

А.Д. Прийма, И.С. Нестеренко, К.А. Бакай, В.А. Сафронова

Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение
«Всероссийский Государственный Центр Качества и Стандартизации
Лекарственных Средств для Животных и Кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»),
Москва, Россия

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИСЫВОРОТКОВ Д ЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ АНТИБИОТИКОВ ФТОРХИНОЛОНОВОГО РЯДА

Антибиотики фторхинолонового ряда являются синтетическими антибактериальными препаратами, широко использующимися как в медицине, так и в ветеринарии [1]. К ним относятся энрофлоксацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин и другие (рис. 1).

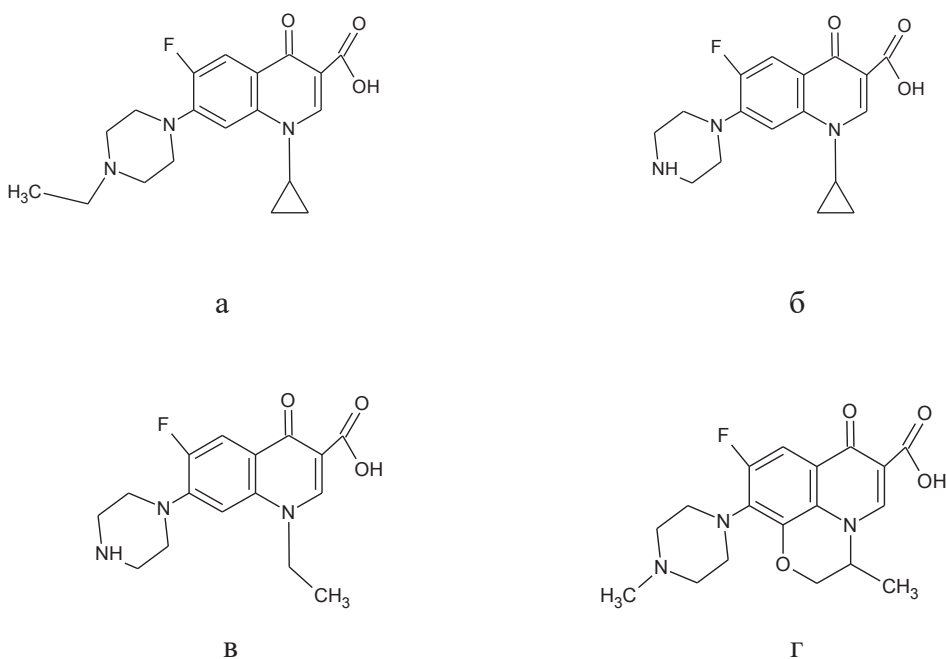


Рисунок 1 – Структурные формулы фторхинолонов: энрофлоксацин (а), ципрофлоксацин (б), норфлоксацин (в), офлоксацин (г).

Значительное увеличение использования антибиотиков для профилактики и лечения инфекционных заболеваний при промышленном разведении крупного и мелкого рогатого скота, свиней, птиц, пчел, а также аквакультур может привести к появлению остаточных количеств этих препаратов в продукции животноводства (молоке, мясе, меде), что способствует формированию антибиотикорезистентно-

сти у микроорганизмов [2]. Это снижает эффективность использования данных препаратов при лечении заболеваний человека. Для контроля использования препаратов фторхинолонового ряда в России и странах европейского союза были установлены максимально допустимые уровни (МДУ) от 10 до 1900 мкг/кг в продукции животноводства [3, 4].

В настоящее время определение содержания остатков фторхинолонов (ФХ) проводится методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим или флуоресцентным детектированием, а также методами на основе капиллярного электрофореза [5, 6]. Данные методы обладают рядом преимуществ: они высокоточные и чувствительные, но требуют длительной подготовки проб и проводятся высококвалифицированными специалистами на дорогостоящем оборудовании. Для анализа большого количества образцов больше подходят скрининговые методы, например, иммунохимические, основанные на взаимодействии антиген-антитело. К таким методам относится иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющий проверить до 40 образцов с минимальной пробоподготовкой за 2-3 часа.

Целью данной работы являлось получение специфических антисывороток для использования их в разработке методики определения остаточного содержания фторхинолов методом ИФА.

