



ARGENTA  
EKSPERCI Z MISJĄ

# Wykrywanie antybiotyków w mięsie za pomocą metody ELISA

Automatyzacja procesu przy użyciu systemu BOLT

# Leki weterynaryjne

**Leki weterynaryjne** to **WSZYSTKIE** substancje aktywne podawane zwierzętom hodowlanym w różnych celach:

- Wzrostu i poprawy wydajności produkcyjnej
- Modyfikacji funkcji fizjologicznych
- Profilaktyki
- Metafilaktyki
- Terapii

Dawki są zazwyczaj związane z celem leczenia: Niewielkie ilości leków są podawane zdrowym zwierzętom w celu wspomagania wzrostu lub zapobiegania chorobom, podczas gdy wyższe dawki są stosowane w leczeniu chorych zwierząt.



# Czym są pozostałości leków weterynaryjnych?

Veterinary drug residues (VDR)

„**Pozostałości leków weterynaryjnych**” oznaczają wszystkie substancje farmakologicznie czynne, których zawartość wyrażona jest w mg/kg lub µg/kg świeżej masy, co obejmuje zarówno substancje czynne, jak i substancje pomocnicze, produkty rozpadu oraz ich metabolity pozostające w żywności pochodzenia zwierzęcego.

Stosowanie leków weterynaryjnych u zwierząt może prowadzić do odkładania się pozostałości w mięśniach i organach – oraz w produktach zwierzęcych, takich jak jaja, mleko i miód.

- Pozostałości mogą się kumulować i być obecne przez określony czas po zakończeniu leczenia.
- Pozostałości mogą być natywną cząsteczką lub jednym z metabolitów.



ARGENTA  
EKSPERCI Z MISJĄ

# Dlaczego detekcja pozostałości antybiotyków jest istotna?

- Bezpieczeństwo żywności: Pozostałości antybiotyków w mięsie mogą powodować reakcje alergiczne u konsumentów oraz zwiększać ryzyko powstawania oporności na antybiotyki.
- Zgodność z regulacjami: Unia Europejska i inne organizacje wprowadzają ścisłe limity maksymalnych poziomów pozostałości (MRL) w środkach spożywczych, zgodnie z **Rozporządzeniem Komisji (UE) nr 37/2010 z dnia 22 grudnia 2009 (wraz z późniejszymi zmianami)**
- Zaufanie konsumentów: Społeczeństwo oczekuje wysokiej jakości i bezpiecznych produktów, co wymaga precyzyjnego monitorowania.



# Rozporządzeniem Komisji (UE) nr 37/2010 z dnia 22 grudnia 2009 (wraz z póź. zm.)

Rozporządzenie to ustanawia szczegółowe zasady dotyczące:

- Klasyfikacji substancji farmakologicznie czynnych stosowanych w weterynaryjnych produktach leczniczych przeznaczonych dla zwierząt hodowlanych.
- Maksymalnych limitów pozostałości (MRL) tych substancji w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego, takich jak mięso, mleko, jaja i miód.

Rozporządzenie ma na celu ochronę zdrowia konsumentów poprzez ograniczenie ilości pozostałości leków w żywności do poziomów uznawanych za bezpieczne.



