

УДК 57.083.3:[577.182.22+577.182.24]

Поступила в редакцию 16.08.2024
Received 16.08.2024**О. С. Куприенко, А. И. Зильберман, И. И. Вашкевич, О. В. Свиридов***Государственное научное учреждение «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск, Республика Беларусь***АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НОВЫХ
ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ
НА БЕТА-ЛАКТАМНЫЕ АНТИБИОТИКИ
В ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ И ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ**

Аннотация. Исследованы аналитические характеристики двух разработанных микропланшетных тест-систем для прямого конкурентного иммуноферментного анализа бета-лактамовых антибиотиков. Одна из систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» включает рекомбинантный микробный рецептор бета-лактамов, который распознает и связывает как пенициллины, так и цефалоспорины. Вторая биоаналитическая система «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» основана на взаимодействии пенициллинов со специфичными к ним высокоаффинными поликлональными антителами. Калибраторы для построения градуировочного графика в обоих случаях готовят путем последовательного разведения раствора ампициллина, и массовая доля суммы бета-лактамов или пенициллинов в образцах измеряется относительно концентрации этого антибиотика. Найдены показатели специфичности обеих тест-систем, рассчитаны параметры точности выполнения измерений, установлены диапазоны определений и охарактеризована область применения соответствующих методик иммуноферментного анализа. Для тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» показано наличие смещения результатов измерений массовой доли антибиотиков в кислотолюбивой продукции, мясе и субпродуктах, что учтено при расчете суммарной неопределенности методики. Метрологически аттестованные рабочие характеристики, область применения и порядок проведения анализа с использованием тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» соответствуют описанию в МВИ.МН 5336-2015.

Ключевые слова: бета-лактамовые антибиотики, пенициллины, цефалоспорины, иммуноферментный анализ, методика измерений.

O. S. Kuprienko, A. I. Zilberman, I. I. Vashkevich, O. V. Sviridov*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus***ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF NEW ENZYME IMMUNOASSAY
SYSTEMS FOR BETA-LACTAM ANTIBIOTICS IN FOOD PRODUCTS AND
RAW MATERIALS**

Abstract. The analytical characteristics of two developed kits for enzyme-linked immunosorbent assay of beta-lactam antibiotics were studied. PRODOSCREEN® ELISA-Beta-Lactam kit includes a recombinant microbial beta-lactam receptor that recognizes and binds both penicillins and cephalosporins. PRODOSCREEN® ELISA-Penicillin kit is based on the interaction of penicillins with high affinity polyclonal antibodies specific to these antibiotics. Calibration solutions in both cases are prepared on the basis of ampicillin, therefore, the contents of beta-lactams or penicillins in the samples are measured relative to the concentration of this antibiotic. In the experiments, the specificities of the test systems were determined, the accuracy parameters for measuring the sum of beta-lactam antibiotics were calculated, the ranges of determination and the scopes of application of enzyme-linked immunosorbent assays of beta-lactams were established. It was shown that the recovery is significantly different from 1 when the measurements of beta-lactam concentrations in fermented milk products, meat and offal are carried out using the PRODOSCREEN® ELISA-Beta-

Lactam kit. This finding was taken into account when calculating the total uncertainty of the method. As for PRODOSCREEN® ELISA-Penicillin test system, its metrologically certified performance characteristics, scope of application and the analytical procedure correspond to the parameters described in MVI.MN 5336-2015.

Keywords: beta-lactam antibiotics, penicillins, cephalosporins, enzyme-linked immunosorbent assay, validation.

Введение. Мероприятия по обеспечению биобезопасности продукции, выполняемые на постоянной основе пищевой промышленностью и лабораторными службами, включают проведение обязательного контроля продуктов питания и продовольственного сырья на содержание в них остатков антибиотиков различных классов. Дело в том, что нарушение ветеринарных технологий и правил применения лекарственных противомикробных препаратов приводит к их распространению в сфере агрохозяйственной деятельности, накоплению в продукции животного происхождения и попаданию в организм человека, что может вызывать серьезные расстройства здоровья. Кроме того, увеличение разнообразия и массы антибиотиков в объектах окружающей среды вызывает быстрый рост бактериальной резистентности к антибиотикам [1]. В наше время проблема антибиотикоустойчивости патогенных микроорганизмов стала настоящим вызовом науке и обществу. В октябре 2022 года Советом Глав СНГ принят План совместных действий государств-участников содружества по противодействию устойчивости к противомикробным препаратам, в выполнение которого включилась Национальная академия наук Беларуси. План включает, в частности, развитие в период 2022–2026 годов системного мониторинга остаточных количеств противомикробных лекарств в пищевых матриксах, а также укрепление материально-технической базы специализированных лабораторий, выполняющих такие определения (мероприятия 2.17.1 и 2.17.2 Плана).

Данная статья посвящена современным средствам и методикам биоаналитического мониторинга бета-лактамов антибиотиков, пожалуй, самого обширного класса противомикробных субстанций, входящих в составы порядка 150 ветеринарных препаратов, зарегистрированных в государственном реестре Республики Беларусь. Авторы надеются, что их скромный вклад будет полезен для выполнения названных мероприятий Плана по противодействию устойчивости к антибиотикам.

В Беларуси, как и во многих странах мира, законодательно установлены максимально допустимые уровни (МДУ) остаточных количеств бета-лактамов в пищевой продукции животного происхождения, которые варьируются в широком пределе от 4 до 400 мкг/кг. Существующий в пищевой аналитике порядок измерения содержания бета-лактамов антибиотиков в пищевых матриксах состоит из первичного скрининга путем биоанализа и последующего подтверждения положительного результата чаще всего высокоэффективной жидкостной хроматографией в комбинации с масс-спектрометрией. Биоаналитические методы, включающие иммунный и рецепторный анализы, постоянно совершенствуются, составляя актуальную область прикладных научных исследований.

Главное внимание при разработке биоаналитических систем на антибиотики класса бета-лактамов уделяется, естественно, соединениям, входящим в нормируемые перечни, а именно группам пенициллинов и цефалоспоринов [2-5], однако, описаны, как бы впрок, и тест-системы, распознающие соединения и из двух других групп — карбопенемов и монобактамов [6]. В основе молекул пенициллинов лежит структура пенициллановой кислоты, включающая конденсированные тиазолидиновый и бета-лактамовый циклы, тогда как цефалоспорины являются производными цефалоспороановой или дезацетоксицефалоспороановой кислот и содержат конденсированные бета-лактамовое и дигидротиазиноное кольца (рис. 1). Для проявления биологической активности, которая реализуется через сродство к тому или иному бактериальному белку-рецептору, большое значение имеет целостность и реакционная способность бета-лактамового цикла, который очень неустойчив в кислой и щелочной средах, а также может разрушаться в ходе химической модификации. Периферическая структура антибиотика, обозначенная радикалами R_1 – R_3 на рис. 1, влияет на силу сродства к природному или рекомбинантному рецептору, а с другой стороны определяет различия в антигенных свойствах и иммунореактивностях бета-лактамов в процессах продуцирования специфических антител у животных и взаимодействий в иммуноаналитических системах.

