

## Иммунобиотехнологические методы определения антибиотиков в продуктах питания

**Аннотация.** В ветеринарной практике применяется большой перечень антибиотиков в качестве лечебных или профилактических средств. Некоторые из них используются как стимуляторы роста и продуктивности животных. Однако несоблюдение правил применения антибиотиков и/или сроков выдержки забоя животных или получения молока приводят к поступлению остаточного количества препаратов в организм человека с продуктами питания, которые могут вызывать различные патологии. В статье представлен обзор научных работ, опубликованных в рецензируемых научных журналах с 2015 года по настоящее время по разработке и совершенствованию методов исследования молока и мяса на содержание антибиотиков. На основе обзора литературы и результатов собственных исследований автор статьи отмечает преимущества вариантов иммуноферментного анализа (ИФА) перед инструментальными аналитическими методами, такими как жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией и высокоэффективная жидкостная хроматография. Тем не менее, ИФА-наборы из-за сложности процедуры анализа не находят применения в лабораториях пищевой безопасности Республики Казахстан и других стран СНГ. В этой связи в обзорной статье обсуждаются состояние и перспективы разработки простых экспресс-тестов для определения предельно допустимого количества (ПДК) антибиотиков в продуктах животноводства, основанных на использовании иммунохроматографического анализа (ИХА). Такие тесты, не уступая по своей чувствительности ИФА и превосходя его по себестоимости, могли бы быть использованы не только в лабораторных условиях, но и непосредственно потребителями продуктов питания, что будет способствовать надежной защите здоровья населения и развитию животноводства.

**Ключевые слова:** антибиотик, молоко, мясо, иммуноферментный анализ, иммунохроматографический анализ.

DOI: 10.32523/2616-7034-2021-136-3-35-50

### Введение

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 (например, аллергию, нефропатию, поражение печени, репродуктивные нарушения, перенос устойчивых к антибиотикам бактерий человеку, токсичность для костного мозга, развитие раковых болезней и др.) [1]. Кроме того, антимикробные препараты зачастую угнетают микрофлору желудочно-кишечного тракта, приводят к снижению естественной резистентности и, как следствие, развитию заболеваний. В этой связи весьма важно не только регулировать, но и контролировать использование антибиотиков в животноводстве и ветеринарии. 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].

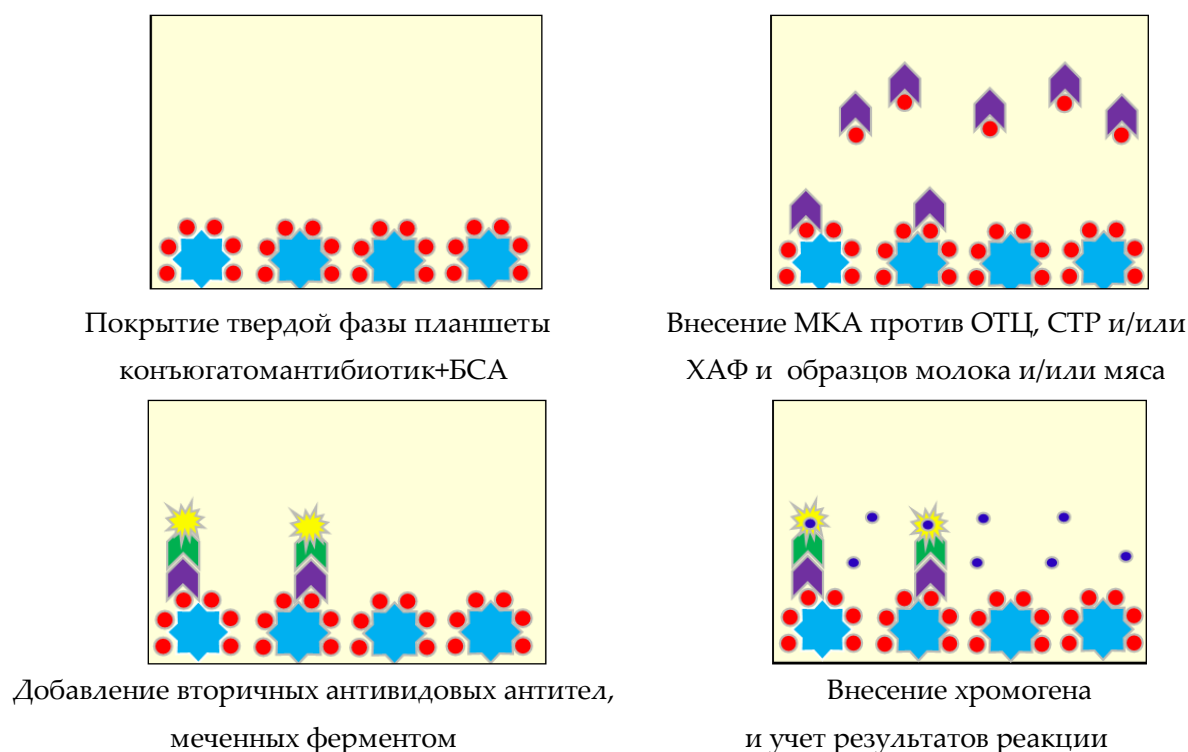
Антимикробные препараты вводятся животным тремя путями: с кормом, перорально или путем инъекции. В теле животных они метаболизируются, однако определенная часть остается в органах, а другая - попадает в окружающую среду с экскрементами и переходит в ткани растений, загрязняет водоисточники и тем самым находит дополнительный путь для проникновения в организм человека. Для защиты здоровья и безопасности потребителей Европейский Союз (ЕС) установил предельно допустимые количества (ПДК) для лекарственных препаратов в продуктах питания [3]. Среди контаминантов продуктов питания важное место занимают антибиотики из классов макролидов (МЛ), тетрациклинов (ТЦ), аминогликозидов (АГ), бета-лактамов (БЛ) и амфениколов (АФ).

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 жидкостную хроматографию с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС) и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), характеризуются высокой точностью, специфичностью и чувствительностью, и используются как эталонные методы [5]. 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. Например, в Республике Казахстан (РК) определение остатков запрещенных и вредных веществ в продуктах животноводства и кормах с применением ЖХ-МС осуществляется лишь Национальным референтным центром по ветеринарии МСХ РК. Следовательно, ветеринарная практика остро нуждается в альтернативных скрининговых экспресс-тестах, позволяющих в условиях обычной лаборатории пищевой безопасности за короткое время провести контроль молока и/или мяса на антибиотики.

В настоящее время для выявления антибактериальных препаратов в продуктах питания взамен инструментальным технологиям все большее распространение получают варианты иммуноферментного анализа (ИФА). В США и Японии данная иммунологическая реакция уже является основным скрининговым тестом для определения 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 [6].

### Основная часть

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. Нами были разработаны ИФА-тесты для обнаружения остаточного количества окситетрациклина (ОТЦ), стрептомицина (СТР) и хлорамфеникола (ХАФ) в молоке и мясе, основанные на конкуренции свободного антибиотика исследуемой пробы и антибиотика, «посаженного» на твердую фазу планшеты в составе белка-носителя – бычьего сывороточного альбумина (БСА), за связывания со специфическими антителами [7]. В качестве последних были испытаны моноклональные антитела (МКА), продуцируемые штаммами мышийных гибридом, против эпитопов СТР, ХАФ и/или ОТЦ (рис.1).



