



## РАЗРАБОТКА ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНОГО КОЛИЧЕСТВА ПЛЕВРОМУТИЛИНОВ В ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И КОРМАХ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ

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

### Актуальность.

Вальнемулин и тиамулин - полусинтетические аналоги природного дитерпенового антибиотика плевромутилина, продуцируемого грибами *Pleurotus mutilis* (Рис.1).[1] Впервые тиамулин был применен в ветеринарной практике в 1979 году, а вальнемулин - в 1999. Плевромутилины применяют для лечения заболеваний, вызванных инфекциями *Mycoplasma* у домашней птицы (*Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, and *Mycoplasma meleagridis*), дизентерии (*Brachyspira hyodysenteriae*), колитов (*Brachyspira pilosicoli*), и илеита (*Lawsonia intracellularis*) у свиней и эпизоотической энтеропатии у кроликов. Действующее законодательство Таможенного союза [2] устанавливает следующие предельно допустимые концентрации содержания тиамулина в продукции животноводства: не более 0,1 мг/кг в мышечной ткани свиней и кроликов; не более 0,5 мг/кг в печени свиней и кроликов. Предельно допустимые концентрации содержания вальнемулина установлены только для продуктов свиноводства и составляют: 0,05 мг/кг для мышечной ткани; 0,1 мг/кг для почек; 0,5 мг/кг для печени.

На сегодняшний день в Российской Федерации не существует скрининговых методик по определению содержания массовой доли плевромутилинов ни в пищевом сырье, ни в кормах.

### Цель работы

Разработка иммунохимических методик с различными видами детекции для определения плевромутилинов в продукции животноводства.

### Методология работы

Для разработки методик определения плевромутилинов были рассмотрены иммунохимические методы с ферментной и флуоресцентной детекцией: метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [3] и метод поляризационного флуоресцентного анализа (ПФИА) [4]. Плевромутилины являются низкомолекулярными соединениями, поэтому для разработки методики их определения необходимо получение конъюгатов с белками-носителями, такими как бычий сывороточный альбумин (БСА), овальбумин (ОВА) и гемоцианин лимфы улитки (ГЛУ). Конъюгаты вальнемулина синтезировали карбодиимидным методом. В процессе работы были получены поликлональные сыворотки путем ежемесячной иммунизации кроликов белковыми конъюгатами вальнемулина. После иммунизации кроликов был проведен отбор наиболее специфичных сывороток (Табл.1). При разработке методики ИФА применяли схему двухстадийного непрямого иммуноферментного анализа. В качестве ферментной метки использовали пероксидазу хрена.

Метод ПФИА является гомогенным и основан на измерении степени поляризации флуоресценции антигена, конъюгированного с флуоресцентной меткой, при взаимодействии со специфическими антителами. В качестве флуоресцентных меток были рассмотрены 6-карбоксихлорофлуоресцеин, 5-(4,6-дихлортриазинил)-аминофлуоресцеин (ДТАФ), флуоресцеинизотиоцианат.

### Результаты

Таким образом были разработаны методики определения вальнемулина на основе методов ИФА и ПФИА. Условия для проведения методики ИФА были оптимизированы: выбран оптимальный режим сорбции реагентов на полистирольном планшете, подобраны концентрации реагентов, температурный режим и время инкубации. В результате была получена калибровочная зависимость оптической плотности от концентрации вальнемулина (Рис.2А). Линейный диапазон определения плевромутилинов составил 0,6 – 40 нг/мл. Предел обнаружения для вальнемулина составил 0,1 нг/мл. Время проведения ИФА анализа составило ≈ 2 часа с учетом пробоподготовки.

При разработке методики ПФИА были получены конъюгаты вальнемулина с такими флуоресцентными метками, как 6-карбоксихлорофлуоресцеин, 5-(4,6-дихлортриазинил)-аминофлуоресцеин (ДТАФ), флуоресцеинизотиоцианат. Были подобраны оптимальные концентрации конъюгата вальнемулина с флуоресцентной меткой для связывания с антителами. Показано наиболее эффективное использование в тест-системе конъюгата вальнемулин-ДТАФ. Была построена калибровочная зависимость степени поляризации флуоресценции от концентрации вальнемулина (Рис.2Б). Изучено оптимальное время для регистрации аналитического сигнала (Рис.3). Линейный диапазон определяемых концентраций составил 1,5-50 нг/мл, предел обнаружения вальнемулина равен 1,2 нг/мл, а время анализа – 1 час.

