

С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің Ғылым жаршысы (пәнаралық) =Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина (междисциплинарный). -2022 -№1 (112). – С. 289-300

ИММУНОАНАЛИЗ АНТИБИОТИКОВ В ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОВОДСТВА

Булашев Айтбай Кабыкешович
Доктор ветеринарных наук, профессор,
Казахский агротехнический университет
им. Сакена Сейфуллина,
г. Нур-Султан, Казахстан
e-mail: aytbay57@mail.ru

Куйбагаров Марат Амангельдыевич
Кандидат ветеринарных наук,
Казахский агротехнический университет
им. Сакена Сейфуллина,
г. Нур-Султан, Казахстан
e-mail: koibagarov.ru@mail.ru

Аканова Жаннара Жұльдасовна
Кандидат ветеринарных наук,
Казахский агротехнический университет
им. Сакена Сейфуллина,
г. Нур-Султан, Казахстан
e-mail: azhzh80@mail.ru

Жагинар Фариза Сабиткызы
Магистр технических наук,
Казахский агротехнический университет
им. Сакена Сейфуллина,
г. Нур-Султан, Казахстан
e-mail: fariza140292@mail.ru

Джангулова Асем Нуржановна
Докторант факультета ветеринарии и технологии животноводства,
Казахский агротехнический университет
им. Сакена Сейфуллина,
г. Нур-Султан, Казахстан
e-mail: bekasem@bk.ru

Аннотация

Загрязнение продуктов животного происхождения антибиотиками становится одной из актуальных проблем мирового масштаба. Антибиотики, как правило, попадают в продукты питания как следствие неправильного использования их в качестве лечебно-профилактических средств или стимуляторов роста животных. Длительное употребление в пищу продуктов, содержащих остаточные количества антибиотиков, может вызвать неблагоприятные для здоровья человека последствия, а также привести к формированию антибиотикоустойчивых форм микроорганизмов. В настоящей работе был отработан метод иммунизации кроликов, позволяющий получить высокоактивные антитела, специфичные к эпитомам стрептомицина (СТР), хлорамфеникола (ХАФ) и окситетрациклина (ОТЦ), которые были использованы в конкурентном ИФА (к-ИФА) для обнаружения антибиотиков в стандартных растворах. Порог чувствительности к-ИФА при тестировании на известных концентрациях антибиотиков находился в пределах 1,5-4,5 нг/мл. Разработанный протокол постановки к-ИФА показал свою пригодность для экспресс-исследования продуктов животноводства на остаточные количества СТР, ХАФ и ОТЦ. Необходимо вести дальнейшие исследования с целью определения диагностической ценности к-ИФА в сравнении с импортными аналогами.

Ключевые слова: антибиотик; остаточное количество антибиотика; антитело; крупный рогатый скот, молоко; мясо; иммуноферментный анализ.

Введение

Антибиотики широко используются в молочном и мясном животноводстве для лечения мастита и других инфекционных заболеваний, улучшения роста и продуктивных показателей, снижения заболеваемости падежа, а также для производства большого количества высококачественной и недорогой пищи для потребления человеком. Среди антимикробных препаратов, широко используемых в животноводстве, следует отметить аминогликозиды [1]. Стрептомицин (СТР), как и канамицин и неомицин, относится к первому поколению аминогликозидов с явно выраженными бактерицидными свойствами и активными в отношении аэробных грамотрицательных бактерий. Они

часто используются для лечения маститов, энтерита, вызванного чувствительными к этому веществу микроорганизмами, некоторых кожных и глазных заболеваний, вагинальных инфекций, местных инфицированных ран и других патологий [2].

Среди восьми имеющихся в продаже тетрациклинов чаще всего применяется окситетрациклин (ОТЦ), который в ветеринарии доступен в четырех основных формах: инъекционные препараты, растворимые порошки, таблетки и кормовые премиксы. Они применяются не только для лечения и профилактики инфекционных заболеваний животных, вызываемыми бактериальными патогенами, но и для улучшения прироста скота и

птиц, а также увеличения производства молока у молочных коров [3].

Хлорамфеникол (ХАФ) является антибиотиком широкого спектра действия и обладает высоким антибактериальным и фармакокинетическим свойствами. В ветеринарии он применяется для лечения животных и птицы, больных желудочно-кишечными заболеваниями, а также болезней дыхательных путей [4].

Бесконтрольное и неправильное применение антибиотиков в продуктивном животноводстве приводит к их транзиту по пищевой цепи и накоплению остаточных количеств противомикробных препаратов в пищевых продуктах [5], что может вызвать негативное воздействие на здоровье потребителей в виде аллергии, развития устойчивости к антибиотикам, заболеваний желудочно-кишечного тракта, кандидоза и других патологий [6]. Например, известна высокая нефро- и ототоксичность аминогликозидов [7]. ХАФ при поступлении в организм человека может проявлять гемотоксические свойства и, что особенно опасно, провоцировать апластическую анемию. Дозы хлорамфеникола, способные вызывать эти проявления, до сих пор не определены. Ряд исследований показали, что остатки антибиотиков отрицательно влияют на производство кисломолочных продуктов, а именно увеличивает время свертывания сычужного фермента, снижает продукцию диацетила, ингибирует продукцию

