

## Имуноанализ за определяне на пеницилин в мляко чрез протеинови рецептори, изолирани от пеницилин чувствителен микроорганизъм *Bacillus stearothermophilus*

Руска Ненкова, Катя Габровска, Недялка Димова, Севдалина Тодорова,  
Цонка Годжевъргова

The MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of penicillin of three *Bacillus* strains: *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus* was determined. Penicillin-binding proteins (PBPs) were isolated by the most sensitive to that antibiotic test microorganism, *B. stearothermophilus* (MIC 0.187 mg/ml). These PBPs were used in two immunoassays (immunoenzymatic and immunofluorescence) for determining penicillin concentration in standard solutions. The more susceptible immunofluorescence analysis was applied for searching penicillin residues in real samples, cow milk.

*Key words: Bacillus stearothermophilus, receptor, penicillin, milk*

### ВЪВЕДЕНИЕ

Широката употреба на антибиотици за терапевтични цели при отглеждане на едрия рогат добитък води до сериозни въпроси за безопасността на храната. Един от главните проблеми е повишаване резистентността към антибиотици, след попадане на последните в човешкия организъм със замърсена с антибиотици храна или млечни продукти. Други основни проблеми са нарастващите случаи на алергични реакции към остатъците от антибиотици в храните и инхибиране на стартовите култури при производството на млечно-кисели продукти.  $\beta$ -лактамните антибиотици са най-често откриваната група антимикробни препарати в млякото, поради широката им употреба за лечение на мастит при животните.

Редица регулаторни органи, с цел осигуряване на по-голяма безопасност и високо качество на млечните продукти, са постановили максимално допустими стойности на инхибиращи субстанции в млякото. За Европейския Съюз максимално допустими стойности на пеницилин G в млякото са 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Това налага и разработването на евтини, бързи и надеждни методи за откриване на остатъци от пеницилин в млякото.

Съществуват редица  $\beta$ -лактамни тестове за определяне на максимално допустими стойности на инхибиращи субстанции в млякото. Тестовите се основават на микробно инхибиране [1, 2], ензимно инхибиране [7], имуноанализ [5, 8] и микробиален рецепторен анализ [3, 6]. Особен интерес представлява методът, при който  $\beta$ -лактамния остатък се свързва с протеинов  $\beta$ -лактамен рецептор, изолиран от клетъчната стена на чувствителен към пеницилин микроорганизъм. Настоящата работа описва подборът на подходящ чувствителен към пеницилин микроорганизъм за получаване на протеинов рецептор, получаването на самият рецептор и прилагането му за създаване на чувствителен имунологичен метод за анализ на пеницилин G в мляко.

### Материали и методи

1. Определяне на минималната подтискаща концентрация (МПК) на пеницилин чувствителни микроорганизми

Изследвани са три представителя на род *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus* за определяне на МПК спрямо пеницилин в течна среда. Посяват се епруветки с тест-микроорганизма (0.1 ml от тест-микроорганизма се внася във всяка епруветка), съдържащи еднакъв обем прозрачна хранителна среда (1 ml). В епруветките се добавя антибиотик (1 ml) в намаляваща концентрация, като се правят двукратни разреждания. В една от епруветките не се внася антибиотик и тя служи за контрол на растежа на бактериите. Епруветките се поставят в термостат,

при температура оптимална за растежа на тест-микроорганизма, за 18-24 ч. Оптималната температура за развитие на *B. Subtilis* и *B. cereus* е 30°C, а на *B. stearothermophilus* е 50°C. Спектрофотометрично се определя мътността на епруветките спрямо контрола чиста хранителна среда (1 ml) и тест-микроорганизма (0.1 ml). Епруветките, в които антибиотикът се съдържа в достатъчно висока концентрация, подтискаща растежа на бактериите, остават прозрачни. Минималната подтискаща концентрация на антибиотика съответства на последната прозрачна епруветка.

2. Получаване на протеинов рецептор от чувствителен към пеницилин *Bacillus stearothermophilus* и имобилизация на получения рецептор върху магнитни наночастички

Получаване на протеинов рецептор от чувствителен към пеницилин *Bacillus stearothermophilus* и пречистване на изолирания рецептор с Affi-Gel 10 Bio-Rad се извършва се по методика описана в литературата [4].