# Rozporządzeniem Komisji (UE) nr 37/2010 z dnia 22 grudnia 2009 (wraz z póź. zm.)

Tabela 2  
Substancje zakazane

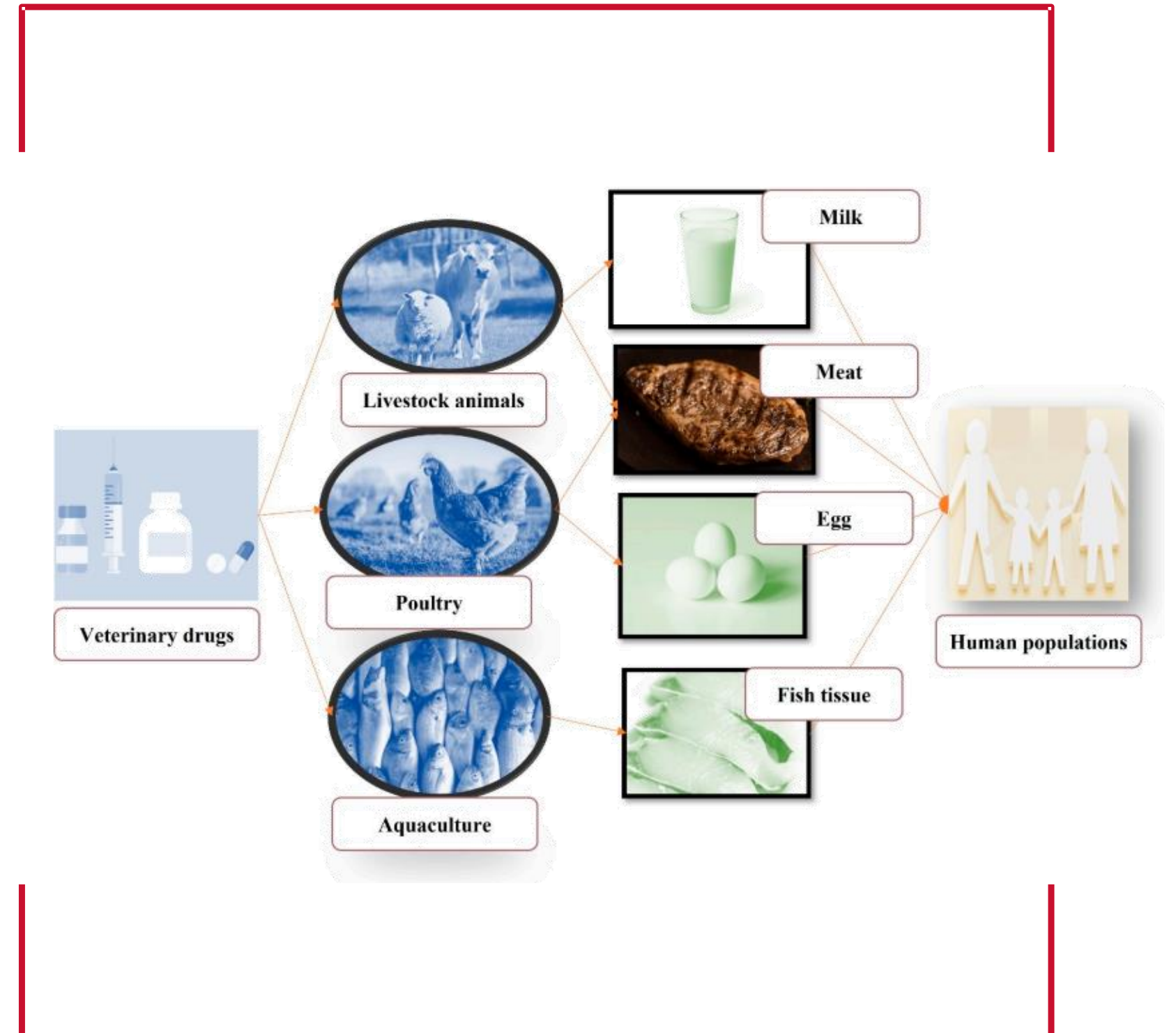
Substancja farmakologicznie czynna	MLP
Aristolochia spp. oraz jej przetwory	MLP nie może być ustalony
Chloramfenikol	MLP nie może być ustalony
Chloroform	MLP nie może być ustalony
Chlorpromazyna	MLP nie może być ustalony
Dapson	MLP nie może być ustalony
Dimetridazol	MLP nie może być ustalony
Kolchicyna	MLP nie może być ustalony
Metronidazol	MLP nie może być ustalony
Nitrofurany (włącznie z furazolidonem)	MLP nie może być ustalony
Ronidazol	MLP nie może być ustalony



# VDR a żywność

Powszechne stosowanie leków weterynaryjnych u zwierząt gospodarskich budzi ogromne obawy, ponieważ ich obecność w produktach jadalnych może powodować poważne konsekwencje dla zdrowia ludzkiego: tj.

- zatrucia pokarmowe
- Długoterminowe konsekwencje zdrowotne (np. hepato- i nefrotoksyczność)
- reakcje alergiczne
- żywność skażona lekami może sprzyjać powstawaniu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe.