молочной кислоты [8], задерживает процесс созревания сыра и нарушает активность щелочной фосфатазы [9], а в некоторых случаях – является причиной ложноположительного теста на щелочную фосфатазу из-за термостойкой фосфатазы микробного происхождения [10] и др. Для охраны здоровья населения от побочных эффектов антибиотиков установлены предельно допустимые количества (ПДК) антибиотиков в пищевых продуктах [11]. Для мониторинга уровня контаминации молока антибиотиками предложены микробиологические анализы, инструментальные методы и иммунологические реакции. Микробиологические анализы характеризуются низкой чувствительностью и специфичностью [12], в то время как инструментальные методы, такие как высокоэффективная жидкостная хроматография, жидкостная хроматография-масс-спектрометрия и жидкостная хроматография-тандемная масс-спектрометрия, являются дорогостоящими, трудоемкими и требуют сложной пробоподготовки и обученного персонала [13]. Кроме того, они не подходят для использования в полевых условиях, несмотря на преимущества в чувствительности и мультиплексной детекции антибиотиков, а также не пригодны для массового скрининга образцов пищевых продуктов [14].

Целью настоящей работы явилось приготовление реагентов конкурентного

иммуноферментного анализа (к-ИФА) и испытание его диагностической ценности для

обнаружения СТР, ОТЦ и ХАФ в образцах молока и мяса крупного рогатого скота (КРС).

Материалы и методы

Лабораторные животные. В работы были использованы 6 гол. кроликов-самцов советской шиншиллы (6 месяцев, масса тела 3300-3500 г). Животные содержались в благоприятных гигиенических условиях в виварий КазАТУ, получали пищу и воду вволю. Все мероприятия с животными были одобрены Комитетом по этике животных факультета ветеринарии и технологии животноводства КазАТУ и проводились в соответствии Правилами содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (Межгосударственный стандарт, ГОСТ 33216-2014).

Белки-носители. В качестве высокомолекулярных белков-носителей для конъюгации антибиотиков были использованы бычий сывороточный альбумин (БСА) (Jackson Immuno Research, West Baltimore Pike, США) и овальбумин (ОВА) (Sigma-Aldrich, St. Louis, США).

Антибиотики. В работе были использованы следующие антибиотики: ХАФ (Panreac, Barcelona, Испания), СТР в виде стрептомицина сульфата (ОАО «Синтез», Курган, Россия) и ОТЦ в форме окситетрациклина гидрохлорида (ЗАО НПП «Агрофарм», Воронеж, Россия).

Приготовление конъюгатов антибиотиков с белками-носителями. Синтез конъюгатов

СТР и ХАФ с БСА и/или ОВА проводили по методике [15] с некоторыми изменениями. Для этого СТР (70 мг) смешивали с 10 мг белка носителя в 1,5 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и к этой смеси добавляли 14 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-гидрохлорид карбодиимида. Инкубировали при комнатной температуре в течение ночи.

Синтез конъюгатов ОТЦ с БСА и/или ОВА проводили с помощью реакции Манниха (Mannichreaction) [16] с некоторыми изменениями. Для этого растворяли 5 мг ОТЦ в растворе этанола и дистиллированной воды (2:1), добавляли в раствор белок-носитель (БСА и/или ОВА), растворенного в 0,3 мл дистиллированной воды. Вносили в раствор 3М ацетат натрия (рН 5,5) и 7,5 % формальдегида. Смесь инкубировали при комнатной температуре в течение ночи.

Иммунизация кроликов. Иммуноген – конъюгат антибиотика (ХАФ, СТР или ОТЦ) с БСА вводили подкожно в область спины в дозе 0,5 мг белка на голову в нескольких точках в объеме 1 мл на 0, 7, 14, 21 дни. В качестве иммуностимулятора использовали неполный адъювант Фрейнда (Sigma-Aldrich, St. Louis, США). Иммунную сыворотку отбирали на 10 день после

последней иммунизации и хранили при -20°C до использования.

Очистка антител. Антитела из сыворотки крови очищали методом высаливания насыщенным раствором сульфата аммония (AppliChem, Darmstadt, Германия). Для этого к сыворотке крови добавляли равный объем ФСБ с рН 7,4. Затем вносили равный объем насыщенного раствора сульфата аммония и оставляли при перемешивании на 12 час. при 4°C . Антитела осаждали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 15 мин. при 4°C . Осадок иммуноглобулинов ресуспендировали в минимальном объеме ФСБ (рН 7,2-7,4) и диализовали против этого же буфера в течение суток. Далее для освобождения сыворотки крови кролика от антител, специфичных к антигенным детерминантам БСА, нами было проведено истощение сыворотки по общеизвестному методу Кастеллани с некоторыми изменениями [17]. Титр антител против использованных антибиотиков определяли в непрямом ИФА. В качестве антигена для сенсibilизации планшета использовали конъюгаты антибиотиков с ОВА.

Образцы продуктов животноводства. Для определения диагностической ценности к-ИФА был осуществлен отбор образцов молока коров и мяса крупного рогатого скота (КРС) в количестве 200 и 150 проб, соответственно.

Подготовка мышечной ткани. Образец материала гомогенизировали в ступке, добавляли дистиллированную воду

в соотношении 1:2 и перемешивали в течение 10 мин на качалке. Затем добавляли ацетон в соотношении 1:1, повторно перемешивали в течение 10 мин. и центрифугировали при 3000 об/мин. (10 мин.). Полученную водную фазу использовали для исследования на наличие антибиотиков.

Пробоподготовка молока. Молоко в объеме 5 мл охлаждали до 8°C , переносили в стеклянную центрифужную пробирку и центрифугировали при $4-12^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин при 3000 об/мин. Удаляли верхний слой жира и переносили аликвоту обезжиренного молока в чистую пробирку.