Имобилизацията на протеиновия рецептор се осъществява на няколко етапа. Първо 2.5 ml 0.23 mmol 1-етил-3(3'-диметиламинопропил) карбодимид, с pH 6 се смесва със суспензия от модифицирани магнитни наночастици (250 µl, 50 mg/ml). Сместа се разклаща в продължение на 15 минути при стайна температура. Магнитните наночастици се промиват двукратно с по 1 ml 2 mM HCl и се ресуспендират в 1.5 ml 0.02 M фосфатен буфер с pH 7.5. След това към разтвора на активираните магнитни наночастички се добавят 250 µl рецептори. Реакцията продължава 2 часа при леко механично разклащане. Частиците се промиват два пъти с 0.02 M фосфатен буфер с pH 7.5 и накрая се ресуспендират в 1 ml от същия буфер, съдържащ 0.5 % албумин. Съхраняват се в хладилник при 4°C

3. Имуноензимен анализ (ИЕА) с имобилизиран рецептор върху магнитни наночастички

Приготвя се конюгат от ензим и пеницилин. За целта 9 mg пеницилин се разтварят в 1 ml дестилирана вода и към този разтвор се прибавя разтвор на пероксидаза (ПОД) (8 mg ПОД в 0.7 ml дестилирана вода) и разтвор на карбодимид (КДИ) (5 mg в 0.3 ml дестилирана вода). Сместа се инкубира при стайна температура за 12 часа. Конюгатът се пречиства чрез диализа срещу 0.01 M фосфатен буфер с pH 7.

Разрежданията на пеницилина се приготвят от изходен стандартен разтвор на пеницилин с концентрация 1 mg/ml и са в интервала от 1 до 300 ng/ml.

Приготвят се проби, съдържащи 50 µl магнитни частички с имобилизиран рецептор и 50 µl разтвор на пеницилин с различна концентрация. Пробите се темперират при 50°C за 15 минути. След това се добавя 50 µl конюгат от пеницилин и пероксидаза и сместа се инкубира още 15 минути при същата температура. Магнитният конюгат се промива с 0.1 M фосфатен буфер с pH 7. Добавят се 1.950 ml о-дианизидин буферна смес и 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Следва инкубиране на пробите в продължение на 30 минути при 37°C и измерване на абсорбцията при λ = 460 nm.

4. Имунофлуоресцентен анализ (ИФА) с имобилизиран рецептор върху магнитни наночастички

Приготвя се конюгат от пеницилин и флуоресцеин изотиоцианат (ФИТЦ). За целта 20 mg пеницилин се разтварят в 240 µl дестилирана вода и към този разтвор се прибавя разтвор на ФИТЦ (10 mg ФИТЦ в 240 µl диметилформамид). Сместа се инкубира при стайна температура за 12 часа на тъмно. Конюгатът се пречиства чрез HPLC.

Разрежданията на пеницилина се приготвят от изходен стандартен разтвор на пеницилин с концентрация 1 mg/ml и са в интервала от 0.1 до 1000 ng/ml/.

Пробите се обработват аналогично на ИЕА. Измерванията се осъществяват на флуоресцентен спектрофотометър при λ = 518

### Резултати и обсъждане

Минималната концентрация на антибиотика, необходима за пълно потискане на дадена микробна култура, се нарича минимална подтискаща концентрация (МПК). Това е параметър, който се използва както за изучаване биологичното действие на антибиотиците, така и за клиничното им приложение. Всеки антибиотик и всеки бактериален вид при дадени условия се характеризира със съответна МПК. Различните щамове от един вид може да се различават по чувствителност към антибиотиците и поради това се характеризират с различни МПК.

Изследвана е минималната подтискаща концентрация (МПК) на пеницилин спрямо три щама от род *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*. Изходната концентрация на пеницилина е 3 mg/ml. Приготвят се 8 двукратни последователни разреждания на дадения антибиотик. Епруветките се посяват с тест- микроорганизма и се инкубират при 37°C за 18-20 часа. Резултатите са представени в таблица 1.