**Рисунок 1. Схема постановки конкурентного ИФА для обнаружения в продуктах животноводства СТР, ХАФ и ОТЦ**

После отделения несвязавшихся реагентов количество МКА, прореагировавших с адсорбированным антигеном, определяли с помощью вторичных антивидовых антител, меченных ферментом. При этом количество антибиотика, содержащегося в исследуемом образце, находилось в обратной корреляции с показателями оптической плотности реакционной жидкости. Диагностическая ценность опытных образцов ИФА-тестов была испытана на 200 пробах молока и 150 образцах мяса в сравнении с коммерческими аналогами фирмы R-Biopharm (Германия): RIDASCREEN® Chloramphenicol, RIDASCREEN® Streptomycin и RIDASCREEN® Tetracyclin. Образцы продуктов были взяты из продовольственных рынков Акмолинской и Карагандинской областей РК и подготовлены к исследованию с помощью отработанных нами методов, которые могут быть использованы в условиях обычной производственной лаборатории. Как показали результаты сравнительного анализа, чувствительность отечественного теста при исследовании образцов молока и мяса на наличие ОТЦ, ХАФ и СТР была достаточно высокой и составляла 80%, 100, 100% и 100%, 89%, 100%, соответственно.

L. An et al. (2016) описали метод непрямого конкурентного ИФА (нкИФА) на основе МКА для обнаружения флорфеникола (ФФ) и тиамфеникола (ТАФ) в съедобных тканях животных и кормах с целью мониторинга незаконного использования указанных антибиотиков [8]. МКА, имея высокую специфичность к антибиотикам, позволяли выявлять наличие ФФ и ТАФ до концентрации 0,21 мкг/л и 0,35 мкг/л соответственно. Предельно обнаруживаемые количества (ПОК) антибиотиков в мышечной ткани составляли от 0,07 до 0,14 мкг/кг, а в кормах - от 2,9 до 5,2 мкг/кг. Исследователями установлена тесная корреляция между результатами нкИФА и ВЭЖХ, что позволило им сделать заключение о возможности использования нкИФА для контроля мяса и кормов на содержание ФФ и ТАФ. Авторы также отмечают простоту методов, использованных для подготовки образцов к исследованию в нкИФА.

Сравнительные исследования методов ИФА и ВЭЖХ с ультрафиолетовым (УФ) детектированием при анализе 450 образцов мяса крупного рогатого скота (КРС), мелкого рогатого скота (МРС), птиц, а также сырого молока на содержание ТЦ были выполнены

K. Bahmani et al. (2020) [9]. По данным авторов, показатели извлекаемости четырех групп ТЦ составляли 72-100%, а ПОК антибиотиков в пробах мяса и сырого молока находились в пределах 3,7–9,0 мкг/кг. ИФА не уступал ВЭЖХ-УФ по точности, однако этапы подготовки образцов у иммуноанализа были более простыми и соответствовали требованиям, предъявляемым директивой ЕС [6].

Важным преимуществом вариантов ИФА перед инструментальными аналитическими методами является то, что они не требуют дорогостоящего аналитического оборудования, упрощают этапы подготовки исследуемых образцов и значительно сокращают продолжительность всего анализа [10-12]. Использование ИФА для обнаружения антибиотиков в продуктах животноводства установлено нормативными документами Российской Федерации (РФ) и РК. Так, Федеральной службой РФ по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека утверждены методические указания «МУК 4.1.2158-07: Определение остаточных количеств антибиотиков тетрациклиновой группы и сульфаниламидных препаратов в продуктах животного происхождения методом ИФА» и «МУК 4.1.1912-04: Определение остаточных количеств левомицетина (хлорамфеникола, хлормицетина) в продуктах животного происхождения методом ВЭЖХ и ИФА». Эти нормативные документы устанавливают использование промышленно изготовленных наборов, метрологические характеристики которых не ниже ИФА-наборов компании RIDASCREEN®. «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» (регистрационный номер в реестре государственной системы измерений KZ.07.00.03642-2017). 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 вышеуказанных нормативных документов. 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 мин. оценить результаты в полевом (*pointofcare*) режиме без использования дополнительного оборудования или портативных устройств. Среди них особое внимание заслуживает процедуры, основанные на иммунохроматографическом анализе (ИХА).

ИХА – это технология, сочетающая принципы иммунологических реакций и хроматографии. Простой дизайн данного анализа состоит из нитроцеллюлозной мембраны, подушечек для образца, конъюгата и абсорбирования. На нитроцеллюлозной мембране готовят тестовые и контрольные линии. Образец, нанесенный на подушечку для образца, начинает мигрировать вдоль полоски по принципу тонкослойной хроматографии. Далее сигнальные метки на конъюгатной подушке (меченое антитело или антибиотик) растворяются и вступают в реакцию с мишенью (антибиотиком или антителом). Комплекс, состоящий из сигнальных меток и мишени, перемещается в область иммобилизованного антибиотика или антитела за счет капиллярной силы и улавливается (накапливается) в тестовой линии, где качественный или количественный анализ может быть проведен по истечении нескольких минут невооруженным глазом или счетчиком тест-полосок соответственно.

Прямой- и/или конкурентный анализ – это два основных формата, обычно используемых в ИХА (рис.2).

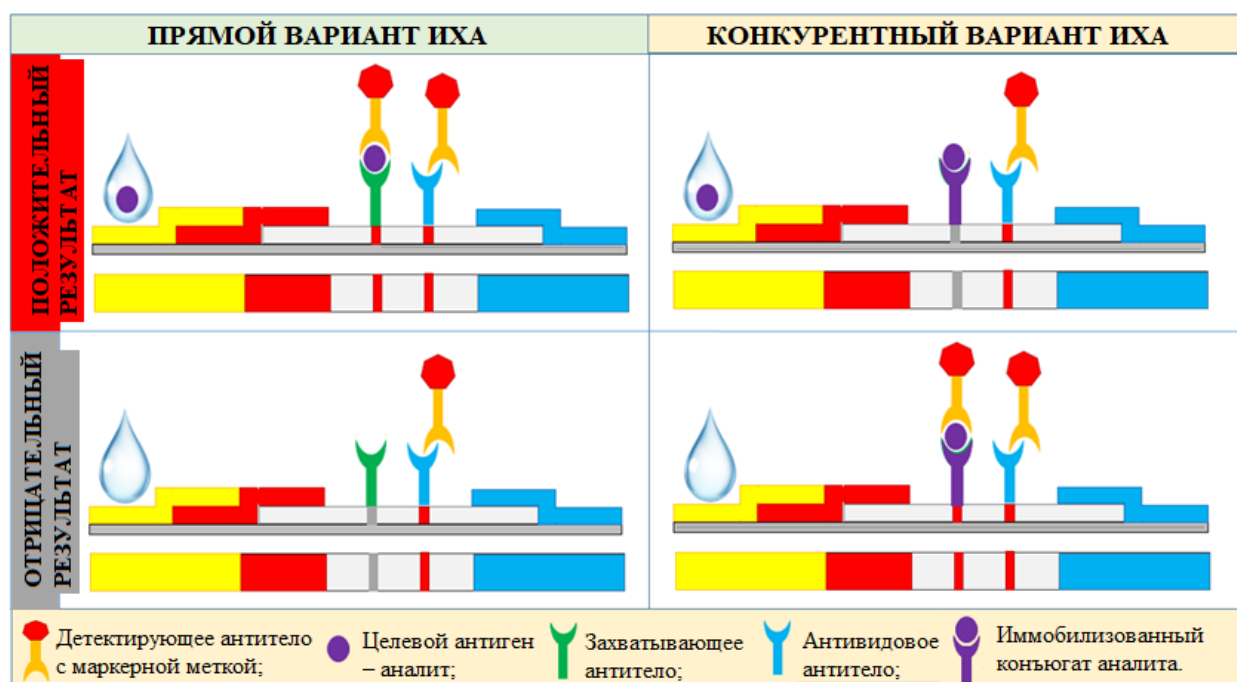
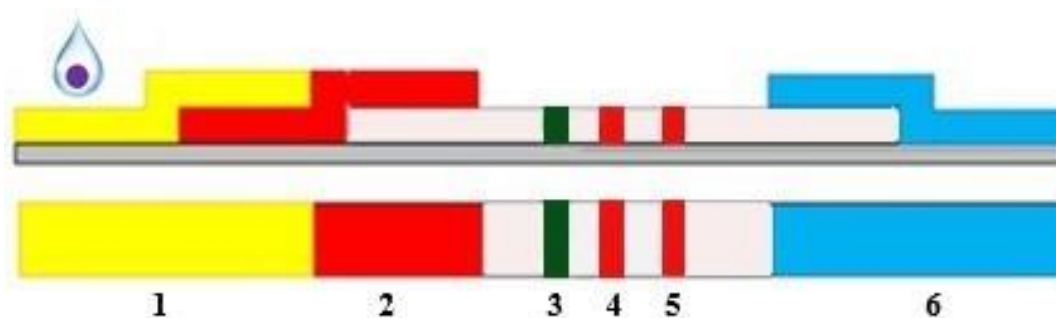