Постановка конкурентного варианта ИФА (к-ИФА). Вкратце, лунки планшета (Nunc, Roskilde, Дания) сенсibilизировали конъюгатом определенного антибиотика с ОВА в диапазонах концентрации 0,005-0,02 мг/мл в карбонатном-бикарбонатном буфере (КББ), рН 9,5,) и/или ФСБ (рН 7,2). Инкубацию проводили в течение 10, 16, 24 ч при 4°C или 2 ч при 37°C . Для удаления несвязавшегося антигена планшет отмывали 3 раза ФСБ с содержанием 0,05% твина-20 (ФСБ-Тв). Далее в лунки планшета вносили по 0,05 мл стандартных растворов антибиотика (ХАФ, СТР и/или ОТЦ) в концентрациях 0; 0.5; 1.5; 4.5; 13.5; 40.5 нг/мл или подготовленные к исследованию образцы молока/мяса. Затем добавляли по 0,05 мл раствора антител к определенному

антибиотик, перемешивали легкими круговыми движениями по поверхности стола и оставляли на инкубацию в течение 2-х часов при комнатной температуре. Далее, в лунки вносили по 0,05 мл раствора антикроличьего (IgG) конъюгата (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), повторяли процедуру отмывки для удаления несвязанных продуктов анализа и реакцию проявляли субстратом фермента – тетраметилбензидином (ЗАО «НВО Иммунотех», Москва, Россия). Реакцию останавливали

добавлением в лунки планшет раствора 0,5М серной кислоты. Результаты к-ИФА учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света (ASYSExpert 96, Eugendorf, Австрия) при длине волны 450 нм.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку титров кроличьих антител против использованных для иммунизации антибиотиков проводили по методике, описанной Т. С. Сайдулдиным [18].

Результаты

Конъюгаты антибиотиков, использованные при иммунизации кроликов, обладали достаточной антигенностью и вызывали выработку специфических антител у иммунизированных животных в достаточно высоких титрах (таблица 1).

Таблица 1 – Активность сывороточных антител противСТР, ХАФ и ОТЦ

| Инвентарные номера кроликов | Титры анти-СТР сыворотки* | | | | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|--------|-----|---------------------|-------|-----|
| | до адсорбции | | | после адсорбции | | |
| | Антигены, использованные в н-ИФА | | | | | |
| | Конъюгат СТР-ОВА | БСА | ОВА | Конъюгат СТР-ОВА | БСА | ОВА |
| 1 | 1:6400 | 1:1600 | - | 1:1600 | 1:100 | - |
| 2 | 1:3200 | 1:800 | - | 1:1600 | 1:400 | - |
| Инвентарные номера кроликов | Титры анти-ХАФ сыворотки | | | | | |
| | до адсорбции | | | после адсорбции | | |
| | Антигены, использованные в н-ИФА | | | | | |
| | Конъюгат ХАФ-ОВА | БСА | ОВА | Конъюгат ХАФ-ОВА | БСА | ОВА |
| 3 | 1:6400 | 1:800 | - | 1:1600 | 1:200 | - |
| 4 | 1:3200 | 1:400 | - | 1:1600 | 1:200 | - |
| Инвентарные номера кроликов | Титры анти-ОТЦ сыворотки | | | | | |
| | до адсорбции | | | после адсорбции | | |
| | Антигены, использованные в н-ИФА | | | | | |
| | Конъюгат ОТЦ-ОВА | БСА | ОВА | Конъюгат ОТЦ-ОВА | БСА | ОВА |
| 5 | 1:3200 | 1:200 | - | 1:1600 | 1:200 | - |
| 6 | 1:3200 | 1:400 | - | 1:800 | 1:100 | - |

| | | | | | | |
|---|------------------------------------|-----------------------------------|--|------------------------------------|-----------------------------------|--|
| Средние титры антител | 1:3940 (+11,7; -10,4) | 1:570 (+39,5; -28,2) | | 1:1390 (+11,7; -10,4) | 1:170 (+24,8; -19,9) | |
| *Примечание: для иммунизации были использованы конъюгаты антибиотиков с БСА | | | | | | |

Из таблицы 1 следует, что после истощения антисывороток путем удаления антител, имеющих специфичность к носителю – БСА, активность ее значительно повышается. Например, если средний титр антител против антибиотиков до адсорбции был равен 1:3940, то после удаления балластных антител данный показатель уменьшился до 1:1390. Приготовленные анти-СТР, анти-ХАФ и анти-ОТЦ антитела и конъюгаты этих препаратов с ОВА были использованы в отработке методов и условий, необходимых для детекции антибиотиков в к-ИФА.

Для отработки параметров постановки к-ИФА, позволяющего определить наименьшее количество антибиотиков в стандартных растворах, нами изучалось влияние основных физико-химических факторов (температура, ионная сила и значения рН, блокирующий буфер, продолжительность взаимодействия,

концентрационные соотношения) на ход анализа.

Сущность метода определения антибиотиков в к-ИФА была основана на конкуренции свободного антибиотика из исследуемого образца и антибиотика, предварительно иммобилизованного на твердой фазе в составе белкового конъюгата, за центры связывания специфичных к антибиотикам антител. После отделения несвязавшихся реагентов количество антител, прореагировавших с иммобилизованным антигеном, определяли с помощью антивидовых антител, меченных пероксидазой хрена. Таким образом, количество специфических антител, выявляемых антивидовым конъюгатом, находилось в обратной пропорции к концентрации антибиотика в растворе (рисунок 1).



