

ISSN 1561-8331 (Print)

ISSN 2524-2342 (Online)

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 57.083.3:577.182.32

<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-3-318-332>

Поступила в редакцию 14.02.2020

Received 14.02.2020

**И. И. Вашкевич¹, А. А. Ястребова¹, О. С. Куприенко¹, Т. С. Серченя¹, М. В. Иванько²,
В. О. Шкиндерова², И. П. Пыжик², Т. М. Смоляк², А. В. Мелешеня², О. В. Свиридов¹**

¹*Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь*

²*Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Беларусь*

**ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ СИСТЕМЫ И НАБОР РЕАГЕНТОВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАЦИТРАЦИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ**

Аннотация. Разработаны тест-системы для непрямого и прямого иммуноферментного анализа (ИФА) пептидного антибиотика бацитрацина (Бц). Поликлональные антитела для обеих тест-систем получены иммунизацией кроликов конъюгатом Бц и гемоцианина улитки, который синтезировали взаимодействием пептида с белком в присутствии 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (EDC). В системе непрямого ИФА твердофазным конъюгированным антигеном служил продукт присоединения Бц к тироглобулину, предварительно активированному EDC и N-гидроксисульфосукцинимидом. Для прямого ИФА на поверхности лунок микропланшета были иммунохимически иммобилизованы антитела к Бц, а жидкая фаза содержала конъюгат Бц с пероксидазой из корней хрена, полученный путем последовательных реакций присоединения аминогрупп Бц к окисленной периодатом углеводной части фермента и восстановления образовавшегося основания Шиффа борогидридом натрия. В системах прямого ИФА и непрямого ИФА связывание конъюгированных антигенов с антителами к Бц обуславливало максимальные колориметрические сигналы около 2,0 и 1,2 единиц оптической плотности соответственно и зависело от содержания Бц в жидкой фазе. При этом концентрации антибиотика, вызывающие ингибирование связывания на 50 %, составили 2,6 нг/мл в прямом ИФА и 10,0 нг/мл в непрямом ИФА. Простая и чувствительная система прямого ИФА послужила прототипом для создания готового набора реагентов и методики выполнения измерений, технико-аналитические параметры и метрологические характеристики которых позволяют определять остаточные количества Бц в пищевой продукции животного происхождения расширенного перечня, включающего 14 наименований, в диапазоне от 9,0 до 405,0 мкг/кг с надлежащей правильностью и точностью.

Ключевые слова: антибиотики, бацитрацин, иммуноферментный анализ

Для цитирования. Иммуноферментные системы и набор реагентов для определения бацитрацина в пищевых продуктах / И. И. Вашкевич [и др.] // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 3. – С. 318–332. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-3-318-332>

**I. I. Vashkevich¹, A. A. Yastrebova¹, O. S. Kuprienko¹, T. S. Serchenya¹, M. V. Ivan'ko², V. O. Shkinderova²,
I. P. Pyzhik², T. M. Smolyak², A. V. Meleshchenya², O. V. Sviridov¹**

¹*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

²*Institute of Meat and Dairy Industry, Minsk, Belarus*

**ENZYME IMMUNOASSAY SYSTEMS AND A REAGENT KIT FOR THE DETERMINATION
OF BACITRACIN IN FOODS**

Abstract. Two test-systems for a direct and an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of peptide antibiotic bacitracin (BC) were developed and studied. For the both systems, polyclonal antibodies were obtained by immunizing rabbits with a conjugate of BC with keyhole limpet hemocyanine synthesized using reaction between the peptide and the high molecular weight protein in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). The product of BC linking to thyroglobulin which was activated with EDC and N-hydroxysulfosuccinimide served as conjugated antigen on a solid phase in the indirect ELISA. For the direct ELISA, the antibodies against BC were immunochemically immobilized onto microplate surface, while the liquid phase contained a conjugate of BC with horseradish peroxidase. This conjugate was obtained by successive reactions of antibiotic amino groups coupling to periodate oxidized carbohydrate chains of enzyme and the reducing of formed Schiff's base with sodium borohydride. Conjugated antigens binding to anti-BC antibodies pro-

vided maximum colorimetric signals of 2.0 and 1.2 optical units for the direct and indirect ELISA, respectively, and depended on BC content in the liquid phase. Antibiotic concentration that caused the inhibition of binding by 50 % was 2.6 ng/ml in the direct ELISA and 10.0 ng/ml in the indirect ELISA. The simple and sensitive direct ELISA system was used as a prototype of the finished reagent kit and a method for measurements with technical-analytical parameters and metrological characteristics allowing the determination of BC residues in a variety of foods including 14 items in a concentration range of 9.0 to 405.0 µg/kg with proper accuracy and precision.

Keywords: antibiotics, bacitracin, enzyme immunoassay

For citation. Vashkevich I. I., Yastrebova A. A., Kuprienko O. S., Serchenya T. S., Ivan'ko M. V., Shkinderova V. O., Pyzhik I. P., Smolyak T. M., Meleshchenya A. V., Sviridov O. V. Enzyme immunoassay systems and a reagent kit for the determination of bacitracin in foods. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2020, vol. 56, no. 3, pp. 318–332 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-3-318-332>

Введение. Избыточное применение антибиотиков в ветеринарной практике для лечения и повышения продуктивности сельскохозяйственных животных приводит к накоплению остаточных количеств этих лекарств в продуктах питания человека. Длительное использование в пищу продуктов животного происхождения, содержащих антибиотики, может вызывать неблагоприятные для здоровья последствия, а также способствовать появлению и развитию устойчивых к антибиотикам форм микроорганизмов.

Бацитрацин (Бц) – циклический пептидный антибиотик, который продуцируется некоторыми штаммами бактерий *Bacillus licheniformis* и *Bacillus subtilis*, был обнаружен в 1943 г. Джонсоном [1]. Он обладает мощной антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий, которая обусловлена воздействием антибиотика на синтез бактериальной клеточной стенки. Бц широко применяется в качестве кормовой добавки, а также для профилактики и лечения инфекционных заболеваний у животных [2]. Из-за выраженной токсичности в терапевтических целях для человека Бц используется только как средство для наружного применения.

Первичная структура Бц, имеющего молекулярную массу 1423 г/моль, включает гептапептидное кольцо, которое связано с пентапептидной боковой цепью (рис.1). Циклический фрагмент состоит из L- и D-аминокислот, главная роль в образовании цикла принадлежит остатку L-Lys⁶, который присоединяется тремя амидными связями к аминокислотным остаткам за счет своих групп: –COOH (D-Orn⁷), α-NH₂ (L-Ile⁵) и ε-NH₂ (L-Asn¹²). N-концевая тиазолиновая группировка молекулы антибиотика образуется за счет конденсации карбоксильной группы L-Ile¹ с аминокислотной и сульфгидрильной группами L-Cys². Предполагается, что циклическое строение, присутствие четырех D-аминокислот и особая пространственная конформация этого антибиотика обуславливают его устойчивость к протеолизу и наделяют свойствами потенциального ингибитора протеиназ [3]. Важно отметить тот факт, что Бц обладает способностью хелатировать ионы двухвалентных металлов, таких как Zn²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Co²⁺ и Mn²⁺ [4, 5]. В комплексообразовании участвуют карбоксил D-Glu⁴, имидазольное кольцо L-His¹⁰ и тиазолиновая группировка [4, 6]. Соединения Бц с ионами металлов характеризуются большей стабильностью по сравнению с апо-формой антибиотика, поэтому эти комплексы, в частности Zn-Бц, являются фармацевтическими субстанциями коммерческих ветеринарных препаратов. В этой связи интересным представляется запатентованное применение Бц для стабилизации при долговременном хранении хромоген-субстратной смеси (3,3',5,5'-тетраметилбензидин + H₂O₂), предназначенной для детекции конъюгированной пероксидазы из корней хрена (ПХ) в иммуноферментном анализе (ИФА) [7]. Скорее всего, стабилизирующее действие добавленного Бц обусловлено хелатированием ионов Fe²⁺, которые могут присутствовать в смеси или попадать в нее в следовых количествах и инициировать реакцию окисления даже в отсутствие фермента.

Первоначально Бц был описан как индивидуальное соединение, однако позже его идентифицировали как смесь структурно схожих додекапептидов. Основным компонентом антибиотика является Бц А, который и определяет его антимикробные свойства. Второстепенный активный компонент представляет собой Бц В. Идентифицированы также Бц С, F, H, I и F, которые обнаруживаются в следовых количествах в препаратах Бц [3, 8–10].

