

УДК 615.013

<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-339-6-17-22>Тип статьи: Краткий обзор
Type of article: Brief review**Бабунова В.С.,
Горяинова Г.М.,
Арсеньева Л.В.,
Денисова Е.А.**

ORCID: 0000-0001-5506-9337

ORCID: 0000-0001-8856-0616

ORCID: 0000-0001-6903-3327

ORCID: 0000-0003-1603-403X

ВНИИ ветеринарной санитарии, гигиены и
экологии — филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН.
E-mail: vniivshe@mail.ru

Москва 123022, Российская Федерация

Ключевые слова: биологическая
безопасность, антибиотики,
остаточные количества фторхинолонов,
иммуногистохимическая технология,
специфичность.**Для цитирования:** Бабунова В.С.,
Горяинова Г.М., Арсеньева Л.В.,
Денисова Е.А. Определение остаточных
количеств фторхинолонов в молоке
с помощью иммуногистохимической
технологии. *Аграрная наука*. 2020; 339 (6):
17–20.<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-339-6-17-20>**Конфликт интересов отсутствует****Veronika S. Babunova,
Galina M. Goryainova,
Louise V. Arsenyeva,
Elizaveta A. Denisova**

ORCID: 0000-0001-5506-9337

ORCID: 0000-0001-8856-0616

ORCID: 0000-0001-6903-3327

ORCID: 0000-0003-1603-403X

All-Russian Research Institute of Veterinary
Sanitation, Hygiene and Ecology – a branch of
the Federal State Budget Scientific Institution
"Federal Scientific Center – All-Russian
Research Institute of Experimental Veterinary
Medicine named after K.I. Scriabin and Ya.R.
Kovalenko of the Russian Academy of Sciences**Key words:** biological safety, antibiotics,
residues of fluoroquinolones, immunoisto-
chemical technology specificity.**For citation:** Babunova V.S., Goryaino-
va G.M., Arsenyeva L.V., Denisova E.A.
Determination of residual amounts of
fluoroquinolones in milk by using immuno-
histochemical technology. *Agrarian Science*.
2020; 339 (6): 17–20. (In Russ.)<https://doi.org/10.32634/0869-8155-2020-339-6-17-20>**There is no conflict of interests**

Определение остаточных количеств фторхинолонов в молоке с помощью иммуногистохимической технологии

РЕЗЮМЕ

Фторхинолоны — группа лекарственных веществ, обладающих выраженной противомикробной активностью, широко применяющихся в ветеринарии в качестве антибактериальных лекарственных средств широкого спектра действия. Существует несколько методов определения фторхинолонов (ГОСТ 32797–2014 и др). Для контроля молока можно использовать современный метод на основе иммуногистохимической технологии Rap-dox® Biochip. В данной статье представлены данные по определению чувствительности и специфичности метода по отношению к остаточным количествам фторхинолонов молока. Метод обладает специфичностью и высокой чувствительностью по отношению к фторхинолонам (0,78 мкг/л молока).

Determination of residual amounts of fluoroquinolones in milk by using immunohistochemical technology

ABSTRACT

This article presents materials on the determination of residual amounts of fluoroquinolones in milk by using immunohistochemical technology. The method is specific and highly sensitive to fluoroquinolones (0.78 mcg / l of milk).

Поступила: 5 июня
После доработки: 6 июня
Принята к публикации: 10 июняReceived: 5 June
Revised: 6 June
Accepted: 10 June

Введение

Среди современных антибактериальных химиотерапевтических средств одно из ведущих мест в терапии бактериальной этиологии в медицине и ветеринарии занимает большая группа синтетических антимикробных препаратов широкого спектра действия — фторхинолоны [3], из которых наиболее широкое применение нашли энрофлоксацин, ципрофлоксацин, норфлоксацин, марбофлоксацин, левофлоксацин.

В структуре фторхинолонов всегда присутствует атом фтора и пиперазиновый цикл (рис. 1) [1].