Рисунок 2. Принципы постановки прямого и конкурентного вариантов ИХА

Прямой или «сэндвич» формат используется для обнаружения высокомолекулярных молекул или мишеней с несколькими антигенными эпитопами. Как правило, в этой системе используется пара специфических антител, где захватывающее антитело иммобилизовано на тестовой линии, а детектирующее антитело конъюгируется с маркерной меткой (например, коллоидным золотом). При нанесении исследуемого образца на тест-полоску образуется комплекс: «детектирующее меченное антитело + целевой антиген + захватывающее антитело», который фиксируется на тестовой линии в ходе миграции реакционной жидкости. Обнаруживаемая реакция на тестовой линии прямо пропорциональна количеству мишени (целевого антигена) в исследуемом образце. Конкурентный анализ используется для обнаружения низкомолекулярных молекул или мишеней с единичными антигенными эпитопами, такими как антибиотики и микотоксины. В этом формате комплекс мишень + носитель иммобилизуется на тестовой линии, чтобы конкурировать с целевыми антигенами в образцах за связывание меченных антител. В данном случае обнаруживаемая реакция на тестовой линии будет обратно пропорциональной концентрации мишени в исследуемой пробе.

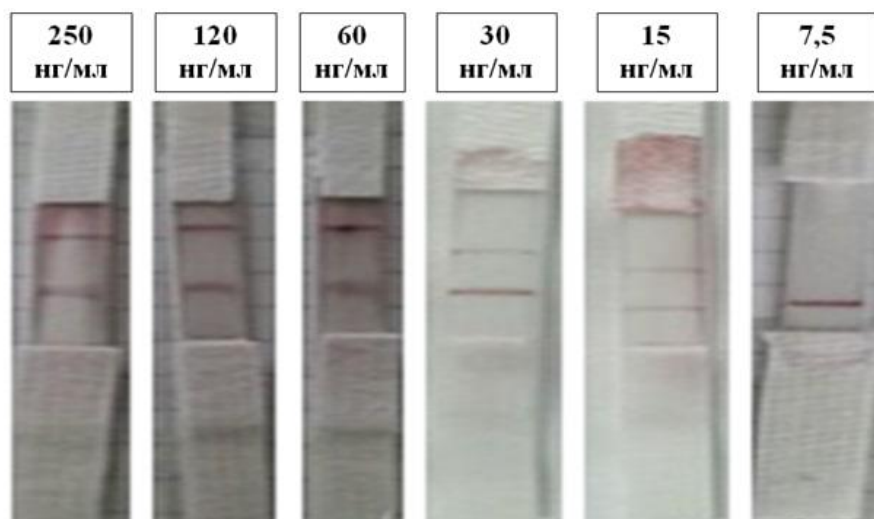
В настоящее время ИХА, как быстрый, простой и экономичный метод, вызывает растущий интерес исследователей, занимающихся совершенствованием методов определения различных контаминантов в молоке и мясе. В наших предыдущих исследованиях был разработан ИХА тест-полоска для обнаружения ивермектина в продуктах животноводства [13, 14]. Использование конъюгата МКА с коллоидным золотом и кроличьих поликлональных антител (ПКА) в качестве реагента тестовой линии позволило нам определить в течение 5-7 мин. содержание антгельминтика до конечной концентрации 3,75 нг/мл. Данный порог чувствительности находится на границе ПДК ивермектина в молоке, но ниже, чем ПДК мясных продуктов. Поэтому для анализа образцов мяса на содержание антгельминтика необходимо было снизить чувствительность теста до 10 нг/мл. Для этой цели нами была сконструирована ИХА тест-система с дополнительным элементом - конкурирующей линией (рис.3).



**Рисунок 3. Устройство тест-полоски ИХА для обнаружения ивермектина в мясе, содержание которого превышает ПДК:**

**1-подушка для образца; 2-подушка для конъюгата; 3- конкурирующая линия; 4-тест-линия; 5-контрольная линия; адсорбирующая подушка**

Конкурирующую линию формировали из тех же МКА, использованных для приготовления конъюгата. Эта линия была включена в тест-систему с одной целью – снизить чувствительность анализа за счет конкурентного связывания аналита с иммобилизованными в ней МКА. Как и следовало ожидать, использование конкурирующей линии привело к снижению аналитической чувствительности ИХА-теста до 15 нг/мл (рис.4).



**Рисунок 4. Чувствительность ИХА тест-система с конкурирующей линией для обнаружения ПДК антгельминтика**

Поскольку ПДК ивермектина в мясных продуктах составляет не более 10-15 нг/мл, то чувствительность предлагаемого нами варианта постановки ИХА-теста позволяет проводить исследование продуктов животноводства на остаточное количество антгельминтика.

В настоящее время в мировой литературе можно найти ряд исследований по разработке различных вариантов ИХА для детекции антибиотиков в пищевых продуктах. Так, цветные латексные наночастицы использовались С. Wang et al. (2017) в мультиплексном ИХА для одновременного обнаружения остатков трех антибиотиков в молоке. Тест-полоска позволила достичь количественного определения с пороговыми значениями 5,0; 3,5; и 1,25 нг/мл для хинолона, ТЦ и сульфонамида соответственно [15].

Л. Naik et al. (2017) для скрининга остаточного количества ОТЦ в молоке испытали полуколичественный конкурентный формат ИХА [16]. Приготовленные наночастицы золота (НЧЗ) были использованы как маркеры в ИХА. Специфичность очищенных кроличьих анти-ОТЦ антител определялась в ИФА. Авторами были оптимизированы мембранные компоненты,

необходимые для исследования молока на наличие антибиотиков, стандартизированы методы получения стабильного конъюгата НЧЗ с анти-ОТЦ антителами. Антибиотик, связанный с белком-носителем, наносился на тестовую линию, а видоспецифичное вторичное антитело - на контрольную линию мембранного матрикса. Валидацию теста проводили путем добавления ОТЦ к образцам молока, не содержащим антибиотиков, и результаты анализа определяли в течение 5 минут без использования какого-либо оборудования. Предел визуального обнаружения составлял 30 нг/мл.