Химия и биотехнологии использования бета-лактамов антибиотиков как гаптенов хорошо освещены в литературе, и научные результаты нашли свое воплощение в практических системах иммуноанализа. Описаны способы синтеза иммуногенных конъюгатов пенициллинов и цефалоспоринов с белками-носителями, схемы получения поликлональных и моно-

клональных антител, характеристики обратимых конкурентных реакций антиген-антитело с участием свободных и конъюгированных с инертными белками или ферментами антибиотиков. Отметим, однако, что исследователям редко удается получить высокоаффинные антитела и достичь требуемой чувствительности иммуноанализа [2–5, 7]. Неизвестны антитела, которые связывают все соединения группы пенициллинов или группы цефалоспоринов, не говоря уже об их специфичности в отношении полного перечня контролируемых бета-лактамов. Кроме того, каждый вновь полученный препарат антител имеет новый набор свойств, что создает трудности в разработке и стандартизации иммунных тест-систем и методик их применения.

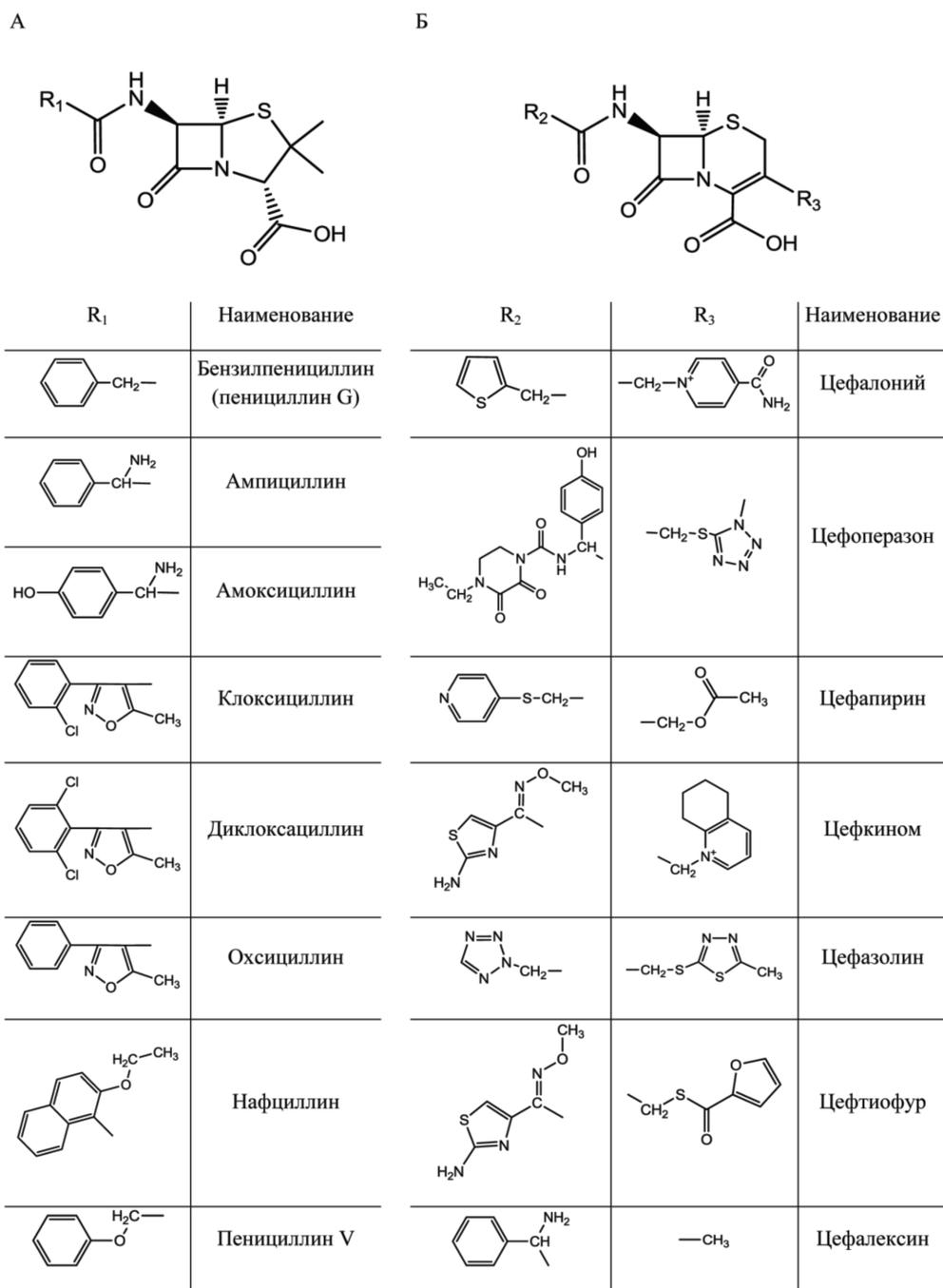


Рис. 1. Химические структуры основных бета-лактамных антибиотиков: пенициллинов (А) и цефалоспоринов (Б)

Fig. 1. Chemical structure of the main beta-lactam antibiotics: penicillins (A) and cephalosporins (B)

Биоанализ данного класса антибиотиков получил мощный импульс для дальнейшего развития после открытия и применения *in vitro* бактериальных белков со свойствами мембранных рецепторов бета-лактамов, например, в *Streptococcus pneumoniae*, получивших название «пенициллинсвязывающие белки» (penicillin-binding proteins, PBPs) [8, 9.]. В клетке патогенного микроорганизма белок-рецептор выступает в качестве мишени антибиотика, распознает его бета-лактамную структуру и специфически связывает лекарственную субстанцию. В результате комплексообразования напряженное бета-лактамное кольцо раскрывается и ацилирует остаток серина в активном центре рецептора, что ингибирует этот важный для функционирования клетки белок и вызывает ее гибель. В биоаналитической системе *in vitro*, основанной на принципе рецепции и включающей PBP, образование нековалентного комплекса между PBP и бета-лактамом также происходит, но оно не приводит к химической модификации активного центра рецептора из-за крайне малых концентраций реагентов. В рецепторно-аналитических системах на бета-лактамы наиболее часто исследовался белок PBP 2x* [7, 10-12].