Фторхинолоны проявляют зависимость от концентрации бактерицидную активность, подавляя активность топоизомеразы IV (первый тип), ДНК-гиразы- топоизомеразы II (второй тип), либо сразу ДНК-гиразы+ топоизомеразы IV (третий тип), т. е. ферментов, отвечающих за репликацию, транскрипцию, репарацию и рекомбинацию бактериальной ДНК. [2].

Фторхинолоны активны в отношении следующих микроорганизмов: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma sp*, *Chlamydia sp*, *Chlamydophila sp.*, *Legionella sp.*, Энтеробактерии, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* и др.

Важное свойство фторхинолонов — оптимальная фармакинетика, которая обеспечивает высокую степень биодоступности при применении внутрь и одновременно высокие тканевые и внутриклеточные концентрации — это позволяет добиться высокой эффективности при тяжелых формах заболеваний [2, 4].

Для лечения бактериальных болезней коров используют антибактериальные препараты, в том числе фторхинолоны, которые могут попадать в молоко.

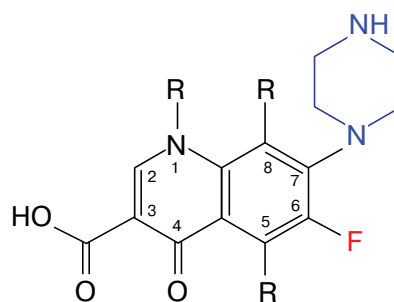
Хотя фторхинолоны считаются малотоксичными соединениями, их остаточные количества могут вызывать у людей (особенно детей и пожилых) различные аллергические реакции, изменять микрофлору организма, вызывать дисбактериоз, способствовать распространению устойчивых видов микрофлоры [5].

В настоящее время требования к содержанию антибиотиков в сыром молоке установлены в Техническом регламенте Таможенного союза 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013) [7]. Приложение 4 ТР ТС 033/2013 включает допустимые уровни для четырех групп антибиотиков — левомицетина (хлорамфеникол), тетрациклиновой группы, стрептомицина и пенициллина. Пределы определения на уровне не выше установленного прописаны для большого количества антибиотиков в перечне, утвержденном Решением Коллегии ЕЭК от 13 февраля 2018 г. № 28. В тоже время в процессе мониторинга образцов молока неоднократно зарегистрированы случаи выявления соединений группы фторхинолонов в молоке. Так, согласно сообщению на сайте Тверского управления Россельхознадзора в декабре 2019 г в ультрапастеризованном образце молока 2,5% жирности, производства ООО «Агромокомбинат Рязанский» выявили ципрофлоксацин и энрофлоксацин.

Существует несколько методов определения фторхинолонов: тест-набор Bioeasy 4in1 ETLF для обнаружения остаточных количеств эритромицина, линкомицина, тилозина и фторхинолонов в молоке и молочной сыворотке иммунохроматографическим экспресс-методом; MILK-QELTT определяет методом конкурентного иммунохроматографического определения остатков препаратов остаточное количество следующих ветеринарных препаратов: Фторхинолоны, Макролиды, Эритромицин, Линкозамиды; Экспресс-тест GarantQuinolones

Рис. 1. Общая структура хинолонов

Fig. 1. General structure of quinolones



для определения антибиотиков группы фторхинолонов в молоке с пределом обнаружения теста 1–12 (мкг/л) и многие другие по такому же принципу определения. ГОСТ 32797–2014 позволяет с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором определять остаточное содержание хинолонов в диапазоне измерений от 1 до 2000 мкг/кг [8].

Современным и высокочувствительным методом определения остаточных количеств фторхинолонов является метод иммуномикрочиповой технологии Randox® Biochip.

В основе технологии лежит конкурентный хемилюминесцентный иммуноанализ. Повышение концентрации антимикробных препаратов в образце приводит к уменьшению связывания антимикробных соединений, меченных пероксидазой хрена (HRP), что в итоге обуславливает снижение интенсивности хемилюминесценции [9–10].

