

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«САРАТОВСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

АЛСОВЭЙДИ АЛИ КАДХИМ МОХАММЕД

**МИКРОБНЫЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИБИОТИКОВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ**

1.5.6. Биотехнология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
ГУЛИЙ Ольга Ивановна
доктор биологических наук, профессор

Саратов – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 Обзор литературы.....	10
1.1 Антибактериальные препараты и объемы их применения.....	10
1.2 Основные методы и подходы для определения антибиотиков.....	12
1.2.1 Классические методы определения антибиотиков.....	12
1.2.2. Биосенсорные методы для определения антибиотиков.....	20
ГЛАВА 2 Материалы и методы исследований.....	40
2.1 Микроорганизмы и условия их культивирования.....	40
2.2 Используемые растворы.....	40
2.3 Методология определения антибиотиков сенсорной системой на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.....	41
2.4 Проведение анализа с применением компактного акустического анализатора на основе резонатора с поперечным электрическим полем.....	42
2.5 Световая фазово-контрастная микроскопия.....	44
2.6 Конфокальная микроскопия.....	45
2.7 Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ).....	45
2.8 Аффинная селекция антител из фаговой библиотеки.....	46
2.9 Дот-иммуноанализ.....	47
2.10 Метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА).....	48
ГЛАВА 3 Акустические сенсорные системы для определения антибиотиков.....	50
3.1 Акустическая сенсорная система на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем для определения канамицина.....	50
3.2 Экспресс-анализ воздействия амингликозидов на бактерии с	

помощью акустической сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.....	60
3.3 Анализ антибиотиков с помощью компактного акустического анализатора на основе резонатора с поперечным электрическим полем.....	64
ГЛАВА 4 Фаговые антитела для определения антибиотиков.....	75
4.1 Получение фаговых антител, специфичных к ампициллину.....	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	83
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	87
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	89

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. На сегодняшний день антибактериальные препараты являются одной из наиболее широко используемых групп лекарственных средств на фармацевтическом рынке. Противомикробные препараты применяются в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности при консервировании, для обработки пищевых продуктов при их транспортировке. В связи с повсеместным применением антибиотиков актуальным является проблема контроля их содержания в воде, жидкостях, продуктах питания, сточных водах фармацевтических предприятий и других объектах. Известны различные способы количественного определения антибиотиков, такие как микробиологические, спектрофотометрические, флуориметрические, хемилюминесцентные, различные варианты хроматографических методов, в том числе высокоэффективная жидкостная хроматография, хроматомасспектрометрия, инверсионная вольтамперометрия, электроаналитическое определение с модифицированными электродами (Methods for the determination, 1998; Сухорукова, 2013). Успешными для анализа антибиотиков являются биосенсорные методы. Биосенсоры - аналитические устройства, основой которых является биологический обнаруживающий элемент (биорецептор), интегрированный с физическим преобразователем (Purohit et al., 2020). Одним из основных моментов при конструировании биосенсоров является подбор чувствительного (сенсорного) элемента датчика. Микроорганизмы, проявляющие чувствительность к определяемому антибиотику, в комплексе с электрофизическим датчиком, представляют собой основу простых, чувствительных и быстродействующих сенсоров. Среди сенсорных систем особо выделяются акустические биосенсоры, чувствительным элементом которых являются бактерии. Преимуществом акустических биосенсоров является их способность проводить определение антибиотиков непосредственно в жидкости без предварительной иммобилизации компонентов анализа. Принцип действия таких датчиков основан на регистрации биоспецифических реакций в жидкой суспензии, контактирующей с

поверхностью пьезоэлектрического звукопровода, по которому распространяется пьезоактивная акустическая волна. Методы электроакустического анализа биологических жидкостей и суспензий активно развиваются в последние два десятилетия, свидетельством чего является усовершенствование известных методов и появление новых подходов. В результате были разработаны акустические методы, позволяющие обнаруживать бактерии, вирусы и бактериофаги в жидких средах и оценивать их жизнеспособность. Однако до недавнего времени акустические датчики не применялись для анализа антибиотиков, и первое упоминание о возможности их применения для оценки воздействия антибактериальных препаратов на бактерии приведено в единственной работе (Gruhl, Länge, 2014). Поэтому актуальным является развитие методов определения антибиотиков на основе акустических сенсорных систем.

В качестве биоселективного компонента (элемента распознавания) сенсорной системы могут быть использованы антитела (Ат), специфичные к определяемому антигену. Альтернативным способом получения специфичных антител является технология фагового дисплея, в основе которой лежит экспонирование чужеродных пептидов или белков на поверхности фаговых частиц в составе одного из химерных белков оболочки. Успех в применении фаговых антител в качестве сенсорного элемента датчика в значительной степени зависит от предварительной отработки метода их наработки и тестирования. Поэтому разработка методики получения антител, специфичных к антибиотикам с использованием технологии фагового дисплея, а также оценка возможности их применения для определения антибиотиков являются актуальными в современной биологии.

Цель работы: развитие новых подходов для определения антибиотиков на основе акустических сенсорных систем с использованием бактерий в качестве чувствительных элементов и метода дот-иммуноанализа с применением фаговых антител.

Для достижения поставленной цели в работе были поставлены следующие **задачи исследования:**

- Показать возможность определения канамицина и хлорамфеникола с помощью акустической сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.

- Оценить возможность определения чувствительности бактерий к канамицину путём регистрации аналитического сигнала датчика после воздействия антибиотика на бактерии.

- Отработать методику получения антиампициллиновых антител с использованием технологии фагового дисплея и оценить возможность их применения для определения ампициллина методом дот-иммуноанализа.

- Проверить специфичность антиампициллиновых фаговых антител в отношении других антибиотиков (тетрациклина и канамицина), а также близких по химической структуре к ампициллину веществ – L-фенилаланина, L-триптофана и L-цистеина.

Научная новизна работы.

Предложен новый метод определения канамицина и хлорамфеникола в жидкости с помощью биосенсорной тест-системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.

Разработан новый подход для оценки чувствительности микробных клеток к антибиотикам на примере канамицина с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.

Впервые получены антиампициллиновые фаговые антитела и показана возможность их применения для определения ампициллина методом дот-иммуноанализа.

Практическая значимость. Представленные результаты демонстрируют возможность определения канамицина и хлорамфеникола в жидкости с помощью сенсорной тест-системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.

Регистрация изменения аналитического сигнала сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем в

результате воздействия антибиотика на бактерии позволяет оценить их восприимчивость к исследуемому антибиотику.

На примере ампициллина отработана методика получения специфичных антител с использованием технологии фагового дисплея. Антиампициллиновые фаговые антитела обладают специфичностью в отношении ампициллина и применимы для его определения методом дот-иммуноанализа с визуальным учетом результатов. Установлено, что антиампициллиновые фаговые антитела не взаимодействуют с тетрациклином, канамицином, L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином.

По материалам исследования разработано и издано учебное пособие для студентов старших курсов по определению хлорамфеникола с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем.

Теоретическая значимость.

Показана перспективность применения акустической сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем для определения антибиотиков.

Отработана методика получения антител, специфичных к ампициллину, с применением технологии фагового дисплея.

Достоверность полученных результатов.

Достоверность полученных результатов подтверждается тем, что экспериментальные исследования проводились на современном оборудовании с применением высокоточных аттестованных приборов. Результаты исследований антибиотиков, полученные с помощью электроакустических методов анализа, находились в соответствии с классическими микробиологическими методами анализа. Результаты работы неоднократно докладывались и обсуждались на всероссийских и международных конференциях, а также опубликованы в рецензируемых научных журналах.

Методология и методы исследования. Методологической базой послужили труды отечественных и зарубежных исследователей по вопросам определения

антибиотиков в водных растворах. В качестве объекта исследования использовали микробные клетки *Escherichia coli* штаммов K-12 (IBPPM 204), XL-1 Blue (IBPPM 632), TG1, B-878, K-12 (pMMB33), pBR-325, антибактериальные препараты: ампициллин, канамицин, хлорамфеникол, полимиксин. В работе использовали хелперный бактериофаг M13K07 (Stratagene, Швеция). Для получения антител, специфичных к ампициллину, применяли овечью дисплейную библиотеку фрагментов scFv (Griffin.1, UK). Для развития методов анализа антибиотиков использовали сенсорные системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем. Для каждой серии экспериментов проводили не менее пяти измерений, а полученный фактический материал обрабатывался методами статистического анализа.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Микробная сенсорная тест-система на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем позволяет определить наличие канамицина и хлорамфеникола в жидкости.

2. Изменение величины регистрируемого сигнала датчика после воздействия канамицина на бактерии позволяет оценить их чувствительность к антибиотику.

3. Антиампициллиновые фаговые антитела позволяют выявлять ампициллин методом дот-иммуноанализа с визуальным учетом результатов.

Апробация результатов исследования. Результаты, полученные в ходе выполнения работы, представлены на 2-й и 3-й международной научной конференции PLAMIC2020 и PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» (Саратов, 2020; Санкт-Петербург, 2022), II и III Международной научной конференции «Исследования молодых учёных в биологии и экологии» (Саратов, 2021, 2022), национальной научно-практической конференции «Зыкинские чтения», посвященной памяти д.м.н., проф. Зыкина Л.Ф. (Саратов, 2021, 2022, 2023).

Работа выполнялась в лаборатории биохимии ИБФРМ РАН в соответствии с плановыми темами НИР «Выявление структурно-функциональных особенностей биополимеров и надмолекулярных комплексов ризосферных бактерий,

детерминирующих образование ассоциативного симбиоза как формы адаптации к условиям обитания» (2019-2023 гг.), номер государственной регистрации № 121032300311-5.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ 19-07-00304 «Разработка новых принципов создания акустических биологических анализаторов нового поколения для быстрого определения концентрации и жизнеспособности бактериальных клеток в жидкой фазе для биосенсорных информационных систем» (2019-2021); РФФИ № 22-29-00587 «Акустические микробные сенсорные системы для определения антибиотиков в проводящих растворах» (2022-2023 гг.), РФФИ № 22-24-00417 «Разработка оптической тест-системы для анализа антибиотиков» (2022-2023 гг.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 19 работ, в том числе 11 статей в научных изданиях, индексируемых международными базами данных, перечень которых определен в соответствии с рекомендациями ВАК РФ.

Личный вклад соискателя. Автор принимал непосредственное участие в планировании, подготовке и проведении экспериментальных исследований, анализе полученных результатов и их интерпретации, формулировке выводов, подготовке публикаций. Отдельные эксперименты или их этапы проводились совместно с коллегами из Саратовского филиала Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН и ИБФРМ РАН.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы. Диссертация изложена на 106 страницах, включает 30 рисунков и 1 таблицу. Список литературы включает 155 источника, в том числе 145 из них зарубежных.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Антибактериальные препараты и объемы их применения

Антибактериальные препараты - одни из самых важных лекарств, используемых в здравоохранении и ветеринарии. Определяющее свойство антибактериальных препаратов – способность избирательно угнетать жизнедеятельность бактерий. Под избирательностью понимают:

- активность только в отношении микроорганизмов при отсутствии влияния на клетки макроорганизма;
- действие на определенные виды бактерий.

Существует несколько семейств антибиотиков: бета-лактамы (пенициллины и цефалоспорины), хлорамфениколы, тетрациклины, макролиды, линкозамиды, сульфонамиды спектиномицина, нитрофураны, триметоприм, нитроимидазолы, полимиксины, ансогликозины и макроциклицины (Cháfer-Pericás, Maquieira, Puchades, 2010).

Каждый год Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) отслеживает ситуацию по объемам потребления антибиотиков в разные временные промежутки и в разных странах.

Согласно общепринятым нормам, потребление противомикробных препаратов выражается как количество установленных суточных доз (DDD) на 1 000 жителей в сутки (More, 2020). ВОЗ ежегодно публикует отчет о потреблении антибиотиков в мире и рейтинг препаратов. В рейтинге препаратов оценивается состав применяемых населением антибиотиков. Согласно классификации ВОЗ эти препараты делятся на «доступные» (Access), «контролируемые» (Watch) и резервные (Reserve). Особое беспокойство ВОЗ вызывает злоупотребление препаратами второй и третьей групп, которое наиболее характерно для развитых стран.

В работе (Klein et al., 2018) проведен анализ употребления антибиотиков в разных странах и указано, что в период с 2000 по 2015 год потребление

антибиотиков в 76 странах, измеренное в определенных суточных дозах (DDD) увеличилось на 65% (21,1–34,8 млрд DDD), а уровень потребления антибиотиков увеличился на 39% (11,3–15,7 DDD на 1000 жителей в день). Рост был вызван за счет стран с низким и средним уровнем доходов, где рост потребления коррелировал с ростом валового внутреннего продукта на душу населения. В странах с высоким уровнем дохода, несмотря на то, что общее потребление антибиотиков увеличилось незначительно, DDD на 1000 жителей в сутки упал на 4%. Показано значительное увеличение применения таких соединений, как глицилциклины, оксазолидиноны, карбапенемы и полимиксины. Фармацевтический рынок является одним из самых высокодоходных и быстрорастущих секторов мировой экономики. Ежегодный темп роста рынка составляет в среднем 4% (по данным аналитической компании GBI Research). Основными факторами, способствующими росту данного сегмента, будут разработка новых препаратов для лечения бактериальных инфекций и рост продаж уже зарекомендовавших себя лекарственных средств.

Основным потребителем антибиотиков в мире является Китай. На его долю приходится 45% от общемирового потребления антибиотиков. В топ-10 потребителей ветеринарных противомикробных препаратов в 2017 г. вошли: Китай (45%), Бразилия (7,9%), Соединенные Штаты (7,0%), Таиланд (4,2%), Индия (2,2%), Иран (1,9%), Испания (1,9%), Россия (1,8%), Мексика (1,7%) и Аргентина (1,5%). Ожидается, что в 2030 г. эти 10 ведущих стран будут использовать 72% от общего объема противомикробных препаратов, потребляемых во всем мире, при этом уровни индивидуального потребления по оценкам могут достигнуть 43% в Китае, 7,9% – в Бразилии, 6,5% – в Соединенных Штатах, 4,0% – в Таиланде, 2,1% – в Индии, 1,9% – в Испании, 1,9% – в России, 1,8% – в Мексике, 1,5% – в Иране и 1,5% – в Аргентине (Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators, 2016; Timofeeva, Gudilova, 2021).

Совокупный объем продаж антибиотиков 4 основных групп (цефалоспорины, макролиды, хинолоны и пенициллины) охватывает около 82% мирового объема

продаж (Antibiotic Resistance Protocols, 2010). Ежегодное увеличение потребления антибиотиков приводит к распространению антибиотикорезистентности бактерий. Чтобы снизить риск возникновения антибактериальной устойчивости, Европейский Союз (ЕС) ввел модель «принципа предосторожности», запретив определенные противомикробные стимуляторы роста для животных (Kriebel et al. 2001). Для тех антибиотиков, которые не запрещены, установлены максимальные допустимые уровни (МДУ) использования антибиотиков для обеспечения безопасности потребителей. МДУ – это максимально допустимое количество фармакологически активных веществ (будь то активные ингредиенты, вспомогательные вещества или продукты разложения) и их метаболитов в пищевых продуктах животного происхождения (согласно определению ЕС (Maximum Residue Limits (MRLs) and the Safety of Food from Animals, 2014). МДУ рассчитывается со ссылкой на допустимое суточное потребление, при этом разработано несколько методов для точной и практической проверки соблюдения МДУ и для проведения тестов, необходимых для определения безопасных МДУ.

Таким образом, широкое применение антибиотиков, приводящее к антибиотикорезистентности и появлению антибиотиков в воде и продуктах питания, стимулирует развитие новых методов контроля антибактериальных препаратов в объектах окружающей среды.

1.2 Основные методы и подходы для определения антибиотиков

1.2.1 Классические методы определения антибиотиков

Микробиологические методы анализа являются исторически первыми, которые применяются и в настоящее время для определения содержания антибиотиков в биологических средах (Drug resistance in microorganisms, 2005; Kularina et al., 2009). Методы основаны на способности антибиотиков диффундировать в агаровую среду, содержащую определённый вид бактерий с высокой чувствительностью к антибиотикам, и задерживать процесс размножения

бактерий. Это приводит к образованию прозрачных зон подавления роста, по диаметру которых устанавливают концентрацию антибиотика. Данные методы характеризуются высокой чувствительностью определения, но достаточно длительны во времени для получения результата (Riediker, Diserens, Stadler, 2001).

Аналитические методы обнаружения антибиотиков можно разделить на две группы: подтверждающие и скрининговые. Подтверждающие методы зависят от свойств жидкостной хроматографии наряду с масс-спектрометрией при определении концентраций аналита. Другие методы обнаружения включают комбинацию подходов, основанных на жидкостной хроматографии и УФ или электрофорезе (Cháfer-Pericás, Maquieira, Puchades, 2010).

Скрининговые методы, в основном, используются для получения полуколичественных измерений. Этот подход применяется благодаря довольно низкой вероятности получения ложноположительных данных, простоты эксплуатации, быстрого периода анализа, экономической эффективности и хорошей избирательности.

Хроматографические методы анализа используются для разделения и определения различных групп антибиотиков, они подходят для идентификации антибиотиков, поскольку характеризуются высокой избирательностью, но требуют значительных временных затрат и дороги в эксплуатации.

При определении остаточных количеств антибиотиков в биологических объектах, как правило, проводят их предварительное концентрирование. Например, в работе (Kularina et al., 2009) показано определение цефтриаксона в крови и тканях (печень, лёгкие) здоровых крыс методом ионообменной хроматографии с ультрафиолетовым (УФ)-детектированием. Техника ионного обмена позволяет концентрировать разбавленные пробы непосредственно на аналитической колонке, без потери эффективности разделения. Отсутствие этапа твердофазного концентрирования образца на отдельной колонке значительно снижает время и трудоёмкость анализов.

Для определения антибиотиков успешно применяются высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), жидкостная хроматография, хромато-масс-

спектрометрия, капиллярный электрофорез. Высокоэффективная жидкостная хроматография является одним из самых эффективных, селективных и чувствительных методов (Kularina et al., 2009). Из-за своих достоинств, он широко применяется в различных анализах многих лекарственных средств. Этот метод открыл возможность разделения смесей, содержащих десятки и сотни компонентов. ВЭЖХ – метод разделения веществ на мелкозернистых сорбентах (с частицами размером менее 15 мкм) при повышенном давлении.

Описано достаточно много работ по применению жидкостной хроматографии для определения различных антибиотиков, например, таких как ванкомицин (Abu-Shandi, 2009), меропенем (Elragehy et al., 2008) и других карбапенемов (Mattoes et al., 2004), цефалоспоринов (Nemutlu et al., 2009), гемифлоксацина мезилата (Rote, Pingle, 2009), амоксициллина (Pires de Abreu et al., 2003) и неомицина В (Hanko, Rohrer, 2007) в плазме, сыворотке крови и моче человека.

Крайне востребовано применение наночастиц (НЧ) в качестве компонентов иммунохроматографических тестов для определения антибиотиков, позволяющих за 5-10 минут (время движения пробы по мембранам тест-полоски) устанавливать наличие и оценивать содержание контролируемого соединения на основании связывания окрашенной метки. Используемые в иммунохроматографическом анализе комплексы наночастица — антитело обеспечивают распознавание аналита (с помощью антител) и генерацию оптического сигнала (с помощью окрашенной метки) (Berlina et al., 2018). Достигнут предел детекции иммунохроматографического анализа для ампициллина 100 нг/мл при прямом мечении и 16 нг/мл — при непрямом; тетрациклина — 4,2 и 1,3 нг/мл, соответственно.

В другом исследовании (Hendrickson et al., 2019) иммунохроматографический анализ был применен для одновременного обнаружения ципрофлоксацина и хлорамфеникола (САР) в молочных продуктах. Анализ проводился в формате прямой конкуренции с использованием НЧ золота в

качестве метки. Метод позволил выявить антибиотики течение 15 мин с пределом визуального обнаружения 5 нг / мл для обоих антибиотиков.

Антитела и антигены являются эффективными и высокоспецифичными инструментами для детекции антибиотиков. ИФА – лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных низкомолекулярных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. ИФА делится на две формы анализов: прямой и непрямой. Прямой ИФА предполагает использование моноклональных антител для обнаружения специфического антигена. Непрямой ИФА включает обнаружение специфических антител в образце, например в сыворотке.

Методы ИФА анализа нашли широкое применение для определения остаточных количеств антибиотиков, особенно в качестве рутинных скрининговых методов (Gazzaz et al., 1992). В работе (Wang et al., 2009) описан колориметрический конкурентный метод прямого ИФА с использованием поликлональных антител для определения остатков неомицина в продуктах питания животного происхождения, предел обнаружения составляет 0,1 мкг/кг, при этом перекрестной реактивности антител с другими аминогликозидами не наблюдалось.

В работе (Shen et al., 2019) разработан метод быстрой и высокоспецифичной поляризационной флуоресценции иммуноферментного анализа для мониторинга остатков энрофлоксацина в продуктах питания животного происхождения (свиной печени и курицы), анализ занял 8 минут без учета предварительной обработки образца.

Колориметрия и спектрофотометрия в видимом свете также активно применяются для определения антибиотиков. Основным достоинством колориметрических методов определения являются их простота, скорость и сравнительно высокая точность, недостатком является их малая специфичность

(Кулапина и др., 2009). При анализе используют цветные реакции либо с самими антибиотиками, либо с продуктами их расщепления.

При спектрофотометрии применяют ультрафиолетовый свет, поскольку большинству антибиотиков свойствен характерный спектр поглощения в ультрафиолетовой области. Недостатком этих методов является возможность определения антибиотиков лишь в чистых образцах. Например, описаны спектрофотометрический и спектрофлуориметрический способы обнаружения 4 пенициллинов (амоксициллина, бакампициллина, пиперациллина и сультамициллина) и 10 цефалоспориновых антибиотиков в фармацевтических препаратах, которые основаны на окислении антибиотиков церием (IV) в среде, содержащей H_2SO_4 , при $100^\circ C$. Эти способы включают измерение уменьшения светопоглощения церия (IV) при $\lambda=317$ нм или интенсивности флуоресценции образовавшегося церия (III) при длинах волн возбуждения и испускания 256 и 356 нм, соответственно (El Walily et al., 2000).

В работе (Al-Momani et al., 2004) показана возможность определения амоксициллина, цефалексина, ампициллина и цефрадина в чистом виде и в фармацевтических препаратах с помощью метода спектрофотометрии, который основан на гидролизе исследуемого препарата в основной среде и восстановлении образующегося гидролизованного продукта.

Инфракрасная спектроскопия является специфичным методом для качественного и количественного определения антибиотиков в жидкой и твердой формах. При использовании данного метода обычно достигается точность, равная точности спектрофотометрии в ультрафиолетовом свете (Islam et al., 2020). Однако при анализе веществ в растворах необходимо выбрать подходящий растворитель, который сам бы не поглощал инфракрасные лучи в данной области.

Флуорометрия – это один из наиболее чувствительных методов определения антибиотиков, который применяется, в основном, для определения тетрациклиновых антибиотиков, которые сами по себе флуоресцируют жёлтым светом в умеренной щелочной среде. Антибиотики, которые сами по себе не флуоресцируют и не образуют флуоресцирующих продуктов разложения также

можно определять флюорометрически путём их соединения с подходящим флюоресцирующим веществом и выделения подходящего дополнительного соединения. Например, описан флуориметрический метод обнаружения ампициллина с пределом обнаружения 0.05 мкг/мл (Raksawong et al., 2019).

Иной подход описан в работе (Dumont et al., 2019), где авторы разработали протокол применения микропланшетов с помощью двух дополнительных методов: спектрофлуориметрии и стандартного микробиологического определения антибиотиков. Результаты позволили изучать влияние дозы и влияние оттока на внутрибактериальное накопление антибиотиков, а также определять низкие концентрации антибиотиков.

Антибиотики, содержащие в своей молекуле восстанавливающиеся группы (например, нитрогруппы, кетогруппы, примыкающие к одной или более двойной связи, альдегидные группы, карбоксильные группы, примыкающие к двойным связям) либо имеющие хиноподобную структуру, могут быть восстановлены на ртутном капельном электроде и могут определяться полярографически. Например, в работе (Al-Ameri, Al-Waeli, 2016) разработан и апробирован дифференциальный импульсный полярографический метод прямого определения амоксициллина и ципрофлоксацин в фармацевтических препаратах. Стандартный калибровочный график для антибиотиков лежит в диапазоне 0.05-0.525 мкг/мл. Этот метод эффективно применяется в коммерческих фармацевтических препаратах амоксициллина и ципрофлоксацина.

Особенность методов электрохимического анализа состоит в том, что в анализируемую систему не вводятся какие-либо химические реагенты, а используются процессы, связанные с переносом ионов или электронов. Из электрохимических методов для определения антибиотиков в биологических жидкостях и фармацевтических формах чаще всего применяются вольтамперометрия и потенциометрия. Различные варианты вольтамперометрии (циклическая, адсорбционная, инверсионная, дифференциальная импульсная) используются для определения основных групп антибиотиков.

Интересная стратегия обнаружения ампициллина была предложена Wang et al. (2019) с использованием дифференциального импульса на основе вольтамперометрии и аптамера в реальных образцах, на примере молока и воды.

Авторами другой работы (Deroco, Rocha-Filho, Fatibello-Filho, 2018) предлагается использовать электроаналитический метод на основе прямоугольной вольтамперометрии для одновременного определения амоксициллина и противовоспалительного препарата нимесулида в моче и пробах окружающей среды.

Для чувствительного определения амоксициллина было разработано электрохимическое устройство, основанное на комбинации наноматериалов (Wong et al., 2020). Морфологические, структурные и электрохимические характеристики наноструктурированного материала оценивали с использованием методов дифракции рентгеновских лучей, конфокальной микроскопии, просвечивающей электронной микроскопии и вольтамперометрии. Электрохимическое определение антибиотика проводили с помощью прямоугольной вольтамперометрии. Представленный метод может быть альтернативным не только для анализа фармацевтических продуктов и клинических образцов (моча), но и для исследования качества пищевых продуктов (образцы молока).

Серосодержащие антибиотики (например, ампициллин, пенициллин, линкомицин, цефалоспорин и сульфаниламид) представляют собой общий класс соединений, обладающих антибактериальными свойствами. Присутствие окисляемой серы в молекулярной структуре антибиотика позволяет напрямую определять ее с помощью импульсной амперометрии, как описано в работе (Hanko et al., 2001).

Импульсная амперометрия – это электрохимический метод обнаружения, который использует импульсную форму волны потенциал-время на поверхности электрода из благородного металла для электрокаталитического окисления аналитов пропорционально концентрации. Интеграция тока в сочетании с быстро

изменяющимися потенциалами напряжения называется интегрированным импульсным амперометрическим обнаружением.

При детекции антибиотиков также применяют радиоактивные и тяжёлые изотопы. Меченые препараты можно применять как для аналитического контроля при производстве, так и для решения основных проблем действия антибиотиков на микроорганизм и макроорганизм для объяснения механизмов всасывания, циркуляции, накопления и выделения антибиотиков. Возможности применения изотопов для определения воздействия антибиотиков на бактерии показано в обзорах (Auletta et al., 2016; Vrioni et al., 2018).