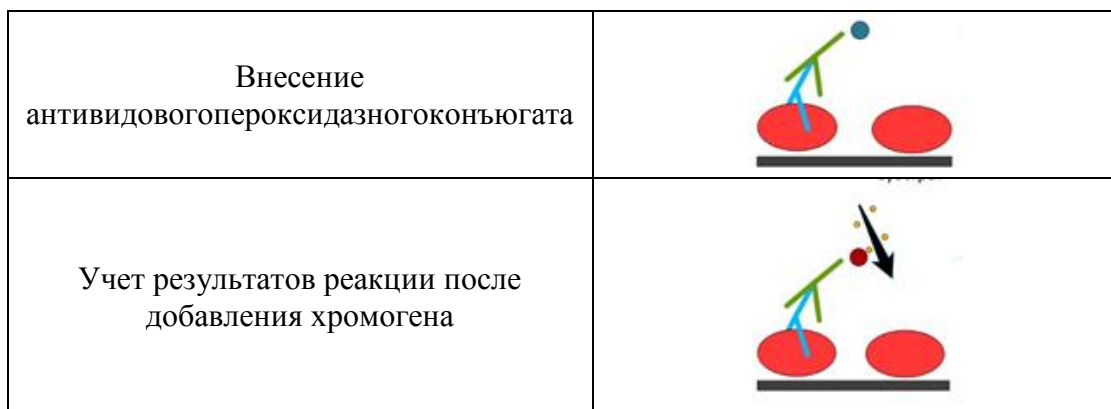


Рисунок 1 – Схема постановки к-ИФА

Постановка к-ИФА выполнялась в соответствии с методикой, описанной в разделе «Материалы и методы». Анализ с каждой стандартной концентрацией антибиотиков проводился в 3-х повторах. Средние показатели значений оптической плотности (ОП), измеренной в лунках со

стандартными растворами, делили на среднее значение ОП лунок с первым (нулевым) стандартом, и полученное число умножали на 100. Результат измерения ОП тестируемой пробы выражали в процентах от ОП лунки с нулевым стандартом (% поглощения) по формуле:

$$\frac{ОП_n}{ОП_0} * 100 = \% \text{поглощения}$$

где $ОП_n$ – среднее значение ОП в лунках со стандартной пробой;
 $ОП_0$ – среднее значение ОП лунки с нулевым стандартом.

В результате исследований были определены оптимальные параметры постановки к-ИФА:

- концентрация антигена (конъюгат антибиотиков с ОВА) – 0,01 мг/мл;
- буфер для разведения антигена – ФСБ (рН 7,2);
- инкубация антигена – 12 ч при 4°C;
- буфер для разведения растворов антибиотиков – ФСБ (рН 7,2);
- экспозиция стандартных растворов антибиотиков и раствора специфических антител – 2 ч при температуре 20-25°C.

Чувствительность к-ИФА (нг/мл) определялась путем нахождения ОП раствора с антибиотиком значения которого в 2 и более раз уступает показателю экстинции лунки без антибиотика (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты к-ИФА в зависимости от содержания антибиотиков в стандартных растворах

| Наименования антибиотиков | Концентрация антибиотиков в стандартных растворах, нг/мл | | | | | |
|---------------------------|--|-------|--------|-------|-------|-------|
| | 0 | 0,5 | 1,5 | 4,5 | 13,5 | 40,5 |
| ХАФ | ОП при 450 нм | | | | | |
| | 2,103 | 1,154 | 0,847* | 0,599 | 0,300 | 0,188 |
| | процент поглощения | | | | | |
| | | 55,0 | 40,0* | 28,0 | 14,0 | 9,0 |

| | | | | | | |
|--|--------------------|-------|--------|--------|-------|-------|
| ОТЦ | ОП при 450 нм | | | | | |
| | 2,009 | 1,024 | 0,912* | 0,499 | 0,301 | 0,119 |
| | процент поглощения | | | | | |
| | | 50,0 | 45,0* | 25,0 | 15,0 | 6,0 |
| СТР | ОП при 450 нм | | | | | |
| | 2,900 | 2,221 | 1,884 | 1,114* | 0,715 | 0,361 |
| | процент поглощения | | | | | |
| | | 76,0 | 65,0 | 38,0* | 25,0 | 12,0 |
| Примечание: * - порог чувствительности к-ИФА | | | | | | |

Полученные результаты, позволили построить калибровочные кривые, обладающие требуемой линейностью в основном диапазоне данных, и проводить обнаружения антибиотиков в исследуемых образцах (рисунок 2).