Нами были проведены исследования по определению в молоке остаточных количеств фторхинолонов с помощью метода иммуномикрочиповой технологии. Результаты, полученные в процессе работы, приводятся ниже.

Материалы и методы.

Исследования выполнены в лаборатории ветеринарно-санитарной экспертизы ВНИИВСГЭ — филиал ФНЦ ВИЭВ имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН. С этой целью была использована тест-система Anti Microbial Array II («Randox», Великобритания).

Для проведения исследований в образец стерилизованного молока (проверенного на наличие остаточных количеств антибиотиков) добавляли стандарты либо препараты, содержащие разные соединения из группы фторхинолонов. Подготовленные таким образом образцы центрифугировали при 2000 об./мин. и 4 °С в течение 15 мин (Центрифуга рефрижераторная настольная Velocity 14R), наносили образцы на биочип, туда же — 50 мкл калибратора. Затем инкубация в термощейкере в течение 30 мин при температуре 25 °С и 370 об./мин и добавление 50 мкл рабочего конъюгата в каждую ячейку биочипа. Повторная инкубация в течение 60 мин при температуре 25 °С и 370 об./мин. Проведение быстрых циклов промывки и заполнение биочипов буфером. Затем проводили калибровку по девяти точкам калибровочного диапазона. На биочипы наносили сигнальный реагент и помещали их в темноту на 2 мин. По истечении времени пластины с биочипами помещали в сканирующий хемилюминесцентный Evidence investigator («Randox», Великобритания) и получали результаты с помощью программного обеспечения в автоматическом режиме.

Результаты исследований и обсуждение

В первой серии опытов нами была определена чувствительность метода. Для этого были использованы несколько стандартов (СО) из группы фторхинолонов. Исследования проводили в двух повторностях. Установленные пределы обнаружения были аналогичны заявленным производителем и представлены в таблице 1.

На следующем этапе для подтверждения специфичности метода в стерилизованное молоко с отсутствием антибиотиков вносили различные концентрации антибиотиков, используемых в РФ для лечения мастита и других инфекционных заболеваний КРС. Полученные данные представлены в таблице 2.

Как видно из приведенных данных, панель Anti Microbial Array II определяет различные соединения группы фторхинолонов как первого так и последующих поколений. При этом определена строгая специфичность именно к фторхинолонам. При нанесении на биочип молока с антибиотиком из группы сульфаниламидов это антимикробное соединение не определилось.

Заключение

Безусловно, фторхинолоны продолжают оставаться препаратами первой линии при многих заболеваниях бактериальной этиологии. Фторхинолоны обладают высокой биодоступностью, быстро всасываются, создают высокие концентрации в легочной ткани, бронхолегочном секрете, в клетках организма. Необходимо соблюдать режимы выдерживания пролеченных животных с целью не допустить попадания остаточных количеств фторхинолонов в молоко и в конечном счете человеку. Для контроля молока на данный показатель использование метода иммуномикрочиповой технологии Randox® Biochip очень перспективно. Результаты будут известны в течение ≈ 5 ч. Чувствительность метода составляет 0,78 мкг/л молока.

Таблица 1. Предел обнаружения СО фторхинолонов тест-системой Anti Microbial Array II

Table 1. Detection limit of fluoroquinolone CO with Anti Microbial Array II test system

| Использованные стандарты | Предел обнаружения, заявленный производителем, мкг/л | Предел обнаружения, экспериментально установленный, мкг/л |
|--|--|---|
| Стандарт Норфлоксацина-D5 гидрат, > 99%. Производитель WITEGA Laboratorien | 0,78 | 0,75 \pm 0,02 |
| Налидиксовая кислота-D5, > 99%. Производитель WITEGA Laboratorien | 0,78 | 0,64 \pm 0,11 |
| Пефлоксацин-D5, > 99%. Производитель WITEGA Laboratorien | 0,78 | 0,70 \pm 0,04 |
| Энрофлоксацин-D5 гидрохлорид, > 99%. Производитель WITEGA Laboratorien | 0,78 | 0,64 \pm 0,11 |
| Norflloxacin. Производство Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation | 0,78 | 0,70 \pm 0,05 |
| Norflloxacin, Sigma-Aldrich, CAS-Номер.:70458–96–7 | 0,78 | 0,77 \pm 0,02 |
| Enrofloxacin, Sigma-Aldrich, CAS Number:93106–60–6 | 0,78 | 0,69 \pm 0,06 |