В результате использования Бц в продуктивном животноводстве его остатки могут присутствовать в продовольственном сырье и пищевой продукции. Поэтому с целью обеспечения

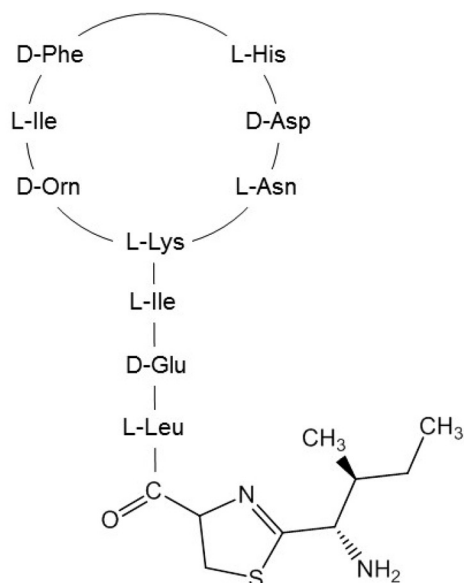


Рис. 1. Химическая структура бацитрацина А

Fig. 1. Chemical structure of bacitracin A

биобезопасности человека во многих странах мира установлены максимально допустимые уровни (МДУ) остаточных количеств этого антибиотика в животноводческом сырье и продуктах питания и используются различные методы контроля его концентраций, в том числе иммуноанализ. Содержание Бц регулируется директивой Европейского союза (Commission regulation (EU) No 37/2010), и этот антибиотик включен в принятый 13.02.2018 Решением № 28 Коллегии Евразийской экономической комиссии перечень ветеринарных лекарственных средств, МДУ которых могут присутствовать в переработанной пищевой продукции животного происхождения. В пределах ЕС и Евразийского экономического союза установлены следующие МДУ (мкг/кг) для остатков Бц: коровье молоко – 100, кроличье мясо – 150, другие продукты < 20.

Для определения лекарственных соединений в фармацевтических препаратах, биологических жидкостях, животноводческой продукции и кормах разработаны и применяются микробиологические, иммуноаналитические и хроматографические методы [11]. Официальным аналитическим методом Европейской фармакопеи (EP) и Фармакопеи США (USP) для Бц является микробиологический тест. Несомненно, микробиологические методы очень надежны в отношении оценки биологической активности препаратов, однако требуют много времени для анализа и не всегда специфичны [12]. Кроме того, эти методы в случае тестирования пищевых продуктов и сырья неизбежно подвержены влиянию присутствующих жиров, кислот, красителей, веществ с антибактериальной активностью и других ингибиторов.

В ряде методов химического анализа для выявления Бц используется жидкостная хроматография [13–17]. Хроматографические методы позволяют проводить выделение и идентификацию субстанций одного или нескольких фармацевтических препаратов, устанавливать наличие и природу родственных соединений, но из-за сложности не подходят для мониторинга остатков антибиотика в большом количестве исследуемых образцов. Кроме того, эти методы требуют использования дорогостоящего оборудования, существенных временных затрат и достаточно сложной многоэтапной пробоподготовки, что сдерживает их применение в рутинной лабораторной практике.

Иммуноанализ широко используется в клинической диагностике и медицинской биохимии и становится все более применимым для определения остатков ветеринарных препаратов, таких как антибиотики. В основе метода лежит реакция специфического связывания между антителом, выработанным против лекарственной субстанции, и антигеном, в роли которого выступают два соединения: сам антибиотик и его конъюгат с инертным белком или активной меткой, например с ферментом. ИФА Бц в кормах, животноводческой продукции и плазме крови описан в нескольких работах [18–21]. Часто иммуноферментные системы, включающие конъюгат антигена с инертным белком, используются в качестве модели систем иммунохроматографического анализа на тест-полосках, в которых твердофазный конъюгированный антиген окрашивается антителом, меченным коллоидным золотом или флуоресцентным красителем из подвижной жидкой фазы. Такие тесты характеризуются экспрессностью, минимальной трудоемкостью и в случае молока не требуют дополнительной пробоподготовки. Следует отметить, что исследовательские и коммерческие иммунохроматографические системы для определения Бц отсутствуют.

Цель нашей работы – получение иммунореагентов, сравнение характеристик иммуноферментных систем, включающих общие поликлональные антитела к Бц и различные белковые конъюгаты антигена, и разработка на основе полученных данных иммуноферментного набора реагентов для количественного определения Бц в продовольственном сырье и пищевых продуктах расширенного перечня, для которых установлен МДУ. В работе описаны технико-аналитические

биобезопасности человека во многих странах мира установлены максимально допустимые уровни (МДУ) остаточных количеств этого антибиотика в животноводческом сырье и продуктах питания и используются различные методы контроля его концентраций, в том числе иммуноанализ. Содержание Бц регулируется директивой Европейского союза (Commission regulation (EU) No 37/2010), и этот антибиотик включен в принятый 13.02.2018 Решением № 28 Коллегии Евразийской экономической комиссии перечень ветеринарных лекарственных средств, МДУ которых могут присутствовать в переработанной пищевой продукции животного происхождения. В пределах ЕС и Евразийского экономического союза установлены следующие МДУ (мкг/кг) для остатков Бц: коровье молоко – 100, кроличье мясо – 150, другие продукты < 20.

параметры и метрологические характеристики данного набора. Изложенные здесь результаты исследования другой иммуноферментной системы воплощены в конструкции первой в мире иммунохроматографической тест-системы [22], описание которой будет опубликовано в последующей работе.

Материалы и методы. В работе использованы чистый Бц (активность 76 IU/mg, Ph. Eur.) фирмы Carl Roth GmbH + Co. KG (Германия), Zn-Бц, полимиксин В, колистин, неомицин, гемоцианин улитки (КЛН), бычий сывороточный альбумин (БСА), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМБ), NaIO_4 , NaBH_4 , детергенты и бактериостатики фирмы Sigma-Aldrich (США), N-гидроксисульфосукцинимид (сульфо-NHS) и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид гидрохлорид (EDC) компании Thermo Fisher Scientific (США), колонка PD-10 (Сефадекс G-25) для обессоливания растворов биополимеров фирмы GE Healthcare (США), ПХ (RZ = 3) фирмы ДИА-М (РФ).

ИФА выполняли в разборных микропланшетах из полистирола, состоящих из двенадцати 8-луночных полосок (стрипов), фирмы Greiner bio-one (Германия), или в 96-луночных полностью разделяемых микропланшетах повышенной сорбционной емкости КН-М-02 от ООО «Хема-медика» (РФ). Растворы хромогена (ТМБ) и субстрата (H_2O_2), стоп-реагент (раствор H_2SO_4), а также препарат аффинно очищенных антикроличьих иммуноглобулинов G овцы для ИФА изготовлены в Институте биоорганической химии НАН Беларуси. Использовали готовый к использованию хромоген-субстратный раствор ООО «Алкор Импэкс» (РФ). Антикроличьи иммуноглобулины козы, меченные ПХ, предоставлены НИЦ микробиологии и эпидемиологии им. Н. Ф. Гамалеи (РФ). Тироглобулин (Тг) выделяли из экстрактов послеоперационной ткани щитовидной железы человека по лабораторной методике Института биоорганической химии НАН Беларуси, включающей хроматографию на аминоэтил-сефарозе.

Для приготовления растворов использовали деионизированную воду с удельным электрическим сопротивлением 17–18 МОм·см, полученную в модульной системе очистки воды Arium[®] pro VF фирмы Sartorius (Германия). Образцы продовольственного сырья животного происхождения приготовлены в Институте мясо-молочной промышленности. Пищевые продукты закуплены в торговой сети г. Минска.

Для детекции колориметрического сигнала в микропланшетных ИФА использовали приборы АИФ М/340 (ОАО «Витязь», Беларусь) и Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Швейцария). Спектры ультрафиолетового поглощения растворов Бц и его конъюгатов записывали в кювете с длиной оптического пути 1 см в приборе Specord M 40 (Carl Zeiss, Германия).

Получение антител к Бц. В качестве иммуногена для введения кроликам применяли конъюгат Бц с высокомолекулярным белком КЛН, синтезированный карбодиимидным методом с использованием водорастворимого EDC [19, 23]. Очистку иммуногена от низкомолекулярных соединений проводили диализом. Продукт хранили при -18°C в 50 % глицерине.

Антитела получали у кроликов породы серый великан с массой тела 1,5–2 кг по общепринятой схеме. Титр, аффинитет и специфичность продуцируемых поликлональных антител оценивали методом непрямого ИФА. Порция выбранной антисыворотки использована для получения иммуноглобулиновой фракции трехкратным переосаждением в растворе $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50 % от насыщения). Выбранные антисыворотки и иммуноглобулиновую фракцию хранили при -18°C .

Синтез конъюгированных антигенов. Белковый конъюгат Бц, предназначенный для иммунизации в лунках микропланшета системы непрямого ИФА, получали путем присоединения антибиотика к чистому Тг, карбоксильные группы которого активировались смесью EDC и сульфо-NHS [23] и затем вводились в реакцию с избытком Бц. Как и в случае иммуногена, конъюгат Бц-Тг очищали диализом, белковый раствор разводили равным объемом глицерина и хранили при -18°C .