К семейству PBPs, представители которого связывают пенициллины, цефалоспорины и некоторые соединения других групп бета-лактамов, относится и трансмембранный белок BlaR — трансдуктор сигнала в индуцируемом бета-лактамами синтезе бета-лактамазы *Bacillus licheniformis* [13]. Данный белок включает С-концевой домен (BlaR-CTD), экспонированный вне клетки. Этот сенсорный домен выполняет рецепторную функцию, связанный им бета-лактама ацилирует активный центр, структурные изменения формируют сигнал, в результате которого инактивируется белок-репрессор, включается транскрипция гена и осуществляется синтез бета-лактамазы. BlaR-CTD был гетерологически экспрессирован в *E. Coli* как водорастворимый PBP с молекулярной массой 26 кДа, и его высокоочищенная форма получена в препаративных количествах [14-19]. Анализ кристаллической структуры BlaR-CTD показал, что его полипептидная цепь свернута в 2 домена с полостью лигандсвязывающего центра между ними [20]

В последнее десятилетие опубликован ряд статей об использовании рекомбинантного BlaR-CTD из *B. Licheniformis* дикого и мутантного типов в микропланшетных и мембрано-хроматографических рецепторных системах для количественного определения широкого спектра бета-лактамов антибиотиков в пищевых продуктах [6, 16–19]. Разработан метод количественного определения BlaR-CTD, обладающего лигандсвязывающей и антигенной активностями, установлены характеристики стабильности рецептора в технологиях изготовления практических биоаналитических систем на его основе [19].

В данной статье представлены результаты разработки и испытаний двух предназначенных для практики тест-систем иммуноферментного анализа (ИФА) бета-лактамов антибиотиков в пищевых продуктах и сырье животного происхождения. Одна из систем основана на взаимодействии пенициллинов с высокоаффинными поликлональными антителами, а другая включает рекомбинантный микробный рецептор BlaR-CTD, который распознает и связывает как пенициллины, так и цефалоспорины.

Целью данной работы является определение аналитических характеристик тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» и «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин». Перечень задач состоял из выяснения специфичности анализа, проводимого с использованием тест-систем, расчета параметров точности методик ИФА бета-лактамов, установления области их применения с указанием диапазонов измерения концентраций антибиотиков.

Материалы и методы исследований. Применяли препараты бета-лактамов антибиотиков с установленными значениями содержания основного компонента от следующих фирм-поставщиков. Аналитические стандарты Vetranal™ пеницилина G калиевой соли (99,3 %), цефалония гидрата (99,3 %), диклоксациллина натриевой соли гидрата (98,0 %) — Sigma-Aldrich (США); референсные материалы феноксиметилпенициллина (98,26 %), цефепима бензатина (93,8 %), цефоперазона (999,0 мкг/мл), цефазолина натриевой соли (98,5 %) — LGC Labor GmbH (Германия); амоксициллина тригидрат (99,9 %) ампициллина тригидрат (99,3 %), цефкином сульфат (96,0 %), нафциллина натриевая соль моногидрат (95,7 %), оксациллин натриевая соль моногидрат (99,4 %) — HPC Standards GmbH (Германия); сертифицированные референсные материалы клоксациллина натриевой соли моногидрата (98,2 %), цефтиофура (97,5 %), цефалексина (98,5 %) — CPChem Ltd (Франция); пиперациллина натриевая соль (946 мкг/мг) — Glentham Life Sciences (Великобритания). Кроме того использовали бацитрацин, хлорамфеникол, стрептомицина сульфат фирмы Glentham Life Sciences (Великобритания), колистина сульфат — LGC Labor GmbH (Германия), тетрациклина гидрохлорид Merck (США).

Детекцию колориметрического сигнала в лунках микротитровальных планшетов осуществляли при длине 450 нм с использованием фотометра универсального Ф300ТП (ОАО «Витязь», Беларусь).

Использовали тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» и «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин», изготовленные в соответствии с ТУ ВУ 100185129.196-2023 в составе:

- ♦ микротитровальный планшет, 96-луночный полистирольный планшет с биоспецифически иммобилизованными бета-лактамым рецептором BlaR-STD или антителами к пенициллинам, 12 стрипов по 8 лунок, готов к использованию, 1 планшет;
- ♦ конъюгат ампициллина с пероксидазой, 100-кратный концентрат, 1 флакон, (0,10±0,01) мл;
- ♦ раствор для разведения конъюгата, 1 флакон, (10,0±0,5) мл;
- ♦ стандарт ампициллина, 4 нг/мл в восстановленном виде, лиофилизированный препарат, 3 флакона;
- ♦ буфер для разбавления, 1 флакон, (50,0±1,0) мл;
- ♦ моющий буфер, 10-кратный концентрат, 1 флакон (50,0±1,0) мл;
- ♦ хромоген-субстратный раствор, 1 флакон (14,0±0,5) мл;
- ♦ стоп-реагент, 1 флакон (14,0±0,5) мл;

Подготовка к проведению ИФА.

Стандарт ампициллина восстанавливали 2 мл буфера для разбавления, получали 4 нг/мл раствор антибиотика. Далее последовательным разведением этого раствора буфером для разбавления приготавливали градуировочные растворы для проведения ИФА. Концентрации ампициллина в градуировочных растворах тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» — 0,08, 0,20, 0,50, 1,25 нг/мл, тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» — 0,125, 0,25, 0,50, 1,00, 2,00, 4,00 нг/мл.

Рабочий раствор конъюгата готовили в пробирке или флаконе, разбавляя концентрат раствором для разведения в 100 раз. Рабочий моющий буфер подготавливали, разбавляя концентрат дистиллированной водой в 10 раз.

Приготовление растворов для внесения добавок бета-лактамных антибиотиков

Для получения основных растворов бета-лактамных антибиотиков навески их препаратов, взвешенные с точностью до 0,1 мг, помещали в отдельные мерные колбы объемом 100 мл, приливали 50 мл дистиллированной воды или метанола, и перемешивали до полного растворения. Затем доводили объем раствора в колбе до метки и тщательно перемешивали. Концентрацию антибиотика в основном растворе рассчитывали по формуле (1), неопределенность концентрации вычисляли по формуле (2) как указано в [21].

$$C_{BL_0} = \frac{10^6 \cdot m_{BL_X} \cdot M_{BL} \cdot P_{BL_X}}{100 \cdot M_{BL_X} \cdot V_k}, \quad (1)$$

где C_{BL_0} — концентрация бета-лактамного антибиотика в основном растворе, нг/мл; m_{BL_X} — навеска бета-лактамного антибиотика, мг; M_{BL} — молярная масса бессолевой и/или безводной форм антибиотика, г/моль; P_{BL_X} — массовая доля основного вещества в сухом препарате антибиотика, %; M_{BL_X} — молярная масса основного вещества антибиотика, г/моль; V_k — объем мерной колбы, в которой приготавливается основной раствор антибиотика, мл.

$$\begin{aligned} \frac{u(C_{BL_0})}{C_{BL_0}} &= \sqrt{\left[\frac{u(m_{BL_X})}{m_{BL_X}} \right]^2 + \left[\frac{u(P)}{P} \right]^2 + \left[\frac{u(V_k)}{V_k} \right]^2} = \\ &= \sqrt{\left(\frac{\Delta_m}{m_{BL_X}} \cdot \sqrt{\frac{2}{3}} \right)^2 + \left(\frac{\Delta P}{\sqrt{3} \cdot P_{BL_X}} \right)^2 + \left(3,68 \cdot 10^{-7} + \frac{\Delta V_k^2}{6 \cdot V_k^2} \right)}, \end{aligned} \quad (2)$$

где $\frac{u(m_{BL_X})}{m_{BL_X}}$ — относительная стандартная неопределенность массы навески бета-лактамного антибиотика;

$\frac{u(P)}{P}$ — относительная стандартная неопределенность массовой доли основного вещества;

$\frac{u(V_k)}{V_k}$ — относительная стандартная неопределенность объема основного раствора антибиотика, приготавливаемого в мерной колбе; Δ_m — величина погрешности взвешивания весов, мг; ΔV_k^2 — предел допускаемой погрешности на номинальную вместимость мерной посуды, см³.

