поляризацию флуоресценции.

Обработка результатов измерений.

Предел обнаружения анализа определяли согласно рекомендациям IUPAC по методу Родбарда [20]. Проводили 10 измерений стандарта с нулевой концентрацией антибиотика и рассчитывали среднее значение поляризации флуоресценции (mP_0), а также стандартное отклонение (S) этой величины. Значение поляризации флуоресценции, соответствующее пределу обнаружения, вычисляли по формуле $mP_{min} = mP_0 - 3S$, после чего по градуировочной кривой определяли концентрацию хлорамфеникола, обеспечивающую достижение данной величины mP_{min} .

При оценке воспроизводимости результатов измерений выбирались концентрации из линейной области градуировочного графика и для них по трём повторностям, выполненным в течение одного дня, рассчитывали стандартное квадратичное отклонение (SE) и коэффициенты вариации ($SE/X_{cp} \cdot 100\%$).

Результаты и обсуждение

Получение конъюгатов хлорамфеникол-флуорофор. Для конъюгата хлорамфеникол-ФИТЦ при очистке реакционной смеси были выделены три фракции с разными значениями R_f (0,1, 0,5, 0,6). Хлорамфеникол-ЭДФ был получен в виде одной полосы с $R_f = 0,7$.

Продукты синтеза растворяли в боратном буфере и хранили при $+4^\circ\text{C}$ (рис. 1).

Определение оптимальных разведений трейсеров и антител. В соответствии с практикой ФПИА [12] выбирали разведения трейсеров, для которых интенсивность флуоресценции при 520 нм в 10 раз

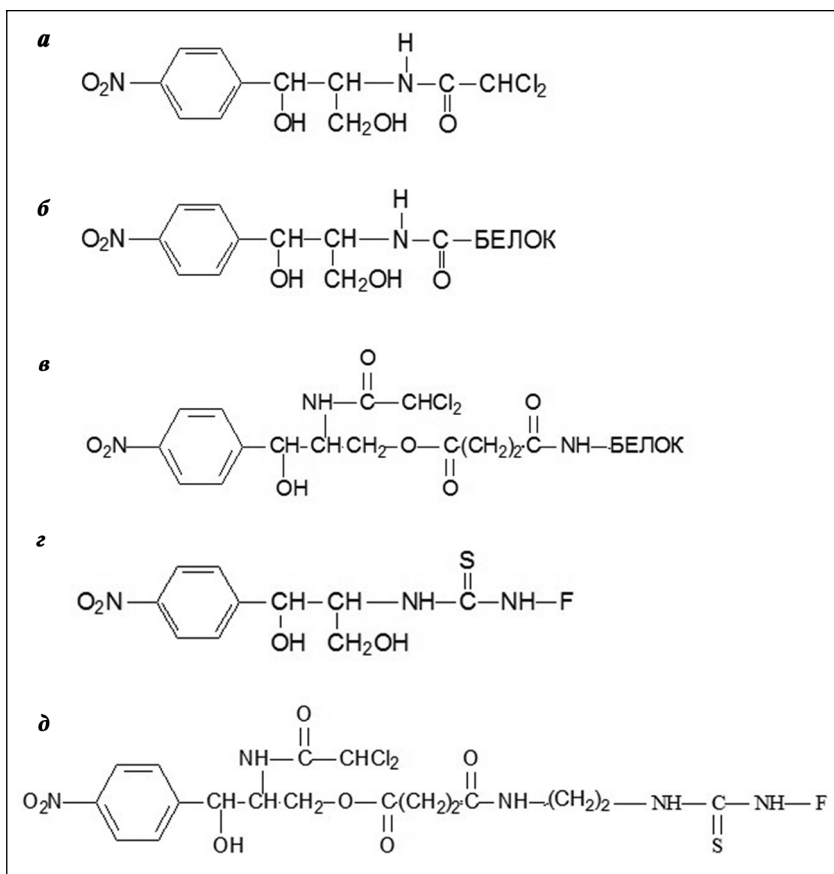


Рис. 1. Химические структуры.

а — хлорамфеникол; б, в — иммуногены для получения антител 1 и 2; г — трейсер 1 — хлорамфеникол-ФИТЦ; д — трейсер 2 — хлорамфеникол-ЭДФ.