Молекула антибиотика имеет низкую молекулярную массу и не обладает иммуногенностью, поэтому для получения сывороток необходимо синтезировать иммунореагенты: конъюгаты антибиотика с белком носителем. Для этого использовали смесь энрофлоксацина, ципрофлоксацина, норфлоксацина и офлоксацина (Σ ФХ), индивидуально энрофлоксацин (ЭНР) и норфлоксацин (НОР), бычий сывороточный альбумин (БСА) и гемоцианин лимфы улитки (ГЛУ), синтез проводился методом активированных эфиров с добавлением дициклогексилкарбодиимида (ДЦК) и 1-(3-диметиламино-пропил)-3-этил карбодиимида (ЭДК). Для получения иммунного ответа полученные конъюгаты смешивали с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ) в физрастворе (ФР) и вводили кроликам породы Шиншила внутривенно в области спины. Характеристики конъюгатов и условия проведения иммунизации представлены в таблице 1.

Полученные антисыворотки были протестированы на чувствительность и специфичность в твердофазном непрямом конкурентном иммуноферментном анализе. Результаты тестирования приведены в таблице 2.

Таким образом, были отобраны сыворотки, позволяющие определять суммарное содержание фторхинолонов с минимальным пределом обнаружения 0,5 мкг/кг, а также выбрана сыворотка, имеющая специфичность только к энрофлоксацину. Предел обнаружения составил 0,1 мкг/кг.

Таблица 1 – Характеристики синтезированных конъюгатов и условия проведения иммунизации

№ п/п	Конъюгат (Гаптен-белок)	Реагенты для проведения реакции	Мольное соотношение гаптен:белок	Адьювант (АД)
1	ΣФХ-ГЛУ	ЭДК	30000:1	ПАФ в ФР АД ($\times 10^{-6}$)
2	ΣФХ-БСА	ЭДК	100:1	ПАФ в ФР
3	ЭНР-БСА	ЭДК	100:1	ПАФ в ФР АД ($\times 10^{-6}$)
4	ΣЭНР-БСА	ДЦК, ЭДК	10:1	ПАФ в ФР
5	НОР-БСА	ДЦК	100:1	ПАФ в ФР АД ($\times 10^{-6}$) корм с АД
6	НОР-БСА	ДЦК	10:1	Тв-Аг

Таблица 2 – Характеристики полученных антисывороток

№ сыворотки	Иммуноген	Тв- АГ в ИФА	IC ₅₀ ЭНР, мкг/л	Коэффициенты перекрестного реагирования с ФХ, %				
				ЭНР	ЦИП	ДАН	НОР	ОФЛО
3/1	ЭНР-БСА (ДЦК+ЭДК)	ЭНР-БСА (ЭДК)	0,3	100	<1	<1	<1	15
50/5	ЭНР-БСА (ЭДК)		20	100	<1			
18/14 16/15	ΣФХ-ГЛУ	НОР-БСА	11 5	100	138	40	91	4,5
33/9	ΣФХ-БСА	НОР-БСА	7	100	86	38	6	6
38/14	НОР-БСА	НОР-БСА	10	100	80	167	29	18

ЛИТЕРАТУРА

1. Lee, H.-B. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography–tandem mass spectrometry/ H.-B. Lee, T. Peart, M.L. Svoboda // *J. Chrom. A.* – 2007. – V. 1139. – P. 45–52.
2. Gosling, R.J. Ciprofloxacin resistance in *E. coli* isolated from turkeys in Great Britain / R.J. Gosling, C.S. Clouting, L.P. Randall, R.A. Horton, R.H. Davies // *Avian Pathol.* – 2012. – V. 41. – P. 83–89.
3. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013).
4. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» (ТР ТС 021/2011).
5. Junza, A. Multiclass method for the determination of quinolones and β -lactams, in raw cow milk using dispersive liquid–liquid microextraction and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / A. Junza, N. Dorival-García, A. Zafra-Gómez, D. Barrón, O. Ballesteros, J. Barbosa, A. Navalón // *J. Chrom. A.* – 2014. – V. 1356. – P. 10-22.
6. Liu, C. Determination of norfloxacin in food by capillary electrophoresis immunoassay with laser-induced fluorescence detector / C. Liu, X. Feng, H. Qian, G. Fang, S. Wang // *Food Anal Methods.* – 2015. – V. 8. – P. 596–603.

УДК 54.062

З.Н. Никифорова, К.А. Диас Хименес,
Д.В. Соколова, В.Д. Гремячева, Ю.С. Орлова, И.С. Нестеренко
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Всероссийский государственный центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)
123022 Москва, Звенигородское шоссе, 5, Россия

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИФЕНОЛОВ В КОРМОВЫХ ДОБАВКАХ

Флавоноиды – самый многочисленный класс природных фенольных соединений, растительного происхождения, мощные естественные антиоксиданты. Они представляют собой полифенолы, структурной основой которых служит флавоновое ядро, содержащее два ароматических кольца, соединенных С3 – мостиком. Флавоноиды можно также рассматривать как производные хромана. В зависимости от