Растворы для добавок получали методом последовательного разведения основных растворов. Вычисляли неопределенность концентрации каждого из растворов.

Подготовка проб

В работе использовали образцы продуктов питания животного происхождения, закупленные в торговой сети г. Минска, не содержащие бета-лактамы антибиотики (массовые доли бета-лактамов антибиотиков в расчете на ампициллин ниже предела количественного определения тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» и «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин»).

В навески образцов продуктов вносили отдельные бета-лактамы антибиотики (пенициллины и цефалоспорины). Объем вносимой аликвоты антибиотика составлял от 25 до 300 мкл и не превышал 2 % от объема экстракта (объема аликвоты образца при анализе жидких продуктов). Внесение добавок осуществляли на трех уровнях контаминации.

Образцы продукции животного происхождения для анализа в тест-системе «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» готовили следующим образом. Образцы молока, восстановленного сухого молока и восстановленной сухой молочной смеси для детского питания разводили в 5 раз буфером для разбавления. К навеске (1,00±0,01) г молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, творога, коктейля молочного, кисломолочных продуктов (йогурт, сметана, кефир, пахта и т.п.), мороженого на молочной основе, мяса (мышцы) и мясных продуктов, креветок, субпродуктов (печень, почки) приливали 4,0 мл воды. Встряхивали образцы в течение 10 мин, затем центрифугировали при 4000 g (4–10) °C в течение 10 мин. Аликвоту надосадочной жидкости разбавляли в (2–10) раз буфером для разбавления. К навеске (1,00±0,01) г сыра (мягкого, полутвердого, твердого, сверхтвердого), масла сливочного, животного жира приливали 4,0 мл воды и 4,0 мл хлористого метилена. Встряхивали образцы в течение 10 мин, затем центрифугировали при 2000 g (20–25) °C в течение 10 мин. Аликвоту верхнего водного слоя разбавляли в 2 раза буфером для разбавления.

Образцы продукции животного происхождения для анализа в тест-системе «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» готовили, как описано ниже. Образцы молока, восстановленного сухого молока и восстановленной сухой молочной смеси для детского питания разводили в 2 раза буфером для разбавления. Навеску (25,0±0,1) г сгущенного молока растворяли в воде и доводили объем раствора до 100 мл. Затем аликвоту разводили в 2 раза буфером для разбавления. К навеске (0,50±0,01) г молочной сыворотки, восстановленной сухой молочной сыворотки, творога, коктейля молочного, кисломолочных продуктов (йогурт, сметана, кефир, пахта и т.п.), сыра (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), масла сливочного, мороженого на молочной основе приливали 3,5 мл воды и 4,0 мл хлористого метилена. Встряхивали образцы в течение 10 мин, затем центрифугировали при 2000 g (20–25) °C в течение 10 мин. Аликвоту верхнего водного слоя разбавляли в 5 раз буфером для разбавления. К навеске (1,00±0,01) г мяса (мышцы) и мясных продуктов, субпродуктов (печень, почки) и продуктов из них, рыбы, креветки приливали 4,0 мл воды. Встряхивали образцы в течение 10 мин, затем центрифугировали при 2000 g (20–25) °C в течение 10 мин. Аликвоту надосадочной жидкости разбавляли в 8 раз буфером для разбавления.

Проведение ИФА. В лунки микротитровального планшета, покрытые антителами или рецептором, вносили 50 мкл градуировочных растворов или подготовленных проб и 50 мкл рабочего раствора конъюгата. Инкубировали в течение 1 ч при (20–25) °C в случае тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» или при (4–8) °C в случае тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин». По окончании времени инкубации удаляли жидкость из всех лунок путем резкого переворачивания планшета и промывали лунки 3 раза по 200 мкл рабочего моющего буфера. Далее в каждую лунку вносили по 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Спустя 15 мин инкубации при (20–25) °C в темноте во все лунки планшета добавляли по 100 мкл стоп-реагента. В течение не более 15 мин измеряли оптическую плотность в лунках микропланшета при 450 нм.

На основании полученных экспериментальных данных строили градуировочные графики

зависимости $\text{logit} \left(\frac{B}{B_0} \right) = \log \left(\frac{\frac{B}{B_0}}{1 - \frac{B}{B_0}} \right)$ от десятичного логарифма концентрации ампициллина

на вида

$$\text{logit} \left(\frac{B}{B_0} \right) = a + b \cdot \lg C, \quad (3)$$

где B_0 — значение оптической плотности для градуировочного раствора C_0 , о.е.; B — значение оптической плотности, измеренное в лунке с градуировочным раствором ампициллина, о.е.; C — концентрация ампициллина в растворе, нг/мл; a и b — коэффициенты линейной регрессии.

По градуировочному графику определяли концентрацию бета-лактамовых антибиотиков в каждой лунке с исследуемой пробой. Для расчета массовой доли антибиотиков в образце использовали фактор разведения, зависящий от способа подготовки пробы.

В случае тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» использовали величины B' и B'_0 , которые получали после вычитания из зарегистрированной оптической плотности фонового сигнала. Величину фонового сигнала определяли в результате ИФА, проведенного по описанной схеме, в лунках, в которые вносили 100 мкл буфера для разведения и не добавляли рабочий раствор конъюгата.

Определение специфичности тест-систем. При проведении ИФА, как описано выше, в лунки микротитровального планшета вместо подготовленных проб вносили растворы известной концентрации бета-лактамовых и других антибиотиков, которые могут присутствовать в животноводческой продукции. Специфичность рассчитывали как процент перекрестного реагирования (кросс-реактивность, CR , %) различных антибиотиков со связывающими их белками, иммобилизованными в лунках микротитровального планшета, по формуле:

$$CR = \frac{C_{Amp}}{C_x} \cdot 100, \quad (4)$$

где C_{Amp} и C_x — концентрации соответственно вещества стандарта ампициллина и сравниваемого антибиотика, при которых максимальное значение ОП₄₅₀, измеренное в отсутствие конкурентных ингибиторов в системе, уменьшается на 50 %, нг/мл.