Определение антибиотиков при помощи препаратов, меченных изотопами, проводят методом разбавления изотопов. Этот способ применим для анализа образца любой химической природы, если только из него можно получить хотя бы небольшое количество чистого антибиотика. Например, к культуральной жидкости прибавляют заранее известное количество чистого меченого антибиотика с известной удельной радиоактивностью. Меченый препарат разбавляют антибиотиком, содержащимся в образце. Затем из жидкости выделяют антибиотик и несколько раз перекристаллизовывают до постоянно удельной радиоактивности. Поскольку изотопы нельзя определить простыми физическими методами, степень разбавления меченого препарата, содержащегося в выделенном антибиотике, а также его удельная радиоактивность будут обратно пропорциональны содержанию антибиотика в культуральной жидкости.

В работе (Jung et al., 2014) продемонстрирована возможность применения стабильных изотопов и лазерной масс-спектрометрии для визуализации роста бактерии (*Pseudomonas aeruginosa*) и определения их устойчивости к антибиотикам на примере меропенема, тобрамицина и ципрофлоксацина.

Основная сложность определения антибиотиков в биологических жидкостях обусловлена их низкой концентрацией на фоне большого избытка мешающих веществ. Недостаточная чувствительность и селективность большинства методов при определении антибиотиков в биологических средах обуславливают необходимость их предварительного концентрирования, а дополнительная

операция концентрирования влияет на точность анализа и увеличивает время для его проведения. Довольно часто при определении антибиотиков необходимо анализировать достаточно большое количество образцов, поэтому для решения данных вопросов активно развиваются биосенсорные методы анализа.

1.2.2 Биосенсорные методы для определения антибиотиков

Несмотря на значительное количество разработанных методов определения антибиотиков, одной из наиболее перспективных технологий для экспресс-анализа антибактериальных препаратов являются биосенсорные системы. Биосенсоры позволяют проводить качественный и количественный анализ антибиотиков, что делает их очень востребованными при необходимости крупномасштабного анализа антибактериальных препаратов. Однако биосенсоры имеют ряд ограничений, связанных как со стабильностью работы, так и со стерилизацией после отработанных образцов.

Биосенсоры являются био-химико-физическими системами, состоящими из двух компонентов: чувствительного биологического элемента и системы детекции, позволяющие регистрировать концентрацию или активность различных аналитов, присутствующих в образце.

Биологический элемент может быть каталитическим и некаталитическим. К каталитическим элементам можно отнести бактерии, ферменты и ткани. К некаталитическим – рецепторы и нуклеиновые кислоты. Система детекции может быть оптической, калориметрической, акустической, электрической и др. Существует возможность комбинирования всех возможных элементов, что говорит о возможности создания огромного числа разнообразных биосенсорных систем (Purohit et al., 2020).

Решающей задачей в разработке биосенсора является процесс введения и закрепления биорецептора на поверхности носителя (трансдьюсера), т.е. процесс иммобилизации, позволяющий разработать селективный, воспроизводимый, чувствительный, стабильный биосенсор (Leca-Bouvier, Blum, 2010; Moreira et al.,

2014). Поэтому одним из основных моментов при классификации датчиков является иммобилизация компонентов анализа на поверхности датчика или проведение исследований без иммобилизации компонентов анализа непосредственно в жидкости. Общая схема биосенсора представлена на рис. 1 (Guliy et al., 2022a).

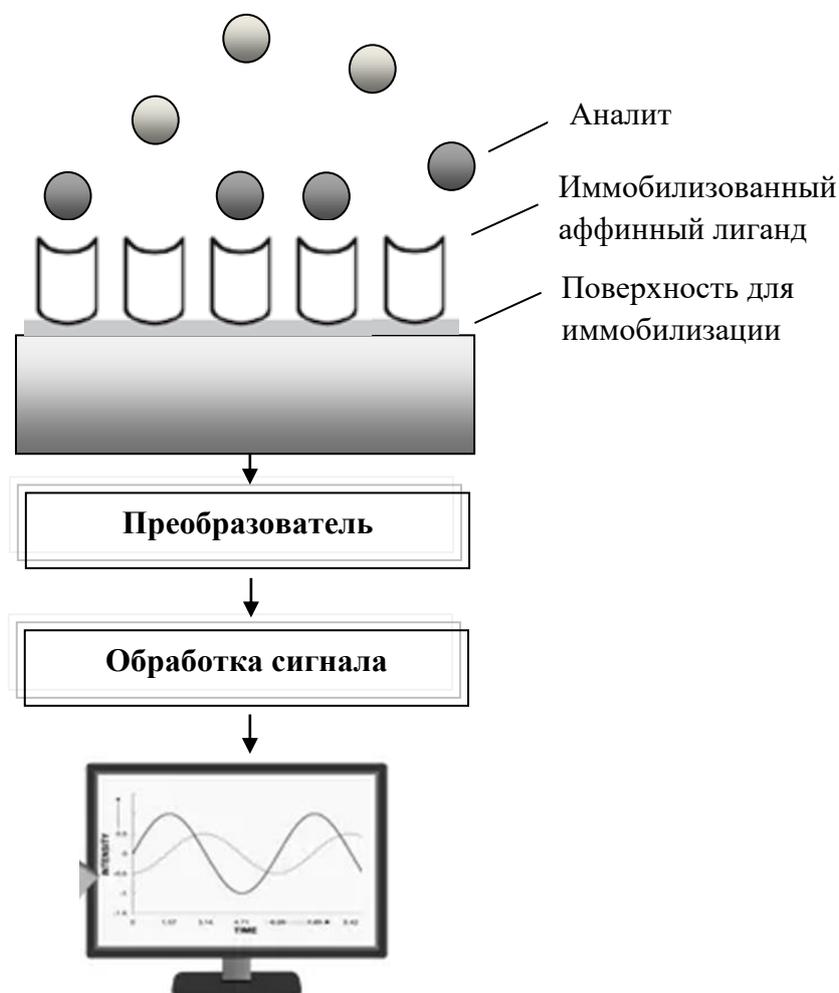


Рисунок 1 – Общая схема биосенсора (Guliy et al., 2022a)

Электрохимические биосенсоры

Электрохимические биосенсоры создавались с целью объединения чувствительности электрохимического детектора и специфичности активного слоя. Среди электрохимических биосенсоров можно выделить:

- потенциометрические сенсоры, в которых измеряется потенциал ячейки при нулевом токе;

- вольтамперометрические (или амперометрические) сенсоры, в которых измеряется ток окисления или восстановления электроактивных частиц, возникающий при приложении заданной разности потенциалов между электродами;

- кондуктометрические сенсоры, в которых измеряется электропроводность содержимого контейнера с помощью моста проводимостей (Будников, Евтюгин, Майстренко, 2010; Evtugin, 2013).

В биосенсорах электрохимического типа в сочетании с потенциометрическими электродами применяют ферменты, рецепторы, клетки микроорганизмов, ткани растений и животных, антитела, меченые ферментами. В сочетании с амперометрическими электродами известно использование ферментов, микроорганизмов, тканей растений и животных, антител, меченых ферментами.

Электрохимический сенсор на основе комбинации многослойных углеродных нанотрубок был разработан для чувствительного и селективного определения тетрациклина в речной воде, искусственной моче и фармацевтических образцах без какой-либо необходимости предварительной обработки образцов (Wong et al., 2015).

Возможности сенсора на основе стеклоуглеродного электрода и пленок хитозана показаны для определения норфлоксацина в присутствии дофамина, кофеина и мочевой кислоты. Морфологические, структурные и электрохимические характеристики наноструктурированного материала оценивали с помощью спектрофотометрии, рентгеновской дифракции, просвечивающей электронной микроскопии и вольтамперометрии. Метод был успешно применен для определения норфлоксацина в фармацевтических препаратах, синтетической моче и сыворотке с добавками (Santos et al., 2019).

В работе (Stevenson et al., 2019) описан электрохимический биосенсор для обнаружения остатков цефтиофура в образцах мяса с помощью спектроскопии электрохимического импеданса для исследования межфазных емкостных изменений при времени анализа 15 минут.

Самая большая группа биосенсоров, используемых для обнаружения антибиотиков, основана на использовании иммунохимических реакций биораспознавания - *иммуносенсоры* (ИС). ИС — устройства, состоящие из специфичного антигена/антитела, связанного с преобразователем, и электронного устройства, отображающего сигнал о связывании с соответствующим лигандом. Общая схема ИС представлена на рис. 2 (Guliy et al., 2022a).

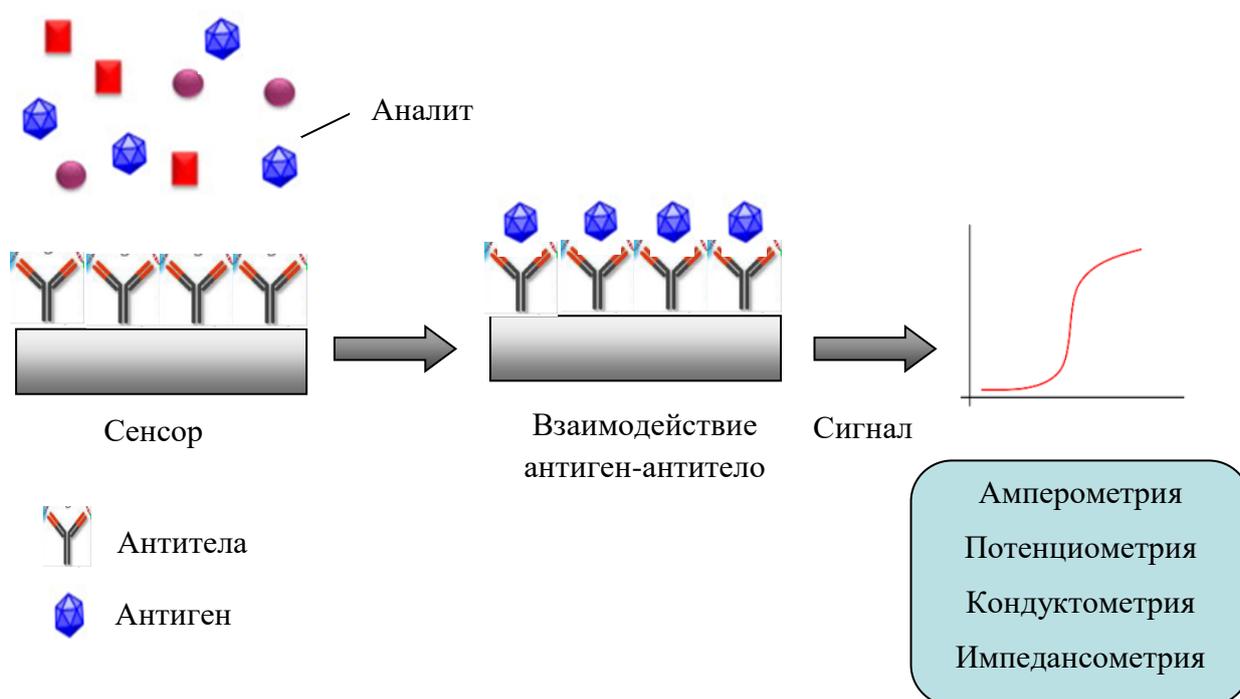


Рисунок 2 – Общая схема иммуносенсора (Guliy et al., 2022a)

В работе иммуносенсоров обязательно принимают участие антитела, выступающие в качестве определяемых соединений или распознающих молекул. В последнем случае их иммобилизуют на сенсоре или вводят в пробу при выполнении конкурентного формата анализа. Одними из часто применяемых ИС являются электрохимические и оптические, последние чаще всего являются биосенсорами поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Хотя иммуносенсоры очень селективны, скорость анализа зависит от времени инкубации, необходимого для образования комплекса антиген/антитело. Кроме

того, полная регенерация датчика также может занять довольно много времени (Fernandez et al., 2010; 2011).

ИС используется для оценки качества иммунобиологических лекарственных препаратов, то есть для качественного и количественного определения веществ в анализируемой пробе после реакции связывания антигена со специфичными антителами и последующей детекции. Качественный анализ позволяет получить положительный или отрицательный результат содержания антигена или антитела в исследуемом веществе. При проведении количественного анализа определяют содержание того или иного антигена или антитела в исследуемом веществе с использованием калибровочного графика. Принципы современных методов иммуноанализа показаны в обзоре (Saeed et al., 2020).

Непрямые ИС основаны на использовании меченых компонентов для обнаружения связывания (флуоресценция, хемолюминесценция). Прямые иммуносенсоры детектируют аналит на основании реакции связывания переноса электронов, выделения или поглощения газов, разности потенциалов, сопротивления, массы, температуры или изменению оптических свойств и т.д. Прямые ИС можно применять для отслеживания реакции антиген-антитело в режиме реального времени. Потенциально данный подход позволяет определять широкий спектр веществ в концентрации от 10^{-9} – 10^{-13} М/л и выше.

Среди иммуносенсоров выделяют четыре основных типа датчиков: измерители электрохимических процессов (потенциометрия, амперометрия); измерители массы (пьезоэффект); измерители тепла (колориметрия); измерители оптических свойств. Количественный результат может быть получен в режиме реального времени.

В работе (Conzuelo et al., 2012) представлен одноразовый амперометрический магнитоиммуносенсор, включающий использование антител, иммобилизованных на поверхности магнитных шариков с белком G (ProtG-MB) и угольных электродов с трафаретной печатью, для количественного и специфического определения остатков тетрациклинов в молоке и молочных продуктах.

Для решения проблемы определения остатков антибиотиков в молоке авторы (Song et al., 2015) предложили объединить иммунофлуоресцентный анализ на основе многоцветных квантовых точек и метод матричного анализа для одновременного, чувствительного и визуального обнаружения стрептомицина, тетрациклина и пенициллина G в молоке. Метод позволяет проводить одновременный анализ нескольких антибиотиков в нескольких образцах за один прогон (высокопроизводительный анализ).

Применение для аффинного взаимодействия аптамеров — молекул некоторых пептидов, коротких полимеров нуклеиновых кислот ДНК или РНК, а также их фрагментов (линейных олигонуклеотидов) — явилось началом разработки *аптасенсоров*. По специфичности взаимодействий аптамеры подобны антителам, но отличаются большей устойчивостью и способностью к обратимой денатурации, осуществляемой в течение нескольких минут. Развитие аптасенсоров может стать реальной альтернативой высокочувствительным и селективным иммуносенсорам для проведения экологического мониторинга лекарственных препаратов.

Биосенсоры на основе аптамера (аптасенсеры) описаны для определения антибиотиков (Song et al., 2012; Ni et al., 2014). Для получения аптамеров с заданными свойствами была предложена технология SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения (Famulok, Mayer, 2011).

Применение иммобилизованных аптамеров в качестве элементов распознавания (аптасенсоры) является весьма перспективным при анализе антибиотиков, их чувствительность сопоставима с чувствительностью антител. Кроме того, они могут быть химически синтезированы, обладают высокой термической стабильностью, легко модифицируются и иммобилизуются (Reder-Christ, Bendas, 2011).

Авторами (Zhou et al., 2012) представлен простой электрохимический аптасенсор с модификацией многостенных углеродных нанотрубок для анализа тетрациклина в пробах молока.

Возможности применения электрохимического аптасенсора для высокочувствительного обнаружения хлорамфеникола в меде показаны в работе (Yan et al., 2012).

Методы комбинирования аптасенсора и флуоресценции являются весьма распространенными благодаря их превосходной чувствительности и селективности, удовлетворительному пространственному и временному разрешению и экономической эффективности. В работе (Taghdisi et al., 2016) разработан флуоресцентный аптасенсор для селективного и чувствительного обнаружения стрептомицина на основе экзонуклеазы III (Exo III), SYBR Gold и комплементарной цепи аптамера. В отсутствие стрептомицина интенсивность флуоресценции мала. После добавления стрептомицина аптамер связывается со своей мишенью, что приводит к высвобождению комплементарной цепи из аптамера и после добавления SYBR Gold достигается высокая интенсивность флуоресценции. Этот аптасенсор показал высокую селективность в отношении стрептомицина в молоке и сыворотке крови.

Флуоресцентный биосенсор на основе аптамера был разработан для обнаружения хлорамфеникола с использованием конъюгированных с аптамером магнитных наночастиц как для индикации, так и для анализа концентрации препарата (Wu et al., 2015). Система биоанализа была изготовлена путем иммобилизации аптамера на поверхности магнитных наночастиц, которые использовались для захвата антибиотика и изменения флуоресцентного сигнала.

В работе (Leung et al., 2013) представлен люминесцентный метод на основе олигонуклеотидов для чувствительного и селективного обнаружения канамицина в водном растворе. В анализе используют квадратно-плоский люминесцентный комплекс платины (II) и канамициновый аптамер. Сигнал люминесценции комплекса платины (II) с олигонуклеотидом слабый в отсутствие канамицина. При добавлении канамицина аптамер превращается из структуры со случайной спиралью в специфическую конформацию, что приводит к усилению сигнала люминесценции системы.

Сенсоры на основе молекулярно-импринтированных полимеров (МИП)

Сложность получения природных рецепторов (напр., антитела, иммуноглобулины, ферменты), их неустойчивость при хранении, воздействии органических растворителей и высоких концентраций электролитов стимулирует поиски синтетических антител, в качестве которых могут выступать полимеры с молекулярными отпечатками (ПМО), имеющие ряд несомненных достоинств по сравнению с биомолекулами.

Внимание исследователей к ПМО связано с их уникальными свойствами обеспечивать высокую селективность молекулярного распознавания одного вида целевых молекул в присутствии множества других соединений близкого строения. К их несомненным достоинствам относятся методическая простота получения (в отличие, например, от выработки антител к низкомолекулярным соединениям, являющейся многостадийным и длительным процессом) и высокая воспроизводимость синтезов. ПМО стабильны в агрессивных средах и могут быть синтезированы фактически к любому веществу - неорганическим ионам, наркотикам, нуклеиновым кислотам, белкам, клеткам и даже супертоксичным соединениям, для которых, например, поликлональные антитела получены быть не могут.

Одним из важных достижений в области биосенсорного анализа остатков антибактериальных препаратов в пищевых продуктах является применение полимерных сенсоров с молекулярной печатью (Lian et al., 2012; Liu et al., 2013; Yola et al., 2014). Молекулярный импринтинг - это метод создания синтетических материалов, содержащих специфические рецепторные сайты, обладающие высоким сродством к молекуле-мишени. На сегодняшний день наработан значительный материал по теории функционирования молекулярно импринтированных полимеров и методики их синтеза для широкого круга аналитов, в том числе лекарственных препаратов. Для получения пленок молекулярно импринтированных полимеров на поверхности электрода сенсора наибольшее распространение получили следующие подходы фотополимеризации: покрытие при вращении (*spin-coating*); сэндвич-метод (*sandwich-casting*); способ

термоиндуцированного разделения фаз; послойного депонирования (*layer-de-layer deposition*); электрополимеризация, а также смешанные подходы, основанные на принципах нанотехнологии (Ермолаева, Чернышова, Бессонов, 2015).

На рис. 3 (Ермолаева, Чернышова, Бессонов, 2015) в качестве примера приведена схема формирования распознающего слоя на основе ПМО методом фотополимеризации, которая включает следующие этапы: методом фотополимеризации на поверхность электрода сенсора дозируется раствор, содержащий смесь функционального и кросс-мономеров, темплата и инициатора полимеризации, а затем осуществляется полимеризация под действием УФ-излучения. Далее молекулы темплата удаляются с поверхности пленки ПМО с помощью подходящего растворителя.

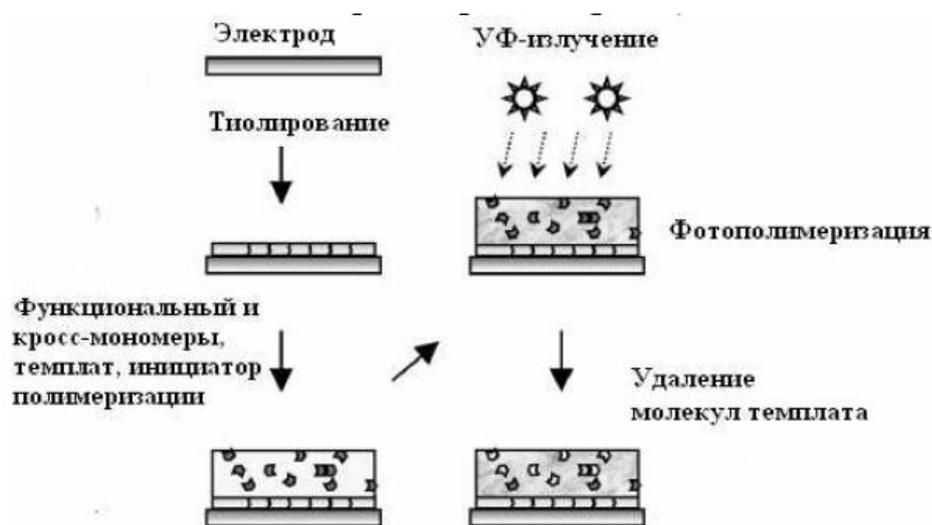


Рисунок 3 – Схема формирования распознающего слоя на основе ПМО методом фотополимеризации (Ермолаева, Чернышова, Бессонов, 2015)

Формирование распознающего слоя на поверхности полимерного или золь-гель материала способом поверхностного импринтинга позволяет осуществлять специфическое распознавание макромолекул или биоаналитов. Поверхность полимера геометрически и химически подгоняется под структуру аналита, что способствует обратимому и быстрому связыванию и удалению с поверхности «отпечатка» целевой молекулы.

В статье (Munteanu et al., 2018) представлен краткий обзор по изготовлению и свойствам электродов на основе трафаретной печати и возможности их применения для обнаружения антибиотиков, бактерий и оценки чувствительности к антибиотикам.

С помощью угольного электрода с трафаретной печатью изготовлен тип матрицы аптасенсоров с «двойным потенциалом» электрохемилюминесценции для одновременного обнаружения малахитового зеленого и хлорамфеникола в пищевых продуктах (Feng et al., 2015).

На основе магнитных многостенных углеродных нанотрубок был разработан магнитно-импринтированный электрохимический сенсор для чувствительного определения канамицина в реальных образцах (Long et al., 2015). Чувствительность электрохимического датчика с магнитной печатью была улучшена благодаря большой удельной поверхности и отличной электропроводности наночастиц Fe_3O_4 и многослойных углеродных нанотрубок.

Для анализа бензилпенициллина в реальных образцах разработан импринтированный золь-гель электрохимический датчик на основе многослойных углеродных нанотрубок, циклической вольтамперометрии и дифференциальной импульсной вольтамперометрии (Hu et al., 2011).

Акустические сенсорные системы для определения антибиотиков

Принцип действия *электроакустических методов анализа* основан на регистрации биоспецифических реакций в жидкой суспензии, контактирующей с поверхностью пьезоэлектрического звукопровода, по которому распространяется пьезоактивная акустическая волна.

Методы электроакустического анализа биологических жидкостей и суспензий активно развиваются в последние два десятилетия. Свидетельством этого является усовершенствование известных и появление новых подходов. Акустические биосенсоры используют пьезоактивные акустические волны для создания аналитического сигнала. Принцип действия электроакустических методов анализа основан на регистрации биоспецифических реакций в жидкой суспензии, контактирующей с поверхностью пьезоэлектрического звукопровода,

по которому распространяется пьезоактивная акустическая волна. Описано множество вариантов акустических биологических датчиков (Zaitsev et al., 2022; Guliy et al., 2022б).

В последнее время для создания акустических биосенсоров широко используются пьезоэлектрические резонаторы на основе линии задержки с распространяющейся поверхностной или пластинчатой акустической волной. Такие сенсоры чувствительны к изменению механических или электрических свойств биологического объекта, контактирующего с поверхностью звукопровода. Акустические биосенсоры чаще всего выполнены на основе таких пьезоэлектрических кристаллов, как кварц, ниобат лития, или танталат лития, поскольку они характеризуются высокой химической устойчивостью. Акустические волны, возбуждаемые в пьезоэлектрической среде, позволяют создать целое семейство датчиков, характеризующихся высокой чувствительностью, быстротой проведения анализа, дешевизной, и небольшими размерами (Durmuş et al., 2014).

Наиболее часто акустические биологические датчики содержат активный слой с иммобилизованными антителами, которые анализируются на устойчивость к различным антибиотикам. В этом случае причиной изменения выходного аналитического сигнала акустического иммуносенсора является увеличение массы распознающего слоя при взаимодействии с определяемым соединением (прямой формат иммуноанализа) или с антителами к нему (конкурентный формат иммуноанализа). Например, на этом принципе разработан иммуносенсор, включающий пьезоэлектрический резонатор и слой электрогенерированного полимера для определения следовых количеств антибиотика в таких пищевых продуктах, как мясо, молоко, яйцо, мед (Karaseva, Ermolaeva, 2012).

Этим же коллективом авторов проведен подбор условий синтеза наночастиц полимеров с МИП для применения в качестве распознающего слоя пьезоэлектрического сенсора для высокочувствительного определения рактопамина в водных средах (Ermolaeva et al., 2020).

Известны также биосенсоры на основе поверхностных акустических волн (ПАВ), которые использовались для быстрого обнаружения пенициллина G в молоке. Это первый случай использования биосенсора на ПАВ для обнаружения антибиотиков (Gruhl, Länge, 2014). Наряду с использованием акустических биосенсоров с активными слоями возможно изучение биомолекулярных взаимодействий непосредственно в растворах, контактирующих напрямую с поверхностью звукопровода. Это значительно сокращает время, необходимое для детекции исследуемого взаимодействия. Например, на основе резонатора с продольным электрическим полем был создан биосенсор для детекции эндотоксина в различных водных растворах (Muramatsu et al., 1989).

Весьма перспективными для работы с биологическими объектами являются пьезоэлектрические резонаторы с поперечным электрическим полем, в которых отсутствует контакт исследуемого материала с металлическими электродами. Эти резонаторы используются для исследования свойств различных жидкостей, включая и биологические. Такой резонатор представляет собой пьезоэлектрическую пластину, на одной стороне которой нанесены два электрода. Исследуемая суспензия контактирует с противоположной стороной пластины. Известно, что изменение вязкости и проводимости контактирующей жидкости приводит к изменению характеристик такого резонатора (Zaitsev et al., 2015). Это позволяет проводить анализ биологических объектов непосредственно в жидкой фазе без нанесения на поверхность резонатора специфичных антител. Была показана возможность акустического биологического датчика на основе двух пьезоэлектрических пластин, разделенных воздушным зазором, для анализа антибиотиков. В нижней пластине датчика возбуждается пьезоактивная акустическая волна с поперечно-горизонтальной поляризацией. Верхняя пластина служит дном контейнера с исследуемой клеточной суспензией. Выходной сигнал такого датчика представляет эквидистантные пики резонансного поглощения на частотной зависимости полных потерь. Показателем активности антибиотика в отношении микробных клеток является разница между регистрируемым сигналом акустического датчика для суспензии клеток без добавления антибиотика и после

его добавления (Guliy, Zaitsev, Vorodina, 2020a). Основными достоинствами этого датчика являются осуществление анализа в течение короткого промежутка времени (5-10 мин) и возможность многократного использования жидкостного контейнера без микробной обсемененности. Кроме того, изменение выходного сигнала датчика при добавлении антибиотика к суспензии микробных клеток зависит от концентрации препарата, что открывает возможность не только качественного, но и количественного анализа.