Ферментный конъюгат Бц для жидкой фазы системы прямого ИФА синтезировали последовательными реакциями окисления углеводной части ПХ периодатом натрия, присоединения антибиотика через NH_2 -группу в боковой цепи Бц и восстановления неустойчивой иминной связи NaBH_4 [23]. От низкомолекулярных фракций конъюгат Бц-ПХ отделяли гелевой фильтрацией на колонке Superose 12 в приборе для быстрой хроматографии белков под давлением (Farmacia FPLC, Швеция). По поглощению света при длине волны 252 нм рассчитывали концентрацию присоединенных к ПХ остатков Бц, используя молярный коэффициент экстинкции Бц, равный

2500 М⁻¹ см⁻¹ [24], и данные о поглощении света немодифицированной ПХ при этой длине волны. Концентрацию ПХ определяли по коэффициенту экстинкции 102 000 М⁻¹ см⁻¹ при длине волны 403 нм [25]. К раствору конъюгата приливали равный объем глицерина. Хранение продукта осуществляли при –18 °С.

Проведение ИФА. Для проведения непрямого ИФА конъюгат Бц-Тг был иммобилизован на внутренней поверхности лунок микропланшета путем инкубации в лунке 0,1 мл раствора Бц-Тг в 0,05 М НФБ с 0,15 М NaCl (рН 7,4) в течение ночи при 4 °С. После этого лунки промывали буфером, содержащим Тритон X-100 (НФБТ). Затем в лунки вносили 50 мкл раствора Бц (концентрации от 0,1 до 1 000 нг/мл) и 50 мкл раствора иммуноглобулиновой фракции антисыворотки к Бц в НФБТ. Систему инкубировали 1 ч при 37 °С и промывали лунки 4 раза порциями по 200 мкл НФБТ. Затем вносили в лунки 100 мкл пероксидазного конъюгата антивидовых антител, разбавленного НФБТ, и проводили вторую инкубацию 1 ч при 37 °С. После промывки твердой фазы последовательно тремя порциями НФБТ по 200 мкл в лунки добавляли 100 мкл свежеприготовленного раствора, содержащего 0,4 мМ ТМБ и 3,0 мМ Н₂O₂ в 0,04 М натрий-цитратном буфере (рН 4,0), и выдерживали 15 мин при комнатной температуре. Ферментативную реакцию в лунках останавливали внесением 50 мкл 1,0 М Н₂SO₄ и сразу же измеряли оптическую плотность при 450 нм (ОП₄₅₀) в планшетном спектрофотометре. Калибровочный график зависимости конкурентного связывания от концентраций Бц в калибровочных пробах строили в координатах: B_i/B_0 в % (ось ординат, линейная), концентрация Бц в калибровочных пробах в нг/мл (ось абсцисс, логарифмическая), где B_0 – оптическая плотность в отсутствие Бц в растворе, B_i – оптическая плотность в присутствии возрастающих концентраций Бц в растворе.

На основе разборного полистирольного микропланшета получали иммуносорбент для проведения прямого ИФА путем функционализации лунок адсорбцией антикरोличьих иммуноглобулинов овцы с последующей иммунохимической иммобилизацией специфических антисывороток к Бц. Концентрацию специфических антител и разбавление конъюгата Бц-Пх в системе подбирали так, чтобы колориметрический сигнал (ОП₄₅₀) после завершения иммунохимической и ферментативной реакций составлял 2,0–2,3 оптических единиц. В лунки иммуносорбента одноканальным дозатором вносили по 50 мкл растворов Бц в порядке возрастания их концентраций (0; 0,5–27,0 нг/мл), а затем добавляли по 50 мкл раствора пероксидазного конъюгата Бц. В экспериментах по оценке специфичности анти-Бц антител в лунки вместо Бц добавляли другие антибиотики в концентрациях от 1,0 нг/мл до 20,0 мкг/мл. Аккуратными круговыми движениями планшета по поверхности стола перемешивали содержимое лунок. Иммуносорбент заклеивали изолирующим листком или закрывали крышкой и выдерживали при температуре (20–25) °С в течение 1 ч, не допуская попадания прямого солнечного света на планшет. По окончании времени инкубации удаляли жидкость из всех лунок путем резкого переворачивания планшета. Затем с помощью восьмиканальной пипетки промывали лунки 3 раза по 300 мкл 0,05 М НФБ (рН 7,4), содержащим 0,15 М NaCl и 0,02 % твин 20, и вносили по 100 мкл готового хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения не превышало 2 мин. Закрывали планшет изолирующим листком или крышкой и инкубировали в течение 15 мин при (20–25) °С в темноте. Останавливали ферментативную реакцию путем добавления во все лунки планшета по 100 мкл стоп-реagenta (1,0 М Н₂SO₄). Растворы в лунках перемешивали круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола. В течение не более 15 мин после остановки реакции измеряли ОП₄₅₀ в планшетном спектрофотометре. На основании полученных экспериментальных данных строили градуировочный график зависимости B_i/B_0 в % (ось ординат, линейная) от концентрации Бц в нг/мл (ось абсцисс, логарифмическая).

Процент перекрестного реагирования различных антибиотиков с анти-Бц антителами (кросс-реактивность, CR) определяли по формуле:

$$CR = \frac{C_i}{C_x} 100,$$

где C_i и C_x – концентрации соответственно Бц и сравниваемого антибиотика, при которых максимальное значение ОП₄₅₀, измеренное в отсутствие конкурентных ингибиторов в системе, уменьшается на 50 %.

Для определения параметров качества ИФА применяли общепринятые подходы [26, 27, 29]. При этом точность прямого ИФА оценивали повторяемостью (сходимостью) результатов измерений (коэффициент вариации, К.В.) концентрации Бц в растворе, содержащем 3,0 нг/мл Бц ($n = 12$). При расчете чувствительности анализа (минимальной достоверно определяемой концентрации Бц) получали 10 значений ОП₄₅₀ для раствора, не содержащего Бц, и графически находили концентрацию, соответствующую ОП₄₅₀ – 2SD. В экспериментах по установлению параметра «степень извлечения (открытия) добавки Бц» в прямом ИФА использовали образцы мяса и продуктов из мяса, рыбы и продуктов из рыбы, меда, яиц и яичных продуктов, не содержащих Бц (менее 9,4 мкг/кг по данным иммуноферментного набора BACITRACIN ELISA от EuroProxima B. V. (Нидерланды)). Эксперимент по оценке степени извлечения R_m проводили с раствором Бц с концентрацией 1 мкг/мл в 100 %-ном метаноле. В каждую навеску образца массой (1,00±0,01) г вносили аликвоту раствора 1 мкг/мл Бц объемом 100 мкл, что давало массовую долю антибиотика 100 мкг/кг. Пробоподготовку для ИФА, включающую водно-метанольную экстракцию Бц и разведение экстракта буфером, проводили как указано далее по тексту. Затем один оператор на одном и том же оборудовании в разные дни получал результаты измерения массовой доли Бц в продуктах с одинаковым уровнем добавки Бц. Расчеты проводили по формуле [29]:

$$R_m = \frac{\bar{c}_{\text{obs}}}{\bar{c}_{\text{spike}}} 100,$$

где R_m – степень извлечения, %; \bar{c}_{obs} – среднеарифметический результат измерений проб с добавкой, мкг/кг; \bar{c}_{spike} – среднеарифметическое значение добавки, мкг/кг.

Набор реагентов для прямого ИФА. В состав готового набора ПРОДОСКРИН® ИФА-Бацитрацин входят следующие компоненты: иммуносорбент, 96-луночный микропланшет, 12 стрипов по 8 лунок, с иммобилизованными анти-Бц антителами, готов к использованию, 1 планшет; градуировочные растворы C_0, C_1, C_2, C_3, C_4 и C_5 со значениями концентрации Бц 0; 0,50; 1,00; 3,00; 9,00 и 27,00 нг/мл, готовы к использованию, 6 флаконов, (0,70±0,02) мл; конъюгат (Бц-ПХ), 21-кратный концентрат, 1 флакон или микропробирка, (0,70±0,02) мл; буфер для разбавления, 1 флакон, (25,0±0,5) мл, готов к использованию; буфер для экстракции 1, 1 флакон, (20,0±0,5) мл; буфер для экстракции 2, 1 флакон, (20,0±0,5) мл; моющий буфер, 10-кратный концентрат, 1 флакон (30,0±0,5) мл; субстрат, (14,0±0,5) мл; хромоген, (0,70±0,02) мл; стоп-реагент, 1 флакон, (14,0±0,5) мл, готов к использованию.