# Limity VDR – regulacije UE i FDA

Drugs	Food and Drug Administration	European Union							
	Specifications	Muscle	Liver	Kidney	Fat	Eggs	Milk	Fish	Others
Abamectin		Avermectin B1a residue 20 ppb (ovine)	Avermectin B1a residue 20 ppb (bovine), 25 ppb (ovine)	Avermectin B1a residue 20 ppb (ovine)	Avermectin B1a residue 10 ppb (bovine), 50 ppb (ovine)		Not for use in animals from which milk is produced for human consumption (ovine).		
Acetylsalicylic acid						Not for use in animals from which eggs are produced for human consumption.	Not for use in animals from which milk are produced for human consumption.		
Acetylsalicylic acid DL-lysine						Not for use in animals from which eggs are produced for human consumption.	Not for use in animals from which milk are produced for human consumption.		
Albendazole	<b>Muscle:</b> 0,05 ppm <b>Liver:</b> 0.2 ppm (bovine), 0.25 ppm (ovine), 0.25 ppm (caprine)	Sum of albendazole sulphoxide, albendazole sulphone, and albendazole 2- amino sulphone, expressed as albendazole 100 ppb (all ruminants)	Sum of albendazole sulphoxide, albendazole sulphone, and albendazole 2- amino sulphone, expressed as albendazole 1000 ppb (all ruminants)	Sum of albendazole sulphoxide, albendazole sulphone, and albendazole 2- amino sulphone, expressed as albendazole 500 ppb (all ruminants)	Sum of albendazole sulphoxide, albendazole sulphone, and albendazole 2- amino sulphone, expressed as albendazole 100 ppb (all ruminants)		Sum of albendazole sulphoxide, albendazole sulphone, and albendazole 2- amino sulphone, expressed as albendazole 100 ppb (all ruminants)		
Albendazole oxide		Sum of albendazole oxide, albendazole sulphone, and albendazole 2- amino sulphone, expressed as albendazole 100 ppb (bovine, ovine)	Sum of albendazole oxide, albendazole sulphone, and albendazole 2- amino sulphone, expressed as albendazole 1000 ppb (bovine, ovine)	Sum of albendazole oxide, albendazole sulphone, and albendazole 2- amino sulphone, expressed as albendazole 500 ppb (bovine, ovine)	Sum of albendazole oxide, albendazole sulphone, and albendazole 2- amino sulphone, expressed as albendazole 100 ppb (bovine, ovine)		Sum of albendazole oxide, albendazole sulphone, and albendazole 2- amino sulphone, expressed as albendazole 100 ppb (bovine, ovine)		
Alphacypermethrin		Cypermethrin (sum of isomers) 20 ppb (bovine, ovine)	Cypermethrin (sum of isomers) 20 ppb (bovine, ovine)	Cypermethrin (sum of isomers) 20 ppb (bovine, ovine)	Cypermethrin (sum of isomers) 200 ppb (bovine, ovine)		Cypermethrin (sum of isomers) 20 ppb (bovine, ovine)**		
Altrenogest	<b>Muscle:</b> 1 ppb (swine) <b>Liver:</b> 4 ppb (swine)		2 ppb (swine), 4 ppb (equidae)		4 ppb (equidae, swine, also skin)				
Aluminium salicylate, basic		Salicylic acid, 200 ppb (bovine)	Salicylic acid, 1.5 ppm (equidae)	Salicylic acid, 1.5 ppm (rabbit)	Salicylic acid, 500 ppb (caprine)		9 ppb (bovine, caprine, equidae)		
Amitraz			Sum of amitraz and all metabolites containing the 2,4-DMA moiety, expressed as amitraz - 200 ppb (bovine, porcine), 100 ppb (ovine, caprine)	Sum of amitraz and all metabolites containing the 2,4-DMA moiety, expressed as amitraz - 200 ppb (bovine, porcine, ovine, caprine)	Sum of amitraz and all metabolites containing the 2,4-DMA moiety, expressed as amitraz - 400 ppb (ovine, porcine, also skin), 200 ppb (bovine, caprine)		Sum of amitraz and all metabolites containing the 2,4-DMA moiety, expressed as amitraz - 10 ppb (bovine, ovine, caprine)	Sum of amitraz and all metabolites containing the 2,4- DMA moiety, expressed as amitraz - 200 ppb (bees)	
Amoxicillin	<b>Edible tissues:</b> 0,01 ppm	0.05 ppm (all food producing species)	0.05 ppm (all food producing species)	0.05 ppm (all food producing species)	0.05 ppm (all food producing species)		0.004 ppm (all food producing species)	0.05 ppm (all food producing species)	
Ampicillin	<b>Edible tissues:</b> 0.01 ppm (bovine, swine)	0.05 ppm (all food producing species)	0.05 ppm (all food producing species)	0.05 ppm (all food producing species)	0.05 ppm (all food producing species)		0.004 ppm (all food producing species)	0.05 ppm (all food producing species)	
Amprolium	<b>Muscle:</b> 0.5ppm (bovine), 0.5 ppm (chicken, turkey, pheasants) <b>Liver:</b> 0.5ppm (bovine), 1 ppm (chicken, turkey, pheasants) <b>Kidney:</b> 0.5ppm (bovine), 1 ppm (chicken, turkey) <b>Fat:</b> 2.0 ppm (bovine) <b>Eggs:</b> 8 ppm (egg yolks), 4 ppm (whole eggs)								





# Badanie poziomu VDR

## 1. Na poziomie gospodarstw hodowlanych/rolnych:

- Weryfikacja efektywności okresu karencji
- Kontrole terenowe przeprowadzane przez oficjalne organy kontrolne
- Badania i nadzór ze strony instytutów zooprofilaktycznych
- Zanieczyszczenia przypadkowe

## 2. Na poziomie ubojni:

- Zgodność z przepisami

## 3. Na poziomie przetwórstwa:

- Zgodność z deklaracjami (np. "wolne od antybiotyków")
- Dopasowanie do procesu produkcyjnego

## 4. Na poziomie sprzedaży:

- Kontrole graniczne towarów importowanych



# Dostępne metody badań poziomowi VDR

W Europie metody stosowane do oficjalnej kontroli są podzielone na dwie główne grupy, tradycyjnie stosowane sekwencyjnie: metody screeningowe i potwierdzające (Rozporządzenie (UE) 2021/808).

