

«Сейфуллин окулары – 18(2): «XXI ғасыр ғылыми - трансформация дәуірі» халықаралық ғылыми - практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения - 18(2): «Наука XXI века - эпоха трансформации». - 2022.- Т.І, Ч.ІІ.- С. 197-199.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ АНТИБИОТИКОВ С БЕЛКОВЫМИ НОСИТЕЛЯМИ

*Джангулова А., докторант 1 курса
Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина, г. Астана*

Предотвращение формирования и распространения антимикробной резистентности признано Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ), странами Европейского Союза и Северной Америки в качестве глобальной проблемы, а также в качестве национального приоритета. В США распространение антимикробной резистентности рассматривается как одна из угроз национальной безопасности [1]. По этой причине ВОЗ установила максимально допустимые уровни остатков (ПДК) для того, чтобы контролировать остаточные количества антибиотиков в продуктах животного происхождения [2].

Эти пределы требуют чувствительных и специфических методов для обнаружения антибиотиков у сельскохозяйственных животных [3]. Следовательно, потребность в массовом и продуктивном контроле остатков количества антибиотиков в пищевых продуктах вызывает растущий спрос на разработку простых, быстрых и недорогих методов их обнаружения [4].

Иммунохроматографический анализ наиболее точно соответствует требованиям быстрого и точного мониторинга остатков ветеринарных препаратов без сложного, дорогостоящего оборудования [5].

Экспресс-тесты становятся популярными из-за их простоты, скорости, специфичности и чувствительности. Также одним из преимуществ является то, что все реагенты включены в полосу и результаты можно получить в течение 5–10 минут [6]. Одним из реагентов, необходимых для конструирования ИХА –теста являются специфические иммуноглобулины. В связи с тем, что антибиотики являются гаптенами, их невозможно использовать самостоятельно. Гаптены не вызывают иммунного ответа, так как имеют незначительную молекулярную массу (менее 1 кДа). Для того, чтобы вызвать иммунный ответ они должны быть конъюгированы с молекулами-носителями [7]. Обычно в качестве носителей используют бычий сывороточный альбумин, овальбумин, гемоцианин лимфы улитки, декстран [8]. В литературных источниках приводятся различные методы сшивания антибиотика с высокомолекулярными носителями.

Целью нашей работы явилось сравнительное изучение методов приготовления конъюгатов антибиотиков с белковыми носителями, предложенными Wangetal. и Pengetal.

Было апробировано 2 способа конъюгации препаратов Стрептомицина с высокомолекулярными носителями, такими как ОВА и БСА. В качестве сшивающего агента в двух методках использовали глутаровый альдегид в различных объемах [9,10].

Полученные конъюгированные препараты диализовали при 4°C в течение 72 часов против ФСБ (рН 7,4, 0,01 моль/л-1). После диализа конъюгаты визуально имели однородную структуру.

Антигенные свойства конъюгатов СТР+БСА изучались на беспородных мышах и кроликах. Для этого были подобраны по методу аналогов беспородные мыши (самцы 8-10 недельного возраста, с живой массой 20-25 г), которым инъецировали конъюгат СТР+БСА .

Мышей иммунизировали подкожно в дозе 60 мкг конъюгата полным адьювантом Фрейнда. Затем повторили иммунизацию на 30, 55, 85 день (через каждые четыре недели). На седьмой день после последней иммунизации (91 день) отбирали кровь и определяли титр, мышь с высоким титром подвергали дополнительной иммунизации внутрибрюшинно, через 4 дня (95 день) кровь отбирали на исследования. Отобранную после завершения иммунизации кровь центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 10 минут с целью получения сыворотки крови.

Иммунизация кроликов проводилась следующим образом [8, с.11]. В 0 день иммунизации конъюгаты в концентрации 0,5 мг/мл, в объеме 500 мкл разводили в 500 мкл ФСБ, затем раствор эмульгировали в 0,5 мл ПАФ, инъецировали в область спины от холки вниз в 10 точках. Вторую инъекцию препаратов в концентрации 0,5 мг/мл осуществляли аналогичным образом на 15 день иммунизации, но антиген эмульгировали в НАФ. Затем иммунизацию повторяли каждые десять дней в течение двух месяцев. Иммуноную сыворотку отбирали на 75 день и хранили при -20°C до использования.