Микробные сенсорные системы для определения антибиотиков

В последнее время наблюдается повышенный интерес к разработке биосенсоров, биорецептором которых являются живые ткани, бактерии, микроорганизмы. Данный тип биосенсоров имеет множество преимуществ перед ферментными биосенсорами. Прежде всего, это связано с тем, что в клетках существует множество ферментов, коферментов и кофакторов, что предоставляет широкие возможности для определения огромного количества химических веществ. Другим несомненным преимуществом является то, что клетки легче адаптировать к потреблению и разложению нового субстрата. Прогресс в молекулярной биологии открыл неограниченные возможности для производства микроорганизмов с заданными свойствами, улучшающими деятельность либо уже существующего в них фермента, либо экспрессии чужеродного фермента в клетку-хозяина.

Микроорганизмы, проявляющие чувствительность к определяемому антибиотику, в комплексе с электрофизическим датчиком, могут представлять простые, чувствительные и быстродействующие сенсоры. Описано несколько биосенсоров для обнаружения остатков антибиотиков, основанных на применении ферментативной активности микроорганизмов (Ferrini et al., 2008; Das et al., 2014; Pellegrini, Carpico, Coni, 2004). Системы мониторинга бета-лактамных антибиотиков основаны на тех же принципах, что и тесты микробиологического ингибирования (Cháfer-Pericás, Maquieira, Puchades, 2010; Kantiani et al., 2009), с той разницей, что сигнал реакции биораспознавания определяется или количественно, или полуколичественно.

Особый интерес представляют датчики, позволяющие проводить исследование без иммобилизации компонентов анализа. Например, в работе (Narang et al., 2018) описан микроволновый микрожидкий биосенсор для быстрого тестирования концентрации и роста *E. coli* в среде с различным рН, а также в присутствии антибиотиков.

Микробные биосенсоры основаны на измерении ингибирования роста бактерий из-за присутствия антибиотиков с помощью электрохимического или йодометрического анализа. Например, Феррини и др. (Ferrini et al., 2008) представили гибридный биосенсор, сочетающий классический микробиологический скрининг антибактериальных препаратов с электрохимическим обнаружением и считыванием. В этой системе *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* использовали в качестве тестового микроорганизма, и за его ростом следили, электрохимически измеряя количество продуцируемого CO₂. Присутствие микробных ингибиторов (например, антибиотиков) в образце молока препятствует росту тест-штамма и, таким образом, снижает уровень продукции CO₂. Это изменение выработки CO₂ было зарегистрировано в течение первых 120 мин по сравнению с контрольной пробой молока.

Описаны микробные биосенсоры, основанные на измерении ингибирования роста бактерий из-за присутствия антибиотиков (Babington et al., 2012; Beltran et al., 2015). Для обнаружения хинолонов и тетрациклинов был предложен электрохимический микробный биосенсор (Pellegrini, Carpico, Coni, 2004) на основе *E. coli*, которые выбраны из-за хорошей чувствительности к анализируемому антибиотику. Обнаружение основывалось на измерении скорости продукции CO₂ в зависимости от ингибирования роста микробов антибиотиками, степень ингибирования оценивали через 120 мин. Биосенсор не показал чувствительность к другим антибиотикам (макролидам, бета-лактамам, аминогликозидам и сульфаниламидам).

Авторы другой работы (Virolainen et al., 2008) представили бактериальный штамм *E. coli*, содержащий оперон люциферазы, с помощью которого можно

определять тетрациклин биолюминисцентным датчиком. Эти бактерии могут храниться в лиофилизированной форме и производят самобиоллюминесценцию при распознавании тетрациклина.

Иной подход для определения антибиотиков разработан на основе микромеханических осцилляторов и регистрации изменений резонансной частоты при увеличении массы бактерий в питательной среде в зависимости от чувствительности к определяемому антибиотику (Gfeller et al., 2005). Авторы показали, что датчик способен обнаруживать избирательный рост кишечной палочки всего за 2 часа за счет добавления антибиотиков в питательные слои, иммобилизованные на микромеханических осцилляторах.

Наномеханические биосенсоры относятся к подсемейству микроэлектромеханических систем, состоящих из подвижных подвешенных микроструктур, способных преобразовывать биологические процессы в измеримое механическое движение. Благодаря этому наномеханические биосенсоры стали многообещающей технологией для обнаружения бактериальных патогенов и оценки их антибиотикочувствительности с повышенной эффективностью. Благодаря своей высокой чувствительности, быстрому отклику и высокой пропускной способности наномеханическая технология обладает большим потенциалом для преодоления некоторых ограничений традиционных методов. В работе (Pujol-Vila, Villa, Alvarez, 2020) представлены возможности наномеханических сенсоров не только для обнаружения бактерий, но и анализа их антибиотикочувствительности.

Описаны сенсорные системы для обнаружения антибиотиков, основанные на иммобилизации компонентов анализа (Liu et al., 2019), в которых бактерии в качестве чувствительного элемента иммобилизованы на поверхности датчика. Например, в работе (Lu et al., 2019) представлен интегрированный цельноклеточный биосенсор на базе смартфона LumiCellSense, который включает в себя 16-луночный биочип с кислородопроницаемым покрытием с иммобилизованными биолюминесцентными клетками *E. coli* для определения ципрофлоксацина в цельном молоке с порогом обнаружения 7.2 нг/мл.

В работе (Guliy et al., 2019a) продемонстрирована возможность определения антибиотиков (на примере ампициллина) с помощью микробных клеток, иммобилизованных на пленках полистирола и датчика на основе свехвысокочастотного резонатора. Показано, что воздействие ампициллина приводит к изменению минимального значения коэффициента отражения S_{11} вблизи резонансной частоты, которые зависят от концентрации антибиотика.

В *оптических биосенсорах* аналитический сигнал обусловлен не химическим взаимодействием определяемого компонента с чувствительным элементом, а измеряемыми физическими параметрами – интенсивностью поглощения и отражения света, интенсивностью люминесценции объекта и т.д. Принцип действия оптических биосенсоров основан на регистрации изменений оптических свойств среды: оптической плотности (денситометрические биосенсоры), цвета (колориметрические биосенсоры), мутности (турбидиметрические биосенсоры), показателя преломления среды (рефрактометрические биосенсоры) и других свойств в результате присутствия биологического агента. В настоящее время наибольшее развитие получили оптические биосенсоры, основанные на изменении направления распространения светового потока, проходящего через оптическое волокно или треугольную призму, покрытую тонкой пленкой металла. Они основаны на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (Deisingh, 2003).

Оптические биосенсоры, включая планарные волноводные сенсоры, были разработаны одновременно с первыми электрохимическими устройствами и в течение длительного времени они не получили должного внимания (Evtugyn, 2013). Хеми- и био-люминесцентные биосенсоры, а также электролюминесцентные сенсоры, обеспечивают очень чувствительное обнаружение специфических субстратов (Erickson et al., 2008; Fan et al., 2008).

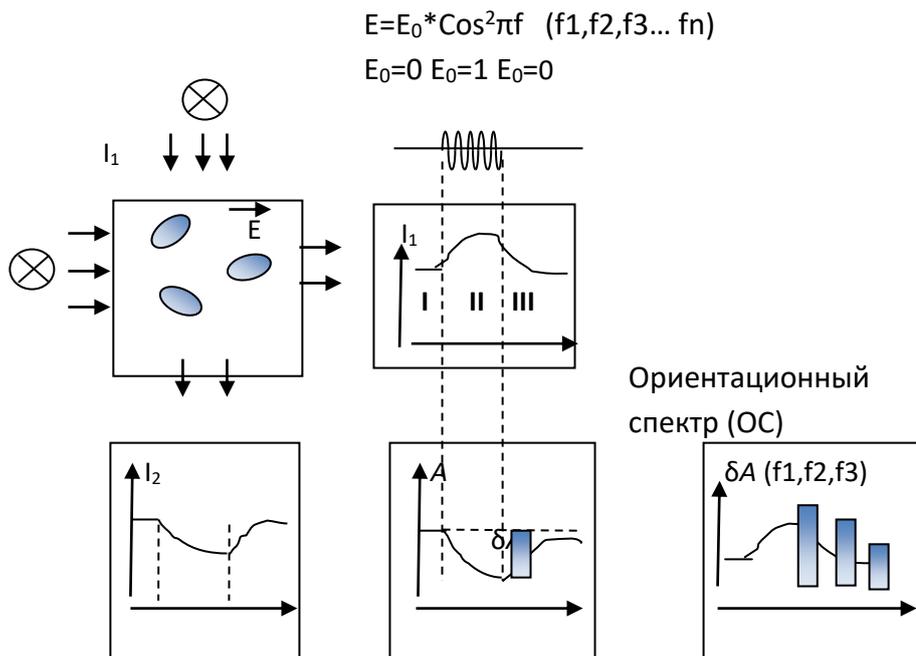
В конце 60-х годов XX века Е. Кретчманном была показана возможность возбуждения поверхностных плазмонов поляризованным светом, что послужило толчком к развитию метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР). ППР – явление, возникающее на границе раздела фаз, например, стеклянная призма –

металлическая пленка. Часть луча света, проходящего через призму и падающего под определенным углом на поверхность металла, распространяется в металлической пленке в виде затухающей электромагнитной волны, которая вызывает коллективные колебательные движения свободных электронов. Эти колебательные движения электронов - поверхностный плазмон – распространяются не только в металлической пленке, но и выходят за слой металла и экспоненциально убывают с увеличением расстояния от поверхности диэлектрика (призмы). Связь изучаемого объекта с поверхностью металлической пленки приводит к изменению диэлектрической проницаемости и, следовательно, к изменению угла пространственного резонанса. Изменение угла пространственного резонанса можно отслеживать в режиме реального времени, получая информацию о кинетике взаимодействий, возникающих на поверхности металлической пленки (Surface Plasmon Resonance. Methods and Protocols, 2010; Garcia-Aljaro et al., 2008). Используя явление плазмонного резонанса, ряд исследователей показали возможность применения метода для анализа антибиотиков. Согласно данным, представленным в работе (Mungroo, Neethirajan, 2014) оптические биосенсоры на основе ППР часто используются для количественного определения остатков антибактериальных или противомикробных препаратов в пищевой промышленности. Использование ППР примерно в 2,5 раза больше, чем у любого другого метода оптического биодатчика. ППР является предпочтительным выбором из-за его надежности и высокой чувствительности, а также его практичности с точки зрения высокой производительности, надежности и высокой экономической эффективности. Возможности применения ППР биосенсоров для определения антибиотиков показаны в работе (Chen et al., 2011). Авторы (Galatus et al., 2017) представили экспериментальную гибридную платформу, объединяющую пластиковое оптическое волокно с поверхностным плазмонным резонансом и электрохимический (био) сенсор для анализа ампициллина в воде.

Наибольшее развитие получили оптические биосенсоры, основанные на изменении направления распространения светового потока, проходящего через

оптическое волокно или треугольную призму, покрытую тонкой пленкой металла, которые основаны на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (Deisingh, 2003; Gulyi, Bunin, 2020). В другой работе (Luo et al. 2016) разработан датчик ППР в сочетании с наноразмерной полимерной пленкой с молекулярным отпечатком в качестве элемента распознавания для селективного обнаружения антибиотика ципрофлоксацина. Интересный подход к распознаванию антибиотиков (неомицина, канамицина, стрептомицина) в образцах молока был описан Frasconi et al. (2010) с использованием функционализированных наночастиц золота для усиления сигнала ППР и повышения чувствительности сенсора. Разработана система для оценки связывания сульфаниламидов с иммобилизованными иммунореагентами оптическим сенсором. Авторами показана возможность его применения для мультиплексного обнаружения сульфаниламидов, фторхинолонов, и тетрациклинов в сыром молоке (Suárez et al., 2009).

Одним из новейших методов оценки изменения электрофизических и морфометрических параметров микробных клеток под влиянием электрического поля является электрооптический (ЭО) мониторинг (Gulyi, Bunin, 2020). Воздействие антибиотиков на бактерии может быть зафиксировано в жидкой фазе с помощью оптической сенсорной системы. Общие теории действия антибиотиков основываются на представлении о связывании веществ со специфическим рецептором (часто мембранным белком), вызывающим биохимический отклик, что приводит к ускорению или замедлению определенной реакции обмена и изменению проницаемости мембран. Данные изменения, в свою очередь, отражаются на ЭО параметрах (распределения зарядов и диэлектрических параметров клеточных структур), регистрируемых с использованием ориентации клеток в электрическом поле. Общая схема работы ЭО датчика представлена на рис. 4 (Gulyi et al., 2017 с модификациями).



I - момент приложения электрического поля (хаотическая ориентация клеток), **II** - момент выключения поля (клетки в ориентированном состоянии), **III** - момент возвращения клеток в состояние с хаотической ориентацией

Рисунок 4 – Схема изменения оптической плотности микробной суспензии в процессе ЭО эксперимента (Guliy et al., 2017 с модификациями)

В работе (Guliy, Bunin, 2020) показана возможность применения ЭО датчика для определения антибиотиков в водных растворах. Измерение основано на ингибирующем действии антибиотиков на микробные клетки, чувствительных к анализируемому веществу.

Электро-фотонный подход для анализа и мониторинга устойчивости бактерий к антибиотикам продемонстрирован в работе (Conteduca et al., 2019). Добавление в среду измерения антибиотиков приводит к изменению оптических свойств и подвижности бактерий, что контролируется с помощью изменения резонанса длина волны. Анализ позволяет контролировать изменение метаболизма бактерий после воздействия на них антибиотиков, а результаты могут быть применимы при анализе антибиотиков. Таким образом, с момента открытия пенициллина в 1929 году человечество использовало этот мощный

инструмент в борьбе против бактериальных заболеваний. Доступность антибиотиков, низкая стоимость их производства, неправильное и чрезмерное использование приводит к широкому распространению антибиотиков в окружающей среде, особенно водных ресурсов. Следовательно, есть большая потребность в мониторинге и определении антибиотиков в различных средах, таких как продукты питания, напитки и образцы окружающей среды.

Как показано в данном материале, для определения антибиотиков разработано достаточно методов, одними из перспективных являются биосенсорные технологии. В целом, область биосенсоров включает широкий спектр аналитических устройств с большим потенциалом роста в ближайшем будущем. Дальнейшая стандартизация и автоматизация биосенсорных методов позволит расширить круг их применения и использования в микробиологии, биотехнологии, ветеринарии, медицине, защите окружающей среды.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Микроорганизмы и условия их культивирования

В работе использовали культуры бактерии *Escherichia coli* штаммов K-12 (IBPPM 204), XL-1 Blue (IBPPM 632), TG1, B-878, K-12 (pMMB33), pBR-325, полученные из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (Саратов) (<http://collection.ibppm.ru>). Культуры выращивали в условиях термостатирования ($37\pm 1^\circ\text{C}$) при перемешивании (160 об/мин) до экспоненциальной фазы роста на жидкой среде LB (г/л): NaCl (Becton, Dickinson and Company, Франция) – 5.0; пептон (Becton, Dickinson and Company, Франция) – 10.0; дрожжевой экстракт (DIFCO, США) – 5.0.

Концентрацию микробных клеток определяли по величине оптической плотности суспензии на длине волны 540 нм (D_{540}) в кювете с толщиной оптического слоя 1.0 см на спектрофотометре «Specol-221» («Carl Zeiss Jena», Германия).

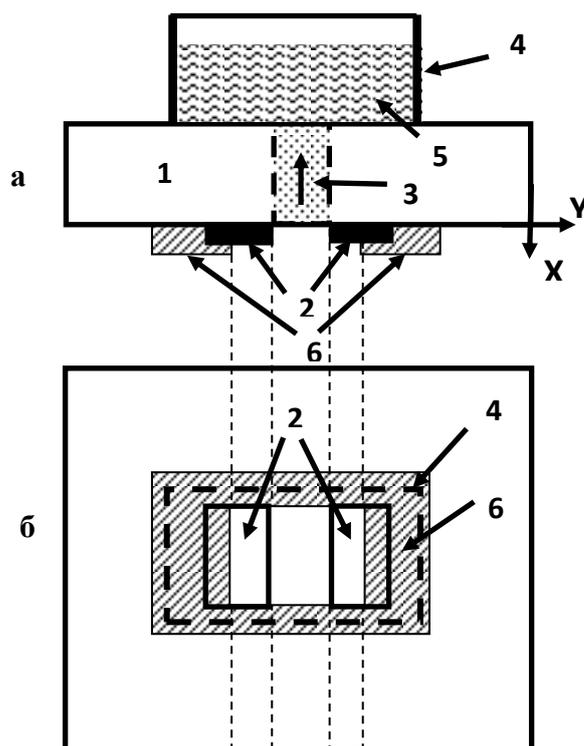
Для подсчета количества колоний, образующихся из отдельных жизнеспособных клеток, после воздействия антибиотиков использовали стандартный метод посева на поверхность плотной питательной среды, как описано (Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents, 1998). В качестве контроля использовали данные подсчета выросших колоний при посеве клеток без их обработки антибиотиком.

2.2 Используемые растворы

В работе использовали стандартный фосфатно-буферный раствор с pH 7.0. Проводимость растворов контролировали с помощью кондуктометра HI 8733 («HANNA», США); антибиотики: ампициллин, канамицин, хлорамфеникол, полимиксин, тетрациклин (Sigma, США); аминокислоты: L-фенилаланин, L-триптофан (Fluka, Швейцария), и L-цистеин (Merck, Германия).

2.3 Методология определения антибиотиков сенсорной системой на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем

Используемая в работе сенсорная система на основе резонатора с поперечным электрическим полем разработана в лаборатории физической акустики Саратовского филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, на базе которой совместно с сотрудниками лаборатории были проведены все эксперименты с указанным датчиком. Главным элементом разработанной сенсорной системы являлся датчик на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем на основе пластины ниобата лития X – среза толщиной 0.5 мм, как описано в работе (Guliy et al., 2022в). Схема датчика представлена на рис. 5.



1 – пьезоэлектрическая пластина, 2 – электроды, 3 – акустический луч, 4 – контейнер для жидкости, 5 – жидкость, 6 – слой лака, X и Y – кристаллографические оси пластины.

Рисунок 5 – Вид сбоку (а) и снизу (б) на акустический биологический датчик на основе резонатора с поперечным электрическим полем

На нижней стороне пластины были нанесены два прямоугольных электрода с поперечными размерами 5×10 мм² с зазором 2 мм между ними. Область вокруг электродов и часть электродов были покрыты специальным лаком, который демпфировал паразитные волны Лэмба (Zaitsev et al., 2011) и обеспечивал достаточно высокую добротность ~ 630 . Диапазон рабочих частот составлял 6 – 7 МГц. Возбуждаемая акустическая волна с продольной электрической поляризацией распространялась вдоль нормали к поверхности пластины. На верхней стороне пластины был приклеен жидкостный контейнер объемом ~ 1 мл.

Перед проведением анализа микробные клетки отмывали трехкратным центрифугированием при $2800 \times g$ в течение 5 мин, затем ресуспендировали в небольшом количестве дистиллированной воды (электропроводность $1,8$ $\mu\text{S}/\text{cm}$). Для устранения конгломератов суспензию клеток вновь центрифугировали при $110 \times g$ в течение 1 мин и использовали надосадочную жидкость. Затем доводили оптическую плотность суспензии D_{670} до $0.4 - 0.42$. Для проведения анализа в жидкостный контейнер вносили подготовленную суспензию микробных клеток (с концентрацией 10^6 кл/мл) и проводили измерение частотных зависимостей реальной и мнимой частей электрического импеданса датчика с помощью прецизионного измерителя LCR параметров 4285A («Agilent», США). Затем добавляли антибиотик и измерения повторялись. Использовали одну концентрацию микробных клеток и разную концентрацию антибиотика.

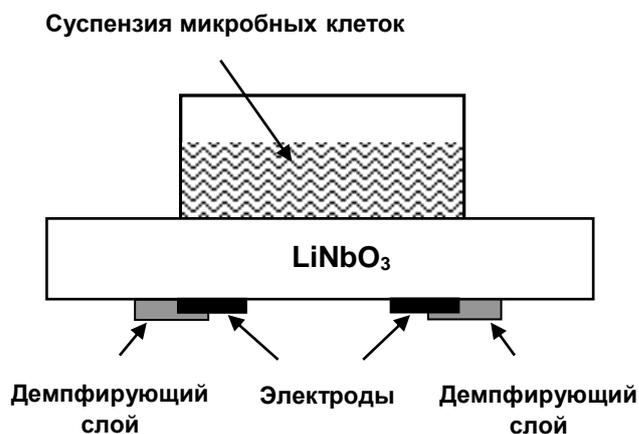
2.4 Проведение анализа с применением компактного акустического анализатора на основе резонатора с поперечным электрическим полем

Компактная акустическая сенсорная платформа представляла собой аналитическую систему, состоящую из двух компонентов: чувствительного биологического элемента и системы детекции, позволяющей регистрировать концентрацию или активность различных аналитов, присутствующих в образце. Компактный акустический анализатор был создан в Саратовском филиале ИРЭ им. В.А. Котельникова (лаборатория физической акустики), на базе которой

проводились все совместные исследования. Анализатор состоял из резонатора с поперечным электрическим полем и измерителя частотной зависимости модуля его электрического импеданса на базе электронного конструктора Arduino. Измеритель частотной зависимости модуля импеданса состоял из генератора гармонического сигнала, измерителя высокочастотного (ВЧ) электрического напряжения на резонаторе с поперечным электрическим полем и измерителя электрического тока, протекающего через этот резонатор. Сигнал с генератора подавался на цепь, состоящую из последовательно включенного известного сопротивления R и неизвестной нагрузки Z , значение которой было необходимо определить. Численные значения этих параметров, как и значение частоты генератора f , передавались в подключенный к устройству персональный компьютер. Специальная программа, заложенная в компьютер, позволяла определять модуль электрического импеданса резонатора Z , как функцию частоты f . На рис. 6а представлен внешний вид компактного устройства, включающего генератор, приемник и USB интерфейс для подключения к персональному компьютеру. На рис. 6б приведена схема датчика.



(а)



(б)

Рисунок 6 – Компактный акустический анализатор для анализа антибиотика в водных растворах (а); схема датчика (б)

Для проведения анализа в жидкостный контейнер компактного биоанализатора вносили подготовленную суспензию микробных клеток (с концентрацией 10^4 кл/мл), измеряли частотные зависимости модуля электрического импеданса датчика, затем добавляли антибиотик и измерения повторяли. Использовали одну концентрацию микробных клеток (10^4 кл/мл) и разную концентрацию антибиотика (от 0.5 до 15 мкг/мл). Выбор концентраций препарата обусловлен данными по минимальной ингибирующей концентрации хлорамфеникола в отношении клеток *E. coli* (Carone et al., 2014).

Все эксперименты с применением акустических датчиков проводились не менее чем пять раз. Относительная погрешность результатов измерений исследуемых образцов составляла $\pm 2\%$, т.е. при проведении нескольких экспериментов с одним и тем же взаимодействием суспензии клеток с антибиотиком значения модуля электрического импеданса имеют разброс значений на любой частоте в пределах $\pm 2\%$. Кривые на рисунках строились по средним значениям, полученным в результате 5 измерений. Поскольку данные включают более чем 1000 точек, то при демонстрации графиков планки погрешностей (около 2%) не видны.

Анализ и представление данных осуществляли при помощи программы Microsoft Excel 2010 и стандартных методов статистической обработки (Чарыков, 1984; Лакин, 1990).

2.5 Световая фазово-контрастная микроскопия

Для контроля воздействия антибиотиков на микробные клетки использовали лазерный диссектор Leica LMD 7000, Leica Microsystems (Германия), метод TL-RH фазового контраста (увеличение 40). Исследования проводились в Центре коллективного пользования научным оборудованием в области физико-химической биологии и нанобиотехнологии «Симбиоз» ИБФРМ РАН (ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН). Подготовку клеток и сканирование образца проводили согласно методике, представленной в работе (Johnson et al., 2017).

2.6 Конфокальная микроскопия

Суточную культуру клеток, выращенную на жидкой питательной среде LB, отмывали от культуральной жидкости дистиллированной водой трижды при 5000 x 5 мин, затем разводили в PBS и доводили оптическую плотность до OD₅₉₀ 0.1-0.2. Затем к суспензии клеток добавляли антибиотик и краситель LIVE/DEAD по 1 мл смеси в каждую чашку. Окрашивающая смесь LIVE/DEAD состояла из Syto9 (5 μM) – 1 мкл и Propidiumiodide (30 μM) – 1 мкл на 1 мл PBS. Затем полученную суспензию выдерживали в темноте в течение 1 часа. Далее клетки отмывали 2 раза PBS, ресуспендировали в 100 мкл 0,3% агарозы и готовили препарат для конфокальной микроскопии по стандартной методике. Изображения получали с помощью программного обеспечения Leica LAS X (Leica, Германия) и проанализированы с помощью программного обеспечения Fiji (обработка изображений с открытым исходным кодом программного обеспечения) и программного обеспечения Vaa3D (с открытым исходным кодом для визуализации и анализа программное обеспечение). Живые клетки (контроль – без воздействия антибиотика) флуоресцировали зеленым цветом, клетки с нарушенной мембраной флуоресцировали красным (Robertson et al., 2019). Исследования проводились в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

2.7 Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Исследование препаратов по электронно-микроскопическим снимкам проводили, как описано в работе (Guliy et al., 2018), при помощи просвечивающего электронного микроскопа Libra 120 («Carl Zeiss», Германия) при ускоряющем напряжении 120 кВ в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

2.8 Аффинная селекция антител из фаговой библиотеки

В работе использовали хелперный бактериофаг M13K07 (Stratagene, Швеция), несущий ген устойчивости к канамицину. Синтез белковых конъюгатов ампициллина проводили по методике, описанной в работе (Samsonova et al., 2005): ампициллин и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид (по 83 мкмоль каждого) добавляли к 2 мл аликвот дистиллированной воды, содержащих растворенный белок (0.83 мкмоль бычьего сывороточного альбумина (БСА)). Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре при непрерывном перемешивании в течение 2 ч, затем инкубировали при 4°C в течение 14 ч. При этом pH поддерживали на уровне 5.0. Полученные конъюгаты диализовали против дистиллированной воды и лиофилизировали.

Для селекции фагов, несущих антитела к конъюгатам ампициллина с БСА, в качестве твердой фазы для закрепления антигена использовали планшет для ИФА. В лунку вносили 200 мкл антигена и инкубировали в течение ночи при +4°C. Затем незанятое антигеном пространство на стенках планшета блокировали 2% раствором сухого обезжиренного молока в течение 1 часа. После этого вносили 200 мкл рекомбинаторной фаговой библиотеки, как описано в работе (Charlton et al., 2000) в концентрации 10^{12} фагмид/мл и инкубировали в течение ночи при +4°C. Элюцию фаговых частиц проводили триэтиламиноом. Элюированные фаговые частицы использовали для инфицирования клеток *E. coli* штамма TG1. Методика получения фаговых антител подробно описана в работах (Guliy et al., 2019б, Гулий с соавт., 2022). Фаговые частицы осаждали центрифугированием 10 мин при 8000 g и осадок ресуспендировали в 1/10 от исходного объема культуры буфера TE pH 7.5 (5 мл). Полученный препарат осветляли центрифугированием в тех же условиях, после чего фаговые частицы снова осаждали добавлением 1/5 объема раствора PEG 6000/NaCl (1 мл) с последующим центрифугированием. Осадок растворяли в 1 мл буферного раствора TE. Процедура биоэннинга проводилась в соответствии с данными (Гулий и др., 2022) и представлена на рис. 7 (Тикунова, Морозова, 2009).