### Выводы

В результате были разработаны высокочувствительные методики определения плевромутилинов методами ИФА и ПФИА. В таблице 3 приведены сравнительные характеристики этих методов. Время проведения анализа в среднем составляет от 60 мин до 2 часов с учетом пробоподготовки. Разработанные методики были апробированы на реальных образцах. Обе методики позволяют выявлять остаточные количества вальнемулина в концентрациях согласно установленным нормам, и могут стать основой для производства отечественных тест-систем.

### Список использованных источников

- 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.
- 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.
- 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.
- Zhang H., Mi T., Khan O. Yu., Sheng Y., Eremin S.A., Beier R.C., Zhang S., Shen J., Wang Z. Fluorescence polarization immunoassay using IgY antibodies for detection of valnemulin in swine tissue.// *Anal Bioanal Chem* – 2015- V. 407- P.7843–7848.

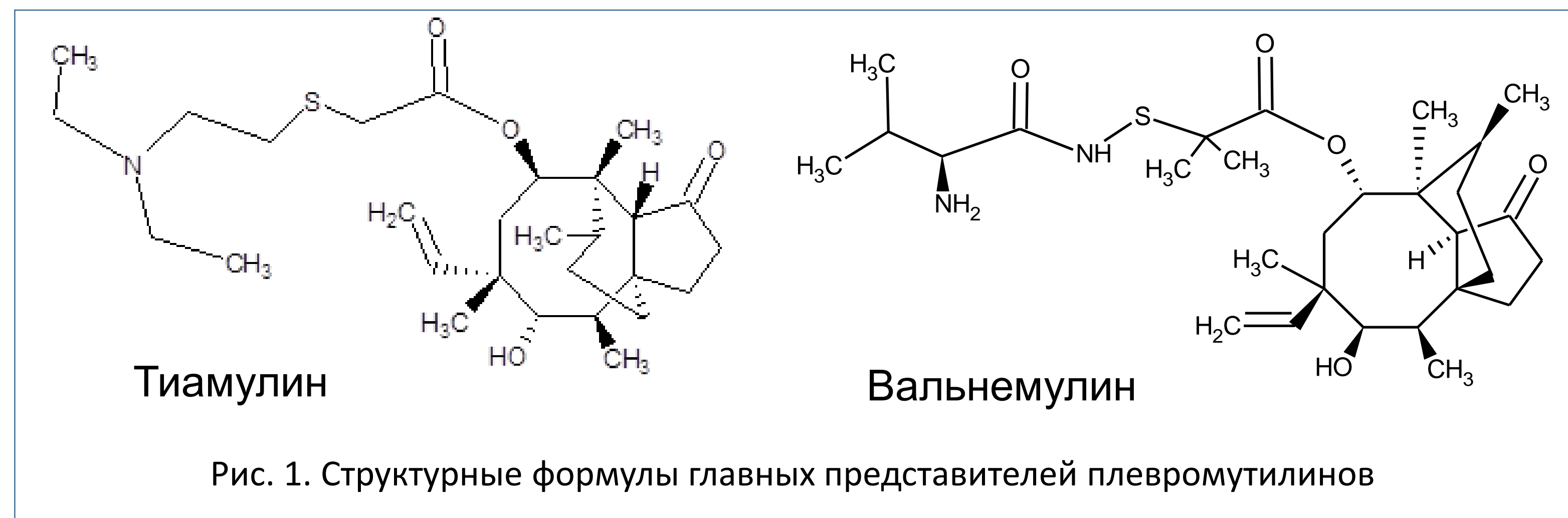


Таблица 1. Выбор оптимального разведения сыворотки и реагентов для проведения ИФА

Антиген, сорбированный на планшете	Сыворотки	Разведение	IC <sub>50</sub> (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