1. **Testy mikrobiologiczne**, np. MIAs (Microbial Inhibition Assays)
2. **Testy immunologiczne**, np. LFIAAs (Immunochromatographic Lateral Flow Devices), EIAs i ELISAs (Plate-based Immuno-sorbent Assays), CLIAs (Chemoluminescent Immunoassays)
3. **Metody fizykochemiczne**, np. LC-MS/MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry)



# Testy ELISA

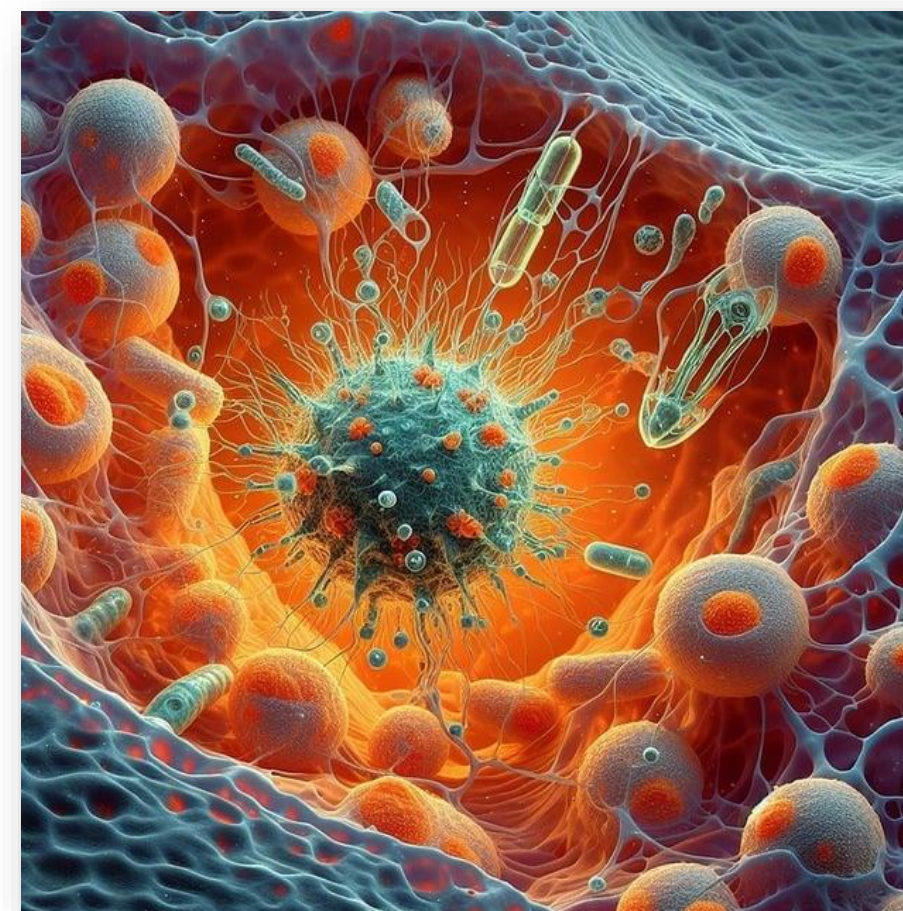
- ✓ Metoda ELISA to immunoenzymatyczny test fazy stałej służący do wykrywania i ilościowego oznaczania białek, takich jak hormony i przeciwciała, bakterie lub wirusy.
- ✓ Podstawą techniki jest powstanie wiązania pomiędzy antygenem a przeciwciałem, które uwidacznia reakcja barwna, zachodząca dzięki połączonymi z immunoglobulinami enzymom i odpowiednich dla nich substratom.
- ✓ Wysoka **specyficzność** i **czułość** przeciwciał pozwala na precyzyjną ocenę ilościową, wykrycie i oszacowanie stężenia szukanego analitu występującego w próbce w niskim stężeniu.
- ✓ Zmianę intensywności barwy mierzy się spektrofotometrycznie, a wyniki kalibruje względem standardów tworząc krzywą wzorcową, pozwalającą na określenie ilości produktu reakcji.
- ✓ Jedna z najczęściej stosowanych metod w badaniach zarówno naukowych, jak i diagnostycznych.