В работах других исследователей [17,18] изучалась возможность определения антибиотиков в молоке с помощью прямого метода ИХА, где специфические антитела конъюгировались с НЧЗ. О. Hendrickson et al. (2020) были разработаны тест-системы для определения неомицина (НЕО) не только в молоке, но и образцах мяса индейки, куриного яйца и мёда [19]. Новизна предлагаемого метода основана на новом подходе введения маркера, а именно: на конъюгации НЧЗ не со специфическими антителами, как в прямых вариантах ИХА, а с антивидовыми. Ранее этими же исследователями была доказана более высокая чувствительность непрямого ИХА по сравнению с его непрямым вариантом [20, 21]. По данным авторов предлагаемая тест-система, основанная на легкодоступной и стабильной золотой метке, значительно повышает чувствительность анализа. Достоинством метода является то, что необходимые компоненты для обнаружения различных пищевых контаминантов могут быть приготовлены без дополнительных синтезов, поскольку маркировка специфических антител в данном варианте иммуноанализа не требуется. Новый вариант ИХА обнаруживал НЕО в пищевых продуктах в течение 15 минут с ПОК равным 0,1-10 нг/мл. Тест-полоска показывала незначительную перекрестную реактивность с антибиотиками из своего и других протестированных классов. Следует отметить, что при использовании данного теста пробоподготовка не потребовалась для молока и была достаточно проста для экстракции антибиотика из мяса, яиц и мёда.

J. Peng et al. (2016) разработали ИХА-тест для одновременного скрининга пяти антибиотиков в молоке, а именно: линкомицина (ЛИН), гентамицина (ГЕН), канамицина (КАН), СТР и НЕО с использованием соответствующих МКА, конъюгированных с НЧЗ [18]. Конъюгаты антибиотиков были иммобилизованы на отдельных тестовых линиях для выявления их мечеными МКА. При использовании теста пороговые значения антибиотиков были равны 25 нг/мл для ЛИН и ГЕН, 50 нг/мл для КАН и СТР и 100 нг/мл для НЕО и были ниже ПДК, установленных ЕС. В случае использования счетчика мультиплексная полоска позволяла обнаруживать антибиотики на уровне 2,5-5 нг/мл в молоке. Точность и воспроизводимость анализа подтверждались и на образцах пищевых продуктов. Авторы заключают о возможности использования данного формата ИХА для быстрого и одновременного скрининга нескольких антибиотиков в продуктах питания в полевых условиях.

В постсоветском пространстве для определения остаточных количеств антибиотиков и лекарственных препаратов в молоке разработан ГОСТ 32254-2013: Межгосударственный стандарт «Молоко» (Армения, Молдова, РФ, Узбекистан). Стандарт устанавливает требования ИХА-тестам для экспресс-определения пенициллина (ПЕН), ТЦ, ХАФ, СТР, сульфаниламидов в сыром и термически обработанном молоке, а также описывает метрологические и технические характеристики, необходимые для экспресс-анализа указанных антибиотиков в молоке. Кроме того, имеется ГОСТ 32219-2013: Межгосударственный стандарт «Молоко и молочные продукты» (Армения, Беларусь, Киргизия, РФ, Узбекистан), разработанный с учетом основных нормативных положений международного стандарта ISO 18330:2003 "Молоко и молочные продукты ("Milk and milkproducts - Guidelines for the standardized description of immunoassays or receptor assays for the detection of antimicrobial residues "). Стандарт распространяется на сырое, пастеризованное, стерилизованное и предварительно восстановленное сухое молоко и устанавливает качественные иммунологические методы определения БЛ, ТЦ, ХАФ и СТР с использованием ИХА-наборов производителей из стран дальнего зарубежья: "Delvotest BLF" (Нидерланды), "Twinsensor" (Бельгия), PROQUI-TEST 4" (Испания), "Betastar 4D" (США).и др. Стандарт допускает

использование и других тестов с техническими характеристиками и метрологическими характеристиками не ниже рекомендуемых. Институтом биоорганической химии НАН Беларуси разработаны ИХА-наборы для обнаружения ТЦ и БЛ (Продоскрин Лактест-2) и ТЦ, БЛ, ХАФ и СТР (Продоскрин Лактест-4), имеющие пределы чувствительности, соответствующие нормативам, установленным ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» [22]. Таким образом, в мониторинговых исследованиях молока на остаточные количества антибиотиков практическая ветеринария стран СНГ отдает предпочтение ИХА-тестам, которые просты в использовании и дешевле по сравнению с ИФА-наборами. Например, средняя стоимость одного анализа с использованием ИФА-наборов составляет 3000 - 3700 тенге [23], что значительно выше, чем у ИХА - наборов: 1357-1378 тенге [24,25].

Современные подходы, применяемые для дальнейшего совершенствования ИХА-тестов для мониторинга опасных веществ в молоке, весьма разнообразны. Среди них наибольший интерес представляют разработки, основанные на применении люминесцентных (ЛНЧ) и/или магнитных наночастиц (МНЧ), ферментов и нанозимов - наночастиц, имитирующих природные ферменты.

Флуоресцеинаизотиоцианат – это типичный флуоресцентный зонд, который может поглощать ультрафиолетовые лучи или синий свет и излучать видимый желто-зеленый свет. W. Sheng et al. (2017) применили ИХА на основе окрашенных полимерных микросфер в качестве меток для обнаружения энрофлоксацина (ЭНР) [26]. Чувствительность этого анализа составляла 1 мкг/л в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) и 10 мкг/л в молоке. Некоторые комплексы, которые встречаются в молоке, такие как витамин А, триптофан, тирозин, фенилаланин и рибофлавин, могут флуоресцировать при соответствующей длине волны возбуждения в процессе проверки качества молока. Этот феномен, по мнению M. Brandao et al. (2017), может привести к снижению чувствительности обнаружения флуоресценции с использованием обычных хромофоров [27]. Авторы считают, что разработка долгоживущих зондов распада для ИХА может минимизировать влияние флуоресценции молока на чувствительность анализа. С этой точки зрения, хелаты лантаноидов (например, европия, тербия, самария, диспрозия), представляющие собой класс люминесцентных материалов, привлекают все большее внимание из-за их длительности флуоресценции, острых спектров излучения, больших стоксовых сдвигов и низкого фона флуоресцентной интерференции.

Флуоресцентный ИХА был разработан для обнаружения афлотоксина (AFM1) в молоке [28]. Чувствительность теста составляла 0,03 нг/мл, что в 10 раз выше, чем чувствительность анализа на основе НЧЗ. Для обнаружения следов AFM1 в сыром молоке был разработан модифицированный двухэтапный ИХА [29]. В отличие от традиционного ИХА, в данном формате использовались два вида МНЧ. Один из них, с высокой концентрацией антител, использовался для захвата AFM1 в тестируемом образце, тогда как другой с низкой концентрацией антител - для принятия решения по результатам теста. В работе были исследованы такие критические факторы, как концентрация антител в МНЧ и их размеры. Двухэтапный анализ показал идеальную чувствительность для скрининга следов AFM1 в образцах молока без дополнительной предварительной обработки образцов. Пороговое значение для невооруженного глаза составляло 0,02 мкг/л и соответствовало ПДК AFM1 в сыром молоке и молочных продуктах. Чувствительность двухэтапного ИХА была увеличена примерно в 25 и 50 раз по сравнению с традиционным форматом на основе МНЧ и/или НЧЗ соответственно. Учитывая увеличение интенсивности сигнала в зоне захвата по мере накопления МНЧ, L. Yan et al. (2018) разработали ИХА с усиленным сигналом за счет двойных МНЧ для мониторинга остатков фуразолидона в молоке [30]. Усилению сигнала способствовало образование двухзондовых сетевых комплексов. ПОК анализа составляло 0,044 нг/мл в сухом обезжиренном молоке, что в 10 раз выше, чем у ИХА/НЧЗ.