Технические требования к изготовлению набора допускают применение готового хромоген-субстратного реагента вместо двух отдельных компонентов.

Компоненты набора подготавливают для выполнения прямого ИФА следующим образом. Содержимое флакона с концентратом моющего буфера интенсивно встряхивают, отмеренную аликвоту переносят в стакан, добавляют в 9 раз больший объем дистиллированной воды и перемешивают. Рабочий раствор конъюгата непосредственно перед использованием готовят в пробирке или во флаконе, куда вносят отмеренную аликвоту буфера для разбавления, добавляют в 20 раз меньший объем концентрата конъюгата Бц-ПХ и перемешивают, не допуская образования пены. Хромоген-субстратный раствор приготавливают в темных стеклянных или пластмассовых флаконах, в которые вносят отмеренную аликвоту субстрата, добавляют в 20 раз меньший объем хромогена и перемешивают.

Для приготовления проб из образцов продуктов, исследуемых с помощью набора ПРОДОСКРИН® ИФА-Бацитрацин, выполняют следующие процедуры. Экстрагирующие смеси № 1 или № 2 готовят непосредственно перед проведением прямого ИФА из отмеренных аликвот водных буферных растворов для экстракции 1 или 2 (различаются по специальным добавкам), к которым приливают в 4 раза больше объема метанола и перемешивают.

Отбор образцов для анализа выполняют по СТБ 1036 и проводят первичную обработку общепринятыми в анализе пищевой продукции приемами и способами. При анализе каждого образца выполняют два параллельных определения.

Подготовка проб мяса, мясных и мясосодержащих продуктов (в том числе птицы, субпродуктов, шпика), продукции аквакультуры (рыба, креветки), яиц птиц, сухих и жидких яичных продуктов. Взвешивают ($1,00 \pm 0,01$) г гомогенизированного образца. Навеску помещают в центрифужную пробирку с пробкой вместимостью 15 мл и добавляют 2 мл экстрагирующей смеси № 1 (вся продукция кроме яиц и яичных продуктов) или № 2 (яйца и яичные продукты). Важно всегда соблюдать соотношение 1:2 массы образца и объема экстрагирующей смеси. Пробирку закрывают пробкой, встряхивают в течение 15 мин на ротаторе при частоте вращения 50 об/мин путем переворачивания вверх-вниз и выполняют центрифугирование в течение 10 мин при комнатной температуре и относительном центробежном ускорении 2000 g. Отбирают 50 мкл супернатанта, переносят в чистую пробирку, добавляют 200 мкл буфера для разбавления и перемешивают.

Подготовка проб молока. Рекомендуется проверить pH образца и при необходимости довести показатель до значения 6,5–7,5, используя 0,1 М раствор гидроксида натрия. Образец объемом 10 мл центрифугируют в течение 10 мин при 4 °С и относительном центробежном ускорении 2000 g. Можно центрифугировать при комнатной температуре образец, предварительно охлажденный до (2–4) °С. Шпателем удаляют верхний жировой слой. Отбирают аликвоту обезжиренного молока объемом 20 мкл, переносят в чистую пробирку, добавляют 280 мкл буфера для разбавления и перемешивают.

Подготовка проб меда. Взвешивают ($1,00 \pm 0,01$) г образца. Навеску вносят в центрифужную пробирку с пробкой вместимостью 15 мл, помещают на водяную баню и выдерживают 10 мин при 60 °С. В пробирку добавляют 2 мл раствора экстрагирующей смеси № 1. Важно соблюдать соотношение масса образца/объем экстрагирующей смеси = 1:2. Пробирку закрывают пробкой, встряхивают в течение 15 мин на ротаторе при частоте вращения 50 об/мин путем переворачивания вверх-вниз и выполняют центрифугирование в течение 10 мин при комнатной температуре и относительном центробежном ускорении 2000 g. Отбирают 50 мкл супернатанта, переносят в чистую пробирку, добавляют 200 мкл буфера для разбавления и перемешивают.

Подготовленные пробы, как и градуировочные растворы, вносятся в объемах по 50 мкл в лунки микропланшета и исследуются прямым ИФА по методике, описанной выше.

Обработка результатов измерений проводится с применением прилагаемого к набору ПРОДОСКРИН® ИФА-Бацитрацин шаблона в Microsoft Excel. Программой Excel автоматически строится градуировочная зависимость B_i/B_0 в % от натурального логарифма концентрации Бц в градуировочных пробах в нг/мл и рассчитывается массовая доля Бц в мкг/кг в исследуемых пробах с учетом фактора разбавления пробы, равного 15. Для проверки качества выполнения ИФА автоматически рассчитываются значения КВ (коэффициент вариации между параллельными результатами измерений одной и той же градуировочной пробы или исследуемого образца) и интерсепт 50 % (IC_{50} , на градуировочном графике это концентрация Бц в нг/мл, соответствующая $B_i/B_0 = 50$ %). Проводится оценка приемлемости результатов измерений, полученных в условиях повторяемости. За окончательный результат принимают округленное до первого десятичного числа среднее арифметическое значение двух измерений параллельных проб одного образца с учетом расширенной неопределенности, установленной для разных групп продуктов.

Разработка и валидация методики выполнения измерений (МВИ) с помощью набора реагентов ПРОДОСКРИН® ИФА-Бацитрацин проведена на базе Института мясо-молочной промышленности. Метрологические характеристики МВИ определены в соответствии с СТБ ИСО 5725-3-2002, СТБ ИСО 5725-4-2002, ГОСТ 34100.3, ГОСТ 8.010 и методическими руководствами [28, 29]. Экспериментальные данные получали в процессе внутрилабораторных испытаний с использованием продуктов, распределенных по 7 группам в зависимости от вида матрицы: мясо, в том числе птицы; мясные и мясосодержащие продукты; субпродукты, в том числе птичьи, и продукты их переработки, сало, в том числе шпик; пищевая продукция аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки); яйца птицы, сухие и жидкие яичные продукты; мед; молоко. Поскольку сырье и продукция животного происхождения с высоким содержанием бацитрацина практически не встречается, то для анализа использовались пробы продукции, не содержащие антибиотик (образцы), в которые вносили добавки бацитрацина. Образцы нагружали Бц до значений массовой доли антибиотика от 9,0 до 405,0 мкг/кг. ИФА выполняли серийным набором

реагентов ПРОДОСКРИН®ИФА-Бацитрацин. Для каждого образца проводили четыре серии измерений, состоящих из двух результатов единичных измерений на каждом из трех уровней. Каждая серия измерений получена при соблюдении условий повторяемости. Разные группы анализов получены при варьировании факторов «оператор», «время». На основании полученных экспериментальных данных рассчитали показатели точности и неопределенности результатов измерений, проведенных в соответствии с МВИ.

Результаты исследований и их обсуждение. Иммунореагенты. В качестве базовых иммунореагентов в данной работе разработаны, исследованы и изготовлены три конъюгата Бц с белками КЛН, Тг и ПХ, а также кроличья антисыворотка к Бц и ее иммуноглобулиновая фракция.

Как низкомолекулярное соединение Бц не способен индуцировать иммунный отклик при введении животным. Поэтому для получения специфических антител требуется осуществить конъюгирование Бц в качестве гаптена с высокомолекулярным носителем для придания ему иммуногенных свойств. В литературе описаны методики присоединения Бц через глутаровый альдегид к глюкоксидазе [20] и БСА [21], а также с использованием водорастворимого карбодиимида – к иммуноглобулину быка [19]. Кроме этих иммуногенов для получения антител к Бц использовался конъюгат антибиотика с альбумином сыворотки человека [18]. Белком-носителем был выбран КЛН, который имеет молекулярную массу от 10^6 до 10^7 Да и содержит большое количество доступных для модификации остатков лизина и карбоксильных групп. При $\text{pH} > 9$ обычные для нейтральной среды агрегаты белка диссоциируют на субъединицы, что увеличивает антигенность конъюгированного гаптена [23]. При работе с этим белком мы учитывали некоторые особенности поддержания его функциональной активности в растворах, а именно присутствие высокой концентрации солей вплоть до 0,9 М по NaCl и также исключение процедур замораживания–оттаивания, приводящих к потере растворимости и даже денатурации гаптен-белковых комплексов. Для конъюгирования Бц с КЛН использовали водорастворимый карбодиимид – EDC, реагирующий с доступными карбоксильными группами с образованием активного интермедиата в форме О-ацилмочевины, который затем взаимодействует с первичной NH_2 -группой и формирует жесткую и прочную амидную связь [23]. Синтез конъюгата проводили в одну стадию, внося EDC в смесь пептидного гаптена и белка-носителя. В предварительных экспериментах было показано, что карбоксильные группы в составе Бц являются малоактивными и практически не участвуют в образовании пептидных связей, а активные интермедиаты в основном образуются за счет COOH-групп белка. В очищенном конъюгате наблюдали появление характерного для Бц поглощения при 252 нм, что свидетельствовало о ковалентном присоединении антибиотика к КЛН.