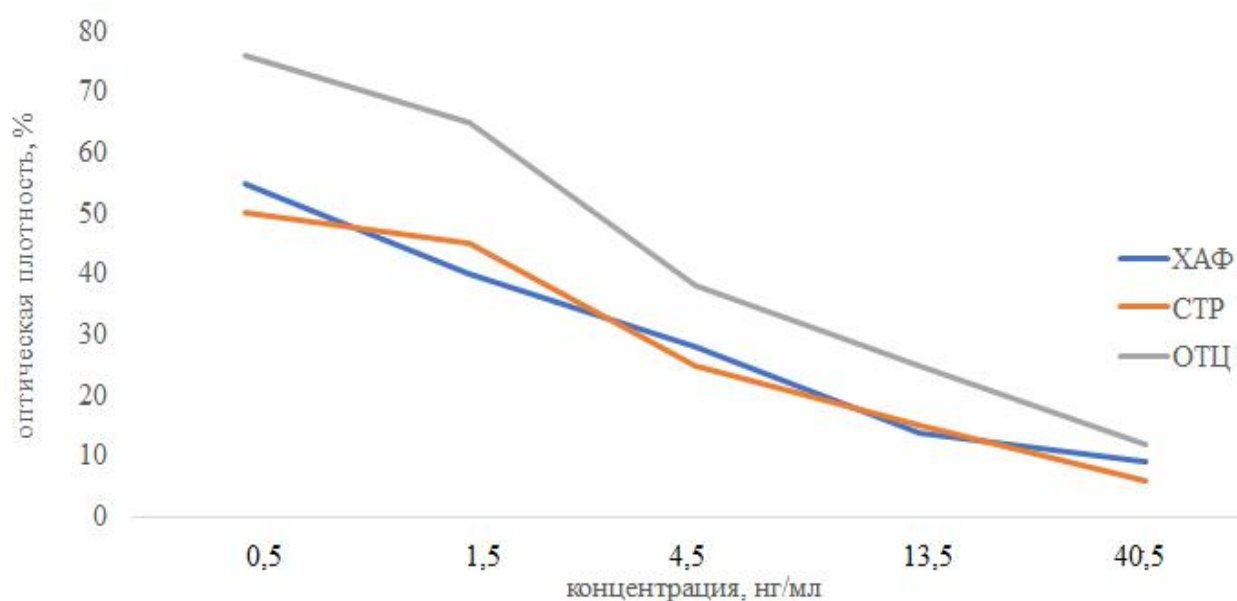


Рисунок 2 – Калибровочные кривые для стандартных растворов антибиотиков

Данные таблицы 2 и рисунка 2 показывают, что чувствительность к-ИФА равна 1,5 нг/мл и 4,5 нг/мл при детекции ХАФ/ОТЦ и СТР, соответственно.

Отработанный вариант к-ИФА был испытан на образцах продуктов животноводства, которые исследовались на наличие ХАФ, СТР и ОТЦ (таблица 3). Реакцию считали положительной, если показатель экстинции лунки с негативным контролем (проба молока или мяса КРС, не подвергнутого лечению антибактериальными препаратами за последние 3 мес.) в 2 и более раз превышал среднее значение ОП лунки исследуемым образцом (таблица 3).

Таблица 3 – Определение антибиотиков в животноводческой продукции с помощью к-ИФА

| Вид | ХАФ | СТР | ОТЦ |
|-----|-----|-----|-----|
|-----|-----|-----|-----|

| продукта | всего проб | (+) | всего проб | (+) | всего проб | (+) |
|---|------------|-----|------------|-----|------------|-----|
| молоко | 200 | 3 | 200 | 5 | 200 | 4 |
| мясо | 150 | 8 | 150 | 1 | 150 | 2 |
| Примечание: (+) – количество проб молока или мяса с положительными результатами на антибиотики. | | | | | | |

Как видно из таблицы 3, в исследуемых пробах мяса антибиотики были обнаружены в 3-5 случаях, что составляет не более 2,5% от общего количества исследованных образцов. Обращает на себя внимание относительно высокая частота обнаружения ХАФ в молоке (5,3%).

Обсуждение

Для ветеринарной практики страны нужны простые в исполнении, но достаточно чувствительные и специфичные тесты, позволяющие за короткое время определить остаточное количество антибиотиков в продуктах животноводства. Для этой цели предложены тест-системы, основанные на использовании ИФА. Директивой ЕС 2002/657 данный тест рекомендован для определения остаточных количеств ветеринарных препаратов в продуктах животноводства в странах ЕС [19]. На сегодняшний день на рынке ветеринарных препаратов имеются ИФА-наборы для определения отдельных антибиотиков, тем не менее продолжают научные работы по разработке новых тест-систем [20].

L. Anetal. (2016) описали метод к-ИФА для обнаружения флорфеникола и тиамфеникола в тканях животных и кормах с целью мониторинга незаконного использования указанных антибиотиков [21]. Исследователями установлена тесная корреляция между

результатами к-ИФА и ВЭЖХ, что позволила им сделать заключение о возможности использования иммуноанализа для контроля мяса и кормов на содержание указанных препаратов. Сравнительные исследования методов ИФА и ВЭЖХ при анализе продуктов животноводства и птицеводства, а также сырого молока на содержание ОЦ были выполнены К. Bahmanietal. (2020) [22]. ИФА не уступал ВЭЖХ по точности, однако этапы подготовки образцов у иммуноанализа были более простыми. Важным преимуществом вариантов ИФА перед инструментальными методами является то, что они не требуют дорогостоящего оборудования, упрощает этапы пробоподготовки и сокращает продолжительность анализа [23].