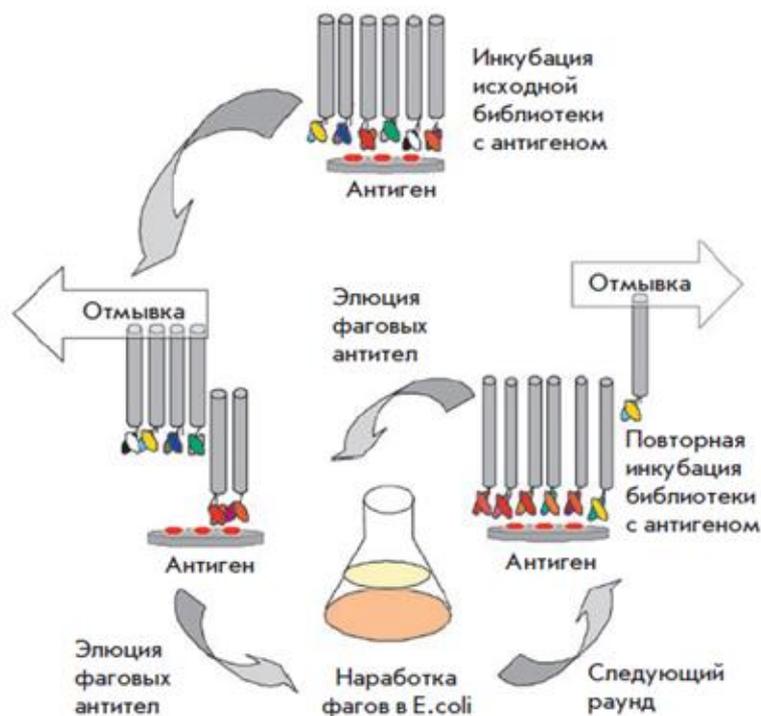


Рисунок 7 – Схема процедуры биопэннинга (Тикунова, Морозова, 2009)

Концентрацию фаговых частиц определяли спектрофотометрически, как описано в работе (Smith, Scott, 1993), используя для расчетов следующее соотношение: $A_{269} - A_{320} \sim 2 \cdot 10^{14}$ фаговых частиц/мл, где A_{320} – оптическая плотность суспензии фагов при длине волны электромагнитного излучения 320 нм, A_{269} – оптическая плотность суспензии при длине волны 269 нм на спектрофотометре UV-VIS Specord BS 250 (Analytik Jena, Германия) в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН. Полученный препарат фаговых частиц использовали для проведения последующих раундов селекции, осуществляемых в аналогичных условиях. Специфичность полученных препаратов определяли методом дот-иммуноанализа. Титр сыворотки определяли с помощью ИФА по общепринятой методике (Beatty, Beatty, Vlahos, 1987). Титр фаговых антител составил 1:1200.

2.9 Дот-иммуноанализ

Для дот-иммуноанализа использовали мембрану «Western S» (Sigma-Aldrich), которую предварительно погружали в раствор метанола на 30 сек. Ампициллин в

концентрациях 1, 4; 6, 12, 25, 50 и 100 мкг/мл наносили на мембрану «Western S», затем проводили блокировку мембраны с нанесенным на нее антигеном в течение 1 ч 2% сухим молоком, разведенным в фосфатном буферном растворе (pH 7.0).

Мембрану погружали в раствор специфичных фагмид, разведенных до концентрации $1 \cdot 10^{13}$ фагмид в 1 мл 10 мМ фосфатного буфера, и проводили инкубацию в течение ночи при +4 °С. Затем мембрану отмывали от неспецифически связавшихся фаговых антител в фосфатном буферном растворе и погружали в конъюгат коллоидного золота (КЗ) с кроличьими антифаговыми антителами ($A_{520} = 0.5$) при 25°C на ночь. Постановку дот-иммуноанализа проводили совместно с сотрудниками лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН.

Наночастицы золота (НЗ) со средним диаметром частиц 15 нм получали, используя реакцию восстановления золотохлористоводородной кислоты (Aldrich, США) цитратом натрия (Fluka, Швейцария) по методу Frens (1973). Фотометрическую оценку НЗ проводили на спектрофотометре UV-vis Specord BS 250 («Analytik Jena», Германия) при длине волны 520 нм (A_{520}). НЗ контролировали по фотометрической калибровке с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (с использованием электронного микроскопа Libra 120 («Carl Zeiss AG», Oberkochen, Германия) и регистрации динамического рассеяния света (на приборе Malvern Zetasizer Nano Nanoparticle Characterization System (Malvern Instruments, Великобритания) с He – Ne лазером (длина волны 633 нм, мощность 4 мВт), под фиксированным углом 173° при 25°C, как описано в работе (Guliy et al., 2020б) в ЦКП «Симбиоз» ИБФРМ РАН.

Конъюгаты НЗ с фаговыми антителами получали согласно методике (Tang et al., 2020), были любезно предоставлены для работы д.б.н. лаборатории иммунохимии ИБФРМ РАН Староверовым С.А.

2.10 Метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА)

Для ИФА использовали 96-луночные полистироловые планшеты. Антибиотики титровали от исходной концентрации 1 мг/мл с помощью двойных

последовательных разведений и иммобилизовали в планшетах методом простой адсорбции. В качестве первичных антител вносили фаговые антитела (разведение 1:10), которые взаимодействовали с вторичными кроличьими антифаговыми антителами (разведение 1:2). Для ферментативного мечения взаимодействия антиген – антитело использовали пероксидазу хрена, конъюгированную с козьими антикроличьими антителами. Субстратом для пероксидазы выступал *o*-фенилендиамин в присутствии перекиси водорода. Оптическую плотность образцов после проведения ферментативной реакции измеряли с помощью мультипланшетного фотометра Multiskan Ascent (ThermoLabsystems, Финляндия) при длине волны 490 нм.

ГЛАВА 3 АКУСТИЧЕСКИЕ СЕНСОРНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Методы электроакустического анализа биологических жидкостей и суспензий активно развиваются в последние два десятилетия. Акустические сенсорные системы позволяют проводить анализ биологических объектов не только с помощью иммобилизации активных реагентов на поверхности биодатчика, но и без иммобилизации компонентов анализа. В этом случае анализ, как правило, проводится в течение короткого промежутка времени непосредственно в жидкой фазе. В зависимости от используемого типа волн акустические датчики классифицируются на датчики на основе: объемных акустических волн, поверхностных акустических волн и пластинчатых акустических волн (Rocha-Gaso et al., 2009).

Датчики на основе объемных акустических волн представляют собой резонаторы, в которых акустическая волна распространяется между двумя сторонами пьезоэлектрической пластины. Эти резонаторы можно разделить на две группы: резонаторы с продольным электрическим полем и резонаторы с поперечным электрическим полем. В работе проводили исследования с использованием биологического датчика на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем на основе пластины ниобата лития X срезом с диапазоном рабочих частот 6 – 7 МГц, описанного в работе (Zaitsev et al., 2011) для определения антибиотиков.

3.1 Акустическая сенсорная система на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем для определения канамицина

Одним из антибиотиков, который широко применяется не только для лечения, но и в качестве стимулятора роста животных и в кормовых добавках для профилактики заболеваний, является канамицин (Durante-Mangoni et al., 2009).

Канамицин относится к группе аминогликозидных антибиотиков, основной механизм действия которых связан с нарушением белкового синтеза на стадии переноса аминокислот от аминоацил-тРНК на рибосомы (Salimizand et al., 2018). Канамицин может накапливаться в организме человека и характеризуется потенциальной ототоксичностью и нефротоксичностью (Jiang, Karasawa, Steyger, 2017; Shavit, Pokrovskaya, Belakhov, 2017). Объем продаж канамицина составляет 6.2% от общего объема реализации антибиотиков (Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018, 2020). Неконтролируемое применение канамицина приводит не только к повышению устойчивости бактерий к нему, но и вызывают накопление остатков канамицина в воде и продуктах животного происхождения, что, в конечном итоге, угрожает здоровью человека (Jiang, Karasawa, Steyger, 2017; Shavit, Pokrovskaya, Belakhov, 2017). Особенную опасность представляет канамицин при попадании в воду, поскольку для осуществления его гидролиза необходима температура не ниже 100° С (Tang et al., 2020). Поэтому важно контролировать содержание канамицина в промышленной и питьевой воде.

Одним из перспективных направлений для анализа антибиотиков в жидкости без иммобилизации компонентов анализа является использование датчиков на основе пьезоэлектрических материалов и структур. Микроорганизмы, проявляющие чувствительность к определяемому антибиотику, в комплексе с электроакустическим датчиком, могут представлять собой простые, чувствительные и быстродействующие сенсоры.

Предварительно проводились исследования по оценке перспективности применения акустических датчиков для проведения исследований с применением бактерий (Бородина и др., 2021; Гулий и др., 2020). В результате проведенных исследований для определения канамицина был выбран датчик на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем и микробные клетки, проявляющие чувствительность к канамицину. Эксперименты, проведенные с образцами жидкости различной вязкости и проводимости, показали, что этот датчик характеризуется высокой

чувствительностью к изменению параметров жидкости и полученные результаты отличаются хорошей повторяемостью. Такой датчик чувствителен к контактирующей жидкости и реагирует на изменение, как механических, так и электрических ее свойств.

Важным вопросом при развитии метода экспресс – диагностики антибиотиков также является не только выбор аналитической платформы, но и подбор сенсорного элемента (микробных клеток), с помощью которого можно проводить анализ при низких концентрациях препарата. Поэтому проводились скрининговые исследования по поиску микробных клеток, проявляющих чувствительность к канамицину.

Аминогликозидные антибиотики обладают широким спектром противомикробного действия и эффективны в отношении аэробной грамотрицательной флоры, в т.ч. семейства *Enterobacteriaceae*, включая *Escherichia coli*. Поэтому в качестве объекта для оценки воздействия канамицина использовали микробные клетки грамотрицательных бактерий *E. coli* В-878, поскольку ранее было установлено, что клетки данного штамма обладают чувствительностью к канамицину. Идея экспериментов заключалась в оценке воздействия канамицина на бактерии с помощью датчика на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем и в сравнении полученных результатов с результатами стандартного микробиологического высева и электронной микроскопии. Общая схема используемого датчика и план проведения экспериментов представлены на рис. 8.

Были подобраны условия измерения, которые включали микробную нагрузку в измерительной ячейке, напряженность, частоты измерения, время, необходимое для стабилизации регистрируемого сигнала датчика. В работе был выбран частотный диапазон 6 – 7 МГц, а время проведения анализа составляло ~10 мин. В измерительную ячейку вносили микробные клетки в количестве 10^4 – 10^6 клеток/мл (Бородина и др., 2021; Гулий и др., 2020).

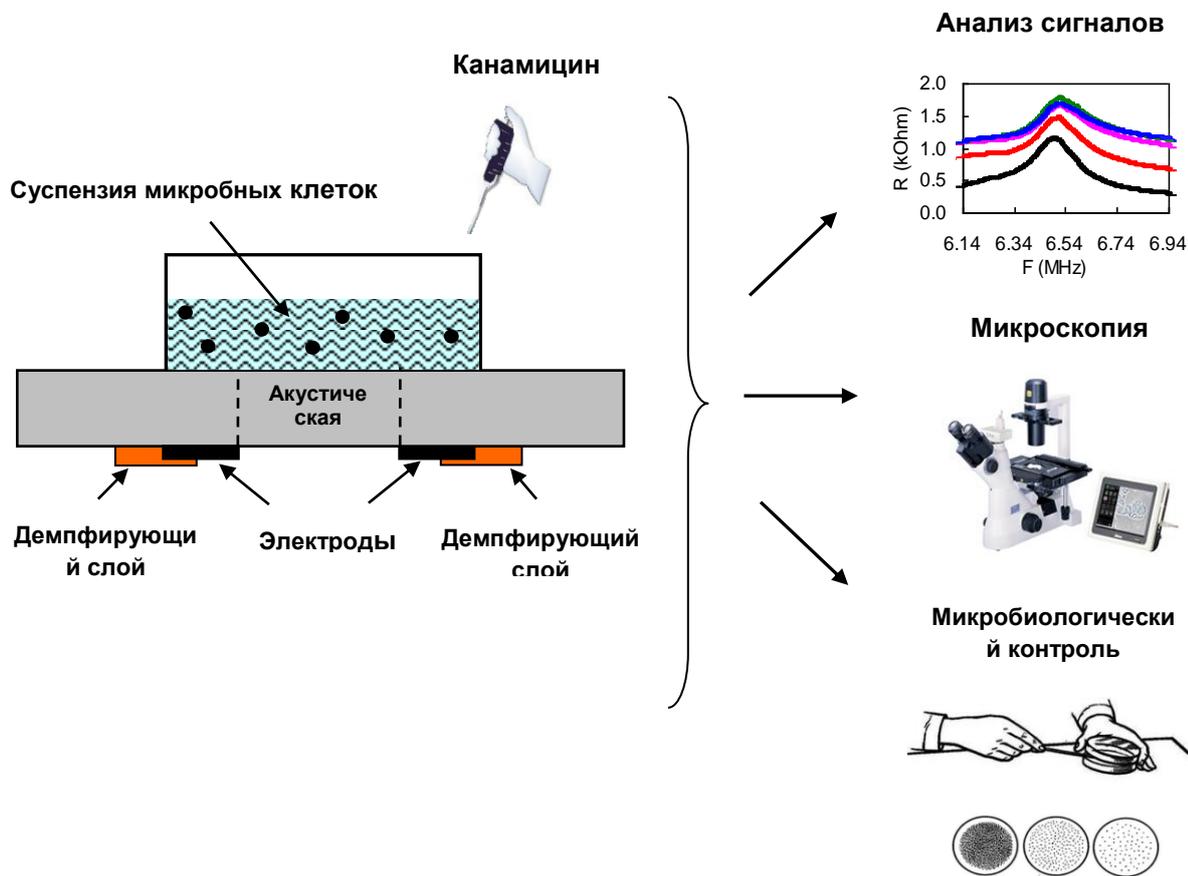
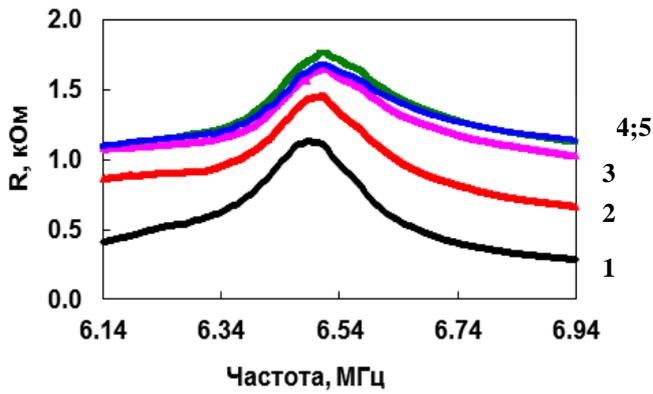
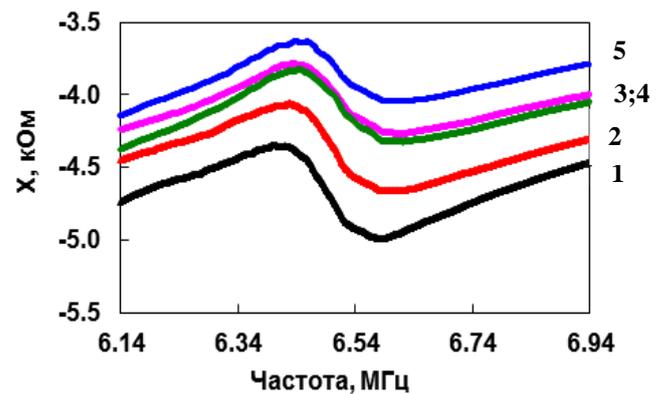


Рисунок 8 – Общая схема используемого датчика и план проведения экспериментов

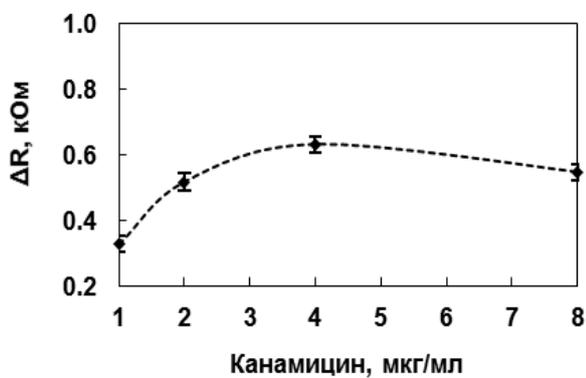
Воздействие разных концентраций канамицина на бактериальные клетки оценивали путем регистрации изменений реальной и мнимой частей электрического импеданса резонатора до и после воздействия антибиотика. В экспериментах использовали следующие значения концентраций канамицина: 1.0, 2.0, 4.0 и 8.0 мкг/мл. Показано, что при добавлении канамицина к суспензии клеток наблюдалось изменение реальной R (рис. 9а) и мнимой X (рис. 9б) частей электрического импеданса резонатора. Время регистрации аналитического сигнала составляло ~ 7 мин. Полученные данные позволили построить зависимости изменения величины реальной ΔR (рис. 9в) и мнимой ΔX (рис. 9г) частей импеданса вблизи резонансной частоты от концентрации канамицина. Аналогичные данные получены для всех используемых концентраций антибиотика.



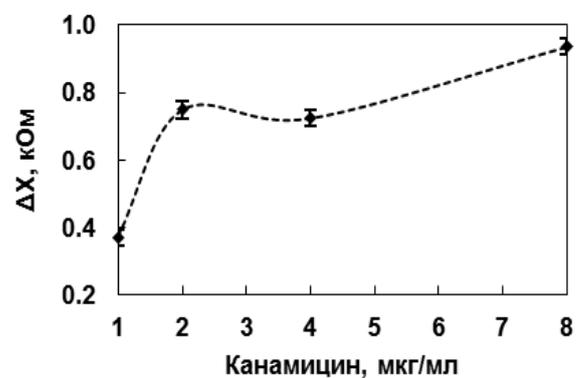
(а)



(б)



(в)



(г)

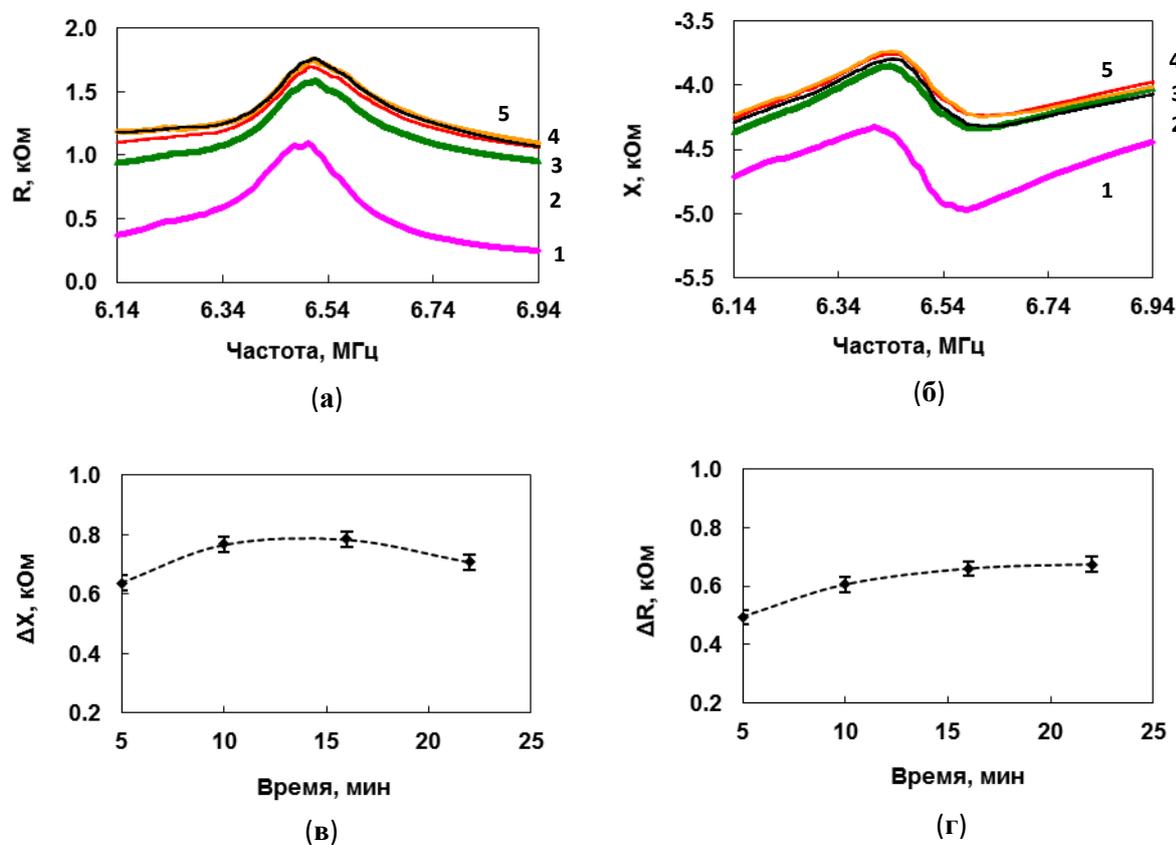
1 — без воздействия антибиотика; после воздействия канамицина: 2 — 0,5; 3 — 1; 4 — 2; 5 — 4. Зависимости изменения реальной ΔR (в) и мнимой ΔX части электрического импеданса на частоте 6,5 МГц от концентрации канамицина.

Рисунок 9 – Частотные зависимости реальной R (а) и мнимой X (б) частей электрического импеданса для суспензии клеток после воздействия разных концентраций канамицина (мкг/мл)

Как видно из представленных на рис. 9 данных, изменение электрического импеданса происходило уже при минимальной используемой концентрации канамицина в образце (1.0 мкг/мл), с увеличением удельного количества вносимого антибиотика в клеточную суспензию изменение реальной части импеданса сначала растет и достигает максимального значения при концентрации антибиотика 4 мкг/мл, а затем немного уменьшается для концентрации канамицина 8 мкг/мл. Что касается мнимой части электрического импеданса, то

ее изменение ΔX растет с увеличением концентрации канамицина и достигает максимального значения для концентрации антибиотка 8 мкг/мл.

Для определения времени, необходимого для анализа канамицина, изучали динамику изменения указанных параметров датчика в зависимости от времени (5, 10, 15, 20 мин) воздействия антибиотика на клетки. На рис. 10 представлены частотные зависимости реальной R (рис. 10а) и мнимой X (рис. 10б) частей электрического импеданса резонатора при различном времени воздействия канамицина на суспензию клеток.

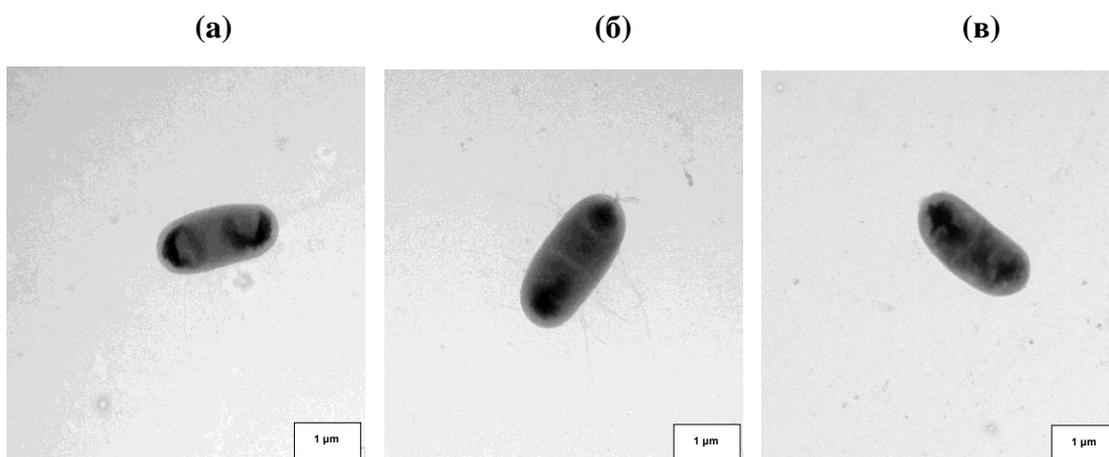


5 мин (2); 10 мин (3); 15 мин (4); 20 мин (5): 1 — без воздействия антибиотика. Зависимости изменения реальной ΔR (в) и мнимой ΔX (г) части электрического импеданса на частоте 6,5 МГц от времени воздействия антибиотика.

Рисунок 10 – Частотные зависимости реальной R (а) и мнимой X (б) частей электрического импеданса для суспензии клеток в зависимости от времени воздействия канамицина (1 мкг/мл)

На основе полученных частотных зависимостей построены зависимости изменения значения реальной ΔR (рис. 10в) и мнимой ΔX (рис. 10г) частей импеданса резонатора вблизи резонансной частоты от времени воздействия канамицина с концентрацией 1.0 мкг/мл на бактерии в суспензии. Видно, что ΔR и ΔX увеличиваются при увеличении времени воздействия канамицина на микробные клетки. После 5 минут воздействия канамицина на бактерии, регистрируемые изменения параметров датчика увеличиваются на 43% по сравнению с контролем (клетки без воздействия антибиотика) и на 30% через 10 мин. Дальнейшее увеличение времени воздействия антибиотика приводило к незначительному изменению регистрируемых параметров датчика на 8% и 2% после 15 мин и 20 мин, соответственно, по сравнению с данными для 10 мин воздействия канамицина. Из полученных данных можно заключить, что оптимальное время для проведения анализа при обнаружении канамицина в образце составляет порядка 10 мин. При контроле воздействия канамицина на бактерии с помощью их посева на питательную среду с канамицином (используемые концентрации 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 мкг/мл), наблюдалось замедление роста клеток, начиная с концентрации 1.0 мкг/мл, что соответствует данным, полученным на используемом датчике.

Для подтверждения результатов активности антибиотика в отношении изучаемых бактерий, полученных с помощью пьезоэлектрического датчика, проводилась оценка воздействия канамицина на бактерии с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). На рис. 11 представлены данные после воздействия на клетки минимальной (1.0 мкг/mL) и максимальной (8 мкг/мл) используемой концентрации канамицина. Из представленных данных видно, что с помощью ПЭМ не представляется возможным отследить изменения, происходящие с клетками под воздействием канамицина. Поверхность клеточной стенки остается без видимых изменений до (рис. 11а) и после (рис. 11б, в) воздействия канамицина. Отсутствие видимых нарушений клеточной мембраны, вероятно, связано с тем, что канамицин является ингибитором синтеза белка и опосредованно воздействует на разрушение бактериальной стенки.

