

## **ОПТИМИЗАЦИЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА АНАЛИЗА ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ СТРЕПТОМИЦИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

*Галушко Дарья Павловна, студент, E-mail: gdp26032002@mail.ru;*

*Телегина Софья Александровна, студент, E-mail: telegina.sonya@mail.ru;*

*Нитяга Инга Михайловна, к.б.н., доцент кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы и биологической безопасности, E-mail: inga99@mail.ru*

*ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»*

**Аннотация:** *Целью исследования явилось проведение валидации тест-системы RIDASCREEN® Streptomycin на основе иммуноферментного анализа для определения остаточных количеств стрептомицина в сырье и продуктах животного происхождения для введения ее в лабораторную практику.*

**Ключевые слова:** *стрептомицин, антибиотики, иммуноферментный анализ, пищевые продукты.*

**Введение.** Широкое применение антибиотиков в сельском хозяйстве порождает новые риски для здоровья людей. Одним из антибиотиков, подлежащих обязательному контролю в продуктах животного происхождения – молоке и молочных продуктах, является стрептомицин. Присутствие остаточных количеств стрептомицина в пищевых продуктах в малых количествах при длительном потреблении может вызывать неблагоприятные для здоровья последствия. Для этого должны разрабатываться современные скрининговые и подтверждающие методы, способные выявлять стрептомицин в нормируемых количествах [4, 5]. Для определения остаточных количеств стрептомицина в настоящее время используют различные методы: скрининговые – на основе иммуноферментного анализа (ИФА) и микробиологические с тест-культурой (МУ 3049-84; ГОСТ 31903-2012); подтверждающие – химические на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС/МС) (ГОСТ 32798-2014) [1,2,3]. Для рутинного контроля в лабораториях могут использоваться методы ИФА, например, с тест-системой RIDASCREEN®Streptomycin, на основе конкурентного ИФА, которая позволяет определить стрептомицин на низких уровнях в молоке, мясе, печени, почках, креветках, яблочном соке, меде.

**Целью исследования** явилась валидация тест-системы RIDASCREEN® Streptomycin, на основе иммуноферментного анализа, для определения остаточных количеств стрептомицина в сырье и продуктах животного и растительного происхождения для введения ее в лабораторную практику.

Для выполнения поставленной цели были определены следующие задачи: определение остаточных количеств стрептомицина в пищевых продуктах иммуноферментным методом с тест-системой RIDASCREEN® Streptomycin; определение остаточных количеств антибиотика в искусственно контаминированных стрептомицином пищевых продуктах; определение

метрологических параметров тест-системы: открываемость, сходимость, пределы определения.

**Материалы и методы исследования.** В соответствии с поставленными целями и задачами была разработана следующая схема проведения эксперимента:

1. Выбор объектов исследования: пищевые продукты, в которых контролируется содержание стрептомицина.
2. Проведение анализа на содержание стрептомицина в выбранных пищевых продуктах иммуноферментным методом с тест-системой RIDASCREEN® Streptomycin.
3. Контаминация продуктов стрептомицином в различных, ранее заданных, концентрациях.
4. Проведение анализа искусственно контаминированных пищевых продуктов иммуноферментным методом с тест-системой RIDASCREEN® Streptomycin.
5. Анализ и статистическая обработка результатов экспериментов.
6. Разработка рекомендаций по применению тест-системы RIDASCREEN® Streptomycin для анализа стрептомицина в пищевых продуктах в РФ

Объектами исследования были образцы продуктов питания: молоко цельное, детская молочная смесь; йогурты кисломолочный и сладкий, спред, творог, сыр, сметана, мясо птицы, печень куриная, соки яблочный и апельсиновый.

Исследования на стрептомицин проводили в соответствии с методическими указаниями к тест-системе RIDASCREEN® Streptomycin.

Для проверки чувствительности и степени извлечения, заявленной изготовителем тест-системы, необходимо исследовали содержание стрептомицина в искусственно контаминированных образцах. Искусственную контаминацию образцов осуществляли путем добавления к навеске продукта заданного количества раствора стрептомицина с определенной концентрацией антибиотика. Для контаминации использовали стандартный образец стрептомицина (ГСО с содержанием основного вещества 762 мкг/мг). Предварительно навеску сухого стрептомицина 10 мг растворяли в 7,61 мл дистиллированной воды и получали основной раствор с концентрацией 1000 мг/л, из которого готовили рабочие растворы №№ 1, 2, 3 с концентрацией: 0,1; 0,01 и 0,001 мг/см<sup>3</sup>, соответственно.

Все пробы исследовали не менее, чем в двух повторностях. Статистическую обработку проводили с использованием программы EXCEL.

**Результаты исследований.** Отобранные образцы пищевых продуктов были проверены на содержание стрептомицина методом ИФА с тест-системой RIDASCREEN® Streptomycin. Результаты обнаружения стрептомицина показали следующие значения: для молочных продуктов 0-0,05 мг/кг; для мяса и субпродуктов 0-0,038 мг/кг. Обнаруженные количества соответствуют заявленным изготовителем пределам обнаружения. На первом этапе в образцы не переработанных продуктов: молоко, мясо птицы, печень вносили стрептомицин, создавая концентрацию на уровне близком к нормируемому и ниже: в молоке – 0,02 и 0,02 мг/л, в птице 0,08 и 0,4 мг/л, в печени 0,08 и 0,4. При уровне искусственной контаминации 0,02 мг/кг в образцах молока выявлено 0,025 мг/кг; при уровне 0,04 мг/кг в куриной печени выявлено 0,06 мг/кг; при уровне 0,08 мг/кг в мясе птицы выявлено – 0,071 мг/кг, в куриной печени – 0,088 мг/кг.