Конъюгированные антигены на основе Бц в ранее опубликованных работах получали с использованием сывороточного альбумина [20,19], желатина [20] или овальбумина [20, 21], применяя глутаральдегидный метод [20, 21], или с помощью карбодиимида [19]. Мы выбрали Тг (молекулярная масса ~ 660 кДа) для конъюгирования с целевым антигеном с тем, чтобы исключить в непрямом ИФА возможные помехи со стороны побочных антител, выработанных к белковому носителю КЛН в составе иммуногена. Лучшим оказался способ конъюгирования Бц, включающий взаимодействие COOH-групп белка с сульфо-NHS в присутствии EDC и последующую реакцию активных эфиров с NH_2 -группами Бц.

Поскольку ПХ представляет собой гликопротеин, богатый углеводами, которые не участвуют в ферментных реакциях, то можно присоединять Бц именно к олигосахаридной части ПХ без причинения ущерба каталитической активности ПХ и повреждения антигенной структуры Бц [19]. В нашей работе вицинальные гидроксилы углеводных цепей ПХ подвергали окислению, образовавшиеся альдегидные группы конденсировали с аминогруппами Бц и получившееся основание Шиффа восстанавливали до устойчивого вторичного амина. Вместо диализа, как в случаях первых двух конъюгатов, для эффективной очистки Бц-ПХ применили быструю гель-хроматографию под давлением. Рассчитанное по данным спектрофотометрии содержание остатков Бц составило 1,6 моль на 1 моль фермента.

В ходе контроля динамики продуцирования анти-Бц антител и определения их характеристик в системах непрямого и прямого ИФА была установлена высокая иммуногенность конъюгата

Бц-КЛН. Антитела к Бц в кроличьей сыворотке, разбавленной более чем в 10 000 раз, обладали способностью связываться с иммобилизованным на твердой фазе Бц-Тг или с жидкофазным Бц-ПХ. При этом удаленные от Бц-связывающих сайтов эпитопы антител могли эффективно взаимодействовать с антивидовыми иммуноглобулинами в растворе или на поверхности твердой фазы. Аналогичными свойствами обладали и частично очищенные антитела к Бц в составе иммуноглобулиновой фракции антисыворотки. Связывание обоих конъюгированных антигенов с анти-Бц антителами конкурентно ингибировалось свободным Бц в диапазоне концентраций 0,4–14,0 нмоль/л, что указывало на достаточный для ИФА Бц аффинитет антител. Удовлетворяющей требованиям ИФА оказалась и специфичность антисыворотки. Ее относительное сродство к некоторым полипептидным антибиотикам, структуры которых так же как и у Бц включают циклическую и линейную части, составило (%): Бц – 100, Zn-Бц – 100, неомицин < 0,02, полимиксин В < 0,01, колистин < 0,01.

Система непрямого ИФА. Главными элементами иммунохимической конструкции этой гетерофазной системы были конъюгат Бц-Тг, адсорбированный на внутренней поверхности лунок микропланшета, растворенный Бц и иммуноглобулиновая фракция антисыворотки к Бц в жидкой фазе на первой стадии ИФА, твердофазный бинарный комплекс Тг-Бц с анти-Бц антителом кролика и жидкофазный компонент в виде антикроличьего иммуноглобулина, меченного ПХ, на втором этапе анализа. Количество метки в итоговом тройном комплексе находится в пропорциональной зависимости от концентрации Бц в системе и измеряется по интенсивности окрашивания раствора продуктом пероксидазной реакции. Термин «непрямой» отражает тот факт, что в ИФА этой конструкции первичный иммунный комплекс метится ферментом не напрямую в ходе реакции антиген–антитело, а на дополнительной стадии анализа. В литературе описано применение тест-систем данной конструкции для количественного определения Бц или Zn-Бц, экстрагированных из разнообразного продовольственного сырья [20] и кормов [21].

В нашем исследовании для повышения чувствительности системы непрямого ИФА к концентрации Бц, внесенного в жидкую фазу, варьировались количества иммобилизованного конъюгата Бц-Тг и растворенного антитела к Бц. Оптимальные соотношения этих иммунореагентов были достигнуты при адсорбции конъюгированного Бц из раствора с концентрацией 1 мкг/мл и содержании анти-Бц иммуноглобулина в жидкой фазе 0,3 мкг/мл. В данных условиях на градуировочной кривой (рис. 2) концентрация Бц, вызывающая ингибирование связывания иммунореагентов и уменьшение колориметрического сигнала на 50 % (IC_{50}), близка к 10 нг/мл, а нижнее плато начинается с концентрации Бц 100 нг/мл. Последняя величина соответствует МДУ для Бц в молоке.

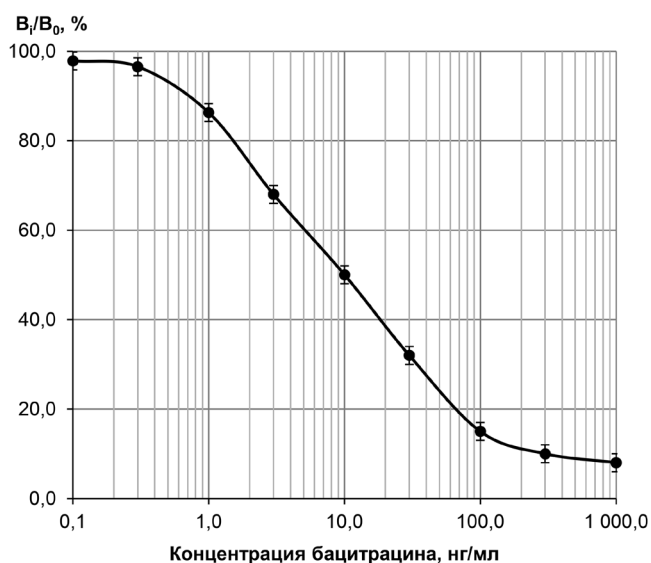


Рис. 2. Калибровочный график непрямого ИФА бацитрацина

Fig. 2. Calibration curve of bacitracin indirect ELISA

Такие характеристики конкурентного связывания интактного и конъюгированного антигенов характерны для высокоаффинных антител. Известно, что именно равновесная константа комплексообразования антиген–антитело определяет концентрационные диапазоны в конкурентных иммуноаналитических системах, в частности в ИФА и в ИХА [30, 31]. Следовательно, иммунореагенты, исследованные в непрямом ИФА, можно применить в ИХА и получить рабочий аналитический диапазон, аналогичный приведенному на рис. 2. Предпринятые нами иммобилизация конъюгата Бц-Тг на нитроцеллюлозной тест-полоске и адсорбция анти-Бц иммуноглобулиновой фракции на коллоидных золотых наночастицах в системе ИХА обеспечили высокочувствительную инструментальную де-

текцию Бц в данном диапазоне и возможность визуального обнаружения в молоке концентраций Бц, соответствующих МДУ [22].

Система прямого ИФА. Базовыми компонентами этой системы являлись кроличьи антитела к Бц, опосредованно иммобилизованные на внутренней поверхности лунок микропланшета через адсорбированный антикроличий иммуноглобулин, а также растворенный Бц и конъюгат Бц-ПХ в жидкой фазе. Полученный тройной комплекс формируется в одну стадию, количество пероксидазного фрагмента в нем зависит от концентрации внесенного в систему Бц и обуславливает интенсивность окрашивания раствора продуктом ферментативной реакции. Термин «прямой» означает, что в ИФА этой конструкции комплекс антитела с определяемым антигеном метится ферментом напрямую в ходе одной реакции. В литературе имеются сведения о применении тест-систем прямого ИФА для количественного определения Бц в кормах [18] и в плазме крови животных [19]. Важной отличительной характеристикой разработанной нами системы является опосредованная иммобилизация кроличьих антител к Бц через антивидовые поликлональные антитела овцы. При таком иммунохимическом способе иммобилизации «автоматически» происходит выделение иммуноглобулина из антисыворотки к Бц и его специфическое связывание с твердой поверхностью, функционализированной вторичными антителами. Кроме того, сохраняется нативная конформация первичных антител и обеспечивается пространственная доступность их антигенсвязывающих сайтов не только для малой молекулы Бц, но и для высокомолекулярного конъюгата Бц-ПХ.

При оптимальном соотношении количества иммобилизованных анти-Бц антител и содержания конъюгированного с ферментом Бц в жидкой фазе получена градуировочная кривая, рабочий диапазон которой ($IC_{50} = 2,5$ нг/мл) позволяет измерять концентрации Бц меньшие, равные и большие МДУ, после экстракции антибиотика из образца любого контролируемого продукта (рис. 3).

