

УДК 543.068.8

В.А. Сафронова, И.С. Нестеренко, А.Д. Прийма, К.А. Бакай
Федеральное Государственное Бюджетное Учреждение «Всероссийский
Государственный Центр Качества и Стандартизации Лекарственных Средств
для Животных и Кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»)
(г. Москва, Россия)

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПЛЕВРОМУТИЛИНОВ В КОРМАХ И КОРМОВЫХ ДОБАВКАХ

Плевромутилины – относительно новый класс антибактериальных препаратов, которые впервые были выделены в 1950 году (продукт базидиомицета *Pleurotus mutilis*) [1]. Основными представителями данного класса являются вальнемулин и тиамулин. Тиамулин применяется в ветеринарии для лечения дизентерии, энзоотической пневмонии, плевропневмонии и микоплазменного артрита, а вальнемулин для профилактики респираторных заболеваний и желудочно-кишечных инфекций, а также для таких заболеваний как дигитальный дерматит, дигитальный пододерматит и дигитальный некробациллез. Данные антибактериальные препараты добавляются непосредственно в корм для животных, что в дальнейшем приводит к повышению вероятности присутствия остаточных количеств данных соединений в органах и тканях животных. В соответствии с законодательством ЕС и России, как процесс производства, так и использование лечебных кормов должны строго отслеживаться и контролироваться для выявления незаконного использования плевромутилинов в кормах и кормовых добавках.

Для тиамулина и вальнемулина действующее законодательство Таможенного союза [2] устанавливает предельно допустимые концентрации содержания в продукции животноводства от 50 до 1000 мкг/кг. В Российской Федерации на данный момент не существует скрининговых методик по определению содержания плевромутилинов в кормах и кормовых добавках для животных. Основным методом для определения плевромутилинов является высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием. С помощью данных методик можно не только количественно определить содержание анализируемого соединения, но и точно установить химическую структуру соединений, присутствующих в образце. Однако для их проведения необходима сложная и длительная пробоподготовка, а также дорогостоящее оборудование. Поэтому для быстрого выявления потенциально несоответствующих образцов необходимо разрабатывать быстрые скрининговые методы. Наиболее

подходящими для этих целей являются иммунохимические методы, основанные на специфическом взаимодействии антиген-антитело.

Для разработки методики определения остаточного количества плевромутилинов за основу метод твердофазного непрямого конкурентного иммуноанализа [3]. Так как плевромутилины являются низкомолекулярными соединениями для создания методики были проведены синтезы конъюгатов вальнемулина с белками-носителями, такими как бычий сывороточный альбумин, овальбумин, гемоцианин лимфы улитки, карбодииимидным методом.

Полученными белковыми конъюгатами была проведена ежемесячная иммунизация кроликов и получены специфические поликлональные сыворотки, из которых в дальнейшем были отобраны наиболее специфичные.

Таблица 1 – Выбор оптимального разведения сыворотки и реагентов для проведения ИФА

Антиген, сорбированный на планшете	Сыворотки	Разведение	IC ₅₀ (ВАЛ), нг/мл
ВАЛ-БСА	Анти-ВАЛ-БСА	1/30000-1/128000	Отсутствует конкурентное связывание
	Анти-ВАЛ-ГЛУ	1/15000-1/45000	0,5-20
ВАЛ-ОВА	Анти-ВАЛ-БСА	1/2000-1/15000	Отсутствует конкурентное связывание
	Анти-ВАЛ-ГЛУ	1/3000-1/10000	100-150
ВАЛ-ГЛУ	Анти-ВАЛ-БСА	1/12000-1/30000	Отсутствует конкурентное связывание
	Анти-ВАЛ-ГЛУ	1/45000-1/150000	Отсутствует конкурентное связывание

В процессе работы были подобраны оптимальные условия постановки реакции: концентрации и условия сорбции иммунохимических реагентов, время проведения анализа, состав буферных растворов. В качестве ферментной метки использовали пероксидазу хрена. Также были рассмотрены различные способы экстракции плевромутилинов из кормов и кормовых добавок. В качестве экстрагирующего агента был выбран ацетонитрил.

В результате проведенной работы была получена калибровочная зависимость оптической плотности от концентрации вальнемулина (Рис.1). Линейный диапазон определения плевромутилинов составил 1– 50 мкг/кг, а предел обнаружения для вальнемулина составил 1

мкг/кг и для тиамулина – 4 мкг/кг. Время проведения ИФА анализа составило около двух часов с учетом пробоподготовки.

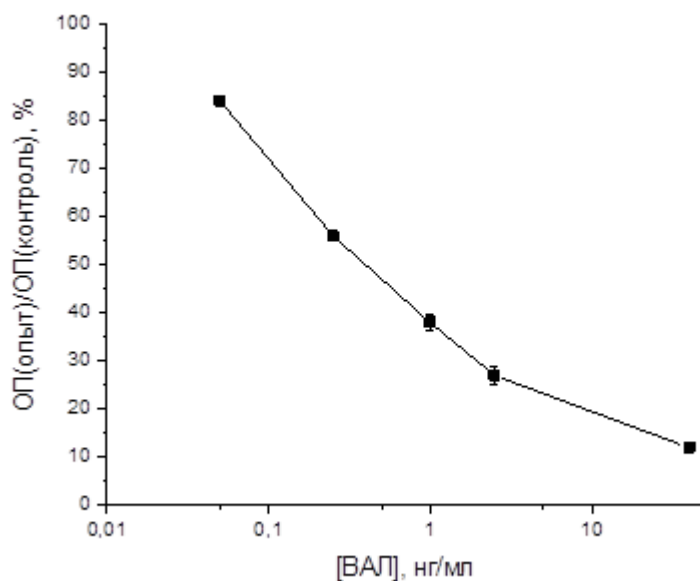


Рисунок 1 – Калибровочная кривая зависимости определения вальнемулина методом иммуноферментного анализа.

В результате проведенной работы был разработан высокочувствительный скрининговый метод определения плевромутилинов методом иммуноферментного анализа. Разработанная методика была апробирована на реальных образцах кормов и кормовых добавок. Было показано, что методика позволяет выявлять остаточные количества вальнемулина и тиамулина в концентрациях согласно установленным нормам, и может стать основой для производства отечественных тест-систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Novak R, Shlaes D.M. The pleuromutilin antibiotics: a new class for human use. // *Curr Opin Investig Drugs*.-2010.- V. 11-№ 2- P. 182-191.
2. Технический регламент таможенного союза ТР ТС 034/2013 «О безопасности мяса и мясной продукции». Утвержден Решением Комиссии Таможенного союза от 9 октября 2013 г. - № 68.
3. Wang Z., Li N., Zhang S., Zhang H., Sheng Y., Shen J. Production of antibodies and development of enzyme-linked immunosorbent assay for valnemulin in porcine liver // *Food Additives & Contaminants: Part A* - 2013- V.30 - № 2– P. 244-252.