Таблица 1

#### Минимална подтискаща концентрация (МПК) на пеницилин спрямо три щама от род *Bacillus*

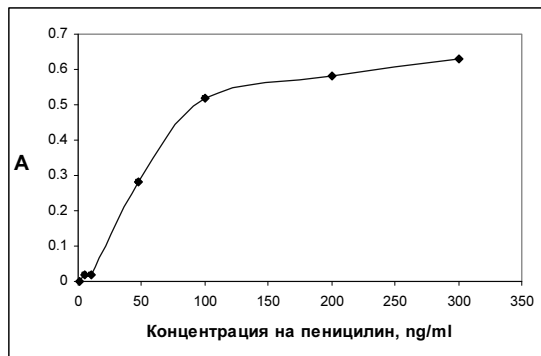
Щам	Разреждания на пеницилина, mg/ml								
	1	2	4	8	16	32	64	128	256
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. stearothermophilus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	+

(-) - отсъствие на развитие на микроорганизма (средата е прозрачна)

(+) - наличие на развитие на микроорганизма (средата е мътна)

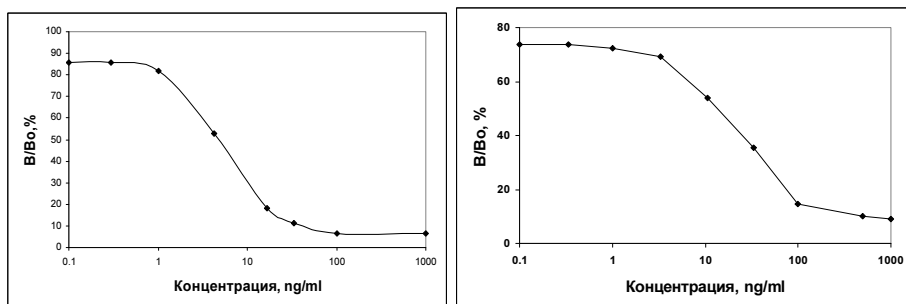
От таблицата се вижда, че най-малко чувствителен към пеницилина е *B. cereus* (МПК – 1.5 mg/ml), а най-чувствителен спрямо пеницилина е микроорганизмът *B. stearothermophilus* (МПК – 0.187 mg/ml).

Въз основа на представените резултати *B. stearothermophilus* е избран като тест-микроорганизъм, за изолиране на пеницилин свързващи рецептори. Последните са приложени за създаване на два имуноанализа за определяне концентрацията на пеницилин. На първо място е разработен имуноензимен метод. За целта полученият рецептор се имобилизира ковалентно върху магнитни наночастички като за свързващ агент се използва карбодимид. След това се добавят проби с различна концентрация на пеницилин (1, 10, 50, 100, 200 и 300 ng/ml). Извършва се селективно свързване между рецептора и антигена (пеницилина), при което остават незаети сайтове в рецептора. Имунореакцията се базира на конкуретния принцип. Допълнително се добавя точно определено количество конюгат от пеницилин-пероксидаза. Част от маркираният пеницилин с пероксидазата заема незаетите сайтове. На базата на количеството свързана пероксидаза се определя количеството на свързания пеницилин, т.е. концентрацията на пеницилина в пробата. Количеството на пероксидаза се доказва чрез появата на червено оцветяване, вследствие на ензимна реакция между водородния пероксид (субстрат на пероксидазата) и о-дианизилина. Абсорбцията се измерва при 460 nm. На фигура 1 е представена получената калибровъчна крива на стандартни разтвори на пеницилин в дестилирана вода (фиг.1). От фигурата се вижда, че линейният интервал на калибровъчната крива е от 4 до 100 ng/ml пеницилин. Изведено е уравнението на линейната област  $y = 0.0054x - 0.0119$ ,  $R^2 = 0.9906$ . Наклонът на правата показва, че ИЕМ е чувствителен. Постигнат е висок корелационен коефициент (0.991). Следователно създадения имуноензимен метод на базата на пеницилин селективен рецептор е много чувствителен и измерва ниски концентрации на пеницилин – от 4 до 100 ng/ml.



Фигура 1. Калибровъчна крива на пеницилин в стандартни разтвори, определена чрез ИЕМ.

Получените пеницилин чувствителни рецептори са приложени и за разработване на втори имуноанализ – имунофлуоресцентен анализ. За разлика от първия метод тук конюгатът е антиген (пеницилин) белязан с флуоресцентно багрило (флуоресцеин изотиоцианат-ФИТЦ). Анализът се провежда аналогично на ИЕ метод. Правят се измервания на проби в интервала 0.1 - 1000 ng/ml. Отчита се флуоресценцията на пробите, празна и нулева проба и се пресмята  $V_0$  (разликата във флуоресценциите на нулева-празна проба) и отношението  $V/V_0$  ( $V$  е разликата във флуоресценциите на реалната и празната проба) Построява се калибровъчна крива (фиг. 2).



