

«Food quality and food safety» (FQFS) (Тамақ өнімдерінің сапасы мен қауіпсіздігі) Халықаралық ғылыми конференцияның материалдары 20-22 қыркүйек, 2023 = «Food quality and food safety» (FQFS)(Качество и безопасность продуктов питания) материалы международной научной конференции 20-22 сентября, 2023= «Food quality and food safety» (FQFS) materials of the international scientific conference 20-22 september,2023. – Астана: КАТИУ им. С. Сейфуллина, 2023. – С.64-67

УДК 637.12:615.33:543.54(043.2)

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ТЕСТА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АНТИБИОТИКОВ В МОЛОКЕ

*Джангулова А., докторант 3 курса  
Казахский агротехнический исследовательский  
университет им. С.Сейфуллина, г. Астана, Казахстан*

Устойчивость к противомикробным препаратам является одной из крупнейших проблем общественного здравоохранения [1]. С момента своего открытия в двадцатом веке антибиотики оказали огромное влияние на здоровье человека и животных, позволяя лечить различные инфекционные заболевания.

По сей день промышленное сельское хозяйство использует противомикробные препараты для лечения и профилактики заболеваний, улучшения состояния животных и повышения производительности [2]. Помимо этого, антибиотики повышают конверсию корма и сохраняют продукты питания [3]. Во всем мире использование антибиотиков в сельском хозяйстве, превышает потребление человеком [4]. Использование противомикробных препаратов у сельскохозяйственных животных является причиной ~80% годового потребления противомикробных препаратов в стране [5], значительная часть которых включает антибиотики, которые важны в медицине при лечении распространенных инфекций у людей, а также необходимы для выполнения серьезных операции, трансплантации органов и химиотерапии [6]. Остатки данных антибиотиков могут передаваться человеку через продукты животного происхождения, такие как молоко, мясо, яйца и другое. Эти остатки могут вызывать аллергические реакции, канцерогенные и мутагенные эффекты, гиперчувствительность или нефропатию, однако наиболее важной проблемой является развитие антибиотикорезистентности [7].

По этой причине ВОЗ установила ПДК для того, чтобы контролировать остаточные количества антибиотиков в продуктах животного происхождения [8]. Следовательно, требуются простые в исполнении, но достаточно чувствительные тесты для определения наличия или отсутствия антибиотиков в продуктах животноводства [9]. Для этого идеально подходят иммунохроматографические – тесты (ИХА - тесты), которые являются

быстрыми и точными, что позволяет проводить тестирование без сложных, дорогостоящих оборудований [101].

**Цель работы** - конструирование ИХА - теста для определения остаточных количеств антибиотиков в молоке.

#### **Объект и методы исследования**

В качестве объекта для исследований использовались полученные ранее поликлональные антитела против антибиотиков стрептомицина, хлорамфеникола и окситетрациклина.

Растворы коллоидного золота с заданным размером частиц получали путем восстановления золото-хлористоводородной кислоты цитратом натрия [11].

Для приготовления конъюгата антител с коллоидным золотом к 10 мл раствора наночастиц золота (pH 7,5-8) добавляли по каплям антитела в концентрации 15-20 мкг/мл. После перемешивания полученного раствора добавляли 1 мл 1% бычьего сывороточного альбумина. Для удаления несвязавшихся антител конъюгат центрифугировали (30 мин, 11000g, 4°C). Супернатант удаляли, осадок растворяли в требуемом объеме Tris-HCl, содержащем 1% БСА и 0,01% азида натрия. Смесь хранили при температуре +4°C [12].

Для получения конъюгатов антибиотиков с овальбумином использовали методы, разработанные J. Wang et. al (2013) [13], J. Samsonova et. al (2010) [14], Y. Chenet. al (2016) [15].

Пробы молока с антибиотиками охлаждали при +2/+8°C и центрифугировали в течение 10 минут при 5000 g. Затем отделяли жир от обезжиренного молока [16]. Образец тщательно перемешивали перед исследованием, затем переносили 200 мкл пробы в микропробирку. Тест-полоску помещали в микропробирку и инкубировали 3 минуты. Извлекали тест-полоску из лунки, помещали на сухую поверхность. Учет результатов производили визуально.

#### **Результаты**

В ИХА - тест включена процедура внутреннего контроля. Окрашивание контрольной линии подтверждает достаточный объем внесенного образца и правильную методику выполнения исследования. При отрицательном результате контрольная линия и соответствующая своему антибиотику тестовая линия (ОТЦ, СТР и/или ХАФ) приобретает красный цвет. Это означает, что образец не содержит антибиотик вообще или содержит его меньше предела обнаружения тест-набора. Окрашивание линии происходит благодаря коллоидному золоту. В результате данного исследования было получено 150 мл раствора коллоидного золота (pH 6,5), который использовали для конъюгации с поликлональными антителами. Готовые конъюгаты ПКА с коллоидным золотом наносили в объеме 10 мкл на подложку для конъюгата. На полоску нитроцеллюлозной мембраны отдельно наносили конъюгаты ОТЦ- ОВА, СТР-ОВА и ХАФ-ОВА для формирования аналитической зоны. Для формирования контрольной зоны системы на расстоянии 5 мм от тестовой зоны наносили раствор

антивидовых антител с концентрацией 0,25 мг/мл. Мембраны высушивали при комнатной температуре в течение 8 часов и при 37 градусов в течение 2 часов и нарезали на полоски. Полученный экспресс-тест проверяли на чувствительность на образцах молока, содержащих определенные количества СТР, ОТЦ и ХАФ. Отсутствие окрашенной тестовой линии наблюдали на нитроцеллюлозной мембране при исследовании молока с концентрацией ОТЦ равной 10 мкг/кг. СТР в образцах молока обнаруживался тест-полоской начиная с концентрации 200 мкг/кг. Тест-полоска детектировала присутствие ХАФ в образцах молока от 0,3 мкг/кг.

