

«Сейфуллин окулары – 18: « Жастар және ғылым – болашаққа көзқарас» халықаралық ғылыми -практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 18: « Молодежь и наука – взгляд в будущее» - 2022.- Т.1, Ч.III. - С.3-7

## **ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ АНТИБИОТИКОВ**

*Джангулова А.Н., докторант 1 курса  
Жагипар Ф.С., магистр технических наук.,  
Калижан З.М., магистрант 1 курса  
Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, г.Нур-Султан*

В настоящее время в ветеринарной практике используется широкий спектр противомикробных веществ в качестве терапевтических и/или профилактических препаратов. Кроме того, отдельные из них, в частности антибиотики, применяются как стимуляторы роста. Для повышения эффективности откорма рекомендовано добавление в корма антибиотиков в малых дозах. Однако несоблюдение правил применения антибиотиков может привести к образованию остаточного количества препаратов в продуктах животноводства, которые при употреблении в пищу могут вызывать различные побочные эффекты [1].

Длительное использование в пищу продуктов, содержащих препараты антибиотиков, может способствовать и появлению антибиотикорезистентности. Поэтому, качественный и количественный анализ антибиотиков необходим для обеспечения безопасности пищевых продуктов и борьбы с незаконным и чрезмерным использованием ветеринарных препаратов. Острота проблемы вынуждает отдельные страны выступать за сокращение использования антибиотиков и разработку новых альтернативных средств, чтобы минимизировать вред, причиняемый остатками лекарственных веществ [2].

Согласно положениям технического регламента Таможенного союза ТР ТС 021/2011 переработанное продовольственное (пищевое) сырье животного происхождения должно быть получено от здоровых продуктивных животных только по истечении сроков выведения из организма лекарственных средств для ветеринарного применения, в том числе антибиотиков. При этом переработчик, получив информацию от поставщика об их применении, может проверить поступающее сырье на наличие остатков этих антибиотиков. В ТР ТС 021/2011 и ТР ТС 034/2013, а также в СанПиН 2.3.2.2871-11 установлены максимально допустимые уровни для 56 антибиотиков, значения которых согласуются с требованиями регламентов ЕС. При этом в России нормативы содержания тетрациклинов в пищевых продуктах сохранены на более жестком уровне ( $\leq 0,01$  мг/кг во всех

нормируемых продуктах), чем нормативы в стандартах Комиссии Кодекс Алиментариус (от  $\leq 0,1$  до  $\leq 1,2$  мг/кг в зависимости от продукта) и ЕС (от  $\leq 0,1$  до  $\leq 0,6$  мг/кг) [3].

Традиционные методы обнаружения антибиотиков в пищевых продуктах включают микробиологические методы, которые не обладают достаточной чувствительностью, специфичностью и точностью. Более того, они являются трудоемкими, длительными по выполнению и требуют обученных специалистов-бактериологов. При этом полученные результаты носят качественный или полуколичественный характер, а их достоверность в значительной степени зависит от стабильности и физиолого-биохимических характеристик тест-штаммов микроорганизмов [4]. Инструментальные аналитические методы, включая ВЭЖХ, характеризуются высокой точностью, специфичностью и чувствительностью, и используются как эталонные методы. Эти сложные и дорогостоящие исследования с привлечением высококвалифицированного персонала выполняются лишь в отдельных специализированных лабораториях, и не могут быть использованы для мониторинга безопасности продукции животноводства.

В настоящее время для выявления антибактериальных препаратов в продуктах питания взамен инструментальным технологиям все большее распространение получают ИФА. В США и Японии данная иммунологическая реакция уже является основным скрининговым тестом для определения предельно-допустимого количества (ПДК) антибиотиков в продуктах питания. ИФА, как быстрый и высокочувствительный метод, характеризующийся высокой воспроизводимостью, рекомендован директивой ЕС 2002/657 для определения остаточных количеств ветеринарных препаратов в продуктах животноводства [5]. Однако, оснащенность лабораторий ветеринарно-санитарной экспертизы на продовольственных рынках РК и стран Содружества не позволяют проводить анализы мяса и молока на остаточные количества антибиотиков с применением ИФА. В этой связи, весьма важно вести исследования по разработке других альтернативных методов, которые, не уступая ИФА по своей чувствительности, позволяли бы в течение 5-10 минут оценить результатов полевом режиме без использования дополнительного оборудования или портативных устройств. Среди них особое внимание заслуживает процедуры, основанные на иммунохроматографическом анализе (ИХА). В мировой литературе можно найти ряд исследований по разработке различных вариантов ИХА для детекции антибиотиков в пищевых продуктах [6]. Главным реагентом ИХА-теста является антитела, имеющие строгую специфичность к определенным антибиотикам. Получение антител против антибиотиков, которые являются гаптенами – дело непростое.