Использование ИФА для выявления антибиотиков в животноводческой продукции установлено нормативными документами Республики Казахстан (РК). Так, «Казстандартом» РК установлено использование ИФА-наборов в соответствии с методикой

выполнения измерений «Сырье продовольственное. Продукты питания животного происхождения. Методика выполнения исследований (МВИ) ИФА антибактериальных препаратов». Однако высокая стоимость импортных ИФА-тестов не позволяет использовать их в массовых скринингах продуктов животноводства. Так, средняя стоимость одного анализа с использованием ИФА-наборов составляет 3000 - 3700 тенге [24]. В этой связи, разработка отечественных аналогов тест-систем, основанных на иммуноанализах, является актуальной задачей ветеринарной науки страны. В настоящей работе нами был отработан метод иммунизации кроликов, позволяющий получить высокоактивные антитела,

специфичные к эпитомам СТР, ХАФ и ОТЦ. Последние были использованы в к-ИФА как детектирующий агент. При этом, свободные антибиотики в стандартных растворах конкурировали с антибиотиками, иммобилизованными к твердой фазе, за антигенсвязывающие участки антител. Порог чувствительности к-ИФА при тестировании на известных концентрациях антибиотиков был довольно высок (1,5-4,5 нг/мл). Разработанный протокол постановки к-ИФА показал свою пригодность для исследования продуктов животноводства на наличие СТР, ХАФ и ОТЦ, обнаруживая остаточные количества антибиотиков у определенного количества исследованных образцов мяса и молока (2-5%).

Заключение

Отработан метод получения высокоактивных антител против СТР, ХАФ и ОТЦ, которые могут быть использованы в разработке иммунологических тестов для определения антибиотиков в продуктах животноводства. Использованный в работе к-ИФА позволяет в течение короткого

времени (3-3,5 часа) обнаруживать остаточные количества антибиотиков в молоке и мясе КРС. Необходимо вести дальнейшие исследования с целью определения диагностической ценности к-ИФА в сравнении с импортными аналогами.

Информация о финансировании

Работа была выполнена в рамках реализации научно-технической программы BR10764944: «Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции» на 2021-2023 гг., финансируемой МСХ РК.

Список литературы

1 Jaimee G., Halami P. Emerging resistance to aminoglycosides in lactic acid bacteria of food origin-an impending menace // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2016. – V. 100, №3. – P.1137-1151.

2 Van Duijkeren E., Schwarz C., Bouchard D., Catry B., Pomba C., Baptiste K., Moreno M., Rantala M., Ruzauskas M., Sanders P., Teale C., Wester A., Ignate K., Kunsagi Z., Jukes H. The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: a review // *J Antimicrob Chemother.* – 2019. V. 74, № 9. – P. 2480-2496.

3 Kaale E, Chambus M and Kitwala J. Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column // *Food Chemistry.* – 2008. – V. 107. – P. 1289-1293.

4 <https://stylab.ru/directory/antimicrobials/chloramphenicol/>

5 Chen J., Ying G., Deng W. Antibiotic residues in food: extraction, analysis, and human health concerns // *J Agric Food Chem.* – 2019. V. 67, № 27. – P. 7569-7586.

6 Perez-Rodriguez F., MercanogluTaban B. A state-of-art review on multi-drug resistant pathogens in foods of animal origin: risk factors and mitigation strategies // *Front Microbiol.* – 2019. V. 10. – P.2091.

7 House J., House L. Ototoxicity of polymyxin B, neomycin, and hydrocortisone suspension in tympanoplasty surgery // *Otolaryngol Head Neck Surg.* – 2014. – V.150, № 2. – P.282-284.

8 Ram C., Bhavadasan M. and Vijaya G. Antibiotic residue in milk // *Indian Journal of Dairy and Biosciences.* – 2000. – V. 11. – P. 151-154.

9 Basantia N., Manolkidis K., Alichanidis E. Effects of some antibiotics on the milk phosphatase pasteurization test // *Journal of Dairy Science.* – 2001. – V. 54. – P. 335-338.

10 Murthy G., Cox S. Evaluation of APHA and AOAC methods for phosphatase in cheese // *Journal of the Association of Official Analytical Chemists.* – 1988. – V. 71. – P. 1195-1199.

11 https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/mrl/regpdf./2001_04_25-0807_ru.pdf

12 Adams E., Liu L., Dierick K., Guyomard S., Nabet P., Rico S., Louis P., Roets E., Hoogmartens J. Neomycin: microbiological assay or liquid chromatography // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1998. – V. 17. – P. 757-766.

13 Han R., Zheng N., Yu Z., Wang J., Xu X., Qu X., Li S., Zhang Y., Wang J. Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC–MS/MS // *Food Chem.* – 2015. – V. 181. – P. 119-126.

14 Grebe S., Singh R. LC-MS/MS in the Clinical laboratory - Where to from here? // *Clin. Biochem. Rev.* – 2011. – V. 32. – P. 5.

15 Kamps-holtzapple C., Larry H., John R. Deloach. Monoclonal antibodies to hygromycin B and the method of making the same. UnitedStatesPatent5,620,890. 1997Apr.15.

16 Вацуро К. Именные реакции в органической химии [Текст] / Вацуро К., Мищенко Г. – М: Химия, 1976. – 110 с.

17 Castellani A. Die Agglutination beigemischter Infection und die Diagnose der letzteren // Zeitschr. f. Hygiene. – 1902. – V. 40, № 1. – P.20.

18 Сайдулдин Т.С. Статистическая обработка результатов серологических реакций [Текст] / Т.С. Сайдулдин. – Ветеринария, 1981. – № 7. – 62–66 с.

19 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C (2002) 3044). – URL:<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en> (by 26.10.2021).

20 Burkin M., Galvidis I. Development of a Competitive Indirect ELISA for the Determination of Lincomycin in Milk, Eggs, and Honey // J. Agric. Food Chem. – 2010. – V. 58. – P. 9893-9898

21 An L., Wang Y., Pan Y. et al. Development and validation of a sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the screening of florfenicol and thiamphenicol in edible animal tissue and feed // Food Anal. Methods. – 2016. – V. 9. – P. 2434-2443.