# Komponenty ELISA

- ✓ **Faza stała** – 96- lub 48- dołkowa płytka opłaszczona antygenami lub przeciwciałami.
- ✓ **Antygeny** - to każda obca substancja, która wywołuje reakcję immunologiczną i może być wykryty za pomocą swoistych przeciwciał.
- ✓ **Przeciwciało** – glikoproteina skierowana przeciwko konkretnemu antygenowi.
- ✓ **Koniugat** (enzym sprzężony z przeciwciałem)- peroksydaza chrzanowa (HRP) lub fosfataza alkaliczna (AP), oksydaza glukozowa (GO)
- ✓ **Substrat:** - fosforan p-nitrofenolu (AP), tetrametylobenzydyna (HRP), kwas 5-aminosalicylowy (GO)

- ✓ **Bufor płuczący** – roztwór do wmywania nadmiaru badanej próbki/niezwiązanych p-ciał.
- ✓ **Roztwór hamujący** - np.  $H_2SO_4$
- ✓ **Standard/wzorzec** – roztwór o znanym stężeniu



# Wyposażenie laboratorium - metoda ELISA

- ✓ **Pipety: jednokanałowe, wielokanałowe**
- ✓ **Automatyczna płuczka do płytek ELISA**
- ✓ **Czytnik/spektrofotometr do płytek ELISA**
- ✓ **Inkubator/łaźnia wodna** (niekiedy wymagany do utrzymania stałej temperatury podczas analizy)

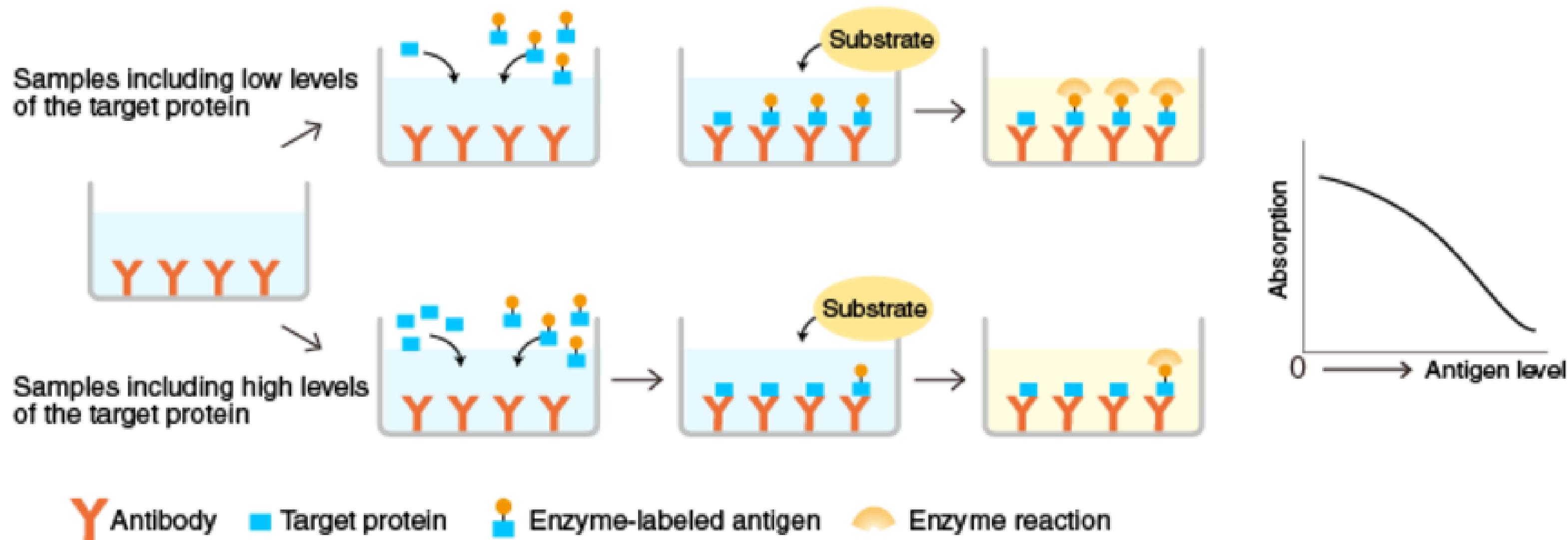


ARGENTA  
EKSPERCI Z MISJĄ

# Odmiany metody ELISA



# ELISA konkurencyjna/kompetytywna



Metoda opiera się na konkurencji między antygenem lub przeciwciałem z próbki a molekułą referencyjną o ograniczoną ilość znakowanych przeciwciał lub antygenów. **Im wyższe stężenie antygeny w próbce, tym słabszy sygnał wyjściowy**, co oznacza odwrotną zależność między sygnałem a stężeniem analizowanej substancji.