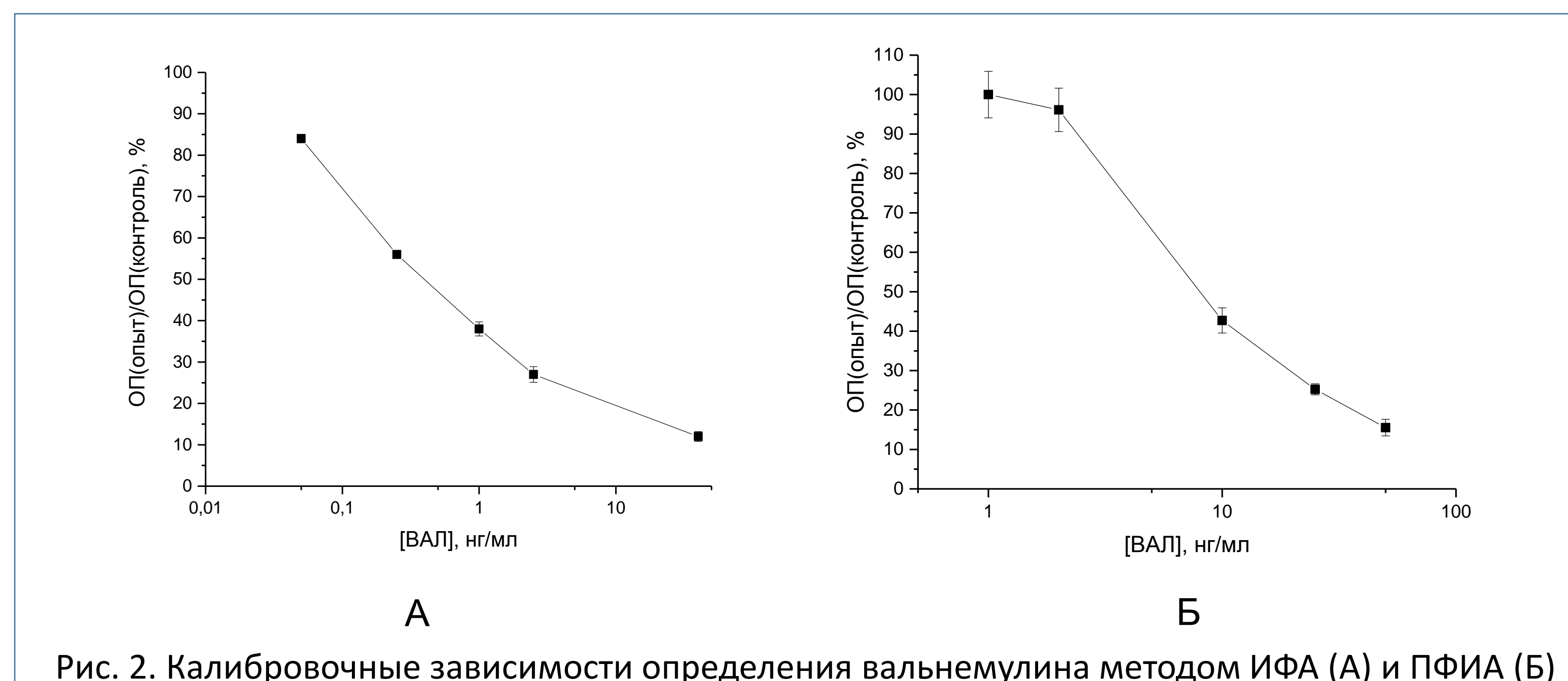


Рис. 2. Калибровочные зависимости определения вальнемулина методом ИФА (А) и ПФИА (Б)

Таблица 2. Значения перекрестной активности для различных антибиотиков

Антибиотик	Перекрестное связывание, %	
	ИФА	ПФИА
вальнемулин	100	100
тиамулин	7	70
стрептомицин	<0,1	<0,1
тилмикозин	<0,1	<0,1
десмикозин	<0,1	<0,1
тилозин	<0,1	<0,1
апрамицин	<0,1	<0,1
линкомицин	<0,1	<0,1
хлорамфеникол	<0,1	<0,1
энрофлоксацин	<0,1	<0,1
тетрациклин	<0,1	<0,1