Результаты исследований и их обсуждение. Принцип работы и специфичность тест-систем. Тест-системы для определения бета-лактамовых антибиотиков «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» и «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» основаны на твердофазном прямом конкурентном ИФА, который проводится в лунках микротитровального полистирольного планшета (иммуносорбента). В течение первой инкубации, выполняемой в ИФА, определяемое соединение (бета-лактамовый антибиотик) и производное ананта в виде пероксидазного конъюгата конкурируют за связывание с иммобилизованными рецепторным белком BlaR-STD или специфическими к бета-лактамовым антибиотикам антителами. Не вступившие в иммунохимическую реакцию, а значит и не связавшиеся с твердой фазой компоненты, удаляют из лунок путем многократного промывания. Затем добавляют в каждую лунку хромоген-субстратный раствор, взаимодействие которого с пероксидазой в составе связанного с твердой фазой конъюгата приводит к формированию голубой окраски. Интенсивность окрашивания тем выше, чем больше конъюгата связалось с рецепторным белком или специфическими антителами, то есть чем меньше определяемого соединения содержится в анализируемой пробе. Ферментативную реакцию, приводящую к окрашиванию раствора, останавливают добавлением стоп-реагента, после чего измеряют интенсивность окраски. Схема ИФА приведена на рис. 2.

Базовым компонентом ИФА тест-систем, во многом определяющим их свойства является функционализированный микропланшет, внутренняя поверхность лунок которого покрыта специальными белками. В лунках микротитровального планшета тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» иммобилизован рекомбинантный белок-рецептор BlaR-STD [19]. При изготовлении микропланшета для тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» применены специфические поликлональные антитела кролика к антибиотикам группы пенициллинов [7]. Специфичность двух тест-систем, найденная в эксперименте по определению перекрестной реактивности BlaR-STD и антител к бета-лактамовым антибиотикам и другим лекарственным препаратам, приведена в табл. 1.

С помощью тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» могут быть определены концентрации антибиотиков, как группы пенициллинов, так и цефалоспоринов (всего 14 наименований). Эта система имеет низкую аналитическую чувствительность к цефтифуру и цефалексину, зато обладает повышенным сродством к пенициллину G, присутствие которого, например, в молоке не допускается вовсе. Тест-система «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» позволяет определять антибиотики группы пенициллинов со специфичностью от 18 до 120 % (всего 9 наименований), при этом она абсолютно не чувствительна к присутствию антибиотиков группы цефалоспоринов. При использовании каждой из двух тест-систем в от-

сутствии информации о виде антибиотика, содержащего в пробе, концентрация определяемых соединений выражается как сумма пенициллинов и цефалоспоринов (в случае тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам») или только пенициллинов (для тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин») в пересчете на ампициллин, который применяется для приготовления градуировочных растворов.

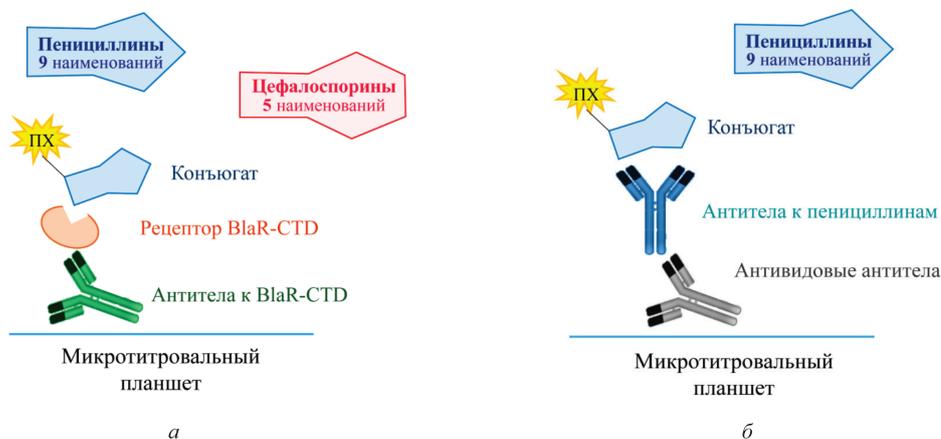


Рис. 2. Схемы количественного определения бета-лактамовых антибиотиков тест-системами «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» (А) и «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» (Б)
Fig. 2. Assay schemes for the quantitative determination of beta-lactam antibiotics by «PRODOSCRIPTIN® ELISA-Beta-Lactam» (A) and «PRODOSCRIPTIN® ELISA-Penicillin» (B) kits

Table 1. Специфичность тест-систем
Table 1. Kits specificity

Антибиотик	Специфичность (CR), %	
	«ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам»	«ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин»
<i>Пенициллины</i>		
Бензилпенициллин (пенициллин G)	244	100
Амоксициллин	111	120
Пиперациллин	110	80
Феноксиметилпенициллин (пенициллин V)	208	130
Ампициллин (вещество стандарта)	100	100
Оксациллин	75	54
Диклоксациллин	75	18
Клоксациллин	54	47
Нафциллин	15	29
<i>Цефалоспорины</i>		
Цефалоний	129	< 0,01
Цефоперазон	109	< 0,01
Цефепим	49	< 0,01
Цефтриаксон	39	< 0,01
Цефазолин	10	< 0,01
Цефтиофурил	5	< 0,01
Цефалексин	0,3	< 0,01
<i>Антибиотики других групп</i>		
Хлорамфеникол	< 0,01	< 0,01
Стрептомицин	< 0,01	< 0,01
Тетрациклин	< 0,01	< 0,01
Бацитрацин	< 0,01	< 0,01
Колистин	< 0,01	< 0,01

Градуировочные графики двух тест-систем приведены на рис. 3.

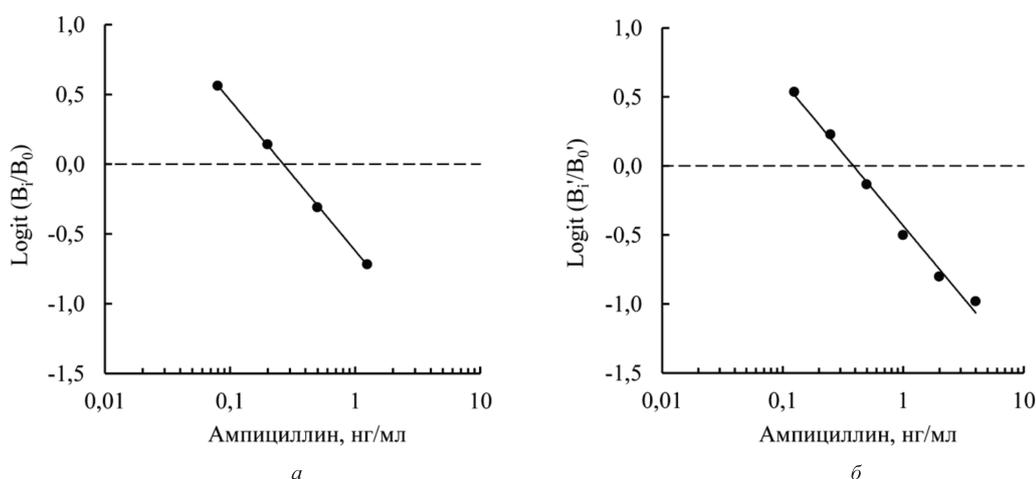


Рис. 3. Градуировочные графики тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» (А) и «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» (Б)