### **Обсуждения**

Продукты питания, содержащие остаточные количества антибиотиков опасны для употребления в пищу человеком. В связи с этим актуальной задачей науки является разработка быстрых, точных, специфичных тестов, способных обнаруживать остатки ветеринарных препаратов в продуктах животноводства. В настоящей работе нами был сконструирован ИХА-тест для определения антибиотиков в молоке. Чувствительность тест-полосок при определении ОТЦ, СТР и ХАФ в образцах молока была равна 10 мкг/кг, 200 мкг/кг и 0,3 мкг/кг, соответственно. Эти данные свидетельствуют о возможности использования разрабатываемой ИХА-тест системы для обнаружения ПДК антибиотиков в соответствии с нормативными показателями, установленными ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» [17].

### **Выводы**

Таким образом, сконструирован ИХА – тест для определения остаточных количеств антибиотиков в молоке. Данный тест позволяет обнаружить остаточные количества антибиотиков СТР, ХАФ, ОТЦ в молоке в течение короткого времени.

### **Список использованной литературы**

- 1 Chandra Deb L., Jara M., Lanzas C. Early evaluation of the Food and Drug Administration (FDA) guidance on antimicrobial use in food animals on antimicrobial resistance trends reported by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System (2012-2019) [Text]/ One Health. – 2023. –Vol. 17:100580.
- 2 Berman T.S., Barnett-Itzhaki Z., Berman T., Marom E. Antimicrobial resistance in food-producing animals: towards implementing a one health based national action plan in Israel[Text]/ Israel Journal of Health Policy Research. –2023. – Vol.12(1). -P.18.
- 3 Kirchhelle C. Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935–2017) [Text]/ Palgrave Communications. – 2018. –Vol.4. - P.1–13.
- 4 Aarestrup F. Get pigs off antibiotics // Nature. – 2012. – Vol.486. – P. 465–466.
- 5 Food and Drug Administration CVM Updates - CVM Reports on Antimicrobials Sold or Distributed for Food-Producing Animals (Food Drug Admin, Silver Spring. MD). – 2010.

- 6 Laxminarayan R., et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions [Text]/ *Lancet Infect Dis.* – 2013. –Vol. 13(12). – P.1057–1098.
- 7 Moga A., Vergara-Barberan M., Lerma-Garcia M., Carrasco-Correa E., HerreroMartinez J., Simo-Alfonso E. Determination of antibiotics in meat samples using analytical methodologies [Text]/ *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* – 2021. – Vol.20. – P. 1681-1716.
- 8 FAO/WHO. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods [Text]/ *Codex Alimentarius: International Food Standards.* – 2018. –Vol.2. –P. 2–26.
- 9 Jangulova A. N., Temirgazyev B. S., Bulashev A. K., Akanova Zh. Zh., Serikova Sh. Obtaining oxytetracycline conjugates with protein carriers [Text]/ *Herald of science of S. Seifullin Kazakh agro technical research university: Veterinary sciences.* – 2023. – N1 (001). - P.17-26.
- 10 Dzantiev, B.B., Byzova, N.A., Urusov, A.E., and Zherdev, A.V. Immunochromatographic methods in food analysis [Text]/ *TRAC – Trends in Anal. Chem.* – 2014. – Vol.55. -P. 81-93.
- 11 Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions [Text]/ *Nature Phys. Sci.* - 1973. - № 241. - P. 20-22.
- 12 Яковлева Е.А., Андреева И.П., Григоренко В.Г., Егоров А.М., Осипов А.П. Латеральный проточный иммуноанализ тропонина-I [Текст]/ *Вестн. моск. ун-та.* - 2012. - № 6. - С.364.
- 13 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. – Vol.5. – P.4430-4435.
- 14 Samsonova J., Fedorova M., Andreeva I., Rubtsova M., Egorov A. Characterization of Anti-Chloramphenicol Antibodies by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay [Text]/ *Analytical Letters.* – 2010. – Vol.43(1). – P. 133-141.
- 15 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 [Text]/ *Food Anal. Methods.* – 2016. –Vol.9. – P. 905–914.
- 16 Naik L, Sharma R, Mann B, Lata K, Rajput YS, Surendra Nath B. Rapid screening test for detection of oxytetracycline residues in milk using lateral flow assay [Text]/ *Food Chem.* – 2017. – Vol.219 – P. -85-92
- 17 Заугольникова М.А., Вистовская В.П. Изучение контаминации животноводческой продукции остаточными количествами антибиотиков [Текст]/ *Acta Biologica Sibirica.* – 2016. – Vol. 2. -P. 9-20.