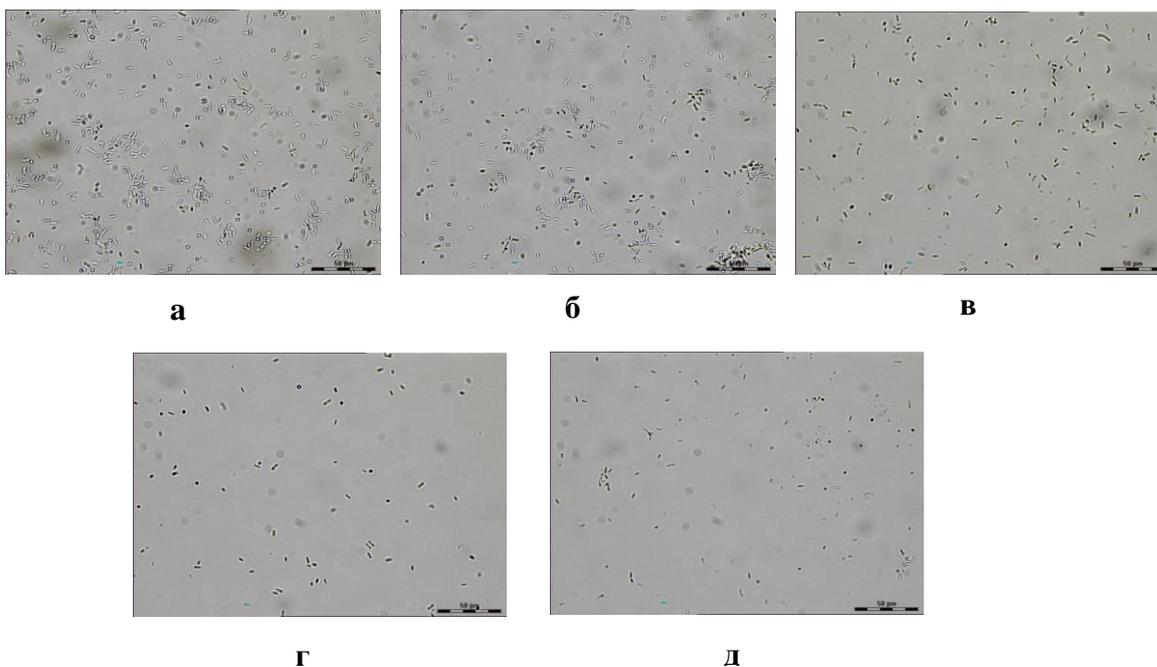


(а)– клетки без воздействия канамицина; клетки после воздействия канамицина: 1 мкг/мл (б) и 8 мкг/мл (в).

Рисунок 11 – ПЭМ *E. coli* после воздействия канамицина

Поэтому для оценки воздействия канамицина на бактерии использовали световой фазово-контрастный микроскоп (LMD). Выбор данной микроскопии обусловлен тем, что LMD позволяет различать релевантные клетки и обеспечивает бесконтактное и свободное от загрязнений выделение отдельных клеток. Высокая числовая апертура линзовых объективов и короткая длина волны лазерного излучения обеспечивают получение изображений с высоким разрешением вдоль оптического и поперечного направлений. В работе (Johnson et al., 2017) продемонстрирована возможность применения лазерного диссектора для контроля оценки антибиотиков на бактерии.

На рис. 12 представлены снимки, полученные с помощью световой фазово-контрастной микроскопии для суспензии клеток до (рис. 12а) и после (рис. 12б-д) воздействия различных концентраций канамицина. Из представленных данных видно, что с увеличением концентрации антибиотика количество жизнеспособных микробных клеток в поле зрения уменьшается по сравнению с контролем (клетки без воздействия антибиотика, рис. 12 (а)), что соответствует тенденции снижения жизнеспособности клеток при увеличении концентрации канамицина.



(а) – контроль, без воздействия антибиотика; после воздействия антибиотика (мкг/мл): (б) – 1; (в) – 2; (г) – 4; (д) – 8. Масштабная линейка: 50 мкм.

Рисунок 12 – Изображения микробных клеток, полученные с помощью Leica LMD 7000 после воздействия на бактерии разных концентраций канамицина

Для подтверждения результатов активности канамицина в отношении изучаемых бактерий, дополнительно проводили анализ их жизнеспособности с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (рис. 13) с окрашиванием LIVE/DEAD BacLight™.

Сравнение бактерий, выращенных без канамицина и в присутствии антибиотика (концентрация 8 мкг/мл), показало, что соотношение живых (зеленое окрашивание) и мертвых (красное окрашивание) клеток в культурах клеток изменилось в сторону увеличения бактерий, убитых антибиотиком. Полученные данные коррелируют с результатами стандартного микробиологического теста и результатами измерений, полученными на акустическом датчике.

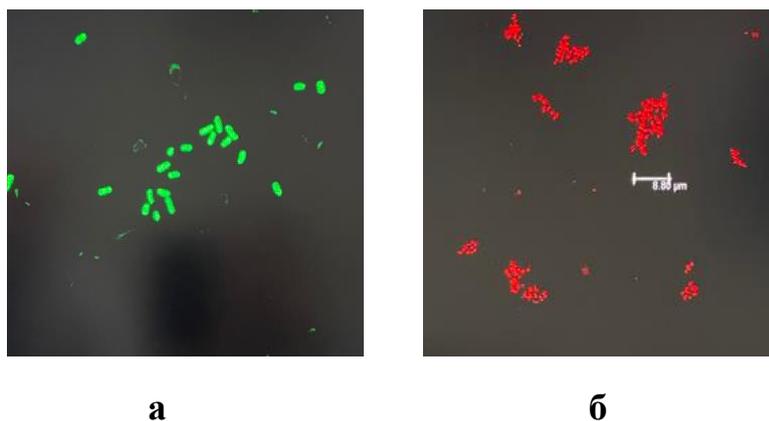


Рисунок 13 – Изображения микробных клеток, полученные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии до (а) и после (б) обработки канамицином

При проверке селективности разрабатываемого биотеста для определения канамицина проводили анализ изменения регистрируемых параметров датчика в отношении других антибиотиков. В работе использовали представителей антибактериальных препаратов, которые, в соответствии с данными на 2020 г., активно используются во всем мире (Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018, 2020). В работе использовали ампициллин, как представитель β -лактамов и полимиксин (представитель полимиксинов). Указанные группы антибиотиков могут быть активны в отношении *E. coli*. Поскольку минимальная детектируемая концентрация канамицина, определяемая с помощью предлагаемого биотеста на основе резонатора с поперечным электрическим полем составила 1.0 мкг/мл, для всех указанных антибиотиков использовали такую же концентрацию. Время анализа составляло 7 – 10 мин. На рис. 14 представлены изменения реальной и мнимой частей электрического импеданса датчика на частоте 6.5 МГц после воздействия различных антибактериальных препаратов на клетки. Концентрация всех антибиотиков равна 1 мкг/мл. Видно, что при одинаковой концентрации антибиотиков (1 мкг/мл) воздействие на исследуемые клетки канамицина приводит к наиболее значительным изменениям параметров датчика.

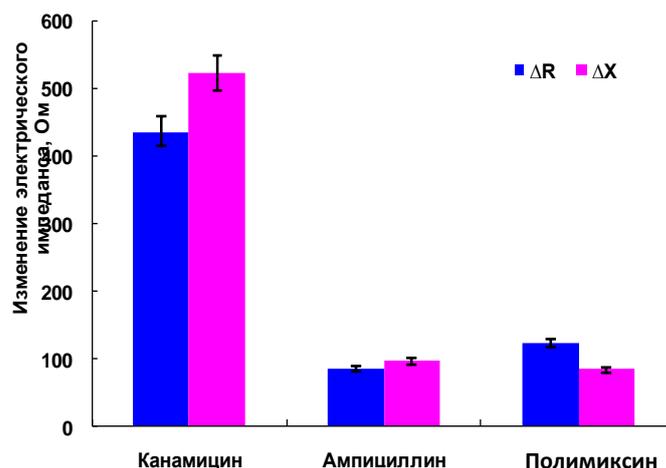


Рисунок 14 – Зависимость изменения действительной (синий цвет) и мнимой (розовый цвет) частей электрического сопротивления датчика на частоте 6.5 МГц от вида антибактериального препарата

Описанная в работе акустическая микробная тест-система на основе резонатора с поперечным электрическим полем позволяет проводить анализ канамицина в водных растворах в режиме реального времени *in situ*, при этом нижний предел детекции составляет 1.0 мкг/мл.

3.2 Экспресс-анализ воздействия амингликозидов на бактерии с помощью акустической сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем

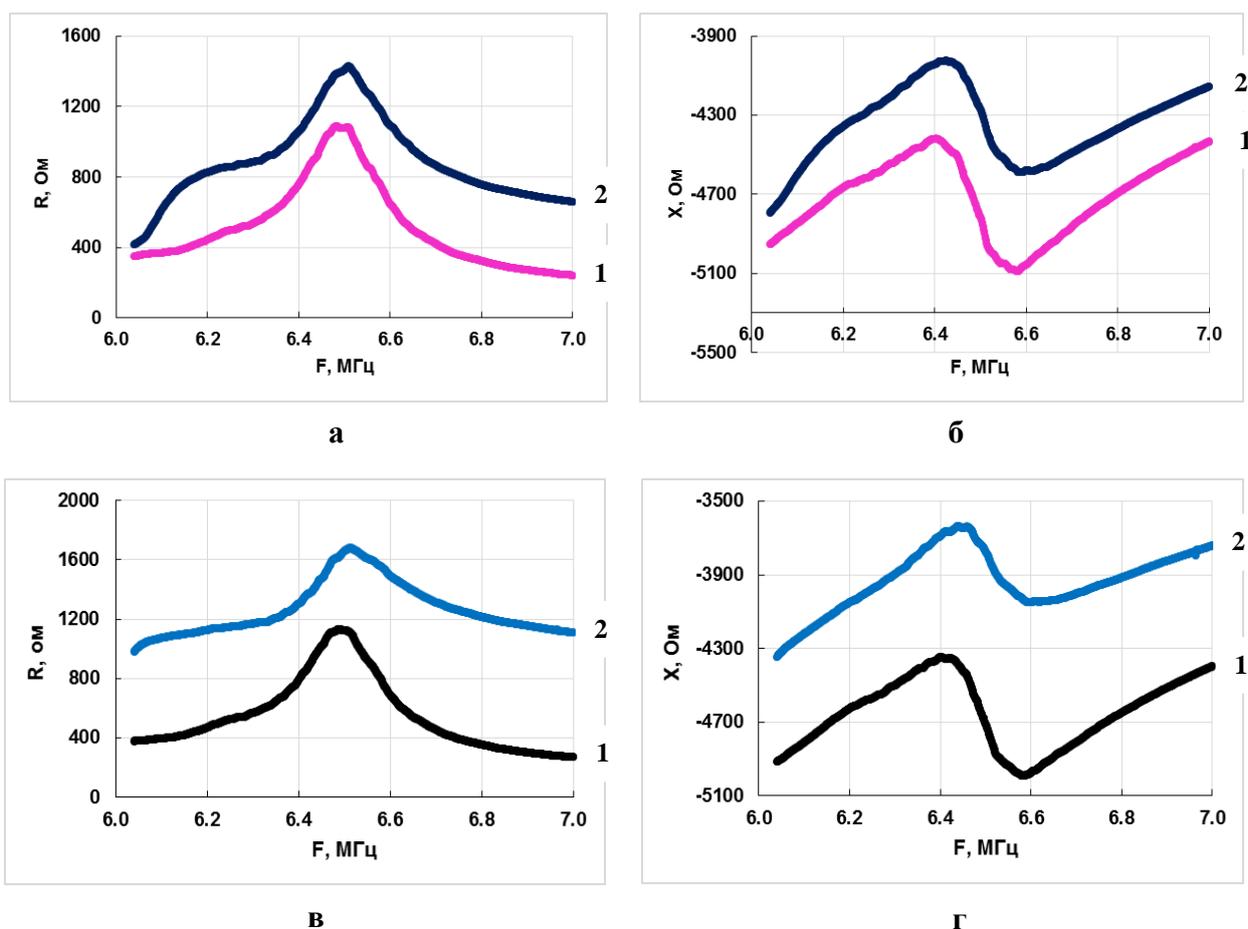
В основе эффективного действия антибактериальных препаратов лежит высокая чувствительность к ним микробных клеток. Основной целью определения восприимчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам является прогнозирование их эффективности при лечении инфекций. Поэтому определение антимицробной восприимчивости (АМВ) бактерий является одной из основных задач при антибиотикотерапии. Поскольку в предыдущем разделе было показано, что с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем можно

проводить определение канамицина, было предложено использовать данную сенсорную систему для оценки воздействия канамицина на бактерии, различающиеся по чувствительности к канамицину.

Идея экспериментов заключалась в сравнительном анализе регистрируемых параметров датчика после воздействия канамицина на микробные клетки *E. coli* штаммов (XL-1, В-878, К-12 (pММВ33)), различающиеся по устойчивости к изучаемому антибиотику. Полученные данные сравнивали с результатами стандартного микробиологического посева. Поскольку при проведении предыдущих исследований зафиксированы максимальные значения ΔR и ΔX при концентрации канамицина 4 мкг/мл, в исследованиях также использовали данную концентрацию антибиотика. В предварительных экспериментах установлено, что оптимальное время воздействия канамицина на бактерии (т.е. время для регистрации аналитического сигнала) составляет $\sim 7 - 9$ мин. На рис. 15 представлены результаты изменения регистрируемых параметров датчика до и после воздействия канамицина на суспензию клеток чувствительных к канамицину штаммов *E. coli* XL-1 и В-878.

Значительные изменения реальной и мнимой частей электрического импеданса датчика на частоте 6.65 МГц, близкой к частоте резонанса, ΔR оказывается равным 418 Ом и 853 Ом для штаммов XL-1 и В-878, соответственно. Изменения ΔX для этих штаммов равны 364 Ом и 837 Ом.

Для проверки предположения о возможности дифференциации чувствительных и резистентных штаммов при воздействии канамицина, проведены исследования с бактериями канамицинустойчивого штамма *E. coli* К-12 (pММВ33), обладающего плазмидой pММВ33, несущей устойчивость к канамицину. Условия эксперимента были аналогичными, как и при использовании канамицин – чувствительных штаммов.

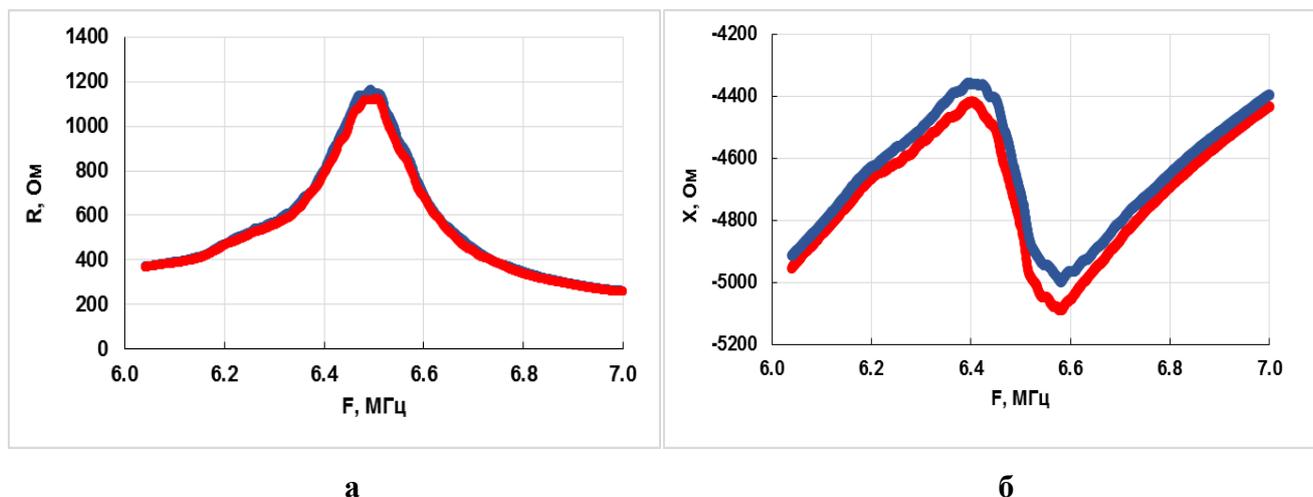


(а, б) – *E. coli* штамм XL-1; (в, г) – *E. coli* штамм В-878; (1 и 2) – измерения до и после воздействия канамицина соответственно

Рисунок 15 – Частотные зависимости реальной R (а, в) и мнимой X (б, г) частей электрического импеданса для суспензии клеток *E. coli*

Из данных, представленных на рис. 16 (а, б) видно, что в используемом диапазоне частот не зафиксировано изменений реальной и мнимой части электрического импеданса датчика. Следовательно, изменение величины регистрируемого сигнала датчика при действии канамицина отличается для чувствительных и резистентных штаммов. На основании проведенных исследований был выбран ориентировочный критерий воздействия канамицина на бактерии, который заключается в следующем: клетки являются чувствительными к антибиотику если изменение модуля электрического импеданса резонатора при взаимодействии антибиотика с бактериями превышает

~3%. Для увеличения надежности результата следует учитывать не одну резонансную частоту, а набор частот в определенном диапазоне вблизи резонанса.



Синяя линия – до воздействия канамицина; красная линия – после воздействия канамицина

Рисунок 16 – Частотные зависимости R (а) и мнимой X (б) частей импеданса для суспензии клеток *E. coli* К-12 (pMMB33)

Таким образом, регистрируя изменения реальной или мнимой части электрического импеданса суспензии клеток до и после воздействия на нее канамицина, можно сделать вывод о чувствительности/устойчивости изучаемых бактерий к исследуемому антибиотику. Можно рекомендовать сенсорную систему на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем для экспресс – оценки воздействия канамицина на бактерии.

Быстрота проведения измерений с использованием пьезоэлектрических резонаторов с поперечным электрическим полем может привлечь специалистов для определения антибиотикочувствительности бактерий. С использованием существующих стандартных методов и методик для определения АМВ бактерий тратится от 24 до 96 часов и более. Высокая чувствительность сенсора позволяет проводить диагностику АМВ бактерий в режиме реального времени, время проведения анализа составляет ~ 7-10 мин. Такая сенсорная система может быть

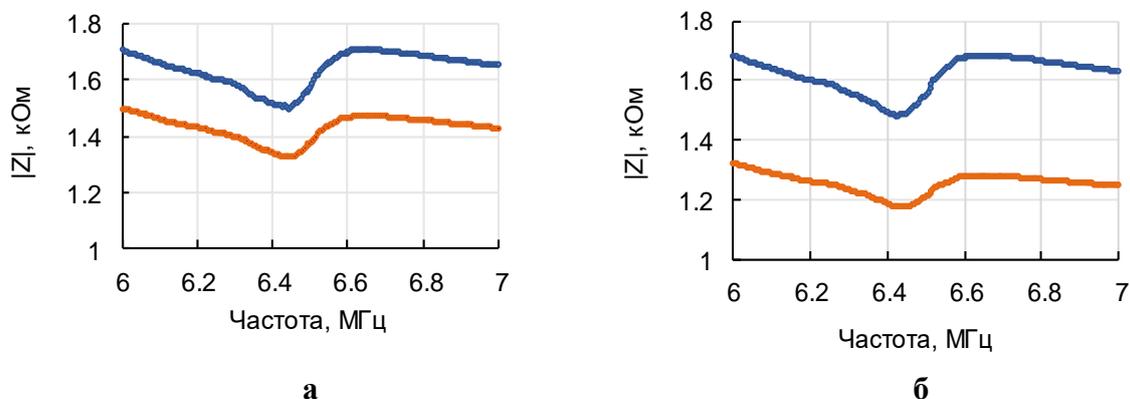
полезна не только при определении антибиотикочувствительности бактерий, но и во время разработки новых антибактериальных препаратов и анализе восприимчивости бактерий к ним.

3.3 Анализ антибиотиков с помощью компактного акустического анализатора на основе резонатора с поперечным электрическим полем

В предыдущих разделах показана возможность анализа антибиотиков на примере канамицина непосредственно в жидкости с помощью датчика на основе резонатора с поперечным возбуждающим электрическим полем. Хотя сам датчик обладает небольшими размерами ($60 \times 40 \times 20$ мм³), для измерения параметров жидкости с его помощью использовался прецизионный LCR измеритель 4285A («Agilent», США). Этот измеритель обладает высокой точностью (до 0.1%), но весьма дорогой и громоздкий. Более перспективными являются компактные анализаторы, позволяющие проводить измерения биологических объектов в «полевых условиях» или небольших передвижных лабораториях. Поэтому был создан компактный прибор (рис. 6) для определения антибиотиков, обладающий несколько меньшей точностью, но отличающийся простотой изготовления, портативностью и низкой стоимостью. Цель данного этапа работы заключалась в определении антибиотиков в водной среде с помощью компактного акустического анализатора.

Условия проведения эксперимента были аналогичны, как и при использовании пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем при определении канамицина. В качестве чувствительного элемента датчика использовали те же бактерии, как и в разделе 3.1. Установлено, что во всем используемом диапазоне концентраций антибиотика наблюдалось изменение модуля электрического импеданса резонатора после воздействия на бактерии канамицином. На рисунке 17 в качестве примера представлены частотные зависимости модуля электрического импеданса датчика для суспензии клеток до (синяя кривая) и после (красная кривая) воздействия канамицина на суспензию

клеток, время регистрации аналитического сигнала составляло не более 5 мин. Видно, что изменение модуля электрического импеданса происходило уже при минимальной используемой концентрации канамицина в образце (0.5 мкг/мл).



Оранжевая кривая – измерение до добавления канамицина; синяя кривая – измерение после добавления канамицина в концентрации 0.5 мкг/мл (а) и 3 мкг/мл (б)

Рисунок 17 – Частотные зависимости изменения модуля электрического импеданса суспензии бактериальных клеток с помощью компактного акустического анализатора на основе резонатора с поперечным электрическим полем

На основе полученных частотных зависимостей модуля электрического импеданса датчика для всех используемых концентраций канамицина были построены зависимости изменения величины модуля электрического импеданса (ΔZ) от концентрации антибиотика. На рис. 18 представлена такая зависимость изменения модуля электрического импеданса ΔZ резонатора от концентрации канамицина на частоте 6.65 МГц. Видно, что линейная зависимость находится в интервале концентраций антибиотика 0.5 – 2.5 мкг/мл. Затем с ростом концентрации модуль импеданса остается постоянным.

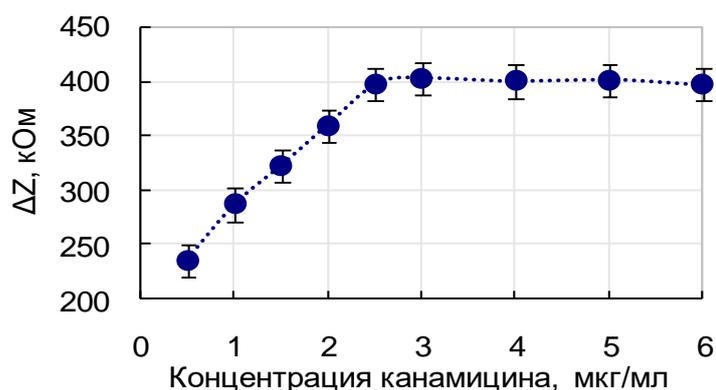


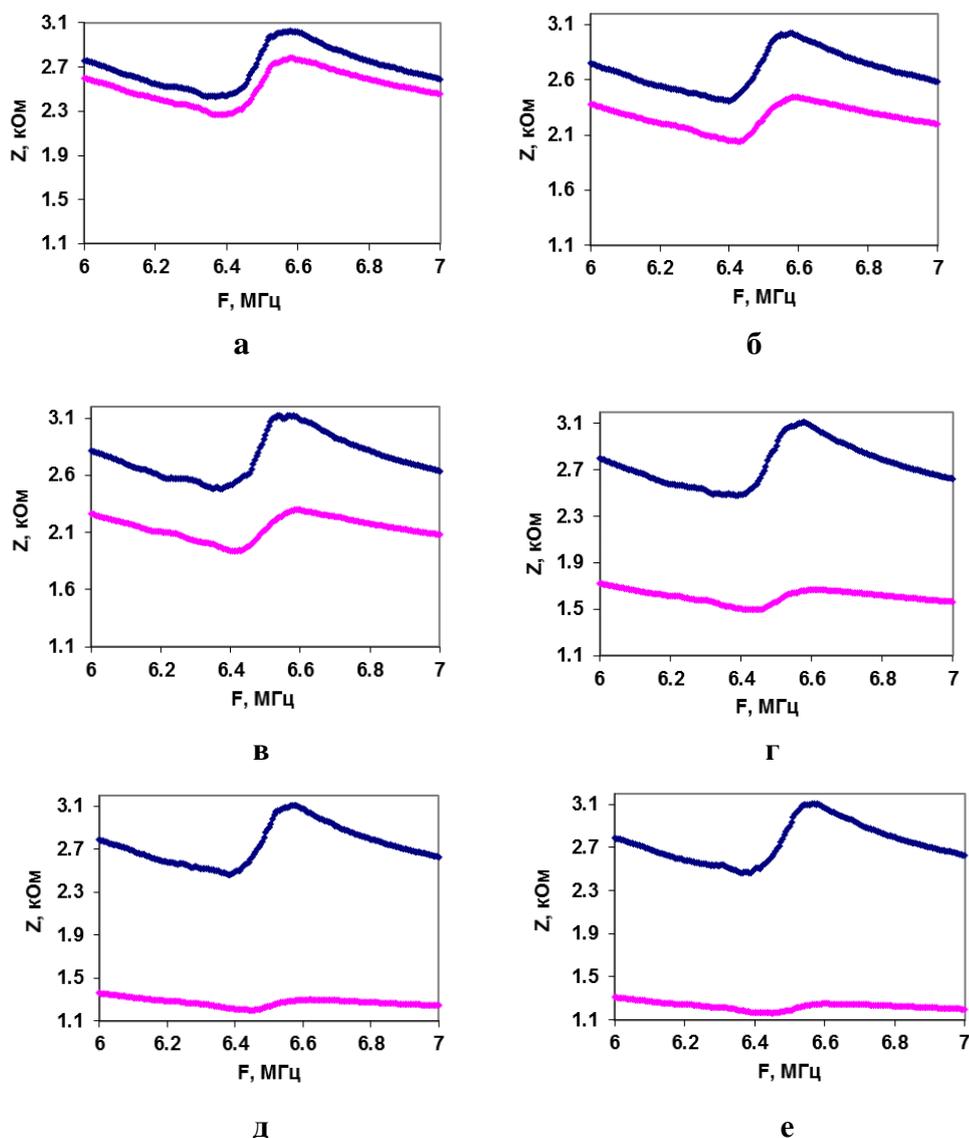
Рисунок 18 – Зависимость изменения модуля электрического импеданса датчика на частоте 6.65 МГц от концентрации канамицина

Таким образом, показано, что компактный акустический анализатор может быть использован для определения канамицина в жидкости. Линейная зависимость определяемых концентраций канамицина находится в интервале 0.5 – 2.5 мкг/мл, время анализа составляет не более 5 мин. Аналитическим сигналом служит изменение модуля электрического импеданса датчика после воздействия антибиотика на бактерии. Перспективность сенсорной системы заключается в возможности ее многократного использования и отсутствии необходимости иммобилизации компонентов анализа на поверхности датчика.