Целью нашей работы явилось отработка оптимального метода конъюгации антибиотиков с белковыми носителями, позволяющие получить высокоактивные антитела.

Материалы и методы: В работе были использованы белые беспородные

мыши в количестве 24 гол. и 6 кроликов породы советская шиншилла.

Конъюгаты стептомицина (СТР), хлорамфеникола (ХАФ) и окситетрациклина (ОТЦ) с белками-носителями готовили по методам, разработанным J. Wang et. al (2013) [7] и J. Samsonova et. al (2010) [8], соответственно. Конъюгаты ОТЦ+бычий сывороточный альбумин (БСА) и ОТЦ+овальбумин (ОВА) были приготовлены по методу, описанному Y. Chen et. al (2016) [9].

Для выяснения иммуногенных свойств конъюгатов ХАФ+БСА, СТР+ОВА и ОТЦ+БСА были подобраны по методу аналогов две группы кроликов по 3 гол. в каждой, которым инъецировали один из конъюгатов ХАФ, СТР и/или ОТЦ по двум схемам. По первой схеме ХАФ+БСА, СТР+ОВА и/или ОТЦ+БСА вводили стерильным шприцем в дозе 1 мл на голову, подкожно в область спины в несколько точек, 4-хратно с интервалом 7 суток. В качестве иммуностимулятора при первой инъекции использовали неполный адъювант Фрейнда (НАФ), а в последующих – забуференный физиологический раствор (ЗФР).

Иммунизация животных по второй схеме проводилась следующим образом. В 0 день иммунизации конъюгаты (ХАФ+БСА, СТР+ОВА, ОТЦ+БСА и/или ОТЦ+ОВА) в концентрации 1 мг/мл, в объеме 250 мкл разводили в 750 мкл ЗФР, затем раствор эмульгировали в 1 мл полного адъюванта Фрейнда (ПАФ), инъецировали в область спины от холки вниз в 10 точках. Вторую инъекцию препаратов в концентрации 1 мг/мл осуществляли аналогичным образом на 28 день иммунизации, но антиген эмульгировали в НАФ. Иммунную сыворотку отбирали на 35 день и хранили при -20°C до использования.

Для иммунизации белых беспородных мышей ХАФ+БСА, СТР+ОВА и ОТЦ+БСА были подобраны по методу аналогов 2 группы белых беспородных мышей по 4 гол. на каждый иммуноген. В качестве антигенов использовали конъюгаты антибиотиков с белками-носителями. Одна группа мышей была подвергнута иммунизации по короткой схеме (15 дней): в 0 день вводили внутрибрюшинно по 100 мкл антигена в концентрации 25 мкг/мл в 0,1 мл НАФ. На 7, 11, 12 и 13 дни иммунизации мышам вводили внутрибрюшинно по 100 мкл антигена в ЗФР. Кровь для исследования брали на 15-ый день иммунизации и хранили при -20°C до использования.

Вторая группа мышей была иммунизирована по длительной схеме: в 0 день животным инъецировали подкожно 15 мкг ХАФ+ОВА и/или СТР+БСА с ПАФ. Затем повторили иммунизацию на 28, 56, 84 день. На 7 день после последней иммунизации отбирали кровь и определяли титр. Взятие крови у иммунизированных мышей проводили через 3 дня после последней иммунизации. Образцы сывороток исследовали в непрямом варианте ИФА с использованием гомологичного антигена на содержание специфических антител.

Для определения антител кроликов и мышей против ХАФ, СТР и ОТЦ в непрямом варианте ИФА ячейки 96-луночного планшета для

иммунологических реакций сенсibilизировали антигеном в разных концентрациях (0,5 - 2 мкг/мл) при +4°C в течение ночи. Для удаления несвязавшегося антигена планшет отмывали 3 раза 3ФР-Твином. После этого вносили сыворотку крови в количестве 0,1 мл и инкубировали при +37°C в течение 1 часа. Затем в лунки планшета вносили антивидовой конъюгат (JacksonLab, США) в объеме 0,1 мл, инкубировали, а после отмывки в лунки вносили по 0,1 мл раствора субстрата фермента. Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света (BiotekTS 800, США) при длине волны 450 нм.

Приготовление конъюгатов СТР+ОВА, ХАФ+БСА, ОТЦ+БСА и ОТЦ+ОВА проводили по вышеописанным методам с некоторыми модификациями. В результате было приготовлено по 6 мл препаратов конъюгатов ОТЦ с БСА и/или ОВА, по 5 мл конъюгатов ХАФ и СТР с БСА и ОВА, соответственно.