Fig. 3. Calibration curves of «PRODOSCREEN® ELISA-Beta-Lactam» (A) and «PRODOSCREEN® ELISA-Penicillin» (B) kits

Оценка параметров точности методик измерений бета-лактамных антибиотиков. Для расчета параметров точности анализа, проводимого согласно инструкции по применению тест-систем, был организован внутрилабораторный эксперимент, в котором получали результаты в условиях повторяемости (одним и тем же оператором в течение ограниченного времени с применением одного и того же оборудования) и при варьировании параметров промежуточной прецизионности «оператор» и «время» (работа выполнялась двумя операторами в течение двух дней). Для оценки показателей точности служил метод добавок. В качестве добавки применяли растворы бета-лактамных антибиотиков, в которых неопределенность концентрации основного вещества не превышала 3 %. Учитывали изменение объема экстракта (объема жидкой пробы), обусловленное внесением добавки. Исследуемые образцы продуктов питания и продовольственного сырья, в которые вносились добавки, сгруппированы в матрицы по близости состава, особенностям подготовки проб и предварительно полученной информации об извлечении из них бета-лактамных антибиотиков. Далее при указании видов продукции также учитывали результаты определения бета-лактамных антибиотиков в других образцах, не вошедших во внутрилабораторный эксперимент. Отобранные образцы исследуемых видов продукции без добавок были предварительно проверены на отсутствие в них бета-лактамных антибиотиков.

Значение массовой доли бета-лактамных антибиотиков в пробе с добавкой в пересчете на ампициллин с учетом специфичности тест-систем рассчитывали по формуле (5).

$$X_{REF} = \frac{C_{BL} V_{BL} CR}{m_s \cdot 100}, \tag{5}$$

где X_{REF} — массовая доля суммы бета-лактамных антибиотиков в пробе с добавкой в пересчете на ампициллин, мкг/кг; C_{BL} — концентрация раствора антибиотика в растворе для внесения добавки, нг/мл; V_{BL} — объем добавленного раствора антибиотика, мл, m_s — масса навески пробы, в которую вносится добавка, г, CR — значение специфичности (кросс-реактивности), приведенное в таблице 1.

В табл. 2 приведен план внесения добавок в различные образцы, который позволяет оценить параметры определения тест-системой «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» 14 бета-лактамных антибиотиков на трех уровнях контаминации. Для тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» использована аналогичная схема внесения добавок, включающая 9 антибиотиков групп пенициллинов.

Среди полученных в условия повторяемости и промежуточной прецизионности с варьированием параметров «оператор-время» результатов не было выбросов и разбросов (проведена проверка по критериям Кохрена и Граббса в соответствии с [22]). Среднее извлечение бета-лактамных антибиотиков R , рассчитанное как указано в [23], составило от 0,76 до 1,09 для тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» (таблица 3). Величина R для 9 пенициллинов с использованием тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» варьировалась от 0,94 до 1,06.

Table 2. Наименования бета-лактамовых антибиотиков, вносимых в образцы для исследования тест-системой «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам»

Table 2. Names of beta-lactam antibiotics added to samples for testing using the «PRODOSCREEEN® ELISA-Beta-Lactam» kit

Матрица	Наименование вносимого антибиотика на уровне контаминации		
	1	2	3
I	ампициллин	пенициллин G	нафциллин
II	амоксциллин	цефазолин	оксациллин
III	ампициллин	клоксацциллин	ампициллин
IV	пенициллин V	диклоксациллин	ампициллин
V	ампициллин	пиперацциллин	цефапирин
VI	цефалоний	ампициллин	цефкином
VII	-	ампициллин	цефоперазон

Table 3. Извлечение бета-лактамовых антибиотиков из различных образцов, найденное с использованием тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам»

Table 3. Recovery of beta-lactam antibiotics from samples by «PRODOSCREEEN® ELISA-Beta-Lactam» kit

Матрица	Наименование образца	X_{REF} , мкг/кг	R
I	Молоко пастеризованное	0,56	1,07
	Молоко обезжиренное сухое восстановленное	2,68	0,99
	Детское питание на молочной основе	4,69	0,98
II	Молочная сыворотка	1,01	0,98
	Восстановленная сухая молочная сыворотка деминерализованная	4,02	1,00
	Восстановленная сухая молочная сыворотка подсырная	10,06	0,96
III	Молоко сгущенное	2,01	1,09
	Напиток на основе сыворотки	6,71	0,93
	Мороженое	16,76	0,99
IV	Сливки 20 % жирность	1,01	0,94
	Творог	4,02	0,93
	Кефир	10,06	0,79
V	Масло сливочное	1,02	1,02
	Сыр	4,02	1,01
	Животный жир	10,06	0,96
VI	Говядина (мышечная ткань)	1,01	0,88
	Куриная голень (мышечная ткань)	16,76	0,76
	Креветки	50,29	0,77
VII	Почки говяжьи	16,76	0,78
	Печень говяжьи	50,29	0,77

В качестве параметров повторяемости σ_r , % и промежуточной прецизионности $\sigma_{I(TO)}$, %, методик измерения бета-лактамовых антибиотиков с применением тест-систем установлены максимальные значения дисперсий повторяемости и промежуточной прецизионности, вычисленных для каждого вида продукции по [22, 24] (таблицы 4 и 5). Пределы повторяемости r , %, рассчитаны, как указано в [25]. Относительная суммарная стандартная неопределенность u , %, рассчитана по формуле (6).

$$u = \sqrt{\sigma_{I(TO)}^2 - \frac{\sigma_r^2}{2} + u(R)^2}, \quad (6)$$

где σ_r — максимальное значение относительного стандартного отклонения повторяемости для определенного вида продукции, %; $\sigma_{I(TO)}$ — максимальное значение относительного стандартного отклонения промежуточной прецизионности для вида продукции, %; t_{crit} — t-критерий Стьюдента, в данном эксперименте для N-1 степеней свободы при 95 % доверительной вероятности $t_{crit}=2,36$; $u(R)$ — максимальное значение стандартной неопределенности извлечения для вида продукции, в которую в методе добавок вносят вклад стандартное отклонение результатов измерения и неопределенность концентрации аналита в образце с добавкой, %.

Значимость отличия извлечения от единицы проверяли, как указано в [23] с использованием *t*-критерия Стьюдента. Если *R* незначимо отличалось от единицы, то вместо *u*(*R*), %, в уравнении (6) подставляли значение *u*(*R*)', %, которое вычисляли по формуле (7).

$$u(R)' = \frac{t_{crit} \cdot u(R)}{1,96} \tag{7}$$

При измерении количества бета-лактамовых антибиотиков с использованием тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» в кисломолочных продуктах, сливках, мясе, креветках и субпродуктах установлена значимость смещения. Для этих матриц при вычислении суммарной стандартной неопределенности по формуле (6) вместо *u*(*R*), %, подставляли значение *u*(*R*)'', %, вычисленное по формуле (8)

$$u(R)'' = \sqrt{\left(\frac{1-R}{k}\right)^2 + u(R)^2}, \tag{8}$$

где *R* — значение извлечения для соответствующего вида продукции с максимальным отклонением от единицы; *k* — фактор охвата, который равен 2 для 95% доверительного интервала.