Одним из важных моментов при развитии сенсорной системы для анализа антибиотиков, является ее апробация на других группах антибиотиков, например, хлорамфениколе. Хлорамфеникол или левомецетин (класс Амфениколы) является антибиотиком ароматической структуры, выделен из культуральной жидкости актиномицетов *Streptomyces venezuelae* в 1947 г. (Oong, Tadi, 2022), является препаратом широкого спектра действия (Shukla, Bansode, Singh, 2011), но поскольку имеет серьезные побочные эффекты, используется при неэффективности других химиотерапевтических средств. Объем продаж *Amphenicols* за 2020 г. в мире не снижается, а наоборот увеличивается, с 1.9% для 2018 г. до 2.3 % от общего объема продаж антибиотиков на 2020 г. по данным для

31 страны (Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018, 2020; Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020, 2021). Препарат активно используется не только в медицине, но и в животноводстве, характеризуется высокой токсичностью (Shukla, Bansode, Singh., 2011; Wiest, Cochran, Tecklenburg, 2012) и после попадания в окружающую среду не разлагается в краткосрочной перспективе, что приводит к длительному загрязнению им окружающей среды (Hanekamp, Bast, 2015; Li et al., 2013). Использование хлорамфеникола, а также несовершенство систем его определения приводит к крупномасштабному загрязнению природных объектов и экосистем данным соединением и его производными, что значительно ухудшает санитарно-гигиеническое состояние окружающей среды, в том числе, водных ресурсов. Поэтому содержание хлорамфеникола в водных ресурсах находится под пристальным вниманием экологов и подлежит обязательному мониторингу.

Предварительно был проведен скрининг бактерий, проявляющих чувствительность к хлорамфениколу с использованием штаммов из коллекции ризосферных микроорганизмов ИБФРМ РАН (<http://collection.ibppm.ru>), в результате была выбрана культура клеток *E. coli* К-12. При проведении исследований на компактном акустическом анализаторе показано, что изменение модуля электрического импеданса происходило уже при минимальной используемой концентрации хлорамфеникола в образце (0.5 мкг/мл). На рис. 19 (а-е) в качестве примера представлены частотные зависимости модуля электрического импеданса датчика для суспензии клеток до (розовая кривая) и после (синяя кривая) воздействия разных концентраций антибиотика. Время регистрации аналитического сигнала составляло ~ 4 мин.



Конечная концентрация хлорамфеникола (µг/мл): (а) – 0.5; (б) – 2.5; (в) – 5; (г) – 10; (д) – 12; (е) – 15

Рисунок 19 – Зависимости модуля электрического импеданса Z от частоты для суспензии клеток до и после добавлением хлорамфеникола

Полученные данные позволили построить зависимость изменения модуля электрического импеданса (ΔZ) на частоте 6.65 МГц при добавлении антибиотика к суспензии микробных клеток от концентрации (рис. 20а). По этой зависимости была построена калибровочная кривая, представленная на рис. 20 (б). Видно, что с увеличением удельного количества вносимого антибиотика в клеточную суспензию изменение модуля электрического импеданса растет, достигает

максимального значения при концентрации антибиотика 12 мкг/мл, а затем испытывает насыщения при концентрации антибиотика 12 – 15 мкг/мл.

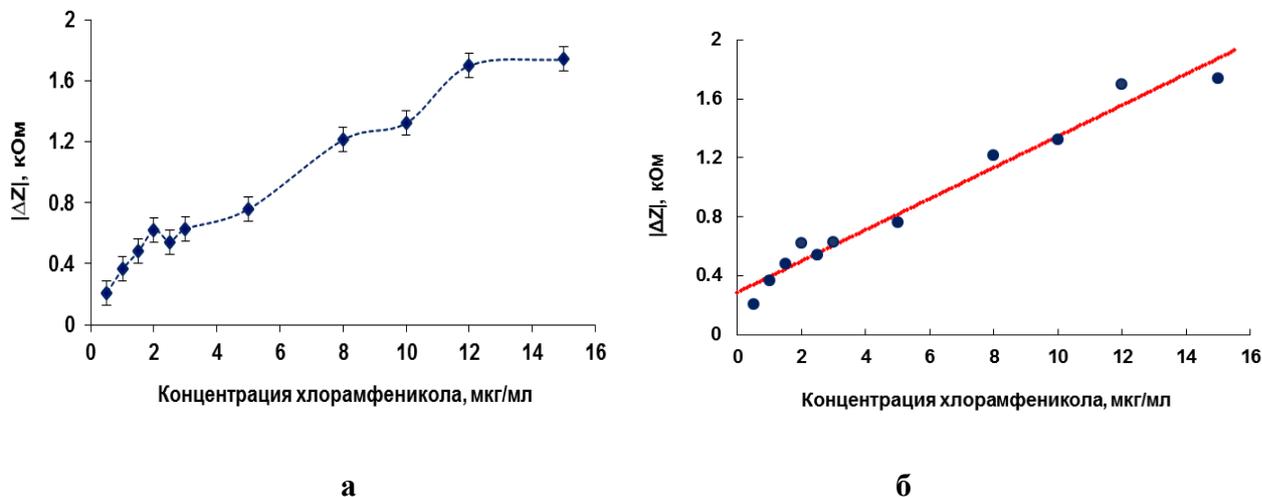


Рисунок 20 –Зависимость изменения модуля электрического импеданса ΔZ на частоте 6.65 МГц от концентрации хлорамфеникола в суспензии микробных клеток (а) и соответствующая калибровочная кривая (б)

Линейная зависимость, представленная на рис. 20б, может быть выражена уравнением

$$|\Delta Z| = 0.289 + 0.106n, \quad (1)$$

где $|\Delta Z|$ — изменение модуля электрического сопротивления после добавления антибиотика (кОм), n — концентрация антибиотика (мкг/мл). Отсюда, измеряя изменение модуля электрического сопротивления $|\Delta Z|$, можно определить n как

$$n = \frac{|\Delta Z| - 0.289}{0.106}, \quad (2)$$

Были проведены независимые контрольные эксперименты по определению концентрации антибиотика с использованием калибровочной кривой на рис. 20б, описанной уравнениями (1–2). Для этого были изготовлены три пробы раствора

хлорамфеникола с разной концентрацией и с каждой пробой проведено 5 независимых опытов. Результаты опытов представлены в таблице. 1.

Таблица 1. Результаты независимых экспериментов по измерению концентрации хлорамфеникола с использованием калибровочной кривой на рисунке 20(б)

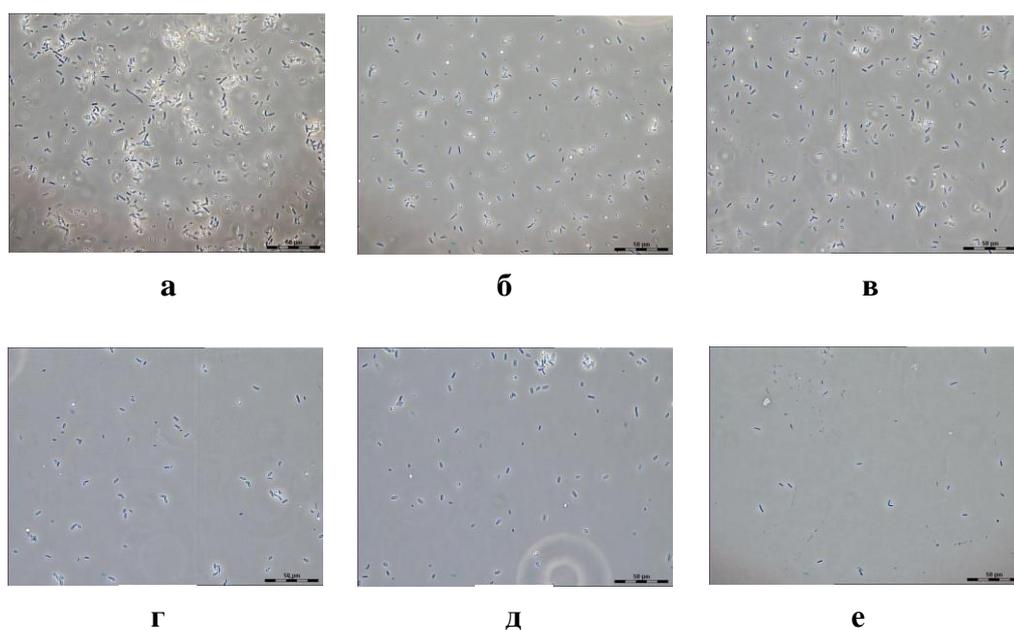
$ \Delta Z $, kHz	$ \Delta Z_{av} $, kHz	n , μг/мл	n_{av} , μг/мл л	Δn_{av} , μг/мл	Sq , μг/мл л	Res1	Res5
0.764 0.779 0.749 0.771 0.756	0.764±1.6%	4.5 4.79 4.35 4.6 4.43	4.534	0.034 -0.256 0.184 -0.066 0.104	0.17	4.534±0.17 4.534±3.76 %	4.534±0.08 4.52±1.7%
1.028 1.05 1.009 1.039 1.019	1.022±1.75 %	7 7.2 6.85 7.1 6.95	7.02	0.02 -0.18 0.17 -0.08 0.07	0.135	7.02±0.135 7.02±2%	7.02±0.06 7.02±0.91 %
1.241 1.264 1.215 1.252 1.227	1.24±1.5%	9.05 9.25 8.75 9.1 8.9	9.01	-0.04 -0.24 0.26 -0.09 0.11	0.192	9.01±0.192 9.01±2.1%	9.01±0.09 9.01±0.95 %

Примечания: Здесь введены следующие обозначения: $|\Delta Z|$ – модуль импеданса резонатора; $|\Delta Z_{cp}|$ – усредненный модуль импеданса резонатора; n – концентрация хлорамфеникола; n_{cp} – усредненное значение концентрации хлорамфеникола; Δn_{cp} – отклонение от n_{cp} ; Sq — квадратичная ошибка одного измерения; Res1 является результатом одного измерения; Res5 – результат пяти измерений.

Согласно предварительно проведенным исследованиям, квадратичная погрешность одного измерения изменения модуля импеданса $|\Delta Z|$ для каждого

эксперимента не должна превышать 2%. Что касается концентрации *n* левомицетина, определенной по градуировке уравнения (2), квадратичные ошибки одного измерения составляют 3.76, 2 и 2.1% для концентраций 4.53, 7.02 и 9.01 мкг/мл. Таким образом, ошибка одного измерения концентрации антибиотика не превышает 4%, т.е. результаты лежат в пределах $\pm 4\%$.

Для подтверждения результатов активности антибиотика в отношении изучаемых бактерий, полученных с помощью пьезоэлектрического датчика, проводилась оценка воздействия хлорамфеникола на бактерии с помощью LMD. Из данных, представленных на рис. 21 видно, что с увеличением концентрации антибиотика количество жизнеспособных микробных клеток в поле зрения уменьшается по сравнению с контролем (клетки без воздействия антибиотика, рис. 18 (а)), что соответствует тенденции снижения жизнеспособности клеток при увеличении концентрации антибиотика.



(а) – контроль, без воздействия антибиотика; после воздействия антибиотика (мкг/мл): (б) – 0.5; (в) – 2.5; (г) – 5; (д) – 10; (е) – 15. Масштабная линейка: 50 мкм.

Рисунок 21 – Изображения микробных клеток, полученные с помощью Leica LMD 7000 после воздействия разных концентраций хлорамфеникола

При сравнении результатов, полученных на акустическом анализаторе, с данными микробиологического высева, видно, что с увеличением концентрации хлорамфеникола, воздействующего на бактерии, величина регистрируемого аналитического сигнала увеличивается, а количество жизнеспособных бактерий уменьшается. Следовательно, данный штамм может быть рекомендован в качестве сенсорного элемента датчика для анализа хлорамфеникола.

Для определения оптимального времени проведения анализа изучалась динамика изменения регистрируемых параметров датчика для суспензии клеток в зависимости от времени воздействия антибиотика: 4, 8, 12, 16, 20 и 24 мин. На основе полученных частотных зависимостей была построена зависимость изменения модуля электрического импеданса Z от времени воздействия хлорамфеникола на клетки вблизи резонансной частоты 6.65 МГц (рис. 22). Видно, что после 4 минут воздействия хлорамфеникола на бактерии, регистрируемые изменения параметров датчика модуль электрического импеданса датчика меняется на 0.672 кОм по сравнению с контролем (клетки без воздействия антибиотика) и на 0.584 МГц через 24 мин. Поскольку разница между изменением модуля электрического импеданса после 4 мин и 24 мин воздействия хлорамфеникола на бактерии составляет примерно 8%, можно рекомендовать проводить анализ в течение 4 мин.

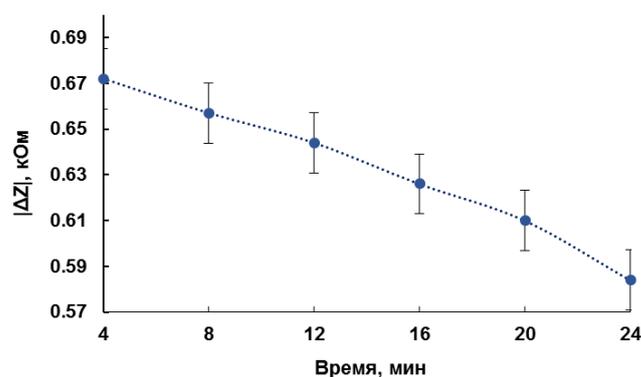
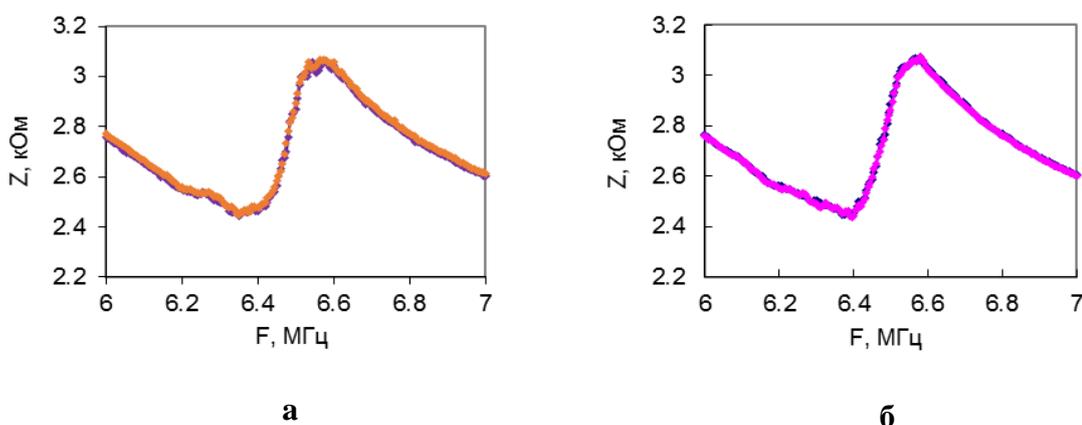


Рисунок 22 – Зависимость изменения модуля электрического импеданса ΔZ от времени воздействия хлорамфеникола на суспензию клеток

При проведении сенсорного анализа с привлечением микробных клеток существует ряд неспецифических факторов, которые могут приводить к изменению регистрируемого сигнала датчика, такие как неспецифичное воздействие соединений вследствие сорбции соединений на клеточной поверхности. Для подтверждения данных, что зафиксированные изменения аналитического сигнала связаны с чувствительностью бактерий к хлорамфениколу, поставлены эксперименты по анализу изменений регистрируемых параметров для клеток хлорамфениколустойчивого штамма, обладающих плазмидой pBR-325, несущей устойчивость к хлорамфениколу, результаты представлены на рис. 23.

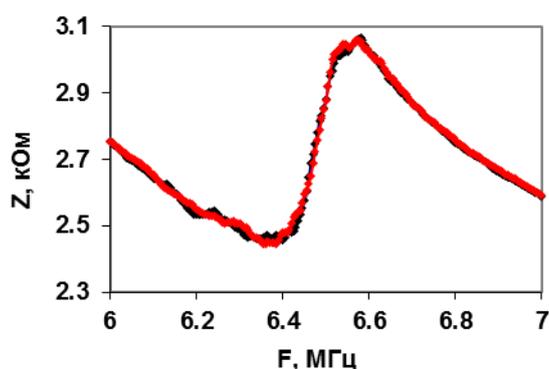


Розовая кривая – до добавления хлорамфеникола; синяя кривая – после добавления хлорамфеникола; конечная концентрация (мкг/мл): (а) - 2.5 и (б) – 10.

Рисунок 23 - Зависимости модуля электрического импеданса Z от частоты для суспензии клеток *E. coli* pBR-325

Условия проведения экспериментов были аналогичны, как и для чувствительного штамма. Видно, что в обоих случаях модуль электрического импеданса датчика практически не меняется. Следовательно, зависимость регистрируемого эффекта для клеток при воздействии хлорамфеникола значительно отличается для чувствительных и резистентных штаммов *E. coli* и можно говорить об отсутствии неспецифичного воздействия хлорамфеникола на суспензию клеток.

Для исключения массовой нагрузки на датчик, связанной с внесением антибиотика в измерительную ячейку и возможной его сорбцией на поверхности датчика, проведены дополнительные эксперименты, в которых хлорамфеникол добавляли в измерительную ячейку с дистиллированной водой (без внесения бактериальных клеток). Из представленных данных (рис. 24) видно, что регистрируемые параметры датчика в этом случае практически не меняются. Следовательно, изменение массы воды после внесения антибиотика не приводит к изменению модуля электрического сопротивления резонатора.



Черная линия – дистиллированная вода; красная линия – вода с добавлением 50 мкл хлорамфеникола (10 мкг/мл).

Рисунок 24 – Зависимость модуля электрического импеданса Z от частоты для дистиллированной воды

Таким образом, показана возможность применения компактного акустического анализатора с использованием микробных клеток в качестве чувствительного компонента для определения хлорамфеникола в водных средах с нижним пределом детекции 0.5 мкг/мл.

ГЛАВА 4 ФАГОВЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Одной из важных составляющих при разработке диагностических аналитических систем анализа антибактериальных препаратов является подбор антибактериального биорецептора. В качестве биоселективного компонента (элемента распознавания) преимущественно используют антитела, специфичные к определяемому антигену, и современная иммунохимия предлагает широкий ассортимент качественных и количественных методов анализа антигена, отличающихся по чувствительности и степени сложности (Sharma, Byrne, O'Kennedy, 2016). Наиболее простым и доступным является метод отбора антител путем иммунизации животных изолированными препаратами антигена. Более сложным и, вместе с тем, позволяющим получить более надежные антитела методом (однажды полученные и охарактеризованные гибридомы представляют собой неограниченный источник моноклональных антител) является гибридная технология (Kohler, Milstein, 1975). Однако гибридомы, подобно большинству других клеточных культур животных, растут относительно медленно, не достигают высокой плотности и требуют сложных и дорогих сред, что создает определенные сложности для их применения в качестве аналитических реагентов. Для решения подобных задач в молекулярной биологии стали использоваться генно-инженерные технологии клонирования узнающих фрагментов – гипервариабельных участков иммуноглобулинов (фаговых антител), которые являются дешевыми и могут конкурировать по селективности с гибридными технологиям. К такому методу относится технология фагового дисплея, в основе которой лежит экспонирование чужеродных пептидов или белков на поверхности фаговых частиц в составе одного из химерных белков оболочки. Технология разработана Дж. Смитом, который доказал возможность экспрессии чужеродного белка на поверхности нитчатого бактериофага M13, осуществив встройку гена, кодирующего фрагмент эндонуклеазы рестрикции EcoRI, в единую рамку трансляции с минорным белком оболочки рIII нитчатого бактериофага (Smith,

Petrenko, 1997; McCafferty et al., 1990). Метод не требует использования животных, длительных процедур иммунизации, дорогих сред и культур животных клеток.

Фаговые рекомбинантные антитела успешно зарекомендовали себя в качестве биорецепторов антигенов (Nanduri et al., 2007; Paoli, Chen, Brewster, 2004; Williams, Benedek, Turnbough, 2003; Chassagne et al., 2004; Jacobsson et al., 2003; Pujol-Vila, Villa, Alvarez et al., 2020; Nguyen et al., 2018; Sompunga et al., 2019). Ранее нами были получены фаговые антитела на ферритин (Staroverov et al., 2015), бактерии *Azospirillum brasilense* Sp245 (Dykman et al., 2012; Guliy et al., 2012), *Herbaspirillum seropedicae* (Guliy et al., 2019б) и показана перспективность их применения в качестве распознающего компонента при определении антигена. Не менее востребованной окажется технология фагового дисплея для получения антител, специфичных к низкомолекулярным антигенам, в том числе, антибиотикам. В частности, с применением этой технологии были получены и апробированы в различных методах иммуноанализа фаговые антитела к ивермектину, диминазину, ксилазину, туберкулину, силимарину (Staroverov et al., 2015; 2021). В известной авторам литературе отсутствует информация о получении фаговых антител, специфичных к β -лактамным антибиотикам.

4.1 Получение фаговых антител, специфичных к ампициллину

На практике при выборе антибиотиков руководствуются принципом принадлежности антибактериального препарата к определенной группе, поэтому в качестве антигена использовали ампициллин (как представитель β -лактамных антибиотиков). β -лактамные антибиотики занимают 2-е место по объему продаж от всех реализуемых антибактериальных препаратов (Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020, 2021).

Цель данного этапа работы – отработка технологии фагового дисплея для получения антител, специфичных к ампициллину, и демонстрация возможности их применения для определения ампициллина методом дот-иммуноанализа.

В 1999 г. в ИБФРМ РАН в ходе выполнения совместного научного проекта с Университетом г. Абердина (Великобритания) был передан фаговый дисплей антител овцы, протоколы и методические рекомендации по применению данной технологии (Charlton et al., 2000). Основой метода является создание комбинаторной библиотеки, в которой переменные участки легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов соединены случайным образом и представлены на поверхности нитевидного бактериофага (M13K07). Каждый бактериофаг, экспрессирует антитела единственной специфичности. Фаги, несущие антигенсвязывающие фрагменты антител (scFv, Fab) нужной специфичности, могут быть отобраны на иммобилизованном антигене. Схема конструирования фрагментов антител фаговой библиотеки представлена на рис. 25 (Тикунова, Морозова, 2009 с модификациями).

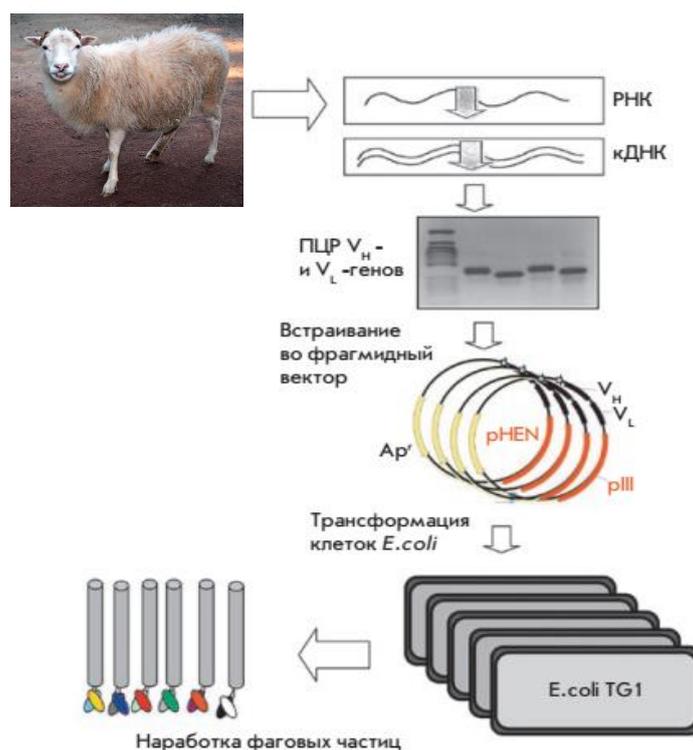


Рисунок 25 – Схема конструирования фрагментов антител фаговой библиотеки (Тикунова, Морозова, 2009 с модификациями)

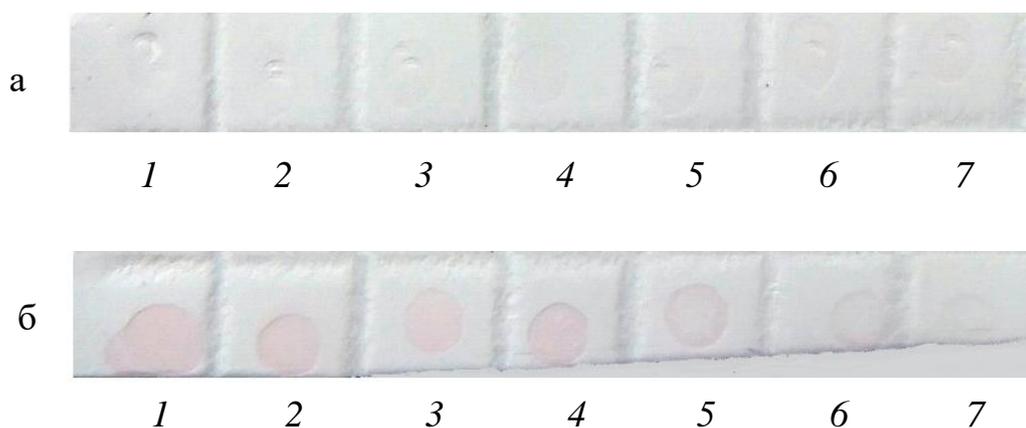
Для получения фаговых антител, специфичных к ампициллину, оптимальным носителем выбрана мембрана «Western S». Установлено, что количество антигена, используемого для иммобилизации, должно быть не менее $\times 10^{12}$ бактериофагов/мл; подобран элюент (100 мМ раствор триэтиламин), для его нейтрализации выбран 1 М Трис-НСl (рН 7.4). Для повышения чувствительности фаговых антител рекомендовано проводить не менее 4-х раундов селекции, титр антител определяли методом ИФА.

С использованием отработанной методики было проведено 4 раунда селекции фаговых антител к ампициллину. Для увеличения их специфичности с каждым раундом вдвое уменьшалась концентрации антигена, как описано в (Grier et al., 1998). Начальная концентрация антигена составляла 100 мг/мл. Концентрация фаговых частиц, определенная методом спектрофотометрии с использованием формулы: $A_{269} - A_{320}$, составила $\sim 1.2 \times 10^{13}$ вирионов/мл.

Специфичность фаговых антител определяли методом дот-иммуноанализа. Несмотря на то, что метод дот-иммуноанализа, в основном, качественный или полуколичественный метод, его использование может оказывать большую помощь при предварительном тестировании. Суть метода заключается в визуализации специфического взаимодействия адсорбированного на мембране антигена и меченых (коллоидными или молекулярными метками) антител. В работе использовали стратегию вторичного мечения, аналогично, как описано (Staroverov et al., 2015), то есть сначала проводили биоспецифическую реакцию ампициллин/фаговые антитела, а затем визуализовали ее с помощью меченых наночастицами поликлональных кроличьих антифаговых антител.

Из данных, представленных на рис. 26 видно, что антиампициллиновые фаговые антитела, обладают специфичностью к ампициллину (рис. 26 б), но после первого раунда такой четкой картины не наблюдалось (рис. 26 а). В результате проведенных исследований сделан вывод, что для повышения чувствительности фаговых антител необходимо проводить не менее 4-х раундов селекции. Для определения минимальной концентрации антигена (ампициллина), детектируемой визуально с помощью фаговых антител методом дот-иммуноанализа,

использовали антиампициллиновые фаговые антитела, полученные после 4-го раунда селекции, и ампициллин в концентрациях 1; 4; 6; 12; 25; 50 и 100 мкг/мл. В качестве метки использовали 15 нм конъюгаты коллоидного золота с кроличьими антифаговыми антителами (200 мкл конъюгата на 1 мл фосфатного буферного раствора при визуальном контроле (около 20 минут).