Y. Chen et al. (2016) сконструировали ИХА на основе ближней инфракрасной флуоресценции для мультиплексного экспресс-обнаружения (в течение 20 мин) остатков антибиотиков в молоке 4 классов: БЛ, ТЦ, хинолонов и сульфаниламидов с чувствительностью 8, 2, 4 и 8 нг/мл, соответственно [31].

J. Zhou et al. (2018) создали квадруплексный ИХА с использованием НЧЗ для обнаружения в молоке остатков антибиотиков четырех классов. НЧЗ, меченные бычьим сывороточным альбумином, распыляли на контрольную линию с целью уменьшения ошибок анализа путем расчета относительной оптической интенсивности [32]. Для радиометрического количественного анализа диапазоны обнаружения ПЕН, ТЦ, СТР и ХАФ в молоке составляли 0,13-1,0; 0,13-8,0; 0,78-25,0 и 0,019-1,2 нг/мл соответственно.

На рынке ветпрепаратов для определения остаточных количеств антибиотиков в мясе и мясных продуктах предлагаются те же ИФА-наборы, предназначенные для исследования молока и других видов продуктов животноводства [23, 33]. Исследование мяса на остаточные количества антибиотиков представляет собой более сложную задачу, чем анализ молока, т.к. мясо представляет собой сложную матрицу, состоящую из нескольких веществ, таких как вода (72% - 75%), азотистые соединения (примерно 21%, включая белки и небелковые азотистые соединения) и липиды (2,5% - 15%) [34]. Такое разнообразие веществ очень затрудняет анализ образцов мяса на антибиотики. Поэтому следует применить различные методы подготовки образцов, чтобы удалить нежелательные компоненты из тканей мяса. Следовательно, необходимы исследования по разработке быстрых, недорогих, надежных, воспроизводимых, селективных и чувствительных процедур экстракции антибиотиков из мяса. Эти методики должны устранить все помехи и обеспечить эффективную экстракцию антибиотиков из мышечной ткани и высокие коэффициенты концентрирования. Другими словами, нужны новые методы подготовки образцов, включающие этапы экстракции, очистки и обогащения антибиотиков в образцах мяса в сочетании с чувствительными тестами. Подробный анализ и обсуждение текущей тенденций и возможных будущих перспектив в этой сфере исследований читатели могут найти в обзорах A. Moga et al. (2021) [35] и B. Wang et al. (2021) [36]. Отсутствие коммерческих ИХА-наборов для определения остаточных количеств антибиотиков в мясе и мясных продуктах объясняется отчасти трудностью извлечения антибиотиков из мышечной ткани и подготовкой образцов к исследованию. Ниже приведены результаты некоторых исследований, посвященные разработке ИХА-тестов для контроля мяса и мясных продуктов на антибиотики.

Y. Wu et al. (2016) описали экспресс-ИХА для одновременного обнаружения остатков ЭНР и офлоксацина (ОФЛ) в куриных мышцах и свинине [37]. ИХА представлял собой одностадийный анализ, не требующий профессионального персонала и экспериментальных инструментов. Предел принятия решения (СС $\alpha$ ) для тест-полоски был равен 0,089 нг/мл, а способность обнаружения (СС $\beta$ ) с помощью сканера - 0,217 нг/мл. Предел обнаружения составил 10 нг/мл. Степень совпадения результатов ИХА и ВЭЖХ достигала 100% при концентрации ЭНР и ОФЛ более 10 нг/мл. Разработанная тест-полоска обладала высокой специфичностью и позволяла получать результат в течение 20 мин без помощи специального оборудования.

Непрямой конкурентный варианты ИФА и ИХА были испытаны D. Mukunzi et al. (2018) для обнаружения остатков фторхинолона (ФХ) в образцах мышц курицы с применением МКА против пefлоксацина (ПЕФ) [38]. В оптимизированных условиях МКА показали приемлемую перекрестную реактивность с девятью ФХ с пределом обнаружения 0,082 нг/мл. Значения визуального пограничного значения (cut-off) для тест-полосок в растворе 0,01М ЗФР и образцах мяса находились в пределах 2,5-50 нг/мл и 5-100 мкг/кг соответственно. Эти результаты показывают, что методы ИФА и ИХА на основе МКА против ПЕФ вполне подходят для одновременного обнаружения и рутинного мониторинга остатков ФХ в курином мясе.

J. Wang et al. (2019) сообщают о хорошей специфичности, чувствительности, стабильности и надежности одноэтапного ИХА/НЧЗ и нкИФА при выявлении колистина в кормах и продуктах животного происхождения [39]. Продолжительность исследования образцов в нкИФА не превышала 60 мин, тогда как время анализа в ИХА составляло менее 15 мин. Авторами сделан вывод о том, что эти два иммуноанализа можно выборочно использовать для быстрого мониторинга незаконного использования антибиотика в кормах и остатков колистина в продуктах животноводства.

Чувствительность и специфичность ИХА в основном зависят от специфичности антител, наноматериалов и методов метки антител/антигенов. По данным X. Dong et al. (2019), наночастицы европия, конъюгированные с козьими антителами к мышинному IgG, могут детектировать специфически и мультплексно синтетические антибиотики 1-аминогидантоин, 3-амино-2-оксазолидинон, семикарбазид и 3-амино-5-морфолинометил-1,3-оксазолидинон, запрещенные ЕС с 1995 г [40]. Используемый формат ИХА позволял исследователям одновременно обнаруживать невооруженным глазом метаболиты, добавленные в образцы рыбы, в течение 10 минут. Пределы обнаружения вышеуказанных антибиотиков составляли 0,05; 0,1; 0,1 и 0,2 нг/г соответственно. Авторы заключают, что разработанный иммуноанализ является высокоэффективным инструментом для скрининга метаболитов нитрофурана в образцах рыб и рыбной продукции.

Как видно из вышеприведенного анализа источников литературы, НЧЗ являются наиболее часто используемыми сигнальными материалами в ИХА. Однако чувствительность ИФА/НЧЗ обычно ограничивается неполной конкуренцией между свободными целевыми аналитами и иммобилизованными антигенами за связывание антител, меченных НЧЗ. Для того чтобы снять это ограничение, L. Su et al. (2021) синтезировали асимметричные наночастицы Au-SiO<sub>2</sub> (НЧАu-SiO<sub>2</sub>) [41]. Последние сочетают два разных физико-химических свойства на своих противоположных сторонах, где сторона НЧАu в основном обладает функциями конъюгирования антител и обеспечения сигнала, а сторона SiO<sub>2</sub> в первую очередь обеспечивает стабильную функцию. Благодаря уникальной асимметричной наноструктуре только сторона НЧАu может взаимодействовать с целевыми аналитами посредством специфических взаимодействий антиген-антитело, что может значительно повысить эффективность конкуренции. Биосенсор иммуноанализа показал предел обнаружения фуразолидона, равный 0,08 нг/мл, что в 10 раз ниже, чем у ИХА, в котором в качестве сигнального материала использовались НЧЗ. Кроме того, ИХА/НЧАu-SiO<sub>2</sub> показал хорошие результаты при исследовании образцов продуктов питания (курица, свинина, мед и говядина) с пределами визуального обнаружения 0,8 нг/г; 0,16 нг/г; 0,4 нг/мл и 0,16 нг/г соответственно. Асимметричные наночастицы НЧАu-SiO<sub>2</sub> обладали преимуществами обоих материалов, что расширяет возможность их применения в качестве потенциальной альтернативы в быстром и чувствительном обнаружении остатков антибиотиков.

## Выводы

Таким образом, анализ научной литературы показывает возможность создания и дальнейшего совершенствования простых в исполнении, но достаточно чувствительных и специфичных иммунобиотехнологических тест-систем на основе различных вариантов ИХА, позволяющих за несколько минут определить остаточные количества антибиотиков в образцах молока и мяса.