# Testy ELISA

- Sulfonamidy
- Tetracykliny
- Chinolony
- Streptomycyna
- Tylosyna
- Chloramfenikol
- Metabolity nitrofuranów (AOZ, AMOZ, SEM, AHD)
- Penicylina
- Klenbuterol
- Zeranol
- Trenbolon
- Kortykosteroidy





# Testy ELISA

Produkt	Target	Numer katalogowy	Matryce	Czas analizy
I'screen SULFA	Sulfonamides family	96 det. cod. HU0050003	Muscle, Egg, Milk, Honey, Feed	75 min
I'screen STREPTO	Streptomycin	96 det. cod. HU0050013	Honey, Royal jelly, Muscle, Milk	60 min
I'screen TYLOSIN	Tylosin	96 det. cod. HU0050020	Tissue, Milk, Urine, Honey	50 min
I'screen CAP	Chloramphenicol	96 det. cod. HU0050001	Bovine urine, Water, Milk, Serum and plasma, Muscle, Honey, Egg, Seafood	45 min
I'screen CAP v2	Chloramphenicol	96 det. cod. HU0050002	Urine, Water, Serum, Tissue, Honey, Egg, Seafood	45 min
I'screen AOZ v2 rapid	AOZ	96 det. cod. HU0050034	Tissue (bovine and swine muscle), Crustaceans, Egg, Honey	45 min
I'screen SEM rapid	SEM	96 det. cod. HU0050036	Crustaceans, bovine and swine muscle, honey	45 min
I'screen AHD rapid	AHD	96 det. cod. HU0050037	Crustaceans, bovine and swine muscle, honey	45 min
I'screen AMOZ v2 rapid	AMOZ	96 det. cod. HU0050035	Muscle, Crustaceans, Egg, Honey	45 min
I'screen QUINO	Fluoroquinolones	96 det. cod. HU0050004	Fish, shrimp, muscle, honey, egg	75 min
I'screen TRENB	Trenbolone	96 det. cod. HU0050022	Tissue, Urine	105 min
I'screen ZERANOL	Zeranol	96 det. cod. HU0050023	Tissue, Urine, Liver	105 min
I'screen CORTICO	Corticosteroids	96 det. cod. HU0050007	Feed, Urine, Milk, Liver, Tissue	75 min
β-agonists (clenbuterol) ELISA kit	Clenbuterol	96 det. cod. HU0050018	Urine, serum, liver, eye, milk, milk powder, feed	45 min
SENSISpec Tetracycline	Tetracyclines family	96 det. cod. HU0050014	Meat, milk, nonfat dry milk, cheese, shrimps, honey	80 min
SENSISpec ELISA Penicillin	Penicillin	96 det. cod. HU0050017	Shrimp, milk	140 min



# Co zawiera zestaw?

## 1. Mikropłytki:

- Format:** 96 studzienek (12 pasków po 8 studzienek).
- Pokrycie:** Przeciwciała przeciwko owczym IgG (*anti-sheep IgG antibodies*).

## 2. Standardy:

- Ilość:** 6 fiolek po 1,5 ml każda.

## 3. Roztwór wzbogacający CAP (CAP spiking solution):

- Zawartość:** 1 ml roztworu chloramfenikolu o stężeniu 100 ng/ml.

Dodawanie do próbek w celu wzbogacania próbek testowych w znane stężenia chloramfenikolu.

## 4. Koniugat enzymatyczny:

- Objętość:** 200 µl.

Chloramfenikol sprzężony z enzymem, używany do oznaczania w reakcji.

## 5. Rozcieńczalnik koniugatu enzymatycznego:

- Objętość:** 12 ml.

Rozcieńczanie koniugatu enzymatycznego przed użyciem.

## 6. Przeciwciało anty-chloramfenikol:

- Objętość:** 12 ml.

Specyficzne przeciwciało wykrywające chloramfenikol.

## 7. Bufor rozcieńczający (5x):

- Objętość:** 50 ml.

Rozcieńczanie próbek i standardów przed dodaniem do mikropłytki.

## 8. Bufor do płukania (10x):

- Objętość:** 50 ml.

Usuwanie niezwiązanych substancji podczas mycia studzienek.

## 9. Roztwór rozwijający/substrat:

- Objętość:** 24 ml.

Substrat enzymatyczny, który po reakcji zmienia kolor.

## 10. Roztwór hamujący:

- Objętość:** 8 ml.

Zatrzymanie reakcji enzymatycznej, zmienia kolor z niebieskiego na żółty.