При уровне 0,2 мг/кг в образцах молока выявлено 0,251 мг/кг; в мясе птицы при уровне контаминации 0,4–0,310 мг/кг, в печени– 0,406 мг/кг; в печени при уровне заражения 0,2 мг/кг – 0,249 мг/кг. При искусственной контаминации образцов не переработанных продуктов молока, мяса птицы и куриной печени, свободных от данного антибиотика, стрептомицин выявлялся в 100% образцов. Для молочной переработанной продукции были подобраны методики экстракции.

*Экстракция йогурта:* взвешивали 5 г пробы в центрифужную пробирку; прибавляли 4 мл 20 мМ PBS-буфера, перемешивали; приливали 0.5 мл Карреза I, перемешивали на вортексе; приливали 0.5 мл Карреза II, встряхивали 10 мин с переворотом; центрифугировали 10 мин/4000g/4 °С; переносили 2 мл супернатанта в новую пробирку; прибавляли 2 мл н-гексана и перемешивали, переворачивая 10 мин; центрифугировали 10 мин/2000g/4 °С; переносили 700 мкл нижней водной фазы в пробирку; разбавляли нижнюю водную фазу 1:10 (1+9) PBS-буфером. Для анализа использовали 50 мкл нижней водной фазы.

*Экстракция творога и сметаны:* к 2.5 г пробы прибавляли 7.4 мл PBS-буфера и перемешивали на вортексе в течение 1 мин; центрифугировали 15 мин /4000g/4 °С; снимали сливочный слой и перемещали 1 мл пробы в новую пробирку; прибавляли 1 мл н-гексана и перемешивали, переворачивая 10 мин; центрифугировали 10 мин/2000g/4 °С; переносили 700 мкл нижней водной фазы в пробирку; нижнюю водную фазу разбавляли PBS-буфером 1:5. Для анализа использовали 50 мкл нижней водной фазы.

Пробы кисломолочных продуктов перед экстракцией нейтрализовали до уровня рН=6,5±0,1 добавлением раствора гидроокиси натрия, после чего проводили экстракцию в соответствии с разработанной методикой определения. Результаты анализа представлены на Рисунок 2.

При уровне искусственной контаминации 0,02 мг/кг в образцах восстановленной детской молочной смеси выявлено 0,022 мг/кг; при уровне 0,04 мг/кг в йогурте выявлено 0,033 мг/кг; при уровне 0,06 мг/кг в сметане выявлено 0,076 мг/кг, в твороге 0,075; при уровне контаминации 0,03 мг/кг в сыре обнаружено 0,027 мг/кг, в спреде 0,05 мг/кг, в твороге 0,034.

При уровне искусственной контаминации 0,4 мг/кг в йогурте обнаружено 0,424 мг/кг; при уровне контаминации 0,6 мг/кг в сметане обнаружено 0,782 мг/кг, в твороге 0,594 мг/кг; при уровне контаминации 0,3 мг/кг в твороге выявлено 0,322 мг/кг, в сыре 0,265 мг/кг, в спреде 0,420 мг/кг.

**Обсуждение результатов.** В результате проведенных исследований установлено, что метод, основанный на конкурентном иммуноферментном анализе с тест-системой RIDASCREEN® Streptomycin, отвечает всем современным требованиям к анализу антибиотиков по специфичности. Для подтверждения пределов обнаружения использовали прием искусственной контаминации образцов пищевых продуктов стрептомицином в концентрациях, соответствующих нормируемому значению в пищевых продуктах – 0,2 мг/кг. Установлено, что при искусственной контаминации образцов не переработанных продуктов молока, мяса птицы и куриной печени, свободных от данного антибиотика, стрептомицин выявлялся в 100% образцов.

В образцах переработанной молочной продуктах стрептомицин также выявлялся в 100% случаях при искусственном заражении. В образцах пищевых продуктов стрептомицин был обнаружен в пределах чувствительности метода ИФА. Для переработанных молочных продуктов: детской молочной смеси, йогурта, сметаны и творога были разработаны и апробированы новые методы пробоподготовки, включающие стадии обезжиривания и осаждения белковых компонентов. Обобщение результатов позволяет констатировать, что метод ИФА с тест-системой RIDASCREEN® Streptomycin обладает высокой специфичностью к стрептомицину при обнаружении в пищевых продуктах; позволяет выявлять низкие уровни загрязнения – на порядок ниже установленных нормативов в продуктах животного происхождения и в продуктах растительного происхождения на уровнях, заявленных в описании тест-системы.

### **Библиографический список**

1. ГОСТ 31903-2012. Межгосударственный стандарт продукты пищевые. Экспресс-метод определения антибиотиков.
2. ГОСТ 32798-2014. Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания аминогликозидов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором.
3. Методические указания по определению остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства (утв. Заместителем Главного государственного санитарного врача СССР А.И. Заиченко 29 июня 1984 г. N 3049-84)
4. *Минаева Л.П., Шевелева С.А.* Антибиотики в сельском хозяйстве как фактор формирования антимикробной резистентности и источник контаминации пищевой продукции//Успехи медицинской микологии. 2019. Т.20. С.441-444.
5. Economou V., Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria //Infection and drug resistance. 2015. Т. 8. С. 49.