превышала фоновое значение флуоресценции рабочего буферного раствора.

Были протестированы две антисыворотки на хлорамфеникол, полученные против иммуногенов, структурные формулы которых представлены на рис. 1 б, в. Получены зависимости степени поляризации флуоресценции от разведения антисывороток при фиксированных концентрациях взаимодействующих с ними трейсеров хлорамфеникол-ЭДФ и хлорамфеникол-ФИТЦ (рис. 2). Основным параметром связывания являлось разведение антисыворотки (титр), приводящее к 50% ингибированию поляризации флуоресценции.

Установлено, что для трейсера хлорамфеникол-ЭДФ отсутствует взаимодействие с антисыворотками. При использовании трейсера хлорамфеникол-ФИТЦ титры антисывороток 1 и 2 составили 1:100 и 1:250, соответственно.

Определение аналитических характеристик ФПИА. В оптимизированных условиях было реализовано конкурентное взаимодействие антисывороток со свободным хлорамфениколом (стандарт для градуировки или тестируемая проба) и хлорамфениколом, входящим в состав трейсера. Полученные градуировочные графики представлены на

рис. 3, а характеристики разработанной методики ФПИА хлорамфеникола — предел обнаружения и диапазон определяемых концентраций — в табл. 1.

Однореагентный ФПИА. Охарактеризована возможность детекции хлорамфеникола методом ФПИА с использованием однореагентного препарата — предварительно сформированного комплекса антитело-трейсер. Для определения кинетики диссоциации данного комплекса к нему добавляли свободный антиген (хлорамфеникол) в разных концентрациях, что приводило к вытеснению трейсера из иммунного комплекса (рис. 4). Установлено, что при этом вытеснении равновесие в системе достигается за 10–15 минут в зависимости от концентрации аналита. Подтвержденная экспрессность данного варианта ФПИА в сочетании с минимальной трудоемкостью тестирования обуславливают его конкурентный потенциал по сравнению с традиционным ФПИА.

Применение ФПИА для контроля хлорамфеникола в продуктах питания. Для подтверждения эффективности разработанной методики проведены эксперименты по внесению в пробы пищевой продукции (молока) известных количеств хлорамфеникола (метод «введено-найден») (табл. 2). Показана высокая степень соответствия результатов определения хлорамфеникола методом ФПИА с данными о реальном его содержании в контаминированных пробах.