Новые методы аналитического контроля и мониторинга безопасности пищевой продукции станут не только надежным звеном в охране здоровья населения, но и будут способствовать росту экспортного потенциала страны-разработчика, что в свою очередь положительно отразится на развитии животноводства.

**Благодарность.** 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. Bacanlı M., Basaran N. Importance of antibiotic residues in animal food // *Food Chem Toxicol.* - 2019. - V.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. - V. 10. - P. 555.
3. [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/mrl/regpdf/2001\\_04\\_25-0807\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/mrl/regpdf/2001_04_25-0807_en.pdf).
4. Wu Q., Peng D., Liu Q., et al. A novel microbiological method in microtiter plates for screening seven kinds of widely used antibiotics residues in milk, chicken egg and honey. // *Front Microbiol.* - 2019. - V. 10. - P. 436.
5. Yang B., Wang L., Luo C. et al. Simultaneous determination of 11 aminoglycoside residues in honey, milk, and pork by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and molecularly imprinted polymer solid phase extraction // *J AOAC Int.* - 2017. - V.100, №6. - P.1869-1878.
6. 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. - V. 50. - P.8-36.
7. Отчет о НИР по теме: «Разработка экспресс-теста для обнаружения остаточных количеств антибиотиков в продуктах животного происхождения» (заключительный отчет) // Булашев А.К., Куйбагаров М.А., Шенжанов К.Т. и др./ № Гос. регистрации 0109РК00897. - 2011. - 78 с.
8. 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.
9. 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.
10. Xu F., Ren K., Yang Y. et al. Immunoassay of chemical contaminants in milk: a review // *J. Integr. Agricult.* - 2015. - V. 14, №11. - P.2282-2295.
11. 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.
12. Lu Y., Sheng W., Liu B. et al. ELISA-based sensing in food safety and quality analysis. In: Lu X (ed) *Sensing techniques for food safety and quality control* // Royal Society of Chemistry, Cambridge. - 2017. - pp 141-163.
13. Отчет о НИР по теме: «Разработка методов оценки качества и контроля ветеринарно-санитарной безопасности продукции животноводства и кормов» (заключительный отчет) // Булашев А.К., Акибеков О.С., Ескендирова С.З. и др./ № Гос. регистрации 0112 РК 01341. - 2014. - 72 с.
14. Bulashev A., Akibekov O., Zhumalin A. et al. Lateral flow-test for express detection of Ivermectin in foods // *Proceedings of 18<sup>th</sup> Federation of Asian Veterinary Associations Congress, Singapore.* - 2014 - P.114.
15. Wang C., Li X., Peng T. 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. - V.77. - P.1-7.
16. Naik L., Sharma R., Mann B. Rapid screening test for detection of oxytetracycline residues in milk using lateral flow assay // *Food Chemistry.* - 2017. - V. 219. - P. 85-92.

17. Shi Q., Huang J., Sun Y. et al. A SERS-based multiple immuno-nanoprobe for ultrasensitive detection of neomycin and quinolone antibiotics via a lateral flow assay // *Microchim. Acta.* - 2018. - V. 85, №2. - P.84.
18. Peng J., Wang Y., Liu L. et al. Multiplex lateral flow immunoassay for five antibiotics detection based on gold nanoparticle aggregations // *RSC Adv.* - 2016. -V. 6, №10. - P.7798-7805.
19. Hendrickson O.D., Byzova N.A., Zvereva E.A. et al. Sensitive lateral flow immunoassay of an antibiotic neomycin in foodstuffs // *J. Food Sci. Technol.* - 2020. - doi.org/10.1007/s13197-020-04541-z.
20. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Shanin I.A. et al. Highly sensitive immunochromatographic detection of antibiotic ciprofloxacin in milk // *Appl. Biochem. Microbiol.* - 2018. - V. 54, №6. - P.670-676.
21. Berlina A.N., Bartosh A.V., Sotnikov D.V. et al. Complexes of gold nanoparticles with antibodies in immunochromatography: comparison of direct and indirect immobilization of antibodies for the detection of antibiotics // *Nanotechnol. Russ.* - 2018. - V. 13, №7. - P.430-438.
22. Тест-наборы для молока Продоскрин Лактест-4 [Электронный ресурс]. -URL: <https://lactotest.com/product/prodoskrin-lactest-4/> (дата обращения: 10.07.2021).
23. Antibiotics ELISA Kits [Electronic resource]. - URL: [www.biovision.com/products/elisa-kits/antibiotics-elisa-kits.html](http://www.biovision.com/products/elisa-kits/antibiotics-elisa-kits.html) (Accessed: July 21, 2021).
24. Экспресс-тест PROQUITEST 4-х сенсорный [Электронный ресурс]. URL: [www.biomer.ru/index.php?part=production&item\\_id=735](http://www.biomer.ru/index.php?part=production&item_id=735) (дата обращения: 10.07.2021).
25. For easy and accurate antibiotic residue testing [Electronic resource]. URL: <http://petrolabspb.ru/delvotest-blf--delvotest> (Accessed: July 15, 2021).
26. Sheng W., Li S., Liu Y. et al. Visual and rapid lateral flow immunochromatographic assay for enrofloxacin using dyed polymer microspheres and quantum dots // *Mikrochim. Acta.* - 2017. - V.184. - P.4313-4321.
27. Brandao M.P., Carvalho dos A.V., Bell M.J.V. Time-resolved fluorescence of cow and goat milk powder // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* - 2017. - V.171. - P. 193-199.
28. Tang X. Q., Zhang Z. W., Li P. W. et al. Sample-pretreatment-free based high sensitive determination of aflatoxin M1 in raw milk using a time-resolved fluorescent competitive immunochromatographic assay // *RSC Adv.* - 2015. - V. 5. - P.558-564.
29. Liu D., Huang Y., Wang S. et al. A modified lateral flow immunoassay for the detection of trace aflatoxin M1 based on immunomagnetic nanobeads with different antibody concentrations // *Food Control.* - 2015. - V.51. - P.218-224.
30. Yan L., Dou L., Bu T. et al. Highly sensitive furazolidone monitoring in milk by a signal amplified lateral flow assay based on magnetite nanoparticles labeled dual-probe // *Food Chem.* - 2018. - V.261. - P.131-138.
31. Chen Y., Chen Q., Han M. M. et al. Near-infrared fluorescence-based multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of four antibiotic residue families in milk // *Biosens. Bioelectron.* - 2016. - V.79. - P.430-434.
32. Zhou J., Nie W., Chen Y. et al. Quadruplex gold immunochromatographic assay for four families of antibiotic residues in milk // *Food Chem.* - 2018. - V.256. - P.304-310.
33. Food & Feed Analysis [Electronic resource]. -URL:<https://food.r-biopharm.com/products/ridascreen> (Accessed: July 30, 2021).
34. Cobos A., Diaz O. Chemical composition of meat and meat products. In *Handbook of food chemistry.* - 2015. - pp. 1-32.
35. Moga A., Vergara-Barberan M., Lerma-Garcia M.J. et al. Determination of antibiotics in meat samples using analytical methodologies: A review // *Compr Rev Food Sci Food Saf.* - 2021. - V.20. - P.1681-1716.
36. Wang B., Xie K., Lee K. *Veterinary Drug Residues in Animal-Derived Foods: Sample Preparation and Analytical Methods* // *Foods.* - 2021. - V. 10. – P.555.