Кроличьи антисыворотки против ХАФ+БСА, СТР+ОВА, ОТЦ+БСА тестировались на наличие в них антител, специфичных к гаптенам-антибиотикам с помощью непрямого варианта ИФА. В качестве антигена для сенсibilизации планшета использовали полученные гетерологичные конъюгаты ХАФ-ОВА СТР-БСА, и ОТЦ-ОВА. Результаты серологических исследований сывороток кроликов, иммунизированных по первой схеме, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты тестирования сыворотки крови кроликов, иммунизированных конъюгатами антибиотиков по первой схеме

Виды сывороток крови	Виды конъюгатов		
	ХАФ +БСА	СТР+О ВА	ОТЦ+Б СА
Антисыворотки	1:200	РО	РО
Контрольные сыворотки	РО	РО	РО

Примечание: РО – реакция отрицательная

Как видно из таблицы 1, иммунизация кроликов по схеме №1 оказалась непригодной для развития иммунного ответа против использованных антибиотиков в виде антителообразования, поскольку в образцах постиммунизационных сывороток антитела не детектировались. Слабый титр (1:200) антител был установлен у кролика, иммунизированного препаратом ХАФ+БСА.

Результаты исследования сывороток крови кроликов, иммунизированных по второй схеме, представлены в таблице 2

Таблица 2 – Иммуногенность антибиотиков для кроликов, иммунизированных по второй схеме

Виды сывороток крови	Виды конъюгатов			
	ХАФ +БСА	СТР+ ОВА	ОТЦ+Б СА	ОТЦ+О ВА
Антисыворотки	1:320 0	1:320 0	1:800	1:1600
Контрольные сыворотки	РО	РО	РО	РО

Примечание: РО – реакция отрицательная

Серологические исследования образцов сывороток крови кроликов, иммунизированных по схеме №2, показали ее эффективность. Так, например, титры антител против ОТЦ в непрямом ИФА находились в пределах 1:800-1:1600, а в сыворотках кроликов, иммунизированных ХАФ и СТР, специфические антитела обнаруживались до титра 1:3200.

Результаты сравнения двух схем иммунизации белых мышей препаратами антибиотиков показали наибольшую эффективность длительной схемы иммунизации, при которой титры антител против иммуногенов достигали 1:3200, тогда как антитела, полученные по короткой схеме иммунизации, детектировались лишь до разведения сывороток крови 1:800.

Таким образом, приготовлены конъюгаты ОТЦ, СТР и ХАФ с белками-носителями, отработана оптимальная схема иммунизации кролика, позволяющая получить антисыворотки против использованных антибиотиков в высоких титрах. Из антисывороток получены поликлональные антитела и очищена IgG фракция, специфичная к ОТЦ, СТР и ХАФ. На белых беспородных мышях отработана методика иммунизации антибиотиками. Наиболее пригодной для этой цели оказалась длительная схема иммунизации (91 день).

### Список литературы

1 Bacanlı M., Basaran N. Importance of antibiotic residues in animal food // Food Chemical Toxicology. – 2019. – Vol. 125. – P. 462-466.

2 Wang B., Xie K., Lee K. Veterinary Drug Residues in Animal-Derived Foods: Sample Preparation and Analytical Methods // Foods. – 2021. – Vol. 10. – P. 555.

3 Codex Alimentarius. Index of veterinary drugs and their MRLs/RMLs in foodstuff. Updated to the 38th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2015) [Электронный ресурс]. - URL: <http://www.codexalimentarius.org/standards/vetdrugs/veterinary-drugs/en/> (дата обращения 26.10.2021).

4 Wu Q, Peng D, Liu Q, Shabbir MAB, Sajid A, Liu Z, Wang Y, Yuan Z. A novel microbiological method in microtiter plates for screening seven kinds of widely used antibiotics residues in milk, chicken egg and honey // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 10. – P. 436.

5 European Commission Commission decision 2002/657/EC of 12 august 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results // Off. J. Eur. Commun. – 2002. – Vol.50. – P.8-36.

6 Wang C., Li X., Peng T., Wang Z., Wen K., Jiang H. Latex bead and colloidal gold applied in a multiplex immunochromatographic assay for high-throughput detection of three classes of antibiotic residues in milk // Food Control. – 2017. – Vol.77. – P.1-7.

7Wang 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 // Analytical Methods. – 2013. – Vol.5. – P.4430-4435.

8Samsonova J., Fedorova M., Andreeva I., Rubtsova M., Egorov A. Characterization of Anti-Chloramphenicol Antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay // Analytical Letters. – 2010. – Vol.43, №1. – P. 133-141.

9 Chen Y., Kong D., Liu L., Song S., Kuang H., Xu C. Development of an ELISA and Immunochromatographic Assay for Tetracycline, Oxytetracycline, and Chlortetracycline Residues in Milk and Honey Based on the Class-Specific Monoclonal Antibody // Food Anal. Methods. – 2016. –Vol.9. – P. 905-914.