Таблица 2. Результаты введения в стерилизованное молоко антимикробных соединений

Table 2. Results of the infusion of antibiotics into sterilized milk

| № | Внесенный в молоко ветеринарный препарат | Действующее вещество | Регистрация на панели Anti Microbial Array II |
|----|--|----------------------------------|---|
| 1 | Энрофлон 5%, иностранное унитарное предприятие «ВИК-здоровье животных» | Энрофлоксацин гидрохлорид | + |
| 2 | Байтрил 10%, ЗАО «Байер» | Энрофлоксацин | + |
| 3 | Лексофлон, ООО «Нита-фарм» | Левовфлоксацин | + |
| 4 | Ципромаг 10%, ЗАО «Мосагроген» | Ципрофлоксацин | + |
| 5 | Энромаг, ЗАО «Мосагроген» | Энрофлоксацин гидрохлорид | + |
| 6 | Марбоцин, «S.P. VETERINARIA, S.A.», Испания | Марбофлоксацин | + |
| 7 | Моксифлоксацин, ООО «НПК «Асконт+» | Моксифлоксацин гидрохлорид | + |
| 8 | Энростин, ООО «АПИ-САН» | Колистин сульфат и энрофлоксацин | + |
| 9 | Марфлоксин 2% раствор для инъекций, «КРКА, д.д., Ново место», Словения | Марбофлоксацин | + |
| 10 | Триметин порошок, ООО НПК «Асконт+» | Сульфаметоксазол и триметоприм | – |

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.

- Бузмакова У.А., Кудряшова О.С. Химическая классификация и методы определения антибиотиков. // Вестник пермского университета, Том 8, вып. 1, 2018, С. 6–28
- Чарушин В.Н., Носова Э.В., Липунова Г.Н., Чупахин О.Н. Фторхинолоны. Синтез и применение. М., Физматлит, 2013. — 320 с.

- Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Фторхинолоны. М.: Биоинформ; 1995
- Падейская Е.Н. //Антибиотики и химиотерапия, 1998, Т. 43, № 11, С. 38–43.
- Доротова А. Хрущева Е. Практическая реализация методов определения антибиотиков в молоке. // Молочная промышленность. — 2009. — № 9 — С. 46–48.

6. Ушкалова Е.А., Зырянов С.К. Ограничения на применение фторхинолонов при неосложненных инфекциях и проблемы безопасности. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, Т.19, № 3, 2017, С. 208–212.

7. Технический регламент Таможенного союза 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции».

8. ГОСТ 32797–2014 Продукты пищевые, продовольственное сырье. Метод определения остаточного содержания хинолонов с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (с Поправками)

9. Бабунова В.С., Светличкин В.В., Карташова В.М. Опре-

деление Бета-лактамов антибиотиков в молоке с помощью тест-системы Beta-Lactam array plus и иммуномикрочипового анализатора Evidence Investigator "Randox" // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии, № 4 (24), 2017. — с. 31–35.

10. Бабунова В.С., Денисова Е.А., Светличкин В.В. Определение остаточных количеств антибиотиков в молоке с помощью тест-систем иммуномикрочипового анализатора EVIDENCE INVESTIGATOR "RANDOX" // Международная научно-практическая конференция, посвященная 95-летию Армавирской биофабрики, 14–16 сентября 2016 г, с. 375–382.