37. Wu Y., Guo S., Dong Q. et al. Development of an immunochromatographic test strip for rapid simultaneous detection of enrofloxacin and ofloxacin in tissue of chicken muscle and pork // *Food Analytical Methods*. - 2016. - V.9, №10. - P.2807-2813.
38. Mukunzi D., Suryoprabowo S., Song S. et al. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay and lateral-flow test strips for pefloxacin and its analogues in chicken muscle samples // *Food and Agric. Immunol.* - 2018. - V.29, №1. - P.484-497.
49. Wang J., Zhou J., Chen Y. et al. Rapid one-step enzyme immunoassay and lateral flow immunochromatographic assay for colistin in animal feed and food // *J. Anim. Sci. Biotech.* - 2019. - V. 10. - P.82.
40. Dong X., Gao Y.Q., Zhang X. et al. Multiplex europium (III) nanoparticles immunochromatographic assay method for the detection of four nitrofurantoin metabolites in fish sample // *Microchemical Journal*. - 2019. - V.150.
41. Su L., Wang L., Xu J. et al. Competitive Lateral Flow Immunoassay Relying on Au-SiO<sub>2</sub> Janus Nanoparticles with an Asymmetric Structure and Function for Furazolidone Residue Monitoring // *J. Agric. Food Chem.* - 2021. - V.69, №1. - P.511-519.

#### А.Қ. Булашев

*С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті, Нұр-Сұлтан, Қазақстан*

#### Тағам құрамындағы антибиотиктерді иммунобиотехнологиялық әдістермен анықтау

**Аңдатпа.** Ветеринарлық тәжірибеде көптеген антибиотиктер емдік немесе профилактикалық препараттар ретінде қолданыс тауып отыр. Олардың кейбіреулері жануарлардың өсуі мен өнімділігін ынталандырушы ретінде де қолданылады. Алайда, антибиотиктерді қолдану ережелерін сақтамау және препарат егілген малды мерзімінен бұрын сою немесе оның сүтін тұтыну адам ағзасына мал өнімдері арқылы дәрілік заттардың қалдық мөлшерлерінің енуіне әкеліп, әр түрлі патологияларды тудыруы мүмкін. Мақалада сүт пен ет өнімдерінде антибиотиктерді анықтауға арналған әдістерді әзірлеу мәселелері бойынша шетелдік беделді журналдарда 2015 жылдан бастап қазіргі уақытқа дейін жарияланған ғылыми еңбектерге шолу жасалынған. Мақала авторы әдеби шолу және жеке зерттеулерінің нәтижелеріне сүйене отырып, иммунды ферменттік талдау (ИФТ) қойылымдарының аспаптық аналитикалық әдістерге қарағанда, айталық тандемді масс-спектрометрия-сұйық хроматография және жоғары өнімді сұйық хроматографиямен салыстырғанда артықшылықтарын атап өткен. Алайда, талдау процедурасының күрделілігіне байланысты ИФТ жинақтары Қазақстан Республикасы мен ТМД-ның басқа елдерінің азық-түлік қауіпсіздігі зертханаларында қолданыс таба алмай келеді. Осыған орай, шолу мақаласында иммунохроматографиялық талдауды (ИХТ) қолдану негізінде мал өнімдеріндегі антибиотиктердің шекті рұқсат етілген мөлшерін (ШРМ) анықтау үшін қарапайым экспресс-тестілерді (сыналымдарды) әзірлеу және жетілдіру мүмкіншіліктері талқыланады. ИФТ-ға сезімталдығы жағынан кем түспейтін, ал бағасы бойынша ұтымдырақ мұндай сыналымдарды тек зертханалар ғана емес, сонымен қатар кез-келген азық-түлік тұтынушысы да қолдана алады, ал бұл жағдайхалықтың денсаулығын сенімді қорғауға және мал шаруашылығының дамуына оң ықпалын тигізбек.

**Түйін сөздер:** антибиотик, сүт, ет, иммунды-ферментті талдау, иммунохроматографиялық талдау.

**A.K. Bulashev**

*S. Seifullin Kazakh Agro Technical University, Nur-Sultan, Kazakhstan*

### **Immunobiotechnological methods for the determination of antibiotics in food**

**Abstract.** In veterinary practice, a large list of antibiotics is used as therapeutic and/or prophylactic agents. Some of them are used as stimulators of the growth and productivity of animals. However, non-observance of the rules for the use of antibiotics and / or timing of slaughter or obtaining milk leads to the intake of a residual amount of antibiotics into the human body with food and can cause various pathologies. The article provides an overview of research papers published in peer-reviewed journals from 2015 to the present on the development and improvement of methods for testing milk and meat for antibiotics. Based on the literature review and the results of his own study, the author of the article notes the advantages of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) options over instrumental analytical methods, such as liquid chromatography with tandem mass spectrometry and high-performance liquid chromatography. However, due to the complexity of the analysis procedure, ELISA kits are not used in food safety laboratories in the Republic of Kazakhstan and other CIS countries. The article describes the state and prospects for the development of simple rapid tests to determine the maximum residue limit (MRL) for antibiotics in livestock products, based on the use of Lateral Flow Assay (LFA). Such tests, not inferior in their sensitivity to ELISA and surpassing it in cost, could be used not only in laboratory conditions, but also directly by food consumers, which will contribute to reliable protection of public health and the development of animal husbandry.

**Key words:** antibiotic, milk, meat, enzyme linked immunosorbent assay, lateral flow assay.

### **References**

1. Bacanlı M., Basaran N. Importance of antibiotic residues in animal food, *Food Chemical Toxicology*, 125, 462-466 (2019).
2. Wang B., Xie K., Lee K. Veterinary Drug Residues in Animal-Derived Foods: Sample Preparation and Analytical Methods, *Foods*, 10, 555 (2021).
3. [https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/mrl/regpdf/2001\\_04\\_25-0807\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/mrl/regpdf/2001_04_25-0807_en.pdf).
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*, 10, 436 (2019).
5. Yang B., Wang L., Luo C., Wang X., Sun C. Simultaneous determination of 11 aminoglycoside residues in honey, milk, and pork by liquid chromatography with tandem mass spectrometry and molecularly imprinted polymer solid phase extraction, *Journal of AOAC International*, 100 (6), 1869-1878 (2017).
6. European 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, *Official Journal of the European Community*, 50, 8-36 (2002).
7. Bulashev A.K., Kuibagarov M.A., Shenzhanov K.T., Kadyrbekov Kh. Kh., Ryskeldinova D.A., Abilmagzhanov A.B., Zhumalin A.Kh. Otchet o NIR po teme: «Razrabotka ekspress testa dlya obnaruzheniya ostatochnyh kolichestv antibiotikov v produktah zhivotnogo proiskhozhdeniya» (Research report: "Development of a rapid test for the detection of antibiotic residues in animal products"). No. Gosudarstvennoy registracii 0109RK00897, 78 (2011) (In Russian).
8. An L., Wang Y., Pan Y., Tao Y., Chen D., Liu Z., Yang W., Peng D., Yuan Z. 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 Analytical Methods*, 9, 2434-2443 (2016).