Определены также некоторые дополнительные характеристики качества прямого ИФА с использованием буферных растворов с точными концентрациями Бц. Средняя OP_{450} для градуировочного раствора, не содержащего Бц (B_0 , связывание Бц-ПХ в отсутствие конкурентного ингибитора), составила 2,0 оптических единиц. Расчет минимальной достоверно определяемой концентрации Бц в буферном растворе дал значение 0,3 нг/мл. КВ для градуировочной пробы из середины рабочего диапазона в условиях изменяющегося фактора оператор–время, оказался равным 7,1 %.

Далее оптимизированная система прямого ИФА была исследована нами в качестве прототипа готового иммуноферментного набора для практического использования. Важнейшим тестом на пригодность иммуноаналитической системы к практическому применению является испытание на открытие внесенной добавки определяемого антигена в тот или иной исследуемый матрикс с расчетом степени извлечения R_m . Результаты выполненного теста с использованием различных продуктов показаны в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что степень извлечения Бц из разных матриксов варьируется от 84,1 до 114,4 %, что следует считать хорошим результатом теста [26, 27, 29].

На базе тест-системы прямого ИФА создан иммуноферментный набор расфасованных, упакованных и маркированных реагентов, готовый к долговременному хранению, транспортированию и применению в практике производственных, испытатель-

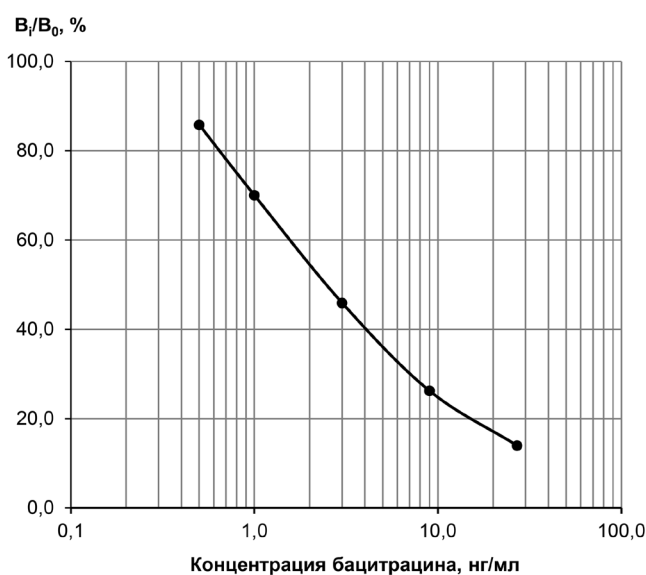


Рис.3. Типичный градуировочный график прямого ИФА

Fig. 3. Calibration curve of bacitracin direct ELISA

ных и контрольных лабораторий. Набор включает 3 главных реагента (микропланшетный иммуносорбент, градуировочные растворы, конъюгат) и 6 или 7 вспомогательных компонентов (буфер для разбавления, 2 буфера для экстракции, моющий буфер, субстрат и хромоген или их смесь, стоп-реагент). Товарная форма набора получила наименование «Тест-система ПРОДОСКРИН® ИФА-Бацитрацин», включающее товарный знак разработчика и изготовителя – Института биологической химии НАН Беларуси.

Таблица 1. Результаты определения прямым ИФА степени извлечения бацитрацина

Table 1. Bacitracin recovery ratio obtained by direct ELISA

Номер образца	Продукт	R_m , %
1	Фарш диетический (куриный)	98,7
2	Фарш говяжий	106,9
3	Филе минтая	112,0
4	Филе скумбрии	106,0
5	Мед цветочный №1	113,7
6	Мед цветочный №2	114,4
7	Яйцо куриное С1	84,1
8	Яичный порошок	88,0

Готовый набор реагентов прошел метрологические испытания в ходе разработки и последующей валидации методики выполнения измерений массовой доли Бц в различных видах продуктов животного происхождения. Разработка включала пробоподготовку (экстракция и разведение), процедуру ИФА, компьютерную обработку результатов ИФА, экспериментальные исследования и расчеты метрологических показателей.

В соответствии с требованиями действующих стандартов определены вероятностные границы погрешности измерений с учетом всех стадий измерительного процесса, а также систематических и случайных погрешностей измерений массовой доли Бц в животноводческой продукции с использованием иммуноферментного набора ПРОДОСКРИН® ИФА-Бацитрацин. Основные результаты приведены в табл. 2.

Таблица 2. Метрологические характеристики методики выполнения измерений содержания бацитрацина в продукции животноводства набором реагентов ПРОДОСКРИН® ИФА-Бацитрацин

Table 2. Metrological characteristics of the method for measuring bacitracin content in products of animal origin by PRODOSCREEN® IFA-Bacitracin reagent kit

Вид продукции	Диапазон измерений массовой доли бацитрацина, мкг/кг	Относительное стандартное отклонение повторяемости, σ_r , %	Относительное стандартное отклонение промежуточной прецизионности, $\sigma_{I(ГО)}$, %	Относительная расширенная неопределенность, U , % $K = 2, P = 95\%$
Мясо, в том числе птицы, мясные и мясосодержащие продукты	от 9,0 до 405,0 включительно	6,1	7,4	16
Субпродукты, в том числе птичьих, и продукты их переработки; сало, в том числе шпик		7,8	8,3	18
Молоко		6,8	7,6	18
Пищевая продукция аквакультуры животного происхождения (рыба, креветки)		6,2	7,7	16
Яйца птицы, сухие и жидкие яичные продукты		6,7	8,0	16
Мед		5,9	8,0	18

На базе Інстытута мяса-молочнай прамысловасці праведзена вальдацыя разрабтаннай МВІ. Падтверджаны прэдел колькасцёвага вызначэння бацытрацына во всех відах матрыц на ўровне 9,0 мкг/кг, дыяпазон прымянення МВІ ад 9,0 да 405 мкг/кг, устаноўлена прыемлемая павторяемасць і внутрылабараторная вольпрыводнасць рэзультатаў ізмэрэнняў, расчытана степенъ ізвлечэння Бц із прадукцыі жывотнага прысходжэння для падтвержджэння правільнасці мэтада. Палученыя рэзультатаў паказалі, што выбранны мэтад аналіза моль прымяняцца іспытательнымі лабараторыямі пры правядзенні скрынінговых ісследований садржання бацытрацына в піщевых прадуктах і прадовольствённым сырьё жывотнага прысходжэння мэтадам ІФА с іспользаваннем набора рэагентаў ПРОДОСКРИН® ІФА-Бацытрацын.

Заклученне. Трём разнымі спосабамі сінтэзаваны конъюгаты Бц с КЛН, Тг і ПХ. Поликлональные антители к Бц выработаны у кроликов путем введения животным Бц, присоединенного к КЛН, в качестве эффективного иммуногена. Эти высокоспецифичные антители обладали способностью связываться из раствора с конъюгатом Бц-Тц, физически адсорбированным в лунках полистирольного микропланшета, или после иммунохимической иммобилизации на твердой фазе взаимодействовать с Бц-ПХ в растворе. Найдено, что обе реакции антител с конъюгированными антигенами конкурентно ингибируются Бц, внесенным в раствор в наномолярных концентрациях. На основе полученных и охарактеризованных иммунореагентов созданы оптимизированные системы непрямого и прямого ИФА. Первая система послужила моделью в параллельной разработке тест-системы для ИХА Бц в молоке, а вторая более простая и чувствительная в данной работе трансформирована в готовый иммуноферментный набор «Тест-система ПРОДОСКРИН® ИФА-Бацытрацын» для количественного определения Бц в продовольственном сырьё и продуктах животноводства. Разработана, метрологически аттестована и прошла вальдацыю в іспытательной лабараторыі мэтадыка, котарая устанавлівае дыяпазон ізмэрэнняў садржання Бц ад 9,0 да 405,0 мкг/кг с надлежачей правільнасцю і тачнасцю в расшырэнном перечне прадовольствённага сырьё і прадуктах яго пераработкі, вклучающем 14 найменований.

Благодарности. Работа выполнена в рамках задания 13 подпрограммы 8 государственной программы «Наукоемкие технологии и техника на 2016–2020 гг.» и при частичной поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (проект БРФФИ-РФФИ Х18Р-060).

Acknowledgements. This work has been performed as a part of project 13 of the subprogram 8 of the state program “High technologies and technics for 2016–2020” and with the partial financial support of the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (BRFFR-RFFR project X18P-060).