Относительная расширенная неопределенность измерений *U*, %, рассчитана по формуле (9).

$$U = 2 \cdot u. \tag{9}$$

Для расчета предела количественного определения тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» и «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» измерили содержание суммы бета-лактамовых антибиотиков в чистых образцах отдельных представителей видов продукции. Каждый образец анализировался 10 раз в условиях повторяемости. Расчет проведен путем прибавления к среднему из полученных значений массовой доли ампициллина шестикратной величины стандартного отклонения результатов. Нижние границы установленных диапазонов измерений для тест-систем равны пределам количественного определения для каждой из матриц (таблицы 4 и 5).

Table 4. Параметры точности методики измерений с использованием тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам»

Table 4. The accuracy of the measurement method using the «PRODOSCREEN® ELISA-Beta-Lactam» kit

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	σ_r , %	$\sigma_{ит0}$, %	r , %	<i>u</i> , %	<i>U</i> , %
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное, молоко сухое восстановленное, сухие молочные смеси для детского питания после восстановления	от 0,50 до 6,25 включ.	5,8	8,4	16,1	9	18
Молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	от 0,80 до 12,50 включ.	6,1	8,2	17,1	8	16
Молоко сгущенное, напитки на основе сыворотки, мороженое на молочной основе, молочные коктейли	от 1,60 до 25,00 включ.	6,4	8,9	18,0	9	18
Творог, кисломолочные продукты (йогурт, сметана, кефир, пахта и т.п.), сливки	от 0,80 до 12,50 включ.	8,3	8,3	23,2	13	26
Сыр (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), масло сливочное, животный жир	от 0,80 до 12,50 включ.	6,7	7,9	18,9	8	16
Мясо, субпродукты, креветки	от 0,80 до 62,50 включ.	5,9	8,1	16,6	15	30

Согласно описанной в стандарте [25] процедуре сравнения альтернативных методов измерения показано, что параметры, полученные для тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин», не имеют значимых различий от количественных характеристик, указанных в методике измерений МВИ.МН 5336-2015 «Методика выполнения измерений содержания антибиотиков группы пенициллинов в продукции животного происхождения методом ИФА с использованием тест-систем производства EuroProxima B.V., Нидерланды». Методика применения тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» и методика МВИ.МН 5336-2015 предназначены для определения антибиотиков группы пенициллинов (бензилпенициллина,

ампициллина, амоксициллина, оксациллина, пиперациллина) прямым иммуноферментным анализом в одинаковом перечне продукции животного происхождения в идентичных диапазонах. В обеих методиках во всем диапазоне измерений отсутствует смещение извлечения пенициллинов из образцов, соответствующих области применения. Это позволило распространить действие МВИ.МН 5336-2015 на измерения, проводимые с использованием тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин» (экспертное заключение БелГИМ на извещение об изменении №1 МВИ.МН 5336-2015). Наименование МВИ.МН 5336-2015 изменено на «Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь. Массовая доля антибиотиков группы пенициллинов в продукции животного происхождения. Методика измерений методом ИФА с использованием тест-систем PENICILLIN ELISA и «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин».

Table 5. Показатели точности методики измерений с использованием тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин»

Table 5. The accuracy of the measurement method using the «PRODOSCREEEN® ELISA-Penicillin» kit

Виды продукции	Диапазон измерений, мкг/кг	σ_r , %	$\sigma_{I(ТО)}$, %	r , %	u , %	U , %
Мясо	от 2,5 до 160,0 включ.	5,4	5,4	15,1	5	10
Молоко сырое, пастеризованное, стерилизованное, молоко сухое восстановленное	от 0,16 до 8,00 включ.	5,5	7,8	15,4	8	16
Молоко сгущенное	от 1,00 до 32,00 включ.	5,4	7,0	15,1	7	14
Творог, сыр (мягкий, полутвердый, твердый, сверхтвердый), масло сливочное, коктейли молочные, кисломолочные продукты (йогурт, сметана, кефир, пахта и т.п.), мороженое на молочной основе, молочная сыворотка, восстановленная сухая молочная сыворотка	от 2,5 до 160,0 включ.	5,8	7,0	16,3	7	14

Стабильность тест-систем. Использованы серийно-изготовленные тест-системы опытно-промышленных партий, хранившиеся при (4–8) °С в течение 1 года. Градуировочные графики ИФА соответствовали параметрам тест-систем, изготовленных в соответствии с ТУ ВУ 100185129.196-2023. Содержание ампициллина после внесения добавки в пробы определяли для молока при использовании тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» и для мяса при использовании тест-системы «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин». Проводили работу с применением именно этих матриц, поскольку для них характерны наименьшие значения относительных стандартных отклонений повторяемости и промежуточной прецизионности. В результате внутрилабораторного эксперимента получены данные и рассчитаны дисперсии повторяемости и промежуточной прецизионности при использовании тест-систем с истекшим сроком годности (табл. 6). С применением квантиля распределения χ^2 по процедуре, описанной в [25] проведено сравнение полученных в данном эксперименте результатов с установленными ранее параметрами (табл. 4 и 5) и показано, что различия между ними незначимы. Также определено, что извлечение R незначимо отличается от единицы.

Table 6. Рассчитанные значения дисперсий повторяемости и промежуточной прецизионности ИФА при использовании тест-систем с истекшим сроком годности

Table 6. Calculated values of repeatability and intermediate precision standard deviations of ELISA when using expired kits

Тест-система	Матрица	$S_{отв. r}$, %	$S_{отв. I(ТО)}$, %
«ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам»	Молоко стерилизованное	7,1	7,1
«ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин»	Говядина	3,9	5,3

Заключение. Определены аналитические характеристики тест-систем «ПРОДОСКРИН® ИФА-Бета-Лактам» и «ПРОДОСКРИН® ИФА-Пенициллин». Эти биоаналитические системы основаны на прямом конкурентном ИФА и могут использоваться для измерения содер-

жания суммы нормируемых бета-лактамовых антибиотиков в широком перечне продуктов питания и пищевого сырья животного происхождения. Установленные для обеих методик показатели точности остаются неизменными в течение всего срока годности тест-систем.