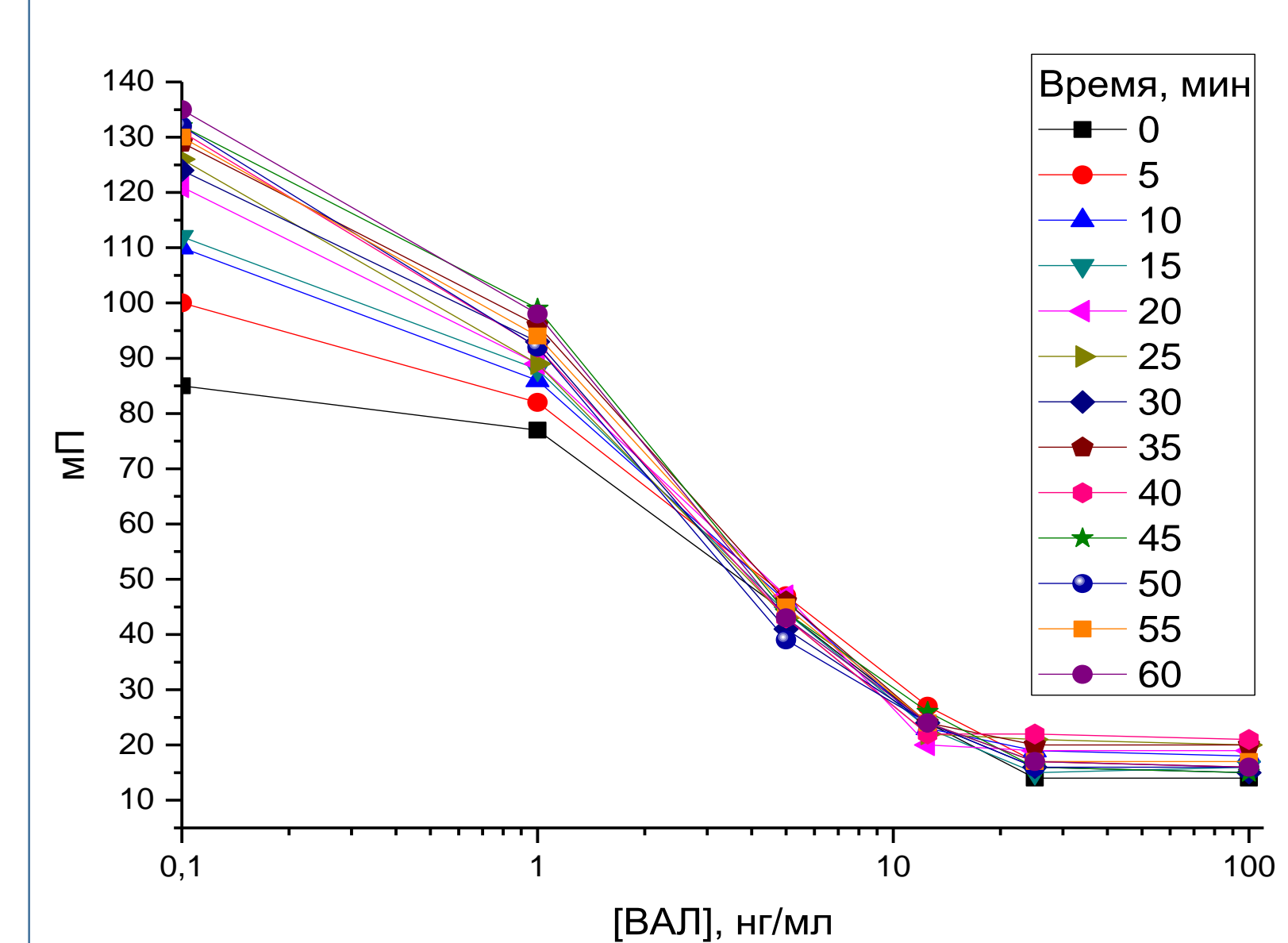


Рис. 3. Зависимость аналитического сигнала ПФИА от времени проведения анализа

Таблица 3. Сравнительные характеристики методик определения вальнемулина

Характеристика	ИФА	ПФИА
Время проведения анализа	120 минут	60 минут
Линейный диапазон определяемых концентраций, нг/мл	0,6-40	1,5 – 50
Предел обнаружения, нг/мл	0,1	1,2
IC <sub>50</sub> , нг/мл	0,3	2,5