Список использованных источников

1. Johnson, B. A. Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group / B. A. Johnson, H. Anker, F. L. Meloney // *Science*. – 1945. – Vol. 102, N 2650. – P. 376–377. <https://doi.org/10.1126/science.102.2650.376>
2. Клёнова, И. Ф. Ветеринарные препараты в России: справочник / И. Ф. Клёнова, Н. А. Яременко. – М.: Сельхозиздат, 2001. – 543 с.
3. Structures of bacitracin A and isolated congeners: Sequencing of cyclic peptides with blocked linear side chains by electrospray ionization mass spectrometry / M.M. Siegel [et al.] // *Biol. Mass Spectrom.* – 1994. – Vol. 23, N 4. – P. 186–204. <https://doi.org/10.1002/bms.1200230403>
4. Binding of nickel and zinc ions to bacitracin A / D. A. Scogin [et al.] // *Biochemistry*. – 1980. – Vol. 19, N 14. – P. 3348–3352. <https://doi.org/10.1021/bi00555a038>
5. Ming, L.-J. Metal binding and structure–activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin / L.-J. Ming, J. D. Epperson // *J. Inorg. Biochem.* – 2002. – Vol. 91, N 1. – P. 46–58. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(02\)00464-6](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(02)00464-6)
6. X-Ray structure of the antibiotic bacitracin A / S. Pfeffer [et al.] // *FEBS Lett.* – 1991. – Vol. 285, N 1. – P. 115–119. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80738-O](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80738-O)
7. Composition of, method of producing and method of using a stabilized formulation for assaying peroxide activity: Patent US 5206150 / H.-Y. Tai. – Publ. date 27. 04.1993.
8. Total Structures and Antimicrobial Activity of Bacitracin Minor Components / Y. Ikai [et al.] // *J. Antibiot.* – 1995. – Vol. 48, N 3. – P. 233–242. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.233>
9. Pavli, V. Fast separation of bacitracin on monolithic silica columns / V. Pavli, V. Kmetec // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2004. – Vol. 36, N 2. – P. 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.06.028>
10. Pavli, V. Pathways of Chemical Degradation of Polypeptide Antibiotic Bacitracin / V. Pavli, V. Kmetec // *Biol. Pharm. Bull.* – 2006. – Vol. 29, N 11. – P. 2160–2167. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.06.028>
11. Sin, D. W. Analytical methodologies for identifying a polypeptide antibiotic / D. W. Sin, Y. Wong // *TrAC, Trends Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 22, N 11. – P. 799–809. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01204-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01204-4)

12. The assay of bacitracin / G. D. Darker [et al.] // *J. Am. Pharm. Assoc. (Scientific ed.)*. – 1948. – Vol. 37, N 4. – P. 156–160. <https://doi.org/10.1002/jps.3030370409>
13. Analysis of bacitracin and its related substances by liquid chromatography tandem mass spectrometry / S. A. Suleiman [et al.] // *J. Pharm. Anal.* – 2017. – Vol. 7, N 1. – P. 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.06.001>
14. Sarri, A. K. Development of a novel liquid chromatography — Evaporative light scattering detection method for bacitracins and applications to quality control of pharmaceuticals / A. K. Sarri, N. C. Megoulas, M. A. Koupparis // *Anal. Chim. Acta.* – 2006. – Vol. 573–574. – P. 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.05.042>
15. High-performance liquid chromatography determination of Zn-bacitracin in animal feed by post-column derivatization fluorescence detection / L. F. Capitan-Vallvey [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2002. – Vol. 943, N 2. – P. 227–234. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)01442-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)01442-x)
16. Gallagher, J. B. High pressure liquid chromatographic determination of bacitracin in premix feeds and finished feeds: collaborative study / J. B. Gallagher, P. W. Love, L. L. Knotts // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* – 1982. – Vol. 65, N 5. – P. 1178–1185. <https://doi.org/10.1093/jaoac/65.5.1178>
17. Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry / D. Sin [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – Vol. 535, N 1-2. – P. 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.063>
18. Situ, C. Simultaneous and rapid detection of five banned antibiotic growth promoters by immunoassay / C. Situ, C. T. Elliott // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – Vol. 529, N 1–2. – P. 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.08.013>
19. Enzyme immunoassay using peroxidase as a label and a dip-strip test for monitoring residual bacitracin in chicken plasma / M. Matsumoto [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 1997. – Vol. 346, N 2. – P. 207–213. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00110-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00110-4)
20. Кононенко, Г. П. Методы санитарного контроля животноводческой продукции. Сообщение II. Иммуноферментный анализ бацитрацина / Г. П. Кононенко, А. А. Буркин // *Сельскохозяйственная биология.* – 2010. – № 6. – С. 88–93.
21. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of zinc bacitracin in animal feedingstuffs / C. Williams [et al.] // *Analyst.* – 1994. – Vol. 119, N 3. – P. 427–430. <https://doi.org/10.1039/an9941900427>
22. Иммунохроматографический экспресс-тест на содержание полипептидного антибиотика бацитрацина в молоке / Т. С. Серченя [и др.] // *Белорусские лекарства: материалы Междунар. науч.-практ. конф. Минск, 10–11 октября 2019 г / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси.* – Минск: издатель А. Н. Вараксин, 2019. – С. 140–143.
23. Hermanson, G. T. *Bioconjugate techniques* / G. T. Hermanson. – 3rd ed. – Amsterdam: Academic Press, Elsevier, 2013. – 1200 p.
24. Galardy, R. E. Tritium-hydrogen exchange of bacitracin A. Evidence for an intramolecular hydrogen bond / R. E. Galardy, M. P. Printz, L. C. Craig // *Biochemistry.* – 1971. – Vol. 10, N 13. – P. 2429–2436. <https://doi.org/10.1021/bi00789a001>
25. Delincée, H. Fractionation of horseradish peroxidase by preparative isoelectric focusing, gel chromatography and ion-exchange chromatography / H. Delincée, B. J. Radola // *Eur. J. Biochem.* – 1975. – Vol. 52, N 2. – P. 321–330. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb04000.x>
26. Leonard, P. Immunoassay validation / P. Leonard // *Immunoassays: development, applications and future trends* / Eds. R. O’Kennedy, C. Murphy. – New York: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., 2017. – P. 89–115. <https://doi.org/10.1201/9781315206547-4>
27. Vashist, S. K. Bioanalytical requirements and regulatory guidelines for immunoassays / S. K. Vashist, J. H. T. Luong // *Handbook of immunoassay technologies* / Eds. S. K. Vashist, J. H. T. Luong. – Academic Press, Elsevier, 2018. – P. 81–95. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811762-0.00004-9>
28. Руководство ЕВРАХИМ/СИТАК. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях / под общ. ред. Л. А. Конопелько. – 2-е изд. – СПб.: ВНИИМ им. Д. И. Менделеева, 2002. – 149 с.
29. Barwick, V. J. VAM Project 3.2.1. Development and Harmonisation of Measurement. Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data / V. J. Barwick, S. L. R. Ellison. – LGC (Teddington) Ltd, 2000. – 87 p.
30. Immunochromatographic assay with photometric detection for rapid determination of the herbicide atrazine and other triazines in foodstuffs / N. A. Byzova [et al.] // *J. AOAC Int.* – 2010. – Vol. 93, N 1. – P. 36–43. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.1.36>
31. Immunochromatographic technique for express determination of ampicillin in milk and dairy products / N. A. Byzova [et al.] // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2011. – Vol. 47, N 6. – P. 627–634. <https://doi.org/10.1134/s0003683811060032>

References

1. Johnson B. A., Anker H., Meloney F. L. Bacitracin: a new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group. *Science*, 1945, vol. 102, no. 2650, pp. 376–377. <https://doi.org/10.1126/science.102.2650.376>
2. Klyonova I. F., Yaryomenko N. A. *Veterinary preparations in Russia*. Moscow, Sel’khozizdat Publ., 2001. 543 p (in Russian).
3. Siegel M. M., Huang J., Lin B., Tsao R., Edmonds C. G. Structures of bacitracin A and isolated congeners: Sequencing of cyclic peptides with blocked linear side chains by electrospray ionization mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, 1994, vol. 23, no. 4, pp. 186–204. <https://doi.org/10.1002/bms.1200230403>
4. Scogin D. A., Mosberg H. I., Storm D. R., Gennis R. B. Binding of nickel and zinc ions to bacitracin A. *Biochemistry*, 1980, vol. 19, no. 14, pp. 3348–3352. <https://doi.org/10.1021/bi00555a038>