а – Анализ после первого раунда селекции; б – анализ после 4 раунда селекции обогащенной фаговой библиотеки. Цифры соответствуют концентрациям ампициллина (мкг/мл): 1-100; 2 - 50; 3 - 25; 4 – 12; 5 – 6; 6 – 4; 7 – 1.

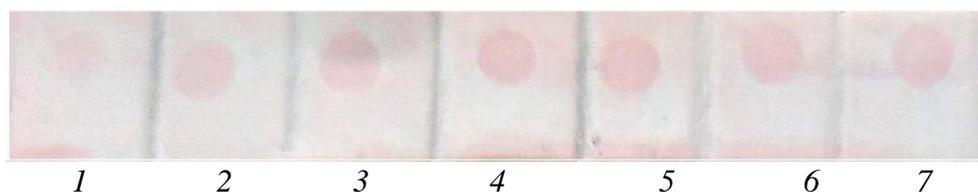
Рисунок 26 – Дот-иммуноанализ фаговых анти-ампициллиновых антител

Из данных, представленных на рисунке 27, видно, что конъюгат связывался с комплексом антиген-антитело, что можно было визуальным образом наблюдать в виде серии красных пятен. Следовательно, полученные в работе фаговые антитела способны определять ампициллин с помощью метода дот-иммуноанализа, при минимальной определяемой концентрации 1 мкг/мл (различимое связывание метки, отличное от фонового уровня).

Далее проводили анализ специфичности взаимодействия антиампициллиновых фаговых антител в отношении представителей других групп антибиотиков. Для этого использовали представителей антибактериальных препаратов, которые, в соответствии с данными на 2020 г., активно используются во всем мире: тетрациклин (занимает 1 место по объему продаж) и канамицин

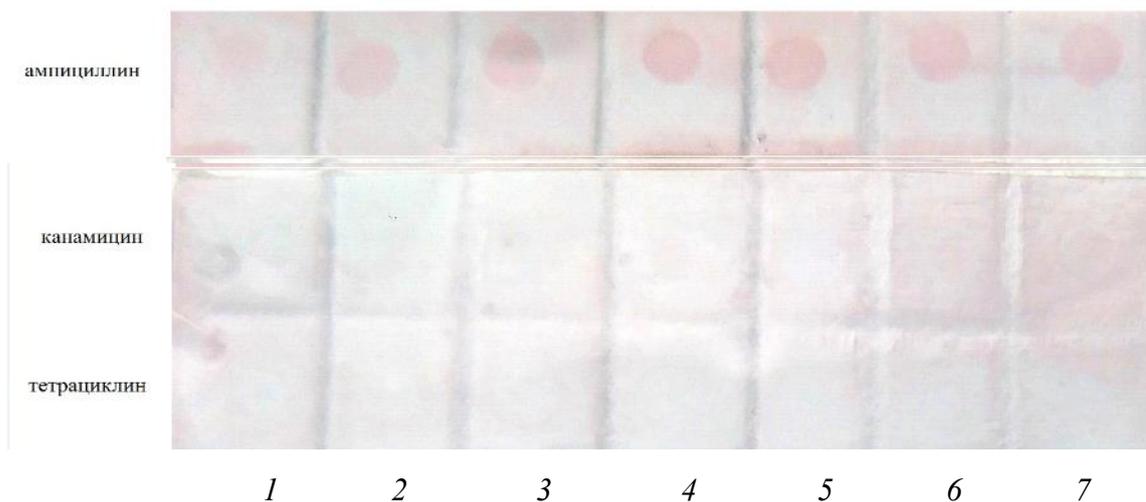
(как представителя аминогликозидных антибиотиков, объем продаж которого составляет 6.2% от общего объема продаж всех антибактериальных препаратов).

Условия проведения анализа для всех антибиотиков были аналогичны, как и при использовании ампициллина. Установлено, что конъюгат связывался с комплексом ампициллин (антиген) – специфичные фаговые антитела, что можно визуально наблюдать в виде серии красных пятен (рис. 28). Видно, что фаговые антитела, специфичны только к ампициллину, и не взаимодействуют с тетрациклином и канамицином.



Цифры соответствуют следующим концентрациям ампициллина (мкг/мл): 1-1; 2 - 4; 3 - 6; 4 - 12; 5 - 25; 6 - 50; 7 - 100

Рисунок 27 – Дот-иммуноанализ ампициллина с использованием фаговых анти-ампициллиновых антител (овечья фаговая библиотека, Griffin.1, UK)



Цифры соответствуют следующим концентрациям антибиотиков (мкг/мл): 1-1; 2 - 4; 3 - 6; 4 - 12; 5 - 25; 6 - 50; 7 - 100

Рисунок 28 – Определение специфичности фаговых антител в отношении ампициллина; тетрациклина; канамицина методом дот-иммуноанализа

Поскольку химическая формула ампициллина, L-фенилаланина и L-триптофана содержат ароматическое кольцо и группу NH₂ (рис. 29), были проведены контрольные исследования по исключению возможности неспецифического взаимодействия антиампициллиновых фаговых антител с L-фенилаланином и L-триптофаном. Дополнительно проводили исследования, исключающие неспецифическое взаимодействие полученных антител в отношении L-цистеина, который также в своем составе содержит группу NH₂ (рис. 29).

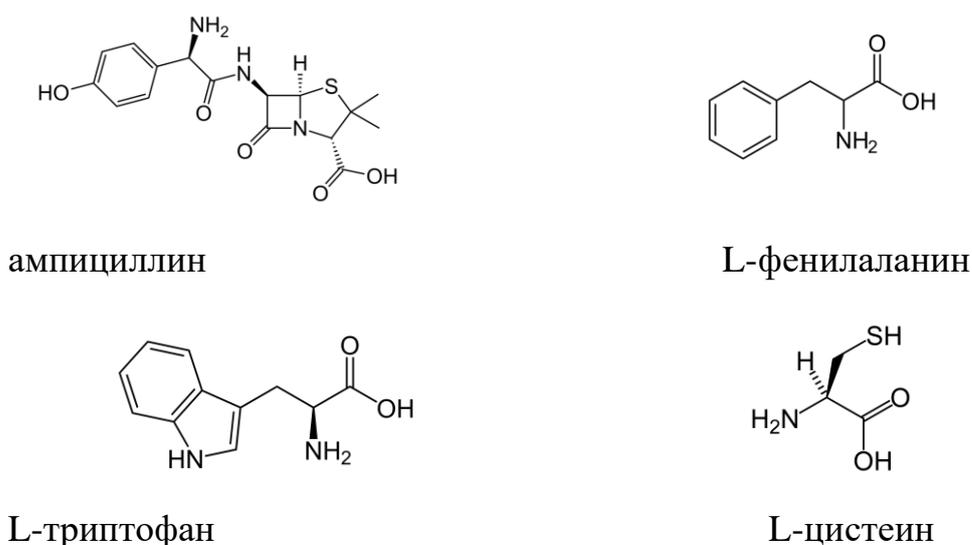
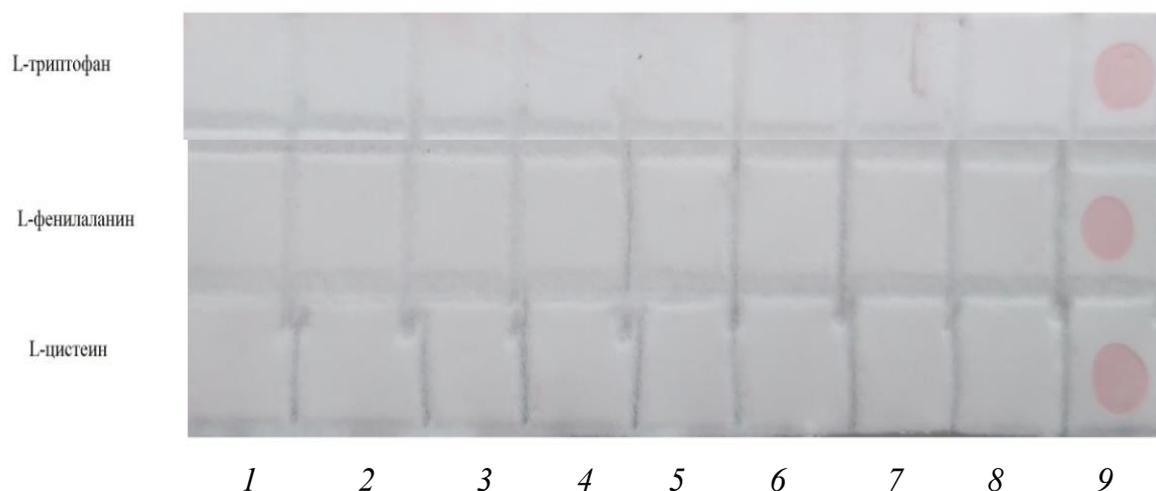


Рисунок 29 – Структурные формулы ампициллина, L-фенилаланина и L-триптофана и L-цистеина

Из данных, представленных на рис. 30 видно, что фаговые антитела, специфичные в отношении ампициллина, не взаимодействуют L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином.

Таким образом, полученные фаговые антитела обладают достаточно высокой специфичностью по отношению к ампициллину и не взаимодействуют с антибиотиками тетрациклином, канамицином, а также L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином. Для получения фаговых антител рекомендовано проводить не менее 4-х раундов биоэппинга для получения специфичных фаговых антител. Фаговые антитела, специфичные к ампициллину, могут быть

использованы для детекции ампициллина в водных растворах методом дот-иммуноанализа при этом нижний предел детекции составляет 1 мкг/мл.



Цифры под рисунками соответствуют следующим концентрациям (мкг/мл): 1-1; 2 - 4; 3 - 6; 4 - 12; 5 - 25; 6 - 50; 7 - 100; 8 - 1000.

Рисунок 30 – Взаимодействие фаговых анти-ампициллиновых антител с L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином методом дот-иммуноанализа (9 – контроль (фаговые антитела, концентрация ампициллина 100 мкг/мл)

На данном этапе показана возможность получения фаговых антител, специфичных к ампициллину и продемонстрирована принципиальная возможность их применения для иммунодетекции ампициллина. В известных базах данных отсутствует информация о получении фаговых антител, специфичных к ампициллину, для определения антибиотика. В дальнейшем антиампициллиновые фаговые антитела могут быть использованы в качестве чувствительного (распознающего) компонента при определении ампициллина в водных растворах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди антибактериальных препаратов, широко используемых не только в медицине, но и в ветеринарии, можно выделить канамицин и хлорамфеникол. Канамицин, как представитель аминогликозидных антибиотиков, применяется в терапии, ветеринарии, а также в качестве стимулятора роста животных. Хлорамфеникол в прошлом применялся в ветеринарии для лечения всех основных сельскохозяйственных животных, а в настоящее время используется для лечения людей и домашних животных. Канамицин может накапливаться в организме человека и характеризуется потенциальной ототоксичностью и нефротоксичностью (Jiang, Karasawa, Steyger, 2017; Shavit, Pokrovskaya, Belakhov, 2017). Неоднократно высказывались опасения относительно генотоксичности хлорамфеникола и его метаболитов, его эмбрио- и фетотоксичности, канцерогенного потенциала для человека (Scientific Opinion on Chloramphenicol in food and feed, 2014).

Присутствие остаточных количеств антибиотиков в водных ресурсах вызывает серьезные опасения. Растущая урбанизация, рост производства и употребления антибиотиков, несмотря на существующие запреты, являются основными факторами, ответственными за появление данных препаратов в объектах окружающей среды и, особенно, в водных ресурсах. Чтобы предотвратить экологическую катастрофу, связанную с применением и депонированием антибиотиков и продуктов их деградации, необходимо разрабатывать методы индикации данных соединений, в первую очередь, в водных ресурсах.

В связи с вышесказанным данная работа велась в 2х направлениях:

- развитие акустической сенсорной системы для определения антибиотиков и оценки их антибактериальной активности в жидкой фазе без иммобилизации компонентов анализа;

- получение антител, специфичных к антибиотикам (ампициллину) с помощью технологии фагового дисплея и демонстрация перспективности их применения для определения антибактериальных препаратов.

Микроорганизмы, проявляющие чувствительность к определяемому антибиотику, в комплексе с электрофизическим датчиком, могут представлять собой простые, чувствительные и быстродействующие сенсоры. В работе представлена, микробная сенсорная система на основе акустических датчиков для определения антибиотиков. Принцип действия таких датчиков основан на регистрации биоспецифических реакций в жидкой суспензии, контактирующей с поверхностью пьезоэлектрического звукопровода, по которому распространяется пьезоактивная акустическая волна. В качестве чувствительного элемента датчика использовали микробные клетки, обладающие чувствительностью к определяемому антибиотику. Минимальный предел определения канамицина и хлорамфеникола в водной фазе составляет 1.0 и 0.5 мкг/мл, соответственно. Аналитическим сигналом служило изменение регистрируемого сигнала датчика после воздействия антибиотика на бактерии. Установлена корреляция экспериментальных данных, полученных с помощью акустического датчика с результатами, полученными с помощью световой фазово-контрастной микроскопии и стандартного микробиологического анализа. Представленный способ демонстрирует стабильность, воспроизводимость и повторяемость результатов. Преимуществами данного подхода являются возможность проведения анализа в течение короткого промежутка времени непосредственно в жидкости и многократность использования датчика без снижения чувствительности сенсорной системы.

Предложен новый подход для оценки чувствительности микробных клеток к антибиотикам на примере канамицина с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем с диапазоном рабочих частот 6 – 7 МГц. В качестве аналитического сигнала рекомендовано использовать изменение регистрируемого сигнала датчика на любой частоте вблизи резонанса.

Таким образом, использование акустических датчиков позволило показать перспективность акустической сенсорной системы на основе резонатора с поперечным электрическим полем и компактного акустического анализатора на основе резонатора с поперечным электрическим полем для определения антибиотиков (канамицина и хлорамфеникола) в водных растворах. Представленные сенсорные системы для обнаружения антибиотиков представляют уникальную альтернативу традиционным диагностическим тестам и могут быть адаптированы для других групп антибактериальных препаратов.

С применением овечьей дисплейной библиотеки фрагментов scFv (Griffin.1, UK) получены антитела, специфичные к ампициллину. В качестве тест-системы для определения ампициллина предложен метод дот-иммуноанализа с использованием вторичного биоспецифического мечения (ампициллин/фаговые антитела/конъюгаты кроличьих антифаговых антител с различными метками). Методом дот-иммуноанализа при биоспецифическом взаимодействии отобранных фаговых антител проведено определение ампициллина в водных растворах. Установлено, что антиампициллиновые фаговые антитела обладают специфичностью в отношении ампициллина и не взаимодействуют с другими антибиотиками тетрациклином и канамицином, а также с близкими по химической формуле с ампициллином веществами – L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином. Показано, что метод твердофазного дот-иммуноанализа с визуальным учетом результатов позволяет определять минимальную концентрацию ампициллина 1 мкг/мл. Антиампициллиновые фаговые антитела могут быть использованы в качестве распознающего компонента при определении ампициллина в водных растворах.

Результаты проведенных исследований подтвердили возможность развития новых подходов для определения антибиотиков, большую их значимость, перспективность применения в микробиологии и биотехнологии. По результатам исследований можно сделать следующие выводы:

1. Акустическая микробная тест-система на основе резонатора с поперечным электрическим полем позволяет проводить анализ канамицина и хлорамфеникола

в водных растворах в режиме реального времени. При этом нижний предел детекции составляет 1.0 мкг/мл и 0.5 мкг/мл, соответственно.

2. Предложен новый подход для оценки чувствительности микробных клеток к антибиотикам на примере канамицина с помощью сенсорной системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем с диапазоном рабочих частот 6 – 7 МГц.

3. Применение технологии фагового дисплея позволило получить антитела, специфичные к ампициллину. Впервые показана возможность использования фаговых антител для определения ампициллина методом дот-иммуноанализа.

4. Показано, что антиампициллиновые фаговые антитела обладают специфичностью в отношении ампициллина и не взаимодействуют с тетрациклином, канамицином, L-фенилаланином, L-триптофаном и L-цистеином.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Проведенные исследования позволили установить, что акустические сенсорные системы на основе пьезоэлектрического резонатора с поперечным электрическим полем и компактный акустический анализатор на основе резонатора с поперечным электрическим полем могут быть использованы для определения антибиотиков в водных растворах. Данные исследования играют важную роль для дальнейшего развития микробных сенсорных систем на основе акустических датчиков для определения антибиотиков. В работе показана возможность проведения анализа антибактериальных препаратов (канамицина и хлорамфеникола) в водных растворах с повышенной проводимостью среды измерения. В перспективе исследования будут направлены на апробацию и оптимизацию проведения анализа антибиотиков других групп, а также в условиях, приближенных к реальным образцам и в реальных образцах.

Антиампициллиновые антитела, полученные с помощью технологии фагового дисплея, открывают большие перспективы для их дальнейшего применения при определении антибиотиков. Отработанная технология может служить основой для наработки антител, специфичных к другим группам антибиотиков. В дальнейшем антиампициллиновые фаговые антитела могут быть использованы в качестве распознающего компонента при определении ампициллина в водных растворах.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Аг – антиген

АМВ – антимикробной восприимчивости

Ат – антитела

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИС – иммуносенсоры

ИФА – иммуноферментный анализ

МИП – молекулярно-импринтированные полимеры

НЗ – наночастицы золота

ПАВ – поверхностные акустические волны

ППР – поверхностный плазмонный резонанс

ПМО – полимеры с молекулярными отпечатками

УФ – ультрафиолетовый

ЭО – электрооптический

SELEX – (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бородина, И.А. Определение микробных клеток при их взаимодействии с фаговыми мини-антителами акустическим датчиком на основе резонатора с поперечным электрическим полем из пьезокерамики ЦТС-19 / И.А. Бородина, Б.Д. Зайцев, А. А. Теплых и др. // Известия РАН. Сер. физ. – 2021. – Т. 85, №6. – С. 771–776 (Izvestia RAN. Seriya Fizicheskaya).
2. Будников, Г.К. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине / Г.К. Будников, Г.А. Евтюгин, В.Н. Майстренко. - Москва: Лаборатория знаний, 2020. – 419 с. - ISBN 978-5-00101-723-3. - URL: <https://rucont.ru/efd/443554> (дата обращения: 28.12.2023).
3. Гулий, О.И. Акустическая сенсорная система для определения бактерий в водной среде / О.И. Гулий, Б.Д. Зайцев, О.А. Караваева и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56, №5. – С. 514–520.
4. Гулий, О.И. Фаговые антитела как биорецепторы для определения ампициллина / О.И. Гулий, А.К.М. Алсовэйди, А.С. Фомин и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58, №5. – С. 513–519.
5. Ермолаева, Т.Н. Микро- и наночастицы полимеров с молекулярными отпечатками - синтез, характеристика и применение в пьезокварцевых сенсорах / Т.Н. Ермолаева, В.Н. Чернышова, О.И. Бессонов // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2015. – В. 15(3). – С. 345-365.
6. Кулапина, Е.Г. Современные методы определения антибиотиков в биологических и лекарственных средах (обзор) / Е.Г. Кулапина, О.В. Барина, О.И. Кулапина и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 2009. - Т. 54, №9-10. – С. 53-60.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для биол. спец. вузов. / Г.Ф. Лакин – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
8. Сухорукова, М.В. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам: что стоит за результатом / М.В. Сухорукова // Клиническая

- микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. - Т. 15, №3. – С. 219–229.
9. Тикунова, Н.В. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител / Н. В. Тикунова, В.В. Морозова // *Acta Naturae* (русскоязычная версия). – 2009. – V. 1(3). – P. 22–31.
 10. Чарыков А.К. Математическая обработка результатов химического анализа / А.К. Чарыков. – Ленинград: Химия, 1984. – 168 с.
 11. Abu-Shandi K.H. Determination of vancomycin in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection / K.H. Abu-Shandi // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2009. – V. 395 (2). – P. 527–532.
 12. Al-Ameri, S.A.H. Differential pulse polarographic study of amoxicillin and ciprofloxacin and its determination in pharmaceuticals / S.A.H. Al-Ameri, N.M.H. Al-Waeli // *International Journal of BioAnalytical Methods & BioEquivalence Studies*. – 2016. – V. 3(1). – P. 47–54.
 13. Al-Momani, I.F. Flow-injection spectrophotometric determination of amoxicillin, cephalixin, ampicillin, and cephadrine in pharmaceutical formulations / I.F. Al-Momani // *Analytical Letters*. – 2004. – V. 37 (10). – P. 2099–2110.
 14. Antibiotic Resistance Protocols: Second Edition / S.H. Gillespie, T.D. McHugh (eds.), *Methods in Molecular Biology*. – V. 642. – Springer Science+Business Media. – LLC. - 2010.
 15. Auletta, S. Imaging bacteria with radiolabelled quinolones, cephalosporins and siderophores for imaging infection: a systematic review / S. Auletta, F. Galli, C. Lauri et al. // *Clinical and Translational Imaging*. – 2016. – V. 4 (4). - P. 229–252.
 16. Babington, R. Current bioanalytical methods for detection of penicillins / R. Babington, S. Matas, M.-P. Marco et al. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – V. 403. – P. 1549–1556.

17. Beatty, J.D. Measurement of monoclonal antibody affinity by non-competitive enzyme immunoassay / J.D. Beatty, B.G. Beatty, W.G. Vlahos // *Journal of Immunological Methods*. – 1987. – V. 100. – P. 173–179.
18. Beltran, M.C. Performance of current microbial tests for screening antibiotics in sheep and goat milk / M.C. Beltran, M.I. Berruga, A. Molina et al. // *International Dairy Journal*. – 2015. – V. 41. – 13-15.
19. Berlina, A.N. Complexes of gold nanoparticles with antibodies in immunochromatography: comparison of direct and indirect immobilization of antibodies for the detection of antibiotics / A.N. Berlina, A.V. Bartosh, D.V. Sotnikov et al. // *Nanotechnologies in Russia*. – 2018. – V. 13 (7-8). – P. 430–438.
20. Carone, B.R. High incidence of multiple antibiotic resistant cells in cultures of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 / B.R. Carone, T. Xu, K.C. Murphy et al. // *Mutation Research*. – 2014. – V. 759. – P. 1-8.
21. Charlton, K.A. Analysis of the diversity of a sheep antibody repertoire as revealed from a bacteriophage display library / K.A. Charlton, S. Moyle, A.J. Porter et al. // *The Journal of Immunology*. – 2000. – V. 164. – P. 6221–6229.
22. Cháfer-Pericás, C. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples / C. Cháfer-Pericás, Á. Maquieira, R. Puchades // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2010. – V. 29 (9). – P. 1038–1049.
23. Chassagne, S. A high-affinity macaque antibody Fab with human-like framework regions obtained from a small phage display immune library / S. Chassagne, E. Laffly, E. Drouet et al. // *Molecular Immunology*. – 2004. – V. 41. – P. 539–446.
24. Chen, H.-f. Surface plasmon resonance biotechnology for antimicrobial susceptibility test / H.-f. Chen, C.-H. Lin, C.-Y. Su et al. / Chapter 21 in *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity: InTech, China*. - 2010. - P. 453–468.
25. Conteduca, D. Monitoring of individual bacteria using electro-phonic traps / D. Conteduca, G. Brunetti, F. Dell’Olio et al. // *Biomedical Optics Express*. – 2019. – V. 10(7). – P. 3463–3471.

26. Conzuelo, F. Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk / F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano et al. // *Analytica Chimica Acta*. – 2012. – V. 737. – P. 29–36.
27. Das, S. Microbial based assay for specific detection of β -lactam group of antibiotics in milk / S. Das, N. Kumar, R.H. Vishweswaraiah et al. // *Journal of Food Science and Technology*. – 2014. – V. 51. – P. 1161-1166.
28. Deisingh, A. Biosensors for microbial detection / A. Deisingh // *Microbiologist*. – 2003. – V. 2. – P. 30-33.
29. Deroco, P.B. A new and simple method for the simultaneous determination of amoxicillin and nimesulide using carbon black within a dihexadecylphosphate film as electrochemical sensor / P.B. Deroco, R.C. Rocha-Filho, O. Fatibello-Filho // *Talanta*. – 2018. – V. 179. – P. 115–123.
30. Drug resistance in microorganisms [DNLM: 1. Microbial Sensitivity Tests – methods – Laboratory Manuals. 2. Anti-Bacterial Agents – pharmacology – Laboratory Manuals. 3. Drug Resistance, Bacterial – Laboratory Manuals. / I. Cavalieri, J. Stephen II. American Society for Microbiology. - Handbooks, manuals, etc. – 2005. – QW 25.5 M6 M2945.
31. Dumont, E. Antibiotics and efflux: combined spectrofluorimetry and mass spectrometry to evaluate the involvement of concentration and efflux activity in antibiotic intracellular accumulation / E. Dumont, J. Vergalli, L. Conraux et al. // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2019. – V. 74(1). – P. 58-65.
32. Durante-Mangoni, E. Do we still need the aminoglycosides? / E. Durante-Mangoni, A. Grammatikos, R. Utili et al. // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2009. – V. 33(3). – P. 201–205.
33. Durmuşa, G.N. Acoustic-Based Biosensors / G.N. Durmuşa, R.L. Linb, M. Kozbergc et al. // *Encyclopedia of microfluidics and nanofluidics*. Springer Science+Business Media New York. – 2014. – P. 1-15.
34. Dykman, L.A. Preparation of miniantibodies to *Azospirillum brasilense* Sp245 surface antigens and their use for bacterial detection / L.A. Dykman, S.A.