Список использованных источников

1. Влияние антибиотиков, используемых в животноводстве, на распространение лекарственной устойчивости бактерий (обзор) / И. С. Сазыкин [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. — 2021. — Т. 57, № 1. — С. 24–35. DOI: 10.31857/S0555109921010335
2. Improved enzyme immunoassay for group-specific determination of penicillins in milk / A. Strasser [et al.] // Food Agric. Immunol. — 2003. — V. 15, № 2. — P. 135–143. doi 10.1080/09540100400003493
3. Production of penicillin-specific polyclonal antibodies for a group specific screening ELISA / P. Cliquet [et al.] // Food Agric. Immunol. — 2007. — V. 18, № 3–4. — P. 237–252. doi 10.1080/09540100701802908
4. A broadly applicable approach to prepare monoclonal anti-cephalosporin antibodies for immunochemical residue determination in milk / A. Bremus [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. — 2012. — № 2. — P. 403:503–515. DOI 10.1007/s00216-012-5750-z
5. Synthesis of novel hapten and production of generic monoclonal antibody for immunoassay of penicillins residues in milk / S.N. Jiao [et al.] // J. Environ. Sci. Health. B. — 2013. — V. 48, № 6. — P. 486–494. doi 10.1080/03601234.2013.761908
6. Integration of antibody-antigen and receptor-ligand reactions to establish a gold strip biosensor for detection of 33 β -lactam antibiotics / Y. Li [et al.] // Sci. China Mater. — 2021. — V. 64, № 8. — P. 2056–2066. doi.org/10.1007/s40843-020-1578-0
7. Конъюгаты аминопенициллинов с белками: синтез, иммуногенные свойства и связывание с рецептором бета-лактамов и антителами / О. В. Куприенко [и др.] // Биоорганическая химия. — 2022. — Т. 48, № 1. — С. 75–86. DOI: 10.31857/S0132342322010067
8. Penicillin binding proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes / P. Macheboeuf [et al.] // FEMS Microbiol. Rev. — 2006. — V. 30, № 5. — P. 673–691. doi 10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x
9. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis / E. Sauvage [et al.] // FEMS Microbiol. Rev. — 2008. — V. 32, № 3. — P. 234–258. doi 10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x
10. Development of a rapid multi-residue assay for detecting β -lactams using penicillin binding protein 2x* / K. Zeng [et al.] // Biomed. Environ. Sci. — 2013. — V. 26, № 2. — P. 100–109. doi 10.3967/0895-3988.2013.02.004
11. A gold immunochromatographic assay for the rapid and simultaneous detection of fifteen β -lactams / Y. Chen [et al.] // Nanoscale. — 2015. — V. 7, № 39. — P. 16381–16388. doi: 10.1039/c5nr04987c
12. Серченя Т. С. Прямое конъюгирование пенициллинов и цефалоспоринов с белками для рецепторного анализа бета-лактамовых антибиотиков / Т. С. Серченя, И. В. Горбачева, О. В. Свиридов // Биоорганическая химия. — 2022. — Т. 48, № 1. — С. 63–74. doi: 10.31857/S0132342322010122
13. Identification of BlaR, the signal transducer for beta-lactamase production in *Bacillus licheniformis*, as a penicillin-binding protein with strong homology to the OXA-2 beta-lactamase (class D) of *Salmonella typhimurium* / Y.F. Zhu [et al.] // Journal of Bacteriology. — 1990. — V. 172, № 2. — P. 1137–1141. doi: 10.1128/jb.172.2.1137-1141.1990
14. Expression in *Escherichia coli* of the carboxy terminal domain of the BLAR sensory-transducer protein of *Bacillus licheniformis* as a water-soluble Mr 26 000 penicillin-binding protein / B. Joris [et al.] // FEMS Microbiology Letters. — 1990. — Vol. 70, № 1. — P. 107–113. doi: 10.1016/0378-1097(90)90111-3
15. The kinetic properties of the carboxy terminal domain of the *Bacillus licheniformis* 749/I BlaR penicillin-receptor shed a new light on the derepression of beta-lactamase synthesis / V. Duval [et al.] // Mol. Microbiol. — 2003. — Vol. 48, № 6. — P. 1553–1564. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03520.x
16. Development of a direct ELISA based on carboxy-terminal of penicillin-binding protein BlaR for the detection of β -lactam antibiotics in foods / J. Peng [et al.] // Anal. Bioanal. Chem. — 2013. — V. 405, № 27. — P. 8925–8933. doi 10.1007/s00216-013-7311-5
17. Analysis of the stability and affinity of BlaR-CTD protein to β -lactam antibiotics based on docking and mutagenesis studies / J. Ning [et al.] // J. Biol. Eng. — 2019. — V. 13, № 1. — P. 27–43. doi.org/10.1186/s13036-019-0157-4
18. Rapid Detection of 21 β -Lactams using Immunochromatographic Assay Based on Mutant BlaR-CTD Protein from *Bacillus Licheniformis* / Y. Li [et al.] // Analyst. — 2020. — V. 145, № 9. P. 3257–3265. doi: 10.1039/d0an00421a
19. Метод количественного определения активного рецептора бета-лактамовых антибиотиков BLAR-CTD для биоаналитического применения / Т.С. Серченя [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. — 2023. — Т. 59, № 1. — С. 81–95. doi: 10.31857/S0555109923010105
20. Crystal Structure of the Sensor Domain of the BlaR Penicillin Receptor from *Bacillus licheniformis* / F. Kerff [et al.] // Biochemistry. — 2003 — V. 42, № 44. — P. 12835–12843. doi:10.1021/bi034976a

21. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК CG 4. Третье издание. Пер. с англ. Р. Л. Кадиса [Электронный ресурс]. — Режим доступа: https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1_RU_V2.pdf. — Дата доступа: 10.07.2024.
22. СТБ ISO 5725-2-2022. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. — Взамен СТБ ИСО 5725-2-2002. — Введ. 01.01.2023. — Минск: Госстандарт, 2022. — 70 с.
23. VAM Project 3.2.1 Development and Harmonization of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data / V.J. Barwick, S.L.R. Ellison. — LGC (Teddington) Limited, 2000. — 90 с.
24. СТБ ИСО 5725-3-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 3. Промежуточные показатели прецизионности стандартного метода измерений. — Введен впервые 01.07.2003. — Минск: Госстандарт, 2022. — 35 с.
25. СТБ ИСО 5725-6-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике. — Введен впервые 01.07.2003. — Минск: Госстандарт, 2002. — 48 с.

Информация об авторах

Куприенко Ольга Сергеевна, кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь).

E-mail: kuprienko@iboch.by

Вашкевич Ирина Игнатьевна, кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь).

E-mail: vashkevich@iboch.by .

Зильберман Анна Игоревна, научный сотрудник ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь).

E-mail: info@iboch.by

Свиридов Олег Васильевич, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией «Химия белковых гормонов», ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, г. Минск, Республика Беларусь).

E-mail: sviridov@iboch.by

Information about authors

Kuprienko Olga Sergeevna, PhD (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academic Kuprevich str., 220084, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: kuprienko@iboch.by

Vashkevich Irina Ignatievna, PhD (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academic Kuprevich str., 220084, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: vashkevich@iboch.by .

Zilberman Anna Igorevna, Researcher The Institute of Bioorganic Chemistry, Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academic Kuprevich str., 220084, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: info@iboch.by

Sviridov Oleg Vasilevich, Doctor of Chemistry, Professor, Head of the Laboratory «Chemistry of Protein Hormones», Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academic Kuprevich str., 220084, Minsk, Republic of Belarus).

E-mail: sviridov@iboch.by