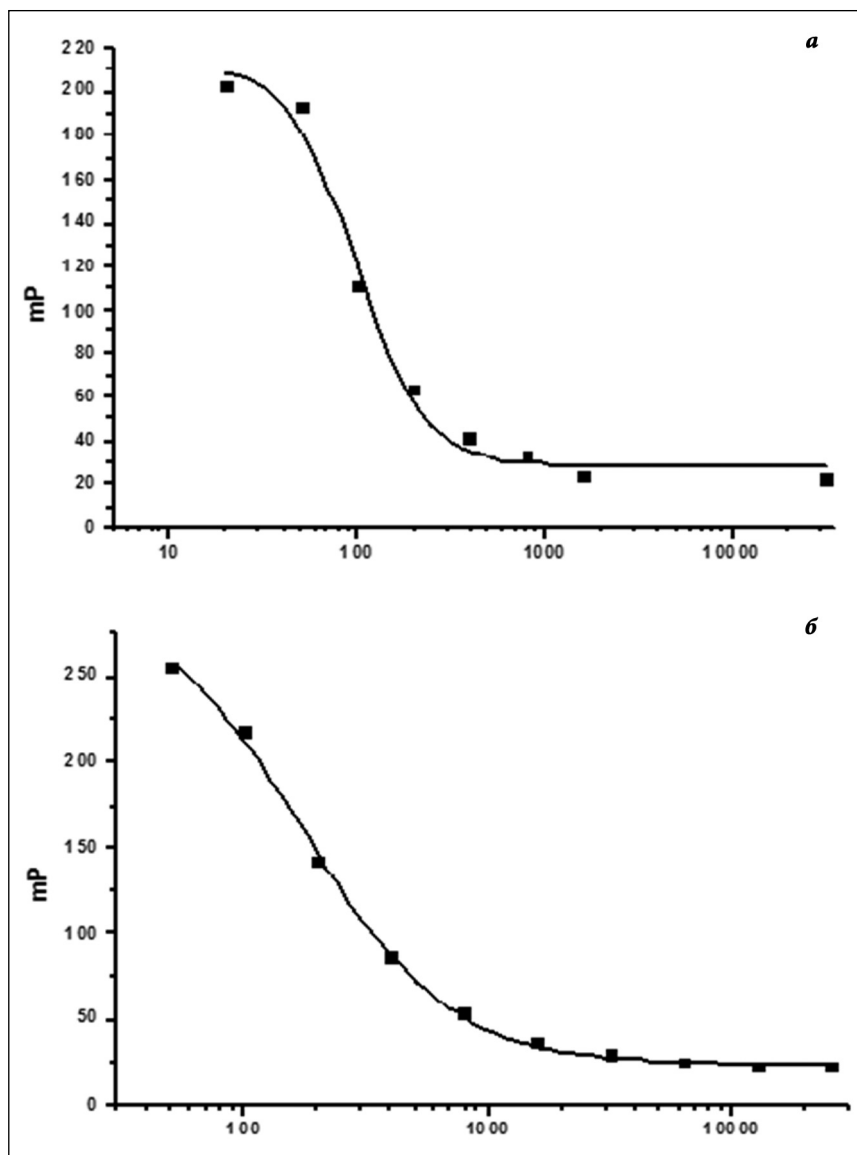


Рис. 2. Концентрационные зависимости связывания антисывороток с хлорамфениколом.

(а — антитела 1; б — антитела 2) с трейсером 1 (хлорамфеникол-ФИТЦ). По оси абсцисс — кратность разведения антисыворотки; по оси ординат — поляризация флуоресценции.

Таблица 1. Аналитические характеристики ФПИА хлорамфеникола

Антитела	Предел обнаружения, C_{\min} , нг/мл	Диапазон определяемых концентраций (нг/мл)
Антитела 1	20	40–20 000
Антитела 2	10	20–10 000

Таблица 2. Полнота открытия хлорамфеникола в молоке

Концентрация, нг/мл	Процент открытия, %
10	101,4±3,0
50	92,4±4,0
150	87,3±4,0
300	87,6±2,0

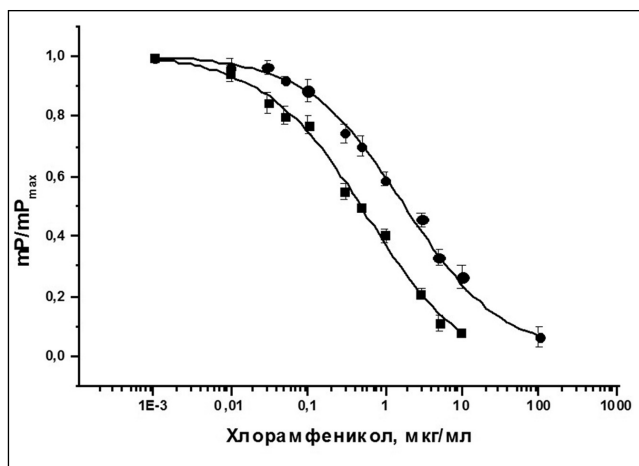


Рис. 3. Градуировочные графики ФИА хлорамфеникола

(● – антитела 1, ■ – антитела 2). По оси абсцисс – концентрация хлорамфеникола (мкг/мл) в пробе; по оси ординат – отношение поляризации флуоресценции тестируемой пробы и пробы без хлорамфеникола.