22 Bahmani K., Shahbazi Y., Nikousefat Z. Monitoring and risk assessment of tetracycline residues in foods of animal origin // Food Sci. Biotechnol. – 2020. – V. 29. – P. 441-448.

23 Parthasarathy R., Monette C., Bracero S. et al. Methods for field measurement of antibiotic concentrations: limitations and outlook // FEMS Microbiol. Ecol. – 2018. – V. 94, №8. – P. 105.

24 Antibiotics ELISA Kits [Electronic resource]. URL: www.biovision.com/products/elisa-kits/antibiotics-elisa-kits.html. (Accessed: July 21, 2021).

References

1 Jaimee G., Halami P. Emerging resistance to aminoglycosides in lactic acid bacteria of food origin-an impending menace // Appl Microbiol Biotechnol. – 2016. – V. 100, №3. – P.1137-1151.

2 Van Duijkeren E., Schwarz C., Bouchard D., Catry B., Pomba C., Baptiste K., Moreno M., Rantala M., Ruzauskas M., Sanders P., Teale C., Wester A., Ignate K., Kunsagi Z., Jukes H. The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: a review // J Antimicrob Chemother. – 2019. V. 74, № 9. – P. 2480-2496.

3 Kaale E, Chambus M and Kitwala J. Analysis of residual oxytetracycline in fresh milk using polymer reversed-phase column // Food Chemistry. – 2008. – V. 107. – P. 1289-1293.

4 <https://stylab.ru/directory/antimicrobials/chloramphenicol/>

5 Chen J., Ying G., Deng W. Antibiotic residues in food: extraction, analysis, and human health concerns // *J Agric Food Chem.* – 2019. V. 67, № 27. – P. 7569-7586.

6 Perez-Rodriguez F., MercanogluTaban B. A state-of-art review on multi-drug resistant pathogens in foods of animal origin: risk factors and mitigation strategies // *Front Microbiol.* – 2019. V. 10. – P.2091.

7 House J., House L. Ototoxicity of polymyxin B, neomycin, and hydrocortisone suspension in tympanoplasty surgery // *Otolaryngol Head Neck Surg.* – 2014. – V.150, № 2. – P.282-284.

8 Ram C., Bhavadasan M. and Vijaya G. Antibiotic residue in milk // *Indian Journal of Dairy and Biosciences.* – 2000. – V. 11. – P. 151-154.

9 Basantia N., Manolkidis K., Alichanidis E. Effects of some antibiotics on the milk phosphatase pasteurization test // *Journal of Dairy Science.* – 2001. – V. 54. – P. 335-338.

10 Murthy G., Cox S. Evaluation of APHA and AOAC methods for phosphatase in cheese // *Journal of the Association of Official Analytical Chemists.* – 1988. – V. 71. – P. 1195-1199.

11 https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/mrl/regpdf/2001_04_25-0807_ru.pdf

12 Adams E., Liu L., Dierick K., Guyomard S., Nabet P., Rico S., Louis P., Roets E., Hoogmartens J. Neomycin: microbiological assay or liquid chromatography // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 1998. – V. 17. – P. 757-766.

13 Han R., Zheng N., Yu Z., Wang J., Xu X., Qu X., Li S., Zhang Y., Wang J. Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC–MS/MS // *Food Chem.* – 2015. – V. 181. – P. 119-126.

14 Grebe S., Singh R. LC-MS/MS in the Clinical laboratory - Where to from here? // *Clin. Biochem. Rev.* – 2011. – V. 32. – P. 5.

15 Kamps-holtzapple C., Larry H., John R. Deloach. Monoclonal antibodies to hygromycin B and the method of making the same. United States Patent 5,620,890. 1997Apr.15.

16 Vacuro K. Imennyereakcii v organicheskoihimii / Vacuro K., Mishchenko G. – M: Himiya, 1976. – 110 c. (In Russian).

17 Castellani A. Die Agglutination beigemischter Infection und die Diagnose der letzteren // *Zeitschr. f. Hygiene.* – 1902. – V. 40, № 1. – P.20.

18 Sajduldin T. S. Statisticheskaya obrabotka rezul'tatov serologicheskikh reakcij // *Veterinariya.* – 1981. – № 7. – S. 62–66. (In Russian).

19 2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (Text with EEA relevance) (notified under document number C (2002) 3044). – URL:<https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858/language-en> (by 26.10.2021).

20 Burkin M., Galvidis I. Development of a Competitive Indirect ELISA for the Determination of Lincomycin in Milk, Eggs, and Honey // *J. Agric. Food Chem.* – 2010. – V. 58. – P. 9893-9898

21 An L., Wang Y., Pan Y. et al. Development and validation of a sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the screening of florfenicol and thiamphenicol in edible animal tissue and feed // Food Anal. Methods. – 2016. – V. 9. – P. 2434-2443.

22 Bahmani K., Shahbazi Y., Nikousefat Z. Monitoring and risk assessment of tetracycline residues in foods of animal origin // Food Sci. Biotechnol. – 2020. – V. 29. – P. 441-448.

23 Parthasarathy R., Monette C., Bracero S. et al. Methods for field measurement of antibiotic concentrations: limitations and outlook // FEMS Microbiol. Ecol. – 2018. – V. 94, №8. – P. 105.

24 Antibiotics ELISA Kits [Electronic resource]. URL: www.biovision.com/products/elisa-kits/antibiotics-elisa-kits.html. (Accessed: July 21, 2021).

МАЛ ӨНІМДЕРІН АНТИБИОТИКТЕРГЕ ИММУНДЫҚ ТАЛДАУ

*Бұлашев АйтбайҚабыкешович,
Ветеринария ғылымдарының докторы, профессор,
С. Сейфуллин атындағы Қазақ
агротехникалық университеті,
Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан
e-mail: aytbay57@mail.ru*

*Куйбагаров Марат Амангельдыевич
Ветеринария ғылымдарының кандидаты,
С. Сейфуллин атындағы Қазақ
агротехникалық университеті,
Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан
e-mail: koibagarov.ru@mail.ru*

*Аканова Жаннара Жульдасовна
Ветеринария ғылымдарының кандидаты,
С. Сейфуллин атындағы Қазақ
агротехникалық университеті,
Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан
e-mail: azhzh80@mail.ru*

*Жагинар Фариза Сабитқызы
Техника ғылымдарының магистрі,
С. Сейфуллин атындағы Қазақ
агротехникалық университеті,
Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан
e-mail: fariza140292@mail.ru*

*Джангулова Асем Нұржановна
Ветеринария және мал шаруашылығы
технологиясы факультетінің докторанты
С. Сейфуллин атындағы Қазақ
агротехникалық университеті,
Нұр-Сұлтан қ., Қазақстан
e-mail: bekasem@bk.ru*

Түйін

Жануарлардан алынатын өнімдердің антибиотиктермен ластануы ең өзекті жаһандық мәселелердің біріне айналуда. Антибиотиктер, әдетте, емдік және профилактикалық дәрі-дәрмектерді немесе жануарлардың өсуін күшейтетін препараттарды дұрыс пайдаланбау нәтижесінде тағамға енеді. Антибиотиктердің қалдық мөлшері бар тағамдарды ұзақ уақыт тұтыну адам денсаулығына жағымсыз әсер етеді, сонымен қатар микроорганизмдердің антибиотиктерге төзімді формаларының пайда болуына әкелуі мүмкін. Осы жұмыста стрептомициннің (СТР), хлорамфениколдың (ХАФ) және окситетрациклиннің (ОТЦ) эпитоптарына телімді және белсенді жоғары антиденелерді алуға мүмкіндік беретін қояндарды иммундеу әдісі әзірленген. Бұл антиденелер стандартты ерітінділердегі антибиотиктерді анықтау үшін бәсекеге қабілетті иммунды фермент тәсілінде (б-ИФТ-да) қолданылған. Антибиотиктердің белгілі мөлшерлерінде сыналған б-ИФТ-дың сезімталдық шегі 1,5-4,5 нг/мл аралығында болды. Әзірленген б-ИФТ жануарлар өнімдерін СТР-нің, ХАФ-дың және ОТЦ-нің қалдық мөлшерлеріне шапшаң түрде тексеріп шығуға жарамдылығын көрсетті. Әзірленген б-ИФТ-дың диагностикалық құндылығын импорттық аналогтармен салыстырмалы түрде анықтау үшін қосымша зерттеулер жүргізу қажет.

Кілт сөздер: антибиотик; антибиотиктің қалдық мөлшері; антидене; ірі кара мал, сүт; ет; иммунды-ферменттік талдау.

IMMUNOASSAY OF ANTIBIOTICS IN LIVESTOCK PRODUCTS

***Bulashev Aitbay Kabykeshovich,**
Doctor of Veterinary Sciences, Professor,
S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University
Nur-Sultan, Kazakhstan
e-mail: aytbay57@mail.ru*

*Kuibagarov Marat Amangeldyevich,
Candidate of Veterinary Sciences,
S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University
Nur-Sultan, Kazakhstan
e-mail: koibagarov.ru@mail.ru*

*Akanova Zhannara Zhuldasovna,
Candidate of Veterinary Sciences,
S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University
Nur-Sultan, Kazakhstan
e-mail: azhzh80@mail.ru*

*Zhagipar Fariza Sabitkyzy,
Master of Technical science,
S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University
Nur-Sultan, Kazakhstan
e-mail: fariza140292@mail.ru*

*Jangulova Assem Nurzhanovna,
doctoral student of the faculty of veterinary and animal husbandry technology
S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University
Nur-Sultan, Kazakhstan
e-mail: bekasem@bk.ru*

Abstract

Contamination of animal products with antibiotics is becoming one of the most pressing global problems. Antibiotics, as a rule, end up in food as a result of their misuse as therapeutic and prophylactic agents or animal growth stimulants. Prolonged consumption of foods containing residual amounts of antibiotics can cause adverse effects on human health, as well as lead to the formation of antibiotic-resistant forms of microorganisms. In this study, a method was developed for immunizing rabbits, which makes it possible to obtain highly active antibodies specific for the epitopes of streptomycin (STR), chloramphenicol (CAP), and oxytetracycline (OTC), which were used in competitive ELISA (c-ELISA) to detect antibiotics in standard solutions. The c-ELISA had a minimum detection limit for tested antibiotics in the range of 1.5-4.5 ng/ml. The developed protocol for c-ELISA showed its suitability for express testing of livestock products for residual amounts of STR, CAP and OTC. Further research is needed to determine the diagnostic value of c-ELISA in comparison with imported analogues.

Keywords: antibiotic; residual amount of antibiotic; antibody; cattle, milk; meat; enzyme linked immunosorbent assay.