Фигура 2. Калибровъчна крива на стандартни разтвори на пеницилин в буфер (а) и в краве мляко (б), определени чрез флуоресцентен ИА

Вижда се, че линейната област е в много нисък концентрационен интервал 1-16.6 ng/ml. Изведено е уравнението на линейната област  $y = -3.7252x + 78.078$ ,  $R^2 = 0.9244$ . Наклонът на правата е значителен, което показва, че ИФМ е чувствителен. Постигнат е висок корелационен коефициент (0.924). От представените резултати може да се заключи, че по-добри показатели се постигат при флуоресцентния ИА, тъй като се измерват по ниски концентрации на пеницилин и чувствителността на метода е по-голяма.

Разработеният ИФА е приложен за определяне на пеницилин в реални проби – краве мляко (фиг.2б). Изведено е уравнението на линейната област:  $y = -0.4216x + 55.358$ ,  $R^2 = 0.931$  Вижда се, че линейният интервал на калибровъчната крива се

измества леко към по-високи концентрации (5-100 ng/ml) и чувствителността на метода леко намалява, в сравнение с анализа на пеницилин в буфер, но независимо от това този метод с успех може да бъде приложен за анализ на ниски концентрации на пеницилин в мляко.

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

1. Изследвана е минималната подтискаща концентрация (МПК) на пеницилин спрямо три щама от род *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus* и като най-чувствителен спрямо този антибиотик е определен *B. stearothermophilus* (МПК – 0.187 mg/ml)

2. Изолирани са пеницилин свързващи рецептори и са приложени за създаване на два имуноанализа за определяне концентрацията на пеницилин в стандартни разтвори.

3. Имунофлуоресцентният анализ е приложен за определяне на пеницилин в реални проби – краве мляко.

#### **ЛИТЕРАТУРА:**

[1] Ang C.Y.W., W. Luo, V.L. Call, H.F. Righter, Comparison of Liquid Chromatography with Microbial Inhibition Assay for Determination of Incurred Amoxicillin and Ampicillin Residues in Milk, J. Agric. Food Chem. 45 (1997) 4351.

[2] Aureli P., A.M. Ferrini, V. Mannoni, Presumptive identification of sulphonamide and antibiotic residues in milk by microbial inhibitor tests, Food Control 7 (1996) 165.

[3] Brady M.S., S.E. Katz, J. Food Protect. 52 (1989) 198.

[4] Piasio R., United States Patent, 5,434,053, (1995).

[5] Senyk G.F., J.H. Davison, J.M. Brown, E.R. Hallstead, J.W. Sherbon, J. Food Protect. 53 (1990) 158.

[6] Suhren G., W. Heesch, Milchwissenschaft 42 (1987) 493.

[7] Suhren G., J. Reichmuth, H.G. Walte, Milchwissenschaft 51(1996) 269.

[8] Van Eenennaam A.L., J.S. Cullor, L. Perani, I.A. Gardner, W.L. Smith, J. Dellinger, W.M. Guterbock, L. Jensen, Evaluation of Milk Antibiotic Residue Screening Tests in Cattle with Naturally Occurring Clinical Mastitis J. Dairy Sci. 76 (1993) 3041.

#### **За контакти:**

Ас. Руска Ненкова – Бургаски университет “Проф. д-р Асен Златаров”, катедра Биотехнология, тел. 056/858471, e-mail: rdenkova@abv.bg

Доц. д-р Катя Габровска - Бургаски университет “Проф. д-р Асен Златаров”, катедра Биотехнология, тел. 056/858471, e-mail: gabrovska@mail.bg

Доц. д-р Недялка Димова - Бургаски университет “Проф. д-р Асен Златаров”, катедра Биотехнология, тел. 056/858334, e-mail: nelidbg@abv.bg

Гл. асистент д-р Севдалина Тодорова, Русенски университет “Ангел Кънчев”, филиал Разград.

Проф. д-р Цонка Годжеваргова –, Университет “Проф. д-р Асен Златаров”, катедра Биотехнология, тел. 056/858353, e-mail: godjevargova@yahoo.com

**Докладът е рецензиран**