9. Bahmani K., Shahbazi Y., Nikousefat Z. Monitoring and risk assessment of tetracycline residues in foods of animal origin, *Food Science Biotechnology*, 29, 441-448 (2020).
10. Xu F., Ren K., Yang Y., Guo J., Ma G., Liu Y., Lu Y., Li X. Immunoassay of chemical contaminants in milk: a review, *Integrative Agriculture*, 4 (11), 2282-2295 (2015).
11. Parthasarathy R., Monette C., Bracero S., Saha M. Methods for field measurement of antibiotic concentrations: limitations and outlook, *FEMS Microbiology Ecology*, 94, 8 (2018).
12. Lu Y., Sheng W., Liu B., Wang S. ELISA-based sensing in food safety and quality analysis. In: Lu X (ed) *Sensing techniques for food safety and quality control*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 141-163 (2017).
13. Bulashev A.K., Akibekov O.S., Eskendirova S.Z., Muhanbetkaliev E.E., Zhumalin A.Kh. Otchet o NIR po teme: «Razrabotka metodov ocenki kachestva i kontrolya veterinarno-sanitarnoy bezopasnosti produkcii zhivotnovodstva i kormov». (Research report: "Development of methods for assessing the quality and control of veterinary and sanitary safety of livestock products and feed"). No. Gosudarstvennoy registracii 0112RK01341, 72 (2014) (In Russian).
14. Bulashev A., Akibekov O., Zhumalin A., Zhagipar F. Lateral flow-test for express detection of Ivermectin in foods, *Proceedings of 18<sup>th</sup> Federation of Asian Veterinary Associations Congress*, Singapore, 2014. P. 114.
15. 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*, 77, 1-7 (2017).
16. Naik L., Sharma R., Mann B., Lata K., Rajput Y.S., Nath B.S. Rapid screening test for detection of oxytetracycline residues in milk using lateral flow assay, *Food Chemistry*, 219, 85-92 (2017).
17. Shi Q., Huang J., Sun Y., Deng R., Teng M., Li Q., Yang Y., Hu X., Zhang Z., Zhang G. A SERS-based multiple immuno-nanoprobe for ultrasensitive detection of neomycin and quinolone antibiotics via a lateral flow assay, *Microchimica Acta*, 85 (2), 84 (2018).
18. 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*, 6 (10), 7798-7805 (2016).
19. Hendrickson O.D., Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Sensitive lateral flow immunoassay of an antibiotic neomycin in food stuffs, *Food Science and Technology*, 58, 292-301 (2020).
20. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Shanin I.A., Zherdev A.V., Tarannum N., Dzantiev B.B. Highly sensitive immunochromatographic detection of antibiotic ciprofloxacin in milk, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54 (6), 670-676 (2018).
21. Berlina A.N., Bartosh A.V., Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. Complexes of gold nanoparticles with antibodies in immunochromatography: comparison of direct and indirect immobilization of antibodies for the detection of antibiotics, *Nanotechnology Research and Innovation in Russia*, 13 (7), 430-438 (2018).
22. Test kits for milk Prodoscrin Laktest-4 [Electronic resource]. Available at: <https://lactotest.com/product/prodoskrin-lactest-4> (Accessed: 10.07.2021).
23. Antibiotics ELISA Kits [Electronic resource]. Available at: [www.biovision.com/products/elisa-kits/antibiotics-elisa-kits.html](http://www.biovision.com/products/elisa-kits/antibiotics-elisa-kits.html) (Accessed: July 21, 2021).
24. Express test PROQUITEST 4-touch [Electronic resource]. Available at: [www.biomer.ru/index.php?part=production&item\\_id=735](http://www.biomer.ru/index.php?part=production&item_id=735) (Accessed: 10.07.2021).
25. For easy and accurate antibiotic residue testing [Electronic resource]. Available at: <http://petrolabspb.ru/delvotest-blf--delvotest> (Accessed: July 15, 2021).
26. Sheng W., Li S., Liu Y., Wang J., Zhang Y., Wang S. Visual and rapid lateral flow immunochromatographic assay for enrofloxacin using dyed polymer microspheres and quantum dots, *Microchimica Acta*, 184, 4313-4321 (2017).
27. Brandao M. P., Carvalho dos Anjos V. de, Bell M. J. V. Time-resolved fluorescence of cow

and goat milk powder, *Spectrochimica Acta. A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 171, 193-199 (2017).

28. Tang X. Q., Zhang Z. W., Li P. W., Zhang Q., Jiang J., Wang D., Lei J. W. Sample-pretreatment-free based high sensitive determination of aflatoxin M1 in raw milk using a time-resolved fluorescent competitive immunochromatographic assay, *RSC Advances*, 5, 558-564 (2015).

29. Liu D., Huang Y., Wang S., Liu K., Chen M., Xiong Y., Yang W., Lai W. A modified lateral flow immunoassay for the detection of trace aflatoxin M1 based on immunomagneticnanobeads with different antibody concentrations, *Food Control*, 51, 218-224 (2015).

30. Yan L., Dou L., Bu T., Huang Q., Wang R., Yang Q., Huang L., Wang J., Zhang D. Highly sensitive furazolidone monitoring in milk by a signal amplified lateral flow assay based on magnetite nanoparticles labeled dual-probe, *Food Chemistry*, 261, 131-138 (2018).

31. Chen Y., Chen Q., Han M. M., Liu J. Y., Zhao P., He L. D., Zhang Y., Niu Y. M., Yang W. J., Zhang L. Y. Near-infrared fluorescence-based multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of four antibiotic residue families in milk, *Biosensors and Bioelectronics*, 79, 430-434 (2016).

32. Zhou J., Nie W., Chen Y., Yang C., Gong L., Zhang C., Chen Q., He L., Feng X. Quadruplex gold immunochromatographic assay for four families of antibiotic residues in milk, *Food Chemistry*, 256, 304-310 (2018).

33. Food & Feed Analysis [Electronic resource]. Available at <https://food.r-biopharm.com/products/ridascreen> (Accessed: July 30, 2021).

34. Cobos A., Diaz O. Chemical composition of meat and meat products, In *Handbook of food chemistry*, 2015.P. 1-32.

35. Moga A., Vergara-Barberan M., Lerma-Garcia M.J., Carrasco-Correa E. J., Herrero-Martinez J. M., Simo-Alfonso E. F. Determination of antibiotics in meat samples using analytical methodologies, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 1681-1716 (2021).

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

37. Wu Y., Guo S., Dong Q., Song Yu. Development of an immunochromatographic test strip for rapid simultaneous detection of enrofloxacin and ofloxacin in tissue of chicken muscle and pork, *Food Analytical Methods*, 9 (10), 2807-2813 (2016).

38. Mukunzi D., Suryoprabowo S., Song S., Liu L., Kuang H. Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay and lateral-flow test strips for pefloxacin and its analogues in chicken muscle samples, *Food and Agricultural Immunology*, 29 (1), 484-497 (2018).

39. Wang J., Zhou J., Chen Y., Zhang X., Jin Y., Cui X., He D., Lai W., He L. Rapid one-step enzyme immunoassay and lateral flow immunochromatographic assay for colistin in animal feed and food, *Animal Science and Biotechnology*, 10, 82 (2019).

40. Dong X., Gao Y.Q., Zhang X., Yuan J., Li P., Xing C.R., Yan W.J. Multiplex europium (III) nanoparticles immunochromatographic assay method for the detection of four nitrofurans metabolites in fish sample, *Microchemical Journal*, 150, 104-207 (2019).

41. Su L., Wang L., Xu J., Wang Z., Yao X., Sun J., Wang J., Zhang D. Competitive Lateral Flow Immunoassay Relying on Au-SiO<sub>2</sub> Janus Nanoparticles with an Asymmetric Structure and Function for Furazolidone Residue Monitoring, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69 (1), 511-519 (2021).

#### Сведения об авторе:

**Булашев А.К.** – доктор ветеринарных наук, профессор кафедры микробиологии и биотехнологии НАО «Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина», проспект Жеңіс, 62, Нур-Султан, Казахстан.

**Bulashev A.K.** – Doctor of Veterinary Sciences, Professor of the Department of Microbiology and Biotechnology, NJSC "S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University", 62, Zhenis avenue, Nur-Sultan, Kazakhstan.