Сыворотки после иммунизации тестировались на наличие в них антител, специфичных к антигенным детерминантам гаптена-антибиотика посредством непрямого варианта ИФА. В качестве антигена для сенсibilизации планшета использовали полученный гетерологичный конъюгат СТР-ОВА. Результаты постановки реакции в иммуноферментном анализе учитывались с помощью спектрофотометра при длине волны 450 нм.

Результаты серологических исследований показали, что препараты конъюгатов способны вызывать иммунный ответ, но различного уровня. При использовании конъюгата, приготовленного по методике, описанной Pengetal. были получены титры антител в пределах 1:200-1:400 в сыворотках лабораторных животных. При этом конъюгаты, полученные по методике Wangetal. показали более высокую иммуногенность, а именно титры антител,

специфичные непосредственно к антигенным детерминантам гаптена-антибиотика в сыворотках кроликов находились в пределах 1:1600-1:3200, у мышей 1:800. Таким образом, в результате данного исследования, отработаны способы получения конъюгированных препаратов, обладающих антигенными свойствами.

Список использованных источников

1. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // Успехи биологической химии. – 2004. – Т. 44. – Р. 263—306.
2. Moga A., Vergara-Barberan M., Lerma-Garcia M., Carrasco-Correa E., Herrero-Martinez J., Simo-Alfonso E. Determination of antibiotics in meat samples using analytical methodologies [Text] / A review // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2021. – V.20. – P. 1681-1716.
3. Wongtangprasert T., Natakathung W., Pimpitak U., Buakeaw A., Palaga T., Komolpis K., Khongchareonporn N. Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp [Text] / Journal of Zhejiang University. Science. – 2014. – V.15. – P. 165-72.
4. Hendrickson O.D., Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Sensitive lateral flow immunoassay of an antibiotic neomycin in foodstuffs [Text] / Journal of Food Science and Technology. – 2021. – V.58. – P. 292-301.
5. Hendrickson O.D., Urusov A.E., Kuznetsova D.A., Zherdev A.V. and Dzantiev B.B. A Biotin-Streptavidin Module for Signal Amplification in Immunochromatographic Analysis to Control Antibiotic Levels [Text] / Int. J. Appl. Eng. Res. – 2017. – V. 12. – No. 23. – P. 13552-13564.
6. Luo L., Suryoprabowo S., Liu L., Peng J., Kuang H., Xu C. Development of an immunochromatographic strip test for rapid detection of ciprofloxacin in milk samples [Text] / Sensors. – 2014. – V.14. – P. 16785-16798.
7. Kumar, B. & Ashok Vasili & Kalyani, P. & Nair, G.(2016). Conjugation of ampicillin and enrofloxacin residues with bovine serum albumin and raising of polyclonal antibodies against them. Veterinary World. 9. 410-416. 10.14202/vetworld.2016.410-416
8. Naik, Laxmana & Lata, Kiran & Sharma, Rajan & Mann, Bimlesh. (2014). Production of Polyclonal Antibody for Oxytetracycline and their use in Lateral Flow Assay [Text] / Journal of Microbiology, Immunology and Biotechnology. 1. 8-17.
9. Wang, J., Zhang, H., Sheng, W., Liu, W., Zheng, L., Zhang, X., Wang, S. Determination of streptomycin residues in animal-derived foods by a reliable and accurate enzyme-linked immunosorbent assay [Text] / Analytical Methods. – 2013. – V. 5. – P. 4430-4435
10. Peng, J., Wang, Y., Liu, L., Kuang, H., Li, A., & Xu, C. Multiplex lateral flow immunoassay for five antibiotics detection based on gold nanoparticle aggregations. RSC Advances, 2016. -P. 7798-7805.