5. Ming L.-J., Epperson J. D. Metal binding and structure–activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2002, vol. 91, no. 1, pp. 46–58. [https://doi.org/10.1016/s0162-0134\(02\)00464-6](https://doi.org/10.1016/s0162-0134(02)00464-6)
6. Pfeffer S., Höhne W., Branner S., Wilson K., Betzel C. X-Ray structure of the antibiotic bacitracin A. *FEBS Letters*, 1991, vol. 285, no. 1, pp. 115–119. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80738-O](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80738-O)
7. Tai H.-H. *Composition of, method of producing and method of using a stabilized formulation for assaying peroxide activity*. Patent US no. 5206150. Publ. date 27 April 1993.
8. Ika Y., Oka H., Hayakawa J., Matsumoto M., Saito M., Harada K.-I., Mayumi T., Suzuki M. Total structures and antimicrobial activity of bacitracin minor components. *Journal of Antibiotics*, 1995, vol. 48, no. 3, pp. 233–242. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.233>
9. Pavli V., Kmetec V. Fast separation of bacitracin on monolithic silica columns. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2004, vol. 36, no. 2, pp. 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.06.028>
10. Pavli V., Kmetec V. Pathways of Chemical Degradation of Polypeptide Antibiotic Bacitracin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2006, vol. 29, no. 11, pp. 2160–2167. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.06.028>
11. Sin D. W., Wong Y. Analytical methodologies for identifying a polypeptide antibiotic. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2003, vol. 22, no. 11, pp. 799–809. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01204-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01204-4)
12. Darker G. D., Brown H. B., Free A. H., Biro B., Goorley J. T., Free A. H. The assay of bacitracin. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*, 1948, vol. 37, no. 4, pp. 156–160. <https://doi.org/10.1002/jps.3030370409>
13. Suleiman S. A., Song F., Su M., Hang T., Song M. Analysis of bacitracin and its related substances by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2017, vol. 7, no. 1, pp. 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.06.001>
14. Sarri A. K., Megoulas N. C., Koupparis M. A. Development of a novel liquid chromatography — Evaporative light scattering detection method for bacitracins and applications to quality control of pharmaceuticals. *Analytica Chimica Acta*, 2006, vol. 573–574, pp. 250–257. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.05.042>
15. Capitan-Vallvey L. F., Titos A., Checa R., Navas N. High-performance liquid chromatography determination of Zn-bacitracin in animal feed by post-column derivatization fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 2002, vol. 943, no. 2, pp. 227–234. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)01442-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)01442-x)
16. Gallagher J. B., Love P. W., Knotts L. L. High pressure liquid chromatographic determination of bacitracin in premix feeds and finished feeds: collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists (USA)*, 1982, vol. 65, no. 5, pp. 1178–1185. <https://doi.org/10.1093/jaoac/65.5.1178>
17. Sin D. W., Clare H., Wong Y.-C., Ho S.-K., Ip A. C. Analysis of major components of residual bacitracin and colistin in food samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2005, vol. 535, no. 1–2, pp. 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.11.063>
18. Situ C., Elliott C. T. Simultaneous and rapid detection of five banned antibiotic growth promoters by immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, 2005, vol. 529, no. 1–2, pp. 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.08.013>
19. Matsumoto M., Tsunematsu K., Tsuji A., Kido Y. Enzyme immunoassay using peroxidase as a label and a dip-strip test for monitoring residual bacitracin in chicken plasma. *Analytica Chimica Acta*, 1997, vol. 346, no. 2, pp. 207–213. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00110-4](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00110-4)
20. Kononenko G. P., Burkin A. A. Methods of sanitary surveillance for livestock production. Communications II. Enzyme immunoassay (eia) of bacitracin. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya = Agricultural Biology*, 2010, no. 6, pp. 88–93 (in Russian).
21. Williams C., Patel I., Willer C. J., Crosby N. T. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of zinc bacitracin in animal feedingstuffs. *Analyst*, 1994, vol. 119, no. 3, pp. 427–430. <https://doi.org/10.1039/an9941900427>
22. Serchenya T. S., Byzova N. A., Vashkevich I. I., Zherdev A. V., Dzantiev B. B., Sviridov O. V. An immunochromatographic rapid test for the detection of polypeptide antibiotic bacitracin in milk. *Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya «Belorusskie lekarstva» [International Scientific and Practical Conference «Belarusian Medicines»]*. Minsk, 2019, pp. 140–143 (in Russian).
23. Hermanson G. T. *Bioconjugate techniques*, 3rd edn. Amsterdam, Academic Press, Elsevier, 2013. 1200 p. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64240-9>
24. Galaray R. E., Printz M. P., Craig L. C. Tritium-hydrogen exchange of bacitracin A. Evidence for an intramolecular hydrogen bond. *Biochemistry*, 1971, vol. 10, no. 13, pp. 2429–2436. <https://doi.org/10.1021/bi00789a001>
25. Delincée, H., Radola, B. J. Fractionation of horseradish peroxidase by preparative isoelectric focusing, gel chromatography and ion-exchange chromatography. *European Journal of Biochemistry*, 1975, vol. 52, no. 2, pp. 321–330. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb04000.x>
26. Leonard P. Immunoassay validation. O'Kennedy R., Murphy C. (eds.) *Immunoassays: development, applications and future trends*. New York, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd, 2017, pp. 89–115. <https://doi.org/10.1201/9781315206547-4>
27. Vashist S. K., Luong J. H. T. Bioanalytical requirements and regulatory guidelines for immunoassays. *Handbook of immunoassay technologies*. Academic Press, Elsevier, 2018, pp. 81–95. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811762-0.00004-9>
28. Konopelko L.A. (ed.) *Guideline EURACHIM / CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. St. Petersburg, VNIIM D.I. Mendeleyeva, 2002. 149 p. (in Russian).
29. Barwick V. J., Ellison S. L. R. *VAM Project 3.2.1. Development and Harmonisation of Measurement. Uncertainty Principles. Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data*. LGC (Teddington) Ltd., 2000. 87 p.

30. Byzova N. A., Zvereva E. A., Zherdev A. V., Dzantiev B. B. Immunochromatographic assay with photometric detection for rapid determination of the herbicide atrazine and other triazines in foodstuffs. *Journal of AOAC International*, 2010, vol. 93, no. 1, pp. 36–43. <https://doi.org/10.1093/jaoac/93.1.36>

31. Byzova, N. A., Zvereva, E. A., Zherdev, A. V., Dzantiev, B. B. Immunochromatographic technique for express determination of ampicillin in milk and dairy products. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, vol. 47, no. 6, pp. 627–634. <https://doi.org/10.1134/s0003683811060032>

Информация об авторах

Вашкевич Ирина Игнатьевна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vashkevich@iboch.by

Ястребова Анна Андреевна – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yastrebova@iboch.by

Куприенко Ольга Сергеевна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kuprienko@iboch.by

Серченя Татьяна Сергеевна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: serchenya@iboch.by

Иванько Мария Валерьевна – мл. науч. сотрудник. Институт мясо-молочной промышленности (Партизанский просп., 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ivanko.m-a@yandex.ru

Шкиндерова Валерия Олеговна – инженер-микробиолог. Институт мясо-молочной промышленности (Партизанский просп., 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ric-2010@yandex.ru

Пыжик Инесса Павловна – зав. сектором. Институт мясо-молочной промышленности (Партизанский просп., 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ric-2010@yandex.ru

Смоляк Татьяна Михайловна – зав. лаб. Институт мясо-молочной промышленности (Партизанский просп., 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ric-2010@yandex.ru

Мелещенко Алексей Викторович – канд. эконом. наук, директор Института мясо-молочной промышленности (Партизанский просп., 172, 220075, Минск, Республика Беларусь). E-mail: info@instmmp.by

Свиридов Олег Васильевич – д-р хим. наук, зав. лаб. Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sviridov@iboch.by

Information about the authors

Irina I. Vashkevich – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vashkevich@iboch.by

Anna A. Yastrebova – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yastrebova@iboch.by

Olga S. Kuprienko – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kuprienko@iboch.by

Tatyana S. Serchenya – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: serchenya@iboch.by

Mariya V. Ivan'ko – Junior Researcher, Scientific Production Republican Subsidiary Unitary Enterprise «Institute of Meat and Dairy Industry» (172, Partizansky Ave., 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ivanko.m-a@yandex.ru

Valeriya O. Shkinderova – Microbiologist Engineer. Scientific Production Republican Subsidiary Unitary Enterprise «Institute of Meat and Dairy Industry» (172, Partizansky Ave., 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ric-2010@yandex.ru

Inessa P. Pyzhik – Head of the Sector. Scientific Production Republican Subsidiary Unitary Enterprise «Institute of Meat and Dairy Industry» (172, Partizansky Ave., 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ric-2010@yandex.ru

Tatyana M. Smolyak – Head of the Laboratory. Scientific Production Republican Subsidiary Unitary Enterprise «Institute of Meat and Dairy Industry» (172, Partizansky Ave., 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ric-2010@yandex.ru

Alexey V. Meleshchenya – Ph. D. (Economics), director Scientific Production Republican Subsidiary Unitary Enterprise «Institute of Meat and Dairy Industry» (172, Partizansky Ave., 220075, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: info@instmmp.by

Oleg V. Sviridov – D. Sc. (Chemistry), Head of the Laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sviridov@iboch.by