ARGENTA  
EKSPERCI Z MISJĄ

# Testy I'Screen

Testy zostały zwalidowane zgodnie z Decyzją Komisji 2002/657/WE oraz z Rozporządzeniem Komisji (UE) 2021/808:

- Wykorzystanie wielu niezależnych materiałów kontrolnych w warunkach pośredniej odtwarzalności w celu oceny efektu matrycy.
- Walidacja minimalnego stężenia analitu wykrywalnego przez test z 5% błędem beta dla wyników fałszywie zgodnych.
- Pomiar różnic między próbkami kontrolnymi a próbkami zanieczyszczonymi.
- Testy szerokiego spektrum zaprojektowane do wykrywania całych rodzin związków (np. sulfonamidów) – najgorsze reakcje krzyżowe są wykorzystywane do oceny czułości testu.
- Harmonizacja przygotowania próbek dla analiz nitrofuranów i chloramfenikolu w owocach morza oraz protokoły zwalidowane na automatyczny czytnika ELISA The Bolt™.



# Automatyczny czytnika ELISA The Bolt™

Nazwa produktu	Wsad	Numer katalogowy
The Thunderbolt	2 płytki	00300
The Bolt	1 płytka	00500

- Systemy 1- lub 2-płytkowe, na 96/192 oznaczeń
- Pozycja wstępnego rozcieńczania / wstępnego mieszania
- Do 4 kompatybilnych testów na sesję
- 9 pozycji odczynników
- Etapy przygotowywania próbek: rozcieńczanie, dozowanie, inkubacja i płukanie
- Wstrząsanie (również podczas inkubacji)
- Ogrzewanie do 45°C
- Odczyt przy 405, 450, 490, 550 i 630 nm (dostępne niestandardowe długości fali)
- Raport końcowy: Punkt po punkcie, regresja liniowa, interpolacja sześcienna, reprezentacja 4PL, 5 PL, Lin-Lin, Lin-Log, Log-Log



ARGENTA  
EKSPERCI Z MISJĄ

# Automatyczny czytnik ELISA The Bolt™

## Duże objętości analityczne

- Zmniejszenie obciążenia personelu
- Standaryzacja pracy
- Oszczędność materiałów eksploatacyjnych
- Tryb walk-away wspierający bezkontaktowe badania



## Możliwość aplikacji od niskiej do średniej przepustowości

- Wspólne przygotowanie próbek w podejściu „mix-and-match”
- Zmniejszona liczba błędów i niedopasowań
- Standaryzacja wydajności