В результате проведенных исследований, разработана методика флуоресцентного поляризационного иммуноанализа антибиотика хлорамфеникола. Подобраны иммунореагенты и их концентрации, оптимальные для проведения анализа. Определены аналитические характеристики метода – предел обнаружения составил 10 нг/мл, диапазон определяемых концентраций – 20–10000 нг/мл. Продолжительность тестирования – 10 мин. Показана возможность использования разработанной методики при тестировании продуктов питания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blasco C., Torres C.M., Pico Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food. *Trends Anal Chem* 2007; 26: 9: 895–913.
2. Durso L. M., Cook K. L. Impacts of antibiotic use in agriculture: what are the benefits and risks? *Cur Opin Microbiol* 2014; 19: 37–44.
3. Beyene T. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. *J Veterinar Sci Technol* 2016; 7: 1: 7.
4. Finley R.L., Collignon P., Larsson D.G.J., McEwen S.A., Li X.Z., Gaze W.H. et al. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin Infect Diseases* 2013; 57: 5: 704–710.
5. Robert C., Gillard N., Brasseur P. Y., Pierret G., Ralet N., Dubois M., Delahaut P. Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. *Food Addit Contam Part A* 2013; 30: 3: 443–457.
6. Mottier P., Parisod V., Gremaud E., Guy P.A., Stadler R.H. Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003; 994: 1–2: 75–84.
7. Barreto F., Ribeiro C., Hoff R. B., Costa T. D. Determination and confirmation of chloramphenicol in honey, fish and prawns by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with minimum sample preparation: validation according to 2002/657/EC Directive. *Food Addit Contam Part A* 2012; 29: 4: 550–558.
8. Tao X., Zhou S., Yuan X., Li H. Determination of chloramphenicol in milk by ten chemiluminescent immunoassays: influence of assay format applied. *Anal Methods* 2016; 8: 22: 4445–4451.
9. Xu F., Ren K., Yang Y., Guo J., Ma G., Liu Y. et al. Immunoassay of chemical contaminants in milk: A review. *J Integr Agric* 2015; 14: 11: 2282–2295.

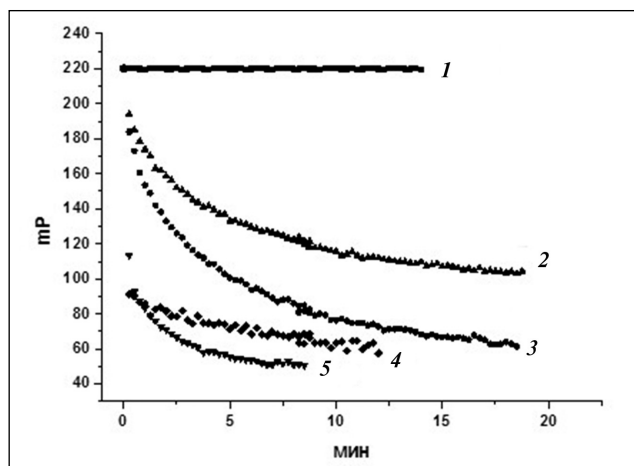


Рис. 4. Кинетические кривые вытеснения трейсера из иммунного комплекса при разных концентрациях хлорамфеникола.

1 – 0 мкг/мл; 2 – 1 мкг/мл; 3 – 10 мкг/мл; 4 – 100 мкг/мл; 5 – 1000 мкг/мл.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (Соглашение о предоставлении субсидии от 11 ноября 2015 г. № 14.616.21.0061, уникальный идентификатор RFMEFI61615X0061).

18. *Shanin I.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B.* Development of fluorescence polarization and enzyme-linked immunosorbent assays for danofloxacin detection in milk. *Int J Chem Sci* 2016; 14: 12: 283–298.
19. *Mi T., Wang Z., Eremin S., Shen J., Zhang S.* Simultaneous determination of multiple (fluoro)quinolone antibiotics in food samples by a one-step fluorescence polarization immunoassay. *J Agric Food Chem* 2013; 61: 39: 9347–9355.
20. *Rodbard D.* Statistical estimation of the minimal detectable concentration («sensitivity») for radioligand assays. *Anal Biochem* 1978; 90: 1: 1–12.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Еремин Сергей Александрович — д.х.н., профессор, ведущий научный сотрудник кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва

Хан Олег Юрьевич — аспирант, кафедра химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва

Писарев Владимир Викторович — к.х.н., генеральный директор Научно-производственного центра Пробиотек, Москва

Зверева Елена Анатольевна — к.б.н., научный сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

Жердев Анатолий Виталиевич — к.б.н., ведущий научный сотрудник Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

Дзантиев Борис Борисович — д.х.н., профессор, заместитель директора Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва