АННОТАЦИЯ

на диссертацию Джангуловой Асем Нуржановны по теме: «Разработка иммунохроматографического анализа для мультиплексного обнаружения антибиотиков в продуктах животноводства», представленную на соискание степени доктора философии (PhD) по образовательной программе 8D09101– «Ветеринарное благополучие животных»

Актуальность. Антибиотики широко применяются в животноводстве как для профилактики, так и для лечения заболеваний, а также для повышения роста молодняка и улучшения продуктивных характеристик животных и птиц. Ожидается, что в период с 2010 по 2030 годы мировое потребление антибиотиков увеличится на 67%. Основным фактором данного роста станет необходимость их применения в условиях интенсивного крупномасштабного животноводства. Повсеместное использование антибиотиков в ветеринарии подтверждает их ключевую роль как незаменимых средств для поддержания здоровья и благополучия животных. В ближайшем будущем они не могут быть полностью заменены из-за отсутствия доступных и эффективных альтернативных препаратов.

Остаточные количества антибиотиков могут передаваться человеку через продукты животноводства в рамках пищевой цепи, что создает определенные риски для здоровья населения. Наиболее значимой проблемой, возникающей вследствие бесконтрольного применения антибиотиков, является развитие лекарственной устойчивости, что представляет собой одну из величайших угроз общественному здоровью. В связи с этим ВОЗ, а также другие органы, контролирующие пищевую безопасность, определили и установили максимальные ПДК остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства. Превышение уровня ПДК представляет не только потенциальный риск для здоровья потребителей, но и вызывает значительные проблемы для производителей кисломолочных продуктов, поскольку повышенное содержание антибиотиков в молоке ингибирует активность заквасок. В этой связи, для практической ветеринарии необходимы быстрые и высокочувствительные методы определения остаточных количеств антибиотиков в молоке. Существуют различные методы, но для РК, как и для других развивающихся стран, более приемлемыми для оценки качества продуктов животноводства в части содержания антибиотиков являются ИХА-тесты, отличающиеся простотой использования и экспрессностью анализа. Однако, высокая стоимость зарубежных диагностикумов является сдерживающим фактором в их использовании на практике. Таким образом, для обеспечения пищевой безопасности населения страны нужны

альтернативные ИХА-тесты, которые, не уступая зарубежным аналогам по своим характеристикам, будут более доступны в ценовом отношении.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы является разработать технологию изготовления отечественного иммунохроматографического теста для одновременного определения в молоке и мясе нескольких антибиотиков, содержание которых превышают ПДК.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1. Приготовить реагенты ИХА теста для одновременного обнаружения СТР, ХАФ и ОТЦ в молоке и мясе;
2. Сконструировать мультиплексный конкурентный ИХА тест для определения антибиотиков в продуктах животноводства;
3. Отработать протокол использования непрямой метки антибиотикоспецифичных антител для обнаружения нескольких аналитов в исследуемом образце;
4. Испытать диагностическую ценность разработанного ИХА-теста на образцах молока и мяса в сравнении с зарубежным аналогом;
5. Разработать научно-техническую документацию на изготовление, контроль и применение ИХА-теста для экспресс-оценки молока и мяса на содержание СТР, ОТЦ и ХАФ.

Методы исследования. Работа выполнялась в Казахстанско-Китайской лаборатории по биологической безопасности НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина» (КАТИУ) и лаборатории иммунобиохимии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Москва, Российская Федерация).

В работе использовались следующие виды лабораторных животных: белые беспородные мыши (n=12, самцы 8-10 недельного возраста с живой массой 20-25 г), мыши линии Balb/c (n=12, самки 7-8 недельного возраста с живой массой 20-25 г), кролики породы советская шиншилла (n=10, самцы 6 месячного возраста с живой массой 3100-3300 г), коза зааненской породы (возраст 1 год, живая масса 38 кг).

В ходе выполнения диссертационной работы применяли иммунологические и биохимические методы исследования.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Способ очистки антибиотика из гидрохлоридной соли;
2. Методы конъюгации СТР, ОТЦ и ХАФ с белковыми носителями;
3. Техника приготовления антибиотикоспецифичных антител;
4. Конкурентный ИХА тест для одновременного определения СТР, ОТЦ и ХАФ в молоке и мясе;
5. Мультиплексный ИХА тест с использованием универсального маркирующего реагента для определения остатков антибиотиков в животноводческой продукции.

Описание основных результатов исследования.

1. Разработан способ получения химически чистого ОТЦ из ветеринарного терапевтического препарата – окситетрациклина гидрохлорида для инъекции с выходом целевого компонента до 96% в пересчете на сухое вещество. Данный способ оказался пригодным и для получения химически чистого СТР из его сульфатной соли, используемого в ветеринарной практике. Спектрофотометрические признаки очищенных антибиотиков полностью соответствовали требованиям нормативных документов для ОТЦ (ФС 001160-040815) и СТР (ФС. 2.1.0037.15).

2. Определены наиболее эффективные методы конъюгирования ОТЦ, СТР и ХАФ с БСА и/или ОВА, основанные на использовании сшивающих агентов – формальдегида, карбодиимида и глутарового альдегида, соответственно. Выход конъюгатов составлял 1.8 и 3.14 мг/мл для СТР-БСА и СТР-ОВА; 4.0 и 3.0 мг/мл для ОТЦ-ОВА и ОТЦ-БСА и 2.5 и 1.5 мг/мл для ХАФ-ОВА и ХАФ-БСА.

3. Конъюгаты антибиотиков с белками-носителями характеризовались стабильностью межмолекулярных связей, что подтверждалась оптической спектрофотометрией в виде непрерывных сигналов с характерными пиками исходной субстанции. Каждый из антибиотиков в составе конъюгата проявлял свойство иммуногена, вызывая выраженное антителообразование у белых мышей и кроликов, о чем свидетельствовали высокие титры специфичных антител в образцах сывороток крови (1:1600 – 1:3200).

4. Метод, предложенный нами для получения кроличьих антисывороток против СТР, ОТЦ и ХАФ, позволяет получить высокоактивные ПКА за относительно короткое время (35 дней) с использованием меньшего количества иммуногенов (2 000 мкг) по сравнению с известными способами. Получены клоны гибридом, обозначенные как 4А3, 3С8 и 4В5 и продуцирующие МКА IgG класса против ОТЦ, ХАФ и СТР, соответственно.

5. Наночастицы КЗ, синтезированные методом восстановления золотохлористоводородной кислоты, имели средние размеры в пределах 19.47±2.53 нм с пиком поглощения на длине волны 527 нм при спектрофотометрии, что свидетельствует о возможности их использования в качестве маркеров антител.

6. Антибиотико-специфичные кроличьи ПКА, в отличие от мышиных МКА, после маркировки наночастицами КЗ методом физической адсорбции сохраняли свою способность связываться с ОТЦ, ХАФ и СТР, и были использованы для приготовления меченого антительного конъюгата.

7. Отработана технология получения реагента контрольной зоны ИХА - антивидовых антител, представляющие собой антитела козы IgG класса против иммуноглобулинов кролика.

8. Разработанная ИХА тест-система, основанная на конкуренции антибиотиков, имеющихся в аналите и иммобилизованных в тестовой зоне нитроцеллюлозной мембраны, за связывание с мечеными антителами, обнаруживает СТР, ОТЦ и ХАФ в молоке и мясе при концентрациях, превышающих 200 нг/мл, 10 нг/мл и 0.3 нг/мл, соответственно, что позволяет использовать ее для контроля качества продуктов животноводства на содержание указанных антибиотиков.

9. Предлагаемый диагностикум для обнаружения остаточных количеств СТР, ОТЦ и ХАФ имеет относительно низкую стоимость по сравнению с аналогами на рынке ветеринарных препаратов, что делает его более конкурентоспособным и доступным для отечественных лаборатории контроля безопасности пищевой продукции.

10. Установлена возможность применения немеченых СТР-, ОТЦ- и ХАФ-специфичных МКА и антивидовых антител - универсального маркирующего реагента в одноэтапном ИХА для определения остаточных количеств антибиотиков в молоке. Инструментальные пределы обнаружения (LOD) нового варианта иммуноанализа составляют 7.3. 0.9 и 2.1 нг/мл для СТР, ОТЦ и ХАФ в коровьем молоке, а в козьем - не менее 1.2. 0.1 и 1.3 нг/мл соответственно.

Обоснование новизны и важности полученных результатов.

Впервые описан принцип мультиплексного ИХА для одновременного и одноэтапного определения остатков СТР, ХАФ и ОТЦ в молоке с использованием специфичных антител и меченых антивидовых иммуноглобулинов – универсального маркирующего реагента, который может быть пригоден для детекции в продуктах животноводства и других антибиотиков, а также антгельминтиков гаптенной природы.

Разработан способ получения химически чистого окситетрациклина из терапевтической формы препарата, который может быть использован для очистки и других антибиотиков от солевых форм.

Практическая ценность заключается в разработке научно-технической документации КП ВЭД 72.11.13 МКС 11.220:

– Стандарт организации 230721000–001–2023 «ИХА тест для обнаружения антибиотиков в молоке и мясе»;

– Наставление по применению ИХА теста для определения остаточного количества антибиотиков в мясе и молоке;

– Инструкция по изготовлению и контролю ИХА теста для обнаружения антибиотиков в молоке и мясе (Приложение А).

Материалы диссертационной работы используются в учебном процессе НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет им. С. Сейфуллина» при чтении лекции и проведении лабораторно–практических занятий магистрантам и докторантам по образовательным программам 7M05101 «Ветеринарная биотехнология» и 8D09101 «Ветеринарное благополучие животных» в рамках силлабусов

дисциплин «Современные проблемы биотехнологии в ветеринарной медицине и животноводстве» и «Ветеринарная иммунология», соответственно.

Соответствие направлениям развития науки или государственным программам.

Работа выполнялась в рамках проекта «ИХА для определения остаточного количества антибиотиков в мясе и молоке» бюджетной программы 267, подпрограммы 101 «Программно-целевое финансирование научных исследований и мероприятий», приоритетного направления «Устойчивое развитие агропромышленного комплекса и безопасность сельскохозяйственной продукции», научно-технической программы BR10764944: «Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции» на 2021-2023 годы.

Описание вклада докторанта в подготовку каждой публикации.

Анализ литературных данных, проведение практических исследований, анализ результатов исследований, написание всех научных статей, подготовка рукописи диссертации проводились при личном участии автора.

Основные результаты исследований отражены в 10 (десяти) опубликованных работах, в том числе в патенте на изобретение РК, монографии, трёх статьях в изданиях, рекомендованных Комитет по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования РК, в статье журнала, входящего в базу данных Scopus и Web of Sciences (Veterinary World, процентиль 82) и трудах международных научных конференций.

Результаты исследований доложены и обсуждены на следующих научных форумах: международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: «Молодёжь и наука – взгляд в будущее» – Астана, Казахстан, 12 апреля 2022 г.; международной научно-практической конференции: «Наука XXI века – эпоха трансформации» – Астана, Казахстан, 6 октября 2022 г.; международной научной конференции: «Качество и безопасность продуктов питания» – Астана, Казахстан, 20-22 сентября 2023 г.; CLXXXIV международной научно-практической конференции «Инновационные подходы в современной науке» – Москва, РФ, 2025. Опытный образец «ИХА тест для обнаружения стрептомицина, окситетрациклина и хлорамфеникола в молоке и мясе» был экспонирован на XXXIV международной сельскохозяйственной специализированной выставке «Белоагро-2024», состоявшейся в г. Минске, выставочном центре Китайско-Белорусского индустриального парка «Великий Камень» с 4 по 9 июня 2024 г.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах компьютерного текста. Диссертация состоит из следующих

разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, список использованных источников и приложения. Диссертационная работа содержит 9 таблиц и 41 рисунок. Список источников использованной литературы включает 231 источников.