ОБ АВТОРЕ:

Бабунова Вероника Сергеевна, канд. вет. наук лаборатории ветеринарно-санитарной экспертизы, ORCID: 0000-0001-5506-9337

Горяйнова Галина Михайловна, канд. биол. наук лаборатории ветеринарно-санитарной экспертизы, ORCID: 0000-0001-8856-0616

Арсеньева Луиза Владимировна, канд. биол. наук лаборатории ветеринарно-санитарной экспертизы, ORCID: 0000-0001-6903-3327

Денисова Елизавета Аркадьевна, доктор биол. наук лаборатории ветеринарно-санитарной экспертизы, ORCID: 0000-0003-1603-403X

ABOUT THE AUTHOR:

Veronika S. Babunova, Cand. Vet. Sci., Senior Researcher Laboratory of veterinary and sanitary expertise, ORCID: 0000-0001-5506-9337

Galina M. Goryainova, Cand.Biol.Sci., Senior Researcher Laboratory of veterinary and sanitary expertise, ORCID: 0000-0001-8856-0616

Louise V. Arsenyeva, Cand.Biol.Sci., Senior Researcher Laboratory of veterinary and sanitary expertise, ORCID: 0000-0001-6903-3327,

Elizaveta A. Denisova, Doctor Biol.Sci., Senior Researcher Laboratory of veterinary and sanitary expertise, RCID: 0000-0003-1603-403X

НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ • НОВОСТИ •

В Сахалинской области – рекордные темпы роста производства молока

В начале летне-пастбищного периода в сельскохозяйственных предприятиях Сахалинской области средний удой от одной коровы составил более 20 кг молока. Это самый высокий показатель за последние несколько лет. Например, в 2019 году такого результата аграриям региона удалось достичь только в середине июля. В текущем году сахалинцы получили столь высокие показатели благодаря качественной и своевременной работе специалистов агрономической и зоотехнической служб. Они смогли выйти на пастбища без снижения продуктивности, максимально используя биологически ценный и дешевый пастбищный корм.

К началу летнего сезона специалисты проверили и, при необходимости, отремонтировали оборудование летних доильных площадок, провели все нужные обработки и вакцинации, произвели подкормку пастбищ минеральными удобрениями.

Хозяйства региона, с целью для поддержания молочной продуктивности коров, проводят мероприятия по рациональному использованию пастбищ – поочередное использование пастбищных участков, подкашивание нестравленной зеленой массы. Для подкормки скота предприятия используют концентраты и минеральные кормовые добавки.

Эксперты отмечают, что погодные условия – прохладный май и нежаркий июнь – также благоприятно сказываются на молочной продуктивности коров, которые чувствуют себя крайне комфортно (особенно благодаря отсутствию гнуса).

По статистике, в Дальневосточном федеральном округе Сахалинская область занимает 2 место по суточной молочной продуктивности коров (первое место занима-

ет Приморский край, а замыкает тройку лидеров Амурская область). Наибольшего результата по надоям достигло АО «Совхоз Южно-Сахалинский» – 24,2 кг в сутки от одной фуражной коровы, за ним следует ООО «Грин Агро-Сахалин» – 24 кг (безвыгульное содержание поголовья), третье место занимает СПК «Соколовский» – 22,2 кг.

В настоящее время в предприятиях Сахалинской области содержатся 4488 молочных коров, что на 786 голов выше уровня прошлого года. Увеличение поголовья в регионе аналитики связывают с вводом нетелей в основное стадо в предприятиях, реализующих инвестиционные проекты – ООО «Грин Агро-Сахалин», АО «Совхоз Корсаковский». По статистике, к началу июня поголовье крупного рогатого скота в Сахалинской области достигло 27,6 тыс. голов (на 6,1% больше, по сравнению с аналогичной датой 2019 года).

По прогнозу экспертов, производство молока в области в этом году составит более 43 тыс. т, что выше на 5% прошлогодних показателей.

Всего в РФ, по оперативным данным Минсельхоза России, суточный объем реализации молока сельскохозяйственными организациями по состоянию на 1 июня 2020 года составил 51,7 тыс. т, что на 5,2% больше аналогичного показателя в 2019 году (2,5 тыс.т).