- Staroverov, O.I. Guliy et al. // *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. – 2012. – V. 33(2). – P. 115-127.
35. Elragehy, N.A. Stability-indicating determination of meropenem in presence of its degradation product / N.A. Elragehy, E.M. Abdel-Moety, N.Y. Hassan et al. // *Talanta*. – 2008. – V. 77(1). – P. 28-36.
36. El Walily, A.F.M. Use of cerium (IV) in the spectrophotometric and spectrofluorimetric determinations of penicillins and cephalosporins in their pharmaceutical preparations / A.F.M. El Walily, A.A.K. Gazy, S.F. Belal et al. // *Spectroscopy Letters*. – 2000. – V. 33(6). – P. 931–948.
37. Erickson, D. Nanoscale optofluidic devices for biomolecular detection / D. Erickson, S. Mandal, A. Yang et al. // *Microfluidics and Nanofluidics*. – 2008. – V. 4. – P. 33-52.
38. Ermolaeva, T.N. A piezoelectric sensor based on nanoparticles of ractopamine molecularly imprinted polymers / T.N. Ermolaeva, O.V. Farafonova, V.N. Chernyshova et al. // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2020. – V. 75(10). – P. 1270–1277.
39. Evtugyn, G. *Biosensors. Essentials* / G. Evtugyn. Springer. - 2013. - 265 p.
40. Famulok, M. Aptamer modules as sensors and detectors / M. Famulok, G. Mayer // *Accounts of Chemical Research*. – 2011. – V. 44 (12). – P. 1349–1358.
41. Fan, X. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review / X. Fan, I.M. White, S.I. Shopoua et al. // *Analytica Chimica Acta*. – 2008. – V. 620 (1-2). – P. 8-26.
42. Feng, X. A novel "dual-potential" electrochemiluminescence aptasensor array using CdS quantum dots and luminol-gold nanoparticles as labels for simultaneous detection of malachite green and chloramphenicol / X. Feng, N. Gan, H. Zhang et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – V. 74. – P. 587-593.
43. Fernandez, F. A label-free and portable multichannel surface plasmon resonance immunosensor for on site analysis of antibiotics in milk samples / F. Fernandez,

- K. Hegnerova, M. Piliarik et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2010. – V. 26 (4). – P. 1231–1238.
44. Fernandez, F. Portable surface plasmon resonance immunosensor for the detection of fluoroquinolone antibiotic residues in milk / F. Fernandez, D.G. Pinacho, F. Sanchez-Baeza et al. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2011. – V. 59 (9). – P. 5036–5043.
45. Ferrini, A.M. Detection and identification of β -lactam residues in milk using a hybrid biosensor / A.M. Ferrini, V. Mannoni, G. Carpico et al. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2008. – V. 56. – P. 784-788.
46. Frasconi, M. Surface plasmon resonance analysis of antibiotics using imprinted boronic acid-functionalized Au nanoparticle composites / M. Frasconi, R. Tel-Vered, M. Riskin et al. // *Analytical Chemistry*. – 2010. – V. 82(6). – P. 2512–2519.
47. Frens, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions / G. Frens // *Nature Physical Science*. – 1973. – V. 241. – P. 20–22.
48. Galatus, R. SPR based hybrid electro-optic biosensor for β -lactam antibiotics determination in water / R. Galatus, B. Feier, C. Cristea et al. // *Proceedings of the SPIE: Remote sensing and modeling of ecosystems for sustainability XIV*. – 2017. - Volume 10405. - 6 p.
49. Garcia-Aljaro, C. Surface plasmon resonance assay for real-time monitoring of somatic coliphages in wastewaters / C. Garcia-Aljaro, X. Munoz-Berbel, A.T.A. Jenkins et al. // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2008. – V. 74(13). – P. 4054 - 4058.
50. Gazzaz, S.S. Application of immunochemical assays to food analysis / S.S. Gazzaz, B.A. Rasco, F.M. Dong // *Critical Reviews In Food Science and Nutrition*. – 1992. – V. 32. – P. 197–229.
51. Gfeller, K.Y. Rapid biosensor for detection of antibioticselective growth of *Escherichia coli* / K.Y. Gfeller, N. Nugaeva, M. Hegne // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2005. – V. 71 (5). – P. 2626-2631.

52. Griep, R.A. Development of specific recombinant monoclonal antibodies against the lipopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* race 3 / R.A. Griep, C. van Twisk, J.R. van Beckhoven et al. // *Phytopathology*. – 1998. – V. 88. – P. 795–803.
53. Gruhl, F.J. Surface acoustic wave (SAW) biosensor for rapid and label-free detection of penicillin G in milk / F.J. Gruhl, K. Länge // *Food Analytical Methods*. – 2014. – V. 7. – P. 430-437.
54. Guliy, O.I. Obtaining phage mini-antibodies and using them for detection of microbial cells with an electroacoustic sensor / O.I. Guliy, B.D. Zaitsev, I.E. Kuznetsova et al. // *Biophysics*. – 2012. – V. 57 (3). – P. 336–342.
55. Guliy, O.I. Electro-optical assays for immunoindication of microbial cells / O.I. Guliy, V.D. Bunin, V.I. Korzhenevich, O.V. Ignatov // *Current Immunology Reviews*. – 2017. – V. 13 (2). – P. 153–162.
56. Guliy, O.I. Electro-acoustic sensor for the real-time identification of the bacteriophages / O.I. Guliy, B.D. Zaitsev, I.A. Borodina et al. // *Talanta*. – 2018. – V. 178. – P. 743–750.
57. Guliy, O.I. Sensor for ampicillin based on a microwave electrodynamic resonator / O.I. Guliy, B.D. Zaitsev, A.V. Smirnov et al. // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2019a. – V. 130 (3). – P. 95–102.
58. Guliy, O.I. Use of an electro-optical sensor and phage antibodies for immunodetection of *Herbaspirillum* / O.I. Guliy, N.S. Velichko, Yu.P. Fedonenko et al. // *Talanta*. – 2019b. – V. 202. – P. 362–368.
59. Guliy, O.I. New approach for determination of antimicrobial susceptibility to antibiotics by an acoustic sensor / O.I. Guliy, B.D. Zaitsev, I.A. Borodina // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020a. – V. 104(3). – P. 1283–1290.
60. Guliy, O.I. Prospects for the use of gold nanoparticles to increase the sensitivity of an acoustic sensor in the detection of microbial cells / O.I. Guliy, B.D. Zaitsev, G.L. Burygin et al. // *Ultrasound in Medicine & Biology*. – 2020b. – V. 46(7). – P. 1727–1737.

61. Gulyi, O.I. Electro-optical analysis as sensing system for detection and diagnostics of bacterial cells / O.I. Gulyi, Bunin V.D. // in *Biointerface engineering: Prospects in medical diagnostics and drug delivery*, Springer Nature Singapore Pte Ltd. – 2020. – P. 233–254. – URL: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-4790-4_11.
62. Gulyi, O.I. Antibiotics and analytical methods used for their determination / O.I. Gulyi, B.D. Zaitsev, I.A. Borodina // in *Nanobioanalytical approaches to medical diagnostics*. Elsevier Ltd. Woodhead Publishing. Eds: Pawan Maurya, Pranjali Chandra. – 2022a. – Chapter 5. – P. 143–177 – doi: 10.1016/B978-0-323-85147-3.00004-9.
63. Gulyi, O.I. Prospects of acoustic sensor systems for antibiotic detection / O.I. Gulyi, B.D. Zaitsev, A.V. Smirnov et al. // *Biosensors and Bioelectronics: X*. – 2022b. – V. 2. – P. 100274.
64. Gulyi, O.I. Microbial acoustic sensor test-system based on a piezoelectric resonator with a lateral electric field for kanamycin detection in liquid / O.I. Gulyi, B.D. Zaitsev, A.P. Semyonov et al. // *Ultrasonics*. – 2022b. – V. 120. – P. 106651.
65. Hanekamp, J.C. Antibiotics exposure and health risks: Chloramphenicol / J.C. Hanekamp, A. Bast // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2015. – V. 39(1). – P. 213-220.
66. Hanko, V.P. Determination of sulfur-containing antibiotics using high-performance liquid chromatography with integrated pulsed amperometric detection / V.P. Hanko, R.L. Williams, C.O. Dasenbrock et al. // *Drug Development Research*. – 2001. – V. 53(4). – P. 268-280.
67. Hanko, V.P. Determination of neomycin sulfate and impurities using high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection / V.P. Hanko, J.S. Rohrer // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2007. – V. 43(1). – P. 131–141.
68. Hendrickson, O.D. Development of a multicomponent immunochromatographic test system for the detection of fluoroquinolone and amphenicol antibiotics in

- dairy products / O.D. Hendrickson, E.A. Zvereva, I.A. Shanin et al. // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2019. – V. 99(8). – P. 3834-3842.
- 69.Hu, Y. Imprinted sol-gel electrochemical sensor for the determination of benzylpenicillin based on Fe₃O₄@SiO₂/multi-walled carbon nanotubes-chitosans nanocomposite film modified carbon electrode / Y. Hu, J. Li, Z. Zhang et al. // *Analytica Chimica Acta*. – 2011. – V. 698 (1-2). – P. 61-68.
- 70.Islam, R. Electrochemical approaches and advances towards the detection of drug resistance (Review) / R. Islam, H.T.L. Luu, S. Kuss // *Journal of The Electrochemical Society*. – 2020. – V. 167 (4). – P. 045501.
- 71.Jacobsson, K. Shotgun phage display - selection for bacterial receptors or other exported proteins / K. Jacobsson, A. Rosander, J. Bjerketorp et al. // *Biological procedures online*. – 2003. – V. 5. – P. 123-125.
- 72.Jiang, M. Aminoglycoside-induced cochleotoxicity: A Review / M. Jiang, T. Karasawa, P.S. Steyger // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2017. – V. 11. – P. 308.
- 73.Johnson, W.L. Sensing bacterial vibrations and early response to antibiotics with phase noise of a resonant crystal / W.L. Johnson, D.C. France, N.S. Rentz et al. // *Scientific Reports*. - 2017. – V. 7. – P. 12138.
- 74.Jung, J.S. Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes / J.S. Jung, T. Eberl, K. Sparbier et al. // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2014. – V. 33 (6). – P. 949–955.
- 75.Kantiani, L. Fully automated analysis of β -lactams in bovine milk by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry / L. Kantiani, M. Farré, M. Sibum et al. // *Analytical Chemistry*. – 2009. – V. 81. – P. 4285-4295.
- 76.Karaseva, N.A. A piezoelectric immunosensor for chloramphenicol detection in food / N.A. Karaseva, T.N. Ermolaeva // *Talanta*. – 2012. – V. 93. – P. 44-48.
- 77.Klein, E.Y. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015 / E.Y. Klein, T.P. Van Boeckel, E.M.

- Martinez et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – V. 115 (15). – P. E3463-E3470.
- 78.Kohler, G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Kohler, C. Milstein // Nature. - 1975. - V. 256. - P. 495-497.
- 79.Kriebel, D. The precautionary principle in environmental science / D. Kriebel, J. Tickner, P. Epstein et al. // Environmental Health Perspectives. – 2001. – V. 109 (9). – P. 871-876.
- 80.Kulapina, E.G. Modern methods of antibiotic determination in biological samples and drugs (Review) / E.G. Kulapina, O.V. Barinova, O.I. Kulapina et al. // Antibiotiki i khimioterapiia = Antibiotics and chemotherapy [sic]. – 2009. – V. 54(9). – P. 53-60.
- 81.Leca-Bouvier, B. Enzyme for biosensing application / B. Leca-Bouvier, L. Blum in Recognition receptors in biosensors: Springer. New York, - 2010. – P. 177–220.
- 82.Leung, K.-H. An oligonucleotide-based switch-on luminescent probe for the detection of kanamycin in aqueous solution / K.-H. Leung, H.-Z. He, D.S.-H. Chan et al. Sensors and Actuators B Chemical. – 2013. – V. 177. – P. 487-492.
- 83.Li, J. Occurrence of chloramphenicol-resistance genes as environmental pollutants from swine feedlots / J. Li, B. Shao, J. She et al. // Environmental Science & Technology. – 2013. – V. 47. – P. 2892–2897.
- 84.Lian, W. Electrochemical sensor based on gold nanoparticles fabricated molecularly imprinted polymer film at chitosan-platinum nanoparticles/graphene-gold nanoparticles double nanocomposites modified electrode for detection of erythromycin / W. Lian, , S. Liu, J. Yu et al. // Biosensors and Bioelectronics. – 2012. – V. 38. – P. 163-169.
- 85.Liu, B. Au(III)-promoted magnetic molecularly imprinted polymer nanospheres for electrochemical determination of streptomycin residues in food / B. Liu, D. Tang, B. Zhang et al. // Biosensors and Bioelectronics. – 2013. – V. 41. – P. 551-556.

- 86.Liu, Z. Ni(OH)₂ nanoarrays based molecularly imprinted polymer electrochemical sensor for sensitive detection of sulfapyridine / Z. Liu, Y. Zhang, J. Feng et al. // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2019. – V. 287. – P. 551-556.
- 87.Long, F. Imprinted electrochemical sensor based on magnetic multi-walled carbon nanotube for sensitive determination of kanamycin / F. Long, Z. Zhang, Z. Yang et al. // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2015. – V. 755. – P. 7-14.
- 88.Lu, M.Y. A smartphone-based whole-cell array sensor for detection of antibiotics in milk / M.Y. Lu, W.C. Kao, S. Belkin et al. // *Sensors*. – 2019. – V. 19(18). – P. 3882.
- 89.Luo, Q. Surface plasmon resonance sensor for antibiotics detection based on photo-initiated polymerization molecularly imprinted array / Q. Luo, N. Yu, C. Shi et al. // *Talanta*. – 2016. – V. 161. – P. 797-803.
- 90.Mattoes, H.M. Optimizing antimicrobial pharmacodynamics: dosage strategies for meropenem / H.M. Mattoes, J.L. Kuti, G.L. Drusano et al. // *Clinical Therapeutics*. – 2004. – V. 26(8). – P. 1187–1198.
- 91.Maximum Residue Limits (MRLs) and the Safety of Food from Animals, 2014. Он-лайн ресурс: <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory-overview/research-and-development-veterinary-medicines/maximum-residue-limits-mrl>.
- 92.McCafferty, J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains / J. McCafferty // *Nature*. - 1990. - V. 348. - P. 552–554.
- 93.Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. EUCAST Definitive document // *Clin Microbiol Infect*. – 1998. – V.4. – P. 291– 296.
- 94.More, S.J. European perspectives on efforts to reduce antimicrobial usage in food animal production. // *Ir Vet J*. – 2020. – 73– 2. doi: 10.1186/s13620-019-0154-4..
- 95.Moreira, F. Novel sensory surface for creatine kinase electrochemical detection / F. Moreira, R. Dutra, J. Noronha et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – V. 56. – P. 217-222.

96. Mungroo, N.A. Biosensors for the detection of antibiotics in poultry industry – a review / N.A. Mungroo, S. Neethirajan // *Biosensors*. – 2014. – V. 4. – P. 472–493.
97. Munteanu, F.-D. Detection of antibiotics and evaluation of antibacterial activity with screen-printed electrodes / F.-D. Munteanu, A.M. Titoiu, J.-L. Marty et al. // *Sensors*. – 2018. – V. 18 (3). – P. 901.
98. Muramatsu, H. Quartz-crystal gelation detector for the determination of fibrinogen concentration / H. Muramatsu, E. Tamiya, M. Suzuki et al. // *Analytica Chimica Acta*. – 1989. – V. 217. – P. 321–326.
99. Nanduri, V. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption / V. Nanduri, I.B. Sorokulova, A.M. Samoylov et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2007. – V. 22. – P. 986–992.
100. Narang, R. Sensitive, real-time and non-intrusive detection of concentration and growth of pathogenic bacteria using microfluidic-microwave ring resonator biosensor / R. Narang, S. Mohammadi, M. Mohammadi Ashani et al. // *Scientific Reports*. – 2018. – V. 8(1). – P. 15807.
101. Nemetlu, E. Simultaneous multiresponse optimization of an HPLC method to separate seven cephalosporins in plasma and amniotic fluid: application to validation and quantification of cefepime, cefixime and cefoperazone / E. Nemetlu, S. Kir, D. Katlan et al. // *Talanta*. – 2009. – V. 80(1). – P. 117–126.
102. Nguyen, X.H. Isolation of phage-display library-derived scFv antibody specific to *Listeria monocytogenes* by a novel immobilized method / X.H. Nguyen, T.L. Trinh, T.B. Vu // *Journal of Applied Microbiology*. – 2018. – V. 124 (2). – P. 591–597.
103. Ni, H. Determination of enrofloxacin in bovine milk by a novel single-stranded DNA aptamer chemiluminescent enzyme immunoassay / H. Ni, S. Zhang, X. Ding et al. // *Analytical Letters*. – 2014. – V. 47 (17). – P. 2844–2856.
104. Oong, G.C., Chloramphenicol / G.C. Oong, P. Tadi // *StatPearls*. – 2022. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555966>.

105. Paoli, G.C. Single-chain Fv antibody with specificity for *Listeria monocytogenes* / G.C. Paoli, C.Y. Chen, J.D. Brewster // Journal of Immunological Methods. – 2004. – V. 289 (1-2). – P. 147-155.
106. Pellegrini, G.E. Electrochemical sensor for the detection and presumptive identification of quinolone and tetracycline residues in milk / G.E. Pellegrini, G. Carpico, E. Coni // Analytica chimica acta. – 2004. – V. 520. – P. 13-18.
107. Pires de Abreu, L.R. HPLC determination of amoxicillin comparative bioavailability in healthy volunteers after a single dose administration / L.R. Pires de Abreu, R.M. Ortiz, S.C. de Castro et al. // Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2003. – V. 6(2). – P. 223–230.
108. Pujol-Vila, F. Nanomechanical sensors as a tool for bacteria detection and antibiotic susceptibility testing (Review) / F. Pujol-Vila, R. Villa, M. Alvarez // Frontiers in Mechanical Engineering. – 2020. – V. 6 (44). – P. 1-18.
109. Purohit, B. Biosensor nanoengineering: design, operation, and implementation for biomolecular analysis / B. Purohit, P.R. Vernekar, N.P. Shetti et al. // Sensors International. – 2020. – V. 1. – P. 100040.
110. Raksawong, P. A polypyrrole doped with fluorescent CdTe quantum dots and incorporated into molecularly imprinted silica for fluorometric determination of ampicillin / P. Raksawong, P. Nurerk, K. Chullasat et al. // Microchimica Acta. – 2019. – V. 186 (6). – P. 338.
111. Reder-Christ, K. Biosensor applications in the field of antibiotic research - a review of recent developments / K. Reder-Christ, G. Bendas // Sensors. – 2011. – V. 11 (10). – P. 9450–9466.
112. Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators / A.C. Singer, H. Shaw, V. Rhodes et al. // Frontiers in Microbiology. – 2016. – V. 7. – P. 1728.
113. Riediker, S. Analysis of β -lactam antibiotics in incurred raw milk by rapid test methods and liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry/ S. Riediker, J.-M. Diserens, R.H. Stadler // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2001. – V. 49 (9). – P. 4171–4176.

114. Robertson, J. Optimisation of the protocol for the LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit for rapid determination of bacterial load / J. Robertson, C. McGoverin, F. Vanholsbeeck et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – V. 10. – P. 801.
115. Rocha-Gaso, M.I. Surface generated acoustic wave biosensors for the detection of pathogens: A Review / M.I. Rocha-Gaso, C. March-Iborra, A. Montoya-Baides et al. // *Sensors*. – 2009. – V. 9. – P. 5740–5769.
116. Rote, A.R. Reverse phase-HPLC and HPTLC methods for determination of gemifloxacin mesylate in human plasma / A.R. Rote, S.P. Pingle // *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. – 2009. – V. 877 (29). – P. 3719–3723.
117. Saeed, A. Current advances in immunoassays for the detection of antibiotics residues: a review / A. Saeed, N. Jianan, P. Dapeng et al. // *Food and Agricultural Immunology*. – 2020. – V. 31(1). – P. 268–290.
118. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018 / European Medicines Agency: Trends from 2010 to 2018. Tenth ESVAC report. – 2020. – 102 p. - ISBN: 978-92-9155-065-4.
119. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020 / European Medicines Agency: Trends from 2010 to 2020. Eleventh ESVAC report. – 2021. – 130 p. - ISBN 978-92-9155-068-5.
120. Salimizand, H. Diversity of aminoglycoside modifying enzymes and 16S rRNA methylases in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* species in Iran; wide distribution of aadA1 and armA / H. Salimizand, A.R. Zomorodi, D. Mansury et al. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2018. – V. 66. – P. 195-199.
121. Samsonova, Z.V. Enzyme-linked immunosorbent assay of ampicillin in milk / Z.V. Samsonova, O.S. Shchelokova, N.L. Ivanova et al.// *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2005. – V. 41(6). – P. 589–595.
122. Santos, A.M. Square-wave adsorptive anodic stripping voltammetric determination of norfloxacin using a glassy carbon electrode modified with

- carbon black and CdTe quantum dots in a chitosan film / A.M. Santos, A. Wong, F.H. Cincotto et al. // *Microchimica Acta*. – 2019. – V. 186(3). – P. 148.
123. Scientific Opinion on Chloramphenicol in food and feed / D. Benford, S. Ceccatelli, B. Cottrill et al. // *EFSA Journal: EFSA CONTAM Panel*. – 2014. – V. 12 (11). – (3907) 146 pp.
124. Sharma, S. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors / S. Sharma, H. Byrne, R.J. O'Kennedy // *Essays in Biochemistry*. – 2016. – V. 60(1). – P. 9-18.
125. Shavit, M. Covalently linked kanamycin-Ciprofloxacin hybrid antibiotics as a tool to fight bacterial resistance / M. Shavit, V. Pokrovskaya, V. Belakhov // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2017. – V. 25. – P. 2917–2925.
126. Shen, X. Fluorescence polarization immunoassay for determination of enrofloxacin in pork liver and chicken / X. Shen, J. Chen, S. Lv et al. // *Molecules*. – 2019. – V. 24 (24). – P. 4462.
127. Shukla, P. Chloramphenicol toxicity: A Review / P. Shukla, F.W. Bansode, R.K. Singh // *Journal of Medicine and Medical Sciences*. – 2011. – V. 2(13). – P. 1313–1316.
128. Smith, G.P. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage / G.P. Smith, J.K. Scott // *Methods in enzymology*. – 1993. – V. 217. – P. 228–257.
129. Smith, G.P. Phage display / G.P. Smith, V.A. Petrenko // *Chemical Reviews*. – 1997. – V. 97. – P. 391-410.
130. Sompunga, P. Generation of human and rabbit recombinant antibodies for the detection of Zearalenone by phage display antibody technology / P. Sompunga, N. Pruksametanan, K. Rangnoi et al. // *Talanta*. – 2019. – V. 15 (201). – P. 397-405.
131. Song, K.-M. A coordination polymer nanobelt (CPNB)-based aptasensor for sulfadimethoxine / K.-M. Song, E. Jeong, W. Jeon et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2012. – V. 33 (1). – P. 113–119.

132. Song, E. Multi-color quantum dot-based fluorescence immunoassay array for simultaneous visual detection of multiple antibiotic residues in milk / E. Song, M. Yu, Y. Wang et al. // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2015. – V. 72. – P. 320–325.
133. Staroverov, S.A. The usage of phage mini-antibodies as a means of detecting ferritin concentration in animal blood serum / S.A. Staroverov, A.A. Volkov, A.S. Fomin et al. // *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. – 2015. – V. 36 (1). – P. 100-110.
134. Staroverov, S.A. Synthesis of silymarin-selenium nanoparticle conjugate and examination of its biological activity in vitro / S.A. Staroverov, S.V. Kozlov, A.S. Fomin et al. // *ADMET&DMPK*. – 2021. – V. 9. – P. 255-266.
135. Stevenson, H.S. Ultrasensitive and rapid-response sensor for the electrochemical detection of antibiotic residues within meat samples / H.S. Stevenson, S.S. Shetty, N.J. Thomas et al. // *ACS Omega*. – 2019. – V. 4 (4). – P. 6324-6330.
136. Suárez, G. Lab-on-a-chip for multiplexed biosensing of residual antibiotics in milk / G. Suárez, Y.-H. Jin, J. Auerswald et al. // *Lab on a Chip*. – 2009. – V. 9 (11). – P. 1625–1630.
137. Surface Plasmon Resonance. Methods and Protocols / N.J. De Mol, M.J.E. Fischer. New Jersey: Humana Press. LLC, 2010. – 296 pp. - ISBN: 978-1-60761-669-6.
138. Taghdisi, S.M. A label-free fluorescent aptasensor for selective and sensitive detection of streptomycin in milk and blood serum / S.M. Taghdisi, N.M. Danesh, M.A. Nameghi et al. // *Food Chemistry*. – 2016. – V. 203. – P. 145–149.
139. Tang, M. Degradation of kanamycin from production wastewater with high-concentration organic matrices by hydrothermal treatment / M. Tang, F. Li, M. Yang et al. // *Journal of Environmental Sciences*. – 2020. – V. 97. – P. 11-18.

140. Timofeeva, S.S. Antibiotics in the environment: status and problems / S.S. Timofeeva, O.S. Gudilova // XXI century Technosphere Safety. – 2021. – V. 6(3). – P. 251–265.
141. Virolainen, N.E. Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria / N.E. Virolainen, M.G. Pikkemaat, J.W.A. Elferink et al. // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2008. – V. 56 (23). – P. 11065-11070.
142. Vrioni, G. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives / G. Vrioni, C. Tsiamis, G. Oikonomidis et al. // Annals of Translational Medicine. – 2018. – V. 6(12). – P. 240.
143. Wang, S. Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney / S. Wang, B. Xu, Y. Zhang et al. // Meat Science. – 2009. – V. 82(1). – P. 53-58.
144. Wang, T. Electrochemical aptasensor for ampicillin detection based on the protective effect of aptamer-antibiotic conjugate towards DpnII and Exo III digestion / T. Wang, H. Yin, Y. Zhang et al. // Talanta. – 2019. – V. 197. – P. 42-48.
145. Wiest, D.B. Chloramphenicol toxicity revisited: a 12-year-old patient with a brain abscess / D.B. Wiest, J.B. Cochran, F.W. Tecklenburg // Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics. – 2012. – V. 17(2). – P. 182–188.
146. Williams, D.D. Species-specific peptide ligands for the detection of *Bacillus anthracis* spores / D.D. Williams, O. Benedek, Jr.C.L. Turnbough // Applied and Environmental Microbiology. – 2003. – V. 69. – P. 6288–6293.
147. Wong, A. Development and application of an electrochemical sensor modified with multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide for the sensitive and selective detection of tetracycline / A. Wong, M. Scontrì, E.M. Materon et al. // Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2015. – V. 757. – P. 250-257.

148. Wong, A. A new electrochemical platform based on low cost nanomaterials for sensitive detection of the amoxicillin antibiotic in different matrices / A. Wong, A.M. Santos, F.H. Cincotto et al. // *Talanta*. – 2020. – V. 206. – P. 120252.
149. Wu, S. Aptamer-based fluorescence biosensor for chloramphenicol determination using upconversion nanoparticles / S. Wu, H. Zhang, Z. Shi et al. // *Food Control*. – 2015. – V. 50. – P. 597-604.
150. Yan, L. A simple and sensitive electrochemical aptasensor for determination of chloramphenicol in honey based on target-induced strand release / L. Yan, C. Luo, W. Mao et al. // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2012. – V. 687. – P. 89-94.
151. Yola, M.L. Development of molecular imprinted nanosensor for determination of tobramycin in pharmaceuticals and foods / M.L. Yola, L. Uzun, N. Özaltın et al. // *Talanta*. – 2014. – V. 120. – P. 318-324.
152. Zaitsev, B.D. New method of parasitic mode suppression in lateral-field-excited piezoelectric resonator / B.D. Zaitsev, I.E. Kuznetsova, A.P. Semyonov et al. // *Technical physics letters*. – 2011. – V. 37. – P. 503–506.
153. Zaitsev, B.D. Liquid sensor based on a piezoelectric lateral electric field-excited resonator / B.D. Zaitsev, A.M. Shikhabudinov, A.A. Teplykh et al. // *Ultrasonics*. – 2015. – V. 63. – P. 179-183.
154. Zaitsev, B. Microbial acoustical analyzer for antibiotic indication / B. Zaitsev, I. Borodina, A. Alsowaidi et al. // *Sensors*. – 2022. – V. 22. – P. 2937.
155. Zhou, L. Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification / L. Zhou, D.-J. Li, L. Gai, et al. // *Sensors and Actuators B Chemical*. – 2012. – V. 162(1). – P. 201–208.