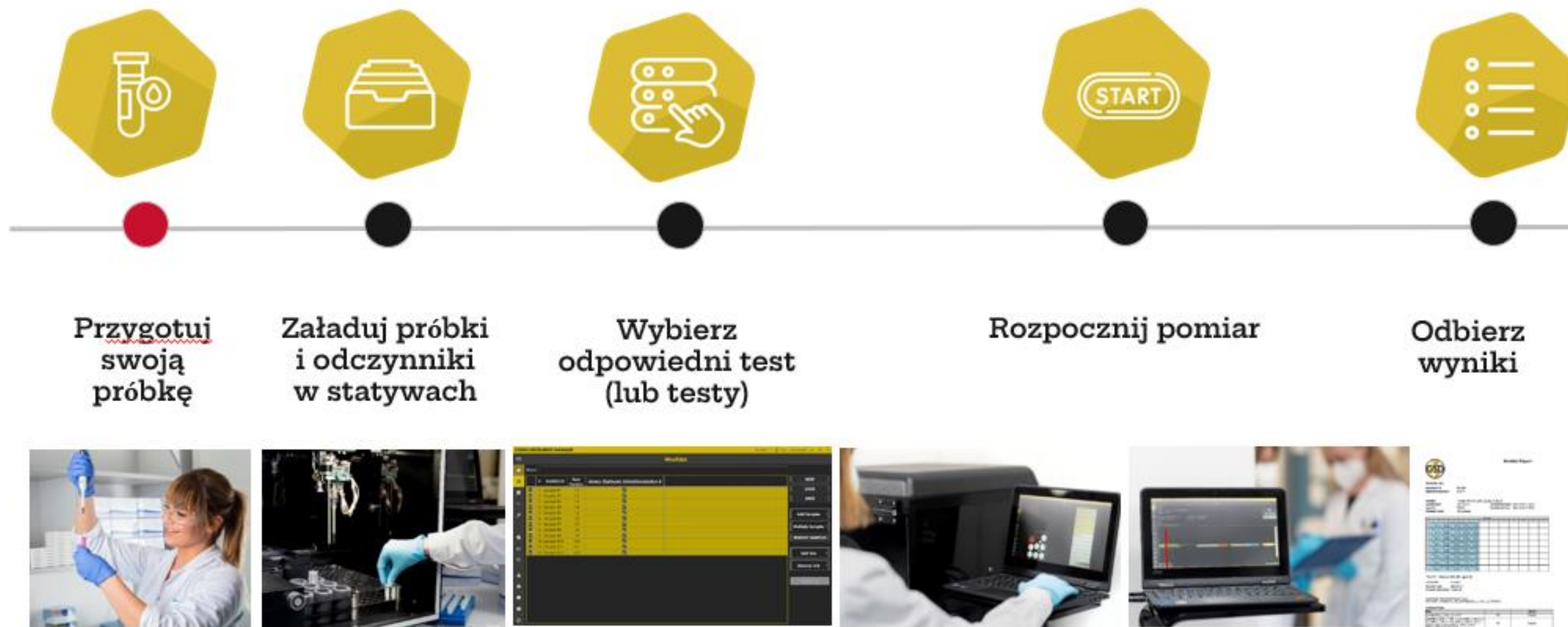
## Multipleks

- Łatwa do programowania otwarta platforma
- Kompatybilne testy dzięki podejściu „mix-and-match”
- 100% elastyczność



ARGENTA  
EKSPERCI Z MISJĄ

# Automatyczny czytnik ELISA The Bolt™



ARGENTA  
EKSPERCI Z MISJĄ

# Jedno urządzenie, wiele zastosowań

Alergeny
SENSISpec ELISA Almond
SENSISpec ELISA Beta-Lactoglobulin
SENSISpec ELISA Casein
SENSISpec ELISA Cashew
SENSISpec ELISA Coconut
SENSISpec ELISA Crustaceans (Tropomyosin)
SENSISpec ELISA Egg White
SENSISpec ELISA Gliadin/Gluten
SENSISpec ELISA Hazelnut
SENSISpec ELISA Lupin
SENSISpec ELISA Lysozyme
SENSISpec ELISA Macadamia nut
SENSISpec ELISA Milk
SENSISpec ELISA Molluscs (Tropomyosin)
SENSISpec ELISA Mustard
SENSISpec ELISA Ovalbumin
SENSISpec ELISA Peanut
SENSISpec ELISA Pecan nut
SENSISpec ELISA Pistachio
SENSISpec ELISA Sesame
SENSISpec ELISA Soy
SENSISpec ELISA Walnut
SENSISpec INgezim Gluten R5

Mykotoksyny
I'screen AFLA M1 milk - Aflatoxin M1
I'screen AFLA M1 - Aflatoxin M1
B ZERO AFLA M1
Celer® AFLA B1 Aflatoxin B1
Celer® ZEA Zearalenone
Celer® DON v3
Deoxynivalenol
Celer® T2 T-2 and HT-2 toxins
Celer® AFLA Aflatoxins
Celer® FUMO Fumonisin
Celer® OCHRA Ochratoxin
Patulin, ELISA

Inne
Glyphosate, ELISA
Atrazine ELISA Plate
Microcystins/Nodularins (ADDA) (EPA ETV)
Okadaic Acid (DSP) (EC 2002/225 Compliant), ELISA
Cylindrospermopsin ELISA
Microcystins/Nodularins DM (EPA ETV) (CCL4) ELISA
Microcystins/Nodularins (ADDA) OH (EPA ETV)
Microcystins/Nodularins (ADDA) SAES, ELISA
Saxitoxins (PSP) (EC 2002/225 Compliant), ELISA
Domoic Acid ELISA
Bisphenol A (BPA), ELISA

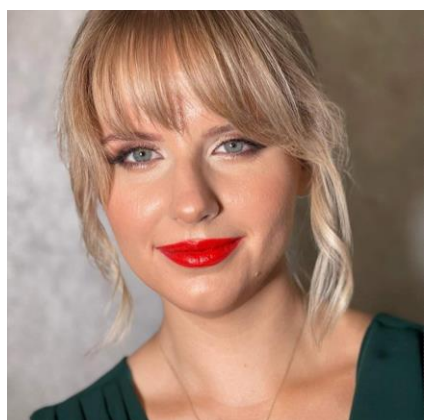
VDR
I'Screen CAP
I'Screen CAP v2
I'Screen AOZ Rapid
I'Screen AMOZ Rapid
I'Screen SEM Rapid
I'Screen AHD Rapid

- **Możliwość opracowania aplikacji dostosowanych do potrzeb laboratorium**
- **Pełna obsługa :**
  - Instalacja
  - Szkolenie
  - Konserwacja
  - Rozwiązywanie problemów



ARGENTA  
EKSPERCI Z MISJĄ

# Dziękujemy za uwagę



**Marta Szlązak**

**e:** [m.szlazak@argenta.com.pl](mailto:m.szlazak@argenta.com.